



Universidad de Guanajuato

Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

Posgrado en Química

**“Estudio Analítico de las
Modificaciones de Ácidos Nucleicos”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN QUÍMICA**

Presenta:

Adolfo López Torres

Guanajuato, Gto., 27 de Junio 2014



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
POSGRADO EN QUÍMICA

Guanajuato, Gto., 27 de Junio de 2014

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título “Estudio analítico de las modificaciones de ácidos nucleicos”. Realizado por el Q.F.B. Adolfo López Torres en el laboratorio del Departamento de Química de la Unidad Pueblito de Rocha de la Universidad de Guanajuato, para obtener el grado de Doctor en Química bajo la dirección del Dr. Kazimierz Wrobel, la Dra. Katarzyna Wrobel y el Dr. J. Félix Gutiérrez Corona.

“La verdad os hará libres”

Dr. Kazimierz Wrobel

Dra. Katarzyna Wrobel

Dr. J. Félix Gutiérrez Corona

Miembros del jurado asignados para el examen que para obtener el grado de Doctor en Química presenta el Q.F.B. Adolfo López Torres.

Dr. Jorge Albino López Jiménez

Dra. Teresa Imelda Saucedo Medina

Dr. Silvio Zaina

Dra. Vianey Graciela Olmedo Monfil

Dr. David Muñoz Rodríguez

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN	XI
CAPÍTULO IV. INTRODUCCIÓN GENERAL AL PROYECTO.....	1
IV.1. Ácidos nucleicos.....	1
IV.2. Mecanismos de regulación de expresión de genes	2
IV.2.1. Factores genéticos.....	2
IV.2.2. Eventos epigenéticos.....	3
IV.2.2.1. Modificaciones covalentes en histonas	4
IV.2.2.2. Metilación de ADN	6
IV.3. Revisión bibliográfica de procedimientos de análisis de metilación de ADN	8
IV.3.1. Determinación del grado de metilación por procedimientos biológicos.....	9
IV.3.1.1. Metilación en secuencias específicas de promotores de genes	9
IV.3.1.2. Metilación global en ADN	11
IV.3.2. Determinación del grado de metilación en ADN por procedimientos analíticos	12
IV.3.2.1. Metilación global en ADN	12
IV.3.2.2. Metilación en promotores de genes.....	15
IV.4. Modificaciones covalentes en ARN	16
IV.4.1. Metilación en el C5 de la citosina en ARN.....	17
IV.4.1.1. Determinación del grado de metilación global en ARN	17
IV.4.1.2. Presencia de 5mC en secuencias específicas de ARN	18
CAPÍTULO V. OBJETIVOS	19
V.1. Objetivo general.....	19
V.2. Objetivos específicos	19
CAPÍTULO VI. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
VI.1. Equipo de laboratorio	21
VI.1.1. Instrumentación analítica	21

VI.1.2. Equipo utilizado para procesamiento de muestras y/o preparación de reactivos	21
VI.2. Reactivos y estándares	22
VI.2.1. Reactivos para extracción de ácidos nucleicos	22
VI.2.2. Reactivos para hidrólisis de ADN hasta nucleósidos	22
VI.2.3. Reactivos y estándares para la determinación de metilación global en ADN y ARN por HPLC	22
VI.2.4. Reactivos y estándares para la determinación de metilación global en ADN por GC-MS/MS	23
VI.3. Software	23
VI.4. Muestras	23
CAPÍTULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES	25
VII.1. Adaptación y aplicación del procedimiento HPLC-DAD para determinar el grado de metilación global en el ADN de muestras biológicas complejas	25
VII.1.1. Introducción	25
VII.1.2. Objetivo específico	25
VII.1.3. Resultados y discusión	26
VII.1.3.1. Estudio de las condiciones de hidrólisis enzimática	26
VII.1.3.2. Modificación de las condiciones de separación cromatográfica (procedimiento HPLC-DAD).	27
VII.1.4. Conclusiones	32
VII.2. Determinación del grado de metilación en ADN por HPLC-FLD	33
VII.2.1. Introducción	33
VII.2.2. Objetivo específico	34
VII.2.3. Resultados y discusión	35
VII.2.3.1. Estudio de las condiciones de reacción de ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos con 2-bromoacetofenona.	35
VII.2.3.2. Selección de las condiciones de separación de C, dC, 5mC y 5mdC derivatizadas, mediante HPLC-FLD.	38
VII.2.3.3. Procedimiento de calibración de C, dC, 5mC y 5mdC derivatizadas y evaluación de sus parámetros.	40

VII.2.3.4. Análisis de muestras reales por HPLC-FLD	45
VII.2.3.5. Conclusiones	49
VII.3. Avances metodológicos en el análisis de metilación en el C5 de la citosina de ARN	51
VII.3.1. Introducción.....	51
VII.3.2. Objetivo específico	52
VII.3.3. Resultados y discusión.....	52
VII.3.3.1. Análisis de metilación total en ARN.....	53
VII.3.3.2. Análisis de metilación global en ADN y ARN total.	59
VII.3.3.3. Conclusiones	64
VII.4. Estudio analítico de otras modificaciones en el C5 de la citosina de ADN	65
VII.4.1. Introducción.....	65
VII.4.2. Objetivo específico	68
VII.4.3. Resultados y discusión.....	68
VII.4.3.1. Separación y detección de 5hmdC por HPLC-DAD.....	68
VII.4.3.2. Análisis de 5hmdC por HPLC-FLD.....	69
VII.4.3.3. Identificación de 5hmdC como producto de oxidación mediado por reacciones Fenton	70
VII.4.4. Conclusiones.....	72
VII.5. Estudio sistemático de la hidrólisis ácida asistida por microondas para la determinación de metilación global del ADN.	74
VII.5.1. Introducción.....	74
VII.5.2. Objetivo específico	74
VII.5.3. Resultados y discusión.....	75
VII.5.3.1. Desarrollo de las condiciones de separación de nucleobases por HPLC-DAD.....	75
VII.5.3.2. Aplicación de un diseño experimental para establecer las condiciones de hidrólisis de ADN asistida por microondas.	76
VII.5.3.3. Análisis comparativo de diferentes procedimientos de la hidrólisis del ADN.....	79
VII.5.4. Conclusiones.....	81

VII.6. Desarrollo y aplicación de un procedimiento de cromatografía de gases con monitoreo de reacciones múltiples (GC-QqQ-MS/MS) para la evaluación de metilación global del ADN.....	83
VII.6.1. Introducción.....	83
VII.6.2. Objetivo específico.....	84
VII.6.3. Resultados y discusión.....	84
VII.6.3.1. Selección de las condiciones de derivatización de nucleobases para su análisis por GC-MS.....	84
VII.6.3.2. Desarrollo de las condiciones de separación y detección de derivados volátiles de nucleobases por GC-QqQ-MS/MS.....	86
VII.6.3.3. Procedimiento de calibración de C y 5mC mediante GC-QqQ-MS/MS y evaluación de sus parámetros.....	88
VII.6.4. Conclusiones.....	90
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES.....	91
CAPÍTULO IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
CAPÍTULO X. ANEXOS.....	106

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Procedimientos analíticos utilizados en el análisis del porcentaje de metilación global en ADN.....	13
Tabla 2. Análisis de metilación global de ADN por HPLC-DAD en muestras de gusanos de tierra.....	30
Tabla 3. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración de C, dC, 5mC y 5mdC derivatizadas con 2-bromoacetofenona en el procedimiento de HPLC-FLD propuesto.	42
Tabla 4. Soluciones de calibración utilizadas para el análisis del porcentaje de metilación en ADN por HPLC-FLD.	44
Tabla 5. Porcentaje de metilación del ADN evaluado en diferentes tipos de muestras biológicas utilizando el procedimiento propuesto de HPLC-FLD y por el procedimiento establecido HPLC-DAD[111].	48
Tabla 6. Porcentajes de 5mC evaluados en plantas utilizando los dos métodos de extracción y el procedimiento HPLC-FLD (tres replicas independientes).....	58
Tabla 7. Cantidades de ADN y ARN estimadas en cada extracto.....	59
Tabla 8. Diseño de Box Benhken aplicado al estudio de hidrólisis de ADN asistido por microondas.	77
Tabla 9. Alturas de los picos cromatográficos de las nucleobases (HPLC-DAD, 277 nm), obtenidas utilizando diferentes condiciones de hidrólisis con ácido fórmico.	78
Tabla 10. Señales analíticas (altura de picos cromatográficos) obtenidos para cinco nucleobases en hidrolizados del ADN de salmón aplicando diferentes condiciones de hidrólisis y llevando separación por HPLC-DAD a 277 nm.	80
Tabla 11. Señales analíticas (área de pico) de nucleobases (hidrolizados de 10 µg de ADN de Salmón) derivatizadas obtenidas en cada medio de reacción a 30 °C durante 1 hora.	86
Tabla 12. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración de C y 5mC en el procedimiento GC-QqQ-MS/MS propuesto.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ADN y ARN.	1
Figura 2. Estructura de los monómeros presentes en el ADN y el ARN.	2
Figura 3. A) Modificaciones covalentes en ADN e histonas. B) Conformación de la cromatina.	3
Figura 4. Mecanismo hipotético (vía activa) de desmetilación del ADN	8
Figura 5. Diversidad de modificaciones en ribonucleósidos.....	16
Figura 6. Principio de identificación de 5mC en secuencias específicas	18
Figura 7. Cromatograma típico de nucleósidos obtenidos de hidrolizados ADN de gusano de tierra obtenido del sitio 5.	30
Figura 8. Cromatograma típico de nucleósidos obtenidos de hidrolizados ADN de plántulas de agave.....	31
Figura 9. Cromatograma típico de nucleósidos obtenidos de hidrolizados ADN de embriones de <i>Coffea canephora</i>	31
Figura 10. Esquema de reacción de 2-bromoacetofenona dirigida a las entidades con residuos citosínicos.....	34
Figura 11. Espectros de excitación A) y emisión B) de 5-metil-2'-desoxicitidina derivatizada con 2-bromoacetofenona.....	36
Figura 12. Efecto de: A) la concentración de ácido acético; B) de la concentración de 2-bromoacetofenona; y C) temperatura y tiempo de reacción (-●- 60 °C; -■- 80 °C; y -▲-) sobre la magnitud de la señal analítica de 5mdC derivatizada (645 ng/mL).....	37
Figura 13. Cromatogramas obtenidos con el procedimiento HPLC-FLD propuesto en este trabajo: soluciones de calibración conteniendo C, dC, 5mC y 5mdC derivatizadas, así como los nucleósidos no derivatizados U, G, dG, dT, A, dA; cada uno de ellos en seis niveles de concentración 0, 1.61, 3.22, 16.1, 64.5 y 161 ng/mL.	40
Figura 14. Esquema de preparación de las soluciones de calibración y la concentración final de cada compuesto.	41
Figura 15. Función de regresión lineal que relaciona las áreas de pico dC/5mdC con su relación molar dC/5mdC obtenida en el proceso de calibración.	44
Figura 16. Análisis de ADN de salmón hidrolizado hasta nucleósidos mediante el procedimiento HPLC-FLD: A) cromatogramas de obtenidos a partir de 25 (---), 50 (—) y	

100 (---) ng de ADN (el cromatograma del blanco se muestra en línea punteada); B) áreas pico calculadas de 5mdC y el porcentaje de metilación global de ADN (con sus respectivas desviaciones estándar de tres determinaciones independientes) obtenidas de 25, 50 y 100 ng de ADN.....	45
Figura 17. Cromatogramas obtenidos por el procedimiento propuesto de HPLC-FLD correspondiente a hidrolizados de ácidos nucleicos obtenidos de <i>L. sativum</i> (sin exponer a cadmio) sin (—) y con (---) adición de estándares de C, dC, 5mC, 5mdC (64.5, 16.1, 1.61 y 1.61 ng/mL, respectivamente).	47
Figura 18. Preparación de soluciones de calibración para determinar el porcentaje de 5mC en ARN total.....	54
Figura 19. Función de regresión lineal para determinar el porcentaje de 5mC.	55
Figura 20. Cromatogramas HPLC-FLD normalizados con respecto a C, correspondientes a soluciones de calibración de 0.95 (---), 1.42 (—) y 1.89% (—) de 5mC.	55
Figura 21. Cromatograma HPLC-FLD correspondiente a extractos de ARN total de plantas obtenidos con TRIZOL: control (—) y expuestos a 1 mg/L de Se(IV) (---).	56
Figura 22. Cromatogramas HPLC-FLD de muestras de planta control (—) y expuesta a 1 mg/L de Se(IV) (---), extraídas con el método 1 (ADN + ARN): a) normalizados con respecto a C para visualizar metilación de ARN; b) normalizados con respecto a dC para visualizar la metilación de ADN.	57
Figura 23. Cromatogramas HPLC-FLD para las soluciones de calibración utilizadas para la evaluación simultánea de metilación global en ADN y ARN total: a) cromatogramas normalizados con respecto a C para visualizar la metilación en ARN (0.95, 1.42 y 1.89% de 5mC); b) cromatogramas normalizados con respecto a dC para visualizar la metilación en ADN (9.47, 14.25 y 19.05% de 5mdC).	60
Figura 24. Resultados de metilación global en ADN (a y c) y ARN total (b y d) obtenidos de berros expuestos a diferentes concentraciones de iones estresantes.....	63
Figura 25. Análisis de correlación de metilación global en ADN y ARN total evaluado en nueve condiciones de cultivos de <i>L. sativum</i> expuestas a diferentes concentraciones de Cd(II) y Se(IV).	63
Figura 26. Comparación de los métodos de secuenciación a) oxBS-Seq, b) BS-Seq y c) TAB-Seq.....	66

Figura 27. Cromatograma de estándares de 12 nucleósidos, obtenido utilizando la columna de núcleo sólido.....	69
Figura 28. Cromatogramas en fase inversa de estándar de 5hmdC (---), 5mdC (···) y producto de la reacción Fenton con 5mdC (—).	71
Figura 29. Cromatograma en fase inversa correspondiente a 5mdC y sus productos de oxidación inducidos por la reacción Fenton a diferentes concentraciones de Cu(II), peróxido de hidrógeno y ácido ascórbico: (---) 40 μ M, 320 μ M, 3.2 mM; (—) 200 μ M, 1600 μ M, 16 mM; y (···)400 μ M, 3200 μ M, 32 mM, respectivamente.....	72
Figura 30. Cromatograma típico de hidrolizados del ADN de salmón obtenido con el procedimiento clásico.	76
Figura 31. Cromatogramas (HPLC-DAD) de hidrolizados del ADN de salmón obtenidos con los procedimientos: hidrólisis enzimática (---), hidrólisis química clásica (···) e hidrólisis con ácido fórmico asistida por microondas (—)	81
Figura 32. Espectros de masa de nucleobases como derivados de mono, bis o tris trimetilsilano.....	85
Figura 33. Cromatograma de GC-MS en modo SIM obtenido para los derivados de nucleobases en hidrolizado del ADN de Salmón.	86
Figura 34. Cromatograma GC-MS en modo SIM obtenido para derivados de nucleobases en hidrolizado de ADN de Salmón.....	87
Figura 35. Efecto de la energía de colisión utilizada en la detección por espectrometría de masas en modo de MRM (254 \rightarrow (238+184)) sobre la relación señal/ruido obtenida para 100 femtomoles de 5mC.....	88
Figura 36. Cromatogramas obtenidos con el procedimiento GC-QqQ-MS/MS en modo MRM propuesto en este trabajo: soluciones de calibración conteniendo C, 5mC derivatizadas, cada uno de ellos en cuatro niveles de concentración 0, 5, 10 y 100 femtomoles inyectados.	89

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
2D-TLC	Cromatografía en capa fina de dos dimensiones
5caC	5-carboxicitosina
5cadC	5-carboxi-2'-desoxicitosina
5fC	5-formilcitosina
5fdC	5-formil-2'-desoxicitosina
5fdU	5-formil-2'-desoxiuracilo
5hmC	5-hidroximetilcitosina
5gmdC	5-glucosilmetoxi-2'-desoxicitosina
5hmdC	5-hidroximetil-2'-desoxicitidina
5hmdCTP	5-hidroximetil-2'-desoxicitosina trifosfato
5hmU	5-hidroximetiluracilo
5mC	5-metilcitosina
5mdC	5-metil-2'-desoxicitidina
5mdCMP	5-metil-2'-desoxicitosina monofosfato
A	Adenosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BER	Reparación por escisión de bases
BODIPY FL EDA	4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propionil etilendiamine
BS-Seq	Secuenciación de ADN previamente tratado con bisulfito
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
cDNA	ADN de cadena complementaria
CE	Electroforesis capilar
CID	Disociación de iones inducidas por colisiones (espectrometría de masas)
dA	2'-desoxiadenosina
DAD	Detector por espectrofotometría UV (detector de arreglo de diodos)
dAMP	2'-desoxiadenina monofosfato
dC	2'-desoxicitidina
dCMP	2'-desoxicitosina monofosfato
dG	2'-desoxiguanosina
dGMP	2'-desoxiguanina monofosfato
DNMT	ADN metil-transferasas
dNTP's	2'-desoxinucleótidos trifosfato
dT	2'-desoxitimidina
dTMP	2'-desoxitimina monofosfato
dU	2'-desoxiuridina
EDTA	Ácido etilendiaminotetrácetico

FAD ⁺	Dinucleótidos de flavín-adenina
FLD	Detector por espectrofluorimetría
G	Guanosina
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas
HAc	Ácido acético
HILIC	Cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica
HILIC-MS	Cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica con detección de espectrometría de masas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica (detector de arreglo de diodos)
HPLC-FLD	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofluorimétrica
LC-MS	Cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas
LD	Límite de detección
MALDI-TOF-MS	Desorción/ionización en matriz asistida por láser con detector de espectrometría de masas de tiempo de vuelo
MCP	Amplificación por PCR de las islas metiladas dCpdG
MRM	Monitoreo de reacción múltiples
MSP	Methyl-specific PCR
oxBS-Seq	Secuenciación de ADN previamente oxidado seguido de su tratamiento con bisulfito
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SIM	Monitoreo de ion selectivo
T	Timina
TAB-Seq	Secuenciación de ADN previamente glicosilado y oxidado enzimáticamente, seguido de su tratamiento con bisulfito
TCMS	Trimetilclorosilano
TDG	Timina ADN glicosilasa
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Cromatografía en capa fina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	Uridina

RESUMEN

El término epigenética se refiere al área de estudio enfocada a los fenómenos transcripcionales que dependen de la estructura de la cromatina, de tal manera que la conformación relajada de la cromatina permite la actividad transcripcional mientras que la disposición condensada conduce su represión. Uno de los mecanismos moleculares mejor caracterizados que potencialmente influye en la estructura de la cromatina, consiste en la adición del grupo metilo al carbono 5 del anillo de la pirimidina contenida en la citosina del ADN, denominado metilación del ADN. El estudio de los cambios en los niveles de metilación en el ADN se ha convertido en la clave para entender los eventos epigenéticos. El grado de metilación del ADN es evaluado en secuencias genómicas específicas o de manera global. La metilación en secuencias de ADN permite averiguar los mecanismos epigenéticos involucrados en los procesos celulares. Los patrones de metilación global permiten estudiar los eventos epigenéticos a gran escala para evaluar la respuesta de los organismos a condiciones ambientales y/o patológicas. En el análisis de metilación global del ADN se emplean técnicas biológicas y de análisis instrumental. Los procedimientos analíticos ofrecen más ventajas en comparación con los procedimientos biológicos en términos de sensibilidad, selectividad y reproducibilidad. Debido a esto, existe una alta demanda de procedimientos analíticos adecuados para su uso en laboratorios de investigación y clínicos, ya sea para conocer la respuesta de los organismos a diversos factores medio ambientales y/o con fines de diagnóstico y/o pronóstico de diferentes patologías. Por otro lado, en ARN se ha descrito la presencia de 5-metilcitosina, y aunque se cree que esta modificación está implicada en eventos epigenéticos, su estudio se ha visto limitado debido a la carencia de procedimientos analíticos adecuados. La intención de este trabajo es contribuir con el desarrollo de procedimientos analíticos para la determinación del porcentaje de metilación global en el ADN y el ARN, asegurando alta sensibilidad y selectividad, buena precisión, alta confiabilidad de los resultados y rapidez del análisis. Por ello, el presente trabajo se enfocó al, pre-tratamiento y digestión de muestras de ácidos nucleicos, el estudio del marcaje molecular y/o derivatización de productos de hidrólisis de ácidos nucleicos, su separación cromatográfica y su detección/cuantificación.

El capítulo I es la introducción general al proyecto, donde se explica el concepto de epigenética, la importancia de la determinación de la metilación en el ADN para entender los eventos epigenéticos y las ventajas de los procedimientos analíticos para medir este parámetro. En el capítulo II se plantea el objetivo general del proyecto así como los objetivos específicos. El capítulo III describe la instrumentación, reactivos, estándares, las muestras y programas utilizados para llevar a cabo este trabajo. El capítulo IV está compuesto por seis secciones que corresponden a los objetivos específicos del capítulo II. En cada sección se incluye una pequeña introducción específica al tema en cuestión, el objetivo particular, los resultados y las conclusiones parciales. En los resultados de cada sección se describen detalladamente los procedimientos analíticos haciendo énfasis en su carácter cuantitativo, la exactitud y reproducibilidad de éstos, así como la discusión e interpretación de los resultados. En la primera sección de resultados de este trabajo, se modificó el procedimiento basado en la separación de nucleósidos por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector espectrofotométrico de arreglo de diodos (HPLC-DAD) desarrollado previamente en el laboratorio, con la intención de su exitosa aplicación en el análisis de metilación global de ADN de muestras con matriz químicamente compleja. Para esto se utilizaron extractos de ácidos nucleicos obtenidos de lombrices de tierra, plántulas de agaves y diferentes estadios de embriones de *Coffea canephora*. Cabe señalar que el procedimiento HPLC-DAD previamente establecido fue destinado al análisis de extractos del ADN de líneas celulares, pero en la aplicación a muestra más complejas la separación de nucleósidos no fue satisfactoria, por lo que en este trabajo se llevó a cabo la modificación de las condiciones cromatográficas. En particular se utilizó mayor fuerza iónica, una columna cromatográfica más larga y un gradiente de modificador orgánico más lento. Con estas modificaciones se logró separar los analitos de interés (dC y 5mdC) para determinar el porcentaje de metilación en ADN en extractos de plantas, fluidos biológicos y tejidos animales. En la segunda sección de resultados, se describe el desarrollo de un nuevo procedimiento analítico confiable para el análisis de metilación global del ADN, basado en cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofluorimétrica (HPLC-FLD). En este caso la determinación del grado de metilación en ADN se llevó a cabo empleando la 2-bromoacetofenona para el marcaje molecular específico de entidades citosínicas presentes en nucleósidos (C, dC, 5mC y 5mdC), su separación y detección por

HPLC-FLD. Las condiciones de reacción, el uso de una columna monolítica para lograr la separación de los cuatro compuestos hasta línea base y la detección espectrofluorimétrica permitieron obtener límites de detección para los cuatro compuestos de 14.4 a 22.7 femtomoles, los cuales son equiparables con aquellos límites de detección obtenidos reportados con el uso de detectores de espectrometría de masas. En la aplicación del procedimiento HPLC-FLD para micromuestras de ácidos nucleicos, los resultados fueron consistentes con aquellos obtenidos mediante el procedimiento HPLC-DAD que utiliza mayor cantidad de ADN. Aprovechando que en el procedimiento HPLC-FLD permite la separación y cuantificación de los cuatro compuestos C, dC, 5mC y 5mdC, en la tercera sección de los resultados se demostró que con este procedimiento se puede determinar simultáneamente la metilación global en ADN y ARN total en una sola corrida cromatográfica. Además, se demostró que el ARN co-extraído en purificaciones de ADN es representativo del ARN total de la muestra. Hay que resaltar que éste fue el trabajo pionero donde se llevó a cabo la determinación de metilación global en ARN total por primera vez, mostrando que este parámetro puede proveer información biológica relevante. Con base a los resultados obtenidos se concluyó que la 5mC podría estar implicada en la modulación de los eventos epigenéticos ya que se observó una correlación negativa entre la metilación global de ADN y ARN en extractos obtenidos de plantas de *L. sativum* expuestas a diferentes condiciones de estrés abiótico. En la cuarta sección de los resultados se demostró que las especies reactivas de oxígeno generadas por la reacción Fenton a partir de Cu(II)/peróxido de hidrógeno/ácido ascórbico pueden oxidar la 5mdC para dar lugar a la 5hmdC (considerada la sexta base del ADN y que probablemente está asociada en los mecanismos de desmetilación del ADN). La quinta sección de los resultados describe el desarrollo de un procedimiento de hidrólisis química del ADN asistida por microondas. El procedimiento requiere de menor tiempo de digestión y es más sencillo que la hidrólisis enzimática. Además, el procedimiento es tan robusto que variaciones en las condiciones de hidrólisis (18.3 a 23.5 M ácido fórmico, 180 – 190 °C, 10 – 15 min) permite obtener el mismo resultado en cuestión de rendimiento y grado de metilación evaluado. También se demostró que los rendimientos de digestión obtenidos con este procedimiento y mediante la hidrólisis enzimática son comparables y que no hay diferencias significativas entre los resultados de metilación global de ADN entre los dos pre-tratamientos de muestra. En la

sexta y última sección de resultados se implementó un procedimiento que permite la determinación de metilación de ADN mediante cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas con triple cuadrupolo (GC-QqQ-MS/MS). Para esto el ADN fue hidrolizado hasta nucleobases y derivatizado para obtener productos volátiles termoestables de trimetilsilano. El estudio sistemático de las condiciones cromatográficas permitió separar los analitos en menos de 8 minutos, y la detección en modo monitoreo de reacciones múltiples permitió obtener límites de detección de 0.46 y 0.41 femtomol para citosina y 5-metilcitosina, respectivamente. La aplicación de este procedimiento en muestras reales podría permitir evaluar el grado de metilación en ADN de pequeñas cantidades de extractos o en sistemas biológicos con muy bajos porcentajes de metilación. En general, este trabajo de tesis permitió generar una serie de conclusiones que se describen en el capítulo V. El capítulo VI incluye las referencias bibliográficas citadas en este escrito. Por último, el capítulo VII presenta la evidencia de que los resultados de este proyecto de investigación se publicaron en artículos de revistas internacionales indizadas que están incluidas en Thompson Reuter Journal Citation Reports.

CAPÍTULO IV. INTRODUCCIÓN GENERAL AL PROYECTO

IV.1. Ácidos nucleicos

El término “ácidos nucleicos” se refiere al ácido desoxirribonucleico (ADN) y al ácido ribonucleico (ARN), ambos son polímeros lineales formados por bases nitrogenadas unidas a un esqueleto de pentosa – fosfato (figura 1). En concreto, las unidades básicas para el ADN son la adenina, la guanina, la citosina, la timina, mientras que para el ARN estas son la adenina, la guanina, la citosina y el uracilo. Las bases nitrogenadas están unidas mediante el enlace glicosídico con la desoxirribosa en el ADN o con la ribosa en el ARN, formando desoxirribonucleósidos y ribonucleósidos respectivamente. Finalmente, al formarse la unión de tipo fosfodiéster entre la desoxirribosa o la ribosa y el fosfato, se obtienen monómeros de los dos ácidos nucleicos, denominados desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos respectivamente. Como ejemplo, en la figura 2 se presenta la estructura de los monómeros presentes en el ADN y el ARN [1-5].

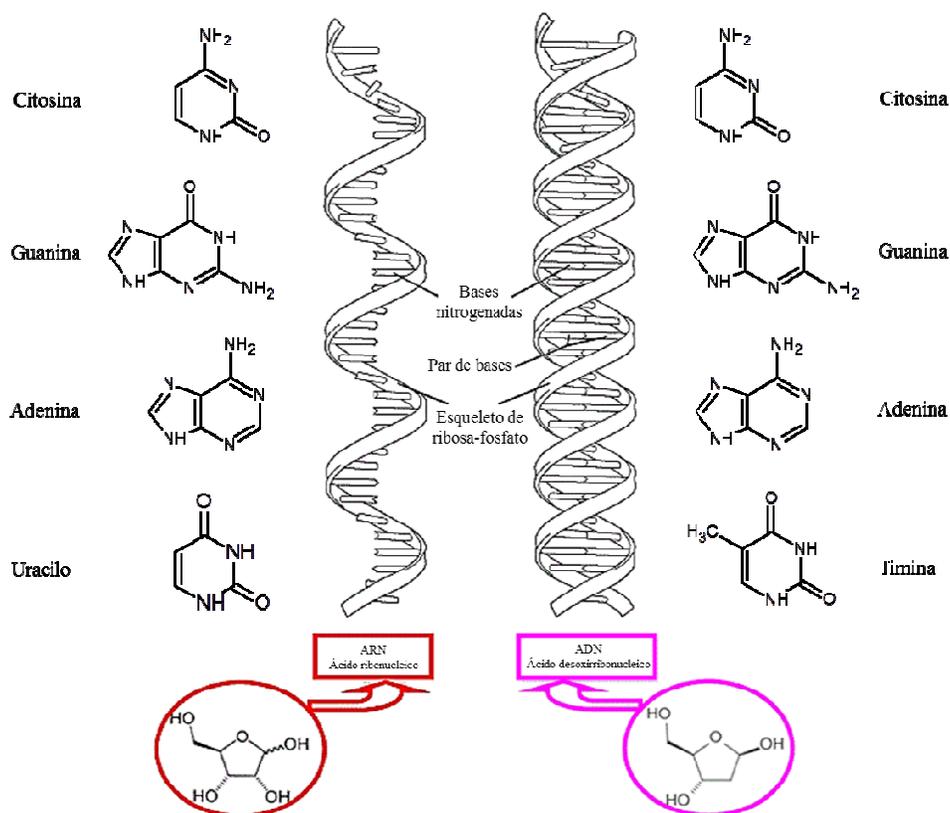


Figura 1. Estructura del ADN y ARN.

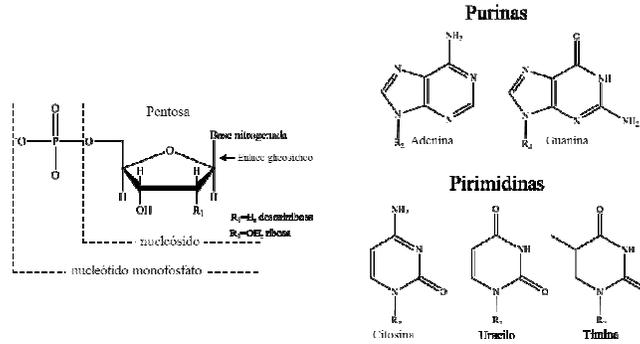


Figura 2. Estructura de los monómeros presentes en el ADN y el ARN.

El número de las unidades monoméricas en los ácidos nucleicos puede alcanzar hasta más de diez billones; las macromoléculas formadas se caracterizan por la secuencia única de nucleótidos, lo que decide sobre la información guardada. La principal función biológica de los ácidos nucleicos es almacenar, expresar, regular y transferir la información genética. En el caso del ADN, su molécula porta la información necesaria para el desarrollo de las características biológicas de un individuo y contiene los mensajes e instrucciones para que las células realicen sus funciones. Por su parte, una de las funciones principales del ARN es expresar la información contenida en el ADN, pasando de una secuencia lineal de nucleótidos (genes), a una secuencia lineal de aminoácidos en una proteína. Dependiendo de la etapa de expresión de genes en la que actúa la molécula de ARN, se distinguen varios grupos de estos compuestos, es decir ARN mensajero, de transferencia, ribosómico y no codificante (pequeño ARN de interferencia, micro ARN entre otros). Actualmente se conoce que la regulación de la expresión génica depende de dos factores: uno de carácter genético y otro de carácter epigenético [6-9].

IV.2. Mecanismos de regulación de expresión de genes

IV.2.1. Factores genéticos

El componente genético está relacionado con la secuencia de ADN, misma que influye sobre la estabilidad de los ARN mensajero y de transferencia [8, 9]. Los cambios en la secuencia de los desoxinucleótidos en el ADN (mutaciones) pueden conducir a los

cambios estructurales en las proteínas sintetizadas. Las mutaciones pueden afectar las células somáticas del mismo individuo y se heredan en la línea germinal.

IV.2.2. Eventos epigenéticos

Los eventos epigenéticos consisten en cambios estructurales de la cromatina (figura 3) sin alteración de la secuencia nucleotídica, en donde la conformación condensada potencialmente causa el silenciamiento de genes mientras que la conformación relajada promueve su actividad [9-11]. Los mecanismos moleculares responsables por la conformación actual de cromatina incluyen la metilación de ADN, modificaciones covalentes de histonas y la reorganización del nucleosoma [12]. Los cambios epigenéticos son potencialmente reversibles, relativamente estables durante varios ciclos de la división de las células y no afectan la secuencia de nucleótidos en el ADN del organismo [13, 14].

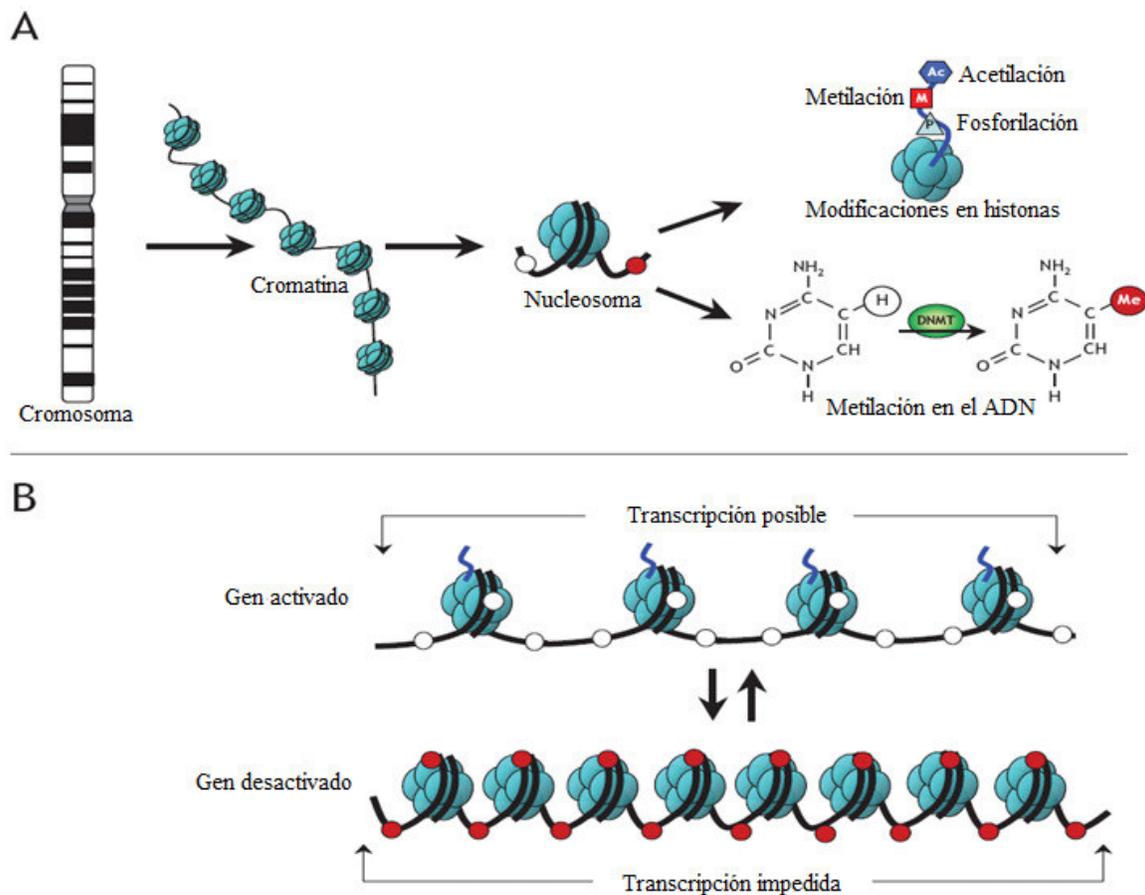


Figura 3. A) Modificaciones covalentes en ADN e histonas. B) Conformación de la cromatina.

IV.2.2.1. Modificaciones covalentes en histonas

La cromatina es el complejo nucleoproteico en el que se encuentra empacado el ADN dentro de la célula. El nucleosoma es la unidad fundamental de la cromatina y está compuesto de un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) que está envuelto por 147 pares de bases de ADN. El núcleo de histonas es predominantemente globular excepto por las secuencias N-terminales, las cuales sobresalen y tienen una conformación no estructurada capaz de interactuar con otros nucleosomas contiguos. Una característica predominante y particular de estas secuencias N-terminales, es que pueden ser modificadas post-traduccionalmente [15]. Las modificaciones covalentes en histonas que son capaces de afectar la estructura de la cromatina, destacan la acetilación, la fosforilación, la metilación, la desiminación, la ADP ribosilación, la ubiquitilación y la sumoilación.

La modificación mejor comprendida en histonas es la acetilación. La acetilación se lleva a cabo preferentemente en la lisina, es altamente dinámica y regulada por dos familias de enzimas, las histona acetiltransferasas y las histona desacetilasas [16, 17]. Las histona acetiltransferasas utilizan la acetil-coenzima A como co-factor y catalizan la transferencia de grupos acetilo al grupo ϵ -amino de la lisina. Esta modificación neutraliza la carga positiva promoviendo la debilitación de la interacción entre histonas y grupos fosfato en el ADN, lo cual potencializa la relajación de la estructura de la cromatina permitiendo la expresión génica. Las histona desacetilasas utilizan como co-factor la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y tienen el efecto opuesto a las histona acetiltransferasas, esta acción restaura la carga positiva de lisina que potencialmente modifica la estructura local de la cromatina conduciendo a la represión transcripcional [18-20].

La fosforilación de histonas es altamente dinámica y se lleva a cabo principalmente (pero no exclusivamente) en serinas, treoninas y tirosinas de las secuencias N-terminales de las histonas [21]. Esta modificación es controlada por cinasas y fosfatasas que añaden o remueven el grupo fosfato, respectivamente. Las cinasas transfieren el grupo fosfato del ATP al grupo hidroxilo del aminoácido. La hiperfosforilación de histonas se ha descrito en la mitosis y meiosis de una gran variedad de organismos, pero su papel epigenético no ha sido bien establecido [22, 23].

La metilación de las histonas se lleva cabo primordialmente en los grupos ϵ -amino y ω -guanidino de la lisinas y de las argininas, respectivamente. A diferencia de la acetilación y la fosforilación, esta modificación no altera la carga en la histona. La metilación de las histonas es llevada a cabo por metiltransferasas que utilizan la s-adenosil metionina (SAM) como co-factor. Las lisinas pueden ser mono- di- o trimetiladas, mientras que las argininas son mono- y dimetiladas [24-26]. La eliminación del(os) grupo(s) metilo es llevada a cabo por desmetilasas que utilizan como co-factor FAD ó hierro (II)/ α -cetoglutarato [27, 28]. La metilación de las histonas tienen múltiples efectos en la estructura de la cromatina resultando en diferentes eventos epigenéticos [29-31]. La metilación de la histona H3 en la lisina 9 ó 27 se ha sugerido estar involucrada en la represión transcripcional [32-34]. Sin embargo la metilación de la histona H3 en la lisina 4, 36 y/o 79 está relacionada con la actividad transcripcional [35-37].

La desiminación en histonas involucra la conversión de la monometil-arginina a citrulina. En mamíferos, esta reacción es catalizada por la peptidil desiminasa. Uno de los efectos de esta conversión, es la eliminación de carga positiva de la arginina debido a que la citrulina es neutral [38, 39].

La mono- y poli-ADP ribosilación toma lugar en los sitios del ácido glutámico y de la arginina. Esta modificación regulada por ADP-ribosil transferasas y ADP-ribosa-glicohidrolasas que añaden o eliminan la ADP-ribosa, respectivamente. Poco se sabe del efecto epigenético de esta modificación, pero su incremento está ligeramente asociado a la relajación de la estructura de la cromatina y en el daño al ADN [40].

La ubiquitilación de histonas es una modificación covalente mucho más grande que las modificaciones mencionadas anteriormente. Esta consiste en la(s) adición(es) de polipéptido(s) de 76 aminoácidos (ubiquitina) a las lisinas presentes en las histonas. Esta adición se lleva de manera secuencial por tres enzimas: E1-activado, E2-conjugado y E3-ligado [41]. Aunque la ubiquitilación es una modificación significativamente grande es también altamente dinámica [42]. La ubiquitina es eliminada de las histonas por medio de isopeptidasas. Al igual que la metilación de histonas, el efecto epigenético de la

ubiquitilación depende de su ubicación. La ubiquitilación en la histona en la lisina 119 de la histona H2A conduce al silenciamiento génico [42, 43], mientras que la misma modificación en la lisina 123 de la histona H2B juega un importante papel en la activación génica [44, 45]. La sumoilación de histonas reside en la adición de un polipéptido pequeño derivado de la ubiquitina [46]. Esta adición se ha registrado en las lisinas prominentes de las cuatro histonas y utiliza la misma maquinaria enzimática que la ubiquitilación. La función epigenética de la sumoilación consiste en la represión génica mediante el antagonismo a la acetilación y ubiquitilación de histonas, ya que se lleva a cabo en el mismo sitio [47].

IV.2.2.2. Metilación de ADN

La metilación de ADN ocurre en el carbono 5 del anillo de la pirimidina contenido en la citosina para formar la 5-metilcitosina (5mC), y es probablemente la modificación epigenética mejor caracterizada [48]. La metilación del ADN se ha descrito tanto en eucariotes y procariotes. En bacterias, la metilación de su ADN permite diferenciar del ADN invasor debido a que el ADN extraño puede ser degradado por las enzimas de restricción del hospedero [49]. En eucariotes, la metilación de ADN se ha descrito en plantas, animales y algunos hongos [50]. En plantas, la metilación de ADN ocurre en varios contextos de secuencias tales como dCpdG, dCpHpG y dCpHpH (H=dA, dC ó dT). En mamíferos la metilación de ADN está restringida a los dinucleótidos dCpdG, excepto para células embrionarias pluripotenciales [51, 52]. Tanto en mamíferos como en plantas, se ha reportado que las regiones centroméricas y pericentroméricas están altamente metiladas, mientras que en algunos genes la metilación ocurre principalmente en la región promotora [53, 54].

Para llevar a cabo la metilación de ADN, la S-adenosilmetionina participa como donador del grupo metil y la reacción es catalizada por enzimas del grupo ADN metiltransferasas (DNMT's, por sus siglas en inglés) [53]. En mamíferos y en plantas se han descrito dos tipos de DNMT's: las que mantienen la metilación del ADN a partir de

sitios hemi-metilados resultantes de la replicación de ADN durante la división celular; y las que llevan a cabo la metilación *de novo* en sitios no metilados [55].

La metilación de ADN es un proceso reversible, pero los mecanismos de desmetilación permanecen en controversia. Se ha propuesto que la desmetilación de ADN se puede llevar a cabo por dos vías: la pasiva y la activa. La desmetilación pasiva consiste en la pérdida de la metilación después varios ciclos de replicación en donde las hemimetilasas no llevan a cabo la metilación [56]. La desmetilación activa se refiere a la eliminación directa de la 5mC o de sus productos de oxidación y/o aminación [57, 58]. El mecanismo de desmetilación del ADN por la vía activa propuesto recientemente en la literatura [59, 60] (figura 4) consiste en la conversión de 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) mediado por las enzimas TET (dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe(II)). La 5mC y la 5hmC son desaminadas por enzimas APOBEC y convertidas en T y 5-hidroximetiluracilo (5hmU), respectivamente. Por otro lado, la 5hmC puede ser oxidada subsecuentemente por las enzimas TET hasta formar 5-formilcitosina (5fC) y/o 5-carboxicitosina (5caC). Los apareamientos erróneos entre G:Y (Y=T, 5hmU, 5fC, 5caC) son reconocidos por la timina ADN glicosilasa (TDG, por sus siglas en inglés). Finalmente, las bases mal apareadas (Y) son eliminadas y sustituidas por C mediante el sistema de reparación por escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés).

Por lo general, la metilación de ADN contribuye potencialmente a la condensación de la cromatina promoviendo la represión de genes, mientras que la desmetilación de ADN promueve la actividad transcripcional [6, 61]. La metilación de ADN puede ser evaluada de manera global o en secuencias de genes. Obviamente, la información sobre el patrón de metilación en secuencias genómicas es de suma importancia, debido a que permite conocer los genes específicos que participan o están involucrados en los mecanismos de procesos celulares y de patologías [62-66]. Por su parte, los niveles de metilación global en el ADN son de gran utilidad porque permiten estudiar los efectos epigenéticos a gran escala, ya sea en el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades así como para evaluar la respuesta de los organismos a ciertas condiciones ambientales [67-74]. El grado de metilación global es actualmente reconocido como un bioindicador de cambios epigenéticos que ocurren en

organismos vivos, bajo diferentes condiciones fisiológicas [75-79]. Algunas patologías oncogénicas han sido relacionadas con patrones erróneos de metilación en ADN, en donde los tejidos neoplásicos presentan hipometilación global de ADN e hipermetilación de promotores de genes involucrados en la supresión tumoral [67, 80-83].

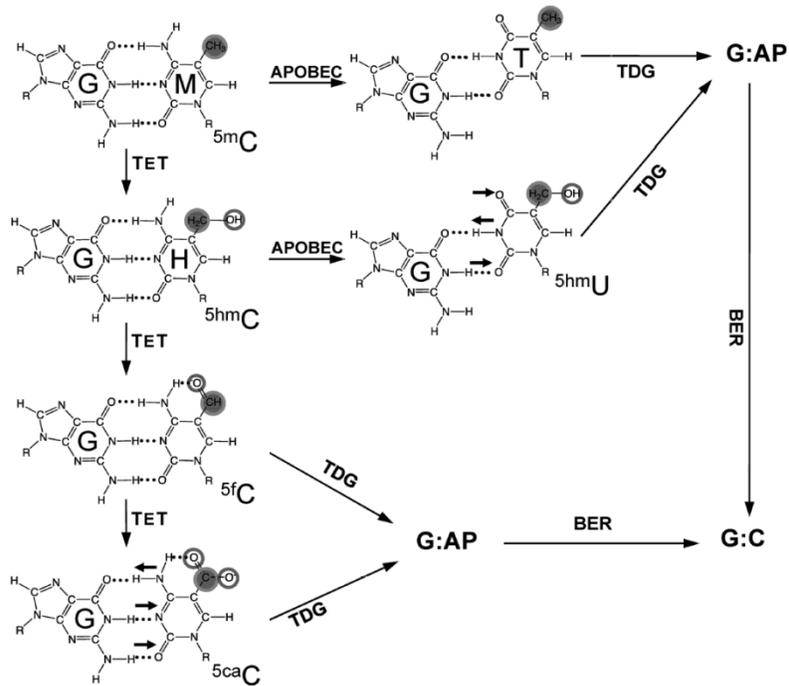


Figura 4. Mecanismo hipotético (vía activa) de desmetilación del ADN

IV.3. Revisión bibliográfica de procedimientos de análisis de metilación de ADN

Los eventos epigenéticos contribuyen al proceso normal de diferenciación y desarrollo celular, sin embargo, las perturbaciones en los patrones de metilación del ADN están involucrados en una diversidad de patologías en las que destacan oncogénesis, desordenes neurodegenerativos e inmunes [9, 62, 84-89]. De ahí la importancia y la demanda de herramientas capaces de identificar y cuantificar la metilación en el ADN. A continuación se hace mención a diversos procedimientos para determinar el grado de metilación global o en secuencias de ADN.

IV.3.1. Determinación del grado de metilación por procedimientos biológicos

IV.3.1.1. Metilación en secuencias específicas de promotores de genes

Inicialmente el estudio de los patrones de metilación de ADN en secuencias individuales y específicas se basó en el uso de enzimas de restricción capaces e incapaces de cortar en los sitios que presentan metilación en la citosina [90], en donde la principal limitante consiste en la digestión incompleta del ADN. Los fragmentos de ADN obtenidos con cada una de las enzimas de restricción pueden ser analizados por una técnica denominada southern blot. Esta consiste en separar los fragmentos de ADN por electroforesis en gel de agarosa para posteriormente ser transferidos a una membrana de nylon. Estos fragmentos de ADN pueden ser hibridados con una sonda específica correspondiente a una secuencia de un gen de interés. La metilación de ADN puede ser identificada mediante la diferencia en los patrones de fragmentación obtenidas con cada una de las enzimas. [91]. En general, estos ensayos tienen como desventaja que se requieren relativas altas cantidades de ADN. Para evitar esta limitante, el ADN digerido puede ser analizado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando iniciadores específicos [92] en donde los sitios desmetilados son fragmentados y sólo las secuencias con sitios metilados se encuentran íntegras y serán amplificadas por la PCR. Esta estrategia es más sensible, pero puede dar resultados falsos positivos debido a la digestión incompleta y a la sensibilidad de la PCR.

Otro procedimiento para identificar la metilación en secuencias ADN denominado amplificación de los dinucleótidos dCpdG metilados (MCA, por sus siglas en inglés)[93], se basa en la digestión de ADN con la enzima *SmaI* (dCpdCpdCpdGpdGpdG), que corta los sitios no metilados dejando extremos romos; seguido de la restricción con la enzima *XmaI*, que corta los sitios metilados dejando extremos cohesivos los cuales son ligados a un adaptador específico. Por último, el fragmento puede ser secuenciado con oligonucleótidos que alinean con la secuencia *XmaI* del adaptador. Un procedimiento derivado de la MCA llamado amplificación de sitios intermetilados (AIMS, por sus siglas en inglés) [94] consiste en la amplificación de las secuencias ligadas utilizando oligonucleótidos que se

extienden en la dirección 3'. Los productos de la PCR son separados en gel de poli-acrilamida en condiciones desnaturizantes dando lugar a bandas múltiples que representan el metiloma.

Por otro lado, el descubrimiento de la reacción de conversión del ADN con bisulfito de sodio condujo a una gran revolución en el estudio de la metilación del ADN. En esta reacción ocurre la desaminación de las citosinas no metiladas hasta obtener uracilos, mientras que las citosinas metiladas y el resto de las bases permanecen intactas [95, 96]. Esta reacción sólo se lleva a cabo en ADN de cadena sencilla por lo que el ADN necesita ser previamente desnaturizado [97]. Este procedimiento tiene como desventaja la obtención de artefactos durante el análisis debido a la desnaturización parcial o a la degradación del ADN [98]. Las bases de esta reacción para diferenciación entre los sitios metilados y no metilados, y su combinación con otros procedimientos permite definir el grado de metilación en secuencias particulares. Las estrategias relacionadas con la conversión del ADN mediante bisulfitos requieren el diseño de cebadores específicos y la amplificación del ADN mediante la PCR (que incorpora timina en lugar de uracilo). Por ejemplo, en las primeras aplicaciones de este procedimiento, en la amplificación del ADN se utilizaron cebadores que no contenían el sitio dCpdG para evitar cualquier discriminación entre diferentes templados metilados. Uno de los procedimientos más ampliamente utilizados para demostrar la metilación en los dinucleótidos dCpdG después de modificar el ADN con bisulfitos es llamado en inglés methyl-specific PCR (MSP) [99], que es simple y relativamente sensible. Esta se basa en la PCR que utiliza cebadores específicos que contienen dinucleótidos dCpdG que alinean específicamente con la secuencia metilada. Después de llevar a cabo la PCR, sus productos de reacción son separados y teñidos en un gel de agarosa. El análisis de la intensidad de sus fragmentos se lleva a cabo por densitometría por lo que se considera que es un procedimiento semi-cuantitativo. Más tarde se desarrollaron las versiones cuantitativas y más sensibles de la MSP que utiliza la PCR en tiempo real basada en fluorescencia. Este procedimiento emplea el diseño de oligonucleótidos que tienden a formar horquillas y que tienen en el extremo 3' el marcaje fluorescente y en el otro extremo un inhibidor de fluorescencia, de tal modo que al alinearse el oligonucleótido se separa el inhibidor del fluoróforo que posteriormente

emite la fluorescencia [100]. Otro procedimiento basado en la PCR es el análisis fluorescente de la curva de fusión que provee un promedio de los niveles de metilación de un amplicón específico (perfil de fusión de la PCR en tiempo real) [101]. Este ensayo permite discriminar las secuencias de ADN metiladas de las no metiladas gracias a la elevación de la temperatura de fusión debido a la presencia de citosinas en lugar de timinas.

Actualmente se emplea con mayor frecuencia la pirosecuenciación. Este procedimiento se basa en la secuenciación del ADN mediante la PCR, donde se añade secuencialmente cada uno de los nucleótidos que al introducirse en la cadena polimérica revela su identidad al generar una señal de luminiscencia. Para generar la señal de luminiscencia, el pirofosfato liberado del nucleótido introducido en la cadena polimérica es transformado a ATP mediante la participación de la sulfurilasa; después el ATP obtenido es utilizado por la luciferasa para dar lugar a un producto luminiscente. Este procedimiento provee información de la ubicación de los sitios metilados al comparar el resultado de las secuencias de ADN con aquellas obtenidas del pretratamiento del ADN con bisulfitos [102-104].

IV.3.1.2. Metilación global en ADN

Una de las técnicas biológicas utilizadas en un inicio para el análisis de metilación global de ADN fue la exploración genómica por marcaje y restricción [105], en donde el ADN es digerido por una enzima de restricción y los fragmentos son marcados con un isótopo radiactivo y separados por tamaño molecular. Después el ADN fraccionado es digerido con otra enzima de restricción y los fragmentos son separados en segunda dimensión. Este procedimiento da como resultado un perfil de miles de fragmentos separados en doble dimensión. El perfil de diferentes muestras puede ser comparado para hallar las diferencias en metilación global de ADN.

Un procedimiento distinto consiste en aislar regiones ricas en dinucleótidos 5mdCpdG emplea cromatografía de afinidad (que utiliza el dominio de unión de la proteína MeCP2) en donde al ADN es digerido con enzimas de restricción incapaces de cortar en los

sitios metilados y los fragmentos obtenidos son fraccionados de acuerdo a su grado de metilación en la columna cromatográfica que posteriormente pueden ser recuperados para clonar en un vector y secuenciarse [106].

También se han descrito una gran variedad de procedimientos que involucran el uso de microarreglos. El diseño de las sondas de los microarreglos pueden tener más de mil secuencias con islas dGp₅mC que pueden ser hibridadas con fragmentos de ADN obtenidos después del pre-tratamiento con enzimas de restricción incapaces de cortar sitios metilados tales como *Bst*UI (dCpdGpdCpdG) y *Hpa*II (dCdpCdpGdpG) [106-108] en donde la digestión incompleta del ADN puede llevar a falsos positivos. Más tarde se desarrollaron las técnicas de microarreglos que incluían el pre-tratamiento del ADN con bisulfitos seguidos de su amplificación por la PCR utilizando iniciadores que no contenían las islas dCpdG para que las regiones metiladas y no metiladas se amplificaran por igual. Las secuencias amplificadas pueden ser inmovilizadas en los pozos de los microarreglos que contienen sondas dirigidas a regiones metiladas o desmetiladas. El grado de metilación en ADN es estimado por la relación de los híbridos que se obtenían con los oligonucleótidos diseñados para captar secuencias metiladas en comparación con aquellos perfilados a secuencias no metiladas [109].

Otros procedimientos incluyen la inmunoprecipitación del ADN metilado ya sea con anticuerpos que reconocen el dinucleótido dGp₅mC o el nucleótido 5m₃CMP. El grado de metilación es evaluado por la PCR en combinación con microarreglos que contienen secuencias con islas dCpdG [110, 111].

IV.3.2. Determinación del grado de metilación en ADN por procedimientos analíticos

IV.3.2.1. Metilación global en ADN

Los procedimientos analíticos reportados en la literatura para la determinación de metilación global en ADN incluyen dos etapas: (1) pre-tratamiento de la muestra

(extracción e hidrólisis de los ácidos nucleicos, y en algunos casos la derivatización de los productos de hidrólisis) y (2) separación de los compuestos obtenidos ya sea por electroforesis capilar (CE), por cromatografía de líquidos (HPLC) o de gases (GC) (tabla 1) [112-116].

Tabla 1. Procedimientos analíticos utilizados en el análisis del porcentaje de metilación global en ADN.

Masa de ADN	Pre-tratamiento de las muestra	Procedimiento de separación	Detección	Referencia
10 µg	Hidrólisis enzimática (nucleótidos) Derivatización con bodipy	Electroforesis capilar	Espectrofluorimetría	Cornelius, 2005
10 µg	Eliminación de ARN Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	Cromatografía de líquidos en fase inversa	Espectrofotometría UV	Sandhu, 2009
10 µg	Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	Cromatografía de líquidos en fase reversa	Espectrofotometría UV	Alcazar, 2008
10 µg	Hidrólisis enzimática (nucleótidos)	Cromatografía de líquidos en fase inversa	Espectrometría de masas atómica con ionización en plasma acoplado inductivamente	Wrobel, 2010
10 µg	Desnaturalización de ADN Derivatización con osmio	Cromatografía de líquidos de exclusión de tamaño molecular	Espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente	Wrobel, 2010
2.5 µg	Eliminación de ARN Hidrólisis ácida (nucleobases) Derivatización con	Cromatografía de Gases	Espectrometría de masas	Rossella, 2009
1 µg	Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	Cromatografía de Líquidos de intercambio catiónico	Espectrofotometría UV	Rozhon, 2008
1 µg	Eliminación de ARN Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	Cromatografía de líquidos en fase inversa	Espectrometría de masas/masas (MRM)	Wang, 2011
1 µg	Eliminación de ARN Hidrólisis ácida (nucleobases)	Cromatografía de líquidos en fase inversa	Espectrometría de masas/masas (MRM)	Zhang, 2011
1 µg	Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	Cromatografía de líquidos en fase inversa	Espectrometría de masas con ionización por electronebulización y trampa iónica	Yang, 2011
0.5 µg	Eliminación de ARN Hidrólisis ácida (nucleobases)	Electroforesis capilar de zona	Espectrofotometría UV	Sotgia, 2008
4 ng	Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	Cromatografía de líquidos en fase inversa	Espectrometría de masas/masas con ionización por electronebulización	Song, 2005

En principio, la CE ofrece las ventajas de simplicidad, alta resolución y, separaciones relativamente en corto tiempo, pero los tiempos de retención son altamente perturbados por compuestos presentes en la matriz de la muestra [117, 118]. En las aplicaciones de esta técnica, el ADN es hidrolizado a nucleótidos, nucleósidos o nucleobases utilizando detección por espectrofotometría UV o espectrometría de masas [117-121]. También se ha explorado el marcaje del grupo fosfato presente en nucleótidos con 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propionil etilendiamine (BODIPY FL EDA), lo que permitió la detección de la señal de fluorescencia inducida por láser [122-124]. En estas técnicas, se ha reportado que el requerimiento de la cantidad de ADN debe ser entre 0.5 a 10 µg.

Por otra parte, los procedimientos en HPLC y GC involucran mayor tiempo de separación con respecto a CE, pero éstos son utilizados preferentemente debido a su excelente reproducibilidad [113, 114, 125]. Los procedimientos de análisis de metilación global en ADN mediante GC involucran la hidrólisis con ácido fórmico hasta obtener nucleobases, que posteriormente son derivatizadas para obtener productos volátiles de tipo alquil-silano. En los reportes de estos procedimientos se utilizan 2.5 µg de ADN y la separación de las nucleobases derivatizadas requiere de hasta 25 minutos. Por lo general la detección en estos procedimientos se lleva a cabo por espectrometría de masas [115, 116].

Los procedimientos típicos de determinación de metilación global en ADN que emplean cromatografía de líquidos consisten en llevar a cabo la hidrólisis enzimática del ADN hasta obtener nucleósidos y separarlos mediante cromatografía en fase inversa o por intercambio iónico [113, 114, 126-128]. En algunos estudios, la separación de nucleósidos se ha logrado en tiempos de 4.5 a 25 minutos [89, 113, 129]. Existen pocos reportes donde el ADN se hidroliza hasta nucleótidos y son separados por HPLC, y esto es debido a que la alta polaridad conferida por el grupo fosfato no permite obtener una separación adecuada en fase inversa [129-131]. Otros procedimientos consisten en emplear ácido fórmico para hidrolizar el ADN (libre de ARN) hasta nucleobases y separarlas por cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (HILIC) [132]. Utilizando la detección por espectrofotometría UV se ha logrado analizar los componentes del ADN y para determinar

el grado de metilación se requieren cantidades entre 1 a 10 μg [128, 129]. La detección por espectrometría de masas ha sido extensamente utilizada en el análisis de metilación de ADN debido a que ofrece una alta selectividad y sensibilidad [114, 125, 132]. En estudios recientes, el uso de columnas cortas ha permitido lograr separaciones cromatográficas en cortos tiempos (1 – 7 minutos) y el uso de espectrometría de masas en modo de monitoreo de reacciones múltiples y ha permitido obtener patrones de metilación de ADN a partir de cantidades inferiores a 0.1 μg [125, 127]. Desafortunadamente para estos sistemas, se requiere una limpieza exhaustiva de la muestra para eliminar a los componentes de la matriz así como utilizar el estándar interno adecuado para compensar los posibles cambios en la eficiencia de ionización.

La demanda de procedimientos enfocados a la determinación de metilación global de ADN exige desarrollar nuevos procedimientos analíticos más sencillos y sensibles, con relativos bajos costos de operación que permitan su aplicación en laboratorios clínicos y de investigación.

Para continuar con el desarrollo de procedimientos analíticos adecuados para la determinación global de ADN, este trabajo se enfocó en estudiar la hidrólisis del ADN, derivatización de los productos de hidrólisis (en algunos procedimientos), separación de los productos de hidrólisis o de sus derivados y detección/cuantificación de los analitos.

IV.3.2.2. Metilación en promotores de genes

Los procedimientos analíticos desarrollados para estudiar la metilación en promotores incluyen la etapa del pretratamiento del ADN con bisulfitos y la amplificación de fragmentos de interés por medio la PCR. Uno de estos procedimientos incluye transcripción *in vitro* para obtener un transcrito de cadena sencilla seguido de la digestión con endoribonucleasas para su posterior análisis por MALDI-TOF-MS, en donde se puede determinar la diferencia en masa molecular de los productos de digestión [133-135]. Otro procedimiento consiste en la hidrólisis enzimática de los productos de amplificación con y sin tratamiento previo de bisulfitos en donde se puede calcular el grado de metilación de

manera cuantitativa comparando el grado de conversión de citosinas mediante LC-MS [136].

IV.4. Modificaciones covalentes en ARN

En las transformaciones que sufre el ARN se ha descrito la participación de una variedad de enzimas que logran introducir modificaciones covalentes. Dichas alteraciones ocurren ya sea en la base nitrogenada, en la posición 2' de la ribosa o en ambas y pueden dar a lugar a más de 100 modificaciones diferentes (figura 5) [137]. La localización, abundancia y distribución de varios tipos de modificación varían enormemente entre los diferentes tipos de ARN, organismos y organelos. Las condiciones fisiológicas y ambientales de la célula afectan el grado y los patrones de modificaciones en el ARN [138]. La mayoría de las modificaciones en ribonucleósidos están presentes en los ARN ribosomal y de transferencia, y recientemente se ha descrito que también ocurren en ARN pequeño no codificador [139, 140]. La presencia de bases modificadas en ARN mensajero y su potencial papel en la regulación de genes han sido últimamente estudiados [141-143]. Recientemente se han encontrado nuevos tipos de modificaciones [144, 145], y se han propuesto diferentes papeles biológicos para algunas modificaciones ya conocidas en ribonucleósidos.

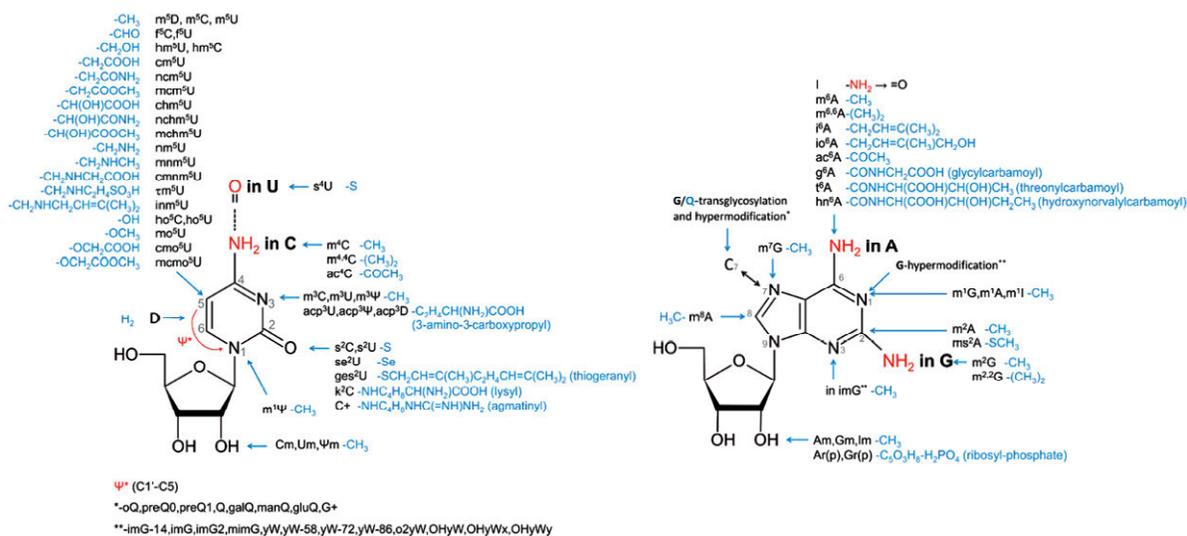


Figura 5. Diversidad de modificaciones en ribonucleósidos

IV.4.1. Metilación en el C5 de la citosina en ARN

La metilación de la citosina en el carbono 5 del ARN (5mC) se ha identificado en varios tipos de ARN tanto de procariotes como de eucariotes [146, 147]. Se ha propuesto que esta modificación provee estabilidad metabólica al ARN [148, 149]. Su presencia en el ARN mensajero sugiere que la modificación juega un papel en la fidelidad de la traducción así como el reconocimiento del ARN de transferencia [150]. Al igual que en la metilación del ADN, la metilación en ARN es llevada a cabo por metiltransferasas que utilizan como co-factor la SAM [151] mientras que el mecanismo de desmetilación permanece en duda.

IV.4.1.1. Determinación del grado de metilación global en ARN

Existen pocos procedimientos para la determinación de modificaciones en ribonucleósidos o ribonucleótidos. Cabe señalar que estos procedimientos han sido aplicados a la determinación de metilación en un tipo de ARN específico o en fluidos biológicos. Estos recurren a la separación de los analitos por HPLC y cromatografía en capa fina de dos dimensiones (2D TLC). La 2D TLC requiere principalmente del marcaje radioactivo con ^{32}P de nucleótidos que previamente fueron obtenidos de la digestión enzimática del ARN de transferencia y permite determinar alrededor de 70 bases modificadas (entre las cuales está incluida la 5mCMP) con límites de detección del orden femtomolar [152]. Los procedimientos de determinación de ribonucleósidos recurren a su separación y detección por LC-MS [153]. Obviamente, se anticipa el uso preferencial de LC-MS debido a la alta reproducibilidad de los tiempos de retención de LC y, la especificidad y sensibilidad que ofrece la detección por espectrometría de masas en modo de monitoreo de reacciones múltiples. Aunque no se ha reportado en la literatura estudios de metilación global en ARN total, al igual que el porcentaje de metilación global en ADN, el grado de metilación en ARN puede ser calculado como la relación molar de la 5mC entre las citosinas presentes.

La carencia de reportes enfocados a la metilación global del ARN total no ha permitido evaluar la implicación de este parámetro en procesos biológicos. Por otro lado, la

metilación de ARN se ha convertido en un tema de interés porque puede desempeñar un papel importante en la modulación de la información genética como sucede con la metilación del ADN [146, 154]. Es por ello que parte de este trabajo se enfocó a desarrollar un procedimiento analítico selectivo y sensible que permita determinar el porcentaje de metilación global en ARN.

Para intentar comprender el parámetro de grado de metilación global del ARN y su posible conexión con eventos epigenéticos, se evaluó la respuesta biológica de *L. sativum* expuesta a cadmio y selenio, particularmente en la determinación de metilación global del ADN y ARN total.

IV.4.1.2. Presencia de 5mC en secuencias específicas de ARN

El desarrollo de procedimientos para elucidar el grado de metilación en secuencias específicas de ADN utilizando el tratamiento típico con bisulfitos seguido de su secuenciación, y su adaptación al tratamiento en distintos tipos de ARN ha permitido explorar los patrones de 5mC en dichas secuencias [155]. Para estos procedimientos, después de tratar el ARN con bisulfitos se lleva a cabo la transcripción inversa para obtener un polímero estable de ADN complementario (cDNA) que posteriormente es amplificado por la PCR y clonado en un plásmido para su subsiguiente secuenciación (figura 6) [146].

