

Received: 11.06.2019  
Accepted: 12.05.2020  
Published: 07.12.2020

## Metylacja DNA jako biomarker epigenetyczny w chorobach związanych z zaburzeniami piętnowania\*

### DNA methylation as an epigenetic biomarker in imprinting disorders

Dorota Jurkiewicz, Elżbieta Ciara, Małgorzata Krajewska-Walasek, Krystyna Chrzanowska

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

\*Praca napisana w ramach realizacji statutowego zadania badawczego nr 241/16 i S180/2019 Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”.

#### Streszczenie:

Modyfikacje epigenetyczne wpływają na ekspresję genów i powodują, że ten sam genotyp może doprowadzić do powstania różnych fenotypów, co wyraża się w dużej zmienności w funkcjonowaniu komórek organizmu człowieka. Jedną z najczęściej badanych modyfikacji epigenetycznych jest metylacja DNA, która odgrywa podstawową rolę w piętnowaniu genomowym. Zjawisko piętnowania genomowego jest procesem epigenetycznym, w którym nadawane są na poziomie DNA swoiste znaczniki (piętna) w męskich i żeńskich komórkach rozrodczych. Wzór piętna na chromosomie matczym jest inny niż na chromosomie ojcowskim, co wywołuje ekspresję określonych genów tylko z jednego allele. Nieprawidłowości w procesie piętnowania prowadzą do powstawania epimutacji, czyli defektów epigenetycznych, w tym nieprawidłowej metylacji DNA. Tego typu zaburzenia są przyczyną tzw. chorób związanych z zaburzeniami piętnowania, w których obserwuje się nieprawidłowe wzrastanie, rozwój, zachowanie i/lub zaburzenia metabolizmu. Epimutacje powstają spontanicznie, bez towarzyszącej zmiany w sekwencji genomowej DNA – taki defekt może być wywołany przez czynniki środowiskowe (tzw. epimutacje pierwotne); mogą być również spowodowane zmianami w sekwencji genów, których produkty wpływają na proces piętnowania (tzw. epimutacje wtórne). Wzór metylacji DNA w regionach kontroli piętnowania jest bardzo użytecznym biomarkerem epigenetycznym, stosowanym w diagnostyce chorób związanych z zaburzeniami piętnowania. Obecnie używane są różne techniki służące do analizy wzoru metylacji DNA, pozwalające na badanie od jednego do kilkudziesięciu piętnowanych loci lub też obejmujące cały genom. Badania dotyczące metylacji DNA są istotne nie tylko w diagnostyce medycznej, lecz także stanowią ważny aspekt badań zmierzających do opracowania terapii przywracających prawidłowy status epigenetyczny pacjentów.

#### Słowa kluczowe:

metylacja DNA, marker epigenetyczny, piętnowanie genomowe, choroby związane z zaburzeniami piętnowania

#### Summary:

Epigenetic modifications control gene expression and enable the same genotype to lead to various phenotypes, thus exhibiting extensive variability in human cells function. DNA methylation is one of the most often investigated epigenetic modifications, playing a key part in genomic imprinting. Genomic imprinting is an epigenetic process by which the male and the female germ cells confer specific marks (imprints). Maternal chromatin marks differ from paternal ones, leading to expression of specific genes from only one allele. Disturbance in imprinting process results in epimutations, which are epigenetic defects, including DNA methylation changes. These abnormalities are identified in a group of

imprinting disorders, associated with abnormal growth, development, behaviour and metabolism. Epimutations can occur spontaneously without any accompanying variant in DNA genomic sequence (a primary epimutation), whose defect can be a result of environmental factors. They can also be caused by changes in DNA sequence of genes involved in imprinting process (a secondary epimutation). DNA methylation in imprinting control regions is a very useful epigenetic biomarker and its detection is applied in the diagnostics of imprinting disorders. At present, various techniques for DNA methylation analysis are employed, which allow for investigations of one to several imprinted *loci* or the whole genome. DNA methylation studies are important not only in medical molecular diagnostics but are crucial in the search for therapies that would restore normal epigenetic status in patients.

**Keywords:** DNA methylation, epigenetic marker, genomic imprinting, imprinting disorders

**GICID** 01.3001.0014.5687  
**DOI:** 10.5604/01.3001.0014.5687  
**Word count:** 5 471  
**Tables:** 1  
**Figures:** 2  
**References:** 58

**Adres autorki:** dr n. med. Dorota Jurkiewicz, Zakład Genetyki Medycznej, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa; e-mail: d.jurkiewicz@ipczd.pl

## WPROWADZENIE

Wszystkie jądrowe komórki człowieka zawierają ten sam genom, lecz mogą używać go w odmienny sposób. Komórki są homogenne genetycznie, lecz heterogenne funkcjonalnie, dzięki różnicom w ekspresji genów [31]. W różnych tkankach w organizmie są odczytywane inne geny, żeby powstały odpowiednie produkty, które są niezbędne do właściwego funkcjonowania komórek na danym etapie rozwoju. Ta możliwość zróżnicowanej czasowo i tkankowo ekspresji genów jest podstawą prawidłowego rozwoju, adaptacji i regeneracji całego organizmu. Tak duża zmienność w funkcjonowaniu komórek i organizmu nie zależy od genetyki, lecz epigenetyki [31]. Epigenetyka dotyczy modyfikacji DNA, które nie zmieniając sekwencji wpływają na jego ekspresję. Istnieje wiele epigenetycznych modyfikacji, składających się na epigenom, m.in. acetylowanie, metylacja lub fosforylowanie histonów, niekodujące RNA oraz metylacja DNA [49]. Wymienione markery epigenetyczne wpływają na strukturę chromatyny i dzięki temu promują lub hamują ekspresję genów [49].

