

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra buněčné biologie
Oddělení vývojové biologie a imunologie

Bakalářská práce

Metylace a přenos somatického jádra do enukleovaného
oocytu u savců

Jana Rybářová

Školitel: Ing.RNDr. Vladimír Krylov, PhD.

2008

Poděkování patří hlavně mému školiteli **Ing.RNDr. Vladimíru Krylovovi, PhD.** za jeho vstřícnost, ochotu a odborné rady.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Metylace a přenos somatického jádra do enukleovaného oocyту u savců** vypracovala sama pouze za pomoci citované literatury a konzultací s mým školitelem.

srpen 2008

Jana Rybářová

Obsah

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE	1
ABSTRAKT	5
KLÍČOVÁ SLOVA	7
SEZNAM ZKRATEK	7
1. ÚVOD	8
2. ODLIŠNÉ METYLAČNÍ STRATEGIE JEDNOTLIVÝCH MODELOVÝCH ORGANISMŮ A CHYBNÉ PŘEPROGRAMOVÁNÍ PO JADERNÉM PŘENOSU	10
2. 1. SKOT	10
2. 2. PRASE	14
2. 3. OVCE	17
2. 4. MYŠ	19
2. 5. MAKAK RHESUS – ZÁSTUPCE PRIMÁTŮ	20
3. STAV TOTIPOTENCE A PLURIPOTENCE Z POHLEDU METYLACE	22
4. IMPRINTING	24
OSUD IMPRINTOVANÝCH GENOVÝCH MODIFIKACÍ BĚHEM VÝVOJE KLONU	25
4.1. OVCE	25
4.2. MYŠ	26
4.3. SKOT	27
5. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ÚROVEŇ METYLACE U KLONOVANÝCH EMBRYÍ	29
5.1. DNA METYLTRANSFERASA	29
5.2. STÁŘÍ DONOROVÉ BUŇKY	31
5.3. STUPEŇ DIFERENCIACE	32
5.4. FÁZE BUNĚČNÉHO CYKLU DONOROVÉ BUŇKY	33
6. ZÁVĚR	34
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	35

Abstrakt

V roce 1952 Robert Briggs a Thomas King přenesli jádro z blastuly skokana hnědého (*Rana pipiens*) do enukleovaného oocyty. Ze 104 jaderných přenosů získali 27 klonovaných pulců. O 10 let později provedl John Gurdon transplantaci jader diferencované střevní buňky do enukleovaného oocyty *Xenopus laevis*. Narozdíl od Briggse a Kinga se Gurdonovi podařilo získat dospělé žáby. V roce 1995 Ian Wilmut a Kevin Campbell získali klony z diferencovaných buněk ovčího embrya a o rok později úspěšně použili donorové jádro buněk z dospělého jedince. Tato událost odstartovala další výzkumy v dané oblasti, mezi nimi i výzkum zabývající se terapeutickým klonováním, při kterém by v budoucnu mohly být získávány kmenové buňky pomocí jaderného přenosu pacientových vlastních somatických buněk. Než budou moci být tyto metody použity v praxi, budeme muset vyřešit ještě mnoho nezodpovězených otázek, mezi nimi i problém, proč se většina klonovaných embryí nedožije ani narození nebo umírá záhy po něm.

Normální embrya vznikají kombinací dvou vysoce specializovaných rodičovských genomů, které jsou kompletně přeprogramovány do totipotentního stádia. K tomu, aby se mohla vyvíjet klonovaná embrya, musí také nastat epigenetické přeprogramování, při kterém jsou reaktivovány geny typické pro embryogenezi. Mezi mechanismy zajišťujícími epigenetické přeprogramování patří i DNA metylace a právě zde vzniká mnoho chyb, které mohou být z velké části zodpovědné za tak nízkou efektivitu při klonování.

Tato bakalářská práce sleduje chyby spojené s DNA metylací během klonování savců. Pokusila jsem se zde srovnat průběh epigenetického přeprogramování u normálních a jaderným přenosem vzniklých embryí u savčích modelových organismů. Dále jsem se zaměřila na skupiny genů, jejichž chybné přeprogramování může ovlivnit vývoj klonů.

Abstract

In the year 1952, Robert Briggs and Thomas King transferred the nucleus of a blastula of the Northern leopard frog (*Rana pipiens*) into an enucleated oocyte. From the total amount of 104 nuclear transfers, they obtained 27 cloned tadpoles. Ten years later, John Gurdon performed nuclear transplantation of differentiated intestinal cells into an enucleated oocyte of *Xenopus laevis*. In contrary to Briggs and King, Gurdon obtained adult frogs. In the year 1995, Ian Wilmut and Kevin Campbell obtained clones derived from differentiated embryonal ovine cells and a year later, they successfully used donor nucleus from differentiated cells of adult sheep. This event launched further research in the field, including the research dealing with therapeutical cloning which could generate stem cells by means of a nuclear transfer of the patient's own somatic cells. Before, these methods can be applied practically, we will have to settle many open items such as the problem why most cloned embryos do not survive till the birth or die only shortly after it.

Normal embryos arise by a combination of two highly specialized parental genomes which are completely reprogrammed into a totipotent state. To make the cloned embryos evolve, epigenetic reprogramming has to occur, accompanying the reactivation of genes typical for embryogenesis, normally silenced in the somatic donor nucleus. Mechanisms responsible for epigenetic reprogramming include DNA methylation, the process where many errors could emerge, resulting in the low efficiency of the cloning.

This bibliographic search shows defects joined with DNA methylation during the cloning of mammals. I attempted to compare the course of epigenetic reprogramming of normal and nuclear transfere derived embryos in mammalian model organisms. Further I focused on groups of genes which faulty reprogramming may affect the development of clones.

Klíčová slova

DNA metylace, přenos jádra somatické buňky, epigenetické přeprogramování, časný embryonální vývoj, klonování

Key words

DNA methylation, somatic cell nuclear transfer, epigenetic reprogramming, early embryonal development, cloning

Seznam zkratek

SCNT	přenos jádra somatické buňky (somatic cell nuclear transfer)
Dnmt	DNA metyltransferasa (DNA methyltransferases)
IVF	<i>in vitro</i> oplození (<i>in vitro</i> fertilization)
ICR	kontrolní oblast imprintingu (imprinting control region)
ICM	vnitřní buněčná masa (inner cell mass)
LOS	syndrom velkých potomků (large offspring syndrome)
TSA	trichostatin A

1. Úvod

Vzniku totipotentního embrya předchází splynutí dvou gamet odlišného pohlaví. Nový embryonální genom, umožňující vznik všech buněčných typů, je tedy kombinován ze dvou vysoce specializovaných rodičovských genomů. Ve velmi krátkém čase zde musí proběhnout efektivní přeprogramování, které umožní vznik totipotence. Jedním z důležitých mechanismů v tomto procesu je DNA metylace.