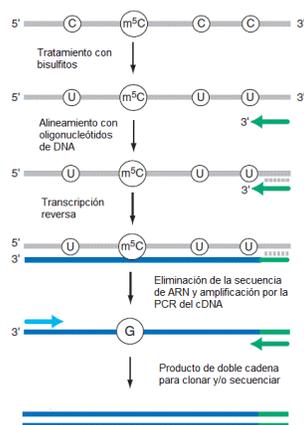


Figura 6. Principio de identificación de 5mC en secuencias específicas

CAPÍTULO V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

El objetivo general de este proyecto ha sido desarrollar nuevos procedimientos analíticos basados en la selectividad del pre-tratamiento de la muestra, separaciones cromatográficas y el uso de diferentes sistemas de detección para su aplicación en el análisis de ADN y ARN provenientes de diversos tipos de organismos, obteniendo información de relevancia biológica sobre la estructura y posibles modificaciones de estos compuestos.

V.2. Objetivos específicos

Adaptar el procedimiento desarrollado previamente, basado en la digestión enzimática de ADN hasta nucleósidos y su separación por cromatografía de líquidos en fase inversa con detección espectrofotométrica (HPLC-DAD) para su aplicación en la determinación del grado de metilación global en el ADN en muestras biológicas con matrices químicamente complejas.

Desarrollar un nuevo procedimiento específico y sensible basado en marcaje molecular de compuestos citosínicos, su separación por cromatografía de líquidos en fase inversa y detección fluorimétrica (HPLC-FLD) que permita determinar el grado de metilación global en micro-muestras de ADN.

Demostrar que el procedimiento HPLC-FLD desarrollado anteriormente permite la determinación simultánea de los porcentajes de citosinas metiladas en ADN y ARN totales en un solo extracto de muestra biológica.

Identificar 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina como producto de oxidación de la 5-metil-2'-desoxicitidina mediado por reacciones tipo Fenton.

Estudiar las condiciones de la hidrólisis ácida del ADN asistida por microondas para establecer un pre-tratamiento de muestra rápido, robusto, sencillo y barato para la determinación del grado de metilación global.

Desarrollar un nuevo procedimiento analítico basado en la obtención de derivados volátiles de nucleobases, su separación por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas con triple cuadrupolo, logrando la cuantificación mediante monitoreo de reacciones múltiples (GC-QqQ-MS/MS).

CAPÍTULO VI. PARTE EXPERIMENTAL

VI.1. Equipo de laboratorio

VI.1.1. Instrumentación analítica

- Cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1200 equipado con bomba cuaternaria, automuestreador, horno para columna, detector de arreglo de diodos, detector espectrofluorimétrico. Las columnas cromatográficas de fase inversa utilizadas (con pre-columna C18 de Phenomenex) fueron: Luna C18(2) (250 x 4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex), Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2.7 μ m, Supelco) y Kinetex C18 (150 x 3 mm, 2.7 μ m, Phenomenex).
- Cromatógrafo de gases BRUKER 456-GC equipado con automuestreador y detector de masas de triple cuadrupolo BRUKER SCION TQ. La columna utilizada fue BR-5 (15 m x 0.25 mm, con espesor de fase estacionaria de 0.25 μ m, Bruker).
- Espectrofotómetro UV/Vis modelo Spectronic 3000 Milton Roy con detector de arreglo de diodos.

VI.1.2. Equipo utilizado para procesamiento de muestras y/o preparación de reactivos

- Destilador de agua Mares Flex/Cole Parmer Instrument Co. modelo 60648.
- Desionizador de agua Labconco modelo WATER PRO PS.
- Potenciómetro Corning 240 (pH/temperatura).
- Centrifuga de vacío Eppendorf modelo Vacufuge Plus.
- Centrífuga Hermle modelo Z326.
- Baño de agua Fanem LTDA modelo 102/1.
- Bloque térmico Thermo scientific modelo 2050.
- Vortex Fisher Scientific modelo Genie 2.

- Homogenizador (politron) IKA, modelo Ultra Turrax T18 basic.
- Balanza analítica Kern modelo 870.
- Liofilizador Labconco modelo 10-269.
- Sistema de digestión de muestras por microondas CEM, modelo Discover SP-D equipado con automuestreador Explorer.

VI.2. Reactivos y estándares

VI.2.1. Reactivos para extracción de ácidos nucleicos

El cloruro de sodio (NaCl), el tris(hidroximetil)aminometano (Tris), el ácido clorhídrico (HCl), el ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA), el dodecilsulfato de sodio (SDS), la proteinasa K, el isopropanol y el etanol fueron obtenidos de Sigma. El reactivo TRIzol fue obtenido de Life Technologies.

VI.2.2. Reactivos para hidrólisis de ADN hasta nucleósidos

El ácido acético (HAc), la glicina, el cloruro de magnesio hexahidratado, el acetato de zinc dihidratado, el cloruro de calcio, el hidróxido de sodio, la DNAsa I, el glicerol, la nucleasa P1 y la fosfatasa alcalina fueron obtenidos de Sigma.

VI.2.3. Reactivos y estándares para la determinación de metilación global en ADN y ARN por HPLC

Los estándares de desoxirribonucleósidos 2'-desoxicitidina (dC), 5-metil-2'-desoxicitidina (5mdC), 2'-desoxiguanosina (dG), 2'-desoxiadenosina (dA) y timidina (T); de ribonucleósidos citidina (C), 5-metil-citidina (5mC), guanosina (G), adenosina (A) y uridina (U) fueron obtenidos de Sigma. El reactivo derivatizante 2-bromoacetofenona (BAF) así como el ADN estándar de salmón fueron obtenidos de Sigma. El HAc, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético (TFA), el EDTA, el acetato de amonio, el fosfato de amonio dibásico, la dimetilformamida y el sulfato de sodio anhidro fueron obtenidos de

Sigma. El reactivo TRIzol fue obtenido de Life technologies. Los solventes grado HPLC metanol y acetonitrilo fueron obtenidos de Karal.

VI.2.4. Reactivos y estándares para la determinación de metilación global en ADN por GC-MS/MS

El ácido fórmico grado reactivo utilizado para hidrolizar el ADN hasta nucleobases fue obtenido de Sigma. Los estándares de nucleobases citosina y 5-metilcitosina fueron obtenidos de Sigma. El reactivo derivatizante BSTFA:TMCS 99:1 así como el ADN estándar de salmón fueron obtenidos de Sigma. El acetonitrilo grado cromatográfico fue obtenido de J.T. Baker. La piridina grado reactivo fue obtenida de Fluka.

VI.3. Software

- ChemStation para manipular el cromatógrafo de líquidos Agilent 1200, así como el análisis cromatográfico.
- GRAMS/AI, versión 8 para la edición de cromatogramas y espectros.
- ACD/ChemSketch Version 12.0 para el diseño molecular.
- Statistica (Statsoft) para el análisis estadístico.
- Software Milton Roy Inst. Co. para adquisición, almacenamiento y tratamiento de datos espectrales.
- CEM Synergy D para operar el digestor de microondas CEM Discover SP-D así como el automuestreador CEM Explorer.
- MS Workstation versión 8 para manejar el cromatógrafo de gases BRUKER 456 GC SCION TQ así como el análisis cromatográfico y espectral.

VI.4. Muestras

Las muestras analizadas fueron:

- 1) Biomasa de berros (*Lepidium sativum*) crecidos hidropónicamente durante 5 días. Después de su germinación las plantas fueron expuestas a diferentes concentraciones de cadmio (II) y selenio (IV) [156];
- 2) Lombrices de tierra recolectados en la ciudad de Guanajuato, Gto., (río Guanajuato cerca del Hotel Real de Minas, Ex-hacienda San Gabriel de Barrera, Mina de cata), de Lagos de Moreno, Jal., (jardín de casa) y Mezcala, Gro., (mina)[74]
- 3) Sangre humana heparinizada de una persona voluntaria sana.
- 4) Biomasa de plántulas de tres clonas de *Agave fourcroydes* (P21, P21 y P159) y una clona de *Agave angustifolia* (BM26) crecidas hidropónicamente durante 16 semanas. Después cada una de las clonas fue crecida en dos condiciones *in vitro*: una en medio líquido y otra en medio semisólido durante 5 semanas. También cada una de las clonas con el tratamiento anterior fue crecida en tierra durante 8 semanas.
- 5) Biomasa de diferentes estadios embrionarios de *Coffea canephora* crecidas hidropónicamente durante 3 meses.

CAPÍTULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

VII.1. Adaptación y aplicación del procedimiento HPLC-DAD para determinar el grado de metilación global en el ADN de muestras biológicas complejas

VII.1.1. Introducción

En estudios previos de nuestro grupo se ha desarrollado el procedimiento analítico que fue utilizado en el análisis del grado de metilación en ADN en líneas celulares de macrófagos que tienen una matriz química relativamente simple. Dicho procedimiento consiste en la hidrólisis de ácidos nucleicos hasta nucleósidos, su separación en fase inversa y detección DAD [113]. Utilizando una columna con reducido diámetro y de tamaño de partícula (Agilent C18, 50 x 3 mm, 1.8 μm), el análisis es relativamente rápido con separaciones de los analitos en menos de 5 minutos, sin embargo, hay muestras que no sólo tienen una matriz químicamente compleja que puede persistir a pesar del aislamiento de los ácidos nucleicos, sino también poseen una gran variedad de ribonucleósidos modificados y artefactos que se pueden co-eluir con la 5mdC. Debido a lo anterior en la primera etapa de trabajo se decidió adaptar el procedimiento HPLC-DAD para su aplicación en el análisis de muestras con matrices complejas provenientes de lombrices de tierra, biomasa de plántulas de agave y de diferentes estadios de embriones de café; así como estudiar el protocolo típico de digestión de ácidos nucleicos hasta nucleósidos con la intención de afinar el procedimiento utilizado previamente y aplicarlo en el tratamiento de dichas muestras.

VII.1.2. Objetivo específico

Afinar las condiciones de digestión enzimática del ADN hasta nucleósidos para su aplicación a micromuestras así como adaptar del procedimiento HPLC-DAD desarrollado previamente para el análisis del grado de metilación en muestras con matrices químicamente complejas.

VII.1.3. Resultados y discusión

VII.1.3.1. Estudio de las condiciones de hidrólisis enzimática

Para examinar el efecto de la cantidad de enzimas y del tiempo de reacción de digestión del ADN se llevaron a cabo una serie de experimentos, en los que 10 µg del estándar del ADN purificado de salmón fueron tratados con diferentes cantidades de enzimas y diferentes tiempos de digestión. Posteriormente, las mezclas de reacción fueron introducidas al sistema HPLC-DAD y los cromatogramas obtenidos fueron comparados con el cromatograma de la mezcla de estándares de ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos en términos de los tiempos de retención de estos compuestos y pureza de los picos cromatográficos. En estos experimentos se observó que el aumento de las cantidades de enzimas respecto a las condiciones reportadas (1 U de nucleasa P1, 20 U de DNAsa I) [128] no presentaba ningún beneficio, mientras que al disminuir las cantidades de estas enzimas se observó diferente perfil de elución respecto al cromatograma de los estándares de ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos, indicando la presencia de polímeros nucleicos, o sea hidrólisis incompleta. Con estos resultados se confirmó que para cantidades relativamente altas de ADN, las cantidades de enzimas utilizadas previamente, son adecuadas [128].

A continuación, se examinó el efecto del tiempo de digestión para obtener nucleótidos. Con tiempos de incubación mayores a 14 horas se obtuvo la digestión completa, pero después de desfosforilar se observó el aumento de ruido y presencia de señales no nucleosídicas probablemente generadas por el desarrollo bacteriano. Para limitar la presencia de microorganismos se tomó la precaución de no exceder el tiempo de digestión a más 14 horas así como someter la muestra a un choque térmico (- 20 °C → 100 °C) después de la obtención de nucleótidos. De acuerdo con el procedimiento anterior, en la etapa para eliminar el grupo fosfato de los nucleótidos, se utilizó 5 µL de hidróxido de sodio 100 mM y 2 µL de fosfatasa alcalina 1 U/µL; así que sólo fue necesario evaluar el tiempo de digestión y se observó que con 2 horas de incubación se logró la desfosforilación completa. Como el objetivo de este trabajo ha sido establecer un procedimiento que permita

el análisis de micro-muestras, se llevó a cabo un escalamiento del proceso de digestión. En dicho estudio se concluyó que la mayor señal analítica de nucleósidos para obtener la hidrólisis completa 100 ng de ADN de salmón, se obtuvo bajo las condiciones antes mencionadas, pero disminuyendo la cantidad de enzimas (0.2, 2.0, 0.2 U de Nucleasa P1, DNasa I, fosfatasa alcalina, respectivamente) y el tiempo de digestión (6, 0.5 horas, para obtener nucleótidos y nucleósidos, respectivamente). Las condiciones establecidas para la etapa de tratamiento de la muestra dependiendo de su cantidad, se describen detalladamente a continuación. Los extractos se diluyeron apropiadamente para obtener de 25 ng a 1 µg de mezcla de ácidos nucleicos (ADN/ARN) en 45 µL de agua y se agregaron 5 µL del amortiguador de digestión (ácido acético 200 mM, glicina 200 mM, cloruro de magnesio 50 mM, cloruro de zinc 5 mM, cloruro de calcio 2 mM pH 5.3). A la mezcla anterior se le adicionó 0.2 µL de DNasa I 10 U/µL y 0.2 µL de nucleasa P1 1 U/µL. La muestra se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 6 horas, y más tarde, fue congelada a - 20 °C seguida de incubación en baño de agua hirviendo por 5 minutos para evitar la posible contaminación por microorganismos. Cada muestra fue alcalinizada adicionando 5 µL de hidróxido de sodio 100 mM y 0.2 µL de fosfatasa alcalina 1 U/µL. La muestra se incubó durante media hora a 37 °C en baño de agua y se conservó a - 20 °C hasta su análisis.

En resumen, además de favorecer el proceso de digestión, las modificaciones propuestas han permitido disminuir la cantidad de las enzimas y acortar el tiempo de la digestión obteniendo hidrolizados de alta pureza y adecuados para su análisis por cromatografía de líquidos en fase inversa.

VII.1.3.2. Modificación de las condiciones de separación cromatográfica (procedimiento HPLC-DAD).

Una vez establecidas las condiciones de la hidrólisis de ácidos nucleicos hasta obtener nucleósidos, se examinó de nuevo el procedimiento de separación cromatográfica propuesto en el trabajo anterior (HPLC-DAD [113]). Cabe mencionar que en el trabajo citado, el ADN provenía de líneas celulares, mientras que el interés de este estudio ha sido

establecer un procedimiento más versátil, útil en el análisis de diferentes muestras biológicas de composición química compleja. Como ejemplo de una matriz compleja, se trabajó con el ADN extraído de tejido de lombriz de tierra. Para llevar a cabo la extracción de ácidos nucleicos se utilizaron 100 mg de biomasa de acuerdo al protocolo reportado anteriormente [157]. En breve, se homogenizaron las muestras con 400 μL de amortiguador de homogenización (cloruro de sodio 0.4 M, ácido etilendiaminotetraacético 2 mM, tris (hidroximetil) aminometano-ácido clorhídrico 10 mM pH 8). El homogenado se mezcló con 40 μL de dodecil sulfato de sodio al 20% (m/v) y 8 μL de proteinasa K 20 mg/mL, y fue incubado a 60 °C por 1 hora. Después, se mezcló con 300 μL de cloruro de sodio 6 M y se centrifugó a 10000 g por 30 minutos. El sobrenadante se recuperó y se le adicionó 500 μL de isopropanol y se incubó a - 20 °C por 1 hora. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 g por 20 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 500 μL de etanol al 70%, secada y disuelta en 50 μL de agua. Para cada extracto, se adquirió el espectro de absorción en UV en el intervalo de longitudes de onda de 200 – 350 nm y se adoptó como el criterio de la pureza de los ácidos nucleicos que las relaciones de absorbancia 260/280 nm fueran de 1.7 a 1.9. La concentración aproximada fue determinada midiendo la absorbancia a 260 nm. Los extractos se conservaron a - 20 °C hasta su análisis. Después de llevar a cabo la hidrólisis enzimática de ácidos nucleicos hasta nucleósidos con el protocolo ajustado recientemente, se inyectaron las muestras en el sistema cromatográfico con las condiciones previamente desarrolladas [113]. De manera general, se observó peor pureza de los picos cromatográficos de los compuestos de interés (dC y 5mC) y también la presencia de picos cromatográficos adicionales, posiblemente bases nucleosídicas modificadas y compuestos extraídos junto con los ácidos nucleicos de la muestra, en comparación con las obtenidas anteriormente a partir de ADN de macrófagos [113]). Para asegurar la resolución a línea base de las señales analíticas de los compuestos de interés, se modificaron las condiciones cromatográficas, disminuyendo el gradiente de concentración de metanol en la fase móvil y extendiendo el tiempo de análisis (hasta 16 minutos). Con estas condiciones modificadas se logró mejorar la separación de los picos cromatográficos de nucleósidos. Las condiciones finales del procedimiento HPLC-DAD se presentan detalladamente a continuación. Las muestras o estándares (50 ng/ μL de ribonucleósidos: C, 5mC, U, G y A; y desoxirribonucleósidos: dC, 5mdC, dG, dA y dT)

fueron apropiadamente diluidas (agua:fase móvil C, 2:1) e introducidas al sistema cromatográfico con un volumen de inyección de 20 a 60 μ L. La separación se llevó a cabo a 40 °C, con el flujo total de 1 mL/min, utilizando la columna Luna C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m) y pre-columna C18 de Phenomenex. Para llevar a cabo la elución de los analitos fueron utilizadas cuatro fases móviles A (agua), B (acetonitrilo), C (solución amortiguadora de fosfato y acetato de amonio 30 y 15 mM, respectivamente, pH 4.1) y D (metanol); utilizando el siguiente gradiente: 0 min 80% A, 20% B; 0 a 4 min 78% A, 20% B, 2% C; 4 a 11 min 77% A, 20 %B, 3 %C; 11 a 16 min 35% A, 20% B, 20% C, 25% D; 16 a 16.8 min 30% A, 25% B, 20% C, 25% D; 16.8 a 17 min 80% A, 20% C. La detección se llevó a cabo a la longitud de onda 286 nm.

Para las muestras reales y en particular en los extractos de ácidos nucleicos de lombrices de tierra (tabla 2 y figura 7) [74], este procedimiento permitió cuantificar el porcentaje de metilación del ADN relacionando las concentraciones molares (c) de 5mdC y citosinas totales presentes en el ADN ($C_{5mdC}/[C_{dC}+C_{5mdC}](\%)$) de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito [113]. En particular, los resultados presentados en la tabla 2 demuestran que el procedimiento permite detectar diferencia entre el grado de metilación del ADN en organismos expuestos a diferentes condiciones ambientales. Cabe señalar que en este análisis también se demostró que existe una posible relación inversa entre el grado de metilación de global del ADN y la concentración de elementos que pueden ser biometilados como mercurio, arsénico y selenio. Por otro lado, también se concluyó que como se ve afectado el grado de metilación en el ADN de lombrices expuestas a estos elementos, este parámetro puede ser usado como bioindicador de riesgos epigenéticos relacionados con la presencia de dichos elementos en diferentes condiciones ambientales.

El procedimiento HPLC-DAD establecido para evaluar el grado de metilación global en ADN de muestras con matriz químicamente compleja, fue aplicado en una gran diversidad de muestras en varios estudios biológicos. En uno de estos estudios se evaluó el grado de metilación en ADN de biomasa de plántulas de agave en diferentes medios de propagación. En la figura 8 se muestra un cromatograma típico obtenido de muestras de

este sistema biológico. En el cromatograma se aprecia la separación de los analitos de interés (dC y 5mdC). Por otro lado, con este procedimiento HPLC-DAD se analizaron las muestras provenientes de biomasa de diferentes estadios embrionarios de *Coffea canephora*. Como se muestra en la figura 9, este procedimiento permitió separar la dC y 5mdC para determinar el grado de metilación en estas muestras biológicas. La aplicación del procedimiento HPLC-DAD permitió detectar diferencias en el porcentaje de metilación del ADN de las diferentes condiciones planteadas en estos dos sistemas biológicos y sus resultados fueron publicados en revistas internacionales indizadas [158, 159].

Tabla 2. Análisis de metilación global de ADN por HPLC-DAD en muestras de gusanos de tierra.

Sitio	Localización	% de metilación de ADN
1	Mina de Cata, Guanajuato, Gto.	2.80
2	Mina Mezcala, Guerrero	1.92
3	Jardín de casa Lagos de Moreno, Jal.	3.37
4	Ex-hacienda San Gabriel de Barrera, Guanajuato, Gto.	2.15
5	Río Guanajuato (Hotel Real de Minas), Guanajuato, Gto.	2.71

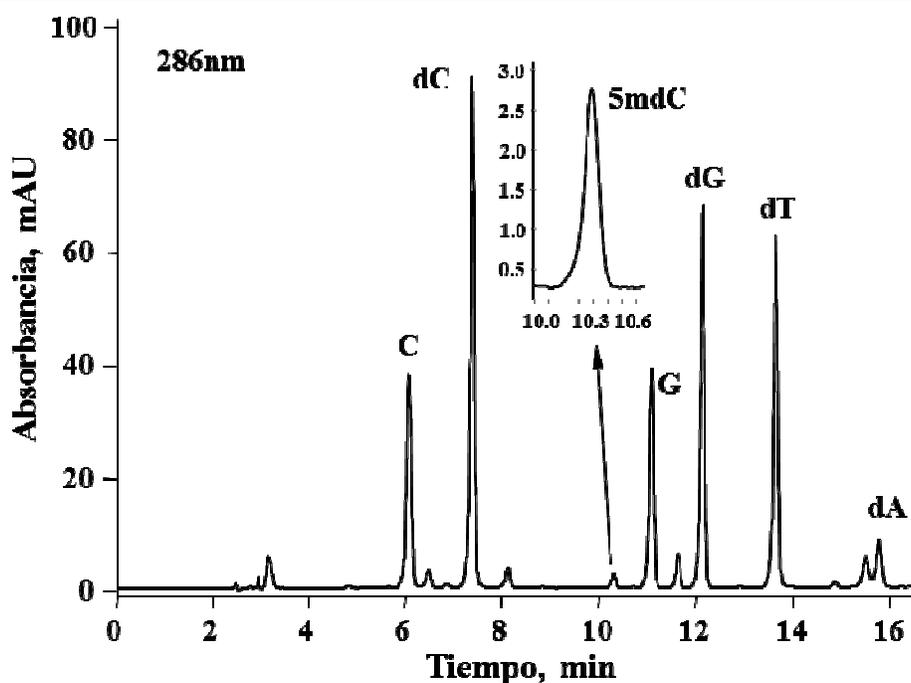


Figura 7. Cromatograma típico de nucleósidos obtenidos de hidrolizados ADN de gusano de tierra obtenido del sitio 5.

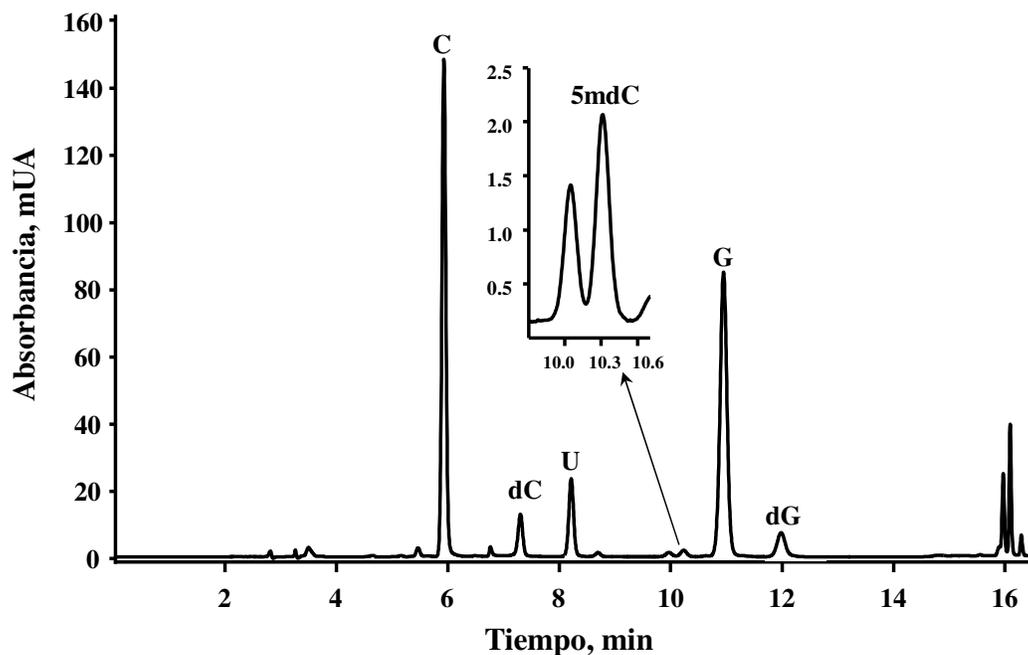


Figura 8. Cromatograma típico de nucleósidos obtenidos de hidrolizados ADN de plántulas de agave.

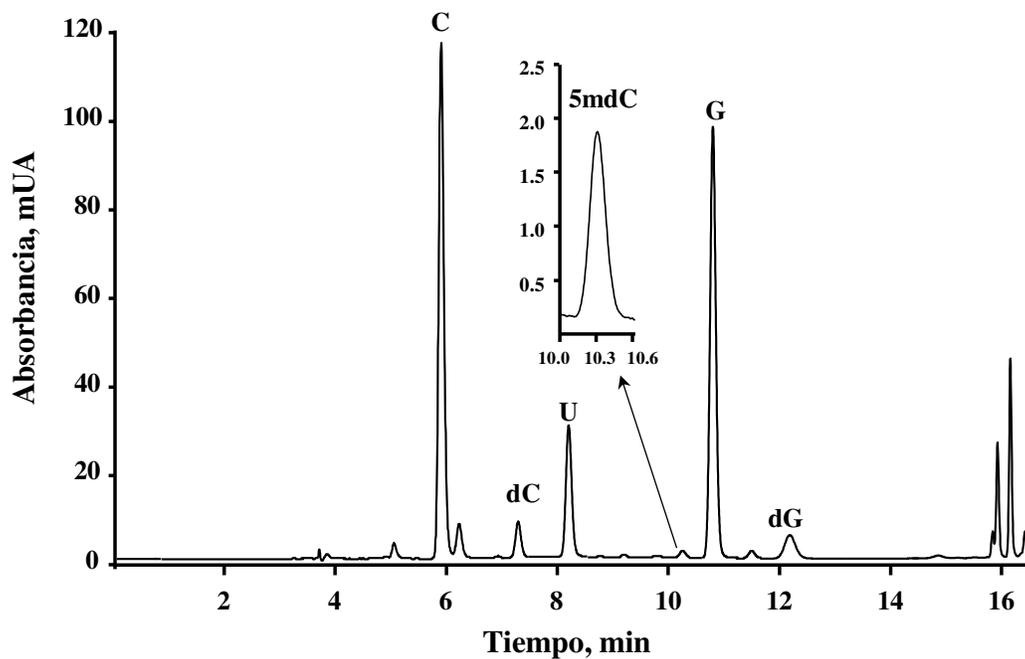


Figura 9. Cromatograma típico de nucleósidos obtenidos de hidrolizados ADN de embriones de *Coffea canephora*.

VII.1.4. Conclusiones

En esta sección de resultados se adaptaron las condiciones de digestión de ácidos nucleicos hasta nucleósidos y el procedimiento de separación cromatográfica previamente reportado para su aplicación en el análisis de muestras reales de matriz compleja. Con respecto a la hidrólisis enzimática de los ácidos nucleicos, se logró llevar a cabo la digestión hasta nucleótidos en un solo paso (la desfosforilación no se modificó); también se consiguió escalar la reacción a micromuestras de ácidos nucleicos y se redujeron la cantidad de enzimas así como el tiempo de incubación. En el caso del procedimiento cromatográfico de separación de nucleósidos, se logró separar desoxirribonucleósidos y ribonucleósidos obtenidos de muestras con matriz químicamente compleja. Esto se consiguió al modificar el procedimiento previamente establecido en el laboratorio. Las modificaciones consistieron en utilizar una columna más larga, aumentar la fuerza iónica de la fase móvil y disminuir el gradiente de modificador orgánico. Estas modificaciones permitieron la resolución de los analitos de interés, eliminando interferencias de otros componentes de la muestra. Se ha demostrado que el procedimiento es útil en estudios ecotoxicológicos, biológicos y biotecnológicos donde es necesario hallar pequeños cambios en la metilación del ADN entre diferentes tipos de organismos, cultivos, condiciones de exposición, etc.

VII.2. Determinación del grado de metilación en ADN por HPLC-FLD

VII.2.1. Introducción

Como se ha comentado, el grado de metilación global en ADN es considerado un biomarcador útil de los eventos epigenéticos que ocurren a gran escala. Existe por lo tanto alta demanda de procedimientos analíticos adecuados para su uso en laboratorios de investigación, pero también en laboratorios de rutina, con fines de diagnóstico y pronóstico de diferentes enfermedades, así como para conocer la respuesta de los organismos a diversos factores medio ambientales [67-73]. Con el afán de contribuir en el avance de los procedimientos analíticos para la evaluación de la metilación global en el ADN, en términos de alta sensibilidad y selectividad, buena precisión y alta confiabilidad de los resultados por un lado y por otro lado, relativamente bajos requerimientos instrumentales, sencillez de operación y rapidez del análisis, esta parte del trabajo se enfocó en el estudio de la factibilidad del marcaje fluorescente de los nucleósidos para su determinación por cromatografía en fase inversa con detección fluorimétrica.

El marcaje fluorescente pre-columna es una estrategia utilizada frecuentemente en cromatografía de líquidos. En muchos casos, se puede lograr una selectividad excepcional y una alta sensibilidad para analitos de interés, mediante la elección adecuada de los marcadores y de las condiciones de la detección fluorimétrica, de tal manera que se alcanzan límites de detección similares a los obtenidos por espectrometría de masas. Además, la magnitud de la señal de fluorescencia no se ve afectada por la co-elución de los compuestos no-fluorescentes, lo que proporciona una ventaja adicional respecto a la espectrometría de masas [160].

Como se comentó, la estrategia de marcaje fluorescente fue explorada para marcar el grupo fosfato en nucleótidos utilizando BODIPY FL EDA y su separación por CE, sin embargo la detección fluorimétrica no ha sido utilizada aún en aplicaciones de cromatografía de líquidos para evaluación del grado de metilación global del ADN [122-124].

En el contexto de este estudio, es interesante el trabajo publicado por Eisenberg y col., sobre aplicación de 2-bromoacetofenona en la derivatización de entidades con residuos citosínicos presentes en fármacos anti-virales [161], por lo que se decidió explorar la factibilidad de este compuesto para obtener marcaje selectivo de citosinas y citosinas metiladas en hidrolizados del ADN. La idea original en este apartado del trabajo de tesis ha sido explorar sistemáticamente las condiciones de reacción y evaluar la selectividad de la 2-bromoacetofenona para obtener derivados fluorescentes de entidades citidínicas potencialmente presentes en hidrolizados de ácidos nucleicos tales como citidina, 5-metil citidina, 2'-desoxicitidina y 5-metil-2'-desoxicitidina (figura 10) para establecer un nuevo procedimiento basado en la cromatografía de líquidos con detección fluorimétrica (HPLC-FLD) que permita determinar el porcentaje de metilación global en micro-muestras de ADN y que potencialmente se pueda aplicar para el análisis de metilación de ARN.

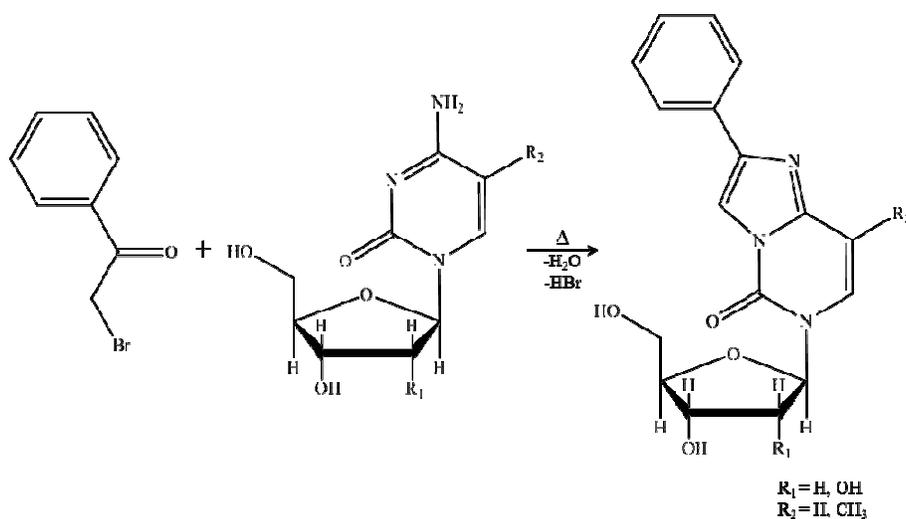


Figura 10. Esquema de reacción de 2-bromoacetofenona dirigida a las entidades con residuos citosínicos.

VII.2.2. Objetivo específico

Desarrollar un nuevo procedimiento específico y sensible basado en marcaje molecular de entidades citosínicas presentes en nucleósidos, su separación por cromatografía de líquidos y detección fluorimétrica (HPLC-FLD) que permita determinar el grado de metilación global en micro-muestras de ADN.

VII.2.3. Resultados y discusión

VII.2.3.1. Estudio de las condiciones de reacción de ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos con 2-bromoacetofenona.

Inicialmente se estudiaron individualmente todos los nucleósidos mencionados anteriormente, utilizando las condiciones de reacción propuestas por Eisenberg y col. [161]. En este caso, solamente se observó señal de fluorescencia para C, dC, 5mC, 5mdC; pero no para G, dG, A, dA, U, dT. Los máximos de los espectros de excitación y emisión de las cuatro entidades citidínicas son similares y corresponden a 306 y 378 nm (figura 11), respectivamente; y estas longitudes de onda fueron seleccionadas para obtener la señal analítica y desarrollar las condiciones de la reacción de derivatización. Es importante mencionar que los derivados fluorescentes obtenidos son fotosensibles, por lo que las reacciones se llevaron a cabo en viales ámbar y fueron protegidas de la luz. Para proceder con el estudio de las condiciones de reacción, se examinaron sistemáticamente los efectos de los solventes (como medio de reacción), la concentración de reactivos, la temperatura y el tiempo de reacción. Para cada uno de los casos, se utilizó como criterio de selección la más alta posible magnitud de la señal analítica de los cuatro compuestos de interés (señal de fluorescencia relativa de C, 5mC, dC, 5mdC, derivatizadas). Los solventes que se consideraron como medio de reacción fueron acetonitrilo, metanol, 1-4 dioxano, dimetilsulfóxido y dimetilformamida; este último fue seleccionado para continuar con el estudio de las condiciones de reacción debido a que con éste se observó la mayor señal analítica para los cuatro compuestos de interés. Como las soluciones estándar fueron preparadas en agua desionizada, este solvente también fue considerado para participar en el medio de reacción y se encontró que la eliminación del agua es esencial para la estabilidad de la señal analítica; por lo que en futuros experimentos, se eliminó el agua de los estándares y de las muestras nucleosídicas mediante centrifugación en vacío, la dimetilformamida fue deshidratada con carburo de calcio y se añadió un pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro al medio de reacción para secuestrar el agua originada durante la derivatización. En la figura 12A y 12B, se presentan los efectos de la concentración del ácido acético y de la 2-bromoacetofenona sobre la señal analítica de 5mdC (derivatizada),

mientras que la figura 12C muestra la influencia de la temperatura y el tiempo de reacción; cabe señalar que los resultados obtenidos para dC, C, 5mC y 5mdC, no se detallan debido a que fueron prácticamente los mismos.

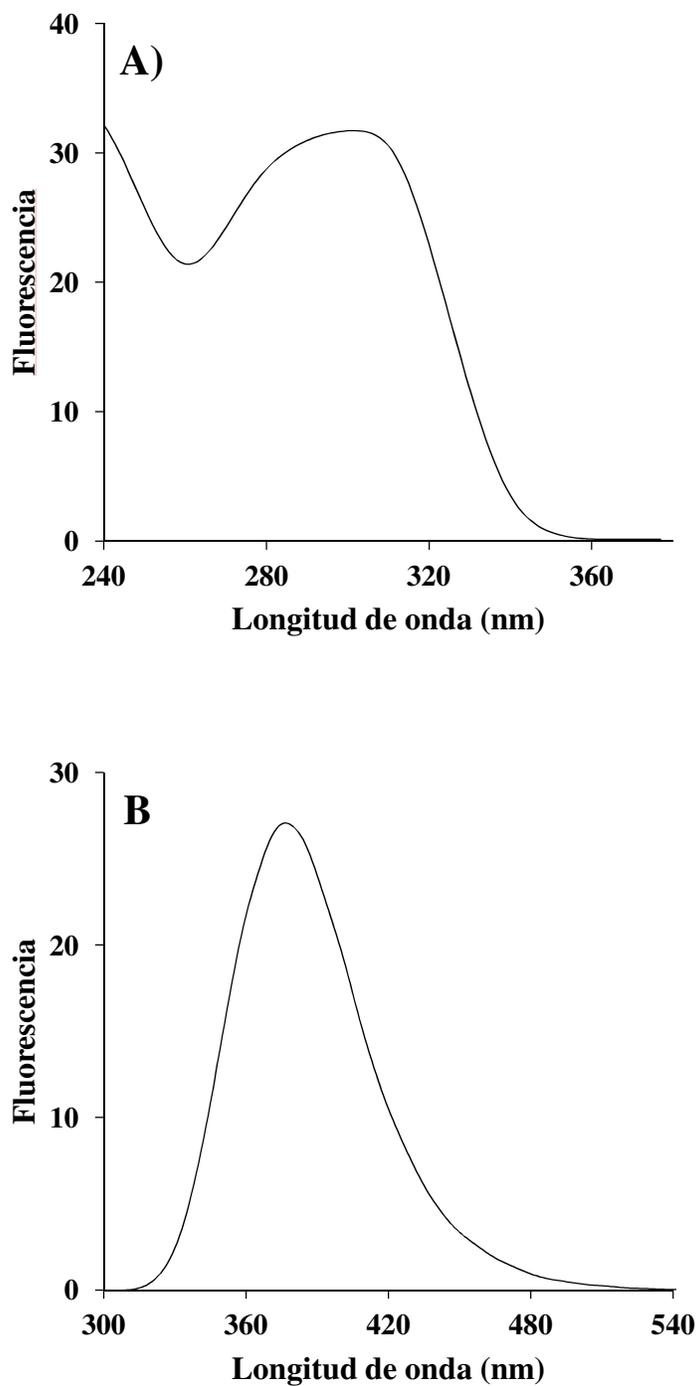


Figura 11. Espectros de excitación A) y emisión B) de 5-metil-2'-desoxicitidina derivatizada con 2-bromoacetofenona.

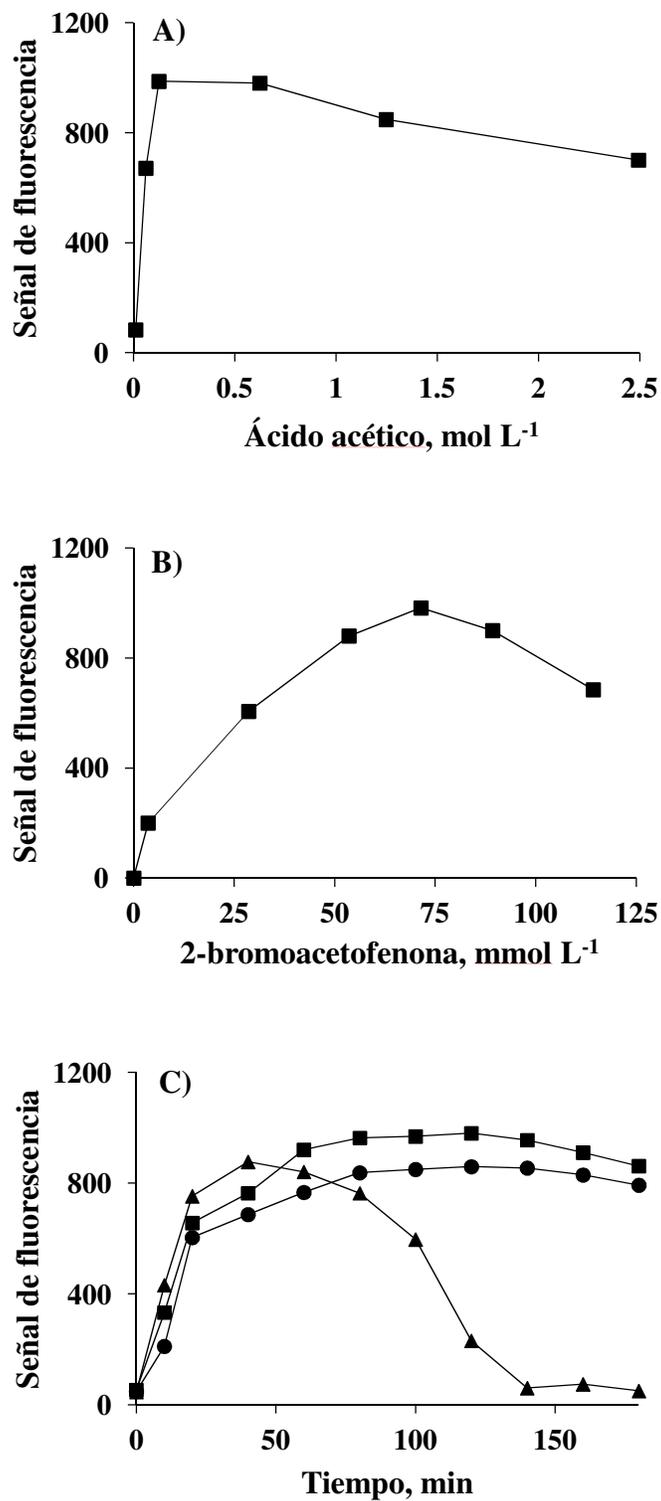


Figura 12. Efecto de: A) la concentración de ácido acético; B) de la concentración de 2-bromoacetofenona; y C) temperatura y tiempo de reacción (-●- 60 °C; -■- 80 °C; y -▲-) sobre la magnitud de la señal analítica de 5mDC derivatizada (645 ng/mL).

En conclusión, de acuerdo con la mayor magnitud de la señal analítica obtenida (área de pico cromatográfico), se seleccionaron las siguientes condiciones de reacción: ácido acético 0.56 M, 2-bromoacetofenona 65 mM, 80 °C y 90 min de temperatura y tiempo de reacción, respectivamente. Por otro lado, es importante destacar que las señales analíticas fueron estables por más de 72 horas a temperatura ambiente (viales protegidos de la luz), por lo que es posible analizar una gran serie de muestras de alrededor de 100 muestras utilizando automuestreador.

El protocolo final para llevar a cabo la derivatización de los compuestos citosínicos se describe como sigue. La reacción se llevó a cabo directamente en viales ámbar del automuestreador. Específicamente, una alícuota de solución estándar o de ácidos nucleicos hidrolizados de concentración apropiada en un volumen menor a 50 µL, fue evaporada por centrifugación en vacío (2000 rpm, 60 °C, 20 minutos). El residuo fue reconstituido en 130 µL de dimetilformamida anhidra (DMFA) con adición de 5 µL de ácido acético glacial, 20 µL de BAF (0.5 M en DMFA) y sulfato de sodio anhidro, fue incubada a 80 °C por 90 minutos y protegido de la luz. Los viales conteniendo las muestras derivatizadas, fueron colocados en el compartimiento del automuestreador y se dejaron alcanzar la temperatura ambiente antes de sus análisis.

VII.2.3.2. Selección de las condiciones de separación de C, dC, 5mC y 5mdC derivatizadas, mediante HPLC-FLD.

Para seleccionar las condiciones de separación, se utilizó una mezcla de estándares conteniendo los nucleósidos potencialmente presentes en extractos de ácidos nucleicos (dC, 5mdC, dG, dA, dT, C, G, 5mC, A, U; 64.5 ng/mL de inyección de cada uno). Aunque G, dG, A, dA, U, dT, no son susceptibles al marcaje molecular bajo las condiciones de reacción desarrolladas para entidades con residuos citosínicos y tampoco son detectadas a las longitudes de onda de excitación/emisión de 306/378 nm, estos compuestos fueron incluidos para simular la composición de muestras reales de ácidos nucleicos. Se evaluó la separación de los compuestos derivatizados explorando sistemáticamente diferentes temperaturas de separación, columnas de fase inversa y las fases móviles. De acuerdo con

reportes previos, se emplearon diferentes proporciones de ácido trifluoroacético, agua, acetonitrilo y metanol como fases móviles. Para lograr la resolución de las señales analíticas hasta la línea base así como obtener tiempos de retención razonablemente cortos, se utilizó la columna monolítica Ascentis Express C18. Las condiciones finales son las siguientes. Antes introducir las muestras derivatizadas al sistema cromatográfico, éstas fueron diluidas 1:1 con TFA al 0.4% y el volumen de inyección se ajustó de 1 a 20 μ L. La separación se llevó a cabo a 30 °C, con un flujo total de 0.35 mL/min, utilizando la columna Ascentis Express C18 de Supelco (150x3 mm, 2.7 μ m) y pre-columna C18 de Phenomenex; utilizando cuatro fases móviles A (agua), B (acetonitrilo), C (ácido trifluoroacético al 0.4%) y D (metanol); con el siguiente gradiente: 0 a 2 min 62% A, 5% B, 13% C, 20% D ; 2 a 9 min 49% A, 10% B, 13% C, 28% D; 9 a 13 min 47% A, 12% B, 13% C, 28% D; 13 a 16 min 12% A, 15% B, 13% C, 60% D. La detección se llevó a cabo utilizando las longitudes de onda de excitación/emisión de 306/378 nm, respectivamente.

En la figura 13 se muestran seis cromatogramas sobrepuestos que corresponden a cada uno de los niveles de concentración para C, dC, 5mC y 5mdC. En dicho cromatograma, se puede apreciar la separación hasta la línea base de los cuatro compuestos fluorescentes dentro de un tiempo de 18 minutos con el orden de elución C, dC, 5mC y 5mdC (como productos derivados de la reacción con 2-bromoacetofenona).

Para los cuatro derivados se obtuvieron factores de retención de 5.2, 6.1, 6.4 y 7.3, respectivamente y la pureza del pico cromatográfico obtenida para cada uno ellos fue mayor a 0.9997 ($\lambda_{exc} = 306$ nm, $\lambda_{em} 320 - 450$ nm). También, se hace notar en el cromatograma, que no se detectaron otros picos cromatográficos dependientes de la concentración confirmando la selectividad del procedimiento de marcaje y detección dirigidos hacia los compuestos con residuos citosínicos.

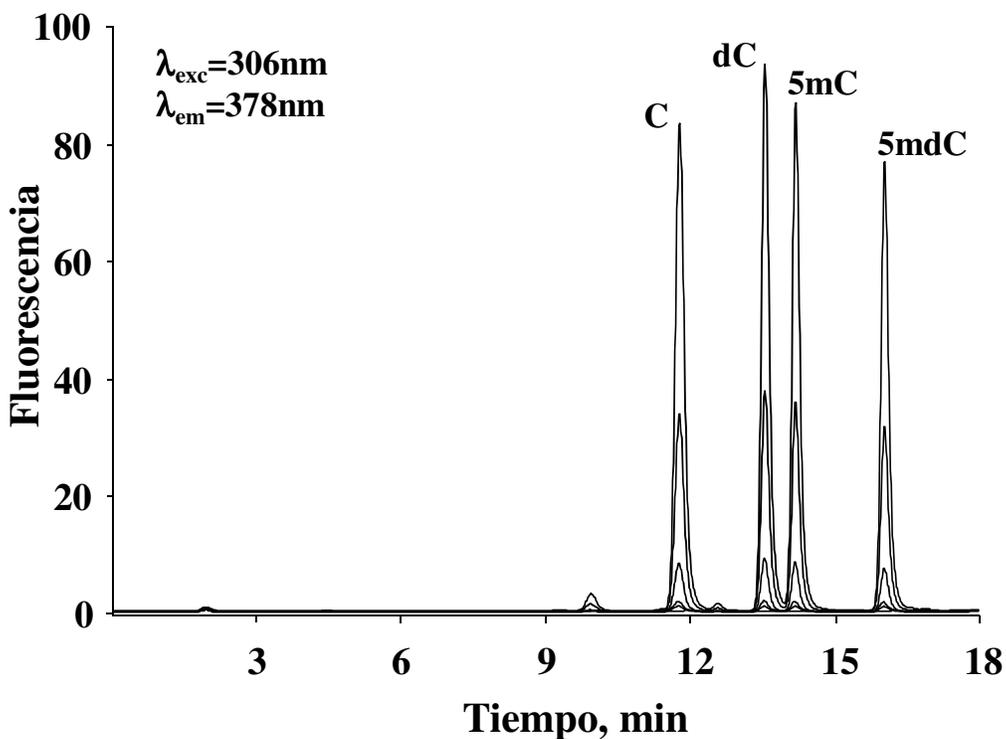


Figura 13. Cromatogramas obtenidos con el procedimiento HPLC-FLD propuesto en este trabajo: soluciones de calibración conteniendo C, dC, 5mC y 5mdC derivatizadas, así como los nucleósidos no derivatizados U, G, dG, dT, A, dA; cada uno de ellos en seis niveles de concentración 0, 1.61, 3.22, 16.1, 64.5 y 161 ng/mL.

VII.2.3.3. Procedimiento de calibración de C, dC, 5mC y 5mdC derivatizadas y evaluación de sus parámetros.

Para evaluar los parámetros de calibración, para cada compuesto el intervalo de concentración fue de 1.61 a 645 ng/mL (inyectado en la columna, figura 14) y las funciones de regresión lineal fueron obtenidas en base al área de pico cromatográfico. Como se puede apreciar en la tabla 3, se obtuvieron tiempos de retención con una reproducibilidad aceptable para los cuatro compuestos, con desviaciones estándar relativas que no exceden el 0.25%. De acuerdo con las pendientes de las funciones de regresión lineal, se observaron pequeñas diferencias indicando un cambio sutil en la sensibilidad para los cuatro derivados, en donde dicha pendiente es ligeramente menor para 5mC, 5mdC. Lo anterior puede ser efecto del cambio de composición de la fase móvil en la elución de cada compuesto, o la

presencia o no del grupo metilo. Para el intervalo de calibración de 1.61 a 645 ng/mL (de inyección) de C, dC, 5mC y 5mdC derivatizadas, la linealidad de las funciones de regresión fue excelente ($R^2 > 0.9999$).

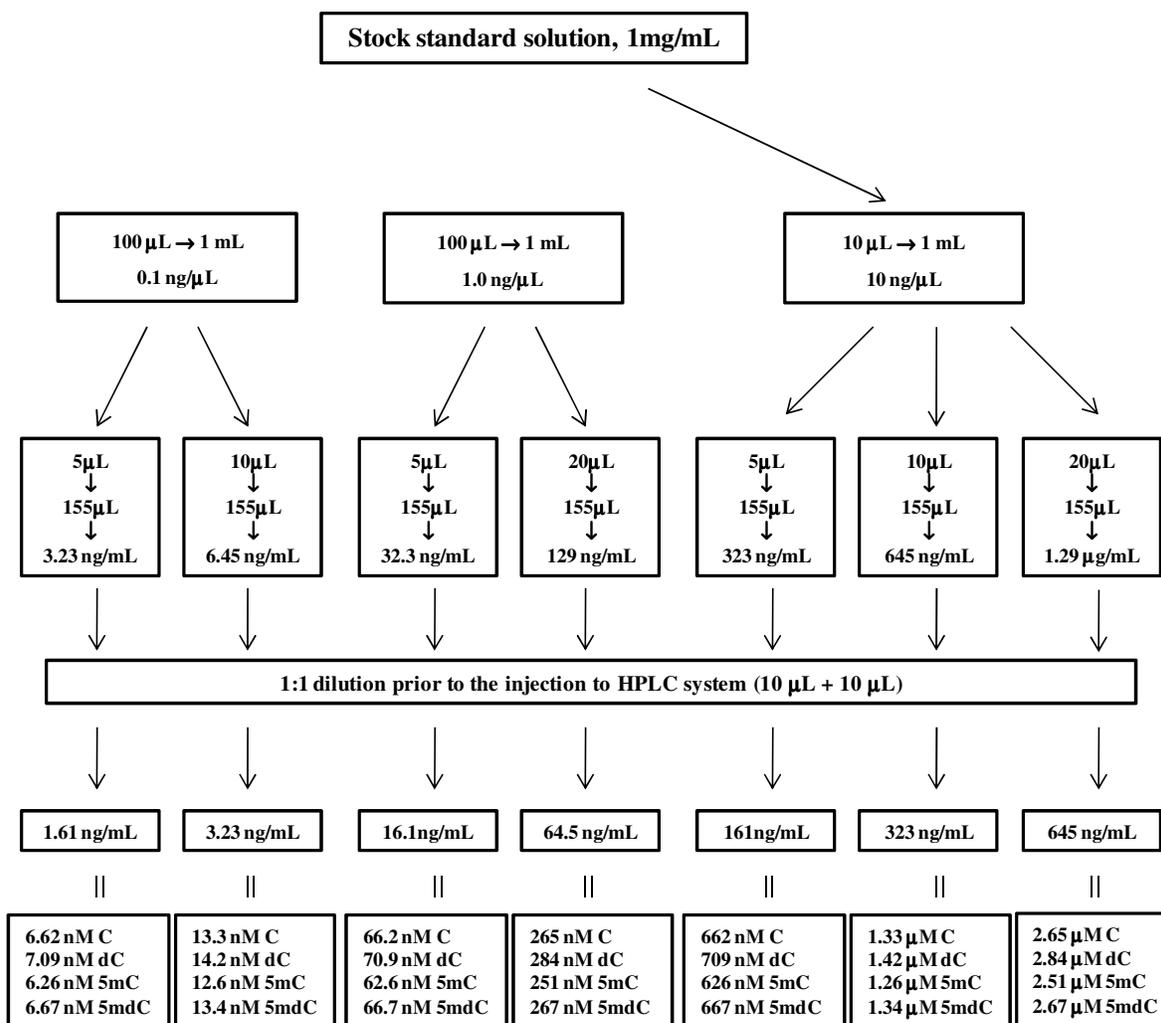


Figura 14. Esquema de preparación de las soluciones de calibración y la concentración final de cada compuesto.

Cabe señalar que se puede extender el intervalo de calibración, ya que para concentraciones más altas (>645 ng/mL de inyección) se puede programar de manera apropiada la ganancia del fotomultiplicador. Los límites de detección logrados se encuentran dentro del intervalo de 14.4 a 22.7 femtomoles inyectados en columna y los coeficientes de variación obtenidos para cinco inyecciones de las soluciones de mezcla de

estándares de C, dC, 5mC, 5mdC derivatizadas fueron de 2.99 a 3.36% para 1.61 ng/mL de inyección, y 0.81 a 0.89% para 323 ng/mL de inyección. Estos resultados indican que el procedimiento desarrollado en este trabajo permite la determinación selectiva y sensible de compuestos con residuos citosínicos presentes en hidrolizados de ácidos nucleicos para determinar el grado de metilación global en ADN, así como su viable aplicación para determinar C y 5mC.

Tabla 3. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración de C, dC, 5mC y 5mdC derivatizadas con 2-bromoacetofenona en el procedimiento de HPLC-FLD propuesto.

Parámetro	C	dC	5mC	5mdC
$T_{ret} \pm DE$, min ^a	11.78±0.03	13.55±0.02	14.18±0.02	16.03±0.02
<i>K</i>	5.2	6.1	6.4	7.3
Función de calibración ^b	A=332.7c+0.5	A=325.7c+0.6	A=312.8c+0.7	A=301.3c+0.1
Error estándar de la pendiente	1.74	1.99	2.09	1.89
Error estándar del intercepto	2.7	3.1	3.3	2.9
R ²	0.99997	0.99993	0.99995	0.99994
Función de calibración ^c	A=1.368C+0.002	A=1.433C+0.003	A=1.216C+0.003	A=1.249C+0.001
LD, ng/mL	0.24	0.25	0.29	0.38
LD, femtomol	14.40	15.30	16.60	22.70
CV, % (1.61 ng/mL)	3.30	3.25	3.36	2.99
CV, % (323 ng/mL)	0.82	0.89	0.82	0.81

^a $T_{ret} \pm DE$: tiempo de retención con su respectiva desviación estándar ($n=5$); *K*=factor de retención; función de calibración: regresión lineal que relaciona la concentración de la solución inyectada con la correspondiente área de pico (A); LD: límite de detección basada en $S/N=3$, expresada como ng/mL de inyección o femtomol inyectados en la columna; CV: coeficiente de variación para $n=5$. ^bc: ng/mL. ^cC:nM.

En estudios recientes, en que se utiliza HPLC acoplado a detector de espectrometría de masas en modo de monitoreo de reacciones múltiples, se reportó que con 4 ng de ADN es suficiente para detectar 0.16% de metilación (basado en la relación señal/ruido=3). Si concebimos una estimación similar, de acuerdo con el límite de detección logrado en este trabajo para 5mdC (0.38 ng/mL de inyección o 1.58 nM) y la concentración mayor de dC utilizada en el proceso de calibración (645 ng/mL de inyección o 2.84 μ M), el porcentaje

más bajo que se puede lograr con el procedimiento propuesto puede ser de 0.06% a partir de 80 ng de ADN. De acuerdo con lo anterior, la detección de 0.15% de metilación en el ADN se puede obtener a partir de 27 ng de muestra. Esto indica la factibilidad de este procedimiento para determinar el grado de metilación global en nano-muestras de ADN.

En principio, el grado de metilación en ADN debe evaluarse con base a la cuantificación de 5mdC y dC (funciones de regresión lineal presentadas en la tabla 3) utilizando la relación molar $5\text{mdC}/(5\text{mdC} + \text{dC}) \cdot 100\%$. Por otro lado, si el sistema de detección provee la misma sensibilidad independientemente de la identidad de cada compuesto, no se requiere calibración externa y por lo tanto el porcentaje de metilación de ADN podría ser obtenido directamente de la relaciones del área del pico cromatográfico $A_{5\text{mdC}}/(A_{5\text{mdC}}+A_{\text{dC}}) \cdot 100$, como ha sido demostrado en la separación de desoxinucleótidos monofosfato por HPLC y monitoreando el isótopo ^{31}P mediante su ionización por plasma acoplado inductivamente con detección de espectrometría de masas atómica [131]. Otra manera de estimar el nivel de metilación global en el ADN, consiste en graficar la señal analítica de 5mdC/dG contra su porcentaje de relación molar (se utiliza dG por ser el desoxinucleósido complementario de los que contienen la entidad de citosina). Como la sensibilidad de detección del procedimiento propuesto no es idéntica para 5mdC y dC (en la tabla 3 se muestra que las pendientes de las funciones de regresión lineal en proceso de calibración son ligeramente diferentes para ambos compuestos) y dG no se derivatiza con 2-bromoacetofenona y no se detecta por espectrofluorimetría, se diseñó otra manera de calibración para determinar el grado de metilación global en ADN. Para determinar el grado de metilación en ADN con el procedimiento desarrollado en este trabajo, se preparó una serie de soluciones con conocida relación molar $\text{dC}/5\text{mdC}$ (R_m) y su relación de áreas de pico cromatográfico fue utilizada como modo de señal analítica ($S=A_{\text{dC}}/A_{5\text{mdC}}$). Para cada punto de calibración, se utilizaron dos soluciones con diferente concentración de dC y 5mdC pero con relación molar idéntica y se analizaron por triplicado. El promedio de los valores de la S obtenidos en las seis determinaciones no excedió el 1% de desviación estándar relativa. Para dicho proceso de calibración se obtuvo la función de regresión lineal $S=1.0729R_m+0.1721$ (figura 15) con un factor de correlación lineal $R^2=0.9999$ y el porcentaje global de metilación de ADN fue calculado como $[1/(1+R_m)] \cdot 100\%$. El

intervalo de calibración (R_m 210 a 4.26) correspondió a los valores de citosinas metiladas de 0.47 a 19% (tabla 4).

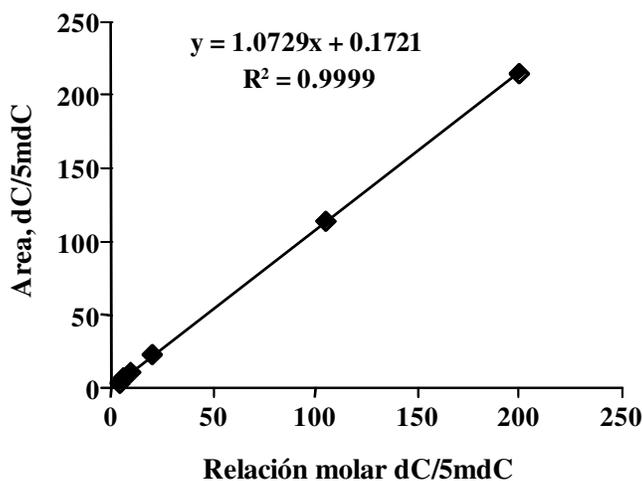


Figura 15. Función de regresión lineal que relaciona las áreas de pico dC/5mdC con su relación molar dC/5mdC obtenida en el proceso de calibración.

Tabla 4. Soluciones de calibración utilizadas para el análisis del porcentaje de metilación en ADN por HPLC-FLD.

dC, nM	5mdC, nM	dC/5mdC	% de metilación
2840	13.50	210.37	0.47
1420	6.67	212.89	0.47
709	6.67	106.30	0.93
1420	13.50	105.19	0.94
709	13.50	52.52	1.87
2840	66.70	42.58	2.29
284	6.67	42.58	2.29
1420	66.70	21.29	4.49
284	13.50	21.04	4.54
2840	133.40	21.29	4.49
70.9	6.67	10.63	8.60
709	66.70	10.63	8.60
1420	267.00	5.32	15.83
709	133.40	5.31	15.84
70.9	13.50	5.25	16.00
2840	667.00	4.26	19.02
284	66.70	4.26	19.02

VII.2.3.4. Análisis de muestras reales por HPLC-FLD

El procedimiento propuesto en este trabajo primero se utilizó para evaluar su capacidad de determinar el porcentaje de citosinas metiladas en muestras de 25 a 200 ng de ADN estándar de salmón. En la figura 16A se presentan los cromatogramas obtenidos para tres cantidades diferentes de ADN, y en la figura 16B se muestra la respectiva área de pico cromatográfico para 5mdC así como el porcentaje de metilación para cada cantidad de ADN. De acuerdo con tres réplicas independientes de cada muestra, el porcentaje de metilación para 25, 50, 100 y 200 ng de ADN fue de 6.942 ± 0.188 , 6.984 ± 0.016 , 6.942 ± 0.001 y 6.957 ± 0.006 , respectivamente, confirmando el potencial de este novedoso procedimiento para el análisis de metilación en nano-muestras de ADN.

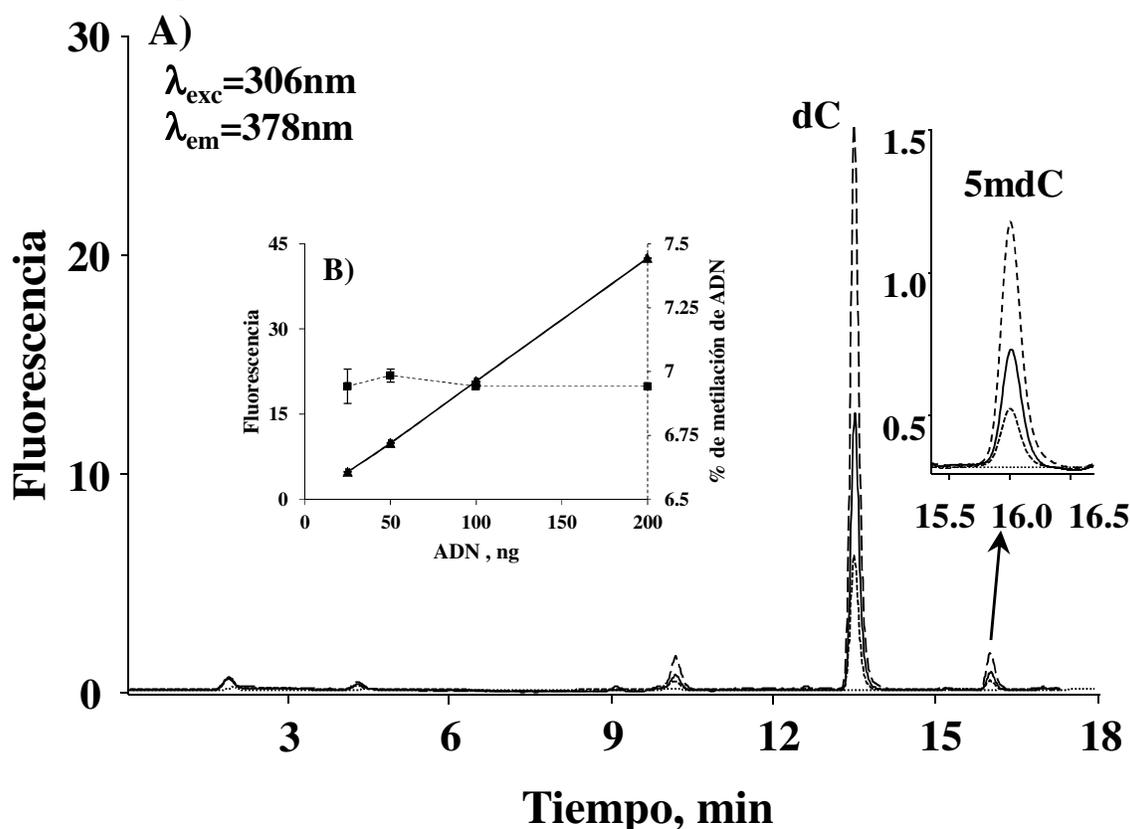


Figura 16. Análisis de ADN de salmón hidrolizado hasta nucleósidos mediante el procedimiento HPLC-FLD: A) cromatogramas de obtenidos a partir de 25 (---), 50 (—) y 100 (---) ng de ADN (el cromatograma del blanco se muestra en línea punteada); B) áreas pico calculadas de 5mdC y el porcentaje de metilación global de ADN (con sus respectivas desviaciones estándar de tres determinaciones independientes) obtenidas de 25, 50 y 100 ng de ADN.

Es procedimiento se aplicó en hidrolizados de extractos de ácidos nucleicos de berros (*L. sativum*), de gusano de tierra y de sangre humana obtenidos con el protocolo de extracción y digestión de ácidos nucleicos que se describe en la primera sección de resultados. Como se estableció que la reacción de derivatización es selectiva para compuestos que contienen citosinas, así como es posible obtener la separación satisfactoria de los derivados fluorescentes de C, dC, 5mC y 5mdC, no fue necesario eliminar el ARN que comúnmente se encuentra presente en extractos de ácidos nucleicos de muestras reales.

En la figura 17 se muestra el cromatograma de los nucleósidos obtenidos a partir de la digestión enzimática de ácidos nucleicos de planta (aproximadamente 25 ng de ADN), en donde se observa claramente la elución de C, dC, 5mC y 5mdC (como entidades derivatizadas). Como se puede observar, el ARN no fue eliminado durante el tratamiento de las muestras, pero la resolución hasta línea base de los cuatro compuestos permitió claramente evaluar el grado de metilación en ADN evitando posibles interferencias del ARN. En la misma figura se muestra el cromatograma del mismo extracto de la planta después de la adición de estándar (64,5, 16,1, 1,61, 1,61 ng/mL de inyección de C, dC, 5mC y 5mdC, respectivamente) y de la evaluación del porcentaje de recuperación se obtuvieron los siguientes resultados: 99,5, 97,4, 97,0 y 95,6% para C, dC, 5mC y 5mdC, respectivamente. En la tabla 5, se resumen los resultados del porcentaje metilación en ADN de las muestras analizadas. Como se puede observar, los dos procedimientos de calibración descritos anteriormente (1: dos funciones de calibración para dC y 5mdC y 2: una función de calibración relacionando el área de pico cromatográfico dC/5mdC contra su relación molar) proporcionaron prácticamente los mismos resultados, confirmando la confiabilidad del nuevo, simplificado proceso de calibración. Para fines comparativos, las muestras fueron analizadas por el procedimiento HPLC-DAD anteriormente descrito [113]. En este caso, son separados y detectados los nucleósidos presentes en hidrolizados obtenidos a partir de altas cantidades de ácidos nucleicos (> 10 µg), lo anterior debido a la relativa baja sensibilidad del detector de arreglo de diodos respecto al detector FLD. En la comparación de los resultados obtenidos mediante el procedimiento recientemente mencionado y el propuesto en este trabajo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p < 0.05$).