## METYLACJA DNA

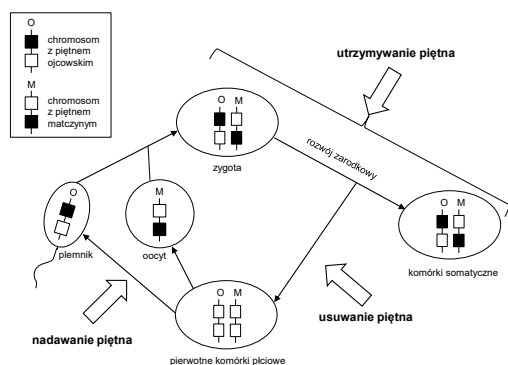
Najczęściej badaną i najlepiej poznaną modyfikacją epigenetyczną jest metylacja DNA. Polega na kowalencyjnym dodaniu grupy metylowej (-CH<sub>3</sub>) do węgla w pozycji 5 w pierścieniu cytozyny, co prowadzi do powstania 5-metylo-cytozyny (5-mC) [52]. Metylowanie dotyczy cytozyn znajdujących się w ugrupowaniach dinukleotydów CpG. Te ugrupowania często występują w skupiskach, tworząc ciąg powtarzających się sekwencji nazywany wyspami CpG

(CpG islands). Wyspy CpG najczęściej są umiejscowione w regionie promotorowym genów [33]. U człowieka około 70% dinukleotydów CpG jest zmetylowanych, niezmetylowane pozostają dinukleotydy w wyspach CpG zlokalizowanych w komórkach linii zarodkowych lub znajdujących się blisko promotorów w komórkach somatycznych [33]. Transkrypcja genu zależy od dostępności jego promotora i innych regionów regulatorowych dla czynników transkrypcyjnych. Metylowanie DNA zmniejsza dostępność DNA i może hamować wiązanie się różnych czynników regulatorowych, hamując ekspresję genu [49].

Reakcja metylacji DNA jest katalizowana przez metylotransferazy DNA (DNA methyltransferase, DNMT). Metylotransferazy DNMT3A i DNMT3B rozpoznają niezmetylowane CpG i nadają nowe znaczniki metylacyjne, dlatego nazywane są metylotransferazami działającymi *de novo*. Metylowanie *de novo* odbywa się podczas wczesnych etapów embriogenezy i w komórkach nowotworowych [48]. Metylotransferaza DNMT1 rozpoznaje i metyluje hemimetylowane dinukleotydy CpG podczas replikacji DNA i kopiuje już istniejący wzór metylacji na potomne nici DNA. Badania wskazują, że funkcje tych trzech metylotransferaz mogą się ze sobą pokrywać [32].

## PIĘTNOWANIE GENOMOWE

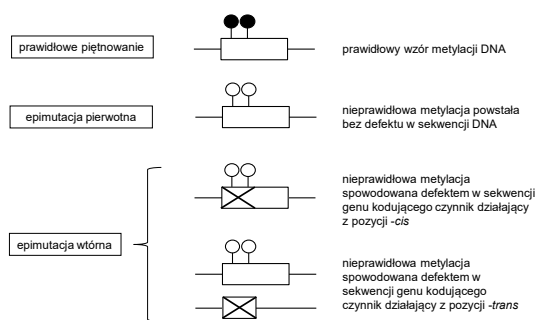
Metylowanie DNA odrywa główną rolę w procesie piętnowania genomowego (genomic imprinting). Jest to zjawisko obserwowane u ssaków i roślin kwitnących. Potomstwo dziedziczy dwa zestawy chromosomów, od ojca i od matki. Większość genów autosomalnych ulega biallelicznej



**Ryc. 1.** Piętno genomowe na różnych etapach rozwoju organizmu. Piętno genomowe jest usuwane w pierwotnych komórkach płciowych i na nowo nadawane podczas rozwoju komórek rozrodczych. Piętna są utrzymywane podczas zapłodnienia i w kolejnych etapach rozwoju organizmu (wg [4] zmodyfikowano)

ekspresji – zarówno z matczynego, jak i ojcowskiego allele. Istnieje jednak grupa genów, które w wyniku modyfikacji genetycznej są ekspresowane tylko z jednego allele, w zależności od jej rodzicielskiego pochodzenia. Zjawisko monoallelicznej ekspresji określonych genów w zależności od tego, czy znajdują się na allelu pochodzącym od matki, czy od ojca jest określane terminem „piętnowanie genomowe” [8, 50]. Piętna genomowe (genomic imprints) w postaci wzoru metylacji DNA (i innych markerów epigenetycznych) są umiejscowione w regionach kontroli piętnowania (imprinting control regions, ICRs). Wszystkie ICRs są regionami o zróżnicowanej metylacji (differentially methylated regions, DMRs). ICRs wpływają na transkrypcję genów znajdujących się pod ich kontrolą, które ulegają ekspresji w zależności od tego, czy znajdują się na chromosomie matczym, czy ojcowskim. Piętna genomowe są niezmiennie, obecne podczas całego życia organizmu i znajdują się właściwie we wszystkich komórkach ciała. Istnieją skupiska, tzw. klastry genów podlegających kontroli danego ICR, ich liczba wynosi od kilku do kilkunastu i są to zarówno geny ulegające translacji, jak i wytwarzające np. niekodujące RNA [15]. Piętnowane geny pełnią różne funkcje, są regulatorami wzrostu i rozwoju, wpływają na prawidłowe funkcjonowanie mózgu i utrzymanie postnatalnej równowagi energetycznej. U człowieka dotąd zidentyfikowano około 100 genów podlegających procesowi piętnowania [6, 28].

Piętna genomowe są nadawane podczas gametogenezy i są zachowywane w niezmięnionej postaci w jednej generacji, od chwili ich ustanowienia w komórkach płciowych danej osoby, aż do ich usunięcia w prekursorach gamet jej potomka. Z tego względu piętnowanie genomowe stanowi przykład międzypokoleniowego dziedziczenia epigenetycznego [4, 44]. Piętno genomowe jest wymazywane w pierwotnych komórkach płciowych i na nowo ustanawiane podczas późniejszych etapów rozwoju komórek rozrodczych (ryc. 1). Piętno jest nadawane zgodnie z płcią – inny wzór piętna jest w oocycie, inny w plemniku [4]. Po zapłodnieniu piętno jest utrzymywane w blastocystyce. Metylacyjne piętna nie są usuwane w czasie



**Ryc. 2.** Epimutacja pierwotna i wtórna. Prawidłowa metylacja DNA – czarne koła, nieprawidłowa metylacja DNA – białe koła, defekt w sekwencji DNA – „X”

demetylacji całego genomu, która odbywa się podczas wczesnych etapów rozwoju embrionalnego. W komórkach somatycznych piętno jest powielane i odczytywane przez kompleksy transkrypcyjne. Przez całe życie człowieka piętna genomowe są utrzymywane i chronione przed epigenetycznymi zmianami, jakie zachodzą w komórkach somatycznych [51]. Proces ten jest bardzo złożony i jego zaburzenia mogą doprowadzić do powstawania chorób związanych z zaburzeniami piętnowania (imprinting disorders, IDs).