Metylová skupina se váže převážně na 5'- cytosinové zbytky CpG dinukleotidů. V savčím genomu jsou CpG dinukleotidy přítomny jen málo, můžeme je ale s větší frekvencí očekávat v malých genomových oblastech, které označujeme jako CpG ostrovy. Metylace je obecně spojována s umlčením genové exprese. Má důležitou úlohu v určování buněčného osudu, neboť zajišťuje, které geny budou reprimovány a které naopak exprimovány v různých buněčných typech. DNA-metyltransferasa (Dnmt) je enzym katalyzující přidávání metylových skupin. Dnmt1 je zodpovědná za udržení metylace v nově vznikajících vláknech DNA po replikaci, přičemž Dnmt1o je její specifická oocytární forma. Dnmt3a a Dnmt3b katalyzují metylaci *de novo*. Dnmt3a metyluje sekvence, které jsou důležité během pozdějšího vývoje. Dnmt3b se zaměřuje na oblasti, hrající významnou roli v časném embryonálním vývoji.

Ustavení nového metylačního stavu je jedním z důležitých kroků, který musí embryonální genom podstoupit. Jakmile dojde ke splynutí pohlavních buněk, protaminy, umožňující organizaci spermatické DNA do vysoce kompaktní struktury, jsou rychle nahrazeny oocytárními histony. Poté následuje rozsáhlá demetylace paternálního genomu. Tento proces nastává jenom několik hodin po oplození a je označován jako aktivní demetylace, neboť nastává před DNA replikací. Byl pozorován u myši, prasete, potkana a dalších druhů. U skotu a člověka probíhá pouze částečně. U ovce a králíka nebyla aktivní demetylace dokonce pozorovaná vůbec. Demetylace maternálního genomu je označována jako pasivní, neboť je závislá na DNA replikaci. Po každé S fázi buněčného cyklu tedy dochází ke snižování metylační úrovně až do stádia moruly, kde jsou již oba rodičovské genomy v hypometylovaném stavu. Ve stádiu blastocysty poté můžeme pozorovat metylaci *de novo*. Právě v tomto stádiu nastává vznik prvních dvou buněčných linií: trofoektodermu (budoucí placenta) a vnitřní buněčné mase (vlastní embryo). Pasivní demetylace i metylace *de novo* probíhají odlišně u různých živočišných druhů. U embryí skotu nastává počátek remetylace mezi osmi- až šestnácti-buněčným stádiem a ve stádiu blastocysty je metylován

trofoektoderm i vnitřní buněčná masa (ICM). U myši je genom postupně demetylován v průběhu celého preimplantačního období a remetylace ve stádiu blastocysty je omezena pouze na ICM. U prasete a králíka demetylace nastává hned po oplození, takže ve čtyř- až osmi-buněčném stádiu již můžeme pozorovat nejnižší úroveň hypometylace, která se nemění až do stádia blastocysty. Z těchto důvodů se proto někdy uvádí, že u posledních dvou uvedených druhů pasivní demetylace neprobíhá. Proč můžeme pozorovat různé vzory jak pasivní, tak aktivní demetylace u jednotlivých skupin živočichů, je zatím nejasné (shrnutí Fulka *et al.*, 2008; shrnutí Shi *et al.*, 2003).

Z enzymatického hlediska vypadá pasivní a aktivní demetylace následovně. Oocyt si nese svoji specifickou formu metyltransferasy v jádře. Během jeho zrání dochází ke snížení množství enzymu, což je způsobeno změnou lokalizace Dnmt1o do cytoplasmy. Po oplození zde zůstává během celého preimplantačního období s výjimkou osmi buněčného stádia, kdy enzym na krátkou dobu vstupuje do jader a zase je opouští. Tento proces je nejspíš nutný k udržení metylačního vzoru imprintovaných genů. Celková absence Dnmt1o v jádře způsobí, že embryonální genom si není schopen udržet metylační stav, a tudíž během rýhování nastává postupná demetylace až hypometylace genomu. Po nidaci blastocysty Dnmt1o znovu vstupuje do jader a brzy na to je nahrazena somatickou formou (Oliveri *et al.*, 2007).

Jedny z mála genů, které odolávají epigenetickým změnám v průběhu časně embryogeneze, jsou imprintované geny. Imprinting je fenomén, dosud objevený u savců a rostlin. Jedná se o nerovnocennou expresi alel v závislosti na rodičovském původu. Dochází tedy k monoalelické expresi buď maternálních nebo paternálních genů. Většina imprintovaných genů se nachází ve velkých chromosomálních doménách. Ty jsou charakteristické přítomností velkého počtu odlišně metylovaných GpC dinukleotidů. Jsou označovány jako kontrolní oblasti imprintingu (ICR). ICR jsou zodpovědné jak za umlčení jedné alely, tak za expresi jejího homologního protějšku. Jak již bylo řečeno, během časně embryonálního vývoje se metylační stav imprintovaných genů nemění. K jeho dramatickým změnám dochází až během gametogeneze. Pokud však přeci jen dojde ke změnám v průběhu embryogeneze, může to mít kritický dopad na reprodukci, tvorbu placenty, laktaci, chování a další (shrnutí Nafee *et al.*, 2008; shrnutí Niemann *et al.*, 2008).

2. Odlišné metylační strategie jednotlivých modelových organismů a chybné přeprogramování po jaderném přenosu

S naklonováním prvního savce nevznikly jen otázky týkající se možného biomedicínského využití, ale také proč většina embryí nepřežívá ani první stádia rýhování nebo se rodí s nejrůznějšími vývojovými abnormalitami. Jednou z možných příčin může být chybné přeprogramování metylačního vzoru somatické buňky do podoby buňky embryonální.