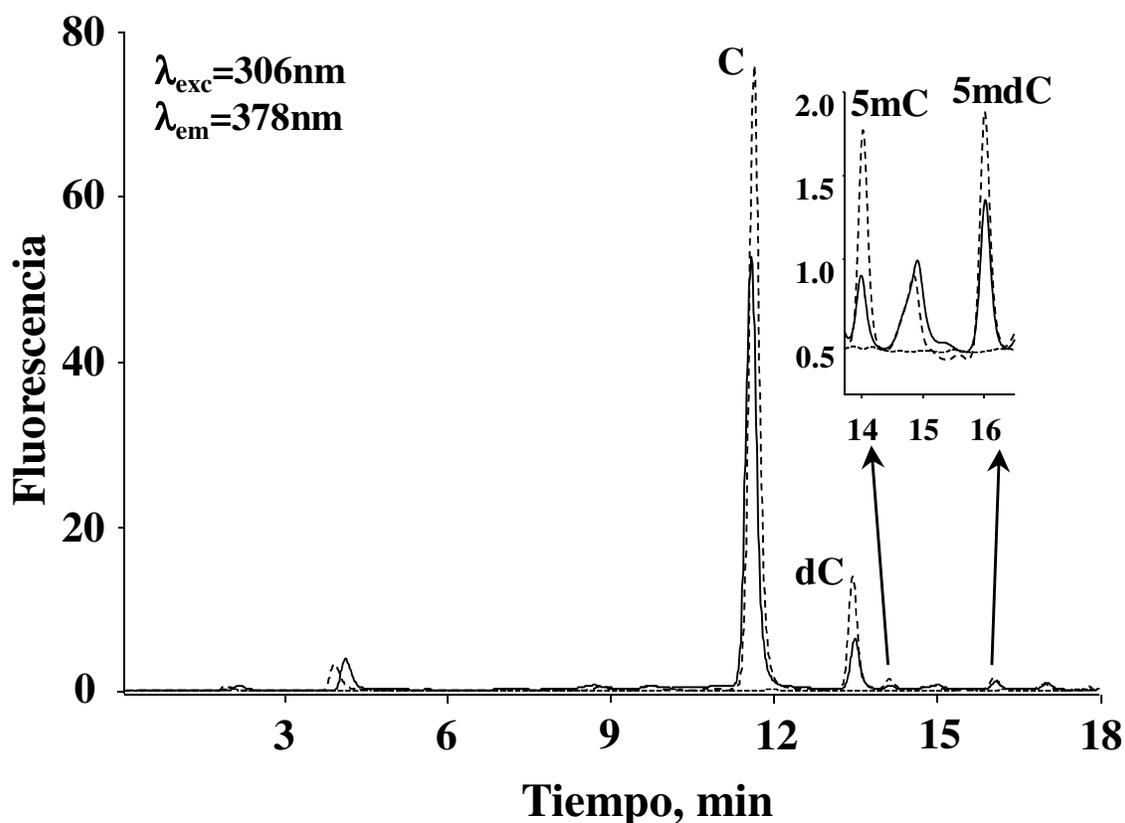


Figura 17. Cromatogramas obtenidos por el procedimiento propuesto de HPLC-FLD correspondiente a hidrolizados de ácidos nucleicos obtenidos de *L. sativum* (sin exponer a cadmio) sin (—) y con (---) adición de estándares de C, dC, 5mC, 5mdC (64.5, 16.1, 1.61 y 1.61 ng/mL, respectivamente).

Es importante mencionar que los porcentajes de metilación global encontrados en el ADN estándar de salmón en este trabajo (por detección espectrofotométrica de nucleósidos y detección espectrofluorimétrica de C, dC, 5mC, 5mdC derivatizadas) concuerdan con los resultados obtenidos de la separación por cromatografía de líquidos y detección de nucleótidos monofosfato monitoreando ^{31}P por espectrometría de masas atómica [131]. El valor de porcentaje de metilación en ADN obtenidos con el procedimiento propuesto a partir de sangre periférica humana de un voluntario sano fue de 3.74%, el cual está dentro del intervalo de 2 a 7% que típicamente se ha reportado para mamíferos [127].

Tabla 5. Porcentaje de metilación del ADN evaluado en diferentes tipos de muestras biológicas utilizando el procedimiento propuesto de HPLC-FLD y por el procedimiento establecido HPLC-DAD[113].

Muestras	Metilación global de ADN \pm SD, % (n = 3)		
	HPLC-FLD		HPLC-DAD
	1 ^a	2 ^b	
ADN purificado del Salmón	6.98 \pm 0.02	6.94 \pm 0.01	7.01 \pm 0.04
<i>L. sativum</i> control	14.60 \pm 0.02	14.62 \pm 0.02	14.59 \pm 0.03
<i>L. sativum</i> expuesto a Cd(II)	12.23 \pm 0.02	12.22 \pm 0.02	12.21 \pm 0.03
Sangre humana	3.75 \pm 0.03	3.73 \pm 0.02	3.74 \pm 0.03
Lombrices de tierra	3.36 \pm 0.05	3.35 \pm 0.04	3.37 \pm 0.06

^a Calculado utilizando las funciones de calibración de los dos compuestos (relación molar 5mdC/[5mdC+dC]) (tabla 3). ^b Calculado utilizando la función de calibración simplificada (relación entre las áreas de pico de dC/5mdC contra su relación molar) (figura 15).

Por otro lado, está bien establecido que los patrones de citosinas metiladas en el ADN de plantas están en el intervalo del 6 al 30%, el cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo para *L. sativum* (14.6%) [55, 162]. Como se ha reportado que la exposición de plantas a cadmio está asociada con la hipometilación del ADN, también se utilizó este novedoso procedimiento para evaluar el grado de metilación del ADN de *L. sativum* desarrolladas en ausencia y presencia de cadmio (0.5 mg/L de Cd(II) obtenido a partir de cloruro de cadmio) [163]. Como se puede observar en la tabla 5, se encontró la disminución significativa del porcentaje de metilación en el ADN de berros expuestos a cadmio con respecto a los berros control (12.2 y 14.6%, respectivamente). Esto confirma la factibilidad del procedimiento propuesto para evaluar la metilación global en el ADN de organismos expuestos a diversas condiciones ambientales.

Los resultados obtenidos en el análisis de hidrolizados de ácidos nucleicos (de diferentes organismos) mediante el procedimiento HPLC-FLD, demostró que este parámetro se puede determinar a partir de micromuestras de ADN, además, no se necesita

eliminar el ARN gracias a la separación de los compuestos hasta línea base. Por otro lado, el procedimiento también permite obtener la relación molar entre 5mC y C, lo que sugiere que en una sola corrida de la muestra, se podría determinar el grado de metilación global en el ARN y el ADN. Para obtener información de relevancia biológica en ácidos ribonucleicos, es necesario utilizar protocolos enfocados a la extracción específica de distintos tipos de ARN.

VII.2.3.5. Conclusiones

En este proyecto se desarrolló un nuevo procedimiento confiable, selectivo y sensible para la determinación del grado de metilación global en ADN en micromuestras, basado en la derivatización selectiva de entidades citosínicas con 2-bromoacetofenona, su separación por cromatografía en fase inversa y detección espectrofluorimétrica. El estudio de las condiciones de derivatización, de detección y de las condiciones cromatográficas; permitió obtener límites de detección en columna para citidina, 2'-desoxicitidina, 5-metilcitidina, y 5-metil-2'-desoxicitidina en el intervalo de 14.4 - 22.7 femtomoles. La reacción de derivatización se lleva a cabo directamente en los viales del automuestreador, dado que la señal analítica de los compuestos derivatizados fue estable por al menos tres días y la separación cromatográfica se logró en 18 minutos, alrededor de 100 muestras pueden correrse en paralelo haciendo este procedimiento atractivo para largas series de muestras. Se estimó que el mínimo porcentaje de metilación detectado por el procedimiento es 0.06% utilizando 80 ng de ADN. La cuantificación fue llevada a cabo mediante una función de regresión lineal que relaciona las áreas pico de A_{dC}/A_{5mdC} con la relación molar (R_m) presente en las soluciones de calibración. El porcentaje de metilación fue calculado como $[1/(1 + R_m)] * 100\%$. Los resultados obtenidos con este procedimiento HPLC-FLD a partir de micromuestras, coincidieron con aquellos reportados previamente con el procedimiento menos sensible y menos selectivo hacia entidades citosínicas, HPLC-DAD, que utiliza de 1 a 10 μ g de ADN. Además, los resultados obtenidos del ADN de muestras biológicas indican la utilidad de este nuevo procedimiento en estudios enfocados en el potencial efecto de factores ambientales sobre los patrones de metilación en ADN de diferentes organismos. Finalmente, este procedimiento podría ser aplicado en la evaluación

de la metilación de ARN, después de la su extracción selectiva para obtener información específica para cada tipo de ARN.

VII.3. Avances metodológicos en el análisis de metilación en el C5 de la citosina de ARN

VII.3.1. Introducción

En las bases que conforman el ARN se han encontrado alrededor 100 modificaciones covalentes, siendo una de ellas la adición del grupo metilo en el C5 de la citosina [137, 164]. Esta modificación relativamente abundante ha sido caracterizada en diferentes tipos de ARN entre los que se incluye el de transferencia, el mensajero, el ribosomal y pequeños no codificadores y, aunque se han planteado posibles papeles biológicos para esta modificación, su función celular no ha quedado clara [146]. Estudios llevados a cabo en diferentes sistemas biológicos han demostrado que las metiltransferasas de ADN y ARN participan en la formación de la 5mC [165]. Por otro lado, la metilación de ADN dirigida por ARN ha sido ampliamente estudiada y está particularmente asociada a la respuesta de los organismos al estrés abiótico [166-168]. Algunos autores especulan que la 5mC juega un papel importante en la regulación epigenética [154]; también se ha observado la variación de los patrones de 5mC en ARN de transferencia en hongos sometidos a diferentes ambientes nutricionales [169]. En resumen, los avances en el campo de la epigenética revelan la importancia de distintos tipos de ARN en la metilación de ADN, y en particular, se sugiere que la metilación de ARN tiene una influencia en la modulación de la información genética [146].

Estos hallazgos y las hipótesis han despertado el interés en la determinación tanto específica como global de la 5mC en ARN [147, 155]. Sin embargo, para evaluar una posible conexión entre la metilación de ADN y ARN es necesario llevar a cabo un análisis simultáneo de ambas modificaciones. En este sentido, con el establecimiento del procedimiento cromatográfico del apartado anterior, en que la 2-bromoacetofenona es utilizada para el marcaje molecular pre-precolumna de entidades citosínicas (dC, 5mdC, C y 5mC) presentes en hidrolizados de ácidos nucleicos, su separación por cromatografía en fase inversa y detección fluorimétrica; es posible obtener el grado de metilación global de ADN y ARN en una sola corrida cromatográfica. Por ello, este apartado está dedicado a

explorar y demostrar que el procedimiento HPLC-FLD arroja información de relevancia biológica. Como se sabe que el estrés abiótico afecta a la metilación del ADN y además existen reportes en que el estrés ambiental afecta el perfil de modificaciones covalentes en ARN (incluyendo la 5mC) [138], se utilizaron cultivos hidropónicos de *L. sativum* los cuales después de crecer durante 5 días, fueron expuestos durante una semana a diferentes concentraciones de iones Cd(II) y Se(IV).

VII.3.2. Objetivo específico

Demostrar que el procedimiento HPLC-FLD desarrollado en el apartado anterior permite cuantificar el grado de metilación global tanto en ADN como ARN en una sola corrida de muestra y que este análisis proporciona información biológica relevante.

VII.3.3. Resultados y discusión

El procedimiento de extracción de ADN (descrito en el primer apartado de resultados y denominado Método 1 en esta sección) propuesto por Aljanabi y Martínez [157] provee también una cantidad importante de ARN. Es por ello que en esta sección utilizamos dicho protocolo para demostrar que la determinación simultánea de metilación global en ADN y ARN en un solo extracto de muestra utilizando el procedimiento HPLC-FLD desarrollado, provee resultados de importancia biológica. Para demostrar esto, es necesario examinar si el ARN co-extraído con el ADN, es representativo del ARN total presente en la muestra biológica. Para esto se utilizó el reactivo comercial TRIzol que es selectivo para la purificación de ARN total (Método 2). El protocolo de extracción con TRIzol consiste en homogenizar de 50 a 100 mg de tejido fresco en nitrógeno líquido, después la muestra es transferida a un tubo de 1.5 mL conteniendo 1 mL de reactivo TRIzol, se homogeniza por pipeteo y se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Al homogenado anterior se le agregan 200 μ L de cloroformo, se homogeniza por pipeteo, se incuba 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga (12000 $\times g$, 15 minutos, 4 °C). El sobrenadante (aproximadamente 500 μ L) es recuperado en un tubo de 1.5 mL, se le adiciona 1 volumen de isopropanol, se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos y

se centrifuga (12000 xg, 10 minutos, 4 °C). El sobrenadante se elimina y la pastilla es lavada con etanol al 70% v/v, secada y reconstituida en 50 µL de agua desionizada. Para cada muestra se obtuvo el espectro de adsorción de ultravioleta en un intervalo de 220 a 400 nm y se evaluaron que las relaciones de absorbancia A_{260}/A_{280} fueran igual o superiores a 1.9. Los extractos obtenidos se almacenan a - 20 °C hasta su análisis [170].

VII.3.3.1. Análisis de metilación total en ARN.

Los parámetros analíticos obtenidos para citidina y 5-metilcitidina en el intervalo de concentración de 1.6 a 645 ng/mL de cada compuesto (6.62 nM – 2.65 µM para C y 6.25 nM – 2.51 µM para 5mC) están reportados en el apartado anterior (tabla 3). El porcentaje de 5mC puede ser calculado utilizando la formula $C_{5mC}/(C_{5mC}+C_C) \times 100\%$, en donde C_{5mC} y C_C corresponden a la concentraciones molares de los compuestos inyectados. Para evitar la tediosa cuantificación de C y 5mC, se llevó a cabo una simplificada calibración (figura 18) de manera similar como se describió previamente para el porcentaje de 5mdC [171]. Como en estudios preliminares del grupo de trabajo se observaba que el porcentaje de 5mC está por debajo de 1%, las soluciones de calibración se prepararon para cubrir un porcentaje de 5mC de 0.47% a 2.37%. Específicamente, se obtuvieron los cromatogramas de las soluciones conteniendo diferentes relaciones molares de C con respecto a 5mC (Valores de R_{RNA} desde 210.5 a 41.25), y la relación entre las respectivas áreas de pico fue utilizada como el modo de señal analítica ($S_{RNA} = A_C/A_{5mC}$). Para cada punto de calibración, se prepararon dos soluciones con diferente concentración de C y 5mC pero con idéntica relación molar y cada uno fue analizado por triplicado (figura 18). El valor promedio de R_{RNA} obtenido de seis corridas cromatográficas fue tomado como señal analítica, y la desviación estándar relativa no excedió el 1.5%. Se obtuvo la función de regresión lineal $S_{RNA} = 1.068 R_{RNA} + 2.252$ un $R^2 = 0.9999$ (figura 19) y el porcentaje de 5mC fue calculado como $[1/(1+R_{RNA})] \times 100\%$. En la figura 20 se presentan los típicos cromatogramas correspondientes a tres soluciones de calibración conteniendo 0.95, 1.42 y 1.89% de 5mC, los cuales están gráficamente normalizados con respecto a C para visualizar la variación de 5mC.

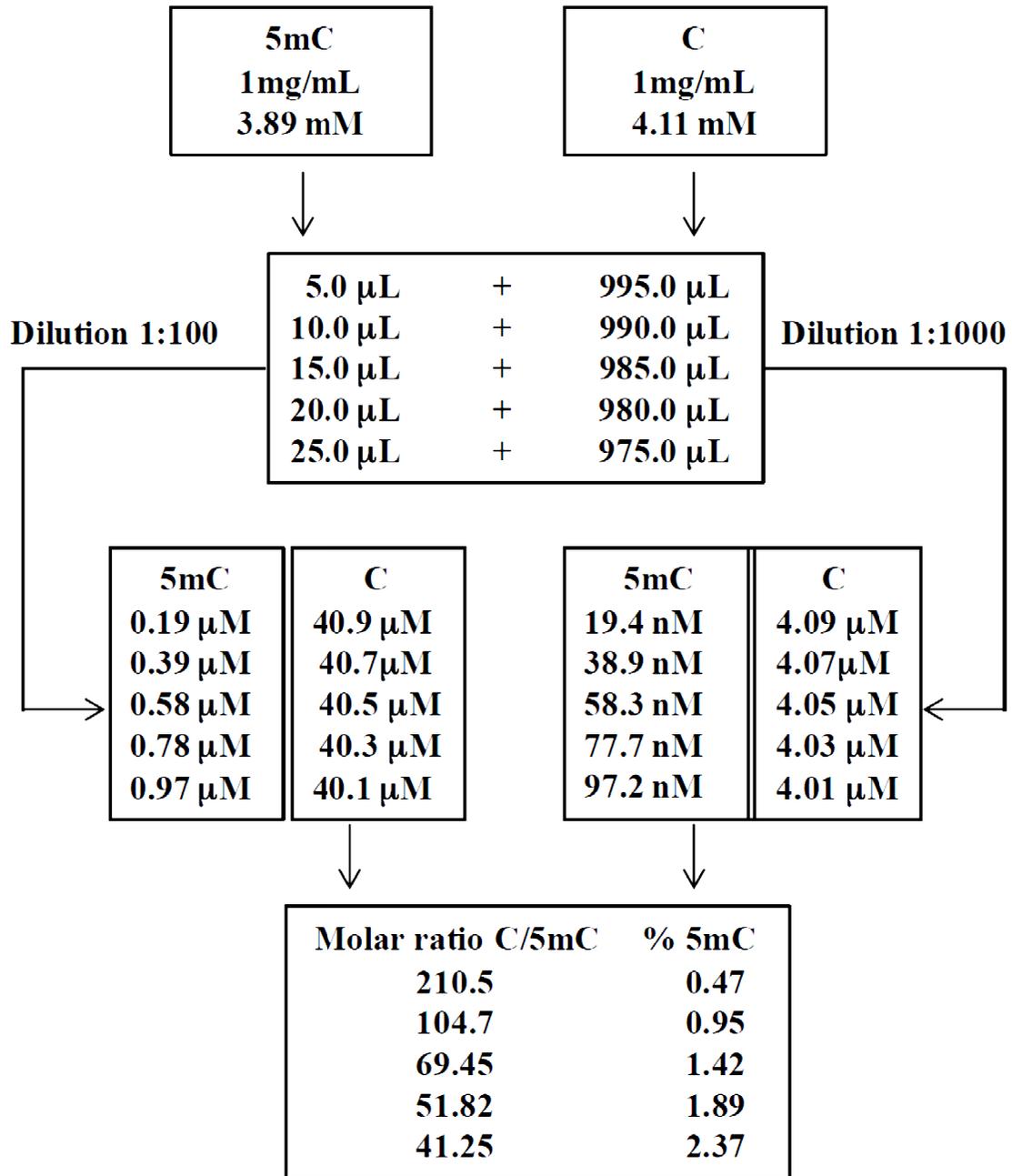


Figura 18. Preparación de soluciones de calibración para determinar el porcentaje de 5mC en ARN total.

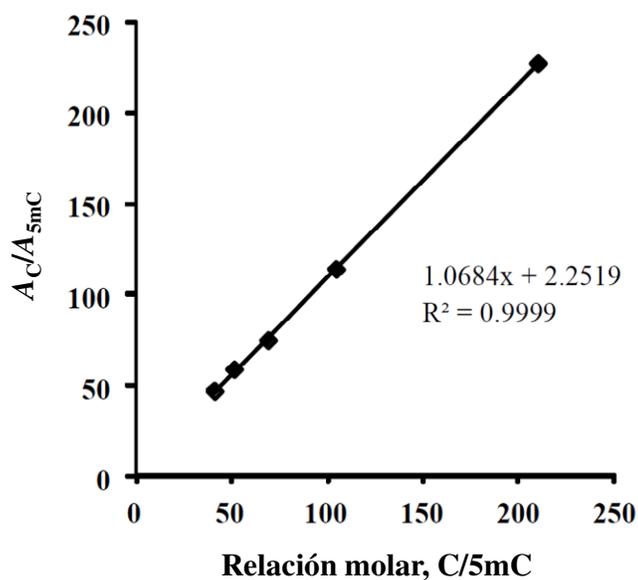


Figura 19. Función de regresión lineal para determinar el porcentaje de 5mC.

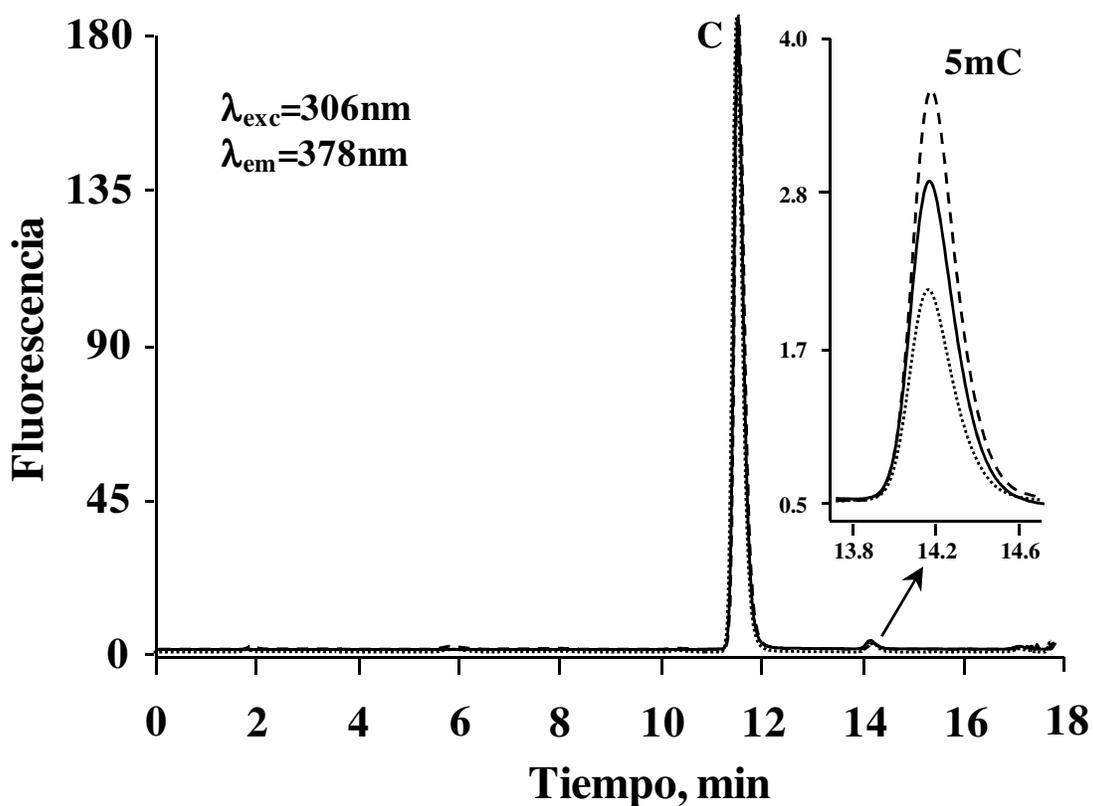


Figura 20. Cromatogramas HPLC-FLD normalizados con respecto a C, correspondientes a soluciones de calibración de 0.95 (---), 1.42 (—) y 1.89% (—) de 5mC.

Se utilizaron los métodos de extracción 1 y 2 para obtener dos muestras de cada una de las nueve condiciones de exposición (0.2, 0.5, 1 y 2 mg/L de Se(IV); 0.5, 1, 2 y 5 mg/L de Cd(II) y el control) de *L. sativum*. La diferencia de selectividad de los métodos de extracción de ácido nucleicos se pueden observar en las figuras 21 y 22, donde se presentan los cromatogramas obtenidos para el control y berros expuestos a 1 mg/L de Se(IV). En la figura 21, que corresponde a los extractos de ARN total con TRIZol (método 2), se observa la elución de los nucleósidos derivatizados C y 5mC, mientras que dC y 5mdC no son detectados (<LD). Por otro lado, en la figura 22 se muestran los cromatogramas obtenidos de extractos obtenidos con el método 1; en estos cromatogramas se observa la elución de los derivados de C, dC, 5mC y 5mdC, confirmando la co-extracción de ADN y ARN. En la tabla 6 se muestran los porcentajes de 5mC obtenidos para las nueve condiciones de cultivo de los berros, como se puede observar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos entre ambos métodos de extracción (test t, $p < 0.05$). Estos resultados indican que el ARN co-extraído junto con el ADN (método 1) es representativo del ARN total presente originalmente en la muestra (método 2).

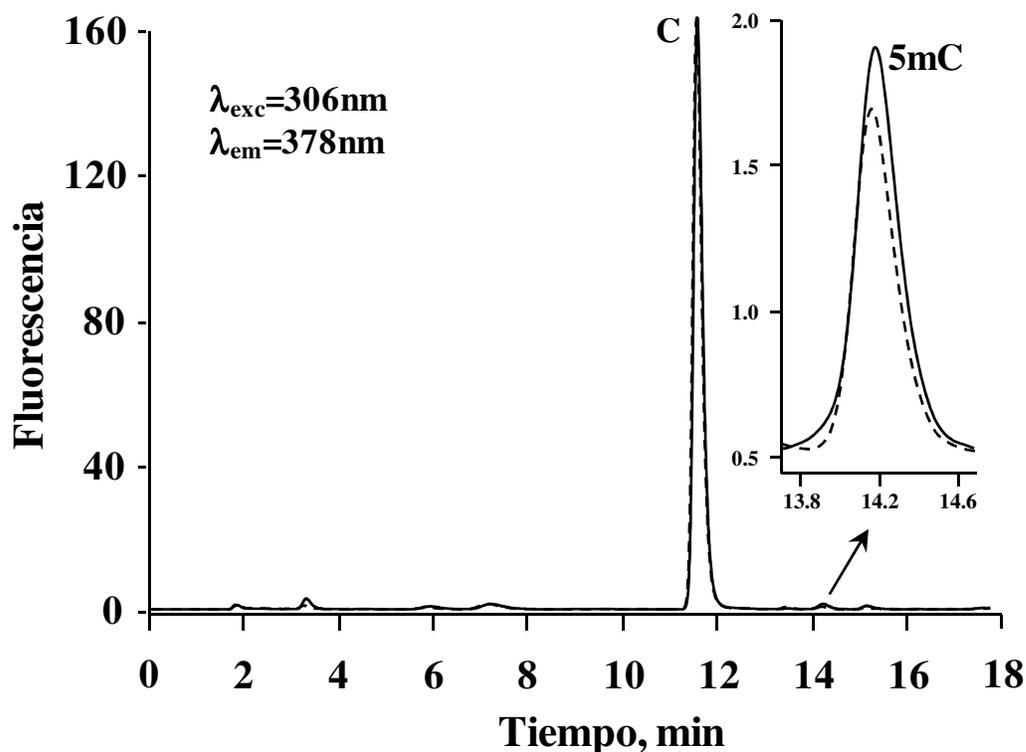


Figura 21. Cromatograma HPLC-FLD correspondiente a extractos de ARN total de plantas obtenidos con TRIZol: control (—) y expuestos a 1 mg/L de Se(IV) (---).

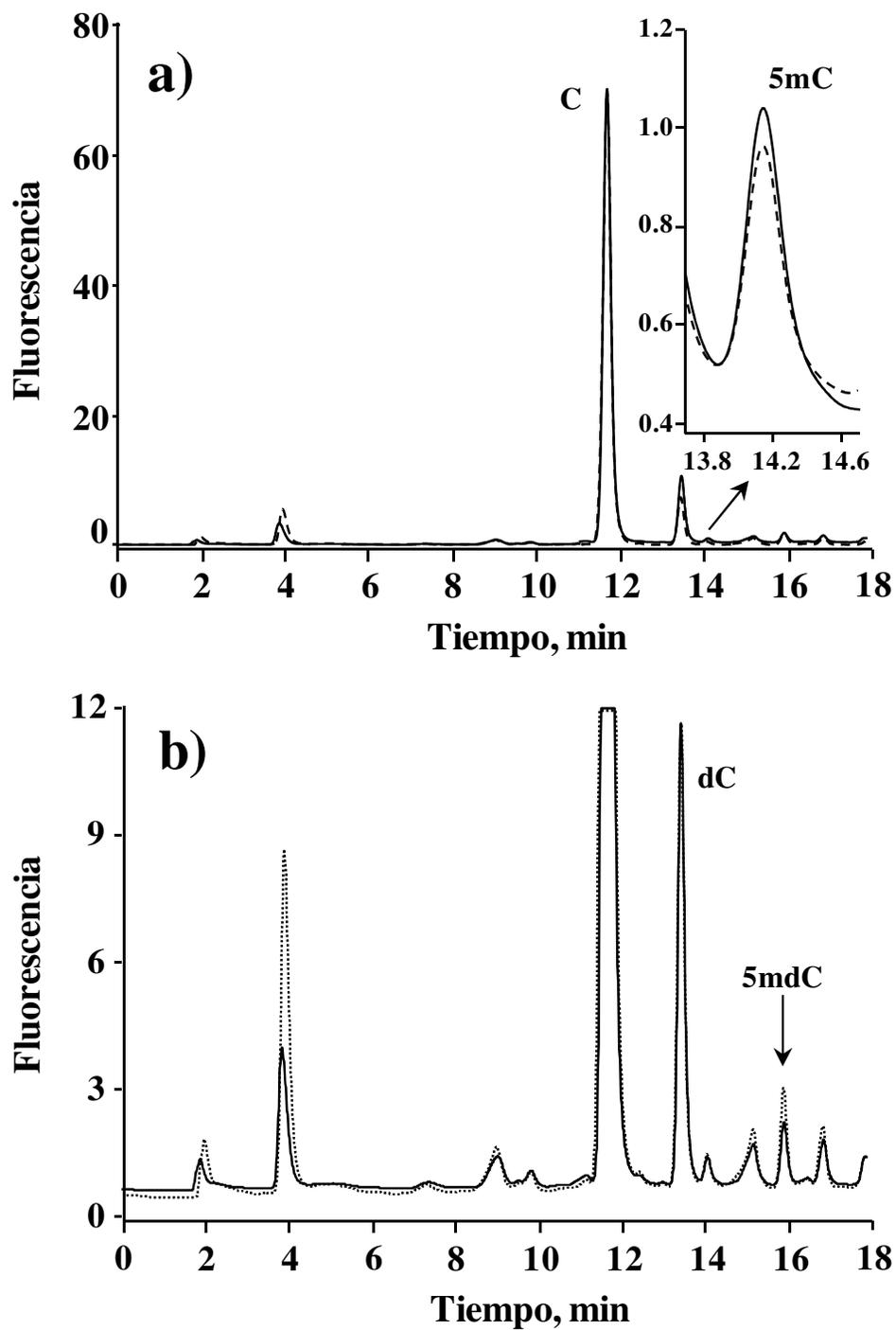


Figura 22. Cromatogramas HPLC-FLD de muestras de planta control (—) y expuesta a 1 mg/L de Se(IV) (---), extraídas con el método 1 (ADN + ARN): a) normalizados con respecto a C para visualizar metilación de ARN; b) normalizados con respecto a dC para visualizar la metilación de ADN.

Tabla 6. Porcentajes de 5mC evaluados en plantas utilizando los dos métodos de extracción y el procedimiento HPLC-FLD (tres replicas independientes).

Muestra	Método 1		Método 2		Prueba <i>t</i> <i>p</i>
	% 5mC promedio	SD	% 5mC promedio	SD	
Control	0.878	0.030	0.904	0.024	0.31
0.2 mg/L Se	0.782	0.022	0.799	0.028	0.45
0.5 mg/L Se	0.745	0.016	0.752	0.018	0.64
1.0 mg/L Se	0.693	0.018	0.727	0.016	0.07
2.0 mg/L Se	0.647	0.017	0.674	0.024	0.19
0.5 mg/L Cd	0.748	0.033	0.775	0.033	0.37
1.0 mg/L Cd	0.744	0.210	0.767	0.018	0.22
2.0 mg/L Cd	0.728	0.023	0.764	0.017	0.09
5.0 mg/L Cd	0.779	0.019	0.773	0.014	0.68

Es importante resaltar que en ningún momento se intentó lograr la extracción cuantitativa de los ácido nucleicos a partir de la muestra, de hecho se obtuvieron distintas cantidades entre cada replica y cada muestra. En la tabla 7 se presentan las cantidades estimadas de ADN y ARN obtenidas en cada extracto. La cantidad total de ácidos nucleicos (ADN + ARN) se cuantificó a partir de los valores de absorbancia de los extractos a 260 nm. La contribución relativa del ADN y ARN fue estimada de las relaciones de los picos cromatográficos (C+5mC)/(dC+5mdC) obtenidas en el análisis en cada extracto. Como se observa en la tabla 7, para el método de extracción 1 se obtuvieron de 70 a 600 ng de ácidos nucleicos por mg de biomasa, mientras que para el método 2 se extrajo de 130 a 600 ng de ARN total. La consistencia de los resultados de metilación en ARN presentados en la tabla 6 señala que no se requiere de un procedimiento riguroso en términos de extracción de ácidos nucleicos. En otras palabras, cada porción extraída es representativa para el ARN total en la muestra, puesto que los porcentajes de metilación no dependen del rendimiento de extracción.

Tabla 7. Cantidades de ADN y ARN estimadas en cada extracto.

Muestra	Método de extracción 1		Método de extracción 2
	ARN, $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$	ADN, $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$	ARN total, $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$
Control	38	13	19
0.2 mg/L Se	36	7.2	17
0.5 mg/L Se	47	16	13
1.0 mg/L Se	23	16	19
2.0 mg/L Se	20	12	19
0.5 mg/L Cd	14	15	19
1.0 mg/L Cd	24	18	20
2.0 mg/L Cd	9.2	9.5	27
5.0 mg/L Cd	1.5	6.1	20

VII.3.3.2. Análisis de metilación global en ADN y ARN total.

Una vez demostrado que el ARN co-extraído con el ADN es representativo del ARN total en las muestras de berros, el método 1 se utilizó para los análisis subsecuentes. Se suplementó el medio de cultivo para exponer a los berros a las concentraciones de Cd(II) (0.5-5.0 mg/L de cadmio como cloruro de cadmio) y Se(IV) (0.2-2.0 mg/L de selenio como selenito de sodio) con la intención de estimular el estrés abiótico sin destruir los procesos vitales activos del sistema biológico [156, 172, 173]. La metilación global en ADN y en ARN total fue evaluada mediante el procedimiento HPLC-FLD con la calibración simplificada, de acuerdo con las soluciones de calibración que contenían los cuatro estándares C, dC, 5mC y 5mdC simulando los porcentajes de metilación de 0.47-2.37 para ARN y 0.47 a 19.05 para ADN. En la figura 23 se muestran los cromatogramas representativos de estas soluciones de calibración.

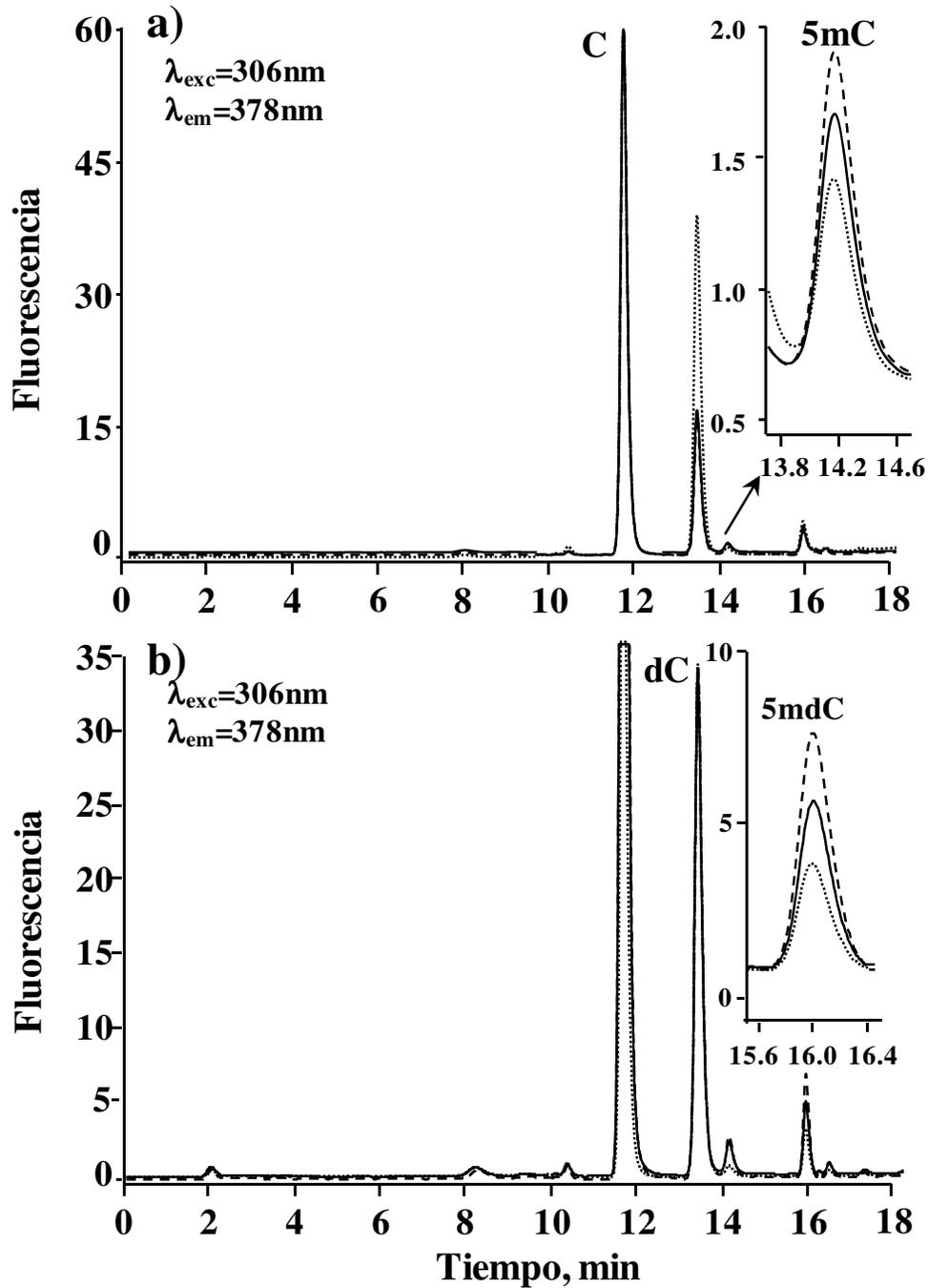


Figura 23. Cromatogramas HPLC-FLD para las soluciones de calibración utilizadas para la evaluación simultánea de metilación global en ADN y ARN total: a) cromatogramas normalizados con respecto a C para visualizar la metilación en ARN (0.95, 1.42 y 1.89% de 5mC); b) cromatogramas normalizados con respecto a dC para visualizar la metilación en ADN (9.47, 14.25 y 19.05% de 5mdC).

Los resultados obtenidos con este procedimiento HPLC-FLD, indican la factibilidad de este procedimiento para evaluar simultáneamente la metilación global en ADN y ARN total a partir de una muestra en una sola corrida cromatográfica.

Los resultados obtenidos para *L. sativum* expuesta a diferentes concentraciones de Se(IV) y Cd(II) se muestran en la figura 24. En las plantas control, se encontró un porcentaje de metilación global en ADN de $14.42 \pm 0.15\%$, como se reportó anteriormente [171]. Como se muestra en la figura 24 a) y c), se encontró que la metilación global de ADN en berros expuestos a estrés abiótico, se incrementó con respecto al control, específicamente en los intervalos de concentración de 0.2-1.0 mg/L para Se(IV) y 0.5-2.0 mg/L para Cd(II); sin embargo, para concentraciones más elevadas (2.0 mg/L y 5.0 mg/L para selenio y cadmio, respectivamente) este biomarcador epigenético decreció. Los resultados obtenidos parecen sustentar estudios previos donde las divergencias en la metilación global en diferentes especies de plantas dependen específicamente del estímulo ambiental [174, 175]. Para cadmio, se reportó hipometilación de ADN en plántulas crecidas hidropónicamente en presencia de Cd(II) (por debajo de 40 mg/L) durante dos semanas, mientras que en el presente estudio, se observó una tendencia de decremento en la metilación de ADN incluso en presencia de más bajas concentraciones del ion estresante 5 mg/L de Cd(II). Por otro lado, utilizando concentraciones similares de cadmio, comparables con las de este trabajo (< 5 mg/L) y relativos cortos tiempos de exposición (< 4 días), se reportó un incremento de la metilación de ADN en *Posidonia oceánica* con respecto al cultivo control [174]. Por otro lado, el Se(IV) utilizado en este estudio, es considerado benéfico para el crecimiento de las plantas y puede actuar como antagonista de metales pesados, pero también se han reportado sus efectos fitotóxicos [172]. De acuerdo con otros autores [175] y en base a nuestros propios resultados presentados en la figura 24, el incremento de la metilación en el ADN de los berros sucede a exposiciones de bajas concentraciones de selenio y cadmio sugiriendo la activación de mecanismos de defensa, mientras que a concentraciones más elevadas de estos elementos (2.0 mg/L de Se(IV) y 5.0 mg/L de Cd(II)), los efectos fitotóxicos se manifiestan por la pérdida de la metilación en el ADN.

Los resultados obtenidos de metilación global para ARN total se presentan en la figura 24 b) y d). En las plantas control se encontró un valor de $0.88 \pm 0.03\%$, mientras que los berros expuestos a Se(IV) o Cd(II) presentan un decremento de metilación dependiente de la concentración de estos elementos (excepto para 5 mg/L de Cd(II)). Los eventos de metilación/desmetilación en el carbono cinco de la citosina en secuencias han sido detectados en varios tipos de ARN [146, 174], sin embargo, no se encontraron en la literatura reportes de valores de porcentaje de metilación en ARN total. En otro análisis que utiliza el método de secuenciación basado en bisulfitos, la desmetilación en ARN de transferencia se observó en el tratamiento de células cancerígenas con azacitidina [176]. La azacitidina es un análogo de la citosina, inhibidor de la metilación de ADN y un fármaco candidato para terapias anti-neoplásicas; basado en los resultados obtenidos, existe la hipótesis de que la hipometilación de ARN de transferencia puede ser una respuesta de organismos tratados con azacitidina, por lo que existe la necesidad de evaluar la metilación en ARN como una potencial herramienta molecular en el monitoreo de la respuesta clínica [176]. En este sentido, nuestros resultados parecen indicar que la estimulación inducida por el ambiente, en particular la exposición a Cd(II) y Se(IV), es capaz de alterar los patrones de metilación en ARN total en *L. sativum*. Como los resultados obtenidos parecían indicar que los berros expuestos a Cd(II) o Se(IV) presentan aparentes tendencias de cambios opuestas entre el grado de metilación del ADN y del ARN total (figura 24), se hizo un análisis estadístico. En los resultados del análisis estadístico se encontró que existe una correlación inversa significativa ($r = -0.6788$, $p = 0.031$) entre estos dos parámetros en las muestras analizadas (figura 25). Los resultados obtenidos parecen concordar con la sugerencia de estudios anteriores de que puede haber una relación entre la metilación de ADN y ARN en el contexto de la regulación epigenética inducida por factores ambientales [146, 147, 154, 155].

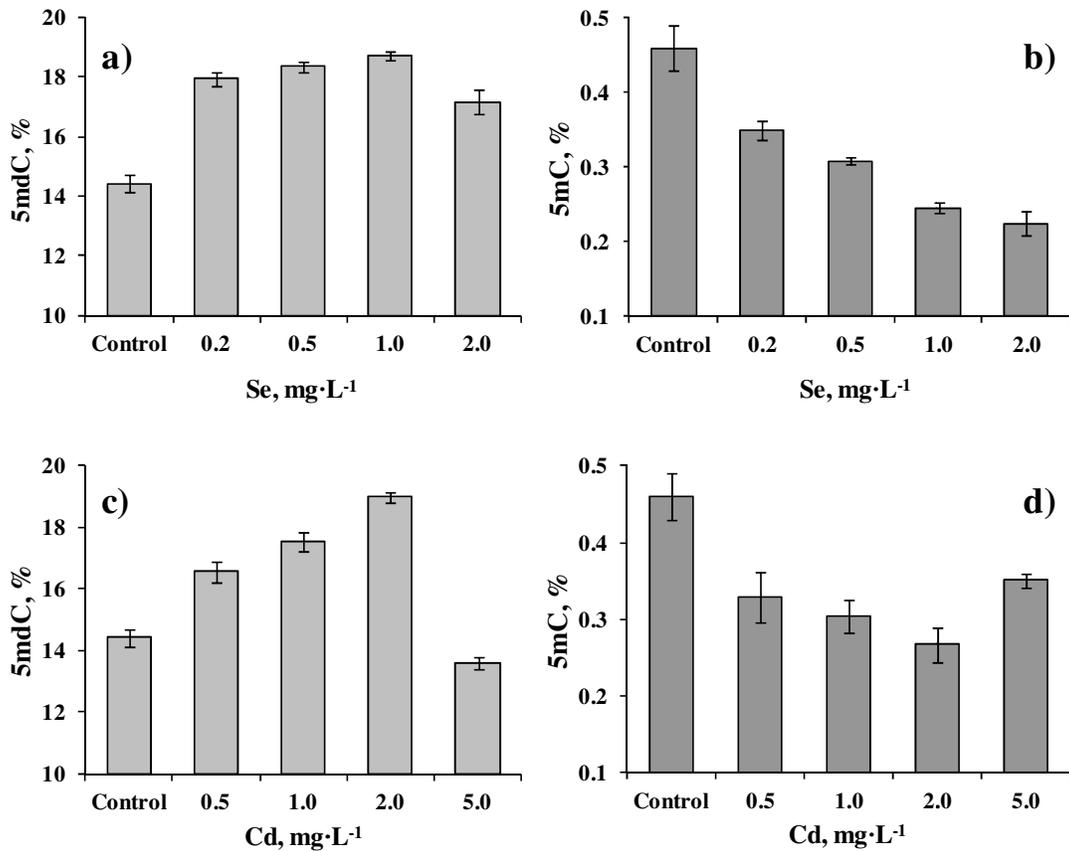


Figura 24. Resultados de metilación global en ADN (a y c) y ARN total (b y d) obtenidos de berros expuestos a diferentes concentraciones de iones estresantes.

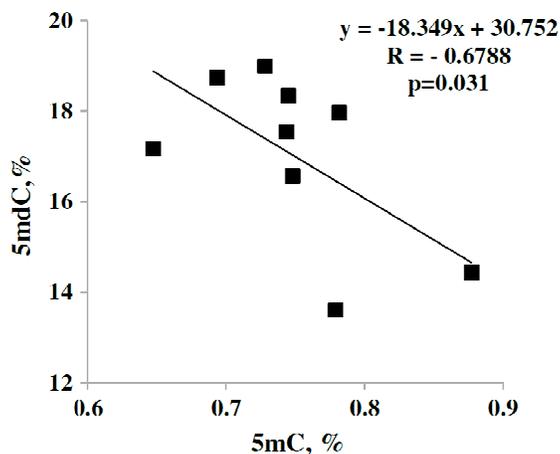


Figura 25. Análisis de correlación de metilación global en ADN y ARN total evaluado en nueve condiciones de cultivos de *L. sativum* expuestas a diferentes concentraciones de Cd(II) y Se(IV).

VII.3.3.3. Conclusiones

En esta sección se demostró la factibilidad del procedimiento HPLC-FLD, desarrollado en el apartado anterior de este proyecto, para evaluar simultáneamente la metilación global en ADN y ARN total en un solo extracto de ácidos nucleicos y una sola corrida cromatográfica. Por otro lado, los resultados analíticos obtenidos de plantas de *L. sativum* expuestas a diferentes concentraciones de Cd(II) y Se(IV), indican que este procedimiento provee información biológica relevante. En particular, la determinación global de 5mC en ARN total fue evaluada por primera vez, y se observó el decremento de este parámetro en plantas tratadas (con respecto al control) sugiriendo que este parámetro puede ser considerado como un potencial y complementario marcador biológico de organismos expuestos a estrés abiótico. Además, se encontró una correlación inversa estadísticamente significativa entre los resultados de metilación global en ADN y ARN total en plantas expuestas a diferentes condiciones que indica una posible conexión entre estatus de la metilación en ADN y ARN y sugiere la posible participación de la metilación de ARN en la respuesta epigenética al estímulo ambiental en plantas.

VII.4. Estudio analítico de otras modificaciones en el C5 de la citosina de ADN

VII.4.1. Introducción

La forma hidroxilada de la 5mdC denominada 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5hmdC), actualmente ha sido designada como la sexta base del ADN [177]. Esta citosina modificada en el carbono 5 fue descrita inicialmente en ADN de bacteriófagos [178]. En mamíferos, la 5hmdC fue reportada por primera vez en los años 70's en extractos de ADN del sistema nervioso central de roedores [179]. Durante más de treinta años, esta modificación no fue un tema de interés y su estudio fue muy limitado. En 2009 Kriaucionis y Heintz identificaron y cuantificaron 0.6% de 5hmdC (con respecto a los nucleótidos totales presentes en la muestra) en ADN de células de Purkinje mediante LC-MS [180] y el estudio de esta citosina modificada se empezó a intensificar debido a su potencial papel biológico en eventos epigenéticos.

Al igual que la metilación de ADN, la hidroximetilación de su citosina ha sido evaluada de manera global [180-185] y en secuencias específicas [186-188]. Como es de esperarse, la detección de 5hmdC en secuencias específicas puede proporcionar información para elucidar su participación en eventos epigenéticos. Para la identificación de la 5hmdC en los promotores de los genes se han descrito un conjunto de métodos de comparación de secuencias previamente tratadas con bisulfitos (BS-Seq) [52], secuenciación de ADN previamente tratados con enzimas seguidos de su desaminación con bisulfitos [188] (TAB-Seq) y secuenciación de ADN previamente oxidados y tratados con bisulfitos (oxBS-Seq) [186, 187], los cuales se resumen en la figura 26. Hoy en día se sabe que la BS-Seq se basa en la desaminación selectiva de la dC para dar lugar a la dU, pero no es capaz de distinguir entre la 5mdC y la 5hmdC [52, 189, 190]. La TAB-Seq consiste en dos modificaciones enzimáticas; la primera consiste en la protección de la 5hmdC mediante la β -glucosil transferasa para obtener 5-glucosilmetoxi-2'-desoxicitosina (5gmdC); la segunda consiste en la oxidación de la 5mdC hasta 5cadC utilizando exceso de enzimas TET; por último el tratamiento con bisulfitos conduce a la desaminación selectiva de la dC y la 5-carboximetil-2'-desoxicitosina (5cadC) para obtener dU en ambos casos [188]. La

oxBS-Seq consiste en la oxidación química selectiva de la 5hmdC con perrutenato de potasio hasta obtener la 5-formil-2'-desoxicitosina (5fdC), la cual al ser tratada con bisulfitos se obtiene dU [186, 187]. Cabe señalar que para estas técnicas después de la reacción con bisulfitos, se lleva a cabo la amplificación de las secuencias mediante la PCR y en lugar de identificar dU en la secuencia, se detecta T.

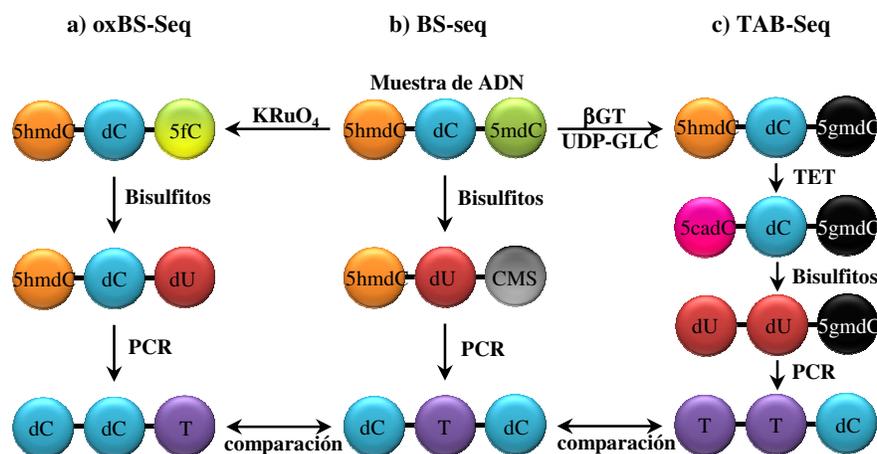


Figura 26. Comparación de los métodos de secuenciación a) oxBS-Seq, b) BS-Seq y c) TAB-Seq.

En el análisis cuantitativo de 5hmdC en ADN total, destacan las técnicas de radiomarcaje glicosídico enzimático específico de la 5hmdC [182], radiomarcaje de nucleótidos monofosfato (P^{32}) seguido por su separación cromatográfica en capa delgada (TLC, por sus siglas en inglés) [191], separación y detección de nucleósidos por HPLC-DAD [180, 192] y detección por espectrometría de masas LC-MS [180], LC-MS/MS [193], de nucleobases mediante LC-MS/MS [194] o HILIC-MS [195]. La 5hmdC se ha reportado en una gran variedad de tejidos de mamíferos, entre los cuales destacan con altos niveles (0.3 a 0.7%) las células del sistema nervioso central; con niveles intermedios (0.15 a 0.17%) músculo, pulmón, riñón, corazón y; con niveles bajos (0.03 a 0.06%) hígado, bazo y glándulas endócrinas [196].

Algunos estudios sugieren que los componentes responsables de metilación en el ADN actúan diferente en presencia de 5mdC y 5hmdC. En primer lugar, la 5hmdC inhibe la metilación de citosinas mediada por la DNMT-1 [197], que posteriormente puede

interferir en el mantenimiento de la metilación durante la división celular y esto puede conducir a la desmetilación pasiva dependiente de la replicación. En segundo lugar, las metiltransferasas que actúan en la metilación *de novo*, DNMT-3A y DNMT-3B funcionan como deshidroximetilasas de la 5hmdC [198]. Por último, las proteínas de unión involucradas en la metilación de la citosina en contexto de islas dCpdG (MBD-1, MBD-2, MBD-4, MeCP-2) reducen su afinidad en presencia de 5hmdC [56, 190], y esto puede afectar la actividad transcripcional de genes con presencia de 5hmdC en sus promotores.

Por otro lado, la identificación en mamíferos de la timina ADN glicosilasa que es capaz de reconocer los sitios de apareamiento erróneo G:X, donde X = 5cadC, 5fdC (productos de oxidación de la 5mdC) y 5-formil-2'-desoxiuracilo (5fdU) (producto de oxidación y desaminación de la 5mdC) participa en la desmetilación activa del ADN mediante la vía de excisión-reparación de bases, [59, 191].

Para explicar la presencia de 5hmdC en el ADN de mamíferos, se planteó que ésta se genera mediante la oxidación de la 5mdC vía enzimática o por especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante el estrés oxidativo. Tahiliani y colaboradores identificaron las enzimas de la familia TET (ten eleven translocation, por sus siglas en inglés) que catalizan la conversión de 5mdC a 5hmdC [191], las enzimas de esta familia presentan las características de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe(II). Aunque las ROS son generadas endógenamente de manera normal durante el metabolismo aeróbico, su exceso debido a la inefectiva neutralización puede conducir al daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN. Una fuente importante de ROS son las reacciones Fenton, en las cuales los iones de metales de transición (Cu, Fe) catalizan la conversión del peróxido de hidrógeno dando lugar a radicales oxhidrilo que pueden hidroxilar al grupo metilo de la 5mdC. Poco se ha explorado la formación de 5hmdC mediante especies reactivas de oxígeno debido a que no se ha encontrado una correlación entre este compuesto y otras modificaciones en bases asociadas al estrés oxidativo [180].

VII.4.2. Objetivo específico

Identificar 5hmdC como producto de oxidación de 5mdC mediado por la reacción Fenton.

VII.4.3. Resultados y discusión

VII.4.3.1. Separación y detección de 5hmdC por HPLC-DAD

Como se ha venido comentando, el análisis de modificaciones de bases de ácidos nucleicos por HPLC por lo general se lleva a cabo después de haber hidrolizado el ADN hasta nucleósidos. En este trabajo, la 5hmdC se obtuvo mediante la desfosforilación de 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina-trifosfato (5hmdCTP) con fosfatasa alcalina siguiendo el protocolo descrito en la primera sección de resultados. Una vez obtenida la 5hmdC se mezcló con los estándares de ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos (C, U, 5mC, G, A, dC, dU, 5mdC, dG, dT, dA) en 20% de fase móvil C (descrita abajo) y 10 μ L de la solución obtenida se introdujo al sistema HPLC-DAD descrito en la primera sección de resultados. En el perfil de elución de los compuestos se observó que la mayoría de los nucleósidos se separaron hasta línea base, excepto 5hmdC y U. La aplicación de variaciones en los gradientes de elución con metanol y acetonitrilo, así como de variaciones en la fuerza iónica, no lograron llevar a cabo la separación total hasta línea base de 5hmdC y U. Otra propuesta para resolver este problema fue utilizar una columna cromatográfica con tecnología de núcleo sólido. La separación se llevó a cabo a 40 °C, con el flujo total de 0.3 mL/min, utilizando la columna Kinetex C18 (150 x 3 mm, 2.7 μ m) y pre-columna C18 de Phenomenex. Para llevar a cabo la elución de los analitos se utilizaron cuatro fases móviles A (agua), B (acetonitrilo), C (solución amortiguadora de fosfato y acetato de amonio 30 y 15 mM, respectivamente, pH 4.1) y D (metanol); utilizando el siguiente gradiente: 0 min 80% A, 20% B; 0 a 4 min 78% A, 20% B, 2% C; 4 a 11 min 77% A, 20% B, 3% C; 11 a 16 min 35% A, 20% B, 20% C, 25% D; 16 a 16.8 min 30% A, 25% B, 20% C, 25% D; 16.8 a 17 min 80% A, 20% C. La detección DAD se llevó a cabo a la longitud de onda 277 nm. En la figura 27 se muestra el cromatograma obtenido en estas condiciones de separación,

observándose la resolución cromatográfica de los 12 compuestos en un tiempo de 16 minutos. En la aplicación al análisis de muestras reales sin embargo, esta separación no fue prometedora para la evaluación del porcentaje de 5hmdC, ya que se esperan muy bajas concentraciones de esta especie (<0.7 % de citosinas totales), de acuerdo con los reportes encontrados en la literatura [196]; cabe también mencionar que, aunque en la solución de estándares se logró la resolución de U y 5hmdC, debido a la compleja matriz química presente en la muestras reales, dicha resolución es insuficiente [180].

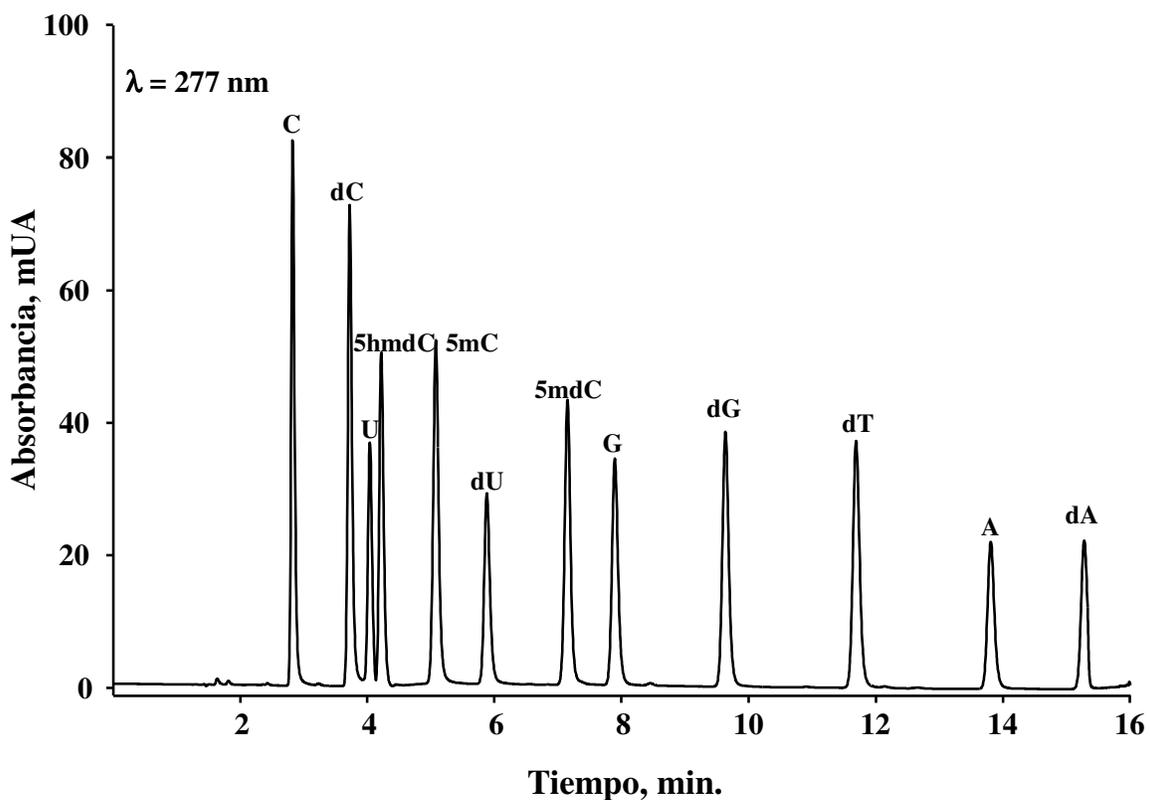


Figura 27. Cromatograma de estándares de 12 nucleósidos, obtenido utilizando la columna de núcleo sólido.

VII.4.3.2. Análisis de 5hmdC por HPLC-FLD

Con la intención de obtener un procedimiento viable para el análisis de 5hmdC, se exploró la posibilidad del marcaje fluorescente de la 5hmdC con 2-bromoacetofenona; de esta manera se podría eliminar la interferencia de U que no forma compuesto fluorescente en estas condiciones y lograr una buena resolución de la 5hmdC. Como se esperaba, el

marcaje molecular funcionó con la 5hmdC bajo las mismas condiciones de reacción que se establecieron para las otras citosinas (C, dC, 5mC y 5mdC). Sin embargo, al incluir las 5 citosinas derivatizadas en la corrida cromatográfica, se observó la co-elución de la 5hmdC y la 5mC. Esto era predecible debido a que estos dos compuestos son isómeros con la misma masa molecular y muy similares propiedades, entre las cuales la diferencia radica en la posición del grupo hidroxilo. Para evitar la interferencia de 5mC en la elución de la 5hmdC, se intentó lograr la separación únicamente dC, 5hmdC y 5mdC, pero no se logró separar la dC y 5hmdC. Desafortunadamente, para lograr la elución de este tipo de compuestos existen muy pocas opciones. Por lo general, sólo se utilizan fases móviles de ácido trifluoroacético (TFA) ó ácido heptafluorobutírico (HFBA) con modificadores orgánicos. A pesar de utilizar una columna monolítica, probar fases ácidas con diferente concentración de TFA ó HFBA (por debajo de 0.1% v/v), diferentes temperaturas y distintos gradientes de modificadores orgánicos (metanol y/o acetonitrilo) no se logró separar la dC de la 5hmdC. Esto se puede deber a que el grupo hidroxilo en que se encuentra en el metilo del C5 de la citosina, le provee mayor polaridad a la molécula que cuando éste se encuentra en la posición 2' del azúcar. Esta hipótesis puede ser soportada porque se observó que la 5hmdC se eluyó antes que la 5mC (figura 27) en una columna de fase inversa.

VII.4.3.3. Identificación de 5hmdC como producto de oxidación mediado por reacciones Fenton

Con el fin de demostrar que la 5hmdC puede ser obtenida a partir de la 5mdC en reacción Fenton, en esta parte se trabajó en primer lugar con el estándar de 5mdC sin incluir ningún otro nucleósido. Para el proceso de identificación de 5hmdC como producto de oxidación de 5mdC, se utilizaron las condiciones de reacción que reportaron Hong y col., [199]. Se preparó una mezcla de reacción que contenía 10 µg de 5mdC, la solución de Cu(II), peróxido de hidrógeno y ácido ascórbico (40 µM, 320 µM, 3.2 mM, respectivamente) en amortiguador de fosfato/cloruro de sodio pH 7 (20 y 50 mM, respectivamente) en un volumen final de 50 µL. La mezcla de reacción después de ser incubada durante 1 hora a 37 °C, así como los estándares de 5mdC y 5hmdC (200 ng/µL)

fueron diluidos (20 μL de mezcla de reacción ó estándar + 130 μL de fase móvil C) e introducidos al sistema cromatográfico (Agilent 1200) con un volumen de inyección de 30 μL . La separación se llevó a cabo en una columna Luna C18 (250 x 4.5 mm, 5 μm , Phenomenex) a 35 $^{\circ}\text{C}$, con el flujo total de 1 mL/min, utilizando tres fases móviles A (agua), B (metanol), C (amortiguador de fosfato y acetato de amonio 30 y 15 mM, respectivamente, pH 4.1); con el siguiente gradiente: 0 min 14.5% A, 0.5% B, 85% C; 0 a 5 min 14% A, 1 %B, 85% C; 5 a 14 min 15% B, 85% C; 14 a 18 min 25% A, 25% B, 50% C. La detección se llevó a cabo a la longitud de onda 277 nm. Como se muestra en la figura 28, en la mezcla de reacción el pico con el tiempo de retención 10.55 minutos correspondió a 5hmdC, ya que el estándar de este compuesto presentó el mismo tiempo de retención y el mismo espectro de absorción en UV.

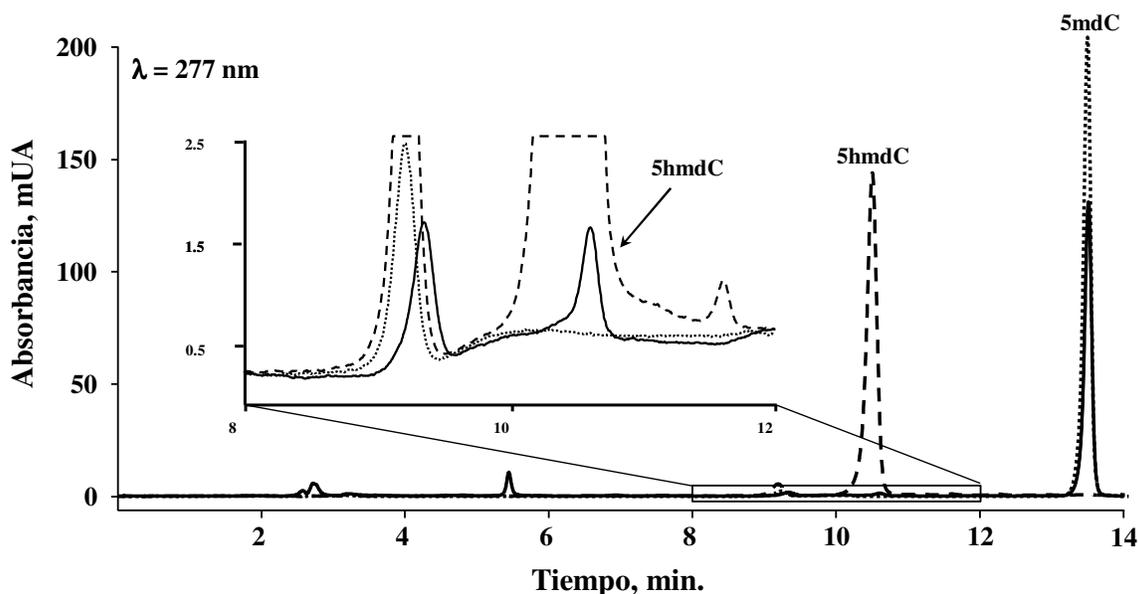


Figura 28. Cromatogramas en fase inversa de estándar de 5hmdC (---), 5mdC (···) y producto de la reacción Fenton con 5mdC (—).