### NIEPRAWIDŁOWA METYLACJA W CHOROBAH ZWIĄZANYCH Z ZABURZENIAMI PIĘTNOWANIA

Choroby związane z zaburzeniami piętnowania są grupą schorzeń, w których obserwuje się nieprawidłowe wzrastanie, rozwój, zachowanie i/lub metabolizm [14]. W tej grupie chorób identyfikuje się cztery rodzaje nieprawidłowości molekularnych: jednorodzicielską disomię (uniparental disomy, UPD), czyli dziedziczenie obu chromosomów homologicznych od jednego z rodziców; delecje lub duplikacje (zmiany liczby kopii, copy number variants, CNVs); mutacje punktowe w piętnowanych genach oraz epimutacje [14, 22]. Defekty te są stwierdzane z różną częstotliwością w poszczególnych chorobach związanych z zaburzeniami piętnowania. Termin epimutacje odnosi się do zmian markerów epigenetycznych modyfikujących DNA, na potrzeby tej publikacji przedstawiono jedynie epimutacje polegające na nieprawidłowościach w metylacji DNA. Terminem „epimutacje pierwotne” określa się epimutacje, które powstają bez zmiany w genomowej sekwencji DNA i które są prawdopodobnie spowodowane przypadkowym lub wywołanym przez czynniki środowiskowe błędem w nadaniu lub utrzymaniu prawidłowego piętna genomowego [27] (ryc. 2). Natomiast termin „epimutacje wtórne” odnosi się do epimutacji, które są skutkiem zmian w sekwencji genów kodujących czynniki działające z pozycji -cis lub -trans [27], np. czynników wpływających na prawidłowy rozwój oocytu (NLRP5, NLRP7) [10, 19] oraz zygoty (ZFP57) [39] lub czynników transkrypcyjnych chroniących

**Tabela 1.** Choroby związane z zaburzeniem piętnowania, w których identyfikuje się epimutacje

Choroba	Chromosom	Region kontroli piętnowania	Typ epimutacji	Udział epimutacji [%]*	Udział MLID [%]	Literatura
Przemijająca cukrzyca noworodkowa (TNDM)	6q24	<i>PLAGL1</i> :alt-TSS-DMR	LOM	30%	50%	[40]
Zespół Beckwitha i Wiedemanna (BWS)	11p15.5	<i>HT19/IGF2</i> :IG-DMR <i>KCNQ1OT1</i> :TSS-DMR	GOM LOM	10% 60%	rzadko 30%	[12, 16]
Zespół Silvera i Russella (SRS)	11p15.5	<i>HT19/IGF2</i> :IG-DMR	LOM	40%	15–30%	[23, 57]
Zespół Temple (TS14)	14q32	<i>MEG3/DLK</i> :IG-DMR i <i>MEG3</i> :TSS-DMR	LOM	12%	rzadko	[29]
Zespół Kagami-Ogata (KOS)	14q32	<i>MEG3/DLK</i> :IG-DMR i <i>MEG3</i> :TSS-DMR	GOM	20%	NR	[35]
Zespół Angelmana (AS)	15q11-q13	<i>SNURF</i> :TSS-DMR	LOM	<5%	rzadko	[13]
Zespół Pradera i Willego (PWS)	15q11-q13	<i>SNURF</i> :TSS-DMR	GOM	<1%	NR	[13]
Rzekoma niedoczynność przytarczyc typu 1b (PHP1b)	20q13	<i>GNAS-NESP</i> :TSS-DMR, <i>GNAS-XL</i> :Ex1-DMR i <i>GNAS A/B</i> :TSS-DMR	LOM	80–90%	0–38%	[12, 42]

\* Przedstawiono udział epimutacji wśród wszystkich defektów identyfikowanych w danej chorobie (inne niewymienione nieprawidłowości to CNVs, UPD lub mutacje punktowe w piętnowanych genach); LOM – hipometylacja (loss of methylation), GOM – hipermetylacja (gain of methylation), MLID – „multi-locus imprinting disturbance”, NR – nieraportowane.

regiony kontroli piętnowania przed nieprawidłową metylacją (CTCF, POU5F1) [11]. Wyróżnia się trzy podstawowe mechanizmy powstawania epimutacji:

- Zaburzenia w procesie usuwania piętna, czyli demetylacji ICR w pierwotnych komórkach płciowych.
- Zaburzenia w procesie nadawania piętna, czyli metylacji ICR w oocycie lub plemniku.
- Zaburzenia w procesie utrzymywania piętna w zarodku, czyli wadliwa ochrona przed demetylacją ICR.

Mechanizmy te mogą prowadzić do hipometylacji (loss of methylation, LOM) lub hipermetylacji (gain of methylation, GOM) w regionie kontroli piętnowania. Z obecnością epimutacji może być związane zjawisko mozaikowości somatycznej, czyli obecność defektu epigenetycznego nie w każdej komórce ciała [17]. Jest ono tłumaczone powstawaniem epimutacji (np. hipometylacji regionu 11p15) już po zapłodnieniu (postzygotycznie), co może doprowadzić do obecności zarówno komórek zdrowych, jak i z epimutacją w danej tkance, przy czym stosunek komórek prawidłowych do zmienionych może być odmienny w zależności od tkanki [21, 53]. Epimutacje występują z różną częstotliwością i dotyczą różnych piętnowanych loci w zależności od danej choroby związanej z zaburzeniami piętnowania (tabela 1). Nieprawidłowy wzór metylacji najczęściej jest identyfikowany w rzekomej niedoczynności przytarczyc typu 1b oraz w zespole Beckwitha i Wiedemanna, gdzie stanowi odpowiednio 80–90% oraz 70% wszystkich identyfikowanych zmian. Obecnie wyróżnia się osiem dobrze scharakteryzowanych klinicznie i molekularnie chorób związanych z zaburzeniami piętnowania, w których identyfikuje się epimutacje związane z różnymi regionami chromosomowymi, są to zespoły: Beckwitha i Wiedemanna oraz Silvera