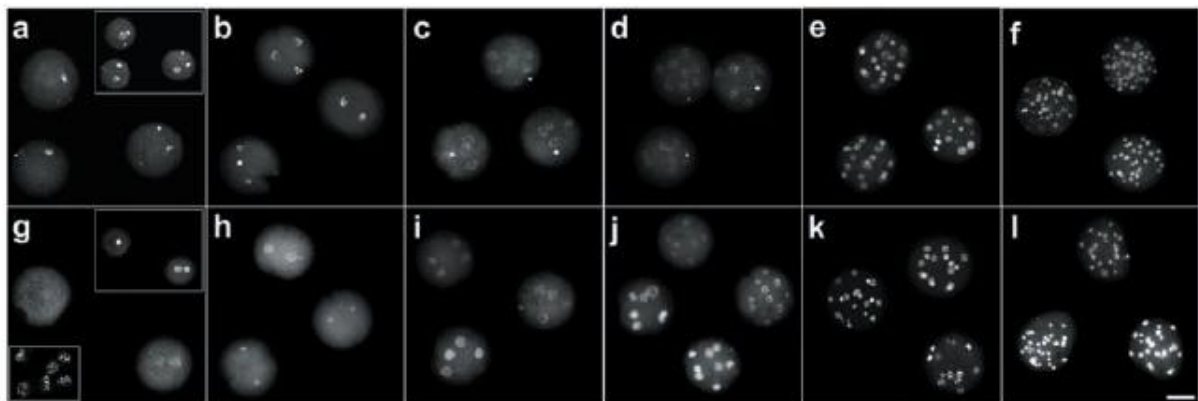
2. 1. Skot

Dean *et al.* (2001) se ve své práci zaměřili na změny metylace během preimplantačního vývoje klonovaných a normálních embryí skotu. Získaná data mezi sebou porovnali a dospěli k jednoznačnému závěru, že v průběhu embryogeneze dochází k abnormálnímu ustavení metylačního vzoru u klonovaných embryí.

Ke sledování průběhu metylačních změn bylo využito imunofluorescenčního barvení pomocí protilátek proti 5-metyl cytosinovým zbytkům. Nejprve byl popsán průběh metylace u normálních embryí. Po oplození oocyty dochází k aktivní demetylaci paternálního genomu. Od dvou- do osmi-buněčného stádia poté nastává demetylace i genomu maternálního, ale mechanismem pasivní demetylace. Během dalšího rýhování, v rozmezí od osmi- do šestnácti-buněčného stádia, se začíná objevovat metylace *de novo*. Průběh těchto tří základních preimplantačních událostí byl dále sledován u klonovaných embryí. Jako donorová jádra byly použity fetální fibroblasty skotu. Po fúzi a elektroaktivaci došlo k vytvoření zygoty, jejíž imunofluorescenční zbarvení bylo mnohem méně intenzivní než zbarvení maternálního pronukleu v zygotě normální. To vypovídá o tom, že v somatickém jádře muselo dojít k demetylaci. Tento pokles metylace je dobře pozorovatelný i v následujícím dvoubuněčném stádiu. Zatímco v normálním embryu jsou výrazně zbarvena obě jádra, v klonovaném embryu je zbarvení jader podstatně sníženo. Jelikož zygotický genom je přibližně o polovinu méně metylován než genom somatického jádra, muselo zde jednoznačně dojít k demetylaci. V následujících stádiích klonovaná embrya další demetylaci již nepodstupují. Mezi jednotlivými čtyř- až osmi-buněčnými rýhovacími stádii můžeme pozorovat značnou heterogenitu v metylační úrovni, podle které můžeme zárodky rozdělit do dvou skupin. V první se nachází zhruba polovina embryí, jejichž zbarvení je srovnatelné

s embryi ve dvoubuněčném stádiu. Druhá skupina obsahuje výrazněji zbarvená embrya, svědčící o předčasné *de novo* metylaci. V několika málo čtyř-buněčných klonovaných embryích je metylační vzor stejný jako u normálních zárodků se šestnácti buňkami (viz obr. 1).

Z tohoto pozorování vyplývá, že stejně jako u normálních embryí i u klonů nejprve dochází ke snížení metylace mechanismem aktivní demetylace. To může naznačovat, že důležitým spouštěčem demetylace je remodelace chromatinu pomocí faktorů, které jsou přítomny v oocytární cytoplasmě. Následná pasivní demetylace již ale u klonovaných embryí pozorována není a *de novo* metylace probíhá předčasně už ve čtyř-buněčném stádiu. Tento chybný krok je vysvětlován tím, že spolu se somatickým jádrem je do oocyty vpravena i somatická forma Dnmt1.

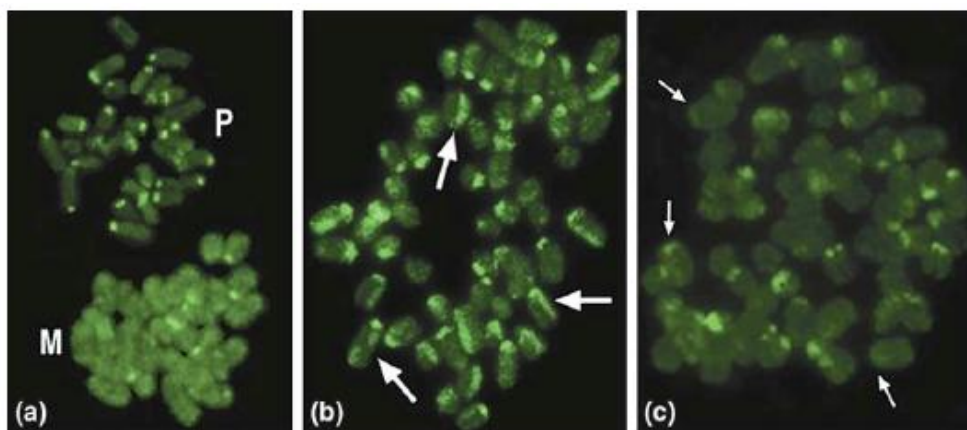


Obr. 1 Metylační vzor u normálních a klonovaných embryí. (a-f) Normální bovinní embrya. (a) Zygoty 12 hodin po oplození. (b) Dvou-buněčná embrya. (c a d) Čtyř- a osmi-buněčná embrya (d) embrya vykazují snížené zbarvení. (e) Deseti- až šestnácti-buněčná embrya podstupující dramatické zvýšení metylace. (f) Stádium moruly udržující si vysokou intenzitu zbarvení. (g-l) Klonovaná embrya. (g) Klonované jedno-buněčné embryo s velmi jemným zbarvením, (dolní vložený obrázek - fibroblastová donorová jádra). (h) Dvou-buněčná klonovaná embrya. (i-j) Čtyř- (i) a osmi- (j) buněčné klony s dvěma populacemi s vyšší a nižší intenzitou zbarvení. (k) Deseti- až šestnácti-buněčné klony. (l) Stádium moruly. (Převzato z Dean *et al.*, 2001)

Bourc'his *et al.* (2001) využili stejného imunofluorescenčního barvení k porovnání metylačních změn během časného embryonálního vývoje mezi normálními a klonovanými embryi.