Como se muestra en el cromatograma de la figura 28, se obtuvo una señal analítica de baja intensidad para 5hmdC, por lo que se planteó llevar a cabo la reacción Fenton con la misma cantidad de 5mdC pero aumentando la concentración Cu(II), peróxido de hidrógeno y ácido ascórbico 5 y 10 veces esperando obtener un mejor rendimiento de la reacción. En los cromatogramas de la figura 29, se observa prácticamente la misma señal analítica de 5hmdC para los tres tratamientos. Cabe señalar que la señal analítica de 5mdC

decrece conforme aumenta la concentración de los reactivos para llevar a cabo la reacción Fenton. También se puede observar el aumento de señal analítica de compuestos altamente polares que se eluyen en volumen muerto (entre 2.5 y 3 minutos) conforme aumentan las concentraciones de los sustratos de la reacción Fenton, lo que sugiere que los radicales hidroxilo afectan la estructura de 5mdC, pero la 5hmdC no es el único producto de la oxidación.

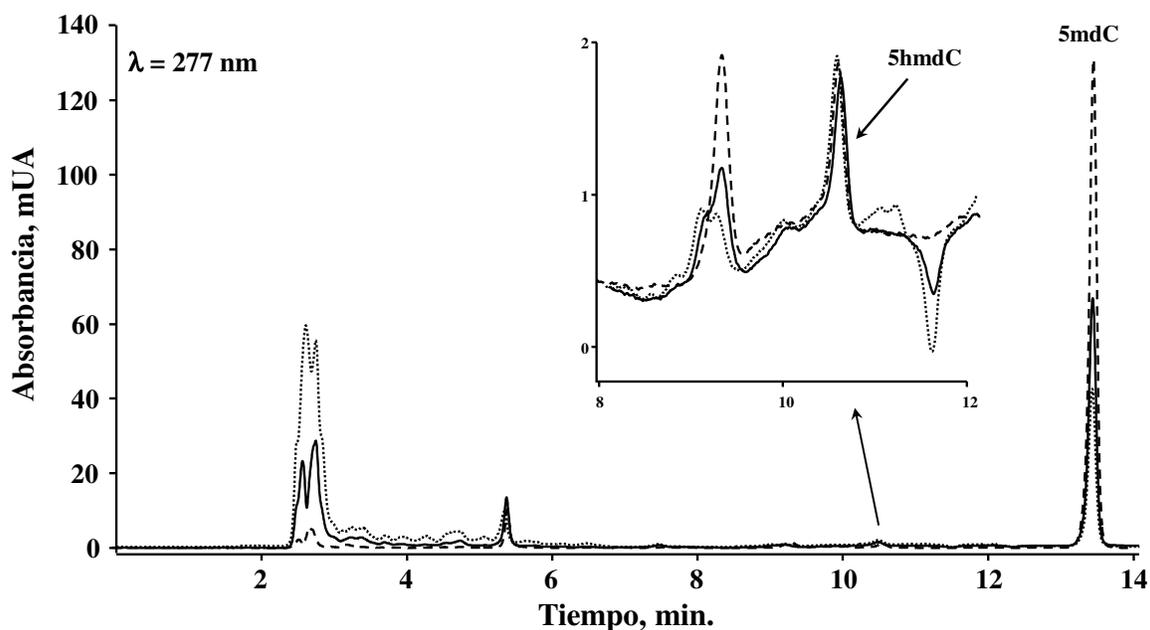


Figura 29. Cromatograma en fase inversa correspondiente a 5mdC y sus productos de oxidación inducidos por la reacción Fenton a diferentes concentraciones de Cu(II), peróxido de hidrógeno y ácido ascórbico: (---) 40 μM , 320 μM , 3.2 mM; (—) 200 μM , 1600 μM , 16 mM; y (···) 400 μM , 3200 μM , 32 mM, respectivamente.

VII.4.4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta sección muestran que el tratamiento de 5mdC con la solución de Cu(II), peróxido de hidrógeno y ácido ascórbico conduce a la formación de 5hmdC, pero este compuesto no es el único ni es el producto mayoritario de oxidación. Se han realizado solamente pruebas sencillas en las soluciones modelo, por lo que no se puede

concluir si esta reacción se lleva a cabo *in vivo*. Se propone que en un trabajo futuro se debe explorar la conversión de 5mdC a 5hmdC en organismo vivos bajo estrés oxidativo.

VII.5. Estudio sistemático de la hidrólisis ácida asistida por microondas para la determinación de metilación global del ADN.

VII.5.1. Introducción

El tema de trabajo de tesis está centrado en el estudio analítico de las modificaciones de ácidos nucleicos, en particular en la determinación de la metilación del ADN. En etapas anteriores, se ha utilizado la hidrólisis enzimática del ADN hasta nucleósidos como pre-tratamiento de muestra para el análisis cromatográfico (HPLC-DAD) [113, 158, 159, 171, 200]. También se ha demostrado la factibilidad del marcaje molecular específico con 2-bromoacetofenona dirigido a las entidades citosínicas presentes en hidrolizados de ácidos nucleicos para el análisis del grado de metilación del ADN y ARN mediante HPLC-FLD [171, 201]. Aunque los resultados obtenidos en el análisis de muestras biológicas complejas fueron satisfactorios, la hidrólisis enzimática es un tratamiento largo, requiere un analista con experiencia y tiene un costo elevado. Por otro lado, se conoce que el análisis de metilación en ADN se puede llevar a cabo mediante hidrólisis ácida para obtener nucleobases, en donde el ARN tiene que ser eliminado de la matriz de la muestra para obtener ADN de alta pureza [116, 132]. En el procedimiento clásico de hidrólisis ácida empleado en estos trabajos, se requieren altas concentraciones del ácido fórmico, altas temperaturas y tiempos prolongados; sin embargo recientemente se ha propuesto la hidrólisis asistida por energía de microondas, donde se podrían esperar altos rendimientos de hidrólisis en condiciones menos drásticas, en un tiempo más corto y sin riesgo de contaminación de muestra por adición de enzimas [202].

VII.5.2. Objetivo específico

El objetivo de esta sección ha sido establecer las condiciones de la hidrólisis ácida del ADN asistida por microondas, empleando ácido clorhídrico o ácido fórmico mediante un diseño experimental multivariante.

VII.5.3. Resultados y discusión

VII.5.3.1. Desarrollo de las condiciones de separación de nucleobases por HPLC-DAD

Para establecer las condiciones de hidrólisis ácida de ADN asistida por energía de microondas, fue necesario implementar un protocolo de separación de nucleobases por HPLC. En la separación de nucleobases algunos autores sugieren utilizar HILIC [132, 202] debido a la alta polaridad de estos compuestos. Como los protocolos desarrollados en este laboratorio para separar productos de hidrólisis de ácidos nucleicos utilizamos cromatografía de líquidos en fase inversa, decidimos explorar esta opción para separar nucleobases. Para iniciar el estudio, se utilizaron 10 µg de ADN purificado de salmón (Sigma) así como 10 µg de los estándares individuales de dC, 5mdC, dG, dT y dA. Los estándares y el ADN de salmón fueron hidrolizados con 88% de ácido fórmico a 140 °C durante 90 minutos en un volumen final de 1.5 mL (que se será denominado en esta sección de resultados como método clásico) [132]. Los productos de hidrólisis fueron llevados a sequedad incubando a 110°C en sistema abierto. La muestra se re-suspendió en 250 µL de fase móvil de fosfatos al 20%. Las nucleobases fueron introducidas al sistema cromatográfico con un volumen de inyección de 10 µL. La separación se llevó a cabo en una columna Luna C18 (250 x 4.5 mm, 5µm, Phenomenex) a 35 °C, con el flujo total de 1 mL/min, utilizando tres fases móviles A (agua), B (metanol), C (amortiguador de fosfato y acetato de amonio 30 y 15 mM, respectivamente, pH 4.1); con el siguiente gradiente: 0 min 14.5% A, 0.5% B, 85% C; 0 a 5 min 14% A, 1% B, 85% C; 5 a 14 min 15% B, 85% C; 14 a 18 min 25% A, 25% B, 50% C. La detección espectrofotométrica (DAD) se llevó a cabo a la longitud de onda 277 y 286 nm. Con estas condiciones se obtuvo una separación satisfactoria de las 5 nucleobases pero involucraba largos tiempos de separación (datos no mostrados). Para disminuir el tiempo de análisis, se procedió con la modificación de cada uno de los parámetros. En breve, se inyectó 1 µL y la separación se llevó a cabo en una columna Kinetex C18 (150 x 3 mm, 2.7 µm, Phenomenex) a 35 °C, con el flujo total de 0.35 mL/min. Se utilizaron las mismas fases móviles con el siguiente gradiente: 0 min 69.5% A, 0.5% B y 30% C; 0 a 0.1 min 50% A, 20% B y 30% C. En la figura 30 se

muestra el cromatograma típico de nucleobases obtenidas a partir del ADN de salmón por el procedimiento de hidrólisis clásica. Para llevar a cabo la identificación de cada uno de los compuestos se obtuvieron hidrolizados de los estándares dC, 5mC, dG, dT, dA y las nucleobases obtenidas fueron introducidas a la columna de manera individual. Las señales analíticas de cada compuesto así como el tiempo de retención y espectro de ultravioleta sirvieron para identificar cada compuesto en los hidrolizados de ADN.

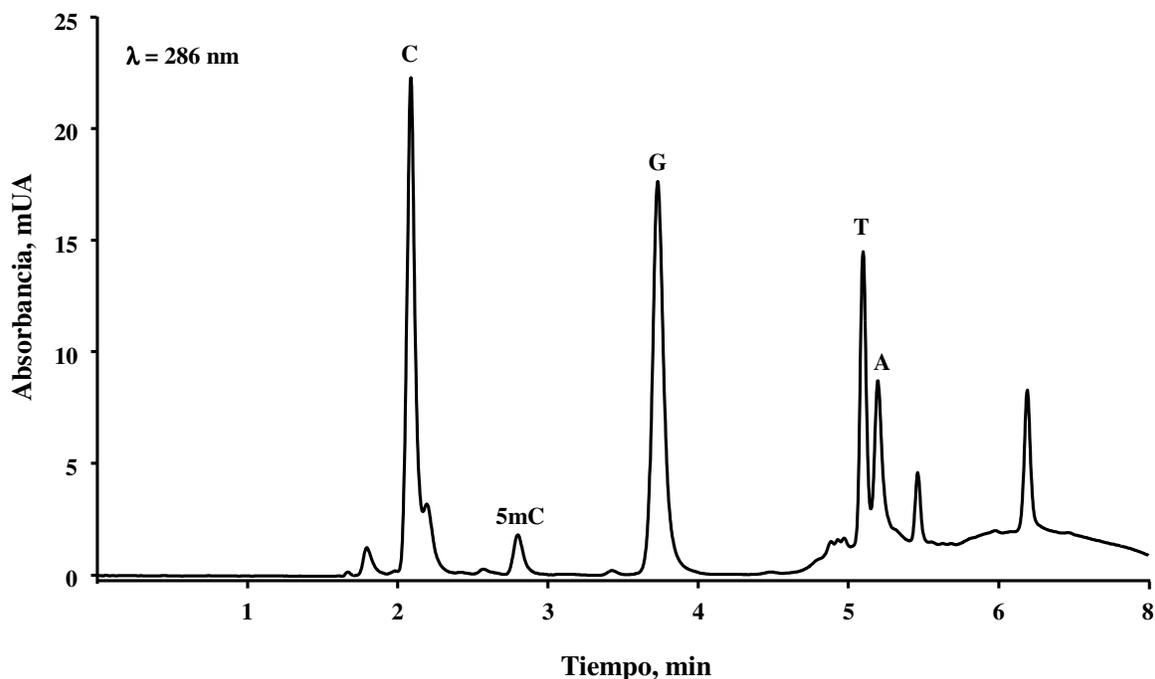


Figura 30. Cromatograma típico de hidrolizados del ADN de salmón obtenido con el procedimiento clásico.

Nota: en esta sección de resultados en particular, las abreviaturas para nucleobases son C (citocina), 5mC (5-metilcitocina), G (guanocina), T (timina) y A (adenina) y no deben confundirse las abreviaturas utilizadas para los ribonucleósidos de las secciones anteriores.

VII.5.3.2. Aplicación de un diseño experimental para establecer las condiciones de hidrólisis de ADN asistida por microondas.

Con el fin de establecer las condiciones de la hidrólisis del ADN asistida por microondas, se utilizó un diseño experimental de Box Behnken (tabla 8), variando cada una de las tres variables en tres niveles: temperatura: 170, 180, 190 °C; tiempo: 5, 10, 15 minutos; concentración del ácido clorhídrico: 0.9, 1.2, 1.5 M ó concentración del ácido

fórmico: 18.3, 20.9 y 23.5 M, respectivamente. Los experimentos se realizaron con 10 µg de ADN estándar de salmón en un volumen final de 1.5 mL, utilizando un digestor de microondas (Discover SP-D, CEM). Los hidrolizados obtenidos en la aplicación del diseño experimental de manera aleatoria fueron secados a 110 °C en sistema abierto, resuspendidos en 250 µL de 20% de fase móvil C e inyectados en el sistema HPLC-DAD. De esta manera se adquirieron varios cromatogramas, correspondientes a diferentes condiciones de la hidrólisis. Para hallar las condiciones más adecuadas de la hidrólisis, se tomaron como criterios de evaluación: la magnitud de la señal analítica de cada una de las bases (altura del pico cromatográfico), el porcentaje de metilación global evaluado con base en las alturas de los picos de 5mC y C, la presencia de otros picos que indicaba una hidrólisis incompleta (oligonucleótidos, nucleótidos o nucleósidos).

Tabla 8. Diseño de Box Benhken aplicado al estudio de hidrólisis de ADN asistido por microondas.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	[HCl] M	[HCOOH] M
170	5	1.2	20.9
190	5	1.2	20.9
170	15	1.2	20.9
190	15	1.2	20.9
170	10	0.9	18.3
190	10	0.9	18.3
170	10	1.5	23.5
190	10	1.5	23.5
180	5	0.9	18.3
180	15	0.9	18.3
180	5	1.5	23.5
180	15	1.5	23.5
180	10	1.2	20.9

El rendimiento más alto con ácido clorhídrico se obtuvo bajo la condición 1.2 M a 170 °C durante 5 minutos. Sin embargo, se observó que las señales analíticas para C, 5mC,

G, T, y A después de la hidrólisis con este ácido siempre fueron más bajos que aquellas obtenidas con ácido fórmico. Este resultado es contradictorio al reportado por Marrubini en 2012 [202], en donde hidrolizaron desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) en presencia de ambos ácidos y se reportaron mejores resultados con ácido clorhídrico. Aunque en el trabajo citado se analizan las muestras del ADN humano, no se detectó la presencia de 5-metilcitosina. La novedad del presente trabajo consiste en el uso del diseño experimental para la selección de las condiciones de hidrólisis, monitoreando 5 compuestos potencialmente presentes en extractos de muestras reales. Los resultados obtenidos del estudio de la hidrólisis con ácido fórmico se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Alturas de los picos cromatográficos de las nucleobases (HPLC-DAD, 277 nm), obtenidas utilizando diferentes condiciones de hidrólisis con ácido fórmico.

°C	min	HCOOH (M)	C	5mC	%5mC	G	T	A
170	5	20.9	31.6	2.0	5.95	20.4	25.8	22.0
190	5	20.9	32.6	2.1	6.05	21.7	38.8	23.4
170	15	20.9	32.9	2.0	5.73	21.8	30.0	23.9
190	15	20.9	32.2	2.0	5.85	21.4	41.4	23.2
170	10	18.3	32.9	2.0	5.73	22.7	23.5	25.5
190	10	18.3	32.7	2.0	5.76	22.9	40.6	25.7
170	10	23.5	31.5	2.0	5.97	20.8	26.1	22.1
190	10	23.5	32.5	2.0	5.80	18.5	40.0	23.2
180	5	18.3	33.6	2.1	5.88	23.5	27.6	26.4
180	15	18.3	33.0	2.1	5.98	23.6	37.3	26.6
180	5	23.5	31.5	2.0	5.97	19.0	27.4	21.8
180	15	23.5	34.1	2.1	5.80	23.9	40.6	26.8
180	10	20.9	35.0	2.0	5.41	23.8	35.1	27.4

En esta tabla, para todas las condiciones empleadas, se presentan las alturas de los picos cromatográficos para cada una de las nucleobases, y el porcentaje de metilación evaluado. Como se puede apreciar no hay diferencias importantes entre los diversos tratamientos sobre el rendimiento de liberación de C, 5mC, G y A, excepto para la primera condición (170 °C, 5 minutos, 20.9 M ácido fórmico) en donde se aprecian más bajas señales analíticas. En el caso de la timina, se encontró que sólo las hidrólisis llevadas en

170 °C y en menos de 5 minutos (excepto la condición 2, 190 °C, 5 minutos, 20.9 M ácido fórmico) desfavorecieron su rendimiento. Estos resultados nos indican que se tiene un amplio margen en las condiciones para llevar a cabo la hidrólisis asistida por microondas (180 – 190 °C; 20.9 – 23.5 M ácido fórmico; 10 – 15 minutos) sin que el cambio de uno o varios parámetros dentro de estos intervalos afecte el rendimiento de la hidrólisis. Esta es una importante ventaja en términos de carácter robusto del procedimiento.

VII.5.3.3. Análisis comparativo de diferentes procedimientos de la hidrólisis del ADN.

Una vez establecidas las condiciones de hidrólisis ácida de ADN asistida por microondas, fue necesario comparar los resultados obtenidos en el análisis de una muestra (ADN de salmón) contra otros procedimientos de hidrólisis, en primer lugar contra el procedimiento químico clásico. Por otro lado, la comparación directa de los rendimientos de la hidrólisis ácida y enzimática no es posible, debido a que los productos de estos dos procedimientos son diferentes (nucleobases y nucleótidos o nucleósidos, respectivamente), de hecho no se encontró en la literatura un análisis comparativo de este tipo. Uno de los retos del presente trabajo ha sido lograr, mediante el análisis cromatográfico, la comparación de los rendimientos de la hidrólisis ácida con respecto a la enzimática. Como se comentó en la introducción general de este trabajo, en el análisis de productos del ADN después de la hidrólisis enzimática raras veces se ha llevado a cabo la separación de nucleótidos debido a su alta polaridad; esta alta polaridad sin embargo, puede resultar en una retención similar de los nucleótidos y de las nucleobases en separaciones llevadas a cabo por cromatografía en fase inversa. En cuanto a la detección, utilizando absorbancia en 277 nm se puede esperar una sensibilidad muy similar, debido a la presencia de las mismas nucleobases en respectivos nucleótidos. Con base en estas consideraciones, se llevó a cabo la hidrólisis de 10 µg de ADN de salmón utilizando el procedimiento químico clásico (140 °C, 90 min, 23.5 M ácido fórmico), utilizando la hidrólisis ácida asistida por microondas (180 °C, 10 min, 20.9 M ácido fórmico) e hidrólisis enzimática hasta nucleótidos (1 U nucleasa P1 y 20 U DNAasa I a 37 °C por 12 horas, las condiciones detalladas se describen en la primera sección de resultados). Una vez completada la hidrólisis, cada una de las

mezclas de reacción se llevaron a sequedad los productos de hidrólisis y se re-disolvió en 250 μL de fase móvil C al 20% y se inyectó 1 μL en el sistema cromatográfico con las condiciones de separación para nucleobases ya mencionadas. En la tabla 10, se muestran los resultados reportando las señales analíticas obtenidas (valores que corresponden a las alturas de los picos cromatográficos). Como se observa en dicha tabla, en la hidrólisis enzimática se obtienen alturas de pico ligeramente mayores para citosina, 5metilcitosina y guanina y claramente menores para adenina y timina, con respecto a la hidrólisis ácida. Por otro lado, no hay diferencias significativas en las señales analíticas obtenidas para citosinas, guanina y adenina entre los procedimientos que emplean ácidos. Sin embargo, el método clásico libera la 5metilcitosina y la timina en cantidades relativamente menores con respecto a los productos obtenidos mediante la hidrólisis ácida asistida por microondas. Esta observación es de particular importancia porque la meta de la aplicación de la hidrólisis ácida en microondas es para evaluar el grado de metilación en ADN. En este sentido, con el procedimiento químico clásico se obtuvo relación de señales analíticas ($C/5mC = 18.39$) más alta a las obtenidas mediante hidrólisis asistida por microondas y enzimática, pero los valores de esta relación para el procedimiento de hidrólisis ácida propuesto y de hidrólisis enzimática fueron prácticamente idénticos ($C/5mC = 16.14$ y 16.22 , respectivamente). En la figura 31 se muestra el perfil de elución de compuestos citosínicos en hidrolizados obtenidos mediante tres diferentes procedimientos en donde se observan diferencias de rendimientos que se acaban de describir.

Tabla 10. Señales analíticas (altura de picos cromatográficos) obtenidos para cinco nucleobases en hidrolizados del ADN de salmón aplicando diferentes condiciones de hidrólisis y llevando separación por HPLC-DAD a 277 nm.

Método	C	5mC	G	T	A	C/5mC
Asistida por microondas	33.9	2.1	23.8	38.1	26.4	16.1
Clásica	33.1	1.8	23.1	27.4	24.7	18.4
Enzimática	37.3	2.3	26.5	30.3	10.9	16.2

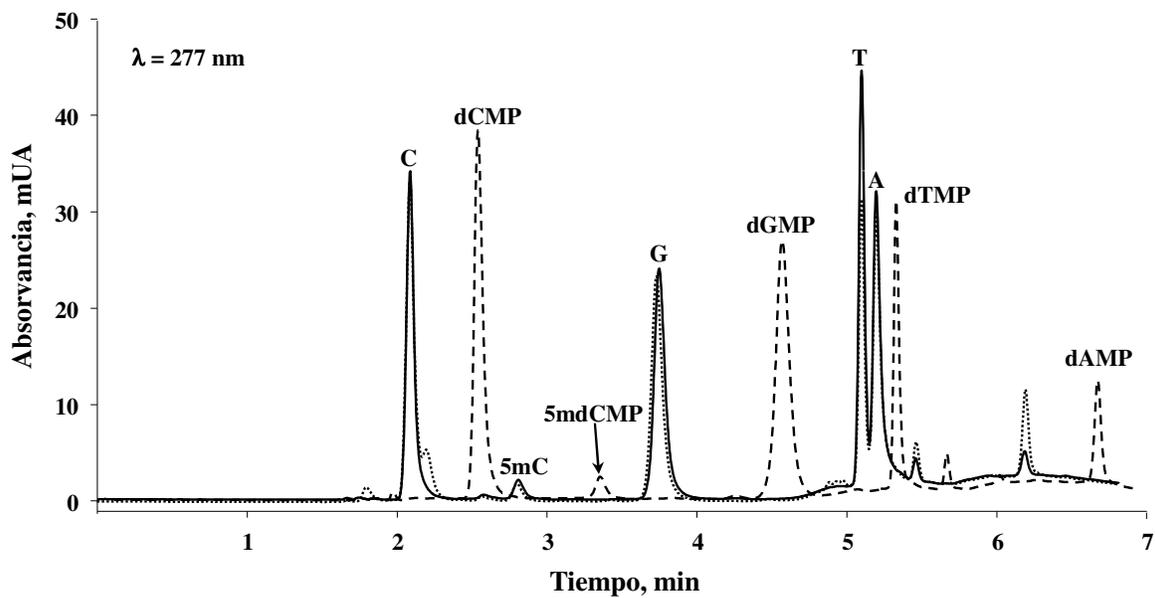


Figura 31. Cromatogramas (HPLC-DAD) de hidrolizados del ADN de salmón obtenidos con los procedimientos: hidrólisis enzimática (---), hidrólisis química clásica (···) e hidrólisis con ácido fórmico asistida por microondas (—)

VII.5.4. Conclusiones

En esta parte de trabajo, se establecieron las condiciones de hidrólisis ácida del ADN asistida por microondas, encontrándose que el ácido fórmico es más adecuado respecto al ácido clorhídrico. En cuanto a las condiciones de la hidrólisis, con base a los experimentos se demostró que a 180 °C, 10 minutos y 20.9 M ácido fórmico, se logra la liberación de nucleobases con rendimiento similar respecto al procedimiento químico clásico y respecto a la liberación de nucleótidos en la hidrólisis enzimática; además se encontró que las condiciones de hidrólisis no tienen que aplicarse de manera rigurosa para asegurar el mismo grado de hidrólisis. Asimismo, se ha establecido el procedimiento de separación de nucleobases por cromatografía de líquidos en fase inversa y detección UV. En la comparación del procedimiento desarrollado contra las condiciones de hidrólisis ácida clásica se demostró un mejor rendimiento de liberación de nucleobases en condiciones propuestas en este trabajo. Por su parte, en la comparación contra la hidrólisis enzimática, utilizada ampliamente en la mayoría de los estudios reportados, se obtuvieron resultados de muy buena concordancia. Entre las ventajas del procedimiento de hidrólisis

propuesto hay que mencionar que éste arroja muy parecido rendimiento de hidrólisis hasta nucleobases respecto a la hidrólisis enzimática donde se forman nucleótidos; además, es rápido, sencillo y robusto. La robustez se refiere a que cambios en cada uno de los parámetros de la hidrólisis en intervalos de 180 a 190 °C; 18.3 a 23.5 M ácido fórmico; 10 a 15 minutos; no afecta de manera significativa el resultado final. El protocolo no riguroso asegura tolerancia a los errores aleatorios y además, se podría emplear este procedimiento en diferentes tipos de sistemas de digestión asistida por microondas, diferentes tipos y cantidades de muestras. Este estudio es la primera evidencia experimental en donde se contrastan los procedimientos de hidrólisis química y enzimática del ADN. Aunque los resultados indican que la hidrólisis enzimática del ADN tiene un rendimiento ligeramente mayor en la liberación de compuestos citosínicos con respecto a la hidrólisis química del ADN asistida por microondas, no hay diferencias significativas entre los valores de metilación obtenidos entre los dos procedimientos. En un trabajo futuro se propone examinar la posible utilidad del procedimiento en el análisis de muestras reales (leucocitos de personas en diferentes condiciones clínicas).

VII.6. Desarrollo y aplicación de un procedimiento de cromatografía de gases con monitoreo de reacciones múltiples (GC-QqQ-MS/MS) para la evaluación de metilación global del ADN.

VII.6.1. Introducción

En la determinación de metilación global del ADN se usan preferentemente técnicas de separación cromatográfica debido a su alto carácter cuantitativo y excelente reproducibilidad [114]. Por lo general los procedimientos están basados en la separación de nucleobases ó nucleósidos obtenidos de la hidrólisis química o enzimática, respectivamente [89, 113, 129]. El análisis de nucleósidos prácticamente se lleva a cabo por cromatografía de líquidos. En cambio el análisis de nucleobases puede llevarse a cabo tanto por cromatografía de líquidos como cromatografía de gases. En el caso de cromatografía de líquidos, debido a la baja retención de las bases nitrogenadas en columnas de fase inversa, se recomienda utilizar HILIC [132]. En cambio en cromatografía de gases es necesario llevar a cabo la derivatización de las nucleobases para obtener derivados volátiles termoestables, típicamente de alquilsilano [115, 116]. El uso de columnas cromatográficas capilares en estos análisis permite una buena resolución de los compuestos de tal manera que se obtienen límites de detección del orden picomolar utilizando espectrometría de masas con un solo cuadrupolo como filtro de masas. Aunque la aplicación de GC-MS ha sido limitada con respecto a cromatografía de líquidos, es importante señalar que la operación instrumental en GC-MS es más sencilla y barata, la manipulación de la muestra es menos exhaustiva y se requieren más cortos tiempos de equilibrio entre inyecciones de muestras. Por otro lado, no se ha reportado aún la cuantificación de derivados termoestables de nucleobases mediante monitoreo de reacciones múltiples (MRM) utilizando detectores de espectrometría de masas con triple cuadrupolo. En general, el MRM en este y otros sistemas cromatográficos ha permitido obtener muy bajos límites de detección de los analitos (orden sub-femtomolar) debido al incremento de la relación señal/ruido. Es necesario hacer notar que la extracción de un ion precursor y monitoreo de respectivos

iones de su fragmentación junto con la buena repetibilidad del tiempo de retención permiten lograr una excelente selectividad en el análisis de múltiples solutos.

VII.6.2. Objetivo específico

Desarrollar y aplicar un nuevo procedimiento basado en la obtención de derivados volátiles de nucleobases para su determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con triple cuadrupolo, mediante monitoreo de reacciones múltiples (GC-QqQ-MS/MS).

VII.6.3. Resultados y discusión

VII.6.3.1. Selección de las condiciones de derivatización de nucleobases para su análisis por GC-MS

Para establecer las condiciones de derivatización de nucleobases se utilizaron hidrolizados de 10 µg de ADN puro (de salmón) obtenidos mediante la hidrólisis ácida asistida por microondas (de acuerdo con la quinta sección de resultados). En un inicio se estudió el efecto del solvente (diluciones de piridina en acetonitrilo, sin dilución, 1:10 y 1:20), la temperatura (30, 40 y 50 °C) y tiempo de derivatización (30, 45 y 60 min). Para esto se utilizaron 50 µL de reactivo derivatizante (BSTFA:TMCS 99:1, Supelco) y la reacciones se llevaron a un volumen final de 150 µL. Para determinar las condiciones más adecuadas de derivatización, se inyectó 1 µL de las mezclas de derivatización al cromatógrafo de gases Bruker 456-GC SCION TQ con condiciones de separación parecidas a las descritas por Tang y colaboradores [115]. La temperatura del inyector se programó a 250 °C con Split 10. La separación se llevó a cabo en una columna BR-5 (15 m x 0.25 mm, con espesor de fase estacionaria de 0.25 µm, Bruker) utilizando un flujo de helio de 1mL/min con el siguiente gradiente de temperatura: 120 °C durante 1 minuto, de 120 a 300 °C a 10 °C/min, 300 °C durante 1 minuto. En la ionización se utilizó impacto de electrones (EI) a - 70 eV y la detección se llevó a cabo por conteo total de iones (TIC, por sus siglas en inglés) monitoreando iones en el intervalo de m/z 200-400. Para la confirmación de los

cinco compuestos, se obtuvo el espectro de masas en los picos cromatográficos (figura 32) y se consultó la base de datos de NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, por sus siglas en inglés) encontrándose un porcentaje de concordancia mayor al 99% para los derivados de cinco compuestos (T, C, 5mC, A y G). Se tomaron como criterios de evaluación de las condiciones de derivatización, los tiempos de retención y la magnitud de la señal analítica de cada una de las bases monitoreando los iones de m/z 255, 240 y 254, 254, 264, 352 (para T, C, 5mC, A, G, respectivamente) de acuerdo con el estudio reportado previamente [115]. En la figura 33 se muestra un cromatograma típico GC-MS de nucleobases derivatizadas en modo de monitoreo de ion selectivo (SIM, por sus siglas en inglés). En la tabla 11 se presentan los resultados de este experimento, encontrándose que el más alto rendimiento de reacción en medio de reacción piridina:acetonitrilo 1:10, en acuerdo con estudios previos en donde se utiliza MTBSTFA:TMCS 99:1 para derivatizar nucleobases [116]. Por otro lado, se encontró que la señal analítica fue estable cuando la reacción se llevó a cabo por al menos una hora y fue independiente de las temperatura en el intervalo 30-50 °C, por lo que se optó por trabajar a 30 °C incubando por al menos de una hora.

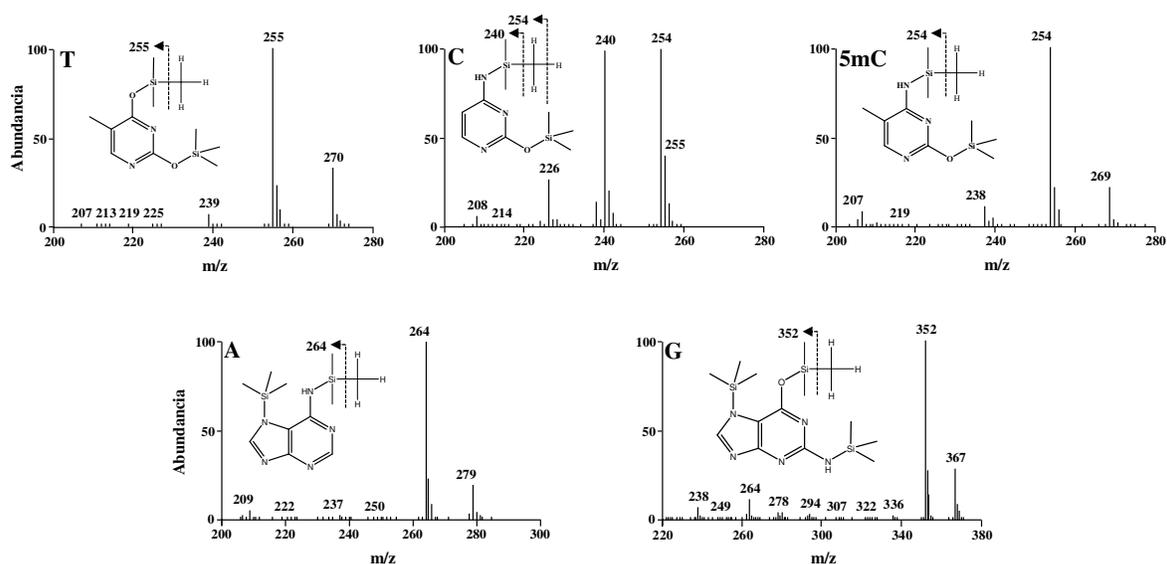


Figura 32. Espectros de masa de nucleobases como derivados de mono, bis o tris trimetilsilano.

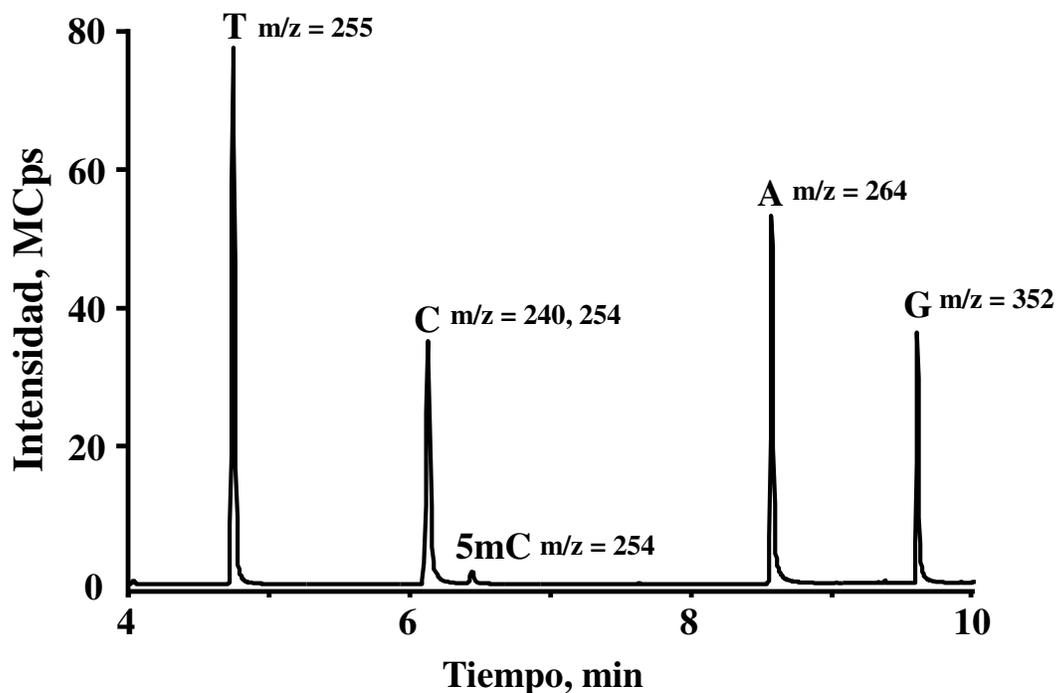


Figura 33. Cromatograma de GC-MS en modo SIM obtenido para los derivados de nucleobases en hidrolizado del ADN de Salmón.

Tabla 11. Señales analíticas (área de pico) de nucleobases (hidrolizados de 10 µg de ADN de Salmón) derivatizadas obtenidas en cada medio de reacción a 30 °C durante 1 hora.

Compuesto	Ion monitoreado <i>m/z</i>	Señal analítica para cada medio de reacción (área)		
		MeCN	piridina:MeCN 1:10	piridina:MeCN 1:20
T	255	1.21E+08	1.42E+08	1.19E+08
C	240, 254	5.51E+07	7.52E+07	7.30E+07
5mC	254	3.16E+06	4.26E+06	3.78E+06
A	264	9.08E+07	1.01E+08	1.13E+08
G	352	4.07E+07	6.70E+07	4.98E+07

VII.6.3.2. Desarrollo de las condiciones de separación y detección de derivados volátiles de nucleobases por GC-QqQ-MS/MS

En trabajos previos, la separación de las 5 nucleobases derivatizadas se obtuvo en tiempos relativamente largos (hasta 22 min) [115, 116]. Este es un inconveniente porque el

medio de reacción es volátil y en largas series de muestras se puede perder bastante volumen que incluso puede ser insuficiente para ser manipulado por el automuestreador. Debido a esto nos dimos a la tarea de lograr el más corto tiempo posible de separación aplicando un gradiente de temperatura más rápido. Como la diferencia entre C y 5mC es sólo un grupo metilo, los derivados de estos dos compuestos se separaron isotérmicamente para obtener una mejor resolución. Para llevar a cabo la separación de los 5 compuestos en menos de 8 minutos (figura 34), se utilizó el siguiente gradiente de temperatura: 100 °C durante 0.1 minuto, de 100 a 140 °C a 20 °C/min, 140 °C por 3 min, de 140 a 270 °C a 40 °C min, 270 °C 1.65 min.

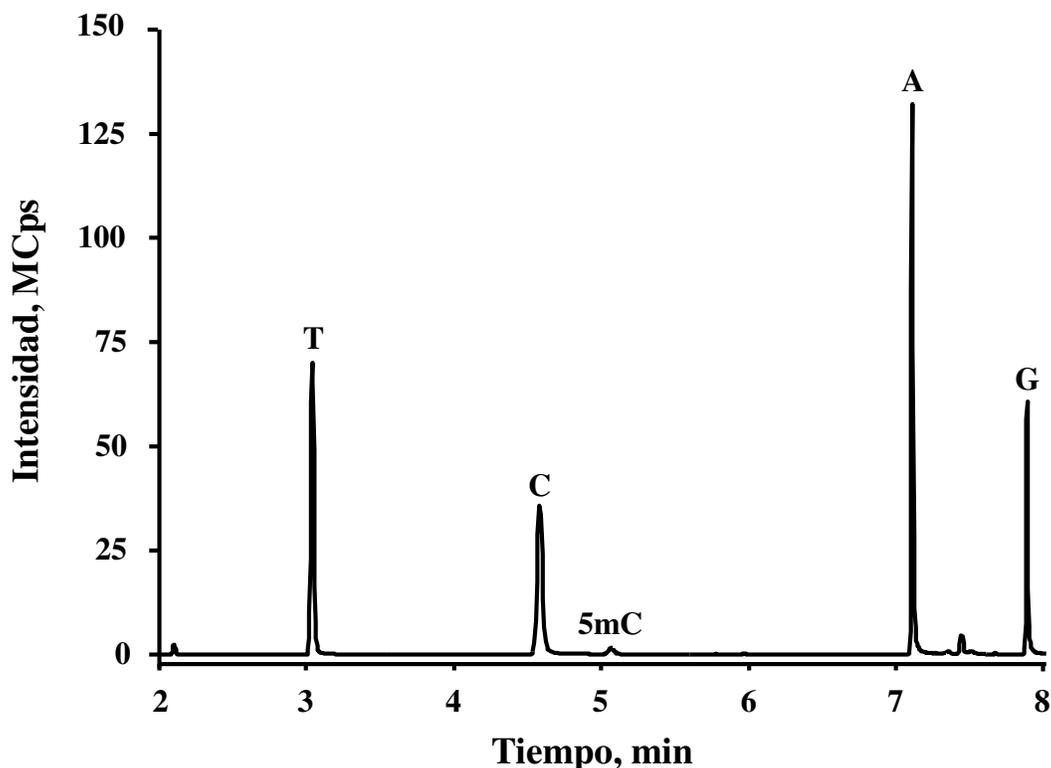


Figura 34. Cromatograma GC-MS en modo SIM obtenido para derivados de nucleobases en hidrolizado de ADN de Salmón

Con las condiciones de separación establecidas, se inició el estudio de las condiciones para el monitoreo de reacciones múltiples para C y 5mC. De acuerdo con los resultados previamente mostrados (figura 32), los iones más abundantes obtenidos después de la ionización por impacto de electrones para C correspondieron a m/z 254 y 240, mientras

que para 5mC a m/z 254 (iones precursores). Se inyectaron al sistema cromatográfico 100 femtomoles de cada analito y con ayuda de los tiempos de retención de C y 5mC (4.6 y 5.1 minutos, respectivamente), se aislaron en el primer cuadrupolo los iones precursores de cada compuesto. Después, estos iones fueron disociados por colisiones (CID) en el segundo cuadrupolo utilizando energías desde 10 hasta 20 eV. Los fragmentos más abundantes (productos) para los iones precursores de C con m/z 254 y 240 fueron los de m/z 238 y 170, respectivamente. Por otro lado, los productos más abundantes obtenidos del ion m/z 254 de 5mC fueron los iones productos de m/z 238 y 184. Los productos más abundantes de cada precursor se utilizaron para evaluar la relación señal/ruido (S/R) en función de la energía utilizada en el CID. En la figura 35 se observa que el más alto valor de S/R para 5mC se obtiene cuando la energía del CID se programa a 15 eV. En el caso de la C, se observó el mismo resultado.

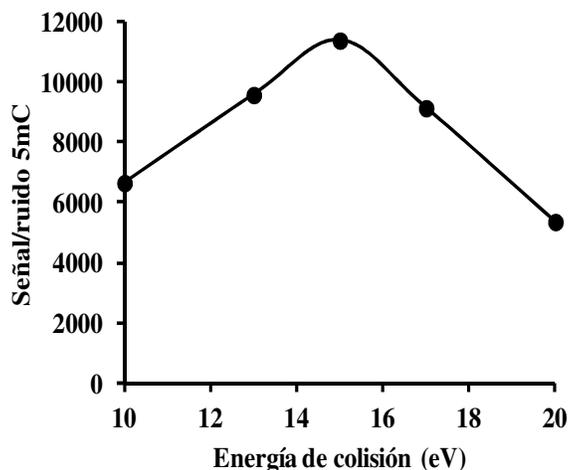


Figura 35. Efecto de la energía de colisión utilizada en la detección por espectrometría de masas en modo de MRM ($254 \rightarrow (238+184)$) sobre la relación señal/ruido obtenida para 100 femtomoles de 5mC.

VII.6.3.3. Procedimiento de calibración de C y 5mC mediante GC-QqQ-MS/MS y evaluación de sus parámetros

Para evaluar los parámetros de calibración, se prepararon mezclas de estándares de C, 5mC en las concentraciones 0; 0.05; 0.10; 1.0 y 10 μM de cada uno. Para el proceso de

calibración se utilizaron 15 μL de cada una de la mezclas de estándares y se llevaron a sequedad. Los estándares fueron re-suspendidos en la solución de derivatización recientemente preparada para obtener derivados de nucleobases. De cada uno de los estándares se introdujo 1 μL al sistema GC-QqQ-MS/MS de tal manera que se inyectaron 0, 5, 10, 100 y 1000 femtomoles de cada uno. Con fines ilustrativos, en la figura 36 se muestran los cromatogramas obtenidos con 0, 5, 10 y 100 femtomoles. Como se muestra en la tabla 12, se obtuvo una alta repetibilidad en los tiempos de retención. También se muestran los bajos límites de detección para los dos compuestos (0.46 y 0.41 femtomol para C y 5mC, respectivamente).

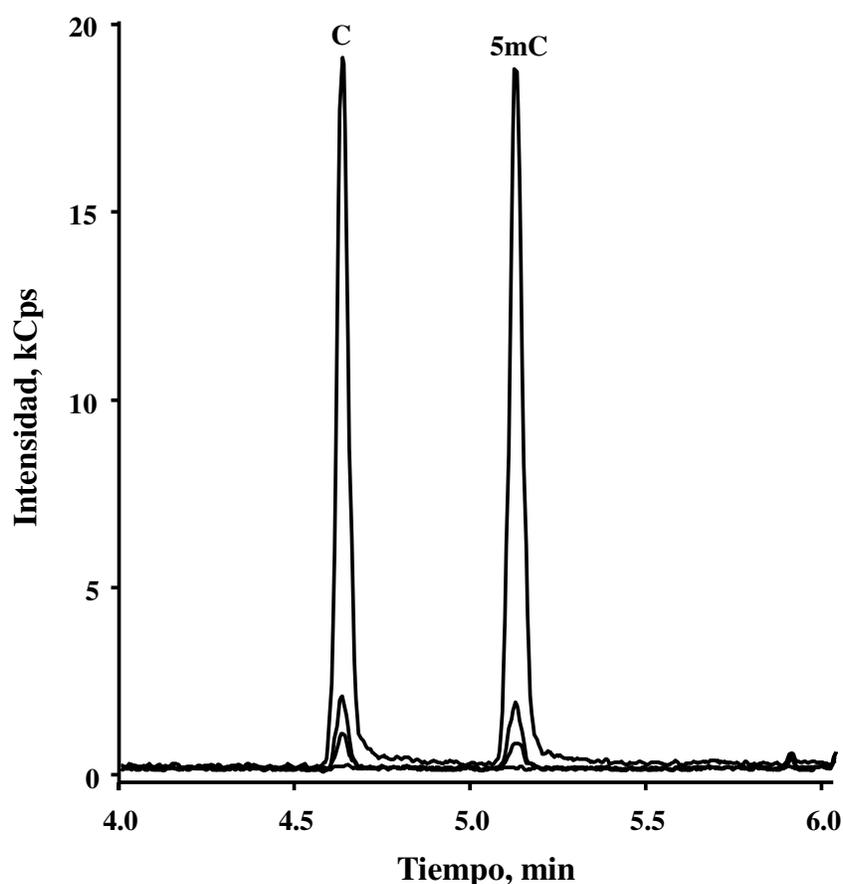


Figura 36. Cromatogramas obtenidos con el procedimiento GC-QqQ-MS/MS en modo MRM propuesto en este trabajo: soluciones de calibración conteniendo C, 5mC derivatizadas, cada uno de ellos en cuatro niveles de concentración 0, 5, 10 y 100 femtomoles inyectados.

Tabla 12. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración de C y 5mC en el procedimiento GC-QqQ-MS/MS propuesto.

Parámetro	Citosina	5-metilcitosina
Tiempo de retención ± DE, min	4.60±0.01	5.10±0.01
Sensibilidad (área del pico/10 fmol)	4625.4	4991.9
LD, fmol inyectado	0.46	0.41
CV, % (5 fmol)	2.89	2.80
CV, % (10 fmol)	2.83	2.71
CV, % (100 fmol)	1.51	1.49

DE: tiempo de retención con su respectiva desviación estándar ($n=5$); función de calibración: regresión lineal que relaciona la cantidad inyectada con la correspondiente área de pico (A) o altura (a) obtenido en el modo MRM; LD: límite de detección basada en $S/N=3$, expresada en femtomol introducido al sistema; CV: coeficiente de varianza ($n=5$).

VII.6.4. Conclusiones

El mejor rendimiento de derivatización de nucleobases con BSTFA:TMCS 99:1 logrado en este trabajo, se obtuvo cuando se utilizó medio de reacción de piridina en acetonitrilo 1:10, incubado a temperatura ambiente durante 60 min. Se logró separar las nucleobases en menos de 8 minutos, casi tres veces más rápido que en protocolos ya descritos. Se desarrolló por primera vez un procedimiento de GC-QqQ-MS/MS con límites de detección de 0.46 y 0.41 femtomol para C y 5mC. El procedimiento propuesto es sensible y específico y podría permitir determinar el grado de metilación global en micromuestras reales de ADN (del orden de nanogramos).

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo es un estudio de procedimientos analíticos para evaluar las modificaciones en ácidos nucleicos, en particular para determinar el grado de metilación global en ADN y/o ARN total. El objetivo de este documento es progresar en el desarrollo de procedimientos para llevar a cabo el pre-tratamiento de la muestra de ácidos nucleicos, la separación cromatográfica de sus productos de hidrólisis, y su detección utilizando diferentes tipos de espectrometrías para cuantificar el porcentaje de metilación en ADN y/o ARN. El pre-tratamiento de muestras de ácidos nucleicos incluye la hidrólisis hasta diferentes tipos de monómeros y en algunos casos la derivatización de los productos de digestión. En la digestión de ácidos nucleicos se utilizó la hidrólisis enzimática y la hidrólisis con el ácido fórmico asistida por microondas. Para mejorar ó establecer las condiciones de hidrólisis ya sea enzimática o química se utilizó ADN de salmón. La hidrólisis enzimática se utilizó para digerir los ácidos nucleicos hasta nucleótidos ó nucleósidos; mientras que el procedimiento químico ácido se usó para liberar bases nitrogenadas. La derivatización de productos de hidrólisis de ácidos nucleicos se aplicó a nucleósidos y nucleobases. En el caso de los nucleósidos, se logró el marcaje selectivo de entidades citosínicas presentes en la muestras para obtener derivados fluorescentes del tipo fenil-eteno citidina. Por otro lado las nucleobases fueron derivatizadas para obtener compuestos volátiles y termoestables, derivados de trimetilsilano. Las técnicas utilizadas en este trabajo para determinar el grado de metilación global en ADN y/o ARN total fueron: HPLC-DAD, HPLC-FLD, GC-QqQ-MS/MS. Una vez desarrollados los procedimientos con los estándares apropiados y/o productos de digestión de ADN de salmón, se aplicaron a diferentes extractos de ácidos nucleicos obtenidos de muestras reales, entre las que incluyen: lombrices de tierra crónicamente expuestas a diferentes concentraciones de metales/metaloideos, plantas de *L. sativum* sometidas a estrés abiótico, sangre humana de pacientes voluntarios sanos, diferentes estadios embrionarios de *C. canephora* y plántulas de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* crecidos en condiciones *in vitro* y *ex vitro*. Los resultados logrados con los procedimientos desarrollados en este trabajo coincidieron con aquellos obtenidos mediante técnicas previamente validadas. Los procedimientos establecidos en este proyecto así como los resultados obtenidos de su aplicación han sido

publicados en cinco artículos de revistas internacionales indizadas (se describen en el Capítulo VII), incluidas en el Thompson Reuter Journal Citation Reports:

1. María Maldonado Santoyo, Crescencio Rodriguez Flores, Adolfo Lopez Torres, Kazimierz Wrobel, Katarzyna Wrobel. Global DNA methylation in earthworms: a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments. *Environ Pollut* **2011**, *159*, 2387-2392.
2. Adolfo Lopez Torres, Eunice Yañez Barrientos, Katarzyna Wrobel, Kazimierz Wrobel. Selective derivatization of cytosine and methylcytosine moieties with 2-bromoacetophenone for submicrogram DNA methylation analysis by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection. *Anal Chem* **2011**, *83* (20), 7999-8005.
3. Clelia de la Peña, Geovanny Nic Can, Gabriel Ojeda, Jose L Herrera Herrera, Adolfo Lopez Torres, Kazimierz Wrobel, Manuel L Robert Diaz. KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during in vitro conditions in *Agave* spp. *BMC Plant Biol* **2012**, *12*, 203.
4. Eunice Yañez Barrientos, Kazimierz Wrobel, Adolfo Lopez Torres, Felix Gutierrez Corona. Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection for simultaneous assessment of global DNA and total RNA methylation in *L. sativum*: effect of plant exposure to Cd(II) and Se(IV). *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405* (7), 2397-404.
5. Geovanny Nic Can, Adolfo Lopez Torres, Felipe Barredo Pool, Kazimierz Wrobel, Victor M Loyola Vargas, Rafael Rojas Herrera, Clelia de la Peña. New insights into somatic embryogenesis: leafy cotyledon1, baby boom1 and WUSCHEL-related homeobox4 are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS One* **2013**, *8* (8), e72160.

A continuación de manera resumida se presentan las principales conclusiones y contribución novedosa de este trabajo:

1. Se modificó el procedimiento HPLC-DAD previamente desarrollado en el laboratorio de tal manera que permitió evaluar el grado de metilación global del ADN en extractos de muestras reales con matrices químicamente complejas.

2. Las modificaciones en el procedimiento de digestión enzimática de ácido nucleicos hasta nucleósidos permitió reducir el tiempo de digestión y la cantidad de enzimas en la hidrólisis de micromuestras.

3. Se logró el marcaje selectivo de las entidades citosínicas C, dC, 5mC y 5mdC con 2-bromoacetofenona y su separación por cromatografía de líquidos en fase inversa. La detección espectrofluorimétrica de los cuatro compuestos, permitió obtener límites de detección en el intervalo de 14.4 a 22.7 femtomoles. La separación de los cuatro compuestos permite determinar sin interferencias el grado de metilación en ADN de muestras contaminadas con ARN. El procedimiento HPLC-FLD permite evaluar el grado de metilación global en micromuestras de ADN (0.06% de 5mdC en 80 ng de ADN). La simplicidad, la sensibilidad, la robustez y los bajos requerimientos instrumentales hacen del procedimiento HPLC-FLD bastante accesible.

4. El procedimiento HPLC-FLD desarrollado permite determinar el grado de metilación en ADN y ARN total obtenido de un solo extracto en una sola corrida cromatográfica. Haciendo una búsqueda bibliográfica se encontró que este procedimiento es el primero en reportarse con la intención de cuantificar el grado de metilación global en ARN total. La aplicación de este procedimiento a extractos de plantas bajo estrés abiótico permitió encontrar una correlación inversa estadísticamente significativa entre los niveles de metilación global en ADN y ARN total, sugiriendo que el grado de metilación global en ARN total puede ser propuesto como un potencial biomarcador.

5. Se demostró la formación *in vitro* de 5hmdC a partir de 5mdC expuesta a especies reactivas de oxígeno generadas por la reacción Fenton.

6. El establecimiento de las condiciones de hidrólisis ácida del ADN asistida por energía de microondas permitió obtener un procedimiento sencillo, barato, rápido y confiable para obtener nucleobases de excelente calidad. La separación de las nucleobases por el procedimiento HPLC-DAD permitió determinar el grado de metilación global en ADN de salmón, el cual es similar al resultado obtenido a partir de nucleótidos. Los rendimientos de hidrólisis no difieren de aquellos obtenidos con la hidrólisis enzimática o de la hidrólisis química clásica.

7. El desarrollo del procedimiento de cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas en modo de monitoreo de reacciones múltiple para la evaluación del grado de metilación global en ADN, permitió lograr límites de detección de 0.46 y 0.41 femtomol para C y 5mC, respectivamente. El mejoramiento de las condiciones de separación permitió separar las 5 nucleobases derivatizadas en un tiempo menor a 8 minutos. Este procedimiento se puede probar en un futuro para determinar el grado de metilación en ADN de micromuestras.

En resumen, el estudio sistemático del pre-tratamiento de las muestras, las condiciones de separación y de detección condujo al desarrollo de novedosos y atractivos procedimientos analíticos que permiten cuantificar de manera confiable el grado de metilación en ADN en una gran variedad de muestras con diversas matrices. La aplicación del procedimiento HPLC-FLD sugirió que la metilación en ARN total podría utilizarse como un biomarcador útil en organismos expuestos a estrés abiótico, además, el hallazgo de la correlación inversa entre metilación de ADN y ARN parece indicar que existe una conexión entre la presencia del ARN metilado y la modulación de los eventos epigenéticos. Cabe mencionar sin embargo, que se requieren más estudios para sustentar la participación del ARN metilado en la modulación génica haciendo el aislamiento de distintos tipos de ARN seguidos del análisis de metilación. Por otro lado, la evidencia de la obtención *in vitro* de 5hmdC como producto de oxidación de la 5mdC mediante reacción de Fenton no es suficiente para sustentar que esto se puede llevar a cabo *in vivo*, por lo que es necesario explorar la formación de la 5hmdC en sistemas biológicos que tienen altos porcentajes de metilación en ADN.

CAPÍTULO IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Langridge, R., et al., *Molecular structure of deoxyribonucleic acid (DNA)*. J Biophys Biochem Cytol, 1957. 3(5): p. 767-78.
2. Markham, R. and J.D. Smith, *The structure of ribonucleic acid. III. The end groups, the general structure and the nature of the core*. Biochem J, 1952. 52(4): p. 565-71.
3. Markham, R. and J.D. Smith, *The structure of ribonucleic acids. II. The smaller products of ribonuclease digestion*. Biochem J, 1952. 52(4): p. 558-65.
4. Markham, R. and J.D. Smith, *The structure of ribonucleic acid. I. Cyclic nucleotides produced by ribonuclease and by alkaline hydrolysis*. Biochem J, 1952. 52(4): p. 552-7.
5. Markham, R. and J.D. Smith, *Structure of ribonucleic acid*. Nature, 1951. 168(4271): p. 406-8.
6. Gronbaek, K., c. Hohter, and P.A. Jones, *Epigenetic changes in cancer*. APMIS, 2007. 115: p. 1039–1059.
7. Mohn, F. and D. Schubeler, *Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation*. Trends Genet, 2009. 25(3): p. 129-36.
8. Delcuve, G.P., M. Rastegar, and J.R. Davie, *Epigenetic control*. J Cell Physiol, 2009. 219(2): p. 243-50.
9. Rodenhiser, D. and M. Mann, *Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications*. CMAJ, 2006. 174(3): p. 341-8.
10. Tchurikov, N.A., *Molecular mechanisms of epigenetics*. Biochemistry (Mosc), 2005. 70(4): p. 406-23.
11. Berger, S.L., et al., *An operational definition of epigenetics*. Genes Dev, 2009. 23(7): p. 781-3.
12. Sutherland, J.E. and M. Costa, *Epigenetics and the environment*. Ann N Y Acad Sci, 2003. 983: p. 151-60.
13. Mellor, J., P. Dudek, and D. Clynes, *A glimpse into the epigenetic landscape of gene regulation*. Curr Opin Genet Dev, 2008. 18(2): p. 116-22.
14. Laird, P.W., *Cancer epigenetics*. Hum Mol Genet, 2005. 14 Spec No 1: p. R65-76.
15. Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky, *Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. 51: p. 786-94.
16. Sterner, D.E. and S.L. Berger, *Acetylation of histones and transcription-related factors*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. 64(2): p. 435-59.
17. Yang, X.J. and E. Seto, *HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention*. Oncogene, 2007. 26(37): p. 5310-8.
18. Chahal, S.S., H.R. Matthews, and E.M. Bradbury, *Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function*. Nature, 1980. 287(5777): p. 76-9.
19. Grunstein, M., *Histone acetylation in chromatin structure and transcription*. Nature, 1997. 389(6649): p. 349-52.
20. De Rubertis, F., et al., *The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in Drosophila and yeast*. Nature, 1996. 384(6609): p. 589-91.
21. Dawson, M.A., et al., *JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin*. Nature, 2009. 461(7265): p. 819-22.

22. Nowak, S.J. and V.G. Corces, *Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation*. Trends Genet, 2004. 20(4): p. 214-20.
23. Hans, F. and S. Dimitrov, *Histone H3 phosphorylation and cell division*. Oncogene, 2001. 20(24): p. 3021-7.
24. Ng, S.S., et al., *Dynamic protein methylation in chromatin biology*. Cell Mol Life Sci, 2009. 66(3): p. 407-22.
25. Bedford, M.T. and S.G. Clarke, *Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why*. Mol Cell, 2009. 33(1): p. 1-13.
26. Lan, F. and Y. Shi, *Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins*. Sci China C Life Sci, 2009. 52(4): p. 311-22.
27. Shi, Y., et al., *Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1*. Cell, 2004. 119(7): p. 941-53.
28. Whetstine, J.R., et al., *Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases*. Cell, 2006. 125(3): p. 467-81.
29. Martin, C. and Y. Zhang, *The diverse functions of histone lysine methylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. 6(11): p. 838-49.
30. Lee, D.Y., et al., *Role of protein methylation in regulation of transcription*. Endocr Rev, 2005. 26(2): p. 147-70.
31. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Reversing histone methylation*. Nature, 2005. 436(7054): p. 1103-6.
32. Hall, I.M., et al., *Establishment and maintenance of a heterochromatin domain*. Science, 2002. 297(5590): p. 2232-7.
33. Cao, R. and Y. Zhang, *The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3*. Curr Opin Genet Dev, 2004. 14(2): p. 155-64.
34. Kirmizis, A., et al., *Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27*. Genes Dev, 2004. 18(13): p. 1592-605.
35. Santos-Rosa, H., et al., *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3*. Nature, 2002. 419(6905): p. 407-11.
36. Krogan, N.J., et al., *Methylation of histone H3 by Set2 in Saccharomyces cerevisiae is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 2003. 23(12): p. 4207-18.
37. Ng, H.H., et al., *Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79*. J Biol Chem, 2002. 277(38): p. 34655-7.
38. Cuthbert, G.L., et al., *Histone deimination antagonizes arginine methylation*. Cell, 2004. 118(5): p. 545-53.
39. Wang, Y., et al., *Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination*. Science, 2004. 306(5694): p. 279-83.
40. Hassa, P.O., et al., *Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?* Microbiol Mol Biol Rev, 2006. 70(3): p. 789-829.
41. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. 67: p. 425-79.
42. Zhai, L., H.Y. Joo, and H. Wang, *In vitro and in vivo assays for studying histone ubiquitination and deubiquitination*. Methods Mol Biol, 2009. 523: p. 295-309.

43. Wang, H., et al., *Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing*. Nature, 2004. 431(7010): p. 873-8.
44. Lee, J.S., et al., *Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS*. Cell, 2007. 131(6): p. 1084-96.
45. Kim, J., et al., *RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells*. Cell, 2009. 137(3): p. 459-71.
46. Seeler, J.S. and A. Dejean, *Nuclear and unclear functions of SUMO*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(9): p. 690-9.
47. Shiio, Y. and R.N. Eisenman, *Histone sumoylation is associated with transcriptional repression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(23): p. 13225-30.
48. Miller, O.J., et al., *5-Methylcytosine localised in mammalian constitutive heterochromatin*. Nature, 1974. 251(5476): p. 636-7.
49. Hattman, S., C. Gribbin, and C.A. Hutchison, 3rd, *In vivo methylation of bacteriophage phi X174 DNA*. J Virol, 1979. 32(3): p. 845-51.
50. Colot, V. and J.L. Rossignol, *Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device*. Bioessays, 1999. 21(5): p. 402-11.
51. Ramsahoye, B.H., et al., *Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(10): p. 5237-42.
52. Lister, R., et al., *Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences*. Nature, 2009. 462(7271): p. 315-22.
53. Weber, M. and D. Schubeler, *Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark*. Curr Opin Cell Biol, 2007. 19(3): p. 273-80.
54. Zhang, X., et al., *Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis*. Cell, 2006. 126(6): p. 1189-201.
55. Chen, T. and E. Li, *Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases*. Curr Top Dev Biol, 2004. 60: p. 55-89.
56. Valinluck, V., et al., *Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2)*. Nucleic Acids Res, 2004. 32(14): p. 4100-8.
57. Wu, S.C. and Y. Zhang, *Active DNA demethylation: many roads lead to Rome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. 11(9): p. 607-20.
58. Ooi, S.K. and T.H. Bestor, *The colorful history of active DNA demethylation*. Cell, 2008. 133(7): p. 1145-8.
59. Hashimoto, H., et al., *Excision of 5-hydroxymethyluracil and 5-carboxylcytosine by the thymine DNA glycosylase domain: its structural basis and implications for active DNA demethylation*. Nucleic Acids Res, 2012. 40(20): p. 10203-14.
60. Hashimoto, H., X. Zhang, and X. Cheng, *Excision of thymine and 5-hydroxymethyluracil by the MBD4 DNA glycosylase domain: structural basis and implications for active DNA demethylation*. Nucleic Acids Res, 2012. 40(17): p. 8276-84.
61. Jones, P.A., *The DNA methylation paradox*. Trends Genet, 1999. 15(1): p. 34-7.
62. Zhang, A.H., et al., *Analysis of p16 gene mutation, deletion and methylation in patients with arseniasis produced by indoor unventilated-stove coal usage in Guizhou, China*. J Toxicol Environ Health A, 2007. 70(11): p. 970-5.

63. Bensaada, M., et al., *Altered patterns of DNA methylation on chromosomes from leukemia cell lines: identification of 5-methylcytosines by indirect immunodetection*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1998. 103(2): p. 101-9.
64. Oakeley, E.J., *DNA methylation analysis: a review of current methodologies*. *Pharmacol Ther*, 1999. 84(3): p. 389-400.
65. Thomassin, H., E.J. Oakeley, and T. Grange, *Identification of 5-methylcytosine in complex genomes*. *Methods*, 1999. 19(3): p. 465-75.
66. Oakeley, E.J., F. Schmitt, and J.P. Jost, *Quantification of 5-methylcytosine in DNA by the chloroacetaldehyde reaction*. *Biotechniques*, 1999. 27(4): p. 744-6, 748-50, 752.
67. Compare, D., et al., *Global DNA hypomethylation is an early event in Helicobacter pylori-related gastric carcinogenesis*. *J Clin Pathol*, 2011. 64(8): p. 677-82.
68. Terry, M.B., et al., *DNA methylation in white blood cells: association with risk factors in epidemiologic studies*. *Epigenetics*, 2011. 6(7): p. 828-37.
69. Guerrero-Preston, R., et al., *Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds*. *Epigenetics*, 2010. 5(6): p. 539-46.
70. Kim, M., et al., *DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk*. *PLoS One*, 2010. 5(3): p. e9692.
71. Guerrero-Preston, R., et al., *Global DNA hypomethylation in liver cancer cases and controls: a phase I preclinical biomarker development study*. *Epigenetics*, 2007. 2(4): p. 223-6.
72. Moore, L.E., et al., *Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study*. *Lancet Oncol*, 2008. 9(4): p. 359-66.
73. Wright, R.O., et al., *Biomarkers of lead exposure and DNA methylation within retrotransposons*. *Environ Health Perspect*, 2010. 118(6): p. 790-5.
74. Maldonado Santoyo, M., et al., *Global DNA methylation in earthworms: a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments*. *Environ Pollut*, 2011. 159: p. 2387-2392.
75. Chakrabarty, D., K.W. Yu, and K.Y. Paek, *Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (Eleutherococcus senticosus)*. *Plant Sci*, 2003. 165: p. 61-68.
76. del Gaudio, R., R. Di Giaimo, and G. Geraci, *Genome methylation of the marine annelid worm Chaetopterus variopedatus: methylation of a CpG in an expressed H1 histone gene*. *FEBS Letters*, 1997. 417: p. 48-52.
77. Fieldes, M.A., et al., *DNA hypomethylation in 5-azacytidine-induced early-flowering lines of flax*. *Theor Appl Genet*, 2005. 111: p. 136-149.
78. Fuke, C., et al., *Age-related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study*. *Ann Hum Genet*, 2004. 68: p. 196-204.
79. Lund, G., et al., *DNA methylation polymorphism precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E*. *J Biol Chem*, 2004. 279: p. 29147-29154.
80. Robertson, K.D. and P.A. Jones, *DNA methylation: past, present and future directions*. *Carcinogenesis*, 2000. 21(3): p. 461-7.

81. Rocco, A., et al., *CD133 and CD44 cell surface markers do not identify cancer stem cells in primary human gastric tumours*. J Cell Physiol, 2011.
82. Shima, K., et al., *MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers*. Cancer Causes Control, 2011. 22(2): p. 301-9.
83. Kim, M.J., et al., *Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 in hepatocellular carcinomas*. Mod Pathol, 2009. 22(3): p. 442-9.
84. Johnson, I.T. and N.J. Belshaw, *Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia*. Food Chem Toxicol, 2008. 46(4): p. 1346-59.
85. Petronis, A., *Human morbid genetics revisited: relevance of epigenetics*. Trends Genet, 2001. 17(3): p. 142-6.
86. Feinberg, A.P., M. Oshimura, and J.C. Barrett, *Epigenetic mechanisms in human disease*. Cancer Res, 2002. 62(22): p. 6784-7.
87. Marsit, C.J., et al., *Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer*. Carcinogenesis, 2006. 27(1): p. 112-6.
88. Ballestar, E., et al., *Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer*. EMBO J, 2003. 22(23): p. 6335-45.
89. Johnston, J.W., et al., *HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors*. Plant Physiol Biochem, 2005. 43(9): p. 844-53.
90. Cedar, H., et al., *Direct detection of methylated cytosine in DNA by use of the restriction enzyme MspI*. Nucleic Acids Res, 1979. 6(6): p. 2125-32.
91. Gounari, F., et al., *Gene reactivation: a tool for the isolation of mammalian DNA methylation mutants*. Genes Dev, 1987. 1(9): p. 899-912.
92. Kutueva, L.I., V.V. Ashapkin, and B.F. Vanyushin, *The methylation pattern of a cytosine DNA-methyltransferase gene in Arabidopsis thaliana plants*. Biochem Mol Biol Int, 1996. 40(2): p. 347-53.
93. Toyota, M., et al., *Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification*. Cancer Res, 1999. 59(10): p. 2307-12.
94. Frigola, J., et al., *Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS)*. Nucleic Acids Res, 2002. 30(7): p. e28.
95. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(5): p. 1827-31.
96. Clark, S.J., et al., *High sensitivity mapping of methylated cytosines*. Nucleic Acids Res, 1994. 22(15): p. 2990-7.
97. Shapiro, R., V. DiFate, and M. Welcher, *Deamination of cytosine derivatives by bisulfite. Mechanism of the reaction*. J Am Chem Soc, 1974. 96(3): p. 906-12.
98. Rein, T., H. Zorbas, and M.L. DePamphilis, *Active mammalian replication origins are associated with a high-density cluster of mCpG dinucleotides*. Mol Cell Biol, 1997. 17(1): p. 416-26.
99. Herman, J.G., et al., *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(18): p. 9821-6.
100. Eads, C.A., et al., *MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation*. Nucleic Acids Res, 2000. 28(8): p. E32.
101. Worm, J., A. Aggerholm, and P. Guldborg, *In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis*. Clin Chem, 2001. 47(7): p. 1183-9.