i Russella (chromosom 11p15), Angelmana oraz Pradera i Willego (chromosom 15q11-q13), Temple i Kagami-Ogata (chromosom 14q32), przemijająca cukrzyca noworodków (chromosom 6q24), a także rzekoma niedoczynność przytarczyc typu 1b (chromosom 20q13). Opisano również inne choroby zakwalifikowane do grupy chorób związanych z zaburzeniami piętnowania, w których dotychczas nie wykryto epimutacji. Do tej grupy należą zespoły: Mulchandani, Bhoj i Conlin związane z obecnością disomii chromosomu 20, IMAGE, Birka i Barel, Schaafa i Yang oraz ośrodkowe przedwczesne dojrzewanie płciowe typu 2, spowodowane mutacjami w sekwencji piętnowanych genów, odpowiednio w *CDKN1C*, *KCNK9*, *MAGEL2* i *MKRN3* [1, 2, 7, 24, 47]. W niektórych przypadkach defekty metylacji tego samego regionu kontroli piętnowania prowadzą do ‘lustrzanych’ chorób, które charakteryzują się przeciwstawnymi cechami klinicznymi w zależności od tego, czy zmiany dotyczą allela ojcowskiego, czy matczynego. Przykładem takich chorób jest zespół Beckwitha i Wiedemanna, w którym jednym z objawów jest nadmierne wzrastanie oraz Silvera i Russella, dla którego typowy jest niedobór wzrostu, przy czym oba zespoły są związane z zaburzoną piętnowaniem tego samego regionu chromosomowego 11p15. U części pacjentów z chorobami związanymi z zaburzeniami piętnowania identyfikuje się zaburzenia metylacji nie tylko w locus związanym z chorobą, lecz także w innych loci genomu, określane jako „multi-locus imprinting disturbance” (MLID) (tabela 1) [40]. U pacjentów z MLID może występować nakładanie się fenotypów różnych chorób związanych z zaburzeniami piętnowania. Przyczyna występowania MLID nie została jeszcze dobrze poznana, dotychczas opisano kilka przypadków mutacji w sekwencji genów działających z pozycji *trans* [10, 39, 43].

## WPLYW ŚRODOWISKA NA PROCES PIĘTNOWANIA

Istotnym aspektem w badaniu zmian metylacji w chorobach związanych z zaburzeniami piętnowania jest wpływ czynników środowiskowych na proces piętnowania genomowego. Czynniki te, np. dostępność różnych składników odżywczych lub ekspozycja na chemiczne zanieczyszczenia w okresie płodowym, mogą pełnić rolę modyfikatorów, przyczyniających się do powstawania epimutacji [44]. Przy czym nie udowodniono do tej pory bezpośredniego związku między dietą ciężarnej, a częstotliwością pojawiania się chorób związanych z zaburzeniami piętnowania [18]. Badania przeprowadzone w grupie pacjentów z zespołem Beckwitha i Wiedemanna sugerują, że warianty molekularne w genie kodującym metylotransferazę DNMT1, które powodują obniżenie jej aktywności enzymatycznej, mogą prowadzić do zaburzeń w utrzymywaniu prawidłowej metylacji w regionie kontroli piętnowania *KCNQ1OT1:TSS-DMR*, prawdopodobnie na etapie wczesnozarodkowym [18]. Białko DNMT1 odgrywa ważną rolę w utrzymywaniu prawidłowej metylacji podczas wczesnego rozwoju zarodkowego i jest jednym z głównych enzymów w szlaku metabolizmu kwasu foliowego, gdzie katalizuje przeniesienie grupy metylowej z S-adenozylometioniny na cytozynę. Autorzy badań sugerują, że dieta matki uboga w kwas foliowy może zwiększać negatywne skutki nieprawidłowego metabolizmu kwasu foliowego u płodu, spowodowane wariantami genetycznymi, m.in. w *DNMT1* [18]. Inne badania wskazują, że małe stężenie witaminy B12 jest związane z wysokim poziomem metylacji w piętnowanym *locus H19/IGF2:IG-DMR* [56]. Natomiast badania na myszach wykazały, że dieta bogata w tłuszcze prowadząca do otyłości, zmniejsza ekspresję *Dppa3* w oocytach myszy, co prowadzi do hipometylacji w regionach kontroli piętnowania w genomie zygot pochodzących od otyłych matek [26]. Jednak istnieją także badania, które wskazują, że dieta nie ma znaczącego wpływu na metylację ICR. Zastosowanie produktów ubogich w białko w diecie samic myszy podczas ciąży i laktacji zmieniło poziom ekspresji wielu piętnowanych genów, lecz nie spowodowało zmian w poziomie ich metylacji [30].

Na proces metylacji mogą mieć wpływ nie tylko składniki odżywcze, ale także narażenie w okresie prenatalnym na wpływ czynników chemicznych zaburzających gospodarkę hormonalną, takich jak bisfenol A (BPA) [34]. Ekspozycja na ten czynnik prowadziła do zmian w metylacji *locus MEST: alt-TSS-DMR*, nasilając proces tworzenia komórek tłuszczowych, co mogło wpływać na zwiększenie masy ciała w okresie niemowlęcym [34]. Badania na myszach wykazały, że ekspozycja matki na bisfenol A w trakcie późnych etapów rozwoju oocytu i wczesnych etapów rozwoju zarodka znacząco zmieniła poziom metylacji w regionach kontroli piętnowania *Snrpn1* i *Igf2 DMR1* [54].

Współdziałanie czynników genetycznych i środowiskowych może spowodować zaburzenia imprintingu i nieprawidłową metylację w regionach kontroli piętnowania. Analiza pacjentów z pierwotnymi epimutacjami,

u których zidentyfikowano zmiany metylacji bez obecności towarzyszących wariantów w sekwencji DNA, może się przyczynić do pogłębienia wiedzy, w jaki sposób różne czynniki środowiskowe wpływają na powstawanie tego typu defektów.