Autoři použili donorová jádra z dospělých fibroblastových buněk škóry. V momentě, který předchází první S fázi, se donorová jádra zdají být stále stejně metylována jako jádra somatická. Není zde tedy žádný důkaz aktivní demetylace, kterou můžeme pozorovat u normálních embryí skotu, ale také v předešlém experimentu provedeného Dean *et al.* (2001). Vysvětlení bylo takové, že signál podporující aktivní demetylaci nejspíš závisí více na specifickém spermatickém jádře, než na oocytárních cytoplasmatických faktorech. Vzhledem k tomu, že v předešlém experimentu Dean *et al.* (2001) však aktivní demetylace pozorována byla, je možnou příčinou spíše odlišné diferenciační stádium použité donorové buňky v tomto experimentu. Typickým indikátorem proběhlé pasivní demetylace je chromosomální asymetrie v metylaci (viz *obr. 2*). V normálních dvou-buněčných embryích je sledována 100% asymetrie. V klonovaných embryích však nenalézáme důkaz dvou odlišně metylovaných rodičovských chromosomálních sad, snad jen několik chromosomů se zdá být asymetricky metylovaných v méně než 10%. Pasivní demetylace je zde tedy podstatně snížena, což je stejně jako v předchozím případě vysvětleno přítomností somatické formy Dnmt1.

Je velice pravděpodobné, že genomová metylace, jaderná reorganizace a diferenciace jsou mezi sebou složitě propojeny a vedou k jasné genové expresi nebo represi. Následné narušení normální časové posloupnosti těchto událostí, jako to vidíme u klonovaných embryí, potom může vést k chybnému vývoji.



Obr. 2 Chromosomální metylační vzor po imunofluorescenčním obarvení v normálním preimplantačním embryu skotu. (a) Chromosomy v jedno-buněčném stádiu. Chromosomy paternálního původu (P) jsou na rozdíl od chromosomů maternálního původu (M) hypometylovány. Obě rodičovské sady chromosomů jsou od sebe prostorově odděleny. (b) Chromosomy ve čtyř-buněčném stádiu. Je zde viditelná asymetrická metylace chromosomů, která je indikátorem pasivního demetylačního mechanismu. (c) Chromosomy ve stádiu blastocysty. Chromosomy jsou hypometylovány v obou chromatidách. (Převzato z Bourc'his *et al.*, 2001)

2. 2. Prase

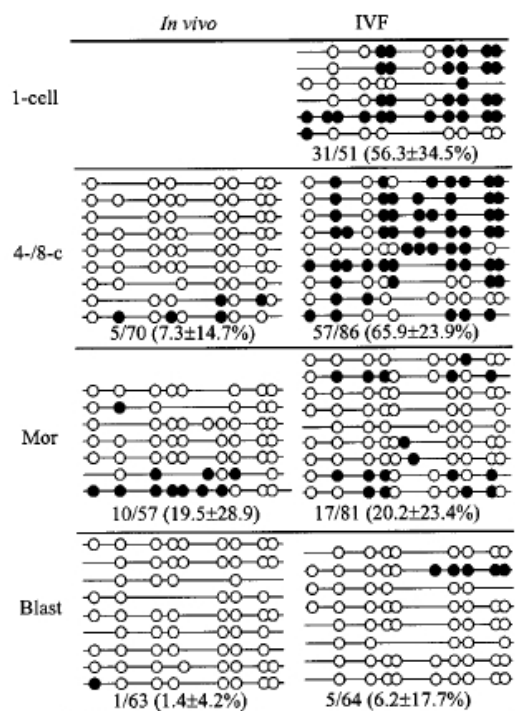
Kang *et al.* (2001b) zjišťovali, zda během preimplantačního vývoje klonovaných prasat dochází ke stejným metylačním změnám jako u *in vivo* získaných jedinců. Jako cíl pro metylační analýzu byla vybrána centromerická satelitní sekvenční DNA. Ta byla postupně izolována z jednotlivých rýhovacích stádií. Následně byla provedena bisulfitová sekvenace, při které jsou nemetylované cytosiny deaminovány na uridin pomocí hydrogensířičitanu. Cytosiny s metylovou skupinou zůstávají nezměněny.

Autoři jako první analyzovali metylační úroveň prasečích spermií a *in vitro* získaných oocytů. Stav obou gamet byl dosti odlišný. Zatímco oocyt byl metylován jen zanedbatelně, spermie byla hypermetylována (62%). Tento vzor je odlišný od specifického metylačního vzoru gamet myši (Sanford *et al.*, 1984) a skotu (Kang *et al.*, 2001a), kde jsou satelitní DNA sekvenční ve spermiích značně hypometylovány. Zda tato hypermetylace u prasat má nějaké vývojové opodstatnění je nejasné. Dále byla zjišťována úroveň metylace v jednotlivých vývojových stádiích u *in vivo* získaných prasečích embryí (viz obr. 3). U čtyř- až osmi-buněčných zárodků došlo v satelitní sekvenci k hypometylaci (7,3%). Tento stav byl dále udržen i v morule (19,5%) a blastocystě (1,4%). Kromě hodnoty 7,3% ve čtyř- až osmi-buněčných embryích, která byla mnohem nižší než se očekávalo, je zde jasně viditelné postupné snižování metylační úrovně. Pro kontrolu byl určen metylační vzor u *in vitro* získaných zárodků. Hodnoty metylace se zde úplně neshodovaly s daty, která byla získána u *in vivo* embryí. Ve čtyř- až osmi-buněčném stádiu byla úroveň metylace rovna 66%, zatímco hodnota rodičovského genomu byla pouze 39%. To je vysvětleno poměrně běžným jevem pozorovaným u *in vitro* fertilizovaných (IVF) oocytů, a to polyspermií. Více než 50% IVF prasečích oocytů má dvě a více spermaticky odvozených jader. Nezdá se však, že by polyploidní stav bránil ve snižování metylace a postupná demetylace zde byla také prokázána. Následovaly pokusy s klonovanými prasečími embryi. Nejprve byl stanoven metylační vzor satelitní sekvenční fetálních fibroblastů, které byly použity jako donorové buňky. Úroveň metylace zde byla rovna 64,6%. Po fúzi jader s enukleovanými oocyty se zdálo, že hypermetylace nebyla změněna a udržela si danou hodnotu až do čtyř- a osmi-buněčného stádia. Změny v metylaci se objevily teprve v morule, kde došlo ke snížení na hodnotu 32,5% a v blastocystě až na úroveň 3,0%, což je srovnatelné s *in vitro* a také *in vivo* získanými embryi (viz obr. 4). K demetylaci tedy dochází i u klonovaných prasečích jedinců.