102. Ronaghi, M., M. Uhlen, and P. Nyren, *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*. *Science*, 1998. 281(5375): p. 363, 365.
103. McKay, J.A., et al., *Genetic and non-genetic influences during pregnancy on infant global and site specific DNA methylation: role for folate gene variants and vitamin B12*. *PLoS One*, 2012. 7(3): p. e33290.
104. Castillo, P., et al., *Impact of cadmium exposure during pregnancy on hepatic glucocorticoid receptor methylation and expression in rat fetus*. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e44139.
105. Hatada, I., et al., *A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(21): p. 9523-7.
106. Cross, S.H., et al., *Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column*. *Nat Genet*, 1994. 6(3): p. 236-44.
107. Yan, P.S., et al., *CpG island arrays: an application toward deciphering epigenetic signatures of breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(4): p. 1432-8.
108. Huang, T.H., M.R. Perry, and D.E. Laux, *Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells*. *Hum Mol Genet*, 1999. 8(3): p. 459-70.
109. Gitan, R.S., et al., *Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for high-throughput methylation analysis*. *Genome Res*, 2002. 12(1): p. 158-64.
110. Lopez-Serra, L., et al., *A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer*. *Cancer Res*, 2006. 66(17): p. 8342-6.
111. Weber, M., et al., *Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells*. *Nat Genet*, 2005. 37(8): p. 853-62.
112. Dahl, C. and P. Guldborg, *DNA methylation analysis techniques*. *Biogerontology*, 2003. 4(4): p. 233-50.
113. Alcazar Magana, A., et al., *High-performance liquid chromatography determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine, 2'-deoxycytidine, and other deoxynucleosides and nucleosides in DNA digests*. *Anal Biochem*, 2008. 374: p. 378-385.
114. Song, L., et al., *Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2005. 77(2): p. 504-10.
115. Tang, Y., et al., *Widespread existence of cytosine methylation in yeast DNA measured by gas chromatography/mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2012. 84(16): p. 7249-55.
116. Rossella, F., et al., *Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the assessment of genomic DNA methylation*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009. 23(17): p. 2637-46.
117. Li, M., et al., *High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of global DNA methylation: application to methotrexate-resistant cells*. *Anal Biochem*, 2009. 387(1): p. 71-5.
118. Sotgia, S., et al., *Rapid quantification of total genomic DNA methylation degree by short-end injection capillary zone electrophoresis*. *J Chromatogr A*, 2008. 1185(1): p. 145-50.
119. Fraga, M.F., et al., *High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues*. *Electrophoresis*, 2002. 23(11): p. 1677-81.

120. Zinellu, A., et al., *Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for ATP quantification in spermatozoa and oocytes*. Anal Bioanal Chem, 2010. 398(5): p. 2109-16.
121. Berdasco, M., M.F. Fraga, and M. Esteller, *Quantification of global DNA methylation by capillary electrophoresis and mass spectrometry*. Methods Mol Biol, 2009. 507: p. 23-34.
122. Cornelius, M., et al., *Detection and separation of nucleoside-5'-monophosphates of DNA by conjugation with the fluorescent dye BODIPY and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. Electrophoresis, 2005. 26(13): p. 2591-8.
123. Hassel, M., et al., *Total nucleotide analysis of Hydra DNA and RNA by MEKC with LIF detection and ³²P-postlabeling*. Electrophoresis, 2010. 31(2): p. 299-302.
124. Schiewek, R., et al., *Determination of the DNA methylation level of the marbled crayfish: an increase in sample throughput by an optimised sample preparation*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. 850(1-2): p. 548-52.
125. Yang, I., et al., *Fused-core silica column ultra-performance liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for determination of global DNA methylation status*. Anal Biochem, 2011. 409(1): p. 138-43.
126. Sandhu, J., et al., *Determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine in genomic DNA using high performance liquid chromatography-ultraviolet detection*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. 877(20-21): p. 1957-61.
127. Wang, X., et al., *Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for accurate quantification of global DNA methylation in human sperms*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011. 879(19): p. 1647-52.
128. Rozhon, W., et al., *Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography*. Anal Biochem, 2008. 375(2): p. 354-60.
129. Armstrong, K.M., et al., *Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA*. Biotechnol J, 2011. 6(1): p. 113-7.
130. Ramsahoye, B.H., *Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Methods, 2002. 27(2): p. 156-61.
131. Wrobel, K., et al., *Phosphorus and osmium as elemental tags for the determination of global DNA methylation--a novel application of high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry in epigenetic studies*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010. 878(5-6): p. 609-14.
132. Zhang, J.J., et al., *Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Anal Biochem, 2011. 413(2): p. 164-70.
133. Ehrich, M., et al., *Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(44): p. 15785-90.
134. Schatz, P., D. Dietrich, and M. Schuster, *Rapid analysis of CpG methylation patterns using RNase T1 cleavage and MALDI-TOF*. Nucleic Acids Res, 2004. 32(21): p. e167.

135. Gut, I.G., *DNA analysis by MALDI-TOF mass spectrometry*. Hum Mutat, 2004. 23(5): p. 437-41.
136. Liu, Z., et al., *Quantification of regional DNA methylation by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Anal Biochem, 2009. 391(2): p. 106-13.
137. Cantara, W.A., et al., *The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 update*. Nucleic Acids Res, 2011. 39(Database issue): p. D195-201.
138. Globisch, D., et al., *Systems-based analysis of modified tRNA bases*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. 50(41): p. 9739-42.
139. Montgomery, T.A., et al., *PIWI associated siRNAs and piRNAs specifically require the Caenorhabditis elegans HEN1 ortholog henn-1*. PLoS Genet, 2012. 8(4): p. e1002616.
140. Kamminga, L.M., et al., *Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish*. EMBO J, 2010. 29(21): p. 3688-700.
141. Bodi, Z., et al., *Yeast targets for mRNA methylation*. Nucleic Acids Res, 2010. 38(16): p. 5327-35.
142. Dominissini, D., et al., *Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq*. Nature, 2012. 485(7397): p. 201-6.
143. Meyer, K.D., et al., *Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons*. Cell, 2012. 149(7): p. 1635-46.
144. Havelund, J.F., et al., *Identification of 5-hydroxycytidine at position 2501 concludes characterization of modified nucleotides in E. coli 23S rRNA*. J Mol Biol, 2011. 411(3): p. 529-36.
145. Krog, J.S., et al., *3-(3-amino-3-carboxypropyl)-5,6-dihydrouridine is one of two novel post-transcriptional modifications in tRNALys(UUU) from Trypanosoma brucei*. FEBS J, 2011. 278(24): p. 4782-96.
146. Motorin, Y., F. Lyko, and M. Helm, *5-methylcytosine in RNA: detection, enzymatic formation and biological functions*. Nucleic Acids Res, 2010. 38(5): p. 1415-30.
147. Squires, J.E., et al., *Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA*. Nucleic Acids Res, 2012. 40(11): p. 5023-33.
148. Motorin, Y. and M. Helm, *tRNA stabilization by modified nucleotides*. Biochemistry, 2010. 49(24): p. 4934-44.
149. Squires, J.E. and T. Preiss, *Function and detection of 5-methylcytosine in eukaryotic RNA*. Epigenomics, 2010. 2(5): p. 709-15.
150. Chow, C.S., T.N. Lamichhane, and S.K. Mahto, *Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with post-transcriptional modifications*. ACS Chem Biol, 2007. 2(9): p. 610-9.
151. Motorin, Y. and H. Grosjean, *Multisite-specific tRNA:m5C-methyltransferase (Trm4) in yeast Saccharomyces cerevisiae: identification of the gene and substrate specificity of the enzyme*. RNA, 1999. 5(8): p. 1105-18.
152. Grosjean, H., et al., *Detection of enzymatic activity of transfer RNA modification enzymes using radiolabeled tRNA substrates*. Methods Enzymol, 2007. 425: p. 55-101.
153. Li, H.Y., et al., *Analysis of modified nucleosides in the urine of patients with malignant cancer by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. 22(20): p. 3161-71.

154. Mattick, J.S., et al., *RNA regulation of epigenetic processes*. *Bioessays*, 2009. 31(1): p. 51-9.
155. Schaefer, M., et al., *RNA cytosine methylation analysis by bisulfite sequencing*. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(2): p. e12.
156. Yanez Barrientos, E., et al., *Impact of cadmium and selenium exposure on trace elements, fatty acids and oxidative stress in *Lepidium sativum**. *J Mex Chem Soc*, in press
157. Aljanabi, S.M. and I. Martinez, *Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques*. *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(22): p. 4692-3.
158. De-la-Pena, C., et al., *KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during in vitro conditions in *Agave spp.** *BMC Plant Biol*, 2012. 12: p. 203.
159. Nic-Can, G.I., et al., *New insights into somatic embryogenesis: leafy cotyledon1, baby boom1 and WUSCHEL-related homeobox4 are epigenetically regulated in *Coffea canephora**. *PLoS One*, 2013. 8(8): p. e72160.
160. Guo, L., H. Yue, and Z. Cai, *A novel pre-column fluorescent derivatization method for the sensitive determination of aristolochic acids in medicinal herbs by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. *J Pharm Biomed Anal*, 2010. 53(1): p. 37-42.
161. Eisenberg, E.J. and K.C. Cundy, *High-performance liquid chromatographic determination of cytosine-containing compounds by precolumn fluorescence derivatization with phenacyl bromide: application to antiviral nucleosides and nucleotides*. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996. 679(1-2): p. 119-27.
162. Zhang, M., et al., *DNA cytosine methylation in plant development*. *J Genet Genomics*, 2010. 37(1): p. 1-12.
163. Filek, M., et al., *The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress*. *J Plant Physiol*, 2008. 165(8): p. 833-44.
164. Machnicka, M.A., et al., *MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update*. *Nucleic Acids Res*, 2013. 41(Database issue): p. D262-7.
165. Krauss, V. and G. Reuter, *DNA methylation in *Drosophila*--a critical evaluation*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2011. 101: p. 177-91.
166. Chinnusamy, V. and J.K. Zhu, *RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants*. *Sci China C Life Sci*, 2009. 52(4): p. 331-43.
167. Chinnusamy, V. and J.K. Zhu, *Epigenetic regulation of stress responses in plants*. *Curr Opin Plant Biol*, 2009. 12(2): p. 133-9.
168. Wang, B., et al., *Cadmium and its epigenetic effects*. *Curr Med Chem*, 2012. 19(16): p. 2611-20.
169. Becker, M., et al., *Pmt1, a Dnmt2 homolog in *Schizosaccharomyces pombe*, mediates tRNA methylation in response to nutrient signaling*. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(22): p. 11648-58.
170. Wilfinger, W.W., K. Mackey, and P. Chomczynski, *Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity*. *Biotechniques*, 1997. 22(3): p. 474-6, 478-81.
171. Lopez-Torres, A., et al., *Selective derivatization of cytosine and methylcytosine moieties with 2-bromoacetophenone for submicrogram DNA methylation analysis by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection*. *Anal Chem*, 2011. 83(20): p. 7999-8005.

172. Torres Elguera, J.C., et al., *Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in Lepidium sativum.* Acta Physiologiae Plantarum, 2013. 35(2): p. 431-441.
173. Frias, J., et al., *Changes in nutritional value and cytotoxicity of garden cress germinated with different selenium solutions.* J Agric Food Chem, 2010. 58(4): p. 2331-6.
174. Greco, M., et al., *In Posidonia oceanica cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning.* J Exp Bot, 2012. 63(2): p. 695-709.
175. Aina, R., et al., *Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp.* Physiologia plantarum, 2004. 121(3): p. 472 - 480.
176. Schaefer, M., et al., *Azacytidine inhibits RNA methylation at DNMT2 target sites in human cancer cell lines.* Cancer Res, 2009. 69(20): p. 8127-32.
177. Munzel, M., D. Globisch, and T. Carell, *5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome.* Angew Chem Int Ed Engl, 2011. 50(29): p. 6460-8.
178. Wyatt, G.R. and S.S. Cohen, *A new pyrimidine base from bacteriophage nucleic acids.* Nature, 1952. 170(4338): p. 1072-3.
179. Penn, N.W., et al., *The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid.* Biochem J, 1972. 126(4): p. 781-90.
180. Kriaucionis, S. and N. Heintz, *The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain.* Science, 2009. 324(5929): p. 929-30.
181. Munzel, M., et al., *Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain.* Angew Chem Int Ed Engl, 2010. 49(31): p. 5375-7.
182. Szwagierczak, A., et al., *Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA.* Nucleic Acids Res, 2010. 38(19): p. e181.
183. Ko, M., et al., *Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2.* Nature, 2010. 468(7325): p. 839-43.
184. Kraus, A.M., et al., *Determination of genomic 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine in human DNA by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence.* Epigenetics, 2011. 6(5): p. 560-5.
185. Song, C.X., et al., *Detection of 5-hydroxymethylcytosine in a combined glycosylation restriction analysis (CGRA) using restriction enzyme Taq(alpha)I.* Bioorg Med Chem Lett, 2011. 21(17): p. 5075-7.
186. Booth, M.J., et al., *Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution.* Science, 2012. 336(6083): p. 934-7.
187. Schuler, P. and A.K. Miller, *Sequencing the sixth base (5-hydroxymethylcytosine): selective DNA oxidation enables base-pair resolution.* Angew Chem Int Ed Engl, 2012. 51(43): p. 10704-7.
188. Yu, M., et al., *Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome.* Cell, 2012. 149(6): p. 1368-80.
189. Huang, Y., et al., *The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing.* PLoS One, 2010. 5(1): p. e8888.
190. Jin, S.G., S. Kadam, and G.P. Pfeifer, *Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine.* Nucleic Acids Res, 2010. 38(11): p. e125.

191. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. 324(5929): p. 930-5.
192. Liutkeviciute, Z., et al., *Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA*. Nat Chem Biol, 2009. 5(6): p. 400-2.
193. Le, T., et al., *A sensitive mass spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples*. Anal Biochem, 2011. 412(2): p. 203-9.
194. Chen, L., L. Zhang, and C. Cai, *[Analysis of global deoxyribonucleic acid 5-hydroxymethylcytosine in tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry]*. Se Pu, 2012. 30(5): p. 533-7.
195. Zhang, L., et al., *Simultaneous determination of global DNA methylation and hydroxymethylation levels by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Biomol Screen, 2012. 17(7): p. 877-84.
196. Globisch, D., et al., *Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates*. PLoS One, 2010. 5(12): p. e15367.
197. Valinluck, V. and L.C. Sowers, *Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1*. Cancer Res, 2007. 67(3): p. 946-50.
198. Chen, C.C., K.Y. Wang, and C.K. Shen, *The mammalian de novo DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases*. J Biol Chem, 2012. 287(40): p. 33116-21.
199. Hong, H., H. Cao, and Y. Wang, *Identification and quantification of a guanine-thymine intrastrand cross-link lesion induced by Cu(II)/H₂O₂/ascorbate*. Chem Res Toxicol, 2006. 19(5): p. 614-21.
200. Maldonado-Santoyo, M., et al., *Global DNA methylation in earthworms: a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments*. Environ Pollut, 2011. 159(10): p. 2387-92.
201. Yanez Barrientos, E., et al., *Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection for simultaneous assessment of global DNA and total RNA methylation in *Lepidium sativum*: effect of plant exposure to Cd(II) and Se(IV)*. Anal Bioanal Chem, 2013. 405(7): p. 2397-404.
202. Marrubini, G., et al., *Experimental design applied to the optimization of microwave-assisted DNA hydrolysis*. J Chromatogr A, 2012. 1249: p. 8-16.

CAPÍTULO X. ANEXOS



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

Global DNA methylation in earthworms: A candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments

María Maldonado Santoyo, Crescencio Rodríguez Flores, Adolfo Lopez Torres, Kazimierz Wrobel, Katarzyna Wrobel*

Department of Chemistry, University of Guanajuato, L de Retana N° 5, 36000 Guanajuato, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2011
Received in revised form
28 June 2011
Accepted 30 June 2011

Keywords:

Earthworms
Heavy metals
Epigenetics
DNA methylation

ABSTRACT

In this work, possible relationships between global DNA methylation and metal/metalloid concentrations in earthworms have been explored. Direct correlation was observed between soil and tissue As, Se, Sb, Zn, Cu, Mn, Ag, Co, Hg, Pb ($p < 0.05$). Speciation results obtained for As and Hg hint at the capability of earthworms for conversion of inorganic element forms present in soil to methylated species. Inverse correlation was observed between the percentage of methylated DNA cytosines and total tissue As, As + Hg, As + Hg + Se + Sb ($\beta = -0.8456$, $p = 0.071$; $\beta = -0.9406$, $p = 0.017$; $\beta = -0.9526$, $p = 0.012$ respectively), as well as inorganic As + Hg ($\beta = -0.8807$, $p = 0.049$). It was concluded that earthworms would be particularly helpful as bioindicators of elements undergoing *in vivo* methylation and might also be used to assess the related risk of epigenetic changes in DNA methylation.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Epigenetics is referred to heritable changes in gene activity and expression that occur without alteration of DNA sequence; these changes depend on actual conformation of chromatin in such a way that its condensed form favors gene silencing, while in the relaxed chromatin state genes become activated. One of the best characterized molecular mechanisms underlying reversible arrangements of chromatin is DNA methylation that occurs by attachment of methyl group to carbon 5 position in cytosine in CpG islands (Delcuve et al., 2009). Epigenetic events are involved in natural processes of cell differentiation and phenotype development; however, while misdirected they can contribute to different pathological processes. In particular, global hypomethylation of genomic DNA has been associated with carcinogenesis (Salnikow and Zhitkovich, 2008). It is relevant that DNA methylation patterns can be established and modified in response to the variety of environmental factors, among them the exposure to heavy metals as nickel, chromium, cadmium and metalloids as arsenic (Wrobel et al., 2009). Inorganic arsenic is metabolized by a series of reduction and methylation reactions aided by S-adenosylmethionine (SAM), the universal methyl donor also used by a variety of methyltransferases to modify DNA, RNA, histones and other proteins (Sutherland and

Costa, 2003; Ferguson et al., 2004). From the point of view of epigenetic effects of As, dose-dependent depletion of methyl group stores have been observed and associated with aberrant DNA methylation (Salnikow and Zhitkovich, 2008; Vahter, 2008; Zhou et al., 2008).

Earthworms have often been used as bioindicators of soil contamination (Furst, 2002; Plytycz et al., 2007). In particular, direct association between soil and tissue concentration levels was reported, mostly for Cd, Zn and Pb (Rahtkens and von der Trenck, 2007; Hinton et al., 2009; Nei et al., 2009; Tischer, 2009). The uptake of elements, their possible bioaccumulation and feasibility of earthworms for soil remediation were investigated (Langdon et al., 2003b; Burton et al., 2006; Veltman et al., 2007; Vijver et al., 2007; Ernst et al., 2008; Suthar, 2008; Ma et al., 2009). For better understanding of the putative role of earthworms in element cycling, speciation analyses were also performed (Langdon et al., 2003a; Burton et al., 2006; Watts et al., 2008; Button et al., 2009). Several types of biological responses in earthworms have been used in ecotoxicological studies (Bierkens et al., 1998; Scott-Fordsmand and Weeks, 2000; Vandecasteele et al., 2004; Plytycz et al., 2007; Tischer, 2009; Zheng and Li, 2009); the biomarkers measured encompass lethality, reproductive failure (Zheng and Li, 2009), neurological parameters (Bierkens et al., 1998), alteration of enzymatic activity, induction of metal-binding proteins (Furst, 2002), energy reserve responses, histopathological changes and DNA damage (Scott-Fordsmand and Weeks, 2000; Fourie et al., 2007; Button et al., 2010; Espinosa-Reyes et al., 2010). Heavy metal genotoxicity was

* Corresponding author.

E-mail address: katarzyn@quijote.ugto.mx (K. Wrobel).

demonstrated by comet assay (Reinecke and Reinecke, 2004; Fourie et al., 2007; Li et al., 2009; Espinosa-Reyes et al., 2010), gene profiling by microarray technology (Steinberg et al., 2008) and also by measurements of DNA oxidative injury marker, 8-hydroxydeoxyguanosine (Nakashima et al., 2008; Hirano and Tamae, 2010). The above tools however, would not provide information on possible epigenetic events, established as an important component of gene regulation and activated by a wide variety of environmental parameters (Mellor et al., 2008; Steinberg et al., 2008).

The purpose of this work was to explore possible relationships among element concentrations and actual status of global DNA methylation in earthworms in order to evaluate the feasibility of this parameter as a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals and metalloids in terrestrial environments.

2. Material and methods

2.1. Instrumentation

A model 7500ce ICP-MS (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) was used with a Meinhard nebulizer for total element determinations, and with a MiraMist Teflon® nebulizer for speciation analysis. A Peltier-cooled chamber was operated at 2 °C. Liquid chromatography separations were carried out using an Agilent Series 1200 liquid chromatographic system equipped with a quaternary pump, a well plate autosampler and a diode array detector, controlled by Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). For element speciation analysis, the column effluent was introduced to ICP-MS system via the short-length Teflon tubing. The chromatographic columns were: Luna C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm), Gemini C18 (150 × 3 mm, 5 μm) and SAX (250 × 4.6 mm, 5 μm) with C18 precolumn, all from Phenomenex. The chromatographic and ICP-MS instrumental operating conditions are given in Table 15 (Supplementary information).

2.2. Reagents and samples

All chemicals were of analytical reagent grade. Deionized water (18.2 MΩ cm, Labconco, USA), HPLC-grade methanol, and analytical reagent-grade ethanol, chloroform, isopropanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) were used throughout. The full list of reagents and solutions is given in the Supplementary information.

Earthworms and the host soils were collected in September 2009 from the following sites in Mexico: (1) close to the silver mine, Guanajuato (Guanajuato state); (2) close to the gold mine, Mezcala (Guerrero state); (3) house garden in the residential zone of San Luis Potosi (San Luis Potosi state); (4) house garden in the residential zone of Lagos de Moreno (Jalisco state); (5) the site where silver ores were processed in the past, Guanajuato (Guanajuato state); (6) house garden in a village close to Lagos de Moreno (Jalisco state); (7) at the Guanajuato river, close to the mine tailing, Guanajuato (Guanajuato state). The sampling area did not exceed 4 m² (0–20 cm surface soil); earthworms of similar size (approximately 10 cm long) and color were handpicked to obtain about 30–40 g of biomass. The soil adjacent to each worm was also taken and then pooled for each sampling site to obtain about 500 g. The earthworms from each site were thoroughly rinsed with deionized water and placed in ventilated tubes with moist filter paper for depuration of gut contents (24 h). Then, they were again rinsed and left for depuration for another 24 h. Finally, the earthworms were rinsed and the excess of moisture was eliminated with filter paper (Watts et al., 2008). Each portion was divided in two; about 20 earthworms were freeze-dried at –20 °C for the analysis of Hg species and for global DNA methylation and the rest of biomass was cut into small pieces and freeze-dried for the determination of total element concentrations and arsenic speciation. The pooled soil samples were dried at room temperature and sieved (250 μm).

2.3. Analytical procedures

For total element determination, the digestion procedures reported elsewhere were adopted (Cabanero Ortiz et al., 2002; Landero Figueroa et al., 2008; Watts et al., 2008) and the digests were analyzed by ICP-MS. The detailed description is given in the Supplementary information. The instrumental detection limit based on $6 \times \sigma$ of the noise level, was 0.2 μg l⁻¹ for the two elements.

Mercury speciation was accomplished according to the procedure reported previously (Maldonado Santoyo et al., 2009), for details see Supplementary information. For calibration, working standard solutions contained Hg²⁺ and CH₃Hg⁺ at concentration levels 0, 5.0, 10, 25, 50 μg l⁻¹ Hg each and IS (10 μg l⁻¹ Bi). The results obtained are expressed as μg of Hg per g of dry mass (after correction for moisture content). The instrumental detection limits for Hg²⁺ and CH₃Hg⁺ were 0.7 μg l⁻¹ and 0.9 μg l⁻¹ Hg respectively. The results obtained are expressed as μg of Hg per g dry mass.

For speciation analysis of arsenic, the extraction conditions reported earlier were applied (Wrobel et al., 2005; Watts et al., 2008) and anion exchange

chromatographic separation with ICP-MS detection was used as described elsewhere (Heitkemper et al., 2001; Day et al., 2002). The detailed experimental conditions are provided in the Supplementary information. External calibration was performed with a series of standard solutions containing As(III) as arsenic trioxide, As(V) as potassium arsenate monobasic, DMAs(V) as dimethylarsinic acid sodium salt and MMAs(V) as sodium methylarsenate, at 0, 5.0, 10, 25, 50 μg l⁻¹ As each. The instrumental detection limits for As(III), DMAs(V), MMAs(V), As(V) were 0.4 μg l⁻¹, 0.5 μg l⁻¹, 0.5 μg l⁻¹, 0.6 μg l⁻¹ As, respectively. The results obtained are expressed as μg of As per g dry mass.

For DNA analysis, the aliquot of thaw biomass (0.5–0.6 g) was precisely weighed in 15 ml Falcon tubes, homogenized (polytron) and three sub-samples were taken (about 100 mg). The extraction of DNA was carried out according to Aljanabi and Martinez (1997). The digestion to deoxynucleosides in DNA extracts and oligonucleotide mixtures followed by reversed phase HPLC–DAD were performed as reported previously (Alcazar Magana et al., 2008), using slightly modified chromatographic conditions (details in the Supplementary information). The ratio between peak area of 5-methyl-2'-deoxycytidine to 2'-deoxyguanosine (A_{5mC}/A_{dC}) was used as analytical signal mode and oligonucleotide digests containing 1, 2, 4, 8% of 5mC were used for calibration ($r^2 = 0.9998$).

2.4. Statistical analysis

Descriptive statistics was performed to obtain means and standard deviations. To evaluate possible relationships between parameters measured, analysis of correlation was carried out. Significance level was established at $p < 0.05$. The software used was Statistica for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

3. Results and discussion

The original approach of this study was to evaluate DNA methylation in earthworms naturally exposed to different concentrations of metals and metalloids in soil. Seven sampling sites were selected in central Mexico and total element concentration was determined both, in the biomass and in soil collected at each site. In further development, speciation analysis of arsenic and mercury was carried out and global methylation of genomic DNA was evaluated. The statistical analysis of correlation was then performed in search of possible associations among the parameters measured.

3.1. Total element concentrations

The concentration ranges found in soil samples collected at seven sites were as follows: 11.8–69.9 μg g⁻¹ V; 6.10–37.4 μg g⁻¹ Cr; 142–866 μg g⁻¹ Mn; 2.90–20.5 μg g⁻¹ Co; 1.00–26.9 μg g⁻¹ Ni; 7.77–184 μg g⁻¹ Cu; 70.5–328 μg g⁻¹ Zn; 1.50–69.6 μg g⁻¹ As; 0.40–5.51 μg g⁻¹ Se; 0.20–16.7 μg g⁻¹ Ag; 0.30–3.80 μg g⁻¹ Cd; 0.10–3.81 μg g⁻¹ Sb; 1.80–29.0 μg g⁻¹ Hg; 40.9–154 μg g⁻¹ Pb (all results given in Table 2S in the Supplementary information). The soil from site 6 contained the lowest concentrations of Cr, Co, As, Se, Cd, Sb, Hg and relatively low concentrations of other metals. For V, Cr, Co, Ni, Cu and Pb, the most elevated concentrations were found at site 1, close to the silver mine; for Ag, Hg and Mn at silver mine tailing (site 5), and for As at site 2 located close to the gold mine. The determination of these same elements in pooled and freeze-dried earthworms revealed the following concentration ranges: 0.60–14.2 μg g⁻¹ V; 0.54–8.77 μg g⁻¹ Cr; 58.4–394 μg g⁻¹ Mn; 1.57–20.6 μg g⁻¹ Co; 0.51–16.7 μg g⁻¹ Ni; 3.02–68.9 μg g⁻¹ Cu; 63.2–224 μg g⁻¹ Zn; 1.40–43.5 μg g⁻¹ As; 0.26–5.44 μg g⁻¹ Se; 0.42–7.00 μg g⁻¹ Ag; 0.82–3.50 μg g⁻¹ Cd; 0.06–3.45 μg g⁻¹ Sb; 0.25–22.6 μg g⁻¹ Hg; 5.47–85.9 μg g⁻¹ Pb (Table 3S in the Supplementary information). The results obtained in this work for arsenic are within the ranges reported and also reviewed by Langdon et al. (Langdon et al., 2002); in particular up to 40 μg g⁻¹ of total As in worm tissues had been found in soils from various geographical regions containing element levels similar to those determined at sites 1–7, while in the study of Watts et al. (2008) arsenic concentration 11 μg g⁻¹ was reported in worms from uncontaminated soil containing 16 μg g⁻¹ of As. In the recent report

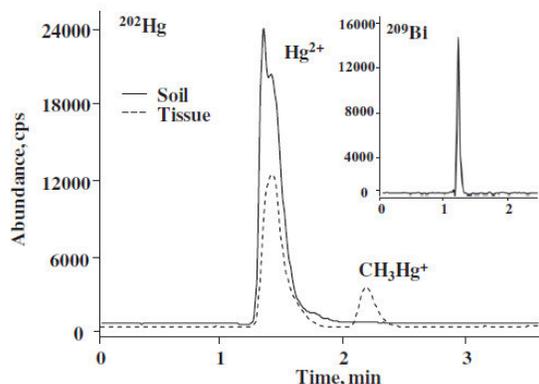


Fig. 1. Typical HPLC-ICP-MS chromatograms of mercury species extracted from soil (—) and biomass (---) collected at site 1. (The insert shows chromatogram of Bi as IS.)

from the polluted area in China, where soil mercury was in the range 2–15 $\mu\text{g g}^{-1}$, total element concentrations found in three worm species ranged from 0.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ to 5.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Zhang et al., 2009), also in agreement with the results obtained in this work.

Statistically significant direct correlation between soil and tissue element concentrations was found for Mn ($\beta = 0.8948$, $p = 0.007$), Co ($\beta = 0.9797$, $p = 0.000$), Zn ($\beta = 0.8188$, $p = 0.024$), As ($\beta = 0.9921$, $p = 0.003$), Se ($\beta = 0.8048$, $p = 0.029$), Ag ($\beta = 0.8897$, $p = 0.007$), Sb ($\beta = 0.9784$, $p = 0.000$), Hg ($\beta = 0.9930$, $p = 0.000$) and Pb ($\beta = 0.9429$, $p = 0.001$), while for other elements (V, Cr, Ni, Cu, Cd) such relationship was not statistically meaningful ($p > 0.1$). Similar direct association between soil and tissue concentration levels of several elements had been previously reported (Rahtkens and von der Trenck, 2007; Hinton et al., 2009; Nei et al., 2009; Tischer, 2009). It seemed interesting however that soil and tissue concentrations were correlated for As, Se, Sb and Se, all of them known to undergo biotransformation from inorganic to alkylated forms (Thayer, 2002; Dopp et al., 2004a). The relationships observed for these elements could be due to better bioavailability of alkylated versus inorganic species present in soil, or might be related to in vivo methylation of inorganic forms by earthworms. To gain a further insight on this issue, speciation analysis was carried out in soil and biomass extracts. Arsenic and mercury were selected for this purpose, because of their relatively high concentration levels and clearly marked differences among sampling sites as compared to Se and Sb (Tables 2S and 3S). It should be mentioned that speciation of these same two elements (As and Hg) in worms has been recently reported (Watts et al., 2008; Button et al., 2009; Zhang et al., 2009). The samples from sites 1, 2, 4, 5, 7 were analyzed, while other sites were not considered due to the low total concentrations of the two elements.

3.2. Analytical speciation of arsenic and mercury

In Fig. 1, typical chromatograms of soil and tissue extracts recollected at site 1 are presented. The recovery of entire procedure, evaluated as a ratio between the sum of Hg^{2+} and CH_3Hg^+ concentrations obtained in speciation analysis and total Hg determined by ICP-MS, was in the range 88–96% and 46–75% for tissue and soil samples respectively. Quite importantly, the extraction conditions applied were aimed at organic mercury and relatively low recovery values obtained in soil analysis should be ascribed to the presence of non-mobile mercury sulfide, typical form of inorganic mercury especially in the mining areas (Gavilan-Garcia et al., 2008; Issaro et al., 2009; Reis et al., 2010). In Table 1, the results obtained for the two Hg species and for total Hg are presented together with the respective detection limits evaluated (as $\mu\text{g Hg per g}$ of the original sample, dry mass). Inorganic mercury was the primary species in soil samples, while methylmercury was found only at site 5 ($1.95 \pm 0.09 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dm}$) characterized by relatively elevated concentration of total mercury ($29.0 \pm 1.5 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dm}$). On the other hand, the two species were observed in earthworm biomass, except for site 2 with the lowest total mercury in biomass ($0.25 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dm}$). These results indicate that earthworms are able for the uptake of the two common Hg species from soil (Burton et al., 2006; Zhang et al., 2009) and also point to the ability of these organisms for conversion the inorganic Hg to HgCH_3 .

In the speciation analysis of arsenic, four standards were used in order to identify and quantify As(III), As(V), MMAs(V) and DMAs(V), usually reported as primary species in environmental samples. In Fig. 2, typical chromatograms corresponding to the soil and biomass samples from site 5 are presented. The quantitative results obtained for five sampling sites are shown in Table 2. The procedure recoveries, evaluated as a sum of As species determined by HPLC-ICP-MS with respect to total ICP-MS determined element content, were in the range 65–85% for soil and 83–90% for biomass samples. As can be observed in Table 2, in soil samples only inorganic arsenicals were detected except for site 1, at which the concentration of DMAs(V) was $1.96 \pm 0.36 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dm}$. In the extracts of earthworms, the two organic species DMAs(V) and MMAs(V) were found, yet at relatively lower concentrations as compared to As(III) and As(V). These results support data reported by Watts et al. (2008) and suggest the capability of earthworms for biotransformation of inorganic As via methylation, the process often studied in a variety of experiment systems (Aposhian, 1997; Thayer, 2002; Wrobel et al., 2009). Some authors reported arseno-betaine as the main organic species in worms with lower proportion of DMAs(V), MMAs(V) and arsenosugars (Langdon et al., 2003a; Button et al., 2009); however in the cited studies As-resistant worms were collected from contaminated soils, containing significantly higher total element concentrations as compared to the present work.

In summary, statistically significant direct correlation observed between soil and tissue element concentration levels and the

Table 1
Concentration levels of total mercury and its two species found in soil and earthworm extracts at different sampling sites.

Sampling site	Mean concentration in soil \pm SD, $\mu\text{g g}^{-1} \text{ Hg}$ (n = 3)			Mean concentration in tissue \pm SD, $\mu\text{g g}^{-1} \text{ Hg}$ (n = 3)		
	Total Hg	Hg^{2+}	CH_3Hg^+	Total Hg	Hg^{2+}	CH_3Hg^+
1	9.06 ± 0.05	4.46 ± 0.20	nf	6.74 ± 0.32	4.79 ± 0.32	1.61 ± 0.09
2	1.83 ± 0.04	0.84 ± 0.06	nf	0.25 ± 0.01	0.22 ± 0.03	nf
4	4.92 ± 0.21	2.98 ± 0.18	nf	4.59 ± 0.17	4.05 ± 0.25	0.37 ± 0.03
5	29.0 ± 1.5	19.8 ± 1.2	1.95 ± 0.09	22.6 ± 1.7	16.7 ± 1.02	4.81 ± 0.24
7	5.61 ± 0.22	2.85 ± 0.12	nf	4.87 ± 0.14	4.08 ± 0.23	0.44 ± 0.03
DL, $\mu\text{g g}^{-1} \text{ Hg}$	0.09	0.18	0.22	0.06	0.12	0.15

nf – Not found, DL – detection limit evaluated based on the instrumental detection limit of each species and the sample mass.

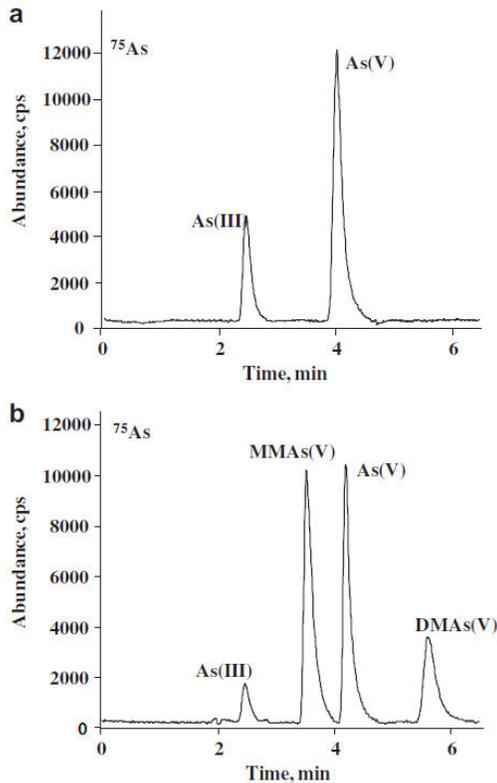


Fig. 2. Typical HPLC–ICP-MS chromatograms of arsenic species extracted from soil (a) and biomass (b) both collected at site 5.

speciation results obtained for mercury and arsenic suggest that biotransformation of inorganic to methylated species in earthworms might be important for the element uptake from soil. Consequently, earthworms as bioindicators seem to be especially

Table 2
Concentration levels of total arsenic and its species found in soil and earthworm extracts at different sampling sites.

Site	Mean concentration ± SD, $\mu\text{g g}^{-1}$ As dm (n = 3)				
	Total As	As(III)	As(V)	DMAs(V)	MMAs(V)
Biomass extracts					
1	3.78 ± 0.21	1.12 ± 0.04	1.44 ± 0.01	0.40 ± 0.05	0.45 ± 0.04
2	43.5 ± 2.2	28.2 ± 0.16	9.53 ± 0.08	0.76 ± 0.04	0.61 ± 0.06
4	1.43 ± 0.03	0.39 ± 0.04	0.59 ± 0.03	0.21 ± 0.02	nf
5	15.8 ± 0.6	1.31 ± 0.05	3.80 ± 0.11	4.92 ± 0.24	4.21 ± 0.23
7	6.48 ± 0.21	2.08 ± 0.10	2.72 ± 0.10	0.41 ± 0.06	0.49 ± 0.05
DL, $\mu\text{g g}^{-1}$ As	0.08	0.10	0.15	0.12	0.12
Soil extracts					
1	28.9 ± 1.6	6.37 ± 0.18	13.0 ± 0.61	1.96 ± 0.36	nf
2	69.6 ± 3.1	11.7 ± 0.49	36.0 ± 1.57	nf	nf
4	1.66 ± 0.09	0.43 ± 0.04	0.65 ± 0.08	nf	nf
5	18.7 ± 1.3	5.87 ± 0.19	10.0 ± 0.56	nf	nf
7	6.32 ± 0.34	2.71 ± 0.16	1.59 ± 0.16	nf	nf
DL, $\mu\text{g g}^{-1}$ As	0.12	0.15	0.22	0.18	0.18

nf – Not found, DL – detection limits based on instrumental detection limits for each species and the sample mass.

well suited for the elements that undergo biotransformation in these organisms.

3.3. Global DNA methylation

Global methylation of DNA, defined as the ratio between methylated cytosines and total amount of cytosine or guanine bases in DNA, is considered a useful indicator of large-scale epigenetic events (Baccarelli and Bollati, 2009; Wrobel et al., 2009). Several studies focused the relation between DNA methylation and actual concentration of a single element (As, Hg, Se, Ni, Cr) or its chemical forms (Dopp et al., 2004b; Salnikow and Zhitkovich, 2008; Baccarelli and Bollati, 2009), while information concerning overall effect caused by exposure of organisms to a variety of elements present in natural environments is scarce. In Fig. 3, typical chromatogram obtained for the DNA digest from site 7 is presented and quantitative results for all sites are given in Table 3. In search of possible relationships between elements and global DNA methylation, the statistical analysis of correlation was carried out. Initially, the concentration levels of individual elements found in biomass were considered and in such approach the most meaningful correlation was observed for As ($\beta = -0.8456$, $p = 0.071$), while for other elements such relation apparently did not exist ($p > 0.1$). These results support earlier data on causative role of arsenic in global DNA hypomethylation (Salnikow and Zhitkovich, 2008; Baccarelli and Bollati, 2009; Jensen et al., 2009; Pilsner et al., 2011). In particular both, aberrant patterns of DNA methylation and oxidative damage have been related to *in vivo* As methylation (Salnikow and Zhitkovich, 2008; Kojima et al., 2009; Wrobel et al., 2009). Since *in vivo* transmethylation processes involve S-adenosylmethionine as a donor of methyl group and compromise various methyltransferases, not only arsenic but also other elements metabolized to their methylated derivatives may contribute to global hypomethylation of DNA (Davis and Uthus, 2004; Salnikow and Zhitkovich, 2008; Baccarelli and Bollati, 2009; Jensen et al., 2009; Pilsner et al., 2010, 2011).

To inquire overall effect of elements known to undergo *in vivo* methylation, the sum of total As and Hg concentrations in biomass as well as the sum of As, Hg, Se and Sb were taken for correlation analysis. It is shown in Table 3 that both variables were inversely correlated to the percentage of DNA methylation ($\beta = -0.9406$, $p = 0.017$ and $\beta = -0.9526$, $p = 0.012$ respectively), which seems to confirm that all these four elements would contribute to actual

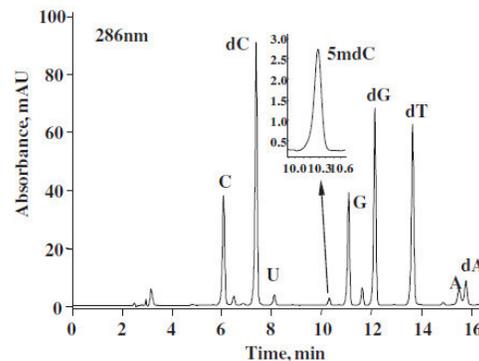


Fig. 3. Typical HPLC–UV chromatogram of DNA hydrolyzate, earthworms collected at site 7 (C – cytidine, dC – 2'-deoxycytidine, U – uridine, 5mdC – 5-methyl-2'-deoxycytidine, G – guanosine, dG – deoxyguanosine, dT – 2'-deoxythymidine, A – adenine, dA – 2'-deoxyadenine).

Table 3
Global DNA methylation in earthworms and its relationship with elements undergoing biotransformation via methylation.

Site	DNA methyl. (%)	Element concentrations in biomass, $\mu\text{g g}^{-1}$ dm					
		As ^a	Hg ^a	(As + Hg) ^a	Organic ^b As + Hg	Inorganic ^b As + Hg	(As + Hg + Se + Sb) ^a
1	2.80	3.78	6.74	10.52	2.46	7.35	14.3
2	1.92	43.5	0.25	43.75	1.37	38.0	48.5
4	3.37	1.43	4.59	6.02	0.58	4.83	9.47
5	2.15	15.8	22.6	38.4	13.9	19.3	44.4
7	2.71	6.48	4.87	11.35	1.34	8.24	18.3
β	–	–0.8456	–0.2302	–0.9406	–0.4595	–0.8807	–0.9526
p	–	0.071	0.710	0.017	0.436	0.049	0.012

^a Total element concentration determined in biomass by ICP-MS (all data given in Table 3S).

^b Sum of organic (or inorganic) As and Hg species determined in biomass by HPLC-ICP-MS (individual values given in Tables 2 and 3); β , p – correlation coefficient and probability evaluated by statistical analysis of correlation between global DNA methylation and element concentrations in earthworms from sites 1, 2, 4, 5, 7.

status of DNA methylation in earthworms. If so, global DNA methylation in these organisms might be useful as a new biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments.

Interestingly enough, statistically significant inverse correlation was found between the sum of inorganic As + Hg species in biomass and DNA methylation ($\beta = -0.8807$, $p = 0.049$, Table 3), which seems to support postulated ability of earthworms for As, Hg methylation and the competitive feature of this process versus DNA methylation (Wrobel et al., 2009). On the other hand, organic (As + Hg) species in biomass did not correlate with DNA methylation, suggesting that their actual tissue content corresponded in part to biotransformation in vivo and in part to the assimilation of methylated species from soil, the latter obviously not related to DNA methylation. Further studies, involving more sampling sites with different element profiles are needed to support the results obtained in this study.

4. Conclusions

The results obtained in this work provide original data potentially enhancing the utility of earthworms as standard organisms for ecotoxicological testing. Statistically significant direct correlation observed between soil and tissue concentration levels of As, Hg, Se and Sb suggests that these organisms might be particularly useful to assess actual status of elements potentially undergoing biotransformation. Chemical speciation analysis carried out in soil and biomass samples hint at the ability of earthworms for As and Hg biotransformation and at possible relevance of such biotransformation to element uptake from soil. The statistical significance of the relation between DNA methylation and tissue elements was low for As ($p = 0.071$), but increased when the sum of As + Hg and As + Hg + Se + Sb were considered ($p = 0.017$, $p = 0.012$ respectively), suggesting additive contribution of all these elements. Since actual status of global DNA methylation in earthworms is apparently affected by the overall effect of elements undergoing methylation, this parameter might be considered as a candidate biomarker of epigenetic risks related to their presence in terrestrial environments.

Acknowledgments

The financial support from CONACYT (Mexico), project 49405 is gratefully acknowledged.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online, version at doi:10.1016/j.envpol.2011.06.041.

References

- Alcazar Magana, A., Wrobel, K., Alvarado Caudillo, Y., Zaina, S., Lund, G., Wrobel, K., 2008. High-performance liquid chromatography determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine, 2'-deoxycytidine, and other deoxynucleosides and nucleosides in DNA digests. *Analytical Biochemistry* 374, 378–385.
- Aljanabi, S.M., Martinez, I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25, 4692–4693.
- Aposhian, H.V., 1997. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 37, 397–419.
- Baccarelli, A., Bollati, V., 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Current Opinion in Pediatrics* 21, 243–251.
- Bierkens, J., Klein, G., Corbisier, P., Van Den Heuvel, R., Verschaeve, L., Weltens, R., Schoeters, G., 1998. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere* 37, 2935–2947.
- Burton, D.T., Turley, S.D., Fisher, D.J., Green, D.J., Shedd, T.R., 2006. Bioaccumulation of total mercury and monomethylmercury in the earthworm *Eisenia fetida*. *Water Air & Soil Pollut* 170, 37–54.
- Button, M., Jenkin, G.R., Bowman, K.J., Harrington, C.F., Brewer, T.S., Jones, G.D., Watts, M.J., 2010. DNA damage in earthworms from highly contaminated soils: assessing resistance to arsenic toxicity by use of the comet assay. *Mutation Research* 696, 95–100.
- Button, M., Jenkin, G.R., Harrington, C.F., Watts, M.J., 2009. Arsenic biotransformation in earthworms from contaminated soils. *Journal of Environmental Monitoring* 11, 1484–1491.
- Cabanero Ortiz, A.L., Madrid Albarran, Y., Camara Rica, C., 2002. Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17, 1595–1601.
- Davis, C.D., Uthus, E.O., 2004. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood) 229, 988–995.
- Day, J.A., Montes Bayon, M., Vonderheide, A., Caruso, J.A., 2002. A study of method robustness for arsenic speciation in drinking water samples by anion exchange HPLC-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373, 664–668.
- Delcuve, G.P., Rastegar, M., Davie, J.R., 2009. Epigenetic control. *Journal of Cell Physiology* 219, 243–250.
- Dopp, E., Hartmann, L.M., Florea, A.M., Rettenmeier, A.W., Hirner, A.V., 2004a. Environmental distribution, analysis, and toxicity of organometal(loid) compounds. *Critical Reviews in Toxicology* 34, 301–333.
- Dopp, E., Hartmann, L.M., Florea, A.M., von Recklinghausen, U., Pieper, R., Shokouhi, B., Rettenmeier, A.W., Hirner, A.V., Obe, G., 2004b. Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 20, 156–165.
- Ernst, G., Zimmermann, S., Christie, P., Frey, B., 2008. Mercury, cadmium and lead concentrations in different ecophysiological groups of earthworms in forest soils. *Environmental Pollution* 156, 1304–1313.
- Espinosa-Reyes, G., Ilizaliturri, C.A., Gonzalez-Mille, D.J., Costilla, R., Diaz-Barriga, F., Del Carmen Cuevas, M., Martinez, M.A., Mejia-Saavedra, J., 2010. DNA damage in earthworms (*Eisenia* spp.) as an indicator of environmental stress in the industrial zone of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 45, 49–55.
- Ferguson, L.R., Karunasinghe, N., Philpott, M., 2004. Epigenetic events and protection from colon cancer in New Zealand. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 44, 36–43.
- Fourie, F., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2007. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 361–368.
- Furst, A., 2002. My saga with earthworms. *Food and Chemical Toxicology* 40, 789–791.
- Gavilan-Garcia, I., Santos-Santos, E., Tovar-Galvez, L.R., Gavilan-Garcia, A., Suarez, S., Olmos, J., 2008. Mercury speciation in contaminated soils from old mining activities in Mexico using a chemical selective extraction. *Journal of the Mexican Chemical Society* 52, 263–271.

- Heitkemper, D.T., Vela, N.P., Stewart, K.R., Westphal, C.S., 2001. Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and induced plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16, 299–306.
- Hinton, J.J., Veiga, M.M., Norman, B.K., 2009. Using earthworms to assess Hg distribution and bioavailability in gold mining soils. *Journal of Soil and Sediment Contamination* 18, 512–524.
- Hirano, T., Tamae, K., 2010. Heavy metal-induced oxidative DNA damage in earthworms: a review. *Applied and Environmental Soil Science*. doi:10.1155/2010/726946.
- Issaro, N., Abi-Ghanem, C., Bermond, A., 2009. Fractionation studies of mercury in soils and sediments: a review of the chemical reagents used for mercury extraction. *Analytica Chimica Acta* 631, 1–12.
- Jensen, T.J., Novak, P., Wnek, S.M., Gandolfi, A.J., Futscher, B.W., 2009. Arsenicals produce stable progressive changes in DNA methylation patterns that are linked to malignant transformation of immortalized urothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 241, 221–229.
- Kojima, C., Ramirez, D.C., Tokar, E.J., Himeno, S., Drobna, Z., Styblo, M., Mason, R.P., Waalkes, M.P., 2009. Requirement of arsenic biomethylation for oxidative DNA damage. *Journal of the National Cancer Institute* 101, 1670–1681.
- Landero Figueroa, J.A., Wrobel, K., Afton, S., Caruso, J.A., Gutiérrez-Corona, J.F., Wrobel, K., 2008. Effect of some heavy metals and soil humic substances on the phytochelatin production in wild plants from silver mine areas of Guanajuato, Mexico. *Chemosphere* 70, 2084–2091.
- Langdon, C.J., Meharg, A.A., Feldmann, J., Balgar, T., Chamock, J., Farquhar, M., Pearce, T.G., Semple, K.T., Cotter-Howells, J., 2002. Arsenic-speciation in arsenate-resistant and non-resistant populations of the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Journal of Environmental Monitoring* 4, 603–608.
- Langdon, C.J., Pearce, T.G., Feldmann, J., Semple, K.T., Meharg, A.A., 2003a. Arsenic speciation in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrodrilus rubidus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1302–1308.
- Langdon, C.J., Pearce, T.G., Meharg, A.A., Semple, K.T., 2003b. Interactions between earthworms and arsenic in the soil environment: a review. *Environmental Pollution* 124, 361–373.
- Li, M., Liu, Z., Xu, Y., Cui, Y., Li, D., Kong, Z., 2009. Comparative effects of Cd and Pb on biochemical response and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* (*Ameletidae*, *Oligochaeta*). *Chemosphere* 74, 621–625.
- Ma, W.K., Smith, B.A., Stephenson, G.L., Siciliano, S.D., 2009. Development of a simulated earthworm gut for determining bioaccessible arsenic, copper, and zinc from soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 1439–1446.
- Maldonado Santoyo, M., Landero Figueroa, J.A., Wrobel, K., Wrobel, K., 2009. Analytical speciation of mercury in fish tissues by reversed phase liquid chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry with Bi³⁺ as internal standard. *Talanta* 79, 706–711.
- Mellor, J., Dudek, P., Clynes, D., 2008. A glimpse into the epigenetic landscape of gene regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* 18, 116–122.
- Nakashima, T., Okada, T., Asahi, J., Yamashita, A., Kawai, K., Kasai, H., Matsuno, K., Gamou, S., Hirano, T., 2008. 8-Hydroxydeoxyguanosine generated in the earthworm *Eisenia fetida* grown in metal-containing soil. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 654, 138–144.
- Nei, L., Kruusma, J., Ivask, M., Kuu, A., 2009. Novel approaches to bioindication of heavy metals in soils contaminated by oil shale wastes. *Oil Shale* 26, 424–431.
- Pilsner, J.R., Hall, M.N., Liu, X., Ahsan, H., Ilievski, V., Slavkovich, V., Levy, D., Factor-Litvak, P., Graziano, J.H., Gamble, M.V., 2011. Associations of plasma selenium with arsenic and genomic methylation of leukocyte DNA in Bangladesh. *Environmental Health Perspectives* 119, 113–118.
- Pilsner, J.R., Lazarus, A.L., Nam, D.H., Letcher, R.J., Sonne, C., Dietz, R., Basu, N., 2010. Mercury-associated DNA hypomethylation in polar bear brains via the luminometric methylation assay: a sensitive method to study epigenetics in wildlife. *Molecular Ecology* 19, 307–314.
- Plytycz, B., Homa, J., Aziz, A.N., Molnar, L., Kille, P., Morgan, A.J., 2007. Earthworms for monitoring metal contamination: from cells to molecules. *Environmental Pollution: New Research*, 47–98.
- Rahtkens, K., von der Trenck, K.T., 2007. Heavy metals in earthworms of Baden–Württemberg's results from a long-term investigation with ecotoxicological evaluation. *Texte – Umweltbundesamt* 34–07, 121–141.
- Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2004. The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46, 208–215.
- Reis, A.T., Rodrigues, S.M., Davidson, C.M., Pereira, E., Duarte, A.C., 2010. Extractability and mobility of mercury from agricultural soils surrounding industrial and mining contaminated areas. *Chemosphere* 81, 1369–1377.
- Salnikow, K., Zhitkovich, A., 2008. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic and chromium. *Chemical Research in Toxicology* 21, 28–44.
- Scott-Fordsmand, J.J., Weeks, J.M., 2000. Biomarkers in earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 165, 117–159.
- Steinberg, C.E.W., Stürzenbaum, S.R., Menzel, R., 2008. Genes and environment—striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. *Science of the Total Environment* 400, 142–161.
- Suthar, S., 2008. Metal remediation from partially composted distillery sludge using composting earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 1099–1106.
- Sutherland, J.E., Costa, M., 2003. Epigenetics and the environment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 983, 151–160.
- Thayer, J.S., 2002. Review: biological methylation of less studied elements. *Journal of Inorganic Biochemistry* 16, 677–691.
- Tischer, S., 2009. Earthworms (*Lumbricidae*) as bioindicators: the relationship between in-soil and in-tissue heavy metal content. *Polish Journal of Ecology* 57, 513–523.
- Vahter, M., 2008. Health effect of early life exposure to arsenic. *BCPT (Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology)* 102, 204–211.
- Vandecasteele, B., Samyn, J., Quataert, P., Muys, B., Tack, F.M.G., 2004. Earthworm biomass as additional information for risk assessment of heavy metal bio-magnification: a case study for dredged sediment-derived soils and polluted floodplain soils. *Environmental Pollution* 129, 363–375.
- Veltman, K., Huijbregts, M.A.J., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M., Hobbelen, P.H.F., Koolhaas, J.E., van Gestel, C.A.M., van Vliet, P.C.J., Hendriks, A.J., 2007. Metal accumulation in the earthworm *Lumbricus rubellus*. Model predictions compared to field data. *Environmental Pollution* 142, 428–436.
- Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Miermans, C.J.H., van Gestel, C.A.M., 2007. Metal accumulation in earthworms inhabiting floodplain soils. *Environmental Pollution* 148, 132–140.
- Watts, M.J., Button, M., Brewer, T.S., Jenkin, G.R.T., Harrington, C.F., 2008. Quantitative arsenic speciation in two species of earthworms from a former mine site. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 753–759.
- Wrobel, K., Wrobel, K., Caruso, J.A., 2005. Pretreatment procedures for characterization of arsenic and selenium species in complex samples utilizing coupled techniques with mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381, 317–331.
- Wrobel, K., Wrobel, K., Caruso, J.A., 2009. Epigenetics: an important challenge for ICP-MS in metallomics studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 481–486.
- Zhang, Z.S., Zheng, D.M., Wang, Q.C., Guo, X., 2009. Bioaccumulation of total and methyl mercury in three earthworm species (*Drawida* sp., *Allolobophora* sp., and *Limnodrilus* sp.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83, 937–942.
- Zheng, R., Li, C., 2009. Effect of lead on survival, locomotion and sperm morphology of Asian earthworm, *Pheretima guillelmi*. *Journal of Environmental Sciences (China)* 21, 691–695.
- Zhou, X., Sun, H., Ellen, T.P., Chen, H., Costa, M., 2008. Arsenite alters global histone methylation. *Carcinogenesis*.

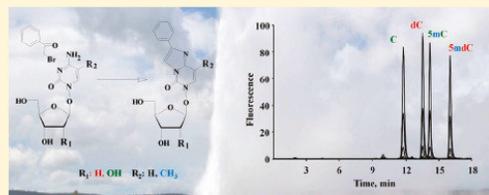
Selective Derivatization of Cytosine and Methylcytosine Moieties with 2-Bromoacetophenone for Submicrogram DNA Methylation Analysis by Reversed Phase HPLC with Spectrofluorimetric Detection

Adolfo Lopez Torres, Eunice Yanez Barrientos, Katarzyna Wrobel, and Kazimierz Wrobel*

Department of Chemistry, University of Guanajuato, L de Retana No. 5, 36000 Guanajuato, Mexico

Supporting Information

ABSTRACT: In eukaryotes, actual DNA methylation patterns provide biologically important information, for which both, genome-wide and locus-specific methylation at cytosine residues have been extensively studied. The original contribution of this work relies on the selective derivatization of cytosine moieties with 2-bromoacetophenone for the determination of global DNA methylation by reversed phase high performance liquid chromatography with spectrofluorimetric detection. The important features of the proposed procedure are as follows: (1) no need for the elimination of RNA, (2) detection limits for cytidine, 2'-deoxycytidine, 5-methylcytidine, and 5-methyl-2'-deoxycytidine in the range of 14.4–22.7 fmol, (3) feasibility for the detection of 0.06% of methylation in a low amount of DNA (80 ng), (4) potential viability for the evaluation of RNA methylation, and (5) relative simplicity in terms of analytical instrumentation and personnel training. The results obtained in the analysis of salmon testes DNA and nucleic acids from plant, human blood, and earthworms demonstrate the utility of the proposed procedure in biological studies and, in particular, for evaluation of the potential effect of environmental factors on actual DNA methylation in different types of living organisms.



Epigenetics is a fast expanding research area centered at the study of stable, heritable phenotypes that result from changes in chromosomes without modification of the DNA sequence.¹ Epigenetic regulation is critical for eukaryotes development and cellular differentiation, and it is believed that epigenetic phenomena might contribute to the evolutionary processes. On the other hand, epigenetic misregulation has been associated with the pathogenesis of various human diseases and with the exposure of different organisms to environmental conditions. Reversible methylation of DNA, occurring at carbon 5 position of the pyrimidine ring in cytosine residues, is the best characterized epigenetic event. The putative role of DNA methylation in fine-tuning or establishing gene expression patterns has triggered a high demand for reliable measurements of both, occurrence and localization of methylated cytosines in the genome.^{2–5} Extensive studies have been carried out in different cell lines, animal models, plants, fungi, and insects.^{6,7} In particular, global DNA methylation defined as a percentage of methylated cytosine residues has been accepted as a potential biomarker of large scale epigenetic events, particularly useful for disease diagnosis and prognostics as well as to study the response of various organisms to environmental conditions.^{8–14}

Global DNA methylation is usually analyzed by capillary electrophoresis (CE) or high performance liquid chromatography (HPLC).^{2,15,16} In principle, CE offers the advantages of simplicity, high resolution, and fast and low-cost separations; yet, chemical composition of the injected solution must be carefully observed, and a high sensitivity detection system is required.^{17,18}

In the applications of this technique, DNA was hydrolyzed to nucleobases, deoxynucleosides, or deoxynucleotides; the UV detection was carried out at 256, 277, or 280 nm,^{17–20} and multiple reaction monitoring (MRM) mode mass spectrometric detection was also reported.²¹ Laser-induced fluorescence detection was exploited after labeling 5'-phosphate or 3'-phosphate groups in deoxynucleotides with 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionyl ethylene diamine hydrochloride (BODIPY FL EDA).^{22–24} In the above cited studies, the lowest sample size requirements were reported in the range of 0.5–10 μ g of DNA.

Even though liquid chromatography procedures involve longer separation time and relatively larger sample amount with respect to CE, this technique has been preferentially used due to its highly quantitative character and excellent reproducibility. The surveys over HPLC procedures can be found elsewhere.^{15,16,25,26} Systematic studies were carried out focusing on both, sample preparation and separation conditions.^{15,27,28} In the common approach, enzymatic hydrolysis of DNA is carried out and the released deoxynucleosides are separated by reversed phase^{15,16,29,30} or cation exchange HPLC.²⁷ Only a few procedures were based on deoxynucleotides separation, due to their relatively high polarity conferred by phosphate groups.^{31–33} Alternatively, DNA can be hydrolyzed with formic acid to nucleobases; however, the complete elimination of

Received: August 8, 2011

Accepted: September 9, 2011

Published: September 09, 2011

RNA is then required.³⁴ With UV spectrophotometric detection, the baseline separation of five DNA components has to be achieved and 1–10 μg of DNA is usually needed.^{27,33} In some studies, the separation of both, deoxynucleosides and nucleosides, was reported with total chromatographic run of 4.5–25 min, depending on the column selection and the elution conditions.^{15,28,33} Mass spectrometric detection has been extensively used in the analysis of DNA methylation by HPLC, since it offers exceptional selectivity and sensitivity.^{16,26,34} In the recent studies, shorter length columns and MRM detection have been employed, thus enabling for short chromatographic runs (1–7 min) and for lowering the DNA requirement to the amounts below 0.1 μg .^{26,30} It should be stressed, however, that, in such approach, sample cleanup becomes critical and it is mandatory to use adequate internal standards in order to compensate for possible changes in ionization efficiency.

Pre-column fluorescent labeling is a well established and a powerful tool in liquid chromatography (HPLC-FLD). In many cases, high selectivity and sensitivity can be achieved by the selection of suitable label(s) as well as the excitation/emission wavelengths, which allows for detection limits comparable to those typically obtained with MS/MS detection. Additionally, fluorescence signal is usually not affected by coeluting nonderivatized compounds. As already commented before, BODIPY FL EDA was used as a tag of nucleotide phosphorus group in CE separation schemes,^{22–24} yet fluorescence derivatization has not been explored as a detection system in HPLC analysis of global methylation of genomic DNA.

2-Bromoacetophenone was reported to form fluorescent derivatives of cytosine- and adenine-containing compounds and used for the determination of antiviral nucleotides and nucleosides by HPLC-FLD.³⁵ Recently, this same reagent was used for comparative purposes while examining the selectivity of uracil reaction with benzamidoxime and $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ in alkaline medium.³⁶

The intent of this work was to investigate systematically the reaction conditions and to evaluate selectivity of 2-bromoacetophenone toward 5-methyl-2'-deoxycytidine (SmdC), 2'-deoxycytidine (dC), 5-methylcytidine (SmC), cytidine (C), deoxyadenosine (dA), and adenosine (A) in order to establish a new HPLC-FLD procedure that would allow one to quantify the percentage of methylated cytosines in submicrogram amounts of genomic DNA and that might be potentially useful in the analysis of RNA methylation.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Samples. All chemicals were of analytical reagent grade. Deionized water (18.2 M Ω cm, Labconco, USA) and HPLC-grade methanol, acetonitrile (ACN), dimethylformamide (DMF), dimethyl sulfoxide (DMSO), isopropanol, and 1,4-dioxane (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) were used throughout.

The standards of deoxynucleosides (2'-deoxycytidine (dC), 2'-deoxyadenosine (dA), 2'-deoxyguanosine (dG), thymidine (T)), nucleosides (cytidine (C), adenosine (A), guanosine (G), uridine (U)), 5-methyl-2'-deoxycytidine (SmdC), and 5-methylcytidine (SmC) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Derivatization reagent, 2-bromoacetophenone, and DNA sodium salt from salmon testes were also from Sigma.

Other Sigma analytical grade reagents were glacial acetic acid, trifluoroacetic acid (TFA), sodium hydroxide, sodium sulfate anhydrous, sodium dodecyl sulfate, ammonium phosphate dibasic, phosphoric acid, hydrochloric acid, sodium acetate, zinc sulfate,

magnesium chloride, sodium chloride, calcium chloride, glycine, proteinase K, DNase I, nuclease P1, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), and tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl). Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) was from New England Biolabs.

Two week-old garden cress plants (*Lepidium sativum*) grown hydroponically in Hoagland nutrient solution in the presence of 0.5 mg/L Cd(II) as cadmium chloride and the biomass of nonexposed plants³⁷ were analyzed. Earthworms were collected in Guanajuato, central Mexico, and prepared for DNA extraction as described elsewhere.³⁸ A blood sample from a healthy volunteer was collected in heparinized tube and stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Nucleic Acids Extraction and Hydrolysis. The aliquots of each sample: 10 μL for whole blood, 100 mg of earthworm homogenate, or 100 mg of fresh plant tissue were taken, and DNA extraction was carried out according to Aljanabi and Martinez.³⁹ In brief, each sample was homogenized with 400 μL of buffer containing sodium chloride (0.4 M), EDTA (2 mM), Tris-HCl (10 mM) at pH 8 (polythron). Afterward, 40 μL of sodium dodecyl sulfate (20%, m/v) and 8 μL of proteinase K (20 mg/mL) were added; the mixture was incubated for 1 h at $60\text{ }^\circ\text{C}$. Sodium chloride (300 μL , 6 M) was added, and the sample was centrifuged at 10 000g for 30 min. The supernatant was collected; 500 μL of isopropanol was added, and the sample was kept at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for 1 h to complete precipitation. Finally, the sample was centrifuged (10 000g, 20 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$); the supernatant was eliminated, and the pellet was washed with 500 μL of ethanol (70%), dried, and reconstituted in 50 μL of deionized water. For each extract, the absorption spectrum was acquired in the wavelength range of 220–350 nm (Spectronic 3000, Milton Roy, Co. Ltd.), and the absorbance ratio 260/280 nm was evaluated, considering the values between 1.7 and 1.9, indicative for nucleic acids purity.^{40,41} The concentration was determined by measuring absorbance at 260 nm; the evaluated extraction yield was in the range of 50–200 ng of nucleic acids per mg of sample (10–20 μg per mL of whole blood). The obtained extracts were kept at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ prior to their analysis.