## METODY ANALIZY METYLACJI DNA STOSOWANE W CHOROBAH ZWIĄZANYCH Z ZABURZENIAMI PIĘTNOWANA

Metylacja dinukleotydów CpG w ICR jest dogodnym biomarkerem epigenetycznym w chorobach związanych z zaburzeniami piętnowania, gdyż spełnia wszystkie kryteria, wymagane dla markera stosowanego w diagnostyce medycznej. Biomarker epigenetyczny jest definiowany jako znacznik epigenetyczny, który nie zmienia się podczas obróbki próbki biologicznej i umożliwia uzyskanie powtarzalnych rezultatów pomiarów w określonej tkance, co pozwala na potwierdzenie klinicznego podejrzenia choroby [25].

W przypadku chorób związanych z zaburzeniami piętnowania należy pamiętać o zjawisku mozaikowości dotyczącym epimutacji. Może się ono wiązać z trudnościami diagnostycznymi, gdyż niski poziom mozaikowości defektu epigenetycznego (nieprawidłowego wzoru metylacji) w DNA leukocytów krwi obwodowej, która jest najczęściej stosowana do analiz molekularnych, może nie zostać zidentyfikowany. Dlatego w razie braku wykrycia defektu we krwi w uzasadnionych klinicznie przypadkach, należy rozważyć analizę DNA w innych dostępnych tkankach, np. fibroblastach czy komórkach nabłonka policzka [badania własne, 21, 53].

Obecnie stosuje się różne techniki umożliwiające badanie metylacji DNA, zarówno do analizy ściśle określonych *loci* (od jednego do kilkudziesięciu), najczęściej stosowane do celów diagnostycznych, jak i obejmujące cały genom, wykorzystywane głównie do badań naukowych.

### Metody analizy metylacji DNA w jednym lub kilkudziesięciu *loci*

#### *Metylospecyficzna multipleksowa amplifikacja sond zależna od ligacji (methylation sensitive multiplex ligation-dependent probe amplification, MS-MLPA)*

Jest to półilościowa metoda, najczęściej używana w laboratoriach diagnostycznych. W pierwszym etapie następuje hybrydyzacja sond połówkowych do zdenaturowanego DNA, potem proces ich ligacji. Następnie przeprowadzana jest podwójna reakcja PCR ze znakowanymi starterami: z nietrawioną próbką, służącą do oceny liczby kopii genu oraz z próbką trawioną metylo-specyficznym enzymem HhaI, dostarczającą informacji o poziomie metylacji określonych *loci*. Produkty reakcji MS-MLPA są poddawane elektroforezie kapilarnej w automatycznym analizatorze DNA i porównywane z próbkami kontrolnymi w przypadku analizy liczby kopii lub między próbką trawioną i nietrawioną – do analizy poziomu metylacji. MS-MLPA umożliwia

jednoczesną analizę do 46 różnych regionów chromosomowych [45].

*Metylospecyficzna łańcuchowa reakcja polimerazy (methylation-sensitive polymerase chain reaction, MS-PCR, MSP)*

Do przeprowadzenia reakcji używa się DNA, który jest chemicznie zmodyfikowany wodorosiarczanem IV sodu. W zmodyfikowanym DNA niezmetylowane cytozyny są zamienione na uracyl, natomiast zmetylowane cytozyny pozostają niezmiennione, takie DNA jest amplifikowane z użyciem starterów specyficznych dla zmodyfikowanego (zmetylowanego) allela i allela niezmetylowanego. Metoda umożliwia badanie jednego locus w jednej reakcji [20, 37].

*Pirosekwencjonowanie z użyciem DNA zmodyfikowanego wodorosiarczanem IV sodu (bisulfite pyrosequencing)*

W pierwszym etapie przeprowadza się reakcję amplifikacji, podczas której uracyl jest zamieniany na tyminę z użyciem starterów wyznakowanych biotyną. Produkty reakcji są sekwencjonowane z wykorzystaniem starterów zlokalizowanych tuż przed sekwencją, która ma być odczytana. Uzyskany pirogram pozwala na określenie odsetka metylacji w miejscu każdego dinukleotydu CpG na podstawie poziomu niezmiennionych w procesie modyfikacji wodorosiarczanem IV sodu cytozyn i zmienionych w tym procesie tymin. Pirosekwencjonowanie umożliwia otrzymanie krótkich sekwencji DNA, z tego względu w jednej reakcji analizuje się pojedyncze locus [36, 55].

*Metylozależna multipleksowa reakcja wydłużania startera (multilocus methylation-specific single nucleotide primer extension, MS-SNuPE)*

Technika pozwala na jednoczesną analizę metylacji DNA do 10 loci. W metodzie tej stosuje się modyfikację DNA za pomocą wodorosiarczanu IV sodu. Zmodyfikowane DNA jest amplifikowane w multipleksowej reakcji, podczas której powielane są zarówno zmetylowane, jak i niezmetylowane allele. Produkty PCR są poddawane reakcji wydłużania starterów, przy czym każde piętnowane locus jest powielane za pomocą dwóch różnych par starterów oligonukleotydowych, które pozwalają na ocenę metylacji w dwóch różnych obszarach tych samych wysp CpG. Uzyskane produkty są poddawane analizie fragmentów na automatycznym sekwencjonatorze DNA [9].

*Allelospecyficzna zależna od metylacji multipleksowa reakcja amplifikacji w czasie rzeczywistym (allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR, ASMM RTQ-PCR)*

Reakcja jest prowadzona z zastosowaniem DNA zmodyfikowanego za pomocą wodorosiarczanu IV sodu. Technika polega na hybrydyzacji do zmodyfikowanego DNA fluorescencyjnych sond typu TaqMan, swoiście rozpoznających zmetylowany allel (zawierający nukleotyd „C”) i niezmetylowany allel (z nukleotydem „T”).

W czasie reakcji amplifikacji DNA sonda jest degradowana i w każdym cyklu uwalniany jest fluorochrom, a sygnał fluorescencyjny jest wykrywany przez laser. Intensywność fluorescencji koreluje z ilością określonego allela w próbce DNA. W jednym eksperymencie badane jest pojedyncze locus [5].