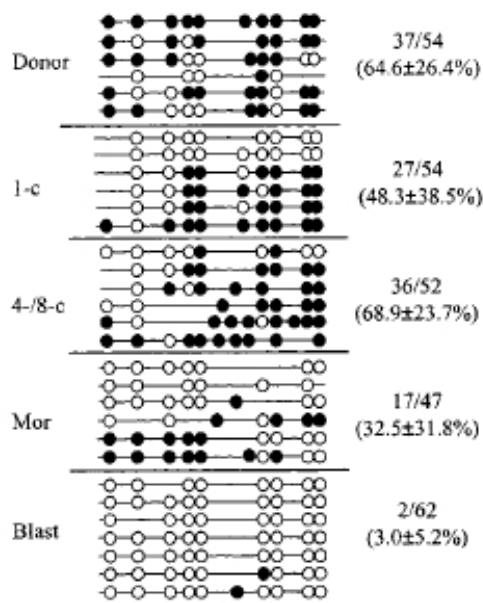
Kromě centromerické satelitní sekvenční, byl tento pokus proveden ještě na euchromatinové PRE-1 sekvenci, patřící do SINE (short interspersed element) podrodiny. To

umožnilo sledovat metylační změny jak v heterochromatinu, tak euchromatinu. I zde byla potvrzena postupná demethylace jak u normálních, tak klonovaných prasečích embryí. Otázkou zůstává, zda získané výsledky mají obecnou platnost pro jakoukoliv genomovou sekvenci.

V rámci přenosu hypermetylovaného somatického jádra do enukleovaného oocyty, může nastat jeden ze dvou dějů: buď si jádro udrží svůj vysoký metylační stav v průběhu jednotlivých replikačních cyklů nebo dojde k demethylaci. O tom, která ze dvou možností nastane, zřejmě rozhoduje kompetice mezi neznámými oocytárními faktory a donorovými specifickými faktory. V předcházejících studiích, týkajících se klonovaných prasečích embryí, bylo možné pozorovat postupné snížení metylace. Ve studiích, týkajících se klonovaných embryí skotu, byl pozorován první případ, kdy nedocházelo k demethylaci, ale naopak úroveň metylace byla udržena na počáteční úrovni. Proč dochází k těmto odlišným jevům u těchto dvou druhů, je nám zatím nejasné.



Obr. 3 Metylační vzory centromerických satelitních sekvencí v *in vivo* a *in vitro* získaných prasečích embryích. Je zde ukázán metylační profil embryí ve stádiu jedno-buněčném, čtyř- až osmi-buněčném a ve stádiu moruly a blastocysty. (Převzato z Kang *et al.*, 2001b)



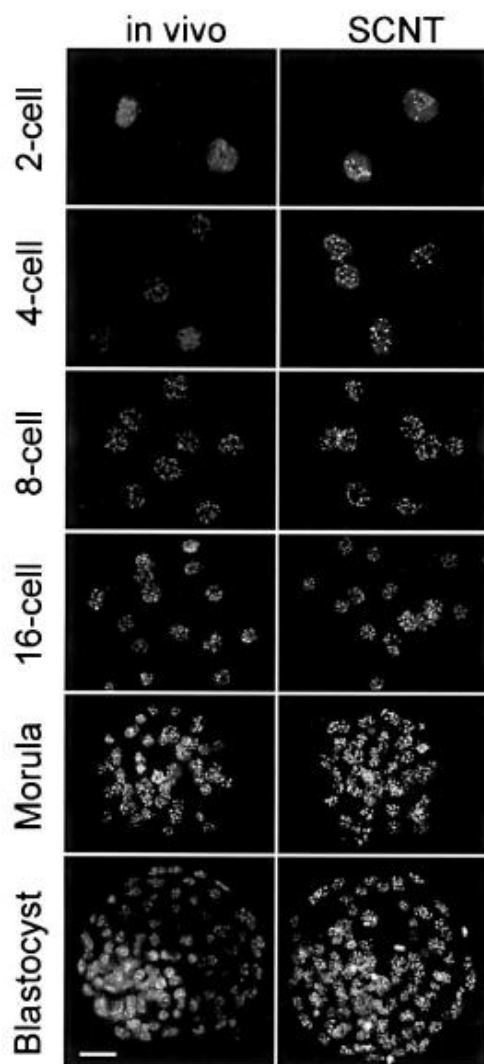
Obr. 4 Postupná demethylace v centromerických satelitních sekvencích v klonovaných prasečích embryích. Je zde ukázán metylační profil v donorových fibroblastech, ve stádiu jedno-buněčném, čtyř- až osmi-buněčném a ve stádiu moruly a blastocysty. (Převzato z Kang *et al.*, 2001b)

2. 3. Ovce

Pomocí imunofluorescenční metody, za využití protilátek proti 5-metyl cytosinovým zbytkům, byl sledován průběh přeprogramování u *in vivo* získaných ovčích embryí. Aktivní demethylace samčího pronukleu zde na rozdíl od skotu a prasat neprobíhá, což naznačuje, že demethylace paternálního genomu není striktně vyžadována v rámci časného embryonálního vývoje. Na první pohled se zdá, že neprobíhá ani pasivní demethylace a že mezi osmi-buněčným stádiem a morulou dochází k remethylaci. Následnou kvantifikací snímků z konfokálního mikroskopu bylo ale prokázáno, že mezi dvou- až osmi-buněčným stádiem naopak k demethylaci dochází, a že navýšení metylace mezi osmi-buněčným stádiem a morulou je ve skutečnosti artefakt spojený se zvyšující se jadernou kompaktací (Beaujean *et al.*, 2004b).