Each extract was appropriately diluted; the aliquot containing 25 ng to 1 μg of DNA was brought to a volume 42 μL with deionized water, and 5 μL of the hydrolysis buffer was added (acetic acid (200 mM), glycine (200 mM), magnesium chloride (50 mM), zinc chloride (5 mM), calcium chloride (2 mM), pH 5.3). The sample was incubated with 0.2 μL of DNase I (10 U/ μL) and 0.2 μL of nuclease P 1 (1 U/ μL) at $37\text{ }^\circ\text{C}$ overnight and then heated in a boiling water bath for 5 min and cooled rapidly on ice to avoid possible contamination by microorganisms. Afterward, sodium hydroxide (5 μL , 100 mM) was added together with 0.2 μL of alkaline phosphatase 1 U/ μL , and the sample was again incubated at $37\text{ }^\circ\text{C}$ for 2 h. Such prepared samples were kept at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until needed.²⁷

Derivatization Reaction. For establishing the reaction conditions, individual standard solutions containing 645 ng/mL of C, dC, SmC, SmdC, G, dG, T, U, A, or dA were used. The analytical parameters for C, dC, SmC, and SmdC were evaluated using a series of mixed standard solutions prepared by appropriate dilution of the stock. For the determination of global DNA methylation, the set of calibration solutions was prepared by varying concentration levels of dC and SmdC to attain different molar ratio dC/SmdC. The derivatization was carried out directly in HPLC autosampler amber vials, and up to 28 samples were processed in parallel. Specifically, an aliquot of standard solution or DNA hydrolyzate was placed in the 350 μL insert in the amber vial; the

volume was brought to about 60 μL with deionized water, and the sample was evaporated (SpeedVac Vacufuge plus, Eppendorf, 2 000 rpm, 60 $^{\circ}\text{C}$, 20 min). The residue was reconstituted in 130 μL of DMF (anhydrous) with addition of 5 μL of glacial acetic acid. Afterward, 20 μL of 2-bromoacetophenone (0.5 M in DMF anhydrous) and sodium sulfate (anhydrous) were added, and the mixture was heated at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 90 min; at this stage, the samples were protected from light. Finally, the vials were placed in the autosampler compartment.

HPLC-FLD Procedure. Liquid chromatography separations were carried out using an Agilent Series 1200 liquid chromatographic system equipped with a quaternary pump, a well plate autosampler, and a spectrofluorimetric detector, controlled by Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The chromatographic column was Ascentis Express C18 (150 \times 3 mm, 2.7 μm) from Supelco, with precolumn C18 from Phenomenex. Prior to injection, the derivatized samples were automatically diluted 1:1 with deionized water, and the injection volume was set at 20 μL . The column temperature was maintained at 30 $^{\circ}\text{C}$ using a column oven, and four mobile phases were used: water (A), acetonitrile (B), TFA 0.4% m/v (C), and methanol (D). The separation was achieved with the following gradient program: 0–2 min 62% A, 5% B, 13% C, 20% D; 2–9 min 49% A, 10% B, 13% C, 28% D; 9–13 min 47% A, 12% B, 13% C, 28% D; 13–16 min 12% A, 15% B, 13% C, 60% D with the total flow rate 0.35 mL/min. Fluorimetric detection was carried out at excitation/emission wavelengths of 306/378 nm, respectively.

For individual compounds, the calibration range was 1.61–645 ng/mL (as injected to the column, see Figure 1S and Table 1S in the Supporting Information for the detailed procedure) and linear regression functions were obtained on the basis of peak area measurements. For the determination of DNA methylation, the calibration solutions contained the following molar ratios dC to 5mdC: 210, 106, 42.6, 21.3, 10.6, 5.32, 4.26 and the ratio between dC and 5mdC peak areas was used as analytical signal mode ($S = A_{dC}/A_{5mdC}$).

HPLC-DAD Procedure. The procedure reported previously was used for comparative purposes (details given in the Supporting Information).^{15,38}

Statistical Analysis. Descriptive statistics was performed to obtain means and standard deviations. ANOVA was used to compare the mean values obtained for global DNA methylation using two different analytical procedures. Significance level was established at $p < 0.05$. The software used was Statistica for Windows (Statsoft Inc., Tulsa, OK).

RESULTS AND DISCUSSION

The original idea of this work was to employ 2-bromoacetophenone as a fluorescent tag of cytosine moieties for the determination of global DNA methylation by HPLC-FLD (derivatization reaction shown schematically in the Supporting Information, Figure 2S). The earlier application of this compound focused the determination of antiviral drugs, and the reaction conditions were optimized for cidofovir ((*S*)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine),³⁵ without considering the full list of deoxynucleosides, nucleosides, 5-methyl-2'-deoxycytidine, and 5-methylcytidine, all of them potentially present in nucleic acids digest. It was important though to select cautiously both the reaction and detection conditions to attain the required selectivity and sensitivity.

Method Development. In the preliminary experiments, individual compounds were derivatized according to the procedure described by Eisenberg et al.³⁵ The fluorescence signals were observed for C, dC, 5mC, and 5mdC but not for G, dG, A, dA, T, and U. The maxima of excitation and emission spectra of four cytosine-containing compounds corresponded to 306 and 378 nm, respectively; these wavelengths were selected for further work (Figure 3S in the Supporting Information shows fluorescence spectra for 5mdC). Quite importantly, the obtained derivatives were very sensitive to light, so the reaction was performed in amber vials. Even with the light protection, fluorescence signals were not stable, for which the composition of solvents, concentration of reagents, and temperature and time of reaction were systematically studied. The solvents examined as the reaction medium were acetonitrile, methanol, 1,4-dioxane, dimethylsulfoxide, and dimethylformamide; the latter was selected for further experiments based on the relatively highest signal magnitudes obtained for four compounds of interest. Since standard solutions were prepared in deionized water, this solvent was also considered and it was found that water elimination was essential for signal stability; DMF anhydrous was used throughout, and a tiny amount of sodium sulfate anhydrous was always added to the reaction mixture. In Figure 1a,b, the effects of acetic acid and 2-bromoacetophenone concentrations on the 5mdC fluorescence signal are presented, while Figure 1c shows the influence of temperature and time of reaction; the results obtained for dC, 5mC, and C are not presented since they were practically identical as for 5mdC. According to the signal magnitude, the conditions selected were 0.56 M acetic acid, 65 mM 2-bromoacetophenone, temperature of 80 $^{\circ}\text{C}$, and the reaction time of 90 min (the detailed derivatization procedure given in Material and Methods). The obtained derivatives were stable for at least 3 days.

Derivatization with 2-bromoacetophenone modified 5mdC, 5mC, and C polarities and caused their increased retention on reversed phase column. To achieve baseline resolution within reasonable time, the Ascentis Express C18 column was used. On the basis of the previous reports,^{15,35} different proportions of trifluoroacetic acid, water, acetonitrile, and methanol were examined as the mobile phases. For the selection of separation conditions, the mixed standard solution containing C, dC, 5mC, 5mdC, G, dG, A, dA, T, and U (64.5 ng/mL each) was used. Even though the G, dG, A, dA, T, and U were not labeled under the derivatization conditions, nor detected at 306/378 nm, their presence was considered important to make the chemical matrix as close as possible to the real nucleic acids samples. Gradient program, total flow rate, and column temperature were assessed as a result of systematic experiments, aiming to achieve short separation time, acceptable retention factors, and the high peak purity. The detailed final conditions are given in the experimental section and, in Figure 2a, five chromatograms corresponding to five concentration levels of each compound are shown. As can be observed, the baseline separation of four fluorescent compounds was achieved within 18 min with the elution order cytidine, 2'-deoxycytidine, 5-methylcytidine, and 5-methyl-2'-deoxycytidine (as 2-bromoacetophenone derivatives). The acceptable retention factors were obtained (5.2, 6.1, 6.4, and 7.3, respectively), and the peak purity evaluated for each compound was always higher than 0.9997 ($\lambda_{\text{exc}} = 306 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 320\text{--}450 \text{ nm}$). It should be noted that no other chromatographic peaks with concentration-dependent intensities were detected, thus confirming selectivity of the procedure toward cytosine-containing compounds.

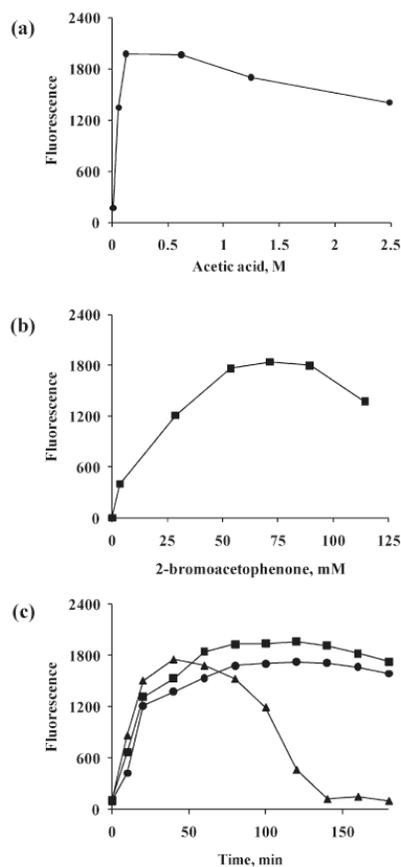


Figure 1. Influence of (a) acetic acid concentration; (b) 2-bromoacetophenone concentration; (c) reaction temperature (—●—, 60 °C; —■—, 80 °C; —▲—, 100 °C) and time on the signal magnitude of 5mdC (645 ng/mL).

Calibration Procedures and Evaluation of Analytical Figures of Merit. In the first approach, calibration was performed for each of four compounds, as described in Materials and Methods, and the evaluated parameters are summarized in Table 1. Good reproducibility of retention times were obtained for all four compounds, with interday relative standard deviations not exceeding 0.25%. Slight differences in sensitivities were observed (Table 1); apparently, the presence of a methyl group caused a small decrease of fluorescence signal (calibration slopes for 5mC and 5mdC lower than those for C and dC). On the other hand, the changing composition of mobile phase during gradient elution was possibly affecting the fluorescence signal of the eluted compounds. Within the calibration range of 1.6–645 ng/mL, the linearity of regression functions was excellent ($r^2 > 0.9999$), and it should be mentioned that higher concentrations (>645 ng/mL) could also be included after decreasing the photomultiplier gain setting. The detection limits were in the range of 14.4–22.7 fmol on-column, and the variation coefficients obtained for five

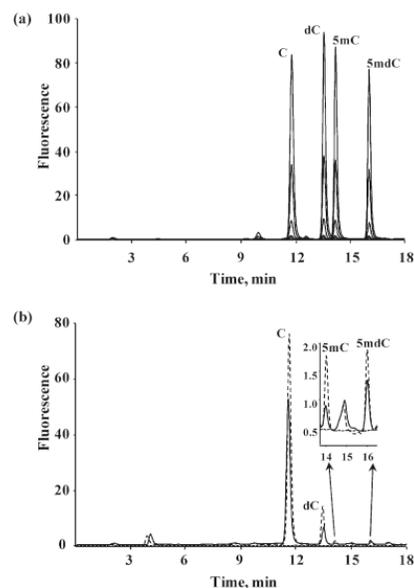


Figure 2. Reversed phase chromatograms obtained by the proposed HPLC-FLD procedure: (a) calibration solutions containing cytidine (C), 2'-deoxycytidine (dC), 5-methylcytidine (5mC), 5-methyl-2'-deoxycytidine (5mdC), and nonderivatized nucleosides A, dA, G, and dG, each at the concentration levels 0, 1.61, 3.22, 16.1, 64.5, and 161 ng/mL, respectively; (b) nucleic acids digest from nonexposed to Cd(II) *L. Sativum* without (—) and with (---) addition of C, dC, 5mC, 5mdC (64.5, 16.1, 1.61, and 1.61 ng/mL, respectively).

repeated injections of the mixed standard solutions were 2.99–3.36% for 1.61 ng/mL and 0.81–0.89% for 323 ng/mL. These results indicate that the proposed procedure enables for selective and sensitive quantification of individual cytosine-containing compounds in nucleic acid digests and for the determination of global DNA methylation.

In the recent study, in which ultraperformance liquid chromatography coupled with tandem MS/MS multiple reaction monitoring mode was used, Wang et al. reported that with 5 ng DNA the evaluation of 0.16% global methylation was possible (based on $S/N = 3$).³⁰ Using similar estimation, on the basis of the detection limit for 5mdC (0.38 ng/mL or 1.58 nM) and the highest concentration of dC used for calibration (645 ng/mL or 2.84 μ M), the lowest percentage of methylation attainable by the proposed here procedure would be 0.06% and the required amount of DNA was 80 ng. Accordingly, the detection of 0.15% of methylation would be possible with as low amounts of DNA as 27 ng, indicating the feasibility of HPLC-FLD for the determination of DNA methylation in submicrogram DNA samples.

Calibration functions obtained for 5mdC and dC can be used to evaluate global methylation defined as molar ratio $5mdC / (5mdC + dC) \cdot 100\%$.^{15,17,18,29,34} If the detection system provides compound-independent sensitivity, the external calibration is not required and the percentage of methylation can be obtained directly from peak area measurements, as demonstrated by ICPMS detection at ³¹P in reversed phase separation of deoxynucleoside monophosphates.³² Another possible approach is to perform calibration by plotting the

Table 1. Analytical Figures of Merit Evaluated for 2'-Deoxycytidine (dC), 5-Methyl-2'-deoxycytidine (5mdC), Cytidine (C), and 5-Methylcytidine (5mC) in the Proposed HPLC-FLD Procedure^a

Parameter	C	dC	5mC	5mdC
$T_{\text{ret}} \pm \text{SD}$, min	11.78 \pm 0.03	13.55 \pm 0.02	14.18 \pm 0.02	16.03 \pm 0.02
k	5.2	6.1	6.4	7.3
Calibration function	$A = 332.7c + 0.5$	$A = 325.7c + 0.6$	$A = 312.8c + 0.7$	$A = 301.3c + 0.1$
Std. error for slope	1.74	1.99	2.09	1.89
Std error for intercept	2.7	3.1	3.3	2.9
R^2	0.99997	0.99993	0.99995	0.99994
Calibration function	$A = 1.368C + 0.002$	$A = 1.433C + 0.003$	$A = 1.216C + 0.003$	$A = 1.249C + 0.001$
LD, ng/mL	0.24	0.25	0.29	0.38
LD, fmol	14.4	15.3	16.6	22.7
CV, % (1.61 ng/mL)	3.30	3.25	3.36	2.99
CV, % (323 ng/mL)	0.82	0.89	0.82	0.81

^a $T_{\text{ret}} \pm \text{SD}$: retention time with respective interday standard deviation ($n = 5$); k : retention factor; calibration function: linear regression relating analyte concentration (c : ng/mL; C : nM) in the injected solution with the corresponding peak area (A); LD: detection limit based on $S/N = 3$, expressed as ng/mL or fmol of analyte as injected to the column; CV: variation coefficient for $n = 5$.

ratio of signal intensities 5mdC/dG against their known molar ratio.^{16,26,30,38} Since the sensitivity of fluorescence detection was not identical for 5mdC and for dC (Table 1) and dG could not be detected by the HPLC-FLD procedure, another simplified calibration was designed. Specifically, a series of solutions containing known molar ratios dC to 5mdC (R_m) was prepared, and the ratio between their peak areas was used as analytical signal mode ($S = A_{\text{dC}}/A_{\text{5mdC}}$). For each calibration point, two solutions with different dC and 5mdC concentrations but identical molar ratio were prepared and each was analyzed in triplicate. A mean S value from six chromatographic runs was taken as analytical signal, and the relative standard deviation did not exceed 1%. Linear regression calibration $S = 1.0729R_m + 0.1721$ with $R^2 = 0.9999$ was obtained, and the percentage of methylation was then calculated as $[1/(1 + R_m)] \cdot 100\%$. The calibration range (R_m of 2.10–4.26) corresponded to the values of cytosine methylation from 0.47% to 19.0% (the calibration details presented in Table 1S and in Figure 4S in the Supporting Information). This procedure was used for the determination of DNA methylation in DNA from salmon testes and in the biological samples.

Finally, it is worth mentioning that the procedure proposed here could be applied for the assessment of RNA methylation, on the basis of C and 5mC signals. Methylation of small noncoding RNA on cytosine residues has often been reported, yet its biological role remains unclear.⁴² Further studies are in progress focusing on RNA extraction and hydrolysis prior to HPLC-FLD analysis in order to provide biologically relevant information.

Analysis of Biological Samples. The procedure was first tested by analyzing DNA from salmon testes in the mass range of 25–200 ng. In Figure 3a, the chromatograms presented are obtained for three amounts of DNA, and Figure 3b shows the respective chromatographic peak areas for 5mdC together with the evaluated percentage of DNA methylation. On the basis of three independent replicates of each sample, the percentage methylations obtained for 25, 50, 100, and 200 ng of DNA were 6.942 ± 0.188 , 6.984 ± 0.016 , 6.942 ± 0.001 , and 6.957 ± 0.006 , respectively, confirming a potential of the proposed procedure for the submicrogram analysis of DNA methylation.

In further development, the extracts from plant *Lepidium sativum*, earthworm, and human blood were analyzed as described in Materials and Methods. To further prove the selectivity toward

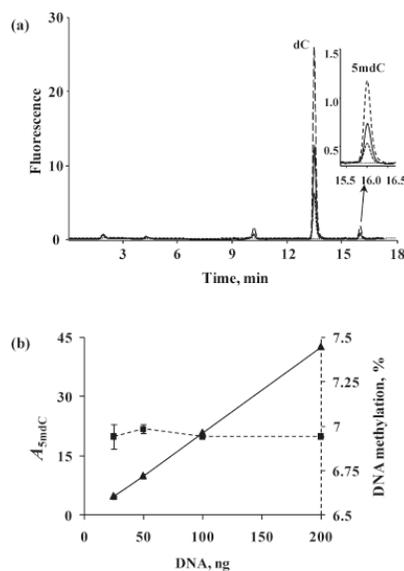


Figure 3. HPLC-FLD analysis of salmon testes DNA digest: (a) reversed phase chromatograms obtained for 25 ng (---), 50 ng (—), and 100 ng (---) of DNA (chromatogram of blank shown as dotted line); (b) peak areas obtained for 5-methyl-2'-deoxycytidine ($A_{5\text{mdC}}$) from different amounts of DNA and the evaluated percentage of global methylation (respective standard deviations for three independent experiments are shown).

cytosine-containing deoxynucleosides and nucleosides, RNase was not used and all biological samples contained both, DNA and RNA. In Figure 2b, the chromatogram of plant nucleic acids digest is presented (approx. 25 ng of DNA), where the elution of C, dC, 5mC, and 5mdC is clearly observed. Even though RNA had not been eliminated during sample treatment, the baseline resolution of cytosine-containing compounds enabled for safe evaluation of DNA methylation. In this same Figure 2b, the chromatogram obtained after standard addition is presented (64.5 ng/mL C,

Table 2. Percentage of Global Methylation in Different DNA Digests, Evaluated Using the Proposed Procedure and HPLC-DAD¹⁵

Sample	Global DNA Methylation \pm SD, % ($n = 3$)		
	HPLC-FLD		HPLC-DAD
	1 ^a	2 ^b	
Salmon testes	6.98 \pm 0.02	6.94 \pm 0.01	7.01 \pm 0.04
<i>L. sativum</i>	14.60 \pm 0.02	14.62 \pm 0.02	14.59 \pm 0.03
<i>L. sativum</i> exposed to Cd	12.23 \pm 0.02	12.22 \pm 0.02	12.21 \pm 0.03
Human blood	3.75 \pm 0.03	3.73 \pm 0.02	3.74 \pm 0.03
Earthworms	3.36 \pm 0.05	3.35 \pm 0.04	3.37 \pm 0.06

^a Calculated using calibration functions of the two compounds (Table 1). ^b Calculated using a simplified calibration function (ratio between dC/5mC peak areas versus their molar ratio).

16.1 ng/mL dC, 1.61 ng/mL 5mC, and 1.61 ng/mL 5mdC) and the evaluated recoveries were as follows: 99.5% C, 97.4% dC, 97.0% 5mC, and 95.6% 5mdC. In Table 2, global DNA methylation results obtained for all analyzed samples are summarized. As can be observed, the two calibration approaches described above (1: two calibration functions for dC and 5mC, respectively, and 2: one calibration function relating the peak area dC/5mC ratios to their molar ratios in the analyzed solution) provided practically identical results, confirming the capability of the designed simplified calibration (2). For comparative purposes, the samples were also analyzed by the HPLC-DAD method reported elsewhere.¹⁵ In this case, ten compounds had to be separated (5mC, 5mdC, four deoxynucleosides, and four nucleosides) and higher amounts of DNA (1–10 μ g) were required due to lower sensitivity of spectrophotometric detection of nonderivatized compounds. No statistically significant differences were observed between the results of the proposed here procedure and those obtained by chromatographic separation of nonderivatized nucleosides/deoxynucleosides with spectrophotometric detection (ANOVA, $p < 0.05$).

It should be noted that the assessed global methylation of salmon testes (Table 2) was in concurrence with the results obtained by coupling HPLC separation of deoxynucleoside monophosphates with ICPMS detection on ³¹P.³² The methylation percentage obtained for blood DNA from healthy volunteer was 3.74%, which falls within the range of 2–7%, typically reported in mammalian DNA.³⁰ On the other hand, it is well established that cytosine bases of the nuclear genome in higher plants are often extensively methylated (6–30%),^{7,43} and accordingly, the results obtained for *L. sativum* were relatively high (14.6%, Table 2). Since the exposure of other plant seedlings to cadmium had been associated with DNA hypomethylation,⁴⁴ it seemed interesting to compare HPLC-FLD methylation results for DNA of unexposed *L. sativum* with those obtained for plants grown in the presence of cadmium (0.5 mg/L Cd(II) as cadmium chloride). As can be observed in Table 2, significantly lower methylation was found in the exposed as compared to control plant (12.2% versus 14.6%), thus confirming the feasibility of the HPLC-FLD procedure for assessing differences in global methylation induced by environmental conditions.

The results obtained in the analysis of nucleic acids from different organisms demonstrate that DNA methylation can be assessed without elimination of RNA. On the other hand, these results suggest that global methylation of both, DNA and RNA,

could be attained in a single analytical run; however, specific extraction protocol focused on the desired type of ribonucleic acids that would be necessary to obtain biologically meaningful information.

CONCLUSIONS

A novel analytical procedure for reliable determination of global DNA methylation in submicrogram samples is proposed here, on the basis of the selective derivatization of cytosine moieties with 2-bromoacetophenone, their reversed phase separation, and spectrofluorimetric detection. Cautious selection of derivatization, detection, and chromatographic conditions allowed for the on-column detection limits for cytidine, 2'-deoxycytidine, 5-methylcytidine, and 5-methyl-2'-deoxycytidine in the range of 14.4–22.7 fmol. The derivatization reaction was carried out directly in autosampler vials; since the fluorescence signals of derivatized compounds were stable for at least 3 days and the chromatographic separation was achieved within 18 min, up to 28 samples could be run in parallel making the procedure attractive for a long sample series. It was estimated that 0.06% would be the minimum methylation percentage attainable for 80 ng of DNA, while 0.15% could be detected in 27 ng of DNA (without lowering the photomultiplier gain). The quantification was performed by linear regression function that relates the ratio of chromatographic peak areas A_{dC}/A_{5mC} to their molar ratio (R_m) in the set of calibration solutions. The percentage of DNA methylation was calculated as $[1/(1 + R_m)] \cdot 100\%$. The results obtained for submicrogram samples by HPLC-FLD were in agreement with those previously reported, yet a less selective and sensitive HPLC-DAD method (DNA mass 1–10 μ g). Furthermore, the results obtained for DNA in biological samples indicate the utility of the proposed procedure in studies focusing potential effect of environmental factors on actual DNA methylation in different types of living organisms. Finally, the proposed procedure might be of interest for the evaluation of RNA methylation, after refining the extraction conditions in order to obtain information specific for a desired type of ribonucleic acid.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Details of two calibration approaches, description of the reference HPLC-DAD procedure, derivatization reaction scheme and excitation/emission spectra of 5mC (Figures 1S, 2S, 3S, and 4S and Table 1S). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: (+52) 473 7327555. Fax: (+52) 473 7326252. E-mail: kazimier@ugto.mx.

ACKNOWLEDGMENT

The financial support from CONACYT (Mexico), project 49405, is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Berger, S. L.; Kouzarides, T.; Shiekhattar, R.; Shilatifard, A. *Genes Dev.* 2009, 23, 781–783.
- Fraga, M. F.; Esteller, M. *BioTechniques* 2002, 33, 632–649.
- Dahl, C.; Guldberg, P. *Biogerontology* 2003, 4, 233–250.

- (4) Vucic, E. A.; Brown, C. J.; Lam, W. L. *Pharmacogenomics* **2008**, *9*, 215–234.
- (5) Ho, S. M.; Tang, W. Y. *Reprod. Toxicol.* **2007**, *23*, 267–282.
- (6) Su, Z.; Han, L.; Zhao, Z. *Epigenetics* **2011**, *6*, 134–140.
- (7) Zhang, M.; Kimatu, J. N.; Xu, K.; Liu, B. *J. Genet. Genomics* **2010**, *37*, 1–12.
- (8) Compare, D.; Rocco, A.; Liguori, E.; D'Armiendo, F. P.; Persico, G.; Masone, S.; Coppola-Bottazzi, E.; Suriani, R.; Romano, M.; Nardone, G. *J. Clin. Pathol.* **2011**, *64*, 677–682.
- (9) Terry, M. B.; Delgado-Cruzata, L.; Vin-Raviv, N.; Wu, H. C.; Santella, R. M. *Epigenetics* **2011**, *6*, 828–837.
- (10) Guerrero-Preston, R.; Goldman, L. R.; Brebi-Mieville, P.; Ili-Gangas, C.; Lebron, C.; Witter, F. R.; Apelberg, B. J.; Hernandez-Roystacher, M.; Jaffe, A.; Halden, R. U.; Sidransky, D. *Epigenetics* **2010**, *5*, 539–546.
- (11) Kim, M.; Long, T. I.; Arakawa, K.; Wang, R.; Yu, M. C.; Laird, P. W. *PLoS One* **2010**, *5*, e9692.
- (12) Guerrero-Preston, R.; Santella, R. M.; Blanco, A.; Desai, M.; Berdasco, M.; Fraga, M. *Epigenetics* **2007**, *2*, 223–226.
- (13) Moore, L. E.; Pfeiffer, R. M.; Poscablo, C.; Real, F. X.; Kogevinas, M.; Silverman, D.; Garcia-Closas, R.; Chanock, S.; Tardon, A.; Serra, C.; Carrato, A.; Dosemeci, M.; Garcia-Closas, M.; Esteller, M.; Fraga, M.; Rothman, N.; Malats, N. *Lancet Oncol.* **2008**, *9*, 359–366.
- (14) Wright, R. O.; Schwartz, J.; Wright, R. J.; Bollati, V.; Tarantini, L.; Park, S. K.; Hu, H.; Sparrow, D.; Vokonas, P.; Baccarelli, A. *Environ. Health Perspect.* **2010**, *118*, 790–795.
- (15) Alcazar Magana, A.; Wrobel, K.; Alvarado Caudillo, Y.; Zaina, S.; Lund, G.; Wrobel, K. *Anal. Biochem.* **2008**, *374*, 378–385.
- (16) Song, L.; Smitha, R.; Kazim, J. L.; Karpf, A. R. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 504–510.
- (17) Li, M.; Hu, S. L.; Shen, Z. J.; He, X. D.; Tao, S. N.; Dong, L.; Zhu, Y. Y. *Anal. Biochem.* **2009**, *387*, 71–75.
- (18) Sotgia, S.; Carru, C.; Franconi, F.; Battista Fiori, P.; Manca, S.; Pettinato, S.; Magliona, S.; Ginanneschi, R.; Deiana, L.; Zinellu, A. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1185*, 145–150.
- (19) Fraga, M. F.; Uriol, E.; Borja Diego, L.; Berdasco, M.; Esteller, M.; Cañal, M. J.; Rodriguez, R. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1677–1681.
- (20) Zinellu, A.; Sotgia, S.; De Murtas, V.; Cossu-Rocca, P.; De Miglio, M. R.; Mironi, M. R.; Mura, A.; Uras, M. G.; Contini, M.; Deiana, L.; Carru, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 1181–1186.
- (21) Berdasco, M.; Fraga, M. F.; Esteller, M. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *507*, 23–34.
- (22) Comelius, M. G.; Wörth, C. G. C. T.; Kliem, H. C.; Wiessler, M.; Schmeiser, H. H. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2591–2598.
- (23) Hassel, M.; Cornelius, M. G.; vom Brocke, J.; Schmeiser, H. H. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 299–302.
- (24) Schiewek, R.; Wirtz, M.; Thiemann, M.; Plitt, K.; Vogt, G.; Schmitz, O. J. *J. Chromatogr. B* **2007**, *850*, 548–552.
- (25) Kouidou, S.; Kovatsi, L.; Iannou, A. *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 2268–2281.
- (26) Yang, L.; Fortin, M. C.; Richardson, J. R.; Buckley, B. *Anal. Biochem.* **2011**, *409*, 138–143.
- (27) Rozhon, W.; Baubec, T.; Mayerhofer, J.; Mittelsten Scheid, O.; Jonak, C. *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 354–360.
- (28) Johnston, J. W.; Harding, K.; Bremmer, D. H.; Souch, G.; Green, J.; Lynch, P. T.; Grout, B.; Benson, E. E. *Plant Physiol. Biochem.* **2005**, *43*, 844–853.
- (29) Sandhu, J.; Kaur, B.; Armstrong, C.; Talbot, C. J.; Steward, W. P.; Farmer, P. B.; Singh, R. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 1957–1961.
- (30) Wang, X.; Suo, Y.; Yin, R.; Shen, H.; Wang, H. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1647–1652.
- (31) Ramsahoye, B. H. *Methods* **2002**, *27*, 156–161.
- (32) Wrobel, K.; Landero Figueroa, J. A.; Zaina, S.; Lund, G.; Wrobel, K. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 609–614.
- (33) Armstrong, K. M.; Bermingham, E. N.; Bassett, S. A.; Treloar, B. P.; Roy, N. C.; Barnett, M. P. *Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 113–117.
- (34) Zhang, J. J.; Zhang, L.; Zhou, K.; Ye, X.; Liu, C.; Zhang, L.; Kang, J.; Cai, C. *Anal. Biochem.* **2011**, *413*, 164–170.
- (35) Eisenberg, E. J.; Cundy, K. C. *J. Chromatogr. B* **1996**, *679*, 119–127.
- (36) Shibata, T.; Kawasaki, S.; Fujita, J.; Kabashima, T.; Kai, M. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *674*, 234–238.
- (37) Yanez Barrientos, E.; Rodriguez Flores, C.; Wrobel, K.; Wrobel, K. *J. Mex. Chem. Soc.*, in press.
- (38) Maldonado Santoyo, M.; Rodriguez Flores, C.; Lopez Torres, A.; Wrobel, K.; Wrobel, K. *Environ. Pollut.* **2011**, *159*, 2387–2392.
- (39) Aljanabi, S. M.; Martinez, I. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4692–4693.
- (40) Mitra, S. E. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, 2003.
- (41) Rossella, F.; Polledri, E.; Bollati, V.; Baccarelli, A.; Fustinoni, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 2637–2646.
- (42) Schaefer, M.; Pollex, T.; Hanna, K.; Lyko, F. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e12/11–e12/10.
- (43) Chen, T.; Li, E. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2004**, *60*, 55–89.
- (44) Filek, M.; Keskinen, R.; Hartikainen, H.; Szarejko, I.; Janiak, A.; Miszalski, Z.; Golda, A. *J. Plant Physiol.* **2008**, *165*, 833–844.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave spp*

Clelia De-la-Peña^{1*}, Geovanny Nic-Can², Gabriel Ojeda¹, José L Herrera-Herrera¹, Adolfo López-Torres³, Kazimierz Wrobel³ and Manuel L Robert-Díaz¹

Abstract

Background: The micropropagation is a powerful tool to scale up plants of economical and agronomical importance, enhancing crop productivity. However, a small but growing body of evidence suggests that epigenetic mechanisms, such as DNA methylation and histone modifications, can be affected under the *in vitro* conditions characteristic of micropropagation. Here, we tested whether the adaptation to different *in vitro* systems (Magenta boxes and Bioreactors) modified epigenetically different clones of *Agave fourcroydes* and *A. angustifolia*. Furthermore, we assessed whether these epigenetic changes affect the regulatory expression of *KNOTTED1*-like *HOMEBOX (KNOX)* transcription factors.

Results: To gain a better understanding of epigenetic changes during *in vitro* and *ex vitro* conditions in *Agave fourcroydes* and *A. angustifolia*, we analyzed global DNA methylation, as well as different histone modification marks, in two different systems: semisolid in Magenta boxes (M) and temporary immersion in modular Bioreactors (B). No significant difference was found in DNA methylation in *A. fourcroydes* grown in either M or B. However, when *A. fourcroydes* was compared with *A. angustifolia*, there was a two-fold difference in DNA methylation between the species, independent of the *in vitro* system used. Furthermore, we detected an absence or a low amount of the repressive mark H3K9me2 in *ex vitro* conditions in plants that were cultured earlier either in M or B. Moreover, the expression of *AtqKNOX1* and *AtqKNOX2*, on *A. fourcroydes* and *A. angustifolia* clones, is affected during *in vitro* conditions. Therefore, we used Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) to know whether these genes were epigenetically regulated. In the case of *AtqKNOX1*, the H3K4me3 and H3K9me2 were affected during *in vitro* conditions in comparison with *AtqKNOX2*.

Conclusions: *Agave* clones plants with higher DNA methylation during *in vitro* conditions were better adapted to *ex vitro* conditions. In addition, *A. fourcroydes* and *A. angustifolia* clones displayed differential expression of the *KNOX1* gene during *in vitro* conditions, which is epigenetically regulated by the H3K4me3 and H3K9me2 marks. The finding of an epigenetic regulation in key developmental genes will make it important in future studies to identify factors that help to find climate-resistant micropropagated plants.

Keywords: Epigenetics, *In vitro*, Histone methylation, *Agave*, *KNOX* genes

Background

DNA methylation and histone modifications are important epigenetic mechanisms for gene regulation in eukaryotes [1-3]. In plants, epigenetic mechanisms play an important role in development [4,5], flowering [6], pathogen recognition [7], senescence [8] and somaclonal variation [9-11]. It has been found that DNA methylation/

demethylation is affected by exogenous and endogenous factors in both *in vivo* and *in vitro* conditions, such as auxin concentration, temperature and aging [5,12-14]. DNA methylation patterns can also change, depending on the method of plant propagation [15].

The use of *in vitro* plant propagation techniques allows the scale up of crops of agronomic importance [16,17], maintaining genetic stability among clones. Although clonal plants are usually very stable at the genetic level, epigenetic modifications in DNA [12,18,19], as well as histones [20-24], mainly by methylation in lysine

* Correspondence: clelia@cicy.mx

¹Unidad Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán CP 97200, México
Full list of author information is available at the end of the article

9 and 4 of the histone H3, could be affected and, therefore, induce somaclonal variation [11]. There is evidence of epigenetic changes, although some can be quite stable with time [25], occurring during *in vitro* culture. For instance, Valledor *et al.* [5] found that an increase in plant vigor and rejuvenation is due to DNA methylation. On the other hand, it has been found that the decrease in organogenesis capability of *Pinus radiata* was related to low levels of acetylation in histone H4 and high levels of DNA methylation [26]. It has been proposed that the changes in DNA methylation patterns in maize and apple are induced by tissue culture during *in vitro* conditions [27-29], and these methylation patterns play an important role during plant development [4,5]. Furthermore, not only methylation [30,31] but also demethylation in the DNA could cause epigenetic alterations that provoke abnormalities during the *in vitro* process [32,33]. One of the factors involved in epigenetic changes during *in vitro* conditions is the exposure to growth regulators, which are widely used in plant tissue culture [34,35] to promote multiplication and growth.

Plant growth regulators have been involved in the expression of several genes, and some studies have even suggested reciprocal links between growth regulators and homeobox genes [36]. One of the most studied homeobox genes regulated by plant growth regulators is the *KNOTTED1-like HOMEBOX (KNOX)* transcription factor group [37-39]. In *Arabidopsis thaliana*, there are eight *KNOX* genes that have been divided into two classes. *STM*, *KNAT1*, *KNAT2* and *KNAT6* belong to class I, while *KNAT3*, *KNAT4*, *KNAT5* and *KNAT7* fall into class II [40]. The expression of two, *KNAT1* and *KNAT6*, is altered by cytokinins and auxins [41-43]. Rupp *et al.* [41] found an increase in the transcription level of *KNAT1* in the cytokinin-overproducing mutant *amp1*, which might occur by acting through the activation of *KNAT1*. Furthermore, Dean *et al.* [43] found in *A. thaliana* that exogenous auxin treatments alter the promoter activity of the gene *KNAT6*. In the same way, Montero-Cortés *et al.* [39] found that in somatic embryos from micropropagated coconut plants, the expression of *CnKNOX1* was stimulated by gibberellic acid, while in *CnKNOX2* the hormone produced a decrease in its expression. Taking all these findings as a whole, it is clear that plant growth regulators have an important impact on *KNOX* genes.

Studies done in *Agave tequilana* have shown that *KNOX* genes are associated with organogenesis during bulbil formation [44]. According to Abraham-Juarez *et al.* [44], *AtqKNOX1*, homologous to *KNAT1*, and *AtqKNOX2*, homologous to *KNAT6*, presented an increase in the levels of expression as bulbils mature. The regulation of *KNOX* genes in Agave has not been clearly understood, but studies in *Arabidopsis* and maize

suggest that chromatin configuration could be an important factor in the regulation of these genes [40,45,46]. In humans, homeobox genes, which encode transcription factors evolutionarily conserved, are epigenetically regulated [47]. Therefore, it is possible that, as in animals, plant homeobox genes, such as *KNOX*, can also be epigenetically regulated.

Although the epigenome is highly dependent on the surrounding environment [48,49], the epigenetic changes that occur under *in vitro* conditions are still unknown, as is how these changes impact plants' development in the field. In order to understand the effect of *in vitro* conditions on the epigenetic regulation of *AtqKNOX1 (KNAT1)* and *AtqKNOX2 (KNAT6)*, in this study we provide a detailed epigenetic analysis comparing different Agave plants cultured under different *in vitro* and *ex vitro* conditions.

Results

In order to assess the epigenetic and molecular differences that might be occurring in Agave plants cultured in different *in vitro* systems (see Methods; Figure 1), as well as in *ex vitro* conditions, we used three different *Agave fourcroydes* clones (P20, P21 and P159) and one *A. angustifolia* clone (BM26) (Figure 1A). Sixteen-week-old clones were cultured *in vitro* (T0), as described in Methods, and transferred for five weeks to two different *in vitro* growth systems: semisolid in Magenta boxes (M) and temporary immersion in modular Bioreactors (B). After that treatment, the plants from each *in vitro* growth system (M and B) were transplanted to soil (S), where they stayed for two months *ex vitro* (Figure 1B). In total, five culture conditions (T0, M, B, SM and SB) were evaluated for each clone (P20, P21, P159 and BM26).

As previously reported by Robert *et al.* [50], it was observed that after five weeks in *in vitro*, the *A. fourcroydes* plants under Bioreactor conditions developed better than those grown in Magenta boxes; they were shorter, more vigorous and presented a more intense coloration (Figure 2). A similar situation was observed in the *A. angustifolia* clone (BM26), which also produced more leaves when cultured in the Bioreactor. These phenotypic characteristics were not conserved once the BM26 plants were evaluated eight weeks later in *ex vitro* conditions (SM and SB). Many of the BM26 plants did not survive after a couple of weeks *ex vitro*, and the few plants that did survive were small, pale and had only a few roots. In contrast, more than 90% of the *A. fourcroydes* plants (P20, P21 and P159) survived. They grew rapidly, produced many strong roots and the leaves developed the characteristic purple color in (data not shown).

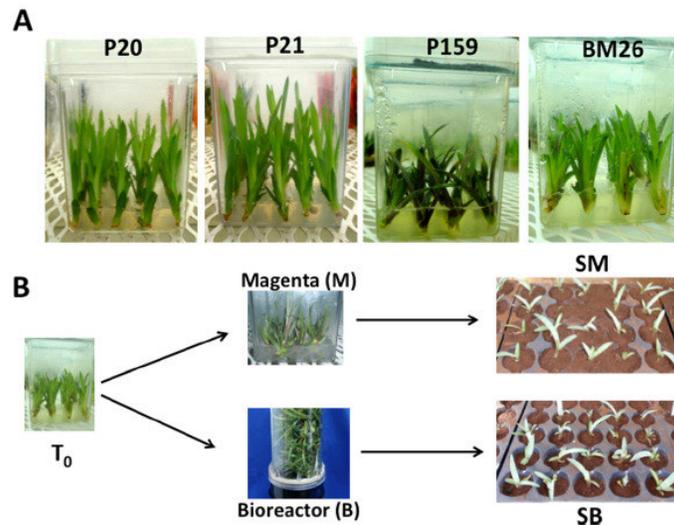


Figure 1 *In vitro* culture of *Agave fourcroydes* clones P20, P21 and P159 and *A. angustifolia* clone BM26. (A) Ten-week-old *Agave* plants grown under photoperiod conditions were considered as T0. (B) Experimental design for the culture of the plantlets cultured ten weeks in multiplication medium (T0). After ten weeks, the plantlets were moved to a semisolid growth medium in Magenta boxes (M) and temporary immersion in modular Bioreactors (B), where they stayed for five weeks. After that, the plantlets were transferred to soil previously cultured in M (SM) and to soil previously cultured in B (SB), where they stayed eight more weeks.

Transfer to *ex vitro* conditions increases DNA methylation in *Agave angustifolia*

To gain insight into DNA methylation from plants grown in two different systems during *in vitro* (M and B) and *ex vitro* (SM and SB) conditions, three different *A. fourcroydes* clones (P20, P21 and P159) and one *A. angustifolia* clone (BM26) were chosen as starting material (Figures 1 and 3). Global DNA methylation rates were analyzed by HPLC (see Methods) from plants collected at T0, M, B, SM and SB. The global quantification of 5-methyl-deoxycytidine has shown that DNA methylation in *A. fourcroydes* (P20,

P21 and P159) and *A. angustifolia* (BM26) cultured either in M or B is not significantly different (Figure 3). However, there is a two-fold difference in the DNA methylation rate of *A. angustifolia* in comparison with *A. fourcroydes*. Under *ex vitro* conditions (SM and SB), it was observed that BM26 increases its methylation rate two-fold in comparison with the *in vitro* conditions, while that of P20, P21 and P159 showed an increase of 1 to 3% from *in vitro* to *ex vitro*. Only one clone, P21, presented 1% less 5mDC under *ex vitro* versus *in vitro* conditions, showing 34% in the plants that were cultured in M in comparison with

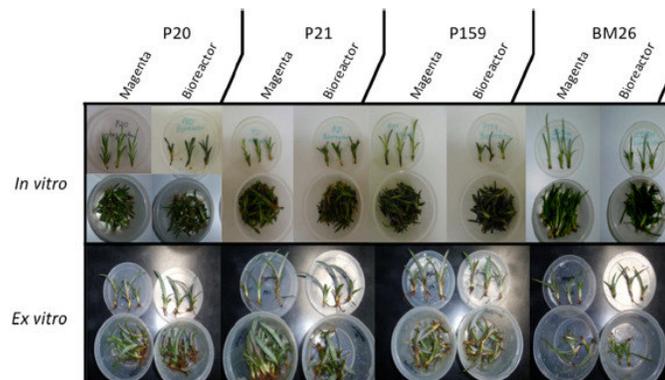
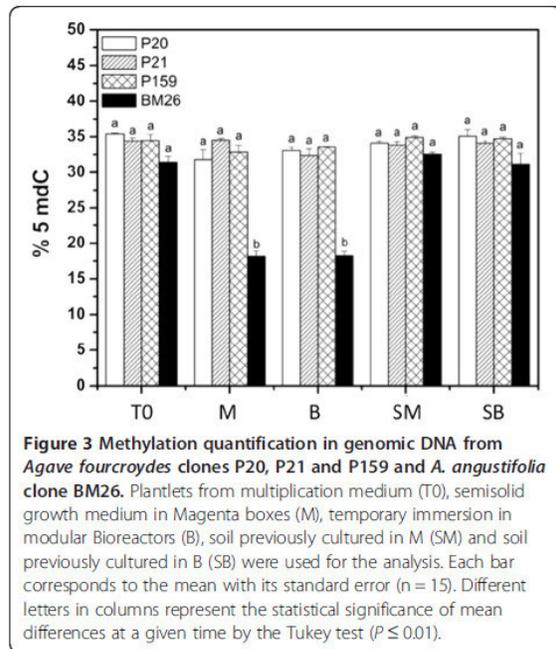


Figure 2 *In vitro* and *ex vitro* culture of *Agave fourcroydes* clones P20, P21 and P159 and *A. angustifolia* clone BM26. Plantlets were grown in two different systems: a semisolid growth medium in Magenta boxes (M) and temporary immersion in modular Bioreactors (B) for five weeks under *in vitro* conditions and for two months under *ex vitro* conditions (in soil; SM and SB).



33% for those cultured in SM. This suggests that *ex vitro* conditions could change the methylation behavior in different clones from the same species, potentially resulting in a change in a plant's performance once it is in the field. On the other hand, we cannot rule out, at least for the case of *A. fourcroydes*, that the slight increase in DNA methylation observed during *ex vitro* in comparison with *in vitro* conditions (SM vs M and SB vs B) could be due to plant development.

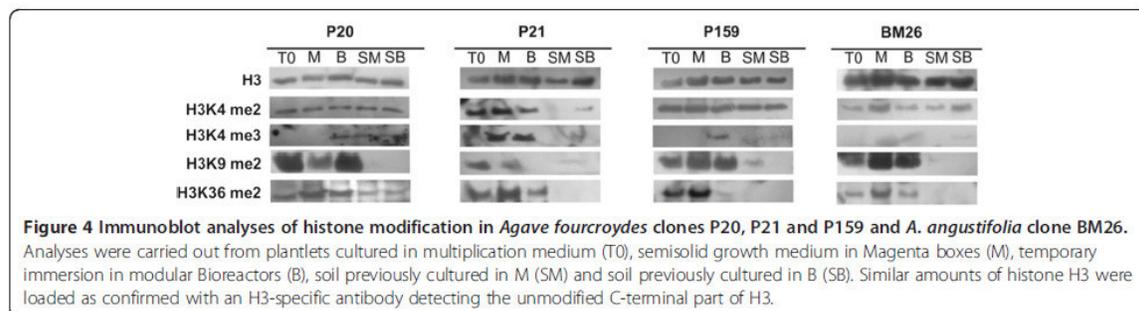
In vitro conditions induce methylation in H3K9

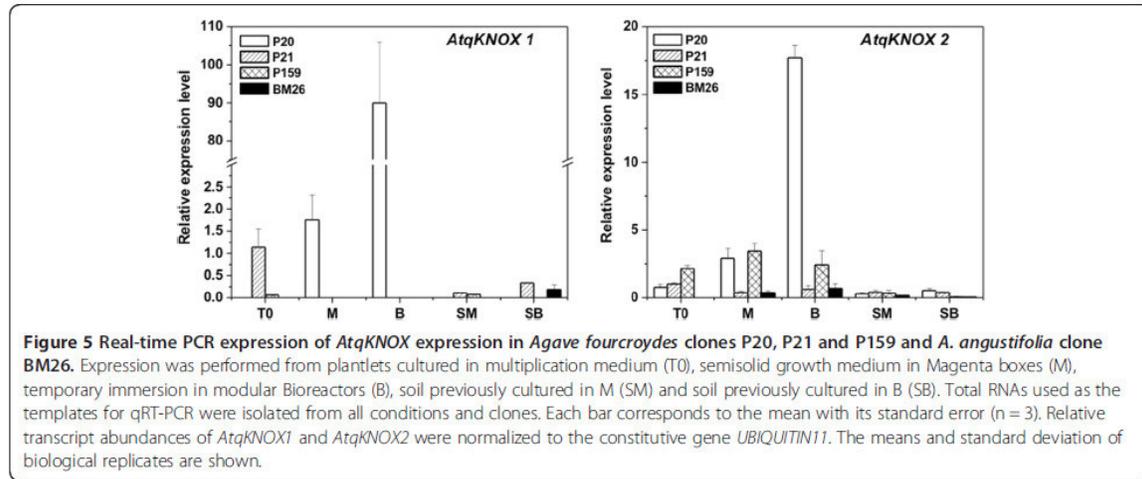
The Western blot analysis using antibodies against the H3K4 di- and tri-methylated isoforms, as well as for the H3K9me2 and H3K36me2 marks (see Methods), showed important changes in histone methylation patterns in all the clones during *ex vitro* conditions in comparison with the *in vitro* ones. In all *ex vitro* samples (SM and SB), we detected an absence or a low amount of the repressive

mark H3K9me2, in spite of the fact that this mark had accumulated noticeably only during *in vitro* conditions (Figure 4). This suggests the possible formation of heterochromatin-like structures, as a result of the *in vitro* conditions. Marks H3K4me2, H3K4me3 and H3K36me2, which are implicated in the activation of transcription [51], were differentially detected among the clones and between *in vitro* and *ex vitro* conditions. For instance, H3K4me2 was present in all samples and all conditions except P21, for which this mark was absent in SM and present at a very low amount in SB. Furthermore, H3K36me2 was found in all samples *in vitro* but absent *ex vitro*, except for P20, where this mark was also found. In contrast, H3K4me3 presented a different pattern in each clone that may lead to the formation of eukaryotic structures as a stress mechanism provoked by *in vitro* conditions in different plants. Therefore, although the clones are genetically very similar, the response of each clone to the *in vitro* and *ex vitro* conditions is different, giving a specific epigenetic identity to each. For instance, in P20, H3K4me3 accumulated in B, SM and SB, in P21 this mark accumulated in M and B, and in P159 it accumulated only in B. In BM26, the H3K4me3 mark was slightly accumulated in B and SB.

KNOX expression is induced by *in vitro* conditions

The effect of *in vitro* conditions on the expression of the *KNOX* genes was analyzed by qRT-PCR assays of P20, P21, P159 and BM26 in T0, M, B, SM and SB (Figure 5). We found that *AtqKNOX1* showed expression only in P21 and P159 at T0; and P20 at M. However, the highest expression detected was in P20 at B. In the case of *ex vitro* conditions, this gene was slightly expressed in P21 and P159 in SM and in P21 and BM26 in SB. Therefore, *AtqKNOX1* is differentially expressed in the *Agave* clones during *in vitro* conditions. On the other hand, the expression of *AtqKNOX2* was low or absent under all culture conditions in the BM26 clone. In the case of P159, the expression of *AtqKNOX2* was almost the same while the clone was *in vitro*. However, once the plants were in *ex vitro* conditions, the expression of this gene was almost undetectable. It is worth mentioning that in the case of P21, the expression of



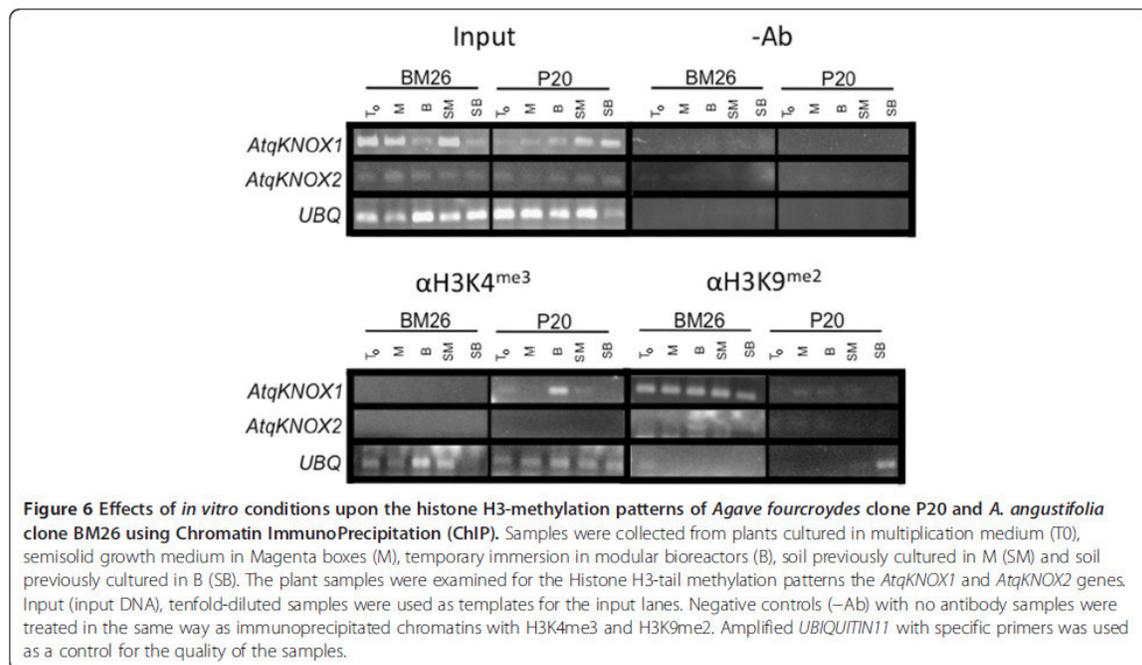


AtqKNOX2 was low in all culture conditions. However, P20 presented the highest expression of *AtqKNOX2* in B; while in T0 and M, the expression of this gene was very similar to P21 and P159, respectively. Furthermore, under *ex vitro* conditions (SM and SB), *AtqKNOX2* expression in P20 was as low as that of P21.

AtqKNOX1 is epigenetically regulated

Since *in vitro* conditions show a differential expression of *AtqKNOX1* and *AtqKNOX2* in *A. fourcroydes* and *A. angustifolia* clones (Figure 5), we examined the molecular

events accompanying the epigenetically induced modification of these genes by Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP) in two clones, one of *A. fourcroydes* (P20) and one of *A. angustifolia* (BM26) from T0, M, B, SM and SB (Figure 6). Normalization of histone H3 immunoprecipitated from all samples to the corresponding input fraction revealed changes in H3K4me3 and H3K9me2. We observed an enrichment of the H3K4me3 mark in P20 at the B condition in comparison to the input of the *AtqKNOX1* gene (Figure 6), which correlated with its expression (Figure 5).



The H3K4me3 methylation levels in *AtqKNOX1* in BM26 were not detected in any condition, which also correlates with its lack of expression found in Figure 5. During *in vitro* conditions in the Bioreactor, the H3K4me3 levels increased, favoring the expression due to epigenetic regulation of *AtqKNOX1* in the clone P20. Considering these results and the ones obtained with gene expression studies, it appears that the *AtqKNOX1* expression (Figure 5) is directly correlated with the H3K4me3 levels. Furthermore, we determined the levels of H3K9me2, a mark related to heterochromatin and repressive gene regions, of all analyzed genes (Figure 6). We found that only in BM26 was there an increase in H3K9me2 in *AtqKNOX1* in all culture conditions. This result is consistent with the lack of expression of this gene in BM26.

These results could help to develop new strategies to optimize the use of more efficient *in vitro* conditions in order to guarantee the epigenetic stability of the cultures in the field.

Discussion

Plant tissue culture has been used for many years to propagate elite plants and for genetic breeding [52,53]. In Mexico, clonal propagation has been successfully employed to improve revigoration and juvenility in commercial plantations of Agave [16,50,54,55]. It is known that Agave plants cultivated under *in vitro* conditions for several generations do not contribute to genetic variation among clones [15], but some phenotypic variations have still been found. One of the explanations for these phenotypic changes under *in vitro* culture could be epigenetic regulation.

There is small but increasing evidence describing the epigenetic changes during *in vitro* culture. It has been found that not only the environment during the *in vitro* culture can change the epigenetic profile of the plant [27-29], but also the epigenetic status of the donor plants; even the organs within the donor plants can determine the later behavior of the explants [26]. For instance, it has been found that *in vitro* conditions change DNA methylation [27-29] and even this epigenetic mechanism has been related to plant development and rejuvenation [4,5]. Therefore, the DNA hypomethylation found in BM26 when this clone was changed from T0 to either the Magenta box or the Bioreactor (Figure 3) could be due to stress [9], which might be related to the increase in the mortality rate observed when these plants were transplanted to soil. Another explanation is that rejuvenation is occurring in this clone during its time in the Magenta boxes or the Bioreactor. Valledor et al. [5] found that there is a relationship between DNA methylation and aging-revigorization in plants, such that aging increases as DNA global methylation increases. In plants,

DNA methylation usually increases with aging [26,56], while in mammals it decreases with time [57,58]. Therefore, the decrease in DNA methylation observed in *A. angustifolia* during *in vitro* culture (Figure 3) could be a mechanism for rejuvenation.

Li et al. [28] reported that several physiological changes related to *in vitro* culture, such as leaf structural changes, modifications in plant water content and changes in photosynthetic systems, are related to the stress provoked by *in vitro* conditions, and the stress seems to be related to the content of global DNA methylation. We observed in Agave that the semisolid system in the Magenta boxes generates longer leaves in comparison with the plants cultured in the temporary immersion of the modular Bioreactors (Figure 2). Although we did not observe a significant difference in DNA methylation between Magenta boxes and Bioreactors in the same clone (Figure 3), we observed a difference in histone methylation patterns between plants grown in these two *in vitro* systems (Figure 4). The genetic expression provoked by stress in plants depends on histone posttranslational modifications and DNA methylation [59]. In the case of histone methylation, there are no reports that explain or suggest either the somaclonal variation or the genes affected epigenetically. Although there is information about the role of DNA methylation during *in vitro* culture, the histone modifications and the changes in chromatin modulation are still unknown. We found that clones genetically and even phenotypically alike have different epigenetic responses to *in vitro* culture (Figure 4). Moreover, there are no reports of the epigenetic stability of the micropropagated plants once they are *ex vitro*; so far, it is unknown whether histone modifications are involved. It is known that the epigenetics of an organism can change depending on development [60], biotic [7] or abiotic interactions [61], and even stress exposure [62]. Therefore, the mechanism of stress response due to the exposure to growth regulators during *in vitro* conditions could be one of the candidates for regulation by epigenetic factors. We found that during *in vitro* conditions, epigenetic modifications in histones (Figure 4), mainly through H3K9me2, which is very important in the initiation and maintenance of heterochromatin silencing [2] and in the control of DNA methylation [63], are affected. However, once the plants were transferred to *ex vitro* conditions in the field, this histone mark was absent or in present in low amounts, suggesting that plants can change the epigenome-phenotype.

In other *in vitro* systems, such as the potato, the DNA methylation variation associated with tissue culture protocols has been investigated [64]. It was found that DNA methylation changes occurring among the tissue types are an essential factor contributing to developmental stage differences, as well as tissue-culture-induced

variation. Therefore, the hypermethylation found in P159 at SM could be induced by elements of the tissue culture media such as plant hormones, which have been shown to induce methylation changes in plant tissue cultures [12,19,65]. There is evidence that the use of the auxin 2,4-D in maize cultures generates changes in the DNA methylation pattern, depending on the concentration [12]. Plant hormones regulate growth and development in plants by controlling the expression of genes involved in these processes.

KNOX genes have been implicated in plant hormone metabolism [66,67]. Hay *et al.* [42] found that auxins repress the *KNAT1* gene, promoting leaf development in *Arabidopsis*. Furthermore, it has been proposed that alterations in auxin gradients could result in a failure to down-regulate *KNOX* expression [37]. Different epigenetic mechanisms have been suggested for the regulation of *KNOX* genes during organogenesis [68,69]. In this study, we showed that the *AtqKNOX1* gene is epigenetically regulated by H3K4me3 and H3K9me2 (Figure 6). Histone modification is a very complex epigenetic mechanism that so far has not been decoded [70-72]. However, studies in *Arabidopsis* have revealed that histone H3K9 methylation exists predominately as mono- and di-methylation, while trimethylation in H3K9 is quite rare [73]. There is evidence showing that in plants H3K27me3, H3K9me3 and H3K4me2 are euchromatic marks, while H3K9me2 is more associated with the repression of the transcription [63,74]. Chromatin changes have become an important key element for development in plants [75] and histone modification is essential [76]. Changes in *KNOX1* gene expression among species could be due to different factors such as diversification of repressors of these genes [67]. Among the main roles of *KNOX* are the formation of auxin maxima, which provide feedback to repress *KNOX* expression, allowing leaflet outgrowth [67,77].

It will be interesting to study the methylation patterns from different generations exposed to *in vitro* conditions compared to those that were not, to determine whether the plants remember the *in vitro* exposure through epigenetic marks.

Conclusions

DNA methylation and histone modifications are very important epigenetic mechanisms that can be affected by *in vitro* conditions. Our studies indicate that under *in vitro* conditions, DNA methylation is affected in *A. angustifolia*, but not in *A. fourcroydes*. In addition, *A. fourcroydes* presented differential expression of *AtqKNOX1* and *AtqKNOX2*, depending on the *in vitro* system used. Furthermore, the regulatory expression of *AtqKNOX1* was related to the H3K4me3 and H3K9me2 marks. We propose that *in vitro* conditions change key

genes by epigenetic regulation, which could be an important tool to find plants better adapted to overcome climate challenges.

Methods

Plant material and growth conditions

Three different *in vitro*-propagated *Agave fourcroydes* clones (P20, P21 and P159) and one *Agave angustifolia* clone (BM26) were used. The media used for plant induction, multiplication and growth of the plants was Murashige and Skoog [78], at pH 5.7, with some modifications as reported by Robert *et al.* [16,55]. Briefly, the plants from each clone were kept for six weeks in Magenta containers filled with 50mL of Murashige and Skoog media with reduced nitrogen, solidified with 1.75g/L of Gelrite (semisolid media) and without growth regulators. All plantlets were then transferred to and maintained in multiplication media supplemented with 10 mg/L BAP and 0.025 mg/L 2,4-D for ten weeks. Sixteen-week-old plants of the same size from each clone were divided as follows: 25 were sampled for analysis (T0) and 100 were cultured in growth medium supplemented with 1mg/L BAP and 0.025 mg/L 2,4-D. At this growing stage, two different systems were used: 50 plantlets were maintained in semisolid growth media in Magenta boxes [Magenta (M)] supplemented with 10 g/L of Agar, and 50 plantlets were cultured in liquid growth medium under temporary immersion in modular Bioreactors [Bioreactor (B)], as described by Robert *et al.* [50]. After five weeks, 25 plantlets from both *in vitro* systems (M and B) and from each clone (P20, P21, P159 and BM26) were sampled, and the remaining 25 from M and B were transferred to soil (SM and SB), where they grew for another eight weeks before they were also evaluated (Figure 1B).

Histone isolation and Western blots

Histones from *Agave* spp. clones (P20, P21, P159 and BM26) were isolated from 0.5 grams of leaf tissue from T₀, M, B, SM and SB using sulfuric acid extraction of nuclei proteins followed by acetone precipitation, according to Jackson *et al.* [79]. Ten micrograms of isolated histones per sample were used for Western blots. The proteins were transferred to nitrocellulose membrane (0.45µm) by electrophoresis for four hours at 265mA. Membranes were blocked with 5% milk and 0.5% Tween in PBS, and probed with various antibodies, as follows: dimethyl-Histone H3 [Lys-4] (Upstate, cat. #07-030), trimethyl-Histone H3 [Lys-4] (Upstate, cat. #04-745), dimethyl-Histone H3 [Lys-9], (Upstate, cat. #07-441) and anti-dimethyl-Histone H3 [Lys-36] (Upstate, cat. #07-274). Di-(m2/H3) and tri-(m3/H3) methylated levels were measured and compared in histones isolated from different samples. The amount of loaded histone H3 in each

sample was determined from Western blots using antibodies specific to non-methylated H3 (Upstate, cat. #06-755). Signals from bands obtained with methylation-specific antibodies were normalized against the respective histone H3 amounts (measured as signal intensities of Western-blot bands obtained with anti-histone H3-antibodies). All blots were stripped and re-probed with the histone H3 antibody to demonstrate equal loading. Data from four independent measurements consistently gave the same results.

DNA methylation

DNA extraction was done following the method described by Echevarria-Machado *et al.* [80]. DNA digestion was performed as described Santoyo *et al.* [81], with slight modifications. Five μg of DNA from P20, P21, P159 and BM26 at T₀, M, B, SM and SB were dissolved in 42 μL of ultra pure water and mixed with 5 μL of 10 X DNA digestion buffer (200 mM acetic acid, 200mM glycine, 50mM magnesium chloride, 5mM zinc acetate, 2 mM calcium chloride adjusted with sodium hydroxide to pH 5.3). The mixture was hydrolyzed with 2 μL of DNase I (D2821-Sigma, 10U/ μL) and 1 μL of Nuclease P1 (N8630-Sigma, 1.25U/ μL) overnight at 37°C and then frozen for 10–15 min at 0°C and then incubated at 100°C for five min. Samples were mixed with 5 μL of 100 mM NaOH and 2 μL Calf intestine alkaline phosphatase (P4879-Sigma, 1U/ μL) and incubated for 3.5 h at 37°C and then mixed with 100 μL of water and 50 μL mobile phase D (see below). Samples were centrifuged at 18,000 \times g for 10 min at 4°C, and the supernatant was transferred to a new tube and stored at -20°C until analysis. Forty μL of sample was injected to liquid chromatographic system (HPLC, Agilent series 1200), and the bases were separated on a chromatographic column, Luna C18 (250 \times 4.6mm, 5 μm from Phenomenex) at 40°C. The absorbance was measured using a diode array detector at 286 nm. The separation was realized according to the method described by Lopez Torres *et al.* [82] with some modifications. Four mobile phases were used: A, deionized water; B, acetonitrile; C, methanol; and D, 50mM ammonium phosphate dibasic, 15mM ammonium acetate adjusted with phosphoric acid to pH 4.1. The gradient program was as follows: 0 to 4 min 80% A, 20% D; 4 to 11 min 78% A, 2% C, 20% D; 11 to 15 min 77% A, 3% C, 20% D; 15 to 15.8 min 35% A, 20% B, 25% C, 20% D; 15.8 to 16 min 30% A, 25% B, 25% C, 20% D at a total flow rate of 1 mL/min. The percentage of global DNA methylation was calculated as follows: concentration of 5-methyl-2'-deoxycytosine (5mC)/ [concentration of 5mC + concentration of 2'-deoxycytosine (dC)] \times 100. All the analysis was achieved with three biological replicates from different DNA extractions. Statistical comparison was performed by one-way analysis of variance (ANOVA). The significance grade

was determined by the test of several means of Tukey ($P \leq 0.01$).

Gene expression

Total RNA was extracted from 0.2g leaf tissue of P20, P21, P159 and BM26 from T₀, M, B, SM and SB by using the BRL Trizol reagent (Invitrogen) and re-purified with the Qiagen RNeasy Mini Kit, following the manufacturer's instructions. Reverse transcriptase (RT) reactions were performed in a 20- μL volume containing 2 μg of total RNA and 200 units of the M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. cDNA templates for qRT-PCR amplification were prepared from three individual plants for each condition. Each reaction contained 100 ng of cDNA template, 10 pM of each primer and 1 \times EXPRESS SYBR[®] Green-ERTM pPCR SuperMix Universal (11784-200-Invitrogen). Real-time PCR assays were performed in a Step OneTM Real Time PCR System (Applied Biosystems) under the following conditions: 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of 95°C for 40 sec, 62°C for 40 sec and 72°C for 90 sec, and a final cycle of 72°C for 5 min. Transcript levels of *AtqKNOX1* and *AtqKNOX2* in the samples were normalized to the level of *UBIQUITIN (UBQ11)* and the data are expressed as the relative expression level. The specificity of the PCR product amplifications was determined by a melting curve analysis. Data obtained from Real-time PCR were used to calculate the relative quantification of the target gene expression and compared to the expression of the *UBQ11* using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [83]. We used the primers reported by Abraham-Juarez *et al.* [44] to determine gene expression in *Agave*: *AtqKNOX1* (GenBank Accession No. GU980050) forward 5'-gagggcagttcatagtgat-3', reverse 5'-ttccacaggagtagtctc-3' (190bp); *AtqKNOX2* (GenBank Accession No. GU980051) forward 5'-gaatggtgactgctcacta-3', reverse 5'-cctcagtcgtcgtcatagaa-3' (225bp) (Additional file 1: Figure S1); and *UBQ11* was used as a control 5'-gacggcgccacccttgccgatta-3', 5'-tcttgatcttcgcttgacatt-3' (211bp). Statistical comparison was performed by one-way analysis of variance (ANOVA).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP assays were performed as described by De-la-Peña *et al.* [7]. The antibodies used were anti-dimethyl Histone H3 [Lys9] (Upstate #07-441) and anti-trimethyl Histone H3 [Lys4] (Upstate #05-745). For all ChIP experiments, chromatin was isolated from leaves of P20 and BM26 from T₀, M, B, SM and SB conditions. Each immunoprecipitation experiment was independently performed three times with separately isolated biological samples. All PCR reactions were done in 25 μL : 5 min at 95°C, followed by 38 cycles of 95°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 2 min, and 72°C 5 min. Intensities were normalized versus the input sample representing 15% of the DNA

used as template. The ChIP primer sequences used were as follows: *AtqKNOX1* forward 5'-gaggcagttcatagtgat-3', reverse 5'-ttcccacaggagtaggtctc-3'; *AtqKNOX2* forward 5'-gaatggggactgctcacta-3', reverse 5'-cctcagtcgtcgtc atagaa-3'; and *UBQ11* was used as a control 5'-gacgggcgcaccttgcggatta-3', 5'-tcctggatcttcgcttgacatt-3'.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. A) Comparison of the *AqtKNOX1* nucleotide sequences with *KNAT1* (At4g08150) Arabidopsis sequences; B) Comparison of the *AtqKNOX2* nucleotide sequences with *KNAT2* (At1g23389) Arabidopsis sequences. Alignment was performed using Blast [84]. The * indicates the conserved residues between the Agave with Arabidopsis. The : indicates that at least one residue is different between Agave and Arabidopsis. Names of the genes are indicated on the left. The squares indicate the primers that were used for RT-PCR and ChIP.