### Metody analizy metylacji DNA obejmujące cały genom

DNA znakuje się znacznikiem fluorescencyjnym, a następnie hybryduje do sond znajdujących się na macierzy. Przez ocenę stosunku sygnałów fluorescencyjnych ze zmetylowanych i niezmetylowanych cytozyn określany jest stopień metylacji.

### Całogenomowe mikromacierze metylacyjne (genome-wide methylation array, GWMA)

W mikromacierzach, służących do analizy metylomu dla każdego dinukleotydu CpG, tworzona jest sonda oligonukleotydowa swoista dla sekwencji zmetylowanej i niezmetylowanej. Sondy są tak zaprojektowane, żeby były komplementarne do sekwencji DNA zmodyfikowanej w reakcji z wodorosiarczanem IV sodu lub fragmentów uzyskanych po trawieniu metylospecyficznymi enzymami restrykcyjnymi. Po zastosowaniu tego typu enzymów odzyskuje się fragmenty DNA wzbogacone o zmetylowane wyspy CpG w wyniku immunoprecypitacji. Tak są przygotowane poszczególne wyspy CpG. Liczba analizowanych loci (wysp CpG) zależy od rodzaju mikromacierzy i waha się od około 485 000 do 850 000 [3, 17, 46].

*Sekwencjonowanie całego genomu z użyciem DNA zmodyfikowanego wodorosiarczanem IV sodu (whole genome bisulfite sequencing, WGBS)*

Jest to metoda NGS (next generation sequencing). Analiza składa się z przygotowania biblioteki DNA, polegającego na fragmentacji DNA, a następnie przyłączeniu do powstałych fragmentów krótkich, znakowanych adapterów. Otrzymana biblioteka jest modyfikowana wodorosiarczanem IV sodu. Kolejnym etapem jest powielanie DNA, a następnie właściwe sekwencjonowanie. WGBS umożliwia analizę około 15–20 milionów dwunukleotydów CpG w obszarze całego genomu. Technika jest metodą wielkoskalową, prowadzącą do uzyskania bardzo wielu danych wymagających zaawansowanej analizy bioinformatycznej [17].

### PERSPEKTYWY

Wzór metylacji DNA jest ważnym biomarkerem, umożliwiającym zweryfikowanie klinicznego rozpoznania w chorobach związanych z zaburzeniami piętnowania. Analizy metylacji DNA w tej grupie chorób są istotne także ze względu na badania zmierzające do opracowania metod terapii przez przywrócenie prawidłowego statusu epigenetycznego. Pojawiły się m.in. próby przeprowadzenia bezpośredniej modyfikacji epigenetycznej w piętnowanych genach za pomocą inaktywowanych białek fuzyjnych

Cas9 (CRISPR associated protein 9). Wykazano, że białko fuzyjne składające się z Cas9 i prokariotycznej metylo-transferazy MQ1 może wpływać na metylację cytozyny w ściśle określonych lokalizacjach w komórkach ludzkich [38]. Białko fuzyjne wprowadzono także do zygoty myszy, gdzie indukowało metylację określonych wysp CpG, co wskazuje na jego potencjalną użyteczność w modyfikacjach metylacji na wczesnych etapach rozwoju organizmu [38]. W innym badaniu wprowadzenie do oocytów myszy