Beaujean *et al.* (2004a) se pokusili o srovnání metylace v průběhu časného preimplantačního vývoje klonovaných a normálních ovčích embryí (viz *obr. 5*). Jako donorová jádra byly použity fetální fibroblasty. Čtyři hodiny po fúzi bylo možné pozorovat tři skupiny rekonstruovaných embryí s odlišnou metylační úrovní. V první skupině byla embrya s velmi intenzivními metylačními ložisky, která se nápadně podobala donorovým jádrům. Druhý typ představovala embrya s poměrně homogenním zbarvením, pozorovatelným u *in vivo* získaných zárodků. Do třetí skupiny se řadila embrya, která se zřejmě zastavila v prvním buněčném stádiu a další rýhování již nepodstoupila. Z těchto tří odlišných skupin se do více než osmi-buněčného stádia dostala většinou jen embrya patřící do druhé skupiny. Tyto výsledky jasně naznačují, že počáteční jaderná reorganizace patří mezi nejvýznamnější kroky časného embryonálního vývoje. Do osmi-buněčného stádia u *in vivo* získaných embryí můžeme pozorovat homogenní snižování metylačního vzoru, jinak řečeno nepozorujeme zde žádnou asymetrickou demethylaci. To dokazuje, že u ovcí opravdu nedochází k aktivní demethylaci paternálního pronukleu. Ve většině dvou- až osmi-buněčných stádiích klonovaných embryí lze pozorovat zbarvení mnohem větších a více intenzivních metylačních ložisek. Ta jsou typicky viditelná v buňkách somatických. Z toho vyplývá, že většina klonovaných embryí má oproti normálním zárodkům abnormálně vyšší metylační úroveň. I přes tuto hypermetylaci ale v klonovaných embryích dochází k postupné demethylaci, a to stejně intenzivně jako u normálních zárodků. Od osmi-buněčného stádia pak v souvislosti s procesem kompaktace dochází k opticky klamnému zvýšení metylační úrovně. Zajímavý jev pak nastává v šestnácti-buněčném stádiu a v morule, kdy dochází k dočasnému zmizení rozdílů v metylační úrovni mezi normálními a klonovanými embryi. Navzdory tomu se

klonovaná embrya, která posléze dosáhla stádia blastocysty, vyznačují abnormalitami v metylaci.



Obr. 5 Metylační analýza preimplantačních ovčích embryí získaných *in vivo* nebo somatickým buněčným jaderným přenosem (SCNT). *In vivo* získaná embrya (v levém sloupci) a SCNT embrya (v pravém sloupci) od dvou-buněčného stádia až do stádia blastocysty. U většiny SCNT embryí je viditelný chybný metylační vzor mimo šestnácti-buněčného stádia a moruly. (Převzato z Beaujean *et al.*, 2004a)

2. 4. Myš

Průběh metylačních změn během časně embryogeneze normálních myších embryí zkoumali Beaujean *et al.* (2004b). Využili imunofluorescenčního barvení za pomoci protilátek proti 5-metyl cytosinu. Jen několik hodin po oplození podstoupil paternální genom rozsáhlou aktivní demetylaci. Snížení metylace maternálního genomu nastalo až po prvním rýhovacím dělení mechanismem pasivním. Úroveň metylace se dále postupně snižovala až do stádia moruly, kdy byl embryonální genom nejvíce hypometylován. Brzy po implantaci blastocysty poté došlo k metylaci *de novo*.

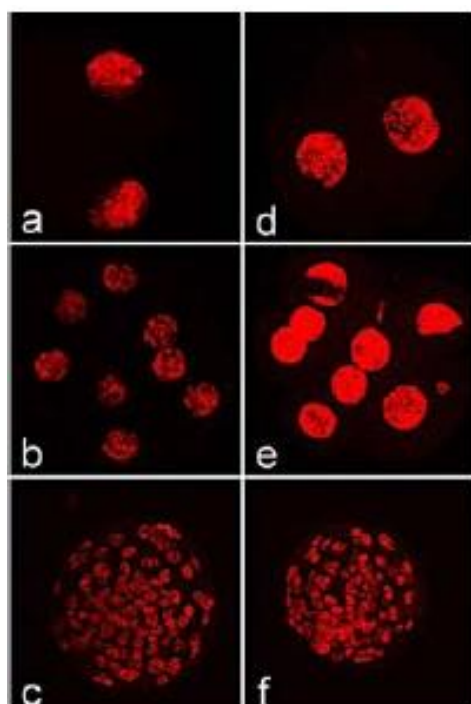
O srovnání metylace mezi normálními a klonovanými myšími embryi se pokusili Yamazaki *et al.* (2006). Využili bisulfitové sekvenační metody a zaměřili se na promotorovou sekvenci genu Oct4. Průběh metylačních změn u normálně se vyvíjejících embryí se shodoval s údaji předešlé skupiny. Došlo tedy k významnému snížení metylace během preimplantačního vývoje. K postupné demetylaci došlo také u klonovaných embryí, zde ale byla celková úroveň metylace mnohem vyšší. Pokus je podrobněji popsán v Kapitole 3. Z výsledků jednoznačně vyplývá, že ani klonovaná myší embrya se nevyhnou chybnému epigenetickému přeprogramování.

2. 5. Makak rhesus – zástupce primátů

Až do dnešní doby se zatím nepodařilo úspěšně klonovat žádného zástupce primátů. V opačném případě by bylo možné tuto čeleď využít při studiu lidských onemocnění, kde myší model často nesplňuje ontogenetickou příbuznost.

Yang *et al.* (2007) zkoumali změny metylačního uspořádání v SCNT a IVF embryích primátů během preimplantačního vývoje. Opět bylo využito imunofluorescenční barvení, za pomoci protilátek proti 5-metyl cytosinovým zbytkům. Nejprve bylo sledováno epigenetické přeprogramování u IVF embryí. Po oplození došlo k utvoření zygoty z dvou rodičovských pronukleů, z nichž jeden byl mnohem více metylován než druhý. Není známo, zda je hypometylovaný pronukleus paternálního původu, a zda je to důsledek aktivní demethylace. V následujícím dvou-buněčném stádiu bylo vidět asymetrické zbarvení obou jader. Až do stádia časně moruly docházelo k postupnému snižování DNA metylace pasivním mechanismem. Ve stádiu pozdější moruly poté nastal proces opačný, při kterém docházelo ke zvyšování metylace. Tato událost je zajištěna metylací *de novo*. V blastocystě bylo poté možné opět pozorovat asymetrické zbarvení, kdy buňky trofoektodermu byly mnohem více metylovány než buňky ICM, jenž si udržely stejnou úroveň metylace jako v časně morule. Následovaly pokusy s klonovanými embryi a výsledky byly porovnány s předešlými daty. Vzhledem k tomu, že počet oocytů byl omezen, byla analyzována pouze některá stádia, a to dvou-buněčné, osmi-buněčné a stádium blastocysty. Bylo zjištěno, že dvou-buněčná klonovaná embrya jsou až o 67% hypermetylována oproti zárodkům pocházejících z IVF. Navíc zde nebylo patrné asymetrické zbarvení, ale protilátky pokrývaly celý povrch jader. To vypovídá o tom, že somatický genom již zde podstupuje jiné přeprogramovací změny než u IVF embryí. V osmi-buněčném stádiu stále polovina klonů vykazovala vyšší úroveň metylace. Nakonec byly mezi sebou porovnány jednotlivé klonované blastocysty. Ty, které měly menší velikost, měly trofoektodermální buňky s více intenzivním zbarvením. Pokud ale byly klonované blastocysty srovnány s IVF protějšky, byla celková úroveň metylace vyšší v buňkách ICM. Vzhledem k tomu, že nemáme data o metylační úrovni v morule, nemůžeme určit, zda hypermethylace ICM byla způsobena nedostatečnou demethylací mezi rekonstruovaným embryem a stádiem moruly nebo nespecifickou metylací *de novo*. (viz obr. 6)

Z pokusu vyplývá, že i u tohoto modelového organismu probíhá chybná DNA metylace v klonovaných embryích.