Abbreviations

B: Bioreactor; ChIP: Chromatin immuno precipitation; dC: 2'-deoxycytosine; 2,4-D: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; HPLC: High-performance liquid chromatography; KNOX: KNOTTED1-like HOMEBOX; K: Lysine; M: Magenta; me: Methylation; 5mdC: 5-methyl-deoxycytidine; RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction; UBQ11: UBIQUITIN11.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GN carried out the biochemical and molecular studies. GO and JH carried out the induction and propagations of the Agave cultures. MR participated in the design of the study and drafted the manuscript. KW and AL carried out the DNA methylation. CD conceived of the study, participated in its design and coordination, carried out the epigenetic studies and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

These studies were supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grants No. 121768 and CB-2012/178149 to CD).

Author details

¹Unidad Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán CP 97200, México. ²Campus de Ciencias Exactas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte. Km 33.5, Tablaje catastral 13615 Col. Chuburná de Hidalgo Inn, Merida, Yucatán C. P. 97203, Mexico. ³Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Guanajuato 36000, México.

Received: 24 May 2012 Accepted: 23 October 2012

Published: 5 November 2012

References

- Salozhin SV, Prokhorchuk EB, Georgiev GP: **Methylation of DNA- One of the major epigenetic markers.** *Biochemistry* 2005, **70**:525–532.
- Shilatifard A: **Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression.** *Annu Rev Biochem* 2006, **75**:243–269.
- Vanyushin B: **DNA methylation and epigenetics.** *Rus J Genet* 2006, **42**:985–997.
- Ruiz-García L, Cervera MT, Martínez-Zapater JM: **DNA methylation increases throughout Arabidopsis development.** *Planta* 2005, **222**:301–306.
- Valledor L, Hasbún R, Meijón M, Rodríguez J, Santamaría E, Viejo M, Berdasco M, Feito I, Fraga M, Cañal MJ, et al: **Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation.** *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2007, **91**:75–86.
- Dennis ES, Peacock WJ: **Epigenetic regulation of flowering.** *Curr Opin Plant Biol* 2007, **10**:520–527.
- De-la-Peña C, Rangel-Cano A, Alvarez-Venegas R: **Regulation of disease-responsive genes mediated by epigenetic factors: interaction of Arabidopsis–Pseudomonas.** *Mol Plant Pathol* 2012, **13**:388–398.
- Ay N, Irlmer K, Fisher A, Uhlemann R, Reuter G, Humbeck K: **Epigenetic programming via histone methylation at WRKY53 controls leaf senescence in Arabidopsis thaliana.** *Plant J* 2009, **58**:333–346.
- Baranek M, Krizan B, Ondrusikova E, Picra M: **DNA-methylation changes in grapevine somadones following in vitro culture and thermotherapy.** *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2010, **101**:11–22.
- Jaligot E, Rival A, Beulé T, Dussert S, Verdeil JL: **Somaclonal variation in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.): the DNA methylation hypothesis.** *Plant Cell Rep* 2000, **19**:684–690.
- Miguel C, Marum L: **An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond.** *J Exp Bot* 2011, **62**:3713–3725.
- LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orselli S, Terzi M: **DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs.** *Theor Appl Genet* 1989, **77**:325–331.
- Vergara R, Verde F, Pitto L, LoSchiavo F, Terzi M: **Reversible variations in the methylation pattern of carrot DNA during somatic embryogenesis.** *Plant Cell Rep* 1990, **8**:697–700.
- Trap-Gentil M-V, Hébrard C, Lafon-Placette C, Delaunay A, Hagège D, Joseph C, Brignolas F, Lefebvre M, Barnes S, Maury S: **Time course and amplitude of DNA methylation in the shoot apical meristem are critical points for bolting induction in sugar beet and bolting tolerance between genotypes.** *J Exp Bot* 2011, **62**:2585–2597.
- Díaz-Martínez M, Nava-Cedillo A, Guzmán-López JA, Escobar-Guzmán R, Simpson J: **Polymorphism and methylation patterns in Agave tequilana Weber var. 'Azul' plants propagated asexually by three different methods.** *Plant Sci* 2012, **185**–186:321–330.
- Robert ML, Herrera JL, Chan JL, Contreras F: **Micropropagation of Agave spp.** In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Edited by Bajaj JPY. Berlin: Springer-Verlag; 1992:306–329.
- Quiroz-Figueroa F, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos R, Loyola-Vargas V: **Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants.** *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2006, **86**:285–301.
- Park S, Murthy H, Chakrabarthy D, Paek K: **Detection of epigenetic variation in tissue-culture-derived plants of Doritaenopsis by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis.** *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 2009, **45**:104–108.
- Peraza-Echeverría S, Herrera-Valencia VA, James-Kay A: **Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP).** *Plant Sci* 2001, **161**:359–367.
- Williams L, Zhao J, Morozova N, Li Y, Avivi Y, Grafi G: **Chromatin reorganization accompanying cellular dedifferentiation is associated with modifications of histone H3, redistribution of HP1, and activation of E2F-target genes.** *Dev Dynam* 2003, **228**:113–120.
- Alatzas A, Foundouli A: **Distribution of ubiquitinated histone H2A during plant cell differentiation in maize root and dedifferentiation in callus culture.** *Plant Sci* 2006, **171**:481–487.
- Berdasco M, Alcázar R, García-Ortiz MV, Ballestar E, Fernández AF, Roldán-Arjona T, Tiburcio AF, Altabella T, Buisine N, Quesneville H, et al: **Promoter DNA hypermethylation and gene repression in undifferentiated Arabidopsis cells.** *PLoS One* 2008, **3**:e3306.
- Law RD, Suttle JC: **Chromatin remodeling in plant cell culture: patterns of DNA methylation and histone H3 and H4 acetylation vary during growth of asynchronous potato cell suspensions.** *Plant Physiol Bioch* 2005, **43**:527–534.
- Tanurdzic M, Vaughn MW, Jiang H, Lee TJ, Slotkin RK, Sosinski B, Thompson WF, Doerge RW, Martienssen RA: **Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture.** *PLoS Biol* 2008, **6**:2880–2895.
- Smykal P, Valledor L, Rodríguez R, Griga M: **Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (Pisum sativum L.).** *Plant Cell Rep* 2007, **26**:1985–1998.
- Valledor L, Meijón M, Hasbún R, Cañal MJ, Rodríguez R: **Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during Pinus radiata needle maturation in relation to the loss of in vitro organogenic capability.** *J Plant Physiol* 2010, **167**:351–357.
- Kaepler SM, Phillips RL: **Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:8773–8776.

28. Li X, Xu M, Korban SS: **DNA methylation profiles differ between field and in vitro-grown leaves of apple.** *J Plant Physiol* 2002, **159**:1229–1234.
29. Phillips RL, Kaeppler SM, Peschke VM: **Do we understand somaclonal variation?** In *Progress in plant cellular and molecular biology*. Edited by Nijkamp HJJ, VanDerPlas LHW, Van Aartrijk J. Dordrecht: Klumer Academic Publishing; 1990:131–141.
30. Smulders MJM, Kortekass WR, Vosman B: **Tissue culture-induced DNA methylation polymorphism in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants.** *Theor Appl Genet* 1995, **91**:1257–1264.
31. Smulders M, de Klerk G: **Epigenetics in plant tissue culture.** *Plant Growth Regul* 2011, **63**:137–146.
32. Peredo EL, Arroyo-García R, Reed BM, Revilla MA: **Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.).** *Cryobiology* 2008, **57**:234–241.
33. Peredo EL, Arroyo-García R, Revilla MA: **Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants.** *J Plant Physiol* 2009, **166**:1101–1111.
34. Varga A, Thoma LH, Bruinsma J: **Effects of auxins and cytokinins on epigenetic instability of callus-propagated *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.** *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1988, **15**:223–231.
35. Morcillo F, Gagneur C, Adam H, Richaud F, Singh R, Cheah SC, Rival A, Duval Y, Tregear JW: **Somaclonal variation in micropropagated oil palm. Characterization of two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin.** *Tree Physiol* 2006, **26**:585–594.
36. Frugis G, Giannino D, Mele G, Nicolodi C, Innocenti AM, Chiappetta A, Bitonti MB, Dewitte W, Van Onckelen H, Mariotti D: **Are homeobox *Knotted*-like genes and cytokinins the leaf architects?** *Plant Physiol* 1999, **119**:371–374.
37. Hay A, Craft J, Tsiantis M: **Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap?** *BioEssays* 2004, **26**(4):395–404.
38. Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M: **KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities.** *Curr Biol* 2005, **15**:1560–1565.
39. Montero-Córtés M, Sáenz L, Córdoba I, Quiroz A, Verdeil JL, Oropeza C: **GA3 stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a *KNOTTED*-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.).** *Plant Cell Rep* 2010, **29**:1049–1059.
40. Hake S, Smith HMS, Holtan H, Magnani E, Mele G, Ramirez J: **The role of *KNOX* genes in plant development.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, **20**:125–151.
41. Rupp H-M, Frank M, Werner T, Strnad M, Schmölling T: **Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem.** *Plant J* 1999, **18**:557–563.
42. Hay A, Barkoulas M, Tsiantis M: **ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress *BREVIPEDICELLUS* expression and promote leaf development in Arabidopsis.** *Development* 2006, **133**:3955–3961.
43. Dean G, Casson S, Lindsey K: ***KNAT6* gene of Arabidopsis is expressed in roots and is required for correct lateral root formation.** *Plant Mol Biol* 2004, **54**:71–84.
44. Abraham-Juarez MJ, Martínez-Hernández A, Leyva-González MA, Herrera-Estrella L, Simpson J: **Class I *KNOX* genes are associated with organogenesis during bulbil formation in *Agave tequilana* J. Exp Bot** 2010, **61**:4055–4067.
45. Ori N, Eshed Y, Chuck G, Bowman JL, Hake S: **Mechanisms that control *KNOX* gene expression in the Arabidopsis shoot.** *Development* 2000, **127**:5523–5532.
46. Greene B, Walko R, Hake S: **Mutator insertions in an intron of the Maize *knotted1* gene result in dominant suppressible mutations.** *Genetics* 1994, **138**:1275–1285.
47. Bae NS, Swanson MJ, Vassilev A, Howard BH: **Human histone deacetylase SIRT2 interacts with the homeobox transcription factor HOXA10.** *J Biochem* 2004, **135**:695–700.
48. Lira-Medeiros CF, Parisod C, Fernandes RA, Mata CS, Cardoso MA, Gomes Ferreira PC: **Epigenetic variation in mangrove plants occurring in contrasting natural environment.** *PLoS One* 2010, **5**:e10326.
49. Vaillant I, Paszkowski J: **Role of histone and DNA methylation in gene regulation.** *Curr Opin Plant Biol* 2007, **10**:528–533.
50. Robert ML, Herrera-Herrera JL, Herrera-Alamillo MA, Fuentes-Carrillo P: **A new temporary immersion bioreactor system for micropropagation.** In *Plant Cell Culture Protocols*. 2nd edition. Edited by Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F. New Jersey: Humana Press; 2006: 121–129.
51. Kouzarides T: **Chromatin modifications and their function.** *Cell* 2007, **128**:693–705.
52. Xiao Y, Niu G, Kozai T: **Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system.** *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2011, **105**:149–158.
53. Bonga J, Klimaszevska K, Von Aderkas P: **Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers.** *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2010, **100**:241–254.
54. Robert ML, Herrera-Herrera JL, Herrera-Alamillo MA, Quijano A, Balám U: **Manual for the in vitro culture of Agaves.** United Nations Industrial Development Organization. Vienna: Common Fund for Commodities; 2004. Technical paper.
55. Robert ML, Herrera JL, Contreras F, Scorer KN: **In vitro propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen).** *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1987, **8**:37–48.
56. Fraga M, Rodríguez R, Cañal MJ: **Genomic DNA methylation-demethylation during ageing-reinvigoration of *Pinus radiata*.** *Tree Physiol* 2002, **22**:813–816.
57. Gonzalo S: **Epigenetic alterations in aging.** *J Appl Physiol* 2010, **109**:586–597.
58. Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG: **Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age.** *J Biol Chem* 1987, **262**:9948–9951.
59. Chinnusamy V, Zhu JK: **Epigenetic regulation of stress responses in plants.** *Curr Opin Plant Biol* 2009, **12**:133–139.
60. Kaufmann K, Pajoro A, Angenent GC: **Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**:830–842.
61. Kim JM, To TK, Nishioka T, Seki M: **Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses.** *Plant Cell Environ* 2010, **33**:604–611.
62. Gutzat R, Mittelsten Scheid O: **Epigenetic responses to stress: triple defense?** *Curr Opin Plant Biol* 2012, doi:doi.org/10.1016/j.pbi.2012.08.007. In press.
63. Mathieu O, Probst AV, Paszkowski J: **Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis.** *EMBO J* 2005, **24**:2783–2791.
64. Joyce SM, Cassells AC: **Variation in potato microplant morphology in vitro and DNA methylation.** *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2002, **70**:125–137.
65. Armholdt-Schmitt B, Herterich S, Neumann KH: **Physiological aspects of genome variability in tissue culture .1. Growth phase-dependent differential DNA methylation of the carrot genome (*Daucus carota* L.) during primary culture.** *Theor Appl Genet* 1995, **91**:809–815.
66. Kusaba S, Kano-Murakami Y, Matsuoka M, Tamaoki M, Sakamoto T, Yamaguchi I, Fukumoto M: **Alteration of hormone levels in transgenic tobacco plants overexpressing the rice homeobox gene *OSH1*.** *Plant Physiol* 1998, **116**:471–476.
67. Hay A, Tsiantis M: ***KNOX* genes: versatile regulators of plant development and diversity.** *Development* 2010, **137**:3153–3165.
68. Phelps-Durr TL, Thomas J, Vahab P, Timmermans MCP: **Maize rough sheath2 and its Arabidopsis orthologue ASYMMETRIC LEAVES1 interact with HIRA, a predicted histone chaperone, to maintain *knox* gene silencing and determinacy during organogenesis.** *Plant Cell* 2005, **17**:2886–2898.
69. Li H, He Z, Lu G, Lee SC, Alonso J, Ecker JR, Luan S: **A WD40 domain cyclophilin interacts with histone H3 and functions in gene repression and organogenesis in Arabidopsis.** *Plant Cell* 2007, **19**:2403–2416.
70. Cosgrove MS: **Writers and readers: deconvoluting the harmonic complexity of the histone code.** *Nat Struct Mol Biol* 2012, **19**:739–740.
71. Strahl BD, Allis CD: **The language of covalent histone modifications.** *Nature* 2000, **403**:41–45.
72. Jenuwein T, Allis CD: **Translating the histone code.** *Science* 2001, **293**:1074–1080.
73. Johnson L, Mollah S, Garcia BA, Muratore TL, Shabanowitz J, Hunt DF, Jacobsen SE: **Mass spectrometry analysis of Arabidopsis histone H3 reveals distinct combinations of post-translational modifications.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:6511–6518.
74. Liu C, Lu F, Cui X, Cao X: **Histone methylation in higher plants.** *Annu Rev Plant Biol* 2010, **61**:395–420.
75. Berger F, Gaudin V: **Chromatin dynamics and Arabidopsis development.** *Chromosome Res* 2003, **11**:277–304.

76. Kouzarides T: **Histone methylation in transcriptional control.** *Curr Opin Genet Dev* 2002, **12**:198–209.
77. Barkoulas M, Hay A, Kouglioumoutzi E, Tsiantis M: **A developmental framework for dissected leaf formation in the *Arabidopsis* relative *Cardamine hirsuta*.** *Nat Genet* 2008, **40**:1136–1141.
78. Murashige T, Skoog F: **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.** *Physiol Plant* 1962, **15**:473–497.
79. Jackson JP, Jonhson L, Jasencakova Z, Zhang X, PerezBurgos L, Singh PB, Cheng X, Schubert I, Jenuwein T, Jacobsen SE: **Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*.** *Chromosoma* 2004, **112**:308–315.
80. Echevarría-Machado I, Sánchez-Cach L, Hernández-Zepeda C, Rivera-Madrid R, Moreno-Valenzuela O: **A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues.** *Mol Biotech* 2005, **31**:129–135.
81. Santoyo MM, Flores CR, Torres AL, Wrobel K: **Global DNA methylation in earthworms: A candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments.** *Environ Pollut* 2011, **159**:2387–2392.
82. Lopez-Torres A, Yanez Barrientos E, Wrobel K, Wrobel K: **Selective derivatization of cytosine and methylcytosine moieties with 2-bromoacetophenone for submicrogram DNA methylation analysis by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection.** *Anal Chem* 2011, **83**:7999–8005.
83. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method.** *Methods* 2001, **25**:402–408.
84. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389–3402.

doi:10.1186/1471-2229-12-203

Cite this article as: De-la-Peña et al: *KNOX1* is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave spp.* *BMC Plant Biology* 2012, **12**:203.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection for simultaneous assessment of global DNA and total RNA methylation in *Lepidium sativum*: effect of plant exposure to Cd(II) and Se(IV)

Eunice Yanez Barrientos · Kazimierz Wrobel ·
Adolfo Lopez Torres · Felix Gutiérrez Corona ·
Katarzyna Wrobel

Received: 9 November 2012 / Accepted: 21 December 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract In the present work, application of the previously established reversed-phase liquid chromatography procedure based on fluorescent labeling of cytosine and methylcytosine moieties with 2-bromoacetophenone (HPLC-FLD) is presented for simultaneous evaluation of global DNA and total RNA methylation at cytosine carbon 5. The need for such analysis was comprehended from the recent advances in the field of epigenetics that highlight the importance of non-coding RNAs in DNA methylation and suggest that RNA methylation might play a similar role in the modulation of genetic information, as previously demonstrated for DNA. In order to adopt HPLC-FLD procedure for DNA and RNA methylation analysis in a single biomass extract, two extraction procedures with different selectivity toward nucleic acids were examined, and a simplified calibration was designed allowing for evaluation of methylation percentage based on the ratio of chromatographic peak areas: cytidine/5-methylcytidine for RNA and 2'-deoxycytidine/5-

methyl-2'-deoxycytidine for DNA. As a proof of concept, global DNA and total RNA methylation were determined in *Lepidium sativum* hydroponically grown in the presence of different Cd(II) or Se(IV) concentrations, expecting that plant exposure to abiotic stress might affect not only global DNA but also total RNA methylation. The results obtained showed the increase of DNA methylation in the treated plants up to concentration levels 2 mgL⁻¹ Cd and 1 mg L⁻¹ Se in the growth medium. For higher stressors' concentration, global DNA methylation tended to decrease. Most importantly, an inverse correlation was found between DNA and RNA methylation levels ($r=-0.6788$, $p=0.031$), calling for further studies of this particular modification of nucleic acids in epigenetic context.

Keywords Bioanalytical methods · HPLC ·
5-Methylcytosine · Nucleic acids · Epigenetics

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-013-6703-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. Yanez Barrientos · K. Wrobel · A. Lopez Torres ·
K. Wrobel (✉)
Department of Chemistry, University of Guanajuato,
L de Retana 5,
36000 Guanajuato, Mexico
e-mail: katarzyn@ugto.mx

F. Gutiérrez Corona
Department of Biology, University of Guanajuato, L de Retana 5,
36000 Guanajuato, Mexico

Introduction

Epigenetic regulation of gene expression relies on dynamic changes in chromatin structure that are governed, among other factors, by methylation/demethylation of DNA at carbon 5 position in cytosine [1]. Epigenetic mechanisms provide the basis for differentiation, development and cellular homeostasis in eukaryotes; however, misdirected events have been associated with early stages of human diseases [2]; in this regard, it is relevant that environmental factors such as nutrition or exposure to pollutants are able to induce

epigenetic changes [3, 4]. Global methylation, defined as the percentage of methylated cytosines in genomic DNA, has been widely accepted as a biomarker of large-scale epigenetic events and used to evaluate the response of various organisms to specific environmental conditions [5–8].

Unlike DNA, for ribonucleic acids there are more than 100 post-transcriptional modifications characterized, being one of them the cytosine methylation at carbon 5 position (5mC) [9]. This relatively abundant modification has been detected in various ribonucleic acids, including ribosomal, transfer, messenger and a variety of small RNAs, yet its possible cellular functions are not fully understood [10]. Studies carried out in different biological systems showed that both specific DNA and RNA methyltransferases may participate in 5mC formation [10, 11]. Furthermore, RNA-directed DNA methylation has been extensively studied in living organisms and in particular associated with the responses of plants to abiotic stress [12, 13]. Some authors speculate that RNA methylation at C5 of cytosine groups might play an important role in the regulation of epigenetic inheritance [14]; it has also been observed that tRNA methylation levels in yeast cells are controlled by actual nutritional environment [15]. In summary, the advances in the field of epigenetics reveal the importance of non-coding RNAs in DNA methylation and, in particular, suggest that RNA methylation might play a similar role in the modulation of genetic information, as previously demonstrated for DNA [10].

These findings and hypotheses have awakened the interest in assessing both global occurrence and specific localization of methylated cytosines (5mC) in ribonucleic acids [16, 17]. Furthermore, for significance evaluation of possible link between DNA and RNA methylation in epigenetically regulated processes, the call for simultaneous analysis of methylation status of nucleic acids can be anticipated. In this regard, we have recently established the chromatographic procedure, in which 2-bromoacetophenone was used as a fluorescent tag of cytosine groups present in nucleic acids digests, and the analysis was carried out by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection (HPLC-FLD) [18]. The baseline separation of labeled cytidine (C), 2'-deoxycytidine (dC), 5-methylcytidine (5mC) and 5-methyl-2'-deoxycytidine (5mdC) was accomplished within 18 min, the on-column detection limits were 14.4–22.7 fmol (0.72–1.14 nM), respectively. The cited work was specifically focused on global DNA methylation, for which the calibration was carried out enabling to assess the percentage methylation from the ratio between peak areas dC/5mdC. The procedure was then extensively validated by comparison with the established HPLC-DAD method [19] and by analysing standard salmon testes DNA (Sigma product). On the other hand, the selectivity of fluorescent labeling and chromatographic resolution of

four compounds suggested possible measurement of cytosines methylation in deoxynucleic and ribonucleic acids in a single analytical run [18].

The present work was undertaken in order to explore the feasibility of the HPLC-FLD procedure described above, for simultaneous determination of global DNA and total RNA methylation in a single nucleic acids extract. Since this is a pioneer approach, the challenge was to demonstrate possible biological relevance of analytical data. It has already been noted that environmental stress affects DNA methylation and different non-coding RNAs have been associated with this primary epigenetic mechanism in plants [2, 12, 13, 20]; for this reason, hydroponic cultures of *Lepidium sativum* were used in this work, and the possible effect of their exposure to Cd(II) as cadmium chloride and Se(IV) as sodium selenite was inquired. Garden cress, an edible vegetable of the Se-accumulating *Brassicaceae* species, is known for its sensitivity to heavy metals [21]. The ability of this plant for selenium and cadmium uptake and accumulation has been reported [22–24]. Furthermore, the plant response under different exposure conditions has been studied, demonstrating element- and concentration-dependent phytotoxic effects [23, 25]. The results obtained in this technical note demonstrate that HPLC-FLD procedure is suitable for simultaneous analysis of global DNA and total RNA and also provide experimental evidence that such analytical data might be potentially useful in plant epigenetic studies.

Experimental

Apparatus

An Agilent series 1200 liquid chromatograph equipped with a quaternary pump, a well plate autosampler, a spectrofluorimetric detector and controlled by Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used. The chromatographic monolithic column was Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2.7 μm) from Supelco, with pre-column C18 from Phenomenex.

Reagents and samples

All chemicals were of analytical reagent grade. Deionized water (18.2 MΩcm, Labconco, USA) and HPLC-grade methanol, acetonitrile, dimethylformamide (DMF), isopropanol and chloroform from Fisher Scientific (Pittsburgh, USA) were used throughout.

The standards of dC, C, 5mdC and 5mC were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Derivatization reagent, 2-bromoacetophenone, cadmium chloride and sodium selenite were also from Sigma.

Other Sigma analytical grade reagents were: glacial acetic acid, trifluoroacetic acid (TFA), sodium hydroxide, sodium sulfate anhydrous, sodium dodecyl sulfate, ammonium phosphate dibasic, phosphoric acid, hydrochloric acid, sodium acetate, zinc sulfate, magnesium chloride, sodium chloride, calcium chloride, glycine, proteinase K, DNase I, nuclease P1, calf intestinal alkaline phosphatase, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl) and TRIzol[®] reagent from Life Technologies. Hoagland nutrient solution was prepared from Sigma reagents. *L. sativum* cv. *Ogrodowa* seeds were purchased in the garden-specialized market in Poland and grown hydroponically in Hoagland nutrient solution amended with different concentrations of cadmium chloride or sodium selenite.

Plant growth

The seeds were sterilized in 70 % ethanol (3 min), then in 3.1 % sodium hypochlorite (15 min) and washed with sterile deionized water. The seeds were soaked in deionized water for 1 h, and then, hydroponic germination was carried out in Hoagland's nutrient solution containing calcium nitrate 0.35 mM, calcium chloride 2.1 mM, magnesium sulfate 0.91 mM, monobasic sodium phosphate 0.97 mM, potassium nitrate 1.22 mM, boric acid 23 μ M, manganese chloride 3.9 μ M, molybdenum trioxide 0.5 μ M, ferric nitrate 10 μ M, zinc nitrate 0.6 μ M and copper sulfate 0.5 μ M, pH 5.8 [23]. After 5 days, the germinated seeds were divided into nine groups and further grown for 1 week at different exposure conditions. The concentration levels of Cd(II) (as cadmium chloride) in the nutrient solution were 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mgL^{-1} , and for Se(IV) (as sodium selenite), the concentrations were 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mgL^{-1} , respectively. Control group was also obtained. The whole plants of each group were harvested, pooled, washed with 0.05 M calcium chloride and with deionized water.

Extraction of nucleic acids (method 1)

The procedure reported by Aljanabi and Martinez [26] and used in the previous study [18] was applied. In brief, about 100 mg of fresh plant tissue was homogenized in a polytron equipment with 400 μ L of buffer containing sodium chloride 0.4 M, EDTA 2 mM and Tris-HCl 10 mM at pH 8. Afterwards, 40 μ L of sodium dodecyl sulfate 20 % (*m/v*) and 8 μ L of proteinase K 20 mg/mL were added; the mixture was incubated for 1 h at 60 °C, 300 μ L of sodium chloride 6 M was added, and the sample was centrifuged at 10,000 \times g for 30 min. The supernatant was collected, 500 μ L of isopropanol was added, and the sample was kept

at -20 °C for 1 h to complete the precipitation. Finally, the sample was centrifuged (10,000 \times g, 20 min, 4 °C), the supernatant was eliminated, and the pellet was washed with 500 μ L of ethanol 70 %, dried and reconstituted in 50 μ L of deionized water.

For each extract, the absorption spectrum was acquired in the wavelength range 220–350 nm (Spectronic 3000, Milton Roy, Co. Ltd), and the absorbance ratios 260/280 nm were evaluated, considering the values $A_{260}/A_{280} > 1.8$ indicative for nucleic acids purity [27]. The concentration was determined by measuring absorbance at 260 nm; the evaluated extraction yields were in the range 70–600 ng of nucleic acids per mg of fresh sample. The obtained extracts containing DNA and RNA were kept at -20 °C prior to their analysis. Each biomass homogenate was extracted in triplicate.

Extraction of total RNA (method 2)

TRIzol[®] reagent was used according to the manufacturer indications. Concisely, an aliquot of 50 to 100 mg of fresh plant tissue was homogenized in liquid nitrogen, the sample was transferred to a 1.5-mL plastic tube containing 1 mL of the commercial reagent, vortex and left for 5 min at room temperature. Afterwards, 200 μ L of chloroform was added, the mixture was shaken vigorously for 15 s, left for 3 min at room temperature and centrifuged (12,000 \times g, 15 min, 4 °C). The supernatant (about 500 μ L) was recovered into a new tube; 500 μ L of isopropanol was added, incubated at room temperature for 10 min and then centrifuged (12,000 \times g, 10 min, 4 °C). The supernatant was eliminated, the pellet was washed with 500 μ L of ethanol (70 % *v/v*), dried and reconstituted in 50 μ L of deionized water. The absorbance ratios $A_{260}/A_{280} > 1.9$ were obtained, indicating acceptable RNA purity. The extraction yields were in the range 130–300 ng of total RNA per mg of fresh sample. The obtained extracts were kept at -20 °C prior to their analysis. The extraction was carried out in triplicate for each biomass homogenate.

Digestion of nucleic acids

The procedure was adopted from the previous studies [6, 18]. Each extract was appropriately diluted, the aliquot containing about 1 μ g of nucleic acids was brought to a volume 42 μ L with deionized water and 5 μ L of the hydrolysis buffer was added (acetic acid 200 mM, glycine 200 mM, magnesium chloride 50 mM, zinc chloride 5 mM, calcium chloride 2 mM, pH 5.3). The sample was incubated with 0.2 μ L of DNaseI 10 U/ μ L and 0.2 μ L of nuclease P1, 1 U/ μ L at 37 °C overnight and then heated in a boiling water bath for 5 min and cooled rapidly on ice to

avoid possible contamination by microorganisms. Afterwards, sodium hydroxide (5 μL , 100 mM) was added followed by 0.2 μL of alkaline phosphatase 1 U/ μL , and the sample was again incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h. Such prepared samples were kept at -20°C until analysis.

High-performance liquid chromatography procedure

Selective derivatization of cytosine groups in nucleic acids digests and reversed-phase liquid chromatography separation with fluorescence detection was carried out as previously described [18]. An aliquot of standard solution or nucleic acids hydrolyzate was placed in the 350- μL insert in the autosampler amber vial, the volume was brought to about 60 μL with deionized water, and the sample was evaporated (SpeedVac); the residue was reconstituted in 130 μL DMF anhydrous with addition of 5 μL glacial acetic acid. Afterwards, 20 μL of 2-bromoacetophenone (0.5 M in DMF anhydrous), sodium sulfate anhydrous were added, and the mixture was heated at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 90 min; at this stage, the samples were protected from light. The vials were placed in the autosampler for automatic dilution (1:1 with deionized water) and injection (20 μL). Column temperature was kept at 30 $^{\circ}\text{C}$, and gradient elution with four mobile phases (water (A), acetonitrile (B), TFA 0.4 %*m/v* (C), methanol (D)) was as follows: 0–2 min 62 % A, 5 % B, 13 % C, 20 % D; 2–9 min 49 % A, 10 % B, 13 % C, 28 % D; 9–13 min 47 % A, 12 % B, 13 % C, 28 % D; 13–16 min 12 % A, 15 % B, 13 % C, 60 % D with the total flow rate 0.35 mLmin^{-1} . Fluorimetric detection was carried out at excitation/emission wavelengths 306/378 nm, respectively.

The calibration was carried out using a set of mixed standard solutions containing C, dC, 5mC and 5mdC with molar ratios dC to 5mdC in the range 210.5–4.26 and molar ratios C to 5mC in the range 210.5–41.25 for DNA and RNA methylation, respectively. These calibration ranges corresponded to the values of cytosine methylation 0.47–19.0 % in DNA and 0.47–2.37 % in RNA.

Statistical analysis

Descriptive statistics was performed to obtain means and standard deviations. Statistical unpaired *t* test for independent samples was used to compare the mean values of global RNA methylation obtained for two different extraction procedures (methods 1 and 2). To evaluate possible relationship between DNA and RNA methylation obtained in plants grown under different exposure conditions, analysis of correlation was carried out. Significance level was established at $p < 0.05$. The software used was Statistica for Windows (Statsoft Inc., Tulsa, OK).

Results and discussion

The procedure according to Aljanabi and Martinez (method 1) provides DNA quality required for PCR-based reactions [26]; however, the amount of ribonucleic acids at least comparable to that of DNA is usually co-extracted, as observed in several studies [5, 18, 19, 28–30]. Therefore, the intent of the present work was to apply this extraction procedure to evaluate methylation percentages of cytosine groups in genomic DNA and in total RNA by means of HPLC-FLD analysis in a single analytical run. To that end, the two following queries had to be directed: (1) would the RNA co-extracted with DNA be representative for total RNA present in the biological sample, and (2) might the methylation of total RNA be considered as a biologically relevant parameter?

To answer the first question, method 1 was compared with the commercial TRIzol[®] reagent designed for selective extraction of total RNA (method 2). In regard to the second question, DNA and total RNA methylation were determined in a series of plant cultures expecting that plant exposure to abiotic stress might affect not only global DNA but also total RNA methylation.

Analysis of total RNA methylation

Calibration parameters obtained for cytidine and 5-methylcytidine in the concentration range 1.6–645 ng mL^{-1} of each compound (6.62 nM–2.65 μM C and 6.26 nM–2.51 μM 5mC) were consistent with those previously reported, yielding the on-column detection limits 14.4 fmol C and 16.6 fmol 5mC (0.72 nM C, 0.83 nM 5mC) [18]. The percentage of methylated cytosine moieties in RNA can be calculated using the formula $C_{5\text{mC}}/(C_{5\text{mC}} + C_{\text{C}}) \times 100\%$, where $C_{5\text{mC}}$ and C_{C} correspond to molar concentrations of the two compounds in the injected sample solution. To avoid tedious quantification of C and 5mC, a simplified calibration was carried out as described for DNA methylation [18]. Since the preliminary results showed relatively low RNA methylation in garden cress (roughly below 1 %), the calibration solutions set was prepared to cover the range of cytidine methylation 0.47–2.37 %. Specifically, chromatograms of the solutions containing different molar ratios C to 5mC (R_{RNA} values from 210.5 to 41.25) were obtained, and the ratio between the respective peak areas was used as analytical signal mode ($S_{\text{RNA}} = A_{\text{C}}/A_{5\text{mC}}$). For each calibration point, two solutions with different C and 5mC concentrations but identical molar ratio were prepared, and each was analyzed in triplicate. Mean R_{RNA} value from six chromatographic runs was taken as analytical signal, and the relative standard deviation did not exceed 1.5 %. Linear regression calibration $S_{\text{RNA}} = 1.068 R_{\text{RNA}} + 2.252$ with $R^2 = 0.9999$ was

obtained, and the percentage of RNA methylation was then calculated as $[1/(1+R_{RNA})] \times 100\%$ (the details are presented in the Electronic supplementary material (ESM) Figs. S1 and S2). In Fig. 1a, typical chromatograms of three calibration solutions corresponding to 0.95, 1.42 and 1.89 % 5mC are presented in a full scale mode (to observe clearly the changes of 5mC peak areas).

The extraction methods 1 and 2 were carried out to obtain two sets of nucleic acids extracts for nine garden cress cultures, each of them corresponding to different concentration levels of Cd(II) or Se(IV) added to the nutrient solution. Different selectivity of method 2 versus method 1 can be observed in Figs. 1b and 2, where the chromatograms obtained for control plant and plant exposed to Se(IV) (1 mgL^{-1} Se in nutrient solution) are presented. In Fig. 1b, corresponding to TRIzol® extraction of total RNA (method 2), the elution of labeled nucleosides (C, 5mC) can be observed, whereas dC and 5mdC were not detected (below DL). On the other hand, Fig. 2 shows chromatograms obtained using method 1; these extracts contained four compounds, confirming co-extraction of DNA and RNA, in agreement with previously reported data [18]. In Table 1, the RNA methylation results obtained in nine *L. sativum* cultures are presented; as can be observed, no statistically

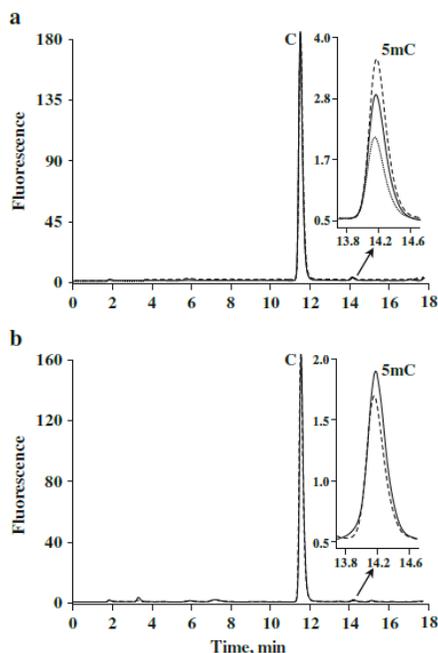


Fig. 1 HPLC-FLD chromatograms presented in a full scale mode: a calibration solutions corresponding to 0.95 % (ellipses), 1.42 % (solid line) and 1.89 % (dashed line) of 5mC. b Plant samples after RNA extraction with TRIzol®: control (solid line) and exposed to 1.0 mgL^{-1} Se(IV) (dashed line)

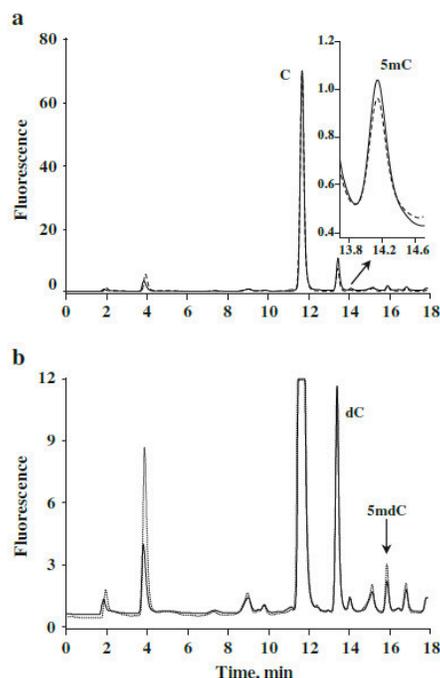


Fig. 2 HPLC-FLD chromatograms of control plant (solid line) and plant exposed to 1.0 mgL^{-1} Se(IV) (dashed line), obtained using method 1 (DNA+RNA) and presented in a full scale mode: a Y-scale and insert adjusted to visualize 5mC and C signals (RNA methylation). b Y-scale adjusted to visualize 5mdC and dC signals (DNA methylation)

significant differences were found between the percentages of cytosine methylation obtained in the application of two extraction procedures (test *t*, $p < 0.05$). These results indicate that RNA co-extracted together with DNA (method 1) would be representative for total RNA in the original sample (method 2). It should be stressed that the quantitative extraction was never intended, and in fact, varying amounts of RNA were obtained for each replicate and for each sample. As described in the “Experimental” section, method 1 yielded 70–600 ng of nucleic acids per 1 mg of biomass, and 130–300 ng of total RNA per mg of biomass were obtained in method 2 (estimated amounts of RNA and DNA in each extract are given in the ESM Table S1). The consistency of RNA methylation results presented in Table 1 points out that the rigorous protocol in terms of selectivity and the extraction yield is not required for the assessment of global methylation at C5 cytosine, as previously demonstrated for DNA methylation analysis [18].

Analysis of global DNA and total RNA methylation

Once demonstrated that RNA co-extracted with DNA was representative for total RNA in garden cress, method 1 was

Table 1 RNA methylation results obtained in plant cultures using two different extraction procedures (three independent replicates)

Sample ^a	Method 1		Method 2		<i>t</i> test
	Mean %5mC	SD	Mean %5mC	SD	
Control	0.878	0.030	0.904	0.024	0.31
0.2 mgL ⁻¹ Se	0.782	0.022	0.799	0.028	0.45
0.5 mgL ⁻¹ Se	0.745	0.016	0.752	0.018	0.64
1.0 mgL ⁻¹ Se	0.693	0.018	0.727	0.016	0.07
2.0 mgL ⁻¹ Se	0.647	0.017	0.674	0.024	0.19
0.5 mgL ⁻¹ Cd	0.748	0.033	0.775	0.033	0.37
1.0 mgL ⁻¹ Cd	0.744	0.210	0.767	0.018	0.22
2.0 mgL ⁻¹ Cd	0.728	0.023	0.764	0.017	0.09
5.0 mgL ⁻¹ Cd	0.779	0.019	0.773	0.014	0.68

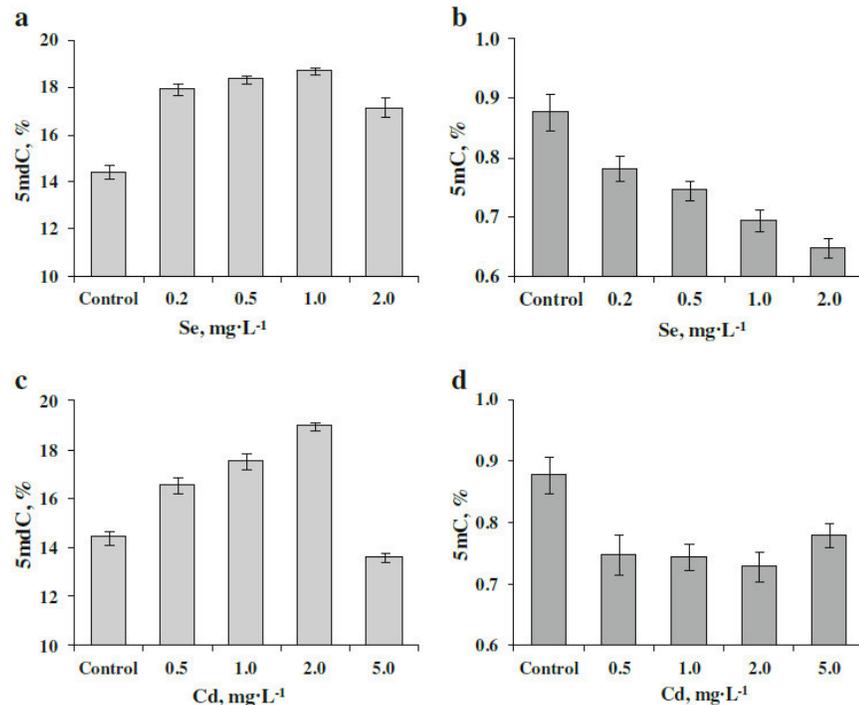
^aConcentrations of stressor ions (Cd(II) and Se(IV)) in the nutrient solution

used in further analyses. The concentration ranges of cadmium (0.5–5.0 mgL⁻¹) and selenium (0.2–2.0 mgL⁻¹) in the nutrient solution were selected based on the previous results; the aim was to stimulate phytotoxic effects in garden cress yet maintaining vital processes active [22, 23, 25]. Global methylation of DNA and total RNA was then evaluated in nine plant groups obtained using HPLC-FLD with simplified calibration [18]; at this stage, each calibration solution contained four standards, as described in the “Experimental” section (chromatograms shown in ESM Fig. S3). The chromatograms obtained for control plant and plant treated with Se(IV) (1 mgL⁻¹ Se in the nutrient solution)

after nucleic acid extraction with method 1 are shown in Fig. 2; for clarity of presentation, a full scale mode was applied in order to observe exposure-dependent changes in the intensity of 5mC chromatographic peak (Fig. 2a) as well as 5mdC (Fig. 2b). The calibration results and the presented chromatograms indicate feasibility of the simultaneous evaluation of cytidine and deoxycytidine methylation in a single analytical run.

The results obtained for *L. sativum* grown in the presence of different Se(IV) and Cd(II) concentration levels are shown in Fig. 3. In control plants, the DNA methylation 14.43±0.15 % was found, in agreement with the previous

Fig. 3 Results obtained for RNA and DNA methylation in plants under different exposure conditions



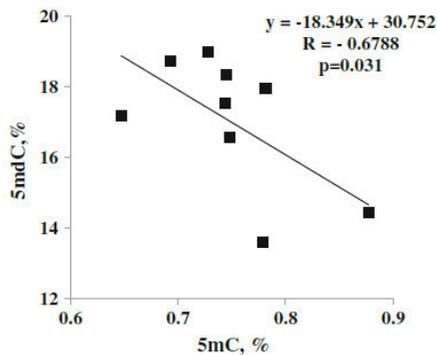


Fig. 4 Correlation analysis of global DNA and RNA methylation evaluated in nine *L. sativum* cultures at different exposure conditions

work [18]. As can be observed in Fig. 3a, c, global DNA methylation found in *L. sativum* was higher in the exposed cultures as compared to the control, specifically in the concentration ranges of stressor ions $0.2\text{--}1.0\text{ mgL}^{-1}$ for selenium and $0.5\text{--}2.0\text{ mgL}^{-1}$ for cadmium; however, further increase of stressor concentration (2.0 mgL^{-1} for selenium and 5.0 mgL^{-1} for cadmium) caused the drop of DNA methylation. These results seem to support previous studies where the observed divergences in DNA methylation in plant species depended on specific environmental stimuli [20, 31]. For cadmium, hypomethylation was reported in 2-week-old rape seedlings hydroponically grown in the presence of Cd (II) (above 40 mgL^{-1}), while in the present study, a tendency toward decreased methylation was observed in garden cress even at lower cadmium concentration (5.0 mgL^{-1}). On the other hand, using comparable Cd(II) concentrations as in this work ($<5\text{ mgL}^{-1}$) and shorter treatment times (up to 4 days), the increase in methylation level was reported in the exposed *Posidonia oceanica* versus control culture [20]. Selenium, the second element in this study, is considered beneficial for the plant growth and may act as heavy metal antagonist; yet in garden cress, its phytotoxic effects have been reported [23]. According to other authors [31] and based on our results presented in Fig. 3, the increase of DNA methylation rates at low Cd(II) and Se(IV) concentrations should be ascribed to the activation of plant defensive mechanisms, whereas at higher stressor concentrations (at least 2.0 mgL^{-1} Se, 5.0 mgL^{-1} Cd), phytotoxic effects manifest by the loss of DNA methylation.

The methylation results obtained for total RNA in *L. sativum* cultures are presented in Fig. 3b, d. In control plants, the value $0.88\pm 0.03\%$ was found, and the exposure to Se(IV) or Cd(II) caused the stressor concentration-dependent decrease of this parameter (except for 5.0 mgL^{-1} Cd). The events of methylation/demethylation of C5 cytosine at specific loci have been detected in various cellular RNAs [10, 20]; however, to the best of our knowledge, this is the first information

reporting percentage values of total RNA methylation, for which any comparative evaluation is not straightforward. In another study using the method based on bisulfite sequencing, the loss of transfer RNA methylation was observed after azacytidine treatment in human cancer cell lines [32]. Azacytidine is a cytosine analogue, inhibitor of DNA methylation and a candidate drug for epigenetic cancer therapy; based on the results obtained, the authors hypothesized that tRNA hypomethylation might contribute to patient responses to azacytidine and highlighted the need to evaluate RNA methylation for its potential as a molecular marker predicting such clinical responses [32]. In this regard, our results seem to indicate that environmental stimuli, in particular exposure to Cd(II) and Se(IV), are capable to alter total RNA methylation in *L. sativum*. Furthermore, the plant treatment with Cd(II) and Se(IV) seemed to have opposite effects on global DNA and total RNA methylation (Fig. 3), and indeed, a statistically significant inverse correlation between these two parameters was found as shown in Fig. 4 ($r=-0.6788$, $p=0.031$). The results obtained seem to support previous studies and included there notion that RNA methylation might be tightly related to DNA methylation in the context of epigenetic regulation under environmental stimuli [10, 14, 16, 17].

Conclusions

In the present note, the feasibility of HPLC-FLD procedure for simultaneous evaluation of global DNA and total RNA in a single nucleic acid plant extract has been demonstrated. On the other hand, the analytical results obtained for garden cress exposed to varying concentrations of Cd(II) or Se(IV) indicate that this procedure might provide biologically relevant information. In particular, the methylation of total RNA has been evaluated in this work for the first time, and the observed decrease of 5mC percentage in the treated plants as compared to the controls seems to suggest that this parameter can be considered a potential, complementary molecular marker of plant response to abiotic stress. Furthermore, a statistically significant inverse correlation between global DNA and total RNA methylation found in the plants after different treatment seems to strengthen previously postulated link between DNA and RNA methylation status and suggests possible role of RNA methylation in epigenetic response to environmental stimuli in garden cress. It has to be stressed however that this technical note is presented as a proof of concept rather than a fully validated biological study, for which further investigation focusing on the fractionation of RNAs, analysis of different plant species and stress conditions is needed.

Acknowledgments The financial support from National Council of Science and Technology, Mexico (CONACYT), project 178553, is gratefully acknowledged.

References

- Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR (2009) *J Cell Physiol* 219:243–250
- Su Z, Han L, Zhao Z (2011) *Epigenetics* 6:134–140
- Martin-Subero JI (2011) *Pediatr Endocrinol Rev* 9(Suppl 1):506–510
- Salnikow K, Zhitkovich A (2008) *Chem Res Toxicol* 21:28–44
- Maldonado Santoyo M, Rodriguez Flores C, Lopez Torres A, Wrobel K, Wrobel K (2011) *Environ Pollut* 159:2387–2392
- Rozhon W, Baubec T, Mayerhofer J, Mittelsten Scheid O, Jonak C (2008) *Anal Biochem* 375:354–360
- Wright RO, Schwartz J, Wright RJ, Bollati V, Tarantini L, Park SK, Hu H, Sparrow D, Vokonas P, Baccarelli A (2010) *Environ Health Perspect* 118:790–795
- Guerrero-Preston R, Baeza A, Blanco A, Berdasco M, Fraga M, Esteller M (2009) *P R Health Sci J* 28:24–29
- Cantara WA, Crain PF, Rozenski J, McCloskey JA, Harris KA, Zhang X, Vendeix FA, Fabris D, Agris PF (2011) *Nucl Acids Res* 39:D195–D201
- Motorin Y, Lyko F, Helm M (2010) *Nucl Acids Res* 38:1415–1430
- Krauss V, Reuter G (2011) *Prog Mol Biol Transl Sci* 101:177–191
- Chinnusamy V, Zhu JK (2009) *Sci China C Life Sci* 52:331–343
- Wang B, Li Y, Shao C, Tan Y, Cai L (2012) *Curr Med Chem* 19:2611–2620
- Mattick JS, Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mehler MF (2009) *BioEssays* 31:51–59
- Becker M, Muller S, Nellen W, Jurkowski TP, Jeltsch A, Ehrenhofer-Murray AE (2012) *Nucl Acids Res* DOI: [10.1093/nar/gks956](https://doi.org/10.1093/nar/gks956)
- Squires JE, Hardip RP, Nusch M, Sibbritt T, Humphreys DT, Parker BJ, Suter CM, Preiss T (2012) *Nucl Acids Res* doi: [10.1093/nar/gks144](https://doi.org/10.1093/nar/gks144)
- Schaefer M, Pollex T, Hanna K, Lyko F (2009) *Nucl Acids Res* 37:e12/11–e12/10
- Lopez Torres A, Yanez Barrientos E, Wrobel K, Wrobel K (2011) *Anal Chem* 83:7999–8005
- Alcazar Magana A, Wrobel K, Alvarado Caudillo Y, Zaina S, Lund G, Wrobel K (2008) *Anal Biochem* 374:378–385
- Greco M, Chiappetta A, Bruno L, Bitonti MB (2012) *J Exp Bot* 63:695–709
- Czuba M, Kraszewski A (1994) *Ecotoxicol Environ Safe* 29:330–348
- Frias J, Gulewicz P, Martinez-Villaluenga C, Penas E, Piskula MK, Kozłowska H, Ciska E, Gulewicz K, Vidal-Valverde C (2010) *J Agric Food Chem* 58:2331–2336
- Yanez Barrientos E, Rodriguez Flores C, Wrobel K, Wrobel K (2012) *J Mex Chem Soc* 56:1–7
- Pedrero Z, Madrid Y, Hartikainen H, Camara C (2008) *J Agric Food Chem* 56:266–271
- Torres Elguera JC, Yanez Barrientos E, Wrobel K, Wrobel K (2012) *Acta Physiol Plant* DOI: [10.1007/s11738-11012-11086-11738](https://doi.org/10.1007/s11738-11012-11086-11738)
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) *Nucl Acids Res* 25:4692–4693
- Mitra SE (2003) *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Wiley, Hoboken
- Rangel-Salazar R, Wickström-Lindholm M, Aguilar-Salinas CA, Alvarado Caudillo Y, Dossing KBV, Esteller M, Labourier E, Lund G, Nielsen FC, Rodriguez Rios D, Solis Martinez MO, Wrobel K, Wrobel K, Zaina S (2011) *BMC Genomics* 12:582–593
- Carpinteyro-Espin P, Jacinto-Ruiz S, Caballero-Vazquez P, Alvarado Caudillo Y, Lund G, Rodriguez-Rios D, Martinez-García JA, Wrobel K, Wrobel K, Zaina S (2011) *Epigenetics* 6:333–343
- Wrobel K, Landero Figueroa JA, Zaina S, Lund G, Wrobel K (2010) *J Chromatogr B* 878:609–614
- Aina R, Sgorbati S, Santagostino A, Labra M, Ghiani A, Citterio S (2004) *Physiol Plant* 121:472–480
- Schaefer M, Hagemann S, Hanna K, Lyko F (2009) *Cancer Res* 69:8127–8132

New Insights into Somatic Embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*

Geovanny I. Nic-Can¹, Adolfo López-Torres³, Felipe Barredo-Pool⁴, Kazimierz Wrobel³, Víctor M. Loyola-Vargas², Rafael Rojas-Herrera¹, Clelia De-la-Peña^{4*}

1 Campus de Ciencias Exactas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, **2** Centro de Investigación Científica de Yucatán, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Mérida, Yucatán, México, **3** Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México, **4** Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

Abstract

Plant cells have the capacity to generate a new plant without egg fertilization by a process known as somatic embryogenesis (SE), in which differentiated somatic cells can form somatic embryos able to generate a functional plant. Although there have been advances in understanding the genetic basis of SE, the epigenetic mechanism that regulates this process is still unknown. Here, we show that the embryogenic development of *Coffea canephora* proceeds through a crosstalk between DNA methylation and histone modifications during the earliest embryogenic stages of SE. We found that low levels of DNA methylation, histone H3 lysine 9 dimethylation (H3K9me2) and H3K27me3 change according to embryo development. Moreover, the expression of *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*) and *BABY BOOM1* (*BBM1*) are only observed after SE induction, whereas *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* (*WOX4*) decreases its expression during embryo maturation. Using a pharmacological approach, it was found that 5-Azacytidine strongly inhibits the embryogenic response by decreasing both DNA methylation and gene expression of *LEC1* and *BBM1*. Therefore, in order to know whether these genes were epigenetically regulated, we used Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assays. It was found that *WOX4* is regulated by the repressive mark H3K9me2, while *LEC1* and *BBM1* are epigenetically regulated by H3K27me3. We conclude that epigenetic regulation plays an important role during somatic embryogenic development, and a molecular mechanism for SE is proposed.

Citation: Nic-Can GI, López-Torres A, Barredo-Pool F, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, et al. (2013) New Insights into Somatic Embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*. PLoS ONE 8(8): e72160. doi:10.1371/journal.pone.0072160

Editor: Hector Candela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Spain

Received: April 16, 2013; **Accepted:** July 7, 2013; **Published:** August 20, 2013

Copyright: © 2013 Nic-Can et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: These studies were supported by L'OREAL-UNESCO-AMC and CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT), grants 213451 to GN, Conacyt 178149 to CD and 157014 to VMLV. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: clelia@cicy.mx

Introduction

All living organisms ensure their species' survival by reproduction. Both mammals and higher plants use different strategies of reproduction through gamete fusion, through which an embryo is developed. However, plants, unlike mammals, have developed sophisticated strategies of reproduction without egg fertilization to ensure the survival of the offspring [1], such as apomixis or vegetative propagules [2,3]. For instance, in *Tripsacum*, a weedy relative of maize, the development of an embryo from an egg cell occurs without fertilization [4], and some Agave species can generate small plantlets from inflorescences or rhizomes [5]. Taking advantage of the ability of plants to regenerate a new plant from a cell or group of somatic cells, these organisms have developed a process known as somatic embryogenesis (SE). SE is one of the most intriguing processes in plants [1] and a powerful biotechnological tool to multiply plants that are difficult to propagate by conventional methods or for plants at risk of extinction [6]. There have been several attempts to understand the

molecular mechanisms that occur during the transition from somatic cell to embryogenic cell [7,8,9].

It has been proposed that genes such as *BABY BOOM1* (*BBM1*) and *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*) are needed during the beginning of SE [10,11]. *BBM1* is preferentially expressed in developing embryos and seeds of *Brassica napus*, while *BnBBM1* overexpression promotes cell proliferation and morphogenesis during embryogenesis [10]. In addition, it has been identified that *BBM1* activates genes involved in cell wall modifications associated with dividing and growing cells, suggesting that *BBM1* activates a complex network of developmental pathways associated with cell proliferation [12]. On the other hand, *LEC1* plays a central role in seed maturation in *Arabidopsis*, and it has been proposed as a key regulator for embryogenic identity. It is also thought that its ectopic expression promotes embryo development [11]. Furthermore, *AtLEC1* integrates activities at diverse regulatory levels, such as transcription factors, hormones and light signaling in both somatic and zygotic embryogenesis [13]. All these findings indicate

common developmental pathways between somatic and zygotic embryogenesis. Another gene that has been related to SE is the *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX (WOX)*, which has specialized functions in various developmental processes in plants, such as embryogenic patterning and stem cell maintenance [14]. For instance, in *Arabidopsis* and tomato, *WOX4* plays an essential role promoting and maintaining the vascular procambium [15,16], while in SE of *Vitis vinifera*, *WOX4* increases its expression levels when the embryo begins to germinate [17]. Despite such advances in the understanding of the molecular basis of SE, the epigenetic mechanisms, such as DNA methylation and histone modifications, that occur during this important biological process are not well understood [18–21].

DNA methylation and histone modifications occur widely during cellular differentiation and development in plants and mammals [18,22,23]. DNA methylation is one of the epigenetic regulatory mechanisms most studied in plant development, and the scientific contributions related to its role in blooming, endosperm development, response to stress, genome maintenance, gene silencing, control of transposable elements and genomic imprinting have helped to understand important regulatory processes [24–26]. In the case of histone modifications, it is known that they are required in the activation or repression of gene transcription by changing chromatin structure. For instance, di- or trimethylation of histone H3 at lysine 4 and 36 (H3K4me2/me3 and H3K36me2/me3) are related to transcriptional active chromatin [27,28]; in contrast, H3K9me2 and H3K27me3 are considered to be repressive marks [29–31]. Previous reports have shown that embryogenic cell formation increases DNA methylation in *Daucus carota* and *Cucurbita pepo* [32,33]. However, Charkrabarty et al. [34] reported that in order to obtain an embryogenic calli from *Eleuterococcus senticosus*, low levels of DNA methylation are needed. More recently, Viejo et al. [20] showed in *Castanea sativa* that DNA demethylation is required for SE induction and further development of somatic embryos in this species. On the other hand, it was recently reported that both DNA methylation and H3K9me2 modulate *WUSCHEL* expression *in vitro* during shoot regeneration in *Arabidopsis* [35]. Furthermore, the H3K27me3 repressive mark plays an important role in the regulation of genes involved in biosynthesis, transport, perception and signaling of auxins, and zygotic embryogenesis development [36,37]. Based on this information, the aim of the present study is to further extend our understanding of the epigenetic means by which SE in plants is regulated and propose a regulatory mechanism for *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* in somatic embryo development. In this study, we used *Coffea canephora* due to its highly embryogenic response *in vitro* [38] and its economical relevance worldwide. *C. canephora* is one of the two economically important species of coffee and it represents the 25% of coffee in the market. *Coffea* spp is the second most traded commodity in the world after oil. Raw coffee generates between \$15 and \$20 billion per year for exporting countries [39]. Because of these economic aspects, many research initiatives have been targeted genomic and transcriptomic data of *Coffea* spp., which could contribute to an understanding of the biology of coffee [40,41]. However, studies in epigenetics are also needed to understand more about the molecular mechanisms of growth and reproduction in this plant. The results of this work reveal specific chromatin modifications during SE in coffee, which could give some answers about the regulatory events that take place during embryo development to improve breeding practices.

Results

Induction, Morphology and Histology of Somatic Embryogenesis in *Coffea canephora*

In order to investigate the epigenetic and molecular changes at the different developmental stages of somatic embryo formation, we performed *in vitro* SE induction. *In vitro* *C. canephora* plantlets were preconditioned with naphthalene acetic acid (NAA) and kinetin for 14 days. Then, young leaves were cut and cultured in liquid medium supplemented with 5 μ M benzyl-adenine (BA) for 56 days (see Materials and Methods). Between 21 and 28 days after induction (dai), the dense cellular formation known as proembryogenic mass (Pm) was noticed (Figure 1). The formation of new meristematic centers in Pm allows the emergence of the first embryogenic stage, the globular (G), at day 35 (Figure 1 and Figure 2). After that, the formation of several embryogenic structures such as the G, the heart stage (H), the torpedo stage (T) and the cotyledonary stage (C) were observed at 42 and 49 dai (Figure 1 and Figures 2B–F). Finally, at 56 dai, the explant was surrounded by all embryo stages (Pm, G, H, T and C), and, by scanning electron microscopy, it was observed that Pm emerges from the inner cells in the explant margin (Figure 2). In the case of H, a bifurcation on the top of the structure was observed (Figure 2C). During the transition from H to T, the embryo starts to elongate, and the axis polarity starts to appear; this polarity is crucial for the formation of the apical and radicular meristems (Figure 2D). During the last stage, the C stage, the cotyledons start to expand and separate (Figure 2F). Histological analyses also revealed that new meristematic centers allowing to early G stage, originate from embryogenic cells, which are small with respect to neighboring cells (Figure 3A). In the G stage, the procambium cells, which form the basic structure of the future plant, are well defined (Figure 3B). During the transition from the G to the H stage, the embryogenic axis for elongation and the split of the procambium are defined (Figure 3C). The T stage presents an elongated embryo, and a fully polarized procambium was observed (Figure 3D). Finally, in the C stage, the presence of the cotyledons in the embryo is evident (Figure 3E) and both the shoot and root stem cell pools are well established (Figure 3F).

Changes in DNA Methylation during Somatic Embryogenesis

In order to know whether DNA methylation plays a role in the SE process, we analyzed global DNA methylation during the SE temporal course of 56 days (Figure 4A) and at different developmental stages of somatic embryos (Figure 4B). It was observed that during the beginning of the 56-day course of the SE process, there is a gradual increase in 5-methyl-2'-deoxycytosine (5 mdC) levels, from 23.8% at the beginning of the induction (0 days) to 29% at 56 days (Figure 4A). However, at days 21 and 28, a decrease in DNA methylation content was observed, 24.8% and 23.5%, respectively (Figure 4A). This might be related to a rapid cell proliferation of the dedifferentiated tissue (Figure 1; 28 days). However, by day 35, when the first embryo stages begin to appear, a gradual increase in the level of DNA methylation was observed until day 56, when a significant increase (indicated with an asterisk) in DNA methylation was observed (Figure 4A). These results indicate that the differentiation of the embryogenic structures is accompanied by an increase in DNA methylation (Figures 1 to 4).

Since we observed important changes in the content of DNA methylation during the course of SE development (Figure 4A), we analyzed the content of DNA methylation in each embryo developmental stage (Figure 4B). Somatic embryos were separated

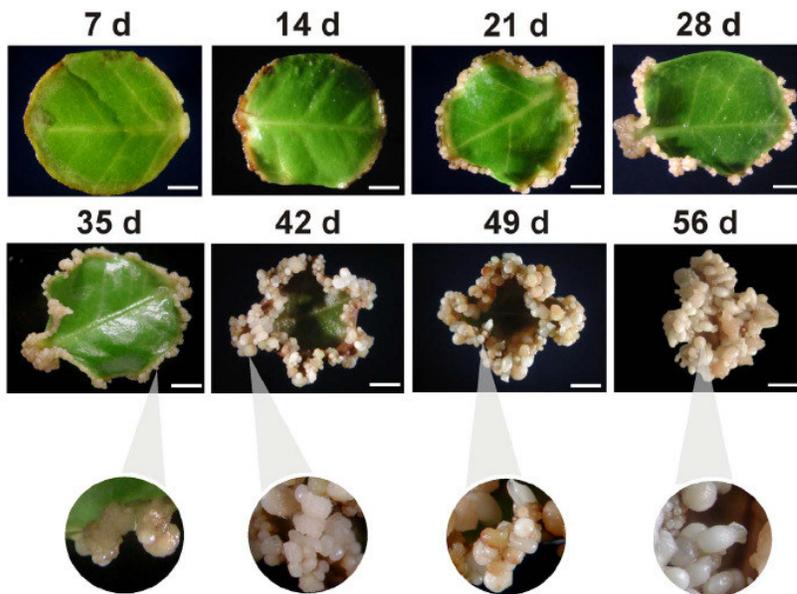


Figure 1. Development of the somatic embryogenesis process in *Coffea canephora*. Leaf explants were cultured in liquid Yasuda medium in the presence of 5 μ M of benzyl adenine under dark conditions. The embryogenic process starts with the thickening of leaf edges at 14 days after induction (dai), cellular proliferation and the development of the proembryogenic mass (Pm), between 21 and 28 dai. Differentiation of the first somatic embryogenic structures from Pm starts to appear at 35 dai and the differentiation of the late embryogenic stages begins at 42 dai until 56 dai. A close-up of the embryos is shown in circles. Bars = 4 mm.
doi:10.1371/journal.pone.0072160.g001

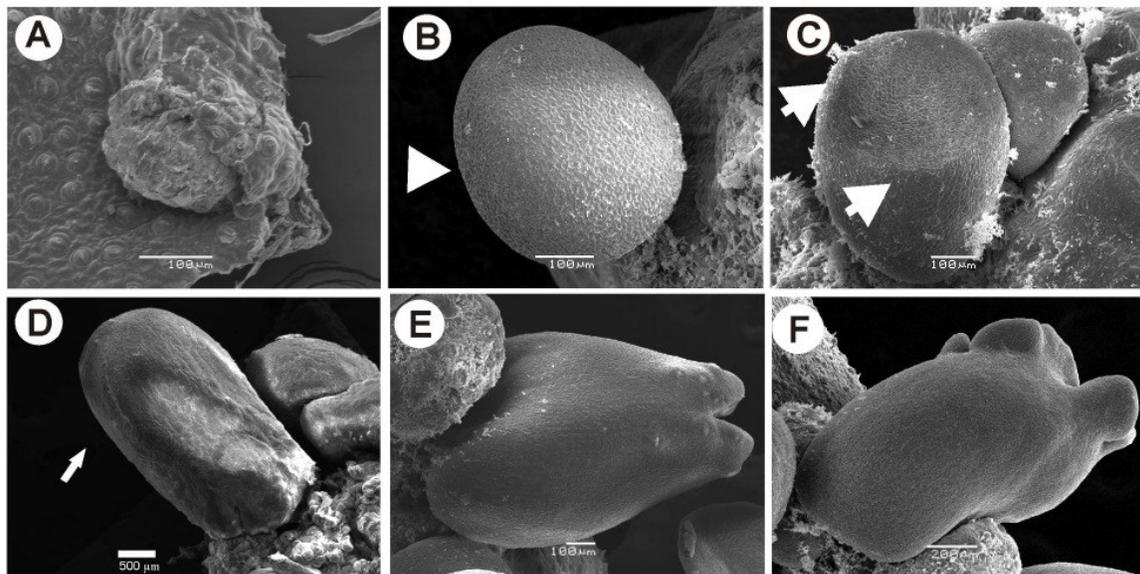


Figure 2. Scanning electron microscopy of the somatic embryo development in *Coffea canephora*. A) Proembryogenic mass (Pm) from a leaf explant at 21 days after induction (dai). B) Globular stage; the white arrowhead indicates the protoderm establishment. C) Heart stage; the white arrows indicate the beginning of the cotyledonary primordia in the embryo. D) Torpedo stage; the white arrow indicates the enlargement of the embryo. E) Early cotyledonary stage, where the establishment of the future cotyledons can be observed. F) Late cotyledonary stage. At this stage the cotyledons are fully developed. Bars = 100 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0072160.g002

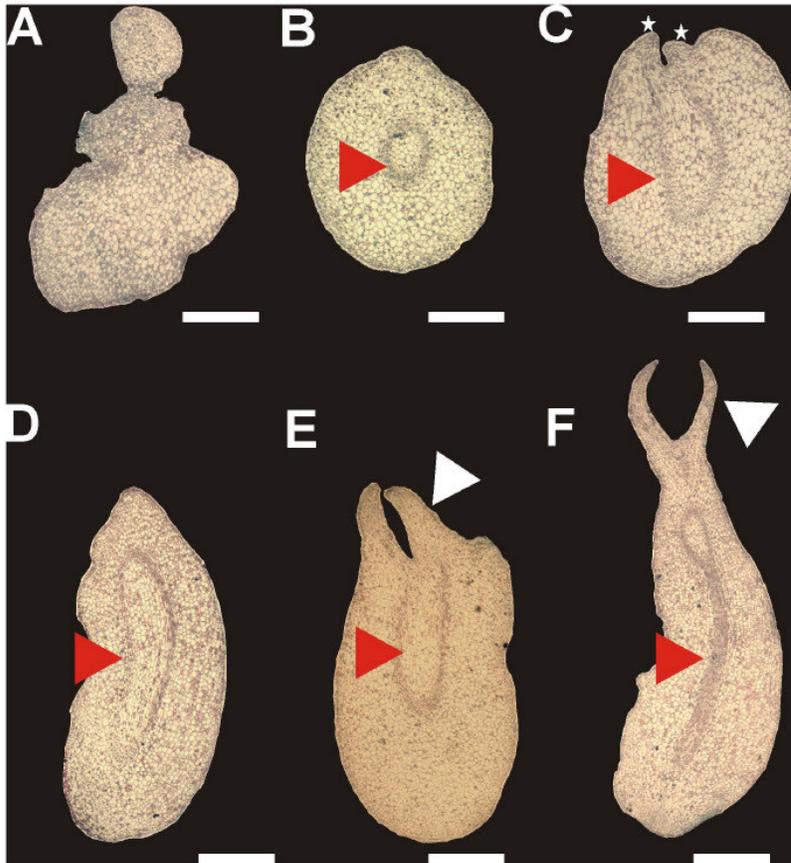


Figure 3. Histological dissection of the somatic embryo at different developmental stages in *Coffea canephora*. **A)** Transverse cut of the early globular stage from the proembryogenic mass at 14 dai. **B)** Transverse cut of the globular stage. The red arrowhead indicates the cellular organization and the presence of a well-defined procambium. **C)** Longitudinal cut of the heart stage. The red arrowhead indicates the initiation of the elongation of the procambium zone and the beginning of the cotyledonary primordium is indicated with white stars. **D)** Longitudinal cut of the torpedo stage. The red arrowhead indicates the elongation of the procambium zone. **E)** Longitudinal cut of the early cotyledonary stage. The red arrowhead indicates the procambium zone, while the white arrowhead indicates the development of the early cotyledonary primordium. **F)** Longitudinal cut of the late cotyledonary stage. The red arrowheads indicate the procambium zone, and the white arrowhead indicates the development of cotyledonary primordium. Bars = 200 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0072160.g003

by stages (Pm, G, H, T and C) and their DNA methylation content was compared with that of the *in vitro* plantlet (P) and the zygotic embryo, in its cotyledonary stage, isolated from coffee seeds (Z) (Figure 4B). The lowest DNA methylation percentage (23.7%) was observed in Pm, which was separated from the explant and isolated at 28 dai. It was also observed that DNA methylation increases as the embryo develops, and the highest content of DNA methylation was found in the T and C stage. On the other hand, the plantlets presented a difference of 5% in DNA methylation content in comparison with the somatic cotyledonary stage (Figure 4B), whereas the zygotic embryo had 2% less DNA methylation than the somatic embryo at the same developmental stage (Figure 4B).