fuzyjnego mRNA *dCas9-Tet/Dnmt*, mającego zdolność do edytowania metylacji w wyspach CpG, pozwoliło na naprawę defektu odpowiedzialnego za zespół Angelmana w jego mysim modelu [58]. Dalsze badania mające na celu doskonalenie metod edytowania metylomu mogą się przyczynić do wprowadzenia w przyszłości terapii epigenetycznych, mających zastosowanie w leczeniu chorób związanych z zaburzeniami piętnowania.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Abreu A.P., Dauber A., Macedo D.B., Noel S.D., Brito V.N., Gill J.C., Cukier P., Thompson I.R., Navarro V.M., Gagliardi P.C., Rodrigues T., Kochi C., Longui C.A., Beckers D., de Zegher F. i wsp.: Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N. Engl. J. Med.*, 2013; 368: 2467–2475
- [2] Arboleda V.A., Lee H., Parnaik R., Fleming A., Banerjee A., Ferraz-de-Souza B., Délot E.C., Rodríguez-Fernandez I.A., Braslavsky D., Bergadá I., Dell'Angelica E.C., Nelson S.F., Martínez-Agosto J.A., Achermann J.C., Vilain E.: Mutations in the PCNA-binding domain of CDKN1C cause IMAGE syndrome. *Nat. Genet.*, 2012; 44: 788–792
- [3] Aref-Eshghi E., Schenkel L.C., Lin H., Skinner C., Ainsworth P., Paré G., Siu V., Rodenhiser D., Schwartz C., Sadikovic B.: Clinical validation of a genome-wide DNA methylation assay for molecular diagnosis of imprinting disorders. *J. Mol. Diagn.*, 2017; 19: 848–856
- [4] Arnaud P.: Genomic imprinting in germ cells: Imprints are under control. *Reproduction*, 2010; 140: 411–423
- [5] Azzi S., Steunou V., Rousseau A., Rossignol S., Thibaud N., Danton F., Le Jule M., Gicquel C., Le Bouc Y., Netchine L.: Allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR (ASMM RTQ-PCR), a powerful method for diagnosing loss of imprinting of the 11p15 region in Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes. *Hum. Mutat.*, 2011; 32: 249–258
- [6] Baran Y., Subramaniam M., Biton A., Tukiainen T., Tsang E.K., Rivas M.A., Pirinen M., Gutierrez-Arcelus M., Smith K.S., Kukurba K.R., Zhang R., Eng C., Torgerson D.G., Urbanek C., GTEx Consortium i wsp.: The landscape of genomic imprinting across diverse adult human tissues. *Genome Res.*, 2015; 25: 927–936
- [7] Barel O., Shalev S.A., Ofir R., Cohen A., Zlotogora J., Shorer Z., Mazor G., Finer G., Khateeb S., Zilberberg N., Birk O.S.: Maternally inherited Birk Barel mental retardation dysmorphism syndrome caused by a mutation in the genomically imprinted potassium channel KCNK9. *Am. J. Hum. Genet.*, 2008; 83: 193–199
- [8] Barlow D.P., Bartolomei M.S.: Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2014; 6: a018382
- [9] Begemann M., Leisten I., Soellner L., Zerres K., Eggermann T., Spengler S.: Use of multilocus methylation-specific single nucleotide primer extension (MS-SNuPE) technology in diagnostic testing for human imprinted loci. *Epigenetics*, 2012; 7: 473–481
- [10] Begemann M., Rezwani F.I., Beygo J., Docherty L.E., Kolarova J., Schroeder C., Buiting K., Chokkalingam K., Degenhardt F., Wakeling E.L., Kleinle S., González Fassrainer D., Oehl-Jaschowitz B., Turner C.L.S., Patalan M. i wsp.: Maternal variants in NLRP and other maternal effect proteins are associated with multilocus imprinting disturbance in offspring. *J. Med. Genet.*, 2018; 55: 497–504
- [11] Beygo J., Citro V., Sparago A., De Crescenzo A., Cerrato F., Heitmann M., Rademacher K., Guala A., Enklaar T., Anichini C., Silnego M.C., Graf N., Prawitt D., Cubellis M.V., Horsthemke B. i wsp.: The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites. *Hum. Mol. Genet.*, 2013; 22: 544–557
- [12] Brioude F., Kalish J.M., Mussa A., Foster A.C., Blik J., Ferrero G.B., Boonen S.E., Cole T., Baker R., Bertolotti M., Cocchi G., Coze C., De Pellegrin M., Hussain K., Ibrahim A. i wsp.: Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: An international consensus statement. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2018; 14: 229–249
- [13] Buiting K.: Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, 2010; 154: 365–376
- [14] Carli D., Riberi E., Ferrero G.B., Mussa A.: Syndromic disorders caused by disturbed human imprinting. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.*, 2020; 12: 1–16
- [15] Chotalia M., Smallwood S.A., Ruf N., Dawson C., Lucifero D., Frontera M., James K., Dean W., Kelsey G.: Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. *Genes Dev.*, 2009; 23: 105–117
- [16] Choufani S., Shuman C., Weksberg R.: Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, 2010; 154: 343–354
- [17] Court F., Tayama C., Romanelli V., Martin-Trujillo A., Iglesias-Platas I., Okamura K., Sugahara N., Simón C., Moore H., Harness J.V., Keirstead H., Sanchez-Mut J.V., Kaneki E., Lapunzina P., Soejima H. i wsp.: Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment. *Genome Res.*, 2014; 24: 554–569
- [18] Dagar V., Hutchison W., Muscat A., Krishnan A., Hoke D., Buckle A., Siswara P., Amor D.J., Mann J., Pinner J., Colley A., Wilson M., Sachdev R., McGillivray G., Edwards M. i wsp.: Genetic variation affecting DNA methylation and the human imprinting disorder, Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin. Epigenetics*, 2018; 10: 114
- [19] Docherty L.E., Rezwani F.I., Poole R.L., Turner C.L., Kivuva E., Maher E.R., Smithson S.F., Hamilton-Shield J.P., Patalan M., Gizewska M., Peregud-Pogorzelski J., Beygo J., Buiting K., Horsthemke B., Soellner L. i wsp.: Mutations in NLRP5 are associated with reproductive wastage and multilocus imprinting disorders in humans. *Nat. Commun.*, 2015; 6: 8086
- [20] Dos Santos J.F., Mota L.R., Rocha P.H., Ferreira de Lima R.L.: A modified MS-PCR approach to diagnose patients with Prader-Willi and Angelman syndrome. *Mol. Biol. Rep.*, 2016; 43: 1221–1225
- [21] Eggermann T.: Russell-Silver syndrome. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, 2010; 154: 355–364
- [22] Eggermann K., Blik J., Brioude F., Algar E., Buiting K., Russo S., Tümer Z., Monk D., Moore G., Antoniadi T., Macdonald F., Netchine I., Lombardi P., Soellner L., Begemann M. i wsp.: EMQN best practice