Obr. 6 Srovnání metylační úrovně mezi IVF a SCNT embryi makaků. (*a-c*) DNA metylace v IVF embryích, ve stádiu dvou-buněčném, osmi-buněčném a stádiu blastocysty. (*d-f*) DNA metylace v SCNT embryích, ve stádiu dvou-buněčném, osmi-buněčném a stádiu blastocysty. (Převzato z Yang *et al.*, 2007)

3. Stav totipotence a pluripotence z pohledu metylace

Pojem totipotence vyjadřuje schopnost buňky, vytvořit jakýkoliv buněčný typ vyskytující se v daném organismu. Obecně platí, že totipotence klesá s mírou diferenciací dané buňky. První totipotentní buňka vzniká splynutím spermie s oocytem a je označována jako zygota. Postupným vývojem embrya buňky ztrácejí schopnost totipotence a mohou dát vzniknout již jenom některým buněčným typům. Takovéto buňky jsou označovány jako pluripotentní.

Pro úspěšný vývoj klonovaných jedinců je nutné, aby po přenosu somatického jádra do enukleovaného oocytu úspěšně proběhlo epigenetické přeprogramování a byl tak obnoven stav totipotence. Dalším důležitým krokem je poté navození pluripotentního stavu. Z předchozích pokusů jasně vyplývá, že během klonování dochází k chybnému metylačnímu uspořádání, což má za následek chybnou expresi celé řady genů. Mezi nimi se nacházejí i takové, které hrají významnou roli v navození pluripotence. K nejvýznamnějším z nich patří Oct4, Sox2, Nanog a Lin28. Právě tyto čtyři faktory jsou plně postačující pro přeprogramování lidských somatických buněk do stavu pluripotentních kmenových buněk (Yu *et al.*, 2007).

Oct4 je jedním z kritických pluripotentních regulátorů exprimovaný v embryonálních a germinálních buňkách. V somatických buňkách je jeho regulační sekvence řízeně metylována, což potlačuje jeho transkripční aktivitu. (Hattori *et al.*, 2004). Aby mohla donorová somatická buňka úspěšně nabýt pluripotentního stavu, musí zde proběhnout úspěšné přeprogramování, které zahrnuje demetylací sekvence regulující expresi Oct4. Při zkoumání metylačního stavu této sekvence u klonů bylo ale zjištěno, že promotor Oct4 je během časného embryonálního vývoje pouze částečně demetylován, což může vést ke zpomalení vývoje v časných rýhovacích stádiích.

Studie promotoru Oct4 byly prováděny za použití bisulfitové sekvenace. Jako donorová jádra pro tvorbu klonovaných embryí byly použity kumulární buňky. Nejprve byl určen metylační stav šestnácti CpG míst nacházejících se v promotoru Oct4 u normálně se vyvíjejících embryí. Promotor ve spermatickém genomu byl metylován pouze částečně, tzn. že pouze 16,5% míst si neslo metylovou skupinu. Promotor oocytu metylací skoro nevykazoval (3,4%). Během rýhování poté došlo k postupnému snižování metylace ze 4% v osmi buněčném stádiu až na 1,6% v blastocystě. Dále byl sledován metylační stav promotoru Oct4 u klonovaných embryí. Donorové jádro vykazovalo vysoký stav metylace

79,3%. V průběhu rýhování poté došlo k postupnému snižování, z 40,9% ve čtyř-buněčném stádiu, na 23,2% v osmi-buněčném stádiu, až na 5,9% v blastocystě. Během preimplantačního vývoje tedy také došlo k významnému snížení metylační úrovně, ale ve srovnání s normálně se vyvíjejícím embryem byla hladina metylace stále vysoká (Yamazaki *et al.*, 2006).

Aby si embryonální kmenové buňky udržely pluripotenci, je pro ně kritická hladina exprese Oct4 (Niwa *et al.*, 2000). U většiny klonovaných embryí však během rýhování dochází k chybným metylačním událostem, které nejsou postačující pro reaktivaci genu Oct4, což může vést k nejrůznějším poškozením až smrti jedince. Dnes ještě není zcela jasné, zda je chybná DNA metylace příčinou nebo důsledkem abnormálního vývoje klonů.

4. Imprinting

Během časného embryonálního vývoje dochází k dramatickým změnám genomu. Patří mezi ně i postupné snižování metylační úrovně. Jediné úseky, které jsou chráněny před tímto procesem, jsou ICR imprintovaných genů. Imprintované geny patří do skupiny genů, jejichž exprese probíhá pouze z jedné alely v závislosti na rodičovském původu. Je zajištěn odlišnou metylací ICR. Jediná mutace pak může znamenat dvojnásobnou expresi nebo naopak umlčení daného genu. To dělá imprintované geny velmi náchylné k jakýmkoliv změnám. Po přenosu somatického jádra do enukleovaného oocyty je důležité, aby nastala postupná demethylace genomu, ale zároveň aby byla beze změny zachována alelická specifická exprese imprintovaných genů. V mnoha případech tomu tak není. U klonovaných embryí, kde donorové jádro je somatického původu, může docházet k chybám, nahromaděným v průběhu života nebo vzniklých při *in vitro* manipulacích. (shrnutí Shi *et al.*, 2003).

Použitím SCNT dnes získáváme jen malé procento embryí, která přežijí celé perinatální období. Z nich poté ještě mnoho umírá krátce po narození. Přispívají k tomu nejrůznější oběhové potíže, otoky placenty, chronické plicní hypertenze a mnoho dalších poruch. Mezi klonovanými jedinci jsou také často viděny nejrůznější růstové abnormality, jako je zvětšená placenta nebo porodní hmotnost. Souhrnně jsou označovány jako syndrom velkých potomků (LOS – Large Offspring Syndrome) (shrnutí Han *et al.*, 2003). Tyto růstové abnormality jsou spojovány s narušenou expresí imprintovaných genů. Napovídá tomu i fakt, že podobné fenotypy byly spatřeny u lidských pacientů nebo myší jako následek buď přirozené změny nebo cílené mutagenese imprintovaných genů (shrnutí Jeanisch, 1997).