Effect of 5-Azacytidine during the Somatic Embryogenic Process

In order to know whether the increase in DNA methylation is related to the onset and differentiation of somatic embryos, a pharmacological assay was performed with two different concentrations (10 μ M and 20 μ M) of 5-azacytidine (5-AzaC, a DNA methylation inhibitor) and without 5-AzaC (control) (Figure 5). The 5-AzaC was added every 7 days (until day 56) starting at independent time points (7, 14, 21 and 35) to see the effect of this compound when it is added at the beginning (day 7 or 14) or at the end of the process (day 21 or 35). The number of somatic embryos from each developmental stage in each of the four time experiments with 5-AzaC was counted at 56 dai (Figure 5B; see Materials and Methods). It was observed that 5-AzaC had a dramatic negative effect on the embryogenic response when it was added from day 7 after induction at both concentrations. However, this negative effect was not observed

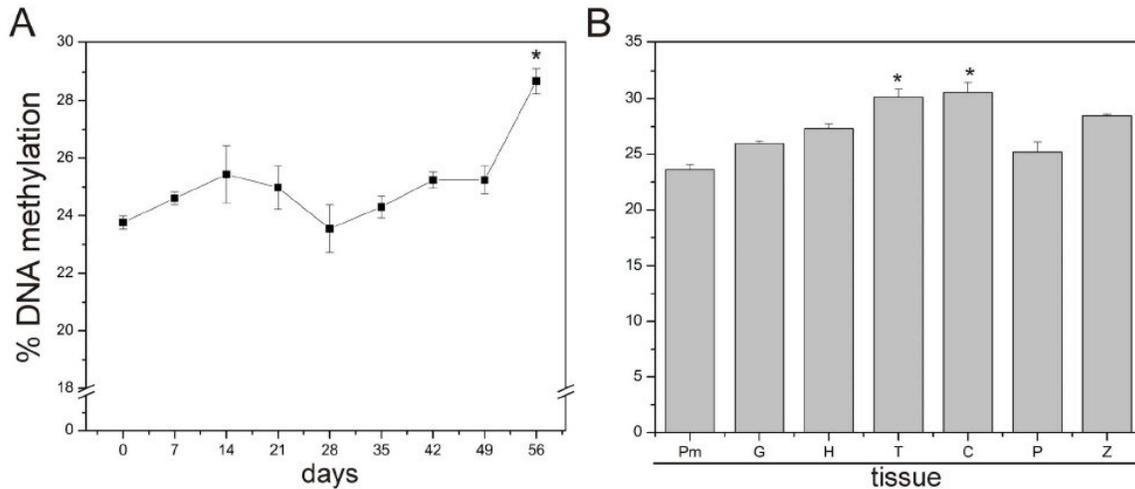


Figure 4. Global DNA methylation levels during somatic embryogenic induction and the separate embryogenic stages and tissues of *Coffea canephora*. **A)** Percentage of global DNA methylation during the development of the somatic embryogenesis process in *Coffea canephora* shown in Figure 1. **B)** DNA methylation levels of different tissues and developmental somatic embryo stages. Pm: Proembryogenic mass, G: Globular stage, H: Heart stage, T: Torpedo stage, C: Cotyledonary stage, P: *C. canephora in vitro* plantlets, Z: *C. canephora* zygotic embryo in cotyledonary stage. Bars represent the mean \pm SE ($n=3$). An asterisk represents the statistical significance of mean differences at a given time by the Tukey test ($P\leq 0.05$). Each experiment was carried out three times.
doi:10.1371/journal.pone.0072160.g004

when this inhibitor was added at day 35 after induction (Figure 5A). Furthermore, it was observed that 5-AzaC at 10 μ M, added at day 7, provoked a reduction of 86% in the total number of somatic embryos and at 20 μ M a reduction of up to 98%, in comparison with the control without 5-AzaC (Figure 5B). Interestingly, the effects of 5-AzaC when it was added at day 14 were less dramatic in comparison with its addition at day 7 (Figure 5). On the other hand, we did not observe visible impairing effects due to 5-AzaC in the formation of the somatic embryo in both concentrations added at day 21; in contrast, it was found that its presence increases the proliferation of Pm, delaying the formation of embryogenic structures (Figure 5A). However, the presence of 20 μ M of 5-AzaC increases the number of G embryos by 1.6 fold in comparison with the control (Figure 5B). This result suggests that the effect of 5-AzaC (mainly at 20 μ M) added at day 21 after induction, not only seems to synchronize the embryogenic process, but also reduces the embryo maturation (Figure 5). Furthermore, this result was also observed in the treatment with 5-AzaC at day 35, when we observed higher somatic embryos at early stages of development, mainly G and H, in comparison with the control. These findings suggest that 5-AzaC can disrupt the normal development of somatic embryos at early stages of the process, probably by affecting threshold levels of DNA methylation. Therefore, to test this hypothesis, we assessed whether impaired-embryo formation due to 5-AzaC was indeed due to a loss in DNA methylation levels. The explants from day 7 were treated with 10 μ M of 5-AzaC, every seven days from day 7 until day 56, and the content of 5 mdc was evaluated (Figure S1). The results show that the addition of 5-AzaC drastically reduces the content of DNA methylation from 23.5% at 7 dai to 14% at 56 dai (Figure S1). These results indicate that gradual DNA demethylation due to the addition of 5-AzaC (10 μ M) from day 7 after induction is directly correlated with impaired embryogenic induction (Figure 5).

Histone Methylation Patterns during SE

It is known that histone posttranslational modification is a fundamental key for chromatin conformation and regulation of transcriptional activity of genes related to development [42,43]. Therefore, we investigated whether, besides DNA methylation, global histone H3 methylation is related to the embryogenic response and establishment of the somatic embryo in *C. canephora* (Figure 6). Nuclear proteins were isolated from explants under embryogenic induction in a temporal course of 49 days (Figure 6A; see Materials and Methods) and from somatic embryos from each developmental stage (Figure 6B). Changes in H3 methylation were detected by Western blot using antibodies against di- and trimethylation of H3K4, H3K9me2 and H3K27me3. We observed interesting changes in global histone methylation patterns in the explants under embryogenic conditions. For instance, after embryogenic induction (day 7), a decrease in the global H3K4me3, H3K9me2 and H3K27me3 marks compared with day 0 was observed (Figure 6A). Interestingly, the presence of the repressive mark H3K9me2 was undetectable at 21 and 28 dai, whereas a decrease in DNA methylation was also observed on these days during the SE process (Figure 4A). On the other hand, the H3K27me3, another repressive mark, was maintained unchanged to the end of the process, an exception for day 7 (Figure 6A).

In order to know whether these epigenetic marks in the H3 histone were changed in each developmental stage of the embryo, the global histone H3 methylation patterns of H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 and H3K27me3 from Pm to C stages were evaluated (Figure 6B). We detected dynamic changes in the global H3K9me2 and H3K27me3 marks and particularly in the Pm, G and T stages were low. Interestingly, these repressive marks are increased in the H and C stage. On the other hand, the H3K4me2 and H3K4me3 marks were abundant throughout all somatic embryo stages. All together, the results indicate that global histone methylation changes (especially both repressive marks

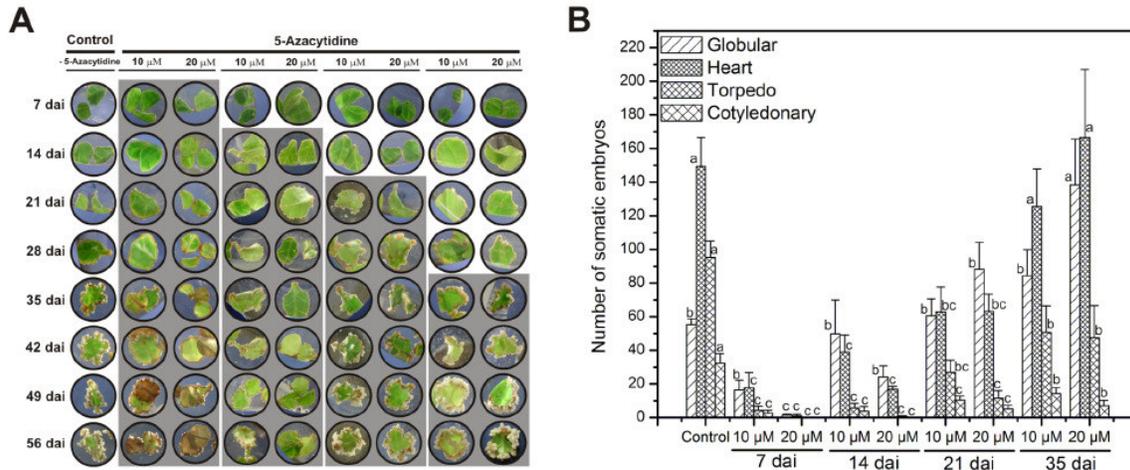


Figure 5. Effects of 5-Azacytidine (5-AzaC) in the somatic embryogenesis of *Coffea canephora*. **A)** Temporal course of explants from *C. canephora* leaves under embryogenic induction with and without (control) the presence of 5-AzaC at 10 μ M and 20 μ M. The 5-AzaC was added into the medium every seven days starting at different independent time points (day 7, 14, 21 and 35) of the SE culture. The shaded rectangles mean the presence of 5-AzaC in the medium, as indicated in Materials and Methods. **B)** The number of every somatic embryo stage was counted after 56 days after induction (dai), with and without (control) the treatments with 5-AzaC added at different time points after the induction (day 7, 14, 21 and 35). The bars represent the mean \pm SE ($n=3$). Different letters in columns represent the statistical significance of mean differences between each embryogenic stage at a given time by Tukey test ($P\leq 0.05$). The experiments were performed three independent times. doi:10.1371/journal.pone.0072160.g005

H3K9me2 and H3K27me3) together with DNA methylation (Figure 4) could contribute to the transition from somatic cells into somatic embryos.

Gene Expression Patterns during the SE

Previous reports have shown that *LEC1* and *BBM1* play a crucial role during the SE process [7,10,11]. Therefore, we searched these genes in *C. canephora* in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?ORG=Cca&LID=25442>) and in the Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net/content/coffee.pl>). We found that the ORF of the sequence GT656663.1 of *C. canephora* encodes for the central B domain of the HAP3 subunit of the transcription factor *LEC1*, required for

DNA binding [11], which has a high degree of similarity to the B domains of the other *LEC1* orthologs (Figure S2). For instance, this sequence showed 82% similarity to both *Arabidopsis thaliana* (*AtLEC1*) and *Medicago truncatula* (*MtLEC1*), 83% to *Daucus carota* (*DcLEC1*), 84% to *Isoetes sinensis* (*LCAAAT-box*), 86% to both *Brassica napus* (*BnLEC1*) and *Pistacia chinensis* (*PtLEC1*), 87% to both *Zea mays* (*ZmLEC1*) and *Oryza sativa* (*OsLEC1*) and 95% to the sequence of *Theobroma cacao* (*TcLEC1*). On the other hand, we found that translation products of the sequences GT656313.1 and GT656297.1 of *C. canephora* show a high degree of similarity to the double APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF) DNA-binding domains of the transcription factor *BBM1* (Figure

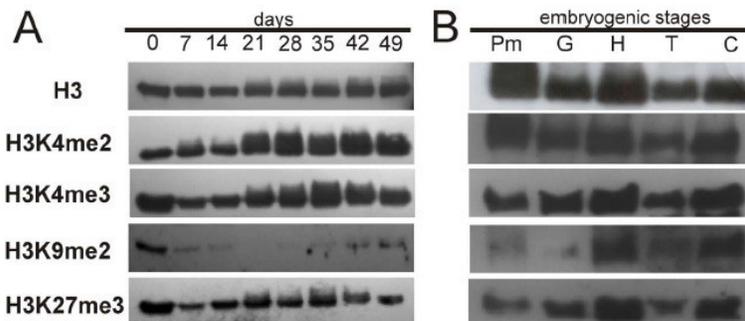


Figure 6. Histone H3 methylation patterns during somatic embryogenesis induction and in different embryogenic stages of *Coffea canephora*. **A)** Immunoblot analyses during the development of the somatic embryogenesis process in *Coffea canephora* shown in Figure 1. **B)** Immunoblot analyses of different tissues and developmental somatic embryo stages. Total histone extracted from leaf explants, as shown in Figure 1, from 0 until 49 days after induction and from different somatic embryo developmental stages were probed with specific antibodies in Western blots. Subsequent to the hybridization, membranes were stripped off and re-probed with antibodies specific to non-modified histone H3. Pm: proembryogenic mass, G: globular stage, H: heart stage, T: torpedo stage, C: cotyledonary stage. doi:10.1371/journal.pone.0072160.g006

S3) according to Boutilier et al. [10]. For instance, the alignment of these sequences with other orthologs of *BBM1* has 95% similarity to *Vitis vinifera* (*VvBBM1*), 92% to *TcBBM1*, 91% to *OsBBM1*, 86% to *BnBBM1*, 85% to both *Glycine max* (*GmBBM1*) and *AtBBM1*, 82% to *MtBBM1* and 81% to *ZmBBM1*.

On the other hand, it has been shown that *WOX4* functions to promote differentiation of the vascular procambium [16], but its expression has been observed principally during postembryonic development or during germination [17]. However, its role during SE and its regulation is unclear. Therefore, we used the SGN-U627534 sequence of *C. canephora*, which contains the homeodomain of *WOX4* (Figure S4), which at the amino acid level has a high degree of similarity with respect to other orthologs: 100% similarity to *Solanum lycopersicum* (*SlWOX4*), 99% to *GmWOX4*, 97% to *VvWOX4*, 96% to *AWOX4*, 94% to *Populus trichocarpa* (*PtWOX4*), 83% to *OsWOX4*, 82% to *ZmWOX4* and 80% to *Brachypodium distachyon* (*BdWOX4*). The *WOX* homeodomain has been found to bind to DNA through a helix turn helix structure [14]. Therefore, we used the *C. canephora*-conserved sequences to perform the expression analysis of *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* in different embryonic developmental stages.

The relative expressions of *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* genes were evaluated by RT-PCR assays during embryonic induction (0, 7, 14, and 21 dai), as well as at the different embryonic stages (Pm, G, H, T, C and Z) (Figure 7). We found that all genes were absent or expressed at low levels on day 0, and the only gene that was highly expressed in the zygotic embryo (Z) was *BBM1*. In the case of *BBM1*, the highest expression was found in the embryonic stages of Pm, G and H, while in the more developed stages, such as T and C, the expression of these genes was reduced. During the 21 days of the SE induction process, *BBM1* expression was low with respect to that found during the somatic embryo development (Figure 7B). These results suggest that the expression of *LEC1* and *BBM1* genes are important for differentiation and maturation of the embryos. *BBM1* activates pathways related to cell proliferation and growth, while *LEC1* is required to induce the embryonic program and embryo maturation [10,11]. On the other hand, the expression of *WOX4* was almost undetectable in the different embryonic stages, and its expression was only found at days 0, 7, 14, 21 and in Pm (Figure 7). *WOX4* participation during SE has not been studied in detail in other species, but during the germination of somatic embryos of *V. vinifera*, the *WOX4* transcripts are higher [17]. In addition, our result regarding the lack of expression of *LEC1* in Z are consistent with other studies in *Arabidopsis* and *B. napus* [11,44], suggesting that *LEC1* cannot be involved in the postembryonic regulation due to the fact that *LEC1* plays a more central role in embryo development [11,45].

Epigenetic Regulation of *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* during SE

Because *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* showed differential expression at the beginning of the SE process and at different embryonic stages (Figure 7), we examined the epigenetic marks of histone H3-methylation (H3K4me3, H3K9me2, H3K27me3 and H3K36me2) in these genes by Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) at days 0 and 14 and in the embryo developmental stages Pm, H, T and C (Figure 8). We did not observe an enrichment of the marks related to gene expression of H3K4me3 and H3K36me2 in any of the genes evaluated. However, we found that the H3K9me2 mark was accumulated from the H to the C stages in the sequence that encodes for the homeodomain of the *WOX4* gene (Figure S4), which is important for DNA binding. This mark accumulation seems to be related to the lack of *WOX4*

gene expression found in Figure 7, while the presence of H3K36me2 from 0 to Pm suggests its participation during the expression of this gene.

In the case of the H3K27me3 mark, it was observed that *LEC1* and *BBM1* genes were enriched with this repressive mark at different embryo stages. For instance, in *LEC1* this mark was highly enriched at 0 days and present only slightly at both 14 days and the C stage (Figure 8); this result is related with the repression found of this gene in those days (Figure 7). Similar results were found for *BBM1*, in which we found that the genomic region that codified for the repeat 2 AP2/ERF domain (Figure S3), which is a fragment needed for DNA binding [10], is highly marked with H3K27me3, especially at the beginning of induction (0 to 14 days). Furthermore, we observed that this region carries a moderate level of H3K4me3 and H3K36me2 marks in all tissue, but low levels of H3K9me2. This result suggests that the decrease of H3K27me3, and the presence of H3K4me3 and H3K36me2, might favor the transcription of *BBM1* from Pm to C stage (Figure 7). Overall, *WOX4*, *LEC1* and *BBM1* expression are regulated by histone modifications.

5-Azacytidine Affects the Expression of *LEC1* and *BBM1*

Because we found that DNA demethylation generated by 5-AzaC arrests the somatic embryonic process (Figure 5), we assessed whether this demethylating agent also affects the transcription of *LEC1* and *BBM1*, which are important to induce the embryonic program and the morphogenesis from somatic cells [10,11], as well as *WOX4* during the initiation of SE. For this purpose, the explants of coffee were incubated in the presence of 10 μ M of 5-AzaC, added every seven days from day 0 until 21 dai (Figure 9). It was found that all three genes, *LEC1*, *BBM1* and *WOX4*, under normal embryonic conditions (Figure 9A, without 5-AzaC), are expressed almost at the same level from day 7 until 21 dai. However, in the presence of 5-AzaC, *LEC1* is highly expressed at day 7 and is low or almost undetectable at days 14 and 21 (Figure 9B). In the case of *BBM1*, this gene was expressed at the same level as without 5-AzaC at day 7 but its expression was almost undetectable at days 14 and 21. On the other hand, *WOX4* expression was increased with 5-AzaC at days 14 and 21 but was undetectable at day 7. Although all together these results show differential regulation in *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* in the presence of 5-AzaC, we cannot rule out the possibility of second effect of cell death observed in explants treated with this demethylating agent (Figure 5A). Further studies need to be done in order to know whether 5-AzaC is activating the expression of *LEC1* (at day 7) and *WOX4* (at days 14 and 21) by indirect epigenetic mechanisms due to the activation of histone methyltransferases.

Discussion

The capacity of somatic cells to form somatic embryos and regenerate a new plant is known as somatic embryogenesis (SE) [46]. Although SE has been studied for a long time, the process is not fully understood, and the importance of epigenetic mechanisms during SE and in different embryonic stages has not been addressed. The results presented here provide new insight into the epigenetic regulation needed during the SE of one of the most economically important species of coffee, *Coffea canephora*.

In this study, we showed that during the beginning of SE in *C. canephora* (Figure 1), the cellular differentiation process and embryo development are modulated by epigenetic mechanisms such as DNA methylation (Figure 4) and histone methylation (Figure 6). For instance, we observed that the explants of *C. canephora* at day 0 have 23.8% global DNA methylation, while at the beginning of

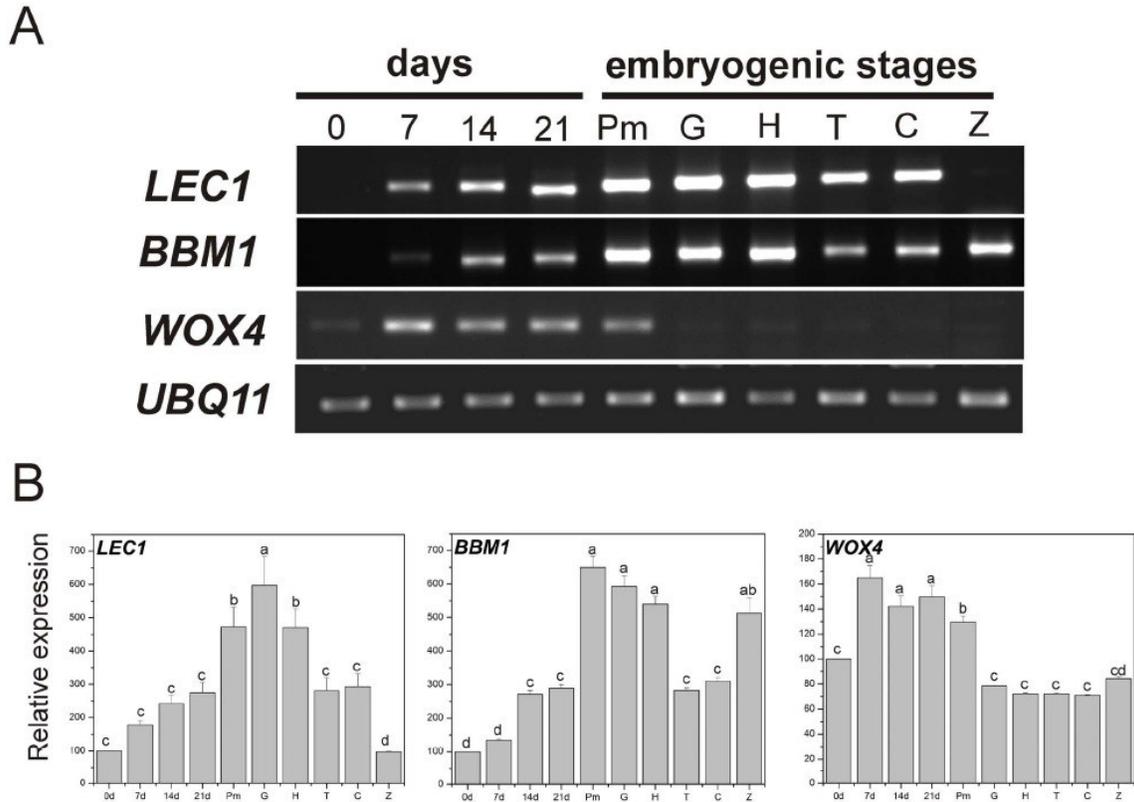


Figure 7. Expression profiles of genes during embryonic induction and development of the somatic embryos in *Coffea canephora*. **A)** Expression of *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* was performed from total RNA samples for RT-PCR analysis that were isolated from leaf explants under embryogenic induction at days 0, 7, 14 and 21, and the different embryogenic stages were isolated and comparatively classified in proembryogenic mass (Pm), globular (G), heart (H), torpedo (T), cotyledonary (C) and zygotic embryo (Z) in cotyledonary stage. *UBQ11* was used as a reference gene. **B)** Densitometric analysis of the gene expression showed in **A**. Relative expression of *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* were normalized to the constitutive gene *UBQ11*. Different letters in columns represent the statistical significance of mean differences at a given time according to the Tukey test ($P \leq 0.05$). Each RT-PCR was conducted twice with three independent biological replicates.
doi:10.1371/journal.pone.0072160.g007

the differentiation process it increased to 25.4% (day 14, Figure 4A). This strongly suggests a rapid cellular response to *in vitro* conditions [47,48] accompanied by a drastic chromatin remodeling [49,50]. Previous reports have shown that embryogenic cell formation is related to the increase of DNA methylation [20,32,33]. However, an increase in DNA methylation is not always the condition that has been reported to be important for SE; a decrease in DNA methylation levels seems to be fundamental for embryo development in some species. For instance, during the phase of dedifferentiation or embryogenic calli generation in *E. senticosus* and *Rosa hybrida*, DNA demethylation events are frequent [34,51]. Recent studies in *C. sativa* and *Acca sellowiana* have also showed the importance of demethylation events during SE induction or prior to the start of embryo differentiation [20,52]. We observed two increases in DNA methylation during the SE of *C. canephora* (Figure 4A). The first was observed from day 7 until day 21, when we observed the stronger effect of 5-AzaC on SE induction (Figure 5), and the second increase was observed at the end of the SE process, from day 35 until day 56 (Figure 4A). This suggests that there is a DNA methylation dynamic throughout the whole process of embryo

formation, confirming the important role of DNA methylation patterns during the development of plants [53–55]. Besides the changes in DNA methylation observed during SE development (Figure 4A), we found interesting changes in different embryo developmental stages (Figure 4B). For instance, we found that somatic embryos in the cotyledonary stage contain high levels of DNA methylation, while the zygotic embryo, at its cotyledonary stage, presented lower levels of DNA methylation (Figure 4B), which can be related to the arrest of development during the dormant period that the zygotic embryo suffers inside the seed [56]. In contrast, the embryo in its C stage continues with the development.

Previous reports have shown that DNA methylation patterns are involved in the control of diverse phases of development in both plants and animals [23,54]. To assess that DNA methylation is important during the SE of *C. canephora*, we performed pharmacological studies to evaluate the effect of 5-AzaC during the SE process (Figure 5). We found that 5-AzaC added since 7 dai drastically reduced the SE process, and this compound induces DNA hypomethylation (Figure S1). Fraga et al. [52] showed that during SE induction in *A. sellowiana*, the levels of DNA methylation

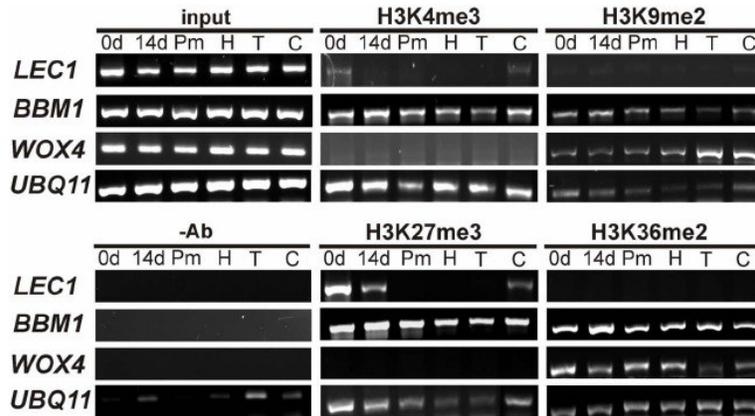


Figure 8. Histone H3-methylation patterns during somatic embryogenesis development in *Coffea canephora* using Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). Samples were collected at the beginning of embryogenic induction (0d) and 14 days after embryogenic induction (14d) and during the proembryogenic mass (Pm), torpedo stage (T) and cotyledonary stage (C). The samples were examined for the Histone H3-tail methylation patterns, and the *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* genes. Input (Input DNA): 10-fold diluted samples were used as templates for the input lanes. As negative control (-Ab), no antibody samples were treated in the same way as immunoprecipitated chromatin with H3K4me3, H3K9me2, H3K27me3 and H3K36me2. Amplified *UBQ11* with specific primers was used as the control for the quality of samples and the same amounts was used to amplify *LEC1*, *BBM1* and *WOX4*.

doi:10.1371/journal.pone.0072160.g008

increase even in the presence of 5-AzaC. However, the presence of this compound resulted in a lower conversion of embryos into plantlets. On the other hand, in *Medicago truncatula*, it was observed that the use of 5-AzaC causes the loss of SE through DNA demethylation [57], a result which agrees with those found in our studies. Therefore, it seems that DNA methylation plays an important role in embryo formation in model and non-model plants. On the other hand, we detected that the effects of 5-AzaC were reduced depending on the day that this compound was added (Figure 5B). For instance, we observed that when 5-AzaC was added at 7 or 14 dai, the SE was drastically affected. However, it is worth noting that 5-AzaC seems to synchronize the earliest stages of embryo development and to reduce embryo maturation (Figure 5). Similar results have been observed in *D. carota*, where 5-AzaC arrests the development of the H stage, inducing secondary embryogenesis [58]. On the other hand, Yamamoto et al. [32] reported that the effects of this demethylating agent depend on the embryogenic stage at which it is applied. The SE in *D. carota* is arrested whether it is applied at 3 or 7 dai, but there is no difference in the embryogenic response if it is applied from 7 to 14

dai. It has been also found that the presence of 5-AzaC or the use of the *METHYLTRANSFERASE1* (*met1*) mutant increases the formation of meristematic centers improving the shoot formation from calli of *Arabidopsis* [35,59], indicating that DNA methylation plays a role mediating the development rate. However, although many reports have pointed out that DNA methylation is involved in embryo and plant development, the mechanism through which it happens is still unknown. Most likely, hypomethylation in the whole genome due to the effect of 5-AzaC is turning on genes that need to be repressed in a specific developmental time sequence in order to induce embryo maturation. The specific inhibitory methylation effect of 5-AzaC needs to be studied in order to test this hypothesis.

Besides the changes in DNA methylation observed during the SE process (Figure 4), we found an interesting histone methylation pattern (Figure 6) that seems to be related to the reduction in DNA methylation levels at 21 and 28 dai (Figure 4A). We observed an absence of the repressive mark H3K9me2 and an increase of the transcription-related marks H3K4me2 and H3K4me3 (Figure 6A); on the same days, a reduction on DNA methylation was observed. Similar epigenetic events have previously been shown in mammalian development during early embryo onset in the zygote, where a significant loss of DNA methylation and H3K9me2 occurs [22,60]. Interestingly, we also found a reduced level of H3K9me2 and H3K27me3 marks after embryogenic induction at day 7 (Figure 6A). It has been reported that a decrease in DNA methylation and low levels of H3K9me2 and H3K27me3 allow the expression of genes related to the beginning of cell dedifferentiation [18,36]. The H3K9me2 mark has been shown to be involved in heterochromatin formation; it is dependent on DNA methylation in *Arabidopsis* and rice [29,61]. In addition, H3K9me2 contributes actively to the setting up of dedifferentiated states or reentry to the cell cycle [18]. Unlike H3K9me2, a recent report indicates that H3K27me3 controls the expression of ~9,006 genes in *Arabidopsis* [37], some of which are related to cell differentiation and stem cell regulation. On the other hand, it was found that during the transition from the globular stage to the

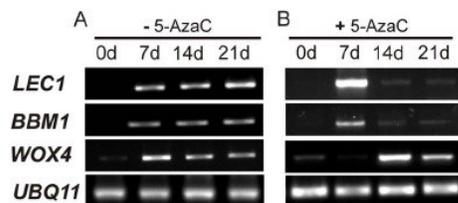


Figure 9. Effects of 5-Azacytidine on the *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* expression during the beginning of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. A) Gene expression under embryogenic conditions in the absence of 5-Azacytidine. B) Gene expression under embryogenic conditions with 10 μ M 5-Azacytidine added every seven days from 0 to 21 dai. Total RNA was used for RT-PCR analysis. *UBQ11* was used as a reference gene.

doi:10.1371/journal.pone.0072160.g009

heart stage there was an increase observed in the repressive marks H3K9me2 and H3K27me3 (Figure 6B), a finding that also seems to be related to an increase in DNA methylation found in the same embryogenic stages (Figure 4B). It has been documented that an increase in DNA methylation is necessary to change the transcription patterns of genes, since DNA methylation represses the transcription directly by interfering with the accessibility of transcription factors [25,42].

In this study, we have found that two transcription factor genes, *LECI* and *BBM1*, are expressed in different embryogenic stages (Figure 7) possibly by H3K27me3 (Figure 8). This epigenetic mark directly represses only specific transcription factor families, such as HAP3-like and AP2-like transcription factors [37], that also correspond to the genes investigated in this study, *LECI* and *BBM1*, respectively. *LECI* is a regulator master of embryogenesis and its expression is needed to induce SE [11], while *BBM1* is essential for cell proliferation and morphogenesis during embryogenesis [10]. We found that analyzed regions of *LECI* and *BBM1* chromatin in coffee are enriched by H3K27me3, which is an epigenetic repressive mark, localized principally to euchromatin regions in plants [62,63]. We localized the target regions of *C. canephora* in the same genes from epigenomes available from *Arabidopsis* and rice (<http://epigara.biologie.ens.fr/index.html> and <http://www.ricemap.org/gmap.jsp>, respectively) (Figures S5 and S6). It was found that, in the case of *AtLECI*, an important enrichment of H3K27me3 exists in the targeted zone (Figure S5B), which is consistent with our findings (Figure 8). Our results show that the decrease of H3K27me3 in the sequence that encodes for the B-domain of *LECI*, could be important for its transcription, because it has been observed that the removal of H3K27me3 is important in the temporal control of gene activation [64]. Lee et al. [45] previously showed that the B-domain of *LECI* in *Arabidopsis* is required for embryogenesis development. These same authors found that the substitution of asparagine 55 by lysine in the B-domain severely decreases the recovery of viable seedlings, suggesting that this amino acid residue is critically required for *LECI* function. Interestingly, the absence of H3K27me3 in *LECI*, especially during the transition from the H stage to the T stage (Figure 8), means that *LECI* could be involved in hypocotyl elongation during embryo growth [13].

In the case of *BBM1*, our results show that the second AP2/ERF domain carries high levels of H3K27me3, moderate levels of H3K4me3 and H3K36me2 and low levels of H3K9me2 in all tissues (Figure 8). The comparative epigenetic analysis in *Arabidopsis* (Figure S5) as well as rice (Figure S6) revealed that the targeted region in *BBM1* contains moderated levels of H3K27me3 and low levels of H3K4me3 in both plants. Recently, it has been found in plants that a small group of genes, particularly transcription factors, are marked by both H3K4me3 and H3K27me3 [36]. The same authors suggest that the presence of both antagonistic marks could maintain the repressed transcription status in the genes, but under the differentiation process the balance of these marks could allow rapid transcriptional reactivation. Analysis of *BBM1* overexpression in *Arabidopsis* and tobacco showed that the *BBM1* gene promotes SE even in absence of growth regulators, and induces shoot organogenesis, respectively, suggesting that *BBM1* has the capacity to induce shoot meristem activity as well as embryogenesis depending on the genetic and cellular environment in the cells [10,65].

On the other hand, it is known that some of the *WOX* gene family members are involved in the regulation of embryogenic cells and maintain meristematic cells, but also they are involved in the regulation of embryo polarity [14,66]. *WUSCHEL*, a member of *WOX* gene family, which organizes the stem cells in the shoot

meristem [67], is modulated by DNA methylation and H3K9me2 in *Arabidopsis* [35]. Here we show that the transcriptional activity of *WOX4* is epigenetically modulated by H3K9me2 (Figure 8), suggesting that another *WUS* homeobox is also controlled through epigenetic mechanisms. It is worth noting that the deposition of H3K9me2 in the *WOX4* gene occurred mainly during embryo elongation, from the H to the C stages (Figure 8). Furthermore, we detected that from the H to the C stage, DNA methylation (Figure 4B) as well as H3K9me2 levels increased (Figure 6B). We also found that during the transition from the H to the C stage, a split of the vascular procambium occurs (Figure 3). Vascular procambium is a group of meristematic cells located at the periphery of stems and roots that are related to the secondary growth [68]. Therefore, taken together, these results indicate that the *WOX4* repression found in these stages (C and H), probably by H3K9me2, is a key step in allowing embryo axis elongation. In *Arabidopsis* and tomato, it has been found that *WOX4* expression is required to promote procambium differentiation in order to regulate lateral plant growth [15,16].

In summary, we showed that under embryogenic conditions, the somatic cells can be reprogrammed epigenetically through dynamic changes in DNA methylation and histone modifications to promote the embryogenic pathway and development of somatic embryos in *C. canephora* (Figure 10). Our results strongly suggest that a decrease in DNA methylation and reductions of repressive marks H3K9me2 and H3K27me3 could be key steps in triggering the cellular dedifferentiation to acquire cell totipotency, whereas the resetting of these marks seems to be a regulatory mechanism for proper embryo development. The regulation of *LECI* and *BBM1* expression by the H3K27me3 mark, together with the repression of *WOX4* by H3K9me2, supports the idea that epigenetic mechanisms contribute to the control of the onset and embryo development during SE of *C. canephora*.

Materials and Methods

Plantlets, Embryogenic Induction and Growth Conditions

Coffea canephora plants were cultivated in Murashige & Skoog [69] medium supplemented with 29.6 μM thiamine-HCl, 550 μM myo-inositol, 0.15 μM cysteine, 16.24 μM nicotinic acid, 87.64 mM sucrose and 0.25% (w/v) gelrite, pH 5.8 and cultured at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under a standard photoperiod of 16/8h (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). For the embryogenic induction, the plantlets were transferred to the same medium supplemented with 0.54 μM naphthalene acetic acid and 2.32 μM kinetin for 14 days under the same conditions. Plantlet leaves were cut and five explants of 0.25 cm^2 were placed on liquid medium (modified Yasuda) as previously described [38] in the presence of 5 μM 6-benzyladenine and cultured at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under dark conditions at 55 rpm. The plantlets were obtained from three-month-old cotyledonary somatic embryos.

Electron Microscopy

Somatic embryos at different embryogenic stages (proembryonic mass, globular, heart, torpedo and cotyledonary) were fixed in phosphate buffer at pH 7.3 (2 mM sodium phosphate monobasic, 2 mM sodium phosphate dibasic heptahydrate and 2.5% glutaraldehyde). Vacuum was applied for 10 min and the culture was maintained at room temperature for 24 h and then kept at 4°C , washing twice with the same buffer without glutaraldehyde. The fixed tissues were dehydrated in a graded series of 10, 30, 50, 70, 85, 96 and 100% ethanol, vacuum was applied at each step for 10 min and the whole maintained for 1 h at 4°C (twice). Then the samples were gradually dried to the

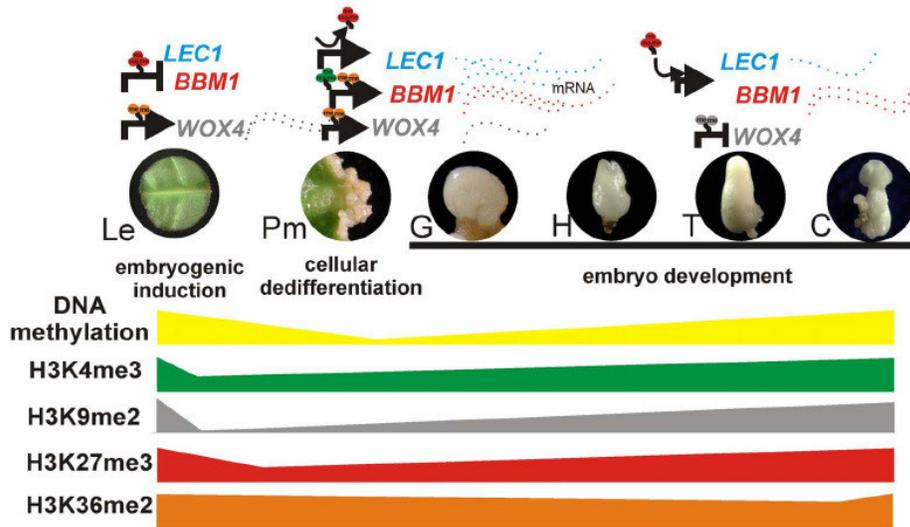


Figure 10. Proposed epigenetic regulatory mechanism during the somatic embryogenesis of *Coffea canephora*. Differentiated somatic cells from leaf explants are treated with plant growth regulators to induce somatic embryogenesis (SE). The embryogenic response proceeds through dynamic changes in DNA methylation and histone modification, each in turn contributing to epigenetic regulation of *LEC*, *BBM1* and *WOX4* genes. Under ideal somatic embryogenic induction, differentiated somatic cells from leaf explants (Le) initiate the first molecular and epigenetic changes. These changes start with the repression of *LEC1* and *BBM1* genes during the induction process, mainly by the accumulation of H3K27me3. *WOX4* is highly expressed in this embryogenic stage, probably by the accumulation of H3K36me2 and the absence of H3K9me2. Furthermore, high levels of DNA methylation are observed. During the Pm development, the H3K27me3 mark on *LEC1* loci is removed and the gene is expressed, while the expression of *BBM1* is mainly accompanied by the accumulation of H3K4me3 and H3K36me2. At this stage, DNA methylation levels start to rapidly decrease. Finally, during the late developmental embryo stage, T, an increase of H3K9me2 promotes the transcriptional repression of *WOX4* and H3K27me3 again starts accumulating on *LEC1* and the expression of *BBM1* decreases. At this embryogenic stage, high levels of DNA methylation are established. These findings suggest that dynamic changes in chromatin could be a crucial step for switching genes on or off during the dedifferentiation and differentiation events to develop a somatic embryo. Le: leaf explant; mRNA: messenger RNA; SE: somatic embryogenesis; Pm: proembryonic mass; G: globular stage; H: heart stage; T: torpedo stage; C: cotyledonary stage. The arrows mean gene repression while the truncate lines mean gene expression. The abundance of the dashed lines means the abundance of the transcripts.
doi:10.1371/journal.pone.0072160.g010

critical point with CO₂ using the dryer Samdri-PVT, and later were mounted on a metallic grill (Polaron SEM coating system E S100) and plated with gold using 30 mA for 60 seconds at 120 mTorr, until a layer of 150 Å was reached. The samples were observed using a scanning electronic microscope (GEOL JSM 6360 LV). Images were obtained by projecting the images at angles of +8° and +8° from the optical axis.

Histology

Somatic embryos at different embryogenic stages were isolated and fixed in FAA solution [10% formaldehyde, 5% acetic acid 50% ethanol (v/v)] for 48 h and washed five times with phosphate buffer at pH 7.3 (2 mM sodium phosphate monobasic, 2 mM sodium phosphate dibasic heptahydrate). The samples were dehydrated in a graded series of 10, 30, 50, 70, 85, 96 and 100% ethanol and vacuum was applied at each step for 10 minutes and the whole maintained for 1 h at 4°C (twice). Then the samples were embedded in JB-4 resin (JB-4Embedding kit, Polysciences). The blocks were sectioned into 5-µm slices using a MICROM[®] HM 325 and were double stained with a solution of periodic acid and Schiff's reactive to stain cell walls and naphtol blue black to stain proteins. Images were acquired using a stereoscopy MZFL III (Leica).

DNA Methylation

Genomic DNA from *C. canephora* was extracted according to the protocol described by Echevarría-Machado et al. [70]. Briefly, 100 mg of explants under embryogenic induction conditions were collected every seven days from 0 to 56 days, and from somatic embryos at different developmental stages (proembryonic mass, globular, heart, torpedo, cotyledonary and plantlets) and zygotic embryos. Nucleic acid digestion and the separation of the nucleosides is described in detail by De-la-Peña et al. [71]. Briefly, 5 µg of DNA from each sample were hydrolyzed and mixed with 5 µL of 10X DNA digestion buffer (200 mM acetic acid, 200 mM glycine, 50 mM magnesium chloride, 5 mM zinc acetate, 2 mM calcium chloride adjusted with sodium hydroxide to pH 5.3), 2 µL of DNase I (D2821-Sigma, 10 U/µL) and 1 µL of Nuclease P1 (N8630-Sigma, 1.25 U/µL). After overnight incubation at 37°C, the samples were mixed with 5 µL of 100 mM NaOH and 2 µL calf intestine alkaline phosphatase (P4879-Sigma, 1 U/µL). The samples were incubated for 3.5 h at 37°C and mixed with the mobile phase D (50 mM ammonium phosphate dibasic, 15 mM ammonium acetate adjusted with phosphoric acid to pH 4.1). After that, the samples were centrifuged at 18,000 ×g and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent 1200 series). DNA methylation percentages were obtained from the phase-reversed chromatograms, using the peak areas to determine the concentration of 2'-deoxycytosine (dC) and 5-methyl-2'-

deoxycytosine (5 mdC) in the sample (% 5 mdC = $C \times 5 \text{ mdC} / [C \times 5 \text{ mdC} + C \times \text{dC}] \times 100$), where C is concentration. All the analyses were performed with three biological replicates from different DNA extractions.

5-Azacytidine Assay

Embryogenic cultures of *C. canephora* were incubated in the absence (control) or presence of 10 and 20 μM of 5-azacytidine (Sigma) diluted in the same medium used for embryogenic induction. This compound was added into the medium every seven days starting at different independent time points (day 7, 14, 21 and 35) of the SE culture. Then the somatic embryos at each embryogenic stage in the control and the treatments with 5-AzaC were counted after 56 days' induction. The percentage of DNA methylation under the effect of 5-AzaC was conducted as described above. Three independent assays were evaluated.

Histone Isolation and Western Blots

Histones from *C. canephora* were isolated from 0.5 g of explants under embryogenic induction conditions and somatic embryos in different embryogenic stages (proembryogenic mass, globular, heart, torpedo and cotyledonary), as described by Nic-Can and De-la-Peña [72]. Briefly, ten micrograms of protein were separated by 15% SDS-gel page and blotted on PVDF membrane (Millipore Immobilon P) for 3.5 h at 265 mA. Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk, 0.5% Tween in phosphate-buffered saline (TPBS). In all experiments, Millipore antibodies were used as follows: anti-H3 (cat. # 07-690) as a loading control, anti-dimethyl-histone H3 [Lys-4] (cat. # 07-030), anti-trimethyl-histone H3 [Lys-4] (cat. # 04-745), anti-dimethyl-histone H3 [Lys-9] (cat. # 07-441), anti-trimethyl-histone H3 [Lys-27] (cat. # 07-449). The primary antibodies were incubated at 4°C for either one hour or overnight with constant agitation. After washing three times for 10 min with 1X TPBS and one time with PBS, the membrane was incubated with secondary antibody Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-conjugate (cat. # 12-348). The signal detection was achieved with the agent Immobilon Western HRP substrate peroxidase solution (Millipore) following the manufacturer's instructions. Data from three independent analyses consistently gave the same results.

Sequence Analysis and Primers Design

To design primers to amplify SE-related genes in *C. canephora*, the selection of nucleotide sequences was carried out, annotated by several databases listed in Table S1. Nucleotide alignments in multiple sequences were performed using the software ClustalW2-Multiple Sequence Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/>) and a highly conserved region was chosen for the primers' design. Primers for *LECI*, *BBMI* and *WOX4* were realized with the software Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), and then were analyzed through the online programs Oligo Analyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>) and DNA calculator (<http://www.sigma-geosys.com/calc/DNACalc.asp>). Primers generated for RT-PCR are listed in Table S2.

RT-PCR Analysis

Total RNA was extracted from 100 mg of leaf explants under embryogenic induction and were collected at 0, 7, 14 and 21 days, and from somatic embryos that were isolated and classified according to developmental stage (proembryogenic mass, globular, heart, torpedo and cotyledonary) and a zygotic embryo in the cotyledonary stage of *C. canephora* was used as a comparison. Tissue

samples were homogenized with TRI reagent (Sigma) following the manufacturer's instructions, and the quality of extracted RNA was verified on agarose gel at 1.5%. The quantity was verified in a Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). For cDNA synthesis, reverse transcription reactions were performed in a 20- μL volume containing 1.5 μg of RNA and 200 U of the SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Platinum Taq polymerase (1.25 U, Invitrogen), 10 mM dNTPs, 10 μM each primer (listed in Table S2) in a 25- μL volume was used during PCR and the conditions were listed as follows: for *BBMI*, 95°C for 4 min, followed by 35 cycles of 95°C for 40 sec, 65°C for 45 sec, 72°C for 90 sec and a final cycle of 72°C for 10 min; for *LECI*, *WOX4* and *UBQ11*, 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 95°C for 40 sec, 60°C for 45 sec, 72°C for 70 sec and a final cycle of 72°C for 5 min. The PCR products were electrophoresed in a 1.5% agarose gel and stained with GelRed (Biotium), and the images were acquired. Band intensities were quantified using the Gel DocTM XR+System (BIO-RAD) and the intensities of genes mentioned above were normalized to the constitutive gene *UBQ11*. Each RT-PCR was conducted twice with three biological replicates.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Analysis

Explants under embryogenic conditions and somatic embryos (0 and 14 days, proembryogenic mass, heart, torpedo and cotyledonary) were vacuum-infiltrated with formaldehyde cross-linking solution. ChIP experiments were performed as described previously by De-la-Peña et al. [73], with slight modifications. In two biological replicates, the chromatin was immunoprecipitated using the following antibodies obtained from Millipore: anti-trimethyl-histone H3 [Lys-4] (cat. # 04-745), anti-dimethyl-histone H3 [Lys-9] (cat. # 07-441), anti-trimethyl-histone H3 [Lys-27] (cat. # 07-449) and anti-dimethyl-histone H3 [Lys-36] (cat. # 07-274). PCR amplifications were done in 25 μL volumes using the following conditions: for *LECI*, *WOX4* and *UBQ11*, 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 40 sec, 60°C for 50 sec, 72°C for 2 min and a final cycle of 72°C for 10 min and for *BBMI*, 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 40 sec, 65°C for 50 sec, 72°C for 2 min and a final cycle of 72°C for 10 min. Primer sequences are shown in Table S3. The PCR products were electrophoresed in a 1.5% agarose gel and stained with GelRed (Biotium) and the images were acquired using the Gel DocTM XR+System (BIO-RAD). *UBQ* is a constitutively active gene that carries both trimethylated Lys 4 and dimethylated Lys 9 of histone H3 and has been used as a control [71,74].

Statistical Analysis

All the data were processed and analyzed using an analysis of variance (ANOVA). The significance level between the mean values was carried out using the Tukey test. Differences were considered to be significant at $P \leq 0.05$. Data were analyzed by Origin 8 (Data Analysis and Graphing Software).

Comparative Bioinformatic Analysis

To evaluate the ChIP results generated in this study, the epigenomics data (histone modifications and DNA methylation) from *Arabidopsis* and rice were analyzed through the publicly accessible database of Vincent Colot for *Arabidopsis* (<http://epigara.biologie.ens.fr/index.html>) and the RMAP-A Map Like Rice Genome Browser [75] (<http://www.ricemap.org/gmap.jsp>) using the orthologous genes as follows: AT1G21970 (*LECI*), AT5G17430 (*BBMI*), AT1G46480 (*WOX4*), LOC_Os02g49370

(*LEC1*), LOC_Os04g42570 (*BBM1*), and LOC_Os04G55590 (*WOX4*).

Supporting Information

Figure S1 Global DNA methylation analysis of leaf explants during somatic embryogenic induction exposed to 5-Azacytidine (5-AzaC). Leaf explants of *Coffea canephora* were treated with 10 μ M 5-AzaC every 7 days, from day 7 until 56 days, as shown in Figure 5A (7 dai), and DNA methylation levels were measured by HPLC as described in Materials and Methods. Error bars represent \pm SE (n = 3). The experiment was carried out three times. (TIF)

Figure S2 Amino acid sequence alignment of the B domains of plant LEC1 proteins. Identical residues are marked with stars. The DNA-binding region and subunit interaction are highlighted in yellow boxes. The position of α -helices and loops in the histone fold motif is indicated with black and red lines, respectively. The Asp (D) residue that is required for the *LEC1* function is shaded in orange. The consensus sequence that interacts with the TATA-binding protein is highlighted in red. *Zm*, *Zea mays* (*ZmLEC1*); *Os*, *Oryza sativa* (*OsLEC1*); *Tc*, *Theobroma cacao* (*TcLEC1-Like*); *Dc*, *Daucus carota* (*DcLEC1*); *Cc*, *Coffea canephora* (*Cc_GT656663.1*); *Is*, *Isoetes sinensis* (*ISCAAT-Box*); *At*, *Arabidopsis thaliana* (*AtLEC1*); *Bn*, *Brassica napus* (*BnLEC1*); *Pe*, *Pistacia chinensis* (*PeLEC1*); *Mt*, *Medicago truncatula* (*MtLEC1*). (TIF)

Figure S3 Amino acid sequence alignment of plants' BBM1 proteins. Identical residues are marked with stars. Amino acid sequences of the first AP2/ERF domain repeat (Repeat 1) and the second AP2/ERF domain repeat (Repeat 2) are highlighted in blue and the linker region that joins the two repeats is highlighted in yellow. Red boxes indicate the overlap of both sequences of *Coffea canephora*: *CcGT656297.1* and *CcGT656313.1*. *At*, *Arabidopsis thaliana* (*AtBBM1*); *Bn*, *Brassica napus* (*BnBBM1*); *Gm*, *Glycine max* (*GmBBM1*); *Mt*, *Medicago truncatula* (*MtBBM1*); *Tc*, *Theobroma cacao* (*TcBBM1*); *Vv*, *Vitis vinifera* (*VvBBM1*); *Zm*, *Zea mays* (*ZmBBM1*); *Os*, *Oryza sativa* (*OsBBM1*). (TIF)

Figure S4 Amino acid sequence alignment of WOX4. The homeodomain that binds DNA through a helix (gray boxes) turn helix structure of WOX4 is shown. The homeodomain proteins used in the alignment were as follows: *Sl*, *Solanum lycopersicum* (*SlWOX4*); *Vv*, *Vitis vinifera* (*VvWOX4*); *Cc*, *Coffea canephora* (*SNG_U627534*); *Gm*, *Glycine max* (*GmWOX4*); *At*, *Arabidopsis thaliana* (*AtWOX4*); *Pt*, *Populus trichocarpa* (*PtWOX4*);

Os, *Oryza sativa* (*OsWOX4*); *Bd*, *Brachypodium distachyon* (*BdWOX4*); *Zm*, *Zea mays* (*ZmWOX4*). (TIF)

Figure S5 Genome browser view of epigenetic modifications of LEC1, BBM1 and WOX4 in Arabidopsis thaliana. A) Representative genes model of *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* sequences. The green boxes show the exons, the connecting lines are the introns and the red boxes are the untranslated regions (UTRs). The black line below the genes represents the analyzed region in *Coffea canephora*. Epigenetic modifications in a genomic region of B) *LEC1* (AT1G21970), C) *BBM1* (AT5G17430) and D) *WOX4* (AT1G46480). A select region indicated by the red dashed lines represents the compared position vs. ChIP of *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* in the somatic embryogenesis of *C. canephora*. (TIF)

Figure S6 Genome browser view of epigenetic modifications of LEC1, BBM1 and WOX4 in Oriza sativa. A) Representative genes model of *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* sequences. The green boxes show the exons, the connecting lines are the introns and the red boxes are the untranslated regions (UTRs). The black line below represents the region analyzed in *Coffea canephora*. Epigenetic modifications in a genomic region of B) *LEC1* (LOC_Os02g49370), C) *BBM1* (LOC_Os04g42570) and D) *WOX4* (LOC_Os04G55590). A select region indicated by the red dashed lines represents the compared position vs. ChIP of *LEC1*, *BBM1* and *WOX4* in the somatic embryogenesis of *C. canephora*. (TIFF)

Table S1 Genes used in motif analysis. (DOCX)

Table S2 Primers used in RT-PCR experiments. (DOCX)

Table S3 Primers used to Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assays. (DOCX)

Acknowledgments

The authors thank Sara Hernández-Castellano and Teresa Cadenas-González for their technical assistance with the histological studies.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VML CD. Performed the experiments: GIN KW AL FB. Analyzed the data: GIN KW AL FB CD. Contributed reagents/materials/analysis tools: VML RR CD. Wrote the paper: GIN VML RR CD.

References

- Vogel G (2005) How does a single somatic cell become a whole plant? *Science* 309: 86.
- Taylor RL (1967) The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. *Can J Bot* 45: 1553–1556.
- Koltunow AM, Grossniklaus U (2003) Apomixis: A developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol* 54: 547–574.
- García-Aguilar M, Michaud C, Leblanc O, Grimmanelli D (2011) Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes. *Plant Cell* 22: 3249–3267.
- Arizaga S, Ezcurra E (2002) Propagation mechanisms in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land succulent rosette. *Am J Bot* 89: 632–641.
- Loyola-Vargas VM, De-la-Peña C, Galaz-Avalos RM, Quiroz-Figueroa FR (2008) Plant tissue culture. In: Walker, J.M. and Rapley, R., (eds) An intertemporal set of tools. In Protein and Cell Biomethods Handbook. Humana Press, Totowa, NJ. 875–904.
- Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, De Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124: 2049–2062.
- Zeng F, Zhang X, Cheng L, Hu L, Zhu L, et al. (2007) A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics* 90: 620–628.
- Yang X, Zhang X (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Crit Rev Plant Sci* 29: 36–57.
- Boutlier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, et al. (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14: 1737–1749.
- Lotan T, Ohto M, Matsudaira YK, West MAL, Lo R, et al. (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93: 1195–1205.
- Passarinho P, Ketelaar T, Xing M, van Arkel J, Maliepaard C, et al. (2008) BABY BOOM target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. *Plant Mol Biol* 68: 225–237.

13. Junker A, Mönke G, Rutten T, Keilwagen J, Seifert M, et al. (2012) Elongation-related functions of LEAFY COTYLEDON1 during the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 71: 427–442.
14. Graaff E, Laux T, Rensing SA (2009) The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Gen Biol* 10: 248.
15. Ji J, Strable J, Shimizu R, Koening D, Sinha N, et al. (2010) WOX4 promotes procambial development. *Plant Physiol* 152: 1346–1356.
16. Suer S, Agustí J, Sanchez P, Schwarz M, Greb T (2011) *WOX4* imparts auxin responsiveness to cambium cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 3247–3259.
17. Gambino G, Minuto M, Boccacci P, Perrone I, Vallania R, et al. (2011) Characterization of expression dynamics of WOX homeodomain transcription factors during somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *J Exp Bot* 62: 1089–1101.
18. Grafi G, Ben-Meir H, Avivi Y, Moshe M, Dahan Y, et al. (2007) Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation. *Dev Biol* 306: 838–846.
19. Noceda C, Salaj T, Pérez M, Viejo M, Cañal J, et al. (2009) DNA methylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. *Trees* 23: 1285–1293.
20. Viejo M, Rodríguez R, Valledor L, Pérez M, Cañal M, et al. (2010) DNA methylation during sexual embryogenesis and implications on the induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa* Miller. *Sex Plant Reprod* 23: 315–323.
21. Miguel C, Marum L (2011) An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal and beyond. *J Exp Bot* 62: 3713–3725.
22. Feng S, Jacobsen S, Reik W (2010) Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330: 622–627.
23. He X, Chen T, Zhu J (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res* 21: 442–465.
24. Amasino R (2010) Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J* 61: 1001–1013.
25. Bruce T, Mazur E, Napier J, Pickett J (2007) Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Sci* 173: 603–608.
26. Martienssen RA, Colot V (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* 293: 1070–1074.
27. Xu L, Zhao Z, Dong A, Taconnat L, Renou J, et al. (2008) Di- and tri but not monomethylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Biol* 28: 1348–1360.
28. Zhang X, Bernatavichute YV, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen S (2009) Genome-wide analysis of mono-, di- or trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Gen Biol* 10: R62.
29. Jackson JP, Johnson L, Jasencakova Z, Zhang X, Burgos L, et al. (2004) Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* 112: 308–315.
30. Jacob Y, Feng M, LeBlanc C, Bernatavichute YV, Stroud H, et al. (2009) ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 16: 763–769.
31. Weinhofer I, Hehenberger E, Roszak P, Henning L, Köhler C (2012) H3K27me3 profiling of the endosperm implies exclusion of polycomb group protein targeting by DNA methylation. *PLoS Genet* 6: e1001152.
32. Yamamoto N, Kobayashi H, Togashi T, Mori Y, Kikuchi K, et al. (2005) Formation of embryogenic cell clumps from carrot epidermal cells is suppressed by 5-azacytidine, a DNA methylation inhibitor. *J Plant Physiol* 162: 47–54.
33. Levanić DL, Mihajević S, Jelaska S (2009) Variations in DNA methylation in *Pisum sativum* (Panc) Purk. embryogenic tissue and the ability for embryo maturation. *Prop Orn Plants* 9: 3–9.
34. Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY (2003) Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Sci* 165: 61–68.
35. Li W, Liu H, Cheng ZJ, Su YH, Han HN, et al. (2011) DNA methylation and histone modifications regulate *de novo* shoot regeneration in *Arabidopsis* by modulating *WUSCHEL* expression and auxin signaling. *PLoS Genet* 7: e1002243.
36. Bouyer D, Roudier F, Heese M, Andersen E, Gey D, et al. (2011) Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition. *PLoS Genet* 7: e1002243.
37. Lafos M, Kroll P, Hohestatt M, Thorpe F, Clarenz O, et al. (2011) Dynamic regulation of H3K27 trimethylation during *Arabidopsis* differentiation. *PLoS Genet* 7: e1002040.
38. Quiroz-Figueroa FR, Monforte-González M, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM (2006) Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. In: Loyola-Vargas VM and Vázquez-Flota FA, editors. *Plant cell culture protocols*. Totowa, NJ: Humana Press. 111–117.
39. Borrel B (2012) Make it a decaf. *Nature* 483: 264–266.
40. Mondengo J, Vidal R, Carazzolle M, Tokuda E, Parizzi L, et al. (2011) An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *BMC Plant Biol* 11: 30.
41. Privat I, Bardil A, Bombarely A, Severac D, Bertrand B (2011) The “PUCE CAFE” Project: the first 15K coffee microarray, a new tool for discovering candidate genes correlated to agronomic and quality traits. *BMC Genomics* 12: 5.
42. Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693–705.
43. Bannister J, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21: 381–395.
44. Malik M, Wang F, Dirpaul J, Zhou N, Polowick P, et al. (2007) Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 144: 134–154.
45. Lee H, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2003) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proc Natl Acad Sci* 100: 2152–2156.
46. Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411–1423.
47. Karami O, Aghavaisi B, Pour AM (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *J Chem Biol* 2: 177–190.
48. Costas C, Desvoyes B, Gutierrez C (2011) A chromatin perspective of plant cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta* 1809: 379–387.
49. Grafi G (2004) How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Dev Biol* 268: 1–6.
50. Exner V, Henning L (2008) Chromatin rearrangements in development. *Curr Opin Plant Biol* 11: 64–69.
51. Xu M, Li X, Korban SS (2004) DNA-methylation alterations and exchanges during *in vitro* cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). *Theor Appl Genet* 109: 899–910.
52. Fraga H, Vieira L, Capestrano C, Steinmacher D, Micke G, et al. (2012) 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acacia salloviana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Rep* 31: 2165–2176.
53. Ruiz-García L, Cervera MT, Martínez-Zapater J (2005) DNA methylation increases throughout *Arabidopsis thaliana* development. *Planta* 222: 201–206.
54. Xiao W, Custard K, Brown R, Lemmon B, Harada J, et al. (2006) DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell* 18: 805–814.
55. Meijón M, Feito I, Valledor L, Rodríguez R, Cañal MJ (2010) Dynamics of the DNA methylation and Histone H4 acetylation during floral bud differentiation in azalea. *BMC Plant Biol* 10: 10.
56. De Smet I, Lau S, Mayer U, Jürgens G (2010) Embryogenesis- the humble beginnings of plant life. *Plant J* 61: 959–970.
57. Santos D, Fevereiro P (2002) Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 70: 155–161.
58. LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, et al. (1989) DNA methylation of embryogenic cell cultures and its variation as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet* 77: 325–331.
59. Tokuyi Y, Takano S, Tonomura M, Tanaka S, Igari K, et al. (2011) Influence of 5-azacytidine on promoting recovery of cell competence for shoot organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 106: 289–297.
60. Suganuma T, Workman J (2011) Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Ann Rev Biochem* 80: 473–499.
61. Ding Y, Wang X, Su L, Zhai JX, Cao SY, et al. (2007) SDG714, a histone H3K9 methyltransferase, is involved in *Tos17* DNA methylation and transposition in rice. *Plant Cell* 19: 9–22.
62. Zhang X, Clarenz O, Cokus S, Bernatavichute YV, Pellegrini M, et al. (2007) Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 5: 1026–1035.
63. Liu C, Lu F, Cui X, Cao X (2010) Histone methylation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 61: 395–420.
64. Lu F, Cui X, Zhang S, Jenuwien T, Cao X (2011) *Arabidopsis* REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nat Genet* 43: 715–719.
65. Srinivasan C, Liu Z, Heidmann I, Jaya E, Fukoaka H, et al. (2007) Heterologous expression of the *BABY BOOM* AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta* 225: 341–351.
66. Haecker A, Groß-Hard R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, et al. (2004) Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131: 657–668.
67. Laux T, Mayer KF, Berger J, Jürgens G (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122: 87–96.
68. Elo A, Immanen J, Nieminen K, Helariutta Y (2009) Stem cell function during plant vascular development. *Semin Cell Dev Biol* 20: 1097–1106.
69. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497.
70. Ehevarria-Machado I, Sánchez-Cach I, Hernández-Zepeda C, Rivera-Madrid R, Moreno-Valenzuela O (2005) A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. *Mol Biotechnol* 31: 129–135.
71. De-la-Peña C, Nic-Can G, Ojeda G, Herrera J, Lopez Torres A, et al. (2012) *KNOX1* is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave spp.* *BMC Plant Biol* 12: 203.
72. Nic-Can G, De-la-Peña C (2012) Determination of histone methylation in mono- and dicotyledonous plants. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, editors. *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press. 313–324.
73. De-la-Peña C, Rangel-Cano A, Alvarez-Venegas R (2012) Regulation of disease-responsive genes mediated by epigenetic factors: interaction of *Arabidopsis-Pseudomonas*. *Mol Plant Pathol* 13: 388–398.
74. Ricardi M, González R, Iusem ND (2010) Protocol: fine-tuning of a Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) protocol in tomato. *Plant Methods* 6: 11.
75. Wang J, Kong L, Zhao S, Zhang H, Tang L, et al. (2011) Rice-Map: a new-generation rice genome browser. *BMC Genom* 12: 165.