- guidelines for the molecular genetic testing and reporting of chromosome 11p15 imprinting disorders: Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 2016; 24: 1377–1387
- [23] Eggermann T., Perez de Nanclares G., Maher E.R., Temple I.K., Tümer Z., Monk D., Mackay D.J., Grønskov K., Riccio A., Linglart A., Netchine I.: Imprinting disorders: A group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin. Epigenetics*, 2015; 7: 123
- [24] Fountain M.D., Aten E., Cho M.T., Juusola J., Walkiewicz M.A., Ray J.W., Xia F., Yang Y., Graham B.H., Bacino C.A., Potocki L., van Haeringen A., Ruivenkamp C.A., Mancias P., Northrup H. i wsp.: The phenotypic spectrum of Schaaf-Yang syndrome: 18 new affected individuals from 14 families. *Genet. Med.*, 2017; 19: 45–52
- [25] García-Giménez J.L., Seco-Cervera M., Tollefsbol T.O., Romá-Mateo C., Peiró-Chova L., Lapunzina P., Pallardó F.V.: Epigenetic biomarkers: Current strategies and future challenges for their use in the clinical laboratory. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2017; 54: 529–550
- [26] Han L., Ren C., Li L., Li X., Ge J., Wang H., Miao Y.L., Guo X., Moley K.H., Shu W., Wang Q.: Embryonic defects induced by maternal obesity in mice derive from Stella insufficiency in oocytes. *Nat. Genet.*, 2018; 50: 432–442
- [27] Horsthemke B.: Mechanisms of imprint dysregulation. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, 2010; 154: 321–328
- [28] Imprinted Genes: by Species. <http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species> (14.11.2019)
- [29] Ioannides Y., Lokulo-Sodipe K., Mackay D.J., Davies J.H., Temple I.K.: Temple syndrome: Improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: An analysis of 51 published cases. *J. Med. Genet.*, 2014; 51: 495–501
- [30] Ivanova E., Chen J.H., Segonds-Pichon A., Ozanne S.E., Kelsey G.: DNA methylation at differentially methylated regions of imprinted genes is resistant to developmental programming by maternal nutrition. *Epigenetics*, 2012; 7: 1200–1210
- [31] Jaenisch R., Bird A.: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.*, 2003; 33: 245–254
- [32] Jones P.A.: Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.*, 2012; 13: 484–492
- [33] Jones P.A., Liang G.: Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat. Rev. Genet.*, 2009; 10: 805–811
- [34] Junge K.M., Leppert B., Jahreis S., Wissenbach D.K., Feltens R., Grützmann K., Thürmann L., Bauer T., Ishaque N., Schick M., Bewerunge-Hudler M., Röder S., Bauer M., Schulz A., Borte M. i wsp.: MEST mediates the impact of prenatal bisphenol A exposure on long-term body weight development. *Clin. Epigenetics*, 2018; 10: 58
- [35] Kagami M., Matsubara K., Nakabayashi K., Nakamura A., Sano S., Okamura K., Hata K., Fukami M., Ogata T.: Genome-wide multilocus imprinting disturbance analysis in Temple syndrome and Kagami-Ogata syndrome. *Genet. Med.*, 2017; 19: 476–482
- [36] Kagami M., Mizuno S., Matsubara K., Nakabayashi K., Sano S., Fuke T., Fukami M., Ogata T.: Epimutations of the IG-DMR and the MEG3-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell Syndrome-compatible phenotype. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2015; 23: 1062–1067
- [37] Kosaki K., McGinniss M.J., Veraksa A.N., McGinniss W.J., Jones K.L.: Prader-Willi and Angelman syndromes: Diagnosis with a bisulfite-treated methylation-specific PCR method. *Am. J. Med. Genet.*, 1997; 73: 308–313
- [38] Lei Y., Zhang X., Su J., Jeong M., Gundry M.C., Huang Y.H., Zhou Y., Li W., Goodell M.A.: Targeted DNA methylation in vivo using an engineered dCas9-MQ1 fusion protein. *Nat. Commun.*, 2017; 8: 16026
- [39] Mackay D.J., Callaway J.L., Marks S.M., White H.E., Acerini C.L., Boonen S.E., Dayanikli P., Firth H.V., Goodship J.A., Haemers A.P., Hahnemann J.M., Kordonouri O., Masoud A.F., Oestergaard E., Storr J. i wsp.: Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat. Genet.*, 2008; 40: 949–951
- [40] Mackay D.J., Eggermann T., Buiting K., Garin I., Netchine I., Linglart A., de Nanclares G.P.: Multilocus methylation defects in imprinting disorders. *Biomol. Concepts*, 2015; 6: 47–57
- [41] Mackay D.J., Temple I.K.: Transient neonatal diabetes mellitus type 1. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, 2010; 154C: 335–342
- [42] Mantovani G., Spada A., Elli F.M.: Pseudohypoparathyroidism and Gs $\alpha$ -cAMP-linked disorders: Current view and open issues. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2016; 12: 347–356
- [43] Meyer E., Lim D., Pasha S., Tee L.J., Rahman F., Yates J.R., Woods C.G., Reik W., Maher E.R.: Germline mutation in NLRP2 (NALP2) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome). *PLoS Genet.*, 2009; 5: e1000423
- [44] Monk D., Mackay D.J., Eggermann T., Maher E.R., Riccio A.: Genomic imprinting disorders: Lessons on how genome, epigenome and environment interact. *Nat. Rev. Genet.* 2019; 20: 235–248
- [45] Monteagudo-Sánchez A., Garin I., de Nanclares G.P., Monk D.: The use of methylation-sensitive multiplex ligation-dependent probe amplification for quantification of imprinted methylation. *Methods Mol. Biol.*, 2018; 1766: 109–121
- [46] Moran S., Arribas C., Esteller M.: Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics*, 2016; 8: 389–399
- [47] Mulchandani S., Bhoj E.J., Luo M., Powell-Hamilton N., Jenny K., Gripp K.W., Elbracht M., Eggermann T., Turner C.L., Temple I.K., Mackay D.J., Dubbs H., Stevenson D.A., Slattey L., Zackai E.H. i wsp.: Spinner N.B., Krantz I.D., Conlin L.K.: Maternal uniparental disomy of chromosome 20: A novel imprinting disorder of growth failure. *Genet. Med.*, 2016; 18: 309–315
- [48] Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E.: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 1999; 99: 247–257
- [49] Portela A., Esteller M.: Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.*, 2010; 28: 1057–1068
- [50] Reik W., Walter J.: Genomic imprinting: Parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.*, 2001; 2: 21–32
- [51] Seisenberger S., Peat J.R., Hore T.A., Santos F., Dean W., Reik W.: Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: Building and breaking epigenetic barriers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2013; 368: 20110330
- [52] Smith Z.D., Meissner A.: DNA methylation: Roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.*, 2013; 14: 204–220
- [53] Soellner L., Begemann M., Mackay D.J., Grønskov K., Tümer Z., Maher E.R., Temple I.K., Monk D., Riccio A., Linglart A., Netchine I., Eggermann T.: Recent advances in imprinting disorders. *Clin. Genet.* 2017; 91: 3–13
- [54] Susiarjo M., Sasson I., Mesaros C., Bartolomei M.S.: Bisphenol A exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *PLoS Genet.*, 2013; 9: e1003401



[55] Tabano S., Bonaparte E., Miozzo M.: Detection of loss of imprinting by pyrosequencing. *Methods Mol. Biol.*, 2015; 1315: 241–258

[56] Tserga A., Binder A.M., Michels K.B.: Impact of folic acid intake during pregnancy on genomic imprinting of IGF2/H19 and 1-carbon metabolism. *FASEB J.*, 2017; 31: 5149–5158

[57] Wakeling E.L., Brioude F., Lokulo-Sodipe O., O'Connell S.M., Salem J., Blik J., Canton A.P., Chrzanowska K.H., Davies J.H., Dias R.P., Dubern B., Elbracht M., Giabicani E., Grimberg A., Grønskov K.

i wsp.: Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: First international consensus statement. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2017; 13: 105–124

[58] Wei Y., Lang J., Zhang Q., Yang C.R., Zhao Z.A., Zhang Y., Du Y., Sun Y.: DNA methylation analysis and editing in single mammalian oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019; 116: 9883–9892

---

The authors have no potential conflicts of interest to declare.