Během klonování se imprintované geny mohou vydat jednou ze tří možných cest. První možností je, že jádro donorové buňky bude přeprogramováno a exprese imprintovaných genů tak napodobí expresi normálního oplozeného embrya. Za druhé, donorové jádro nebude schopno přeprogramování a udrží si imprinting somatické buňky. Poslední varianta zahrnuje nekompletní přeprogramování donorového jádra. V tomto případě může dojít ke ztrátě imprintingu (Mann *et al.*, 2003).

Osud imprintovaných genových modifikací během vývoje klonu

4.1. Ovce

Nefyziologické kultivační podmínky mohou vyústit v nevhodné epigenetické modifikace imprintovaných genů během časné embryogeneze a jsou často spojovány s LOS. Geny *Igf2* (insulin-like growth factor 2) a *Igf2r* (insulin-like growth factor 2 receptor) jsou jedny z nejlépe prostudovaných imprintovaných genů. Mají důležitou úlohu ve fetální růstové regulaci a mohly by hrát určitou roli ve vzniku LOS. Po provedených analýzách se zjistilo, že ovce vzniklé z *in vitro* kultivovaných oocytů a trpící syndromem velkých potomků, mají vzhledem ke kontrolám o 30-60% nižší expresi *Igf2r*. (Young *et al.*, 2001).

Nejen kultivace, ale také SCNT má vliv na utvoření správných modifikací imprintovaných genů. U ovcí produkovaných SCNT byly provedeny analýzy exprese imprintovaných genů (*H19* a *Igf2r*) a DNA metylace dvou regulačních míst (*H19-Igf2* a *Igf2r*). *H19* funguje jako nádorový supresor a ovlivňuje expresi genu *Igf2*. Geny *H19* a *Igf2* jsou kontrolovány ze stejného regulačního místa. Toto místo se nachází upstream *H19* a je paternálně metylováno. Exprese je tedy možná pouze z maternální alely. V tomto místě se také nachází vazebná doména, na kterou se může vázat specifický protein způsobující represi genu *Igf2* na maternální alele. *Igf2* je tedy exprimován z paternální alely. Gen *Igf2r* je kontrolován ze samostatného intronového regulačního místa a je exprimován maternálně.

Byly testovány dvě skupiny klonů. První skupina vznikla z kultivovaných buněk, druhá z buněk nekultivovaných. Konečné výsledky ukázaly, že během přenosu somatického jádra dochází ke snížení DNA metylace v regulačním místě pro *Igf2r* u většiny klonů. K narušení kontrolního místa pro *H19* ale došlo jen u jediného klonu. Tento výsledek byl neočekávaný, neboť u myši je stejný úsek dosti náchylný ke změnám (Mann *et al.*, 2003). Vzhledem k tomu, že narušení metylace se vyskytlo u obou testovaných skupin, tzn. jak u klonů z buněk kultivovaných tak nekultivovaných, kultivace samotná nemohla být jedinou příčinou epigenetického narušení. Zatím však ještě nemůžeme určit, zda metylační změna byla přítomná již v donorových buňkách, nebo zda vznikla následkem jaderného přenosu a embryonálních kultivačních procesů (Young *et al.*, 2003).

4.2. Myš

Pokusy na myších prokázaly, že klonovaná embrya vykazují chyby v imprintovaných genech hned na třech úrovních. První nesrovnalosti byly v množství transkriptů. Celkem bylo sledováno pět imprintovaných genů: *Meg3*, *Snrpn*, *H19*, *Ascl2* a *Igf2r*. *Meg3* je maternálně exprimovaný gen, jehož role ještě není zcela objasněna. *Ascl2* (Achaete Scute homologue 2) kóduje transkripční faktor a je důležitý ve vývoji trofoblastu. Funkce genů *H19* a *Igf2r* jsou popsány v kapitole 4.1., genu *Snrpn* pak v kapitole 4.3. U 30% klonovaných embryí byla narušena exprese všech z pěti sledovaných genů. U zbylých klonů pak byla nalezena chybná expresní úroveň alespoň jednoho z nich. Další nesrovnalosti byly nalezeny na úrovni specifické exprese alel. Správnou monoalelickou expresí ve všech klonovaných embryích vykazovaly pouze geny *Meg3* (maternální exprese) a *Snrpn* (paternální exprese). U větší části klonů byl pak správně exprimován i gen *H19*. Další chyby byly nalezeny u dvou sledovaných imprintovaných genů (*Ascl2* a *Igf2r*), jejichž fyziologická exprese je bialelická ve stádiu blastocysty, ale monoalelická v rámci diferencovaných buněk. Osm klonovaných blastocyst ze 14 vykazovalo maternální monoalelickou expresi, 4 klony exprimovaly tyto geny bialelicky a u dvou klonů naopak došlo k expresi z paternální alely. Správný posun k bialelické expresi může být odraz buď opravdového přeprogramování nebo jednoduše ztráty imprintingu. Poslední úroveň, kde byly nalezeny chyby vzhledem k normálním embryím, byla DNA metylace. V kontrolních úsecích genů *H19* a *Snrpn* došlo ke ztrátě metylace. Tato ztráta byla mnohem větší než v kontrolních embryích což ukazuje, že nebyla způsobena jednoduše *in vitro* kultivací nebo jinými procedurami, ale spíše vlastnostmi klonovaného embrya. Ztráta metylace v genech *H19* a *Snrpn* je v rozporu s jejich správnou monoalelickou expresí pozorovanou v těchto genech. Je to velmi překvapivý výsledek, neboť snížení metylace je obvykle spojováno se ztrátou genové regulace. Vysvětlení může být takové, že i částečná DNA metylace je postačující k udržení vhodné exprese. Jiným vysvětlením může být specifická chromatinová struktura somatické buňky, která se nezměnila v průběhu preimplantační periody, a tak umožnila udržení dané alelické exprese (Mann *et al.*, 2003).

4.3. Skot

Vliv SCNT na regulaci a DNA metylaci imprintovaných genů byl u skotu zkoumán na genu *Snrpn*. *Snrpn* kóduje sestřihový faktor a je jedním z nejlépe prostudovaných imprintovaných genů. U skotu, stejně jako u myši je metylován maternálně. Kontrolní oblast tohoto genu je dobře definována u myši a člověka. Po provedení analýzy metylačního vzoru v této oblasti u skotu se zjistilo, že je s myši v některých místech identická. U člověka jsou metylační abnormality uvnitř této kontrolní oblasti spojeny s Prader-Willi a Angelmanovým syndromem.

V klonovaných myších embryích dochází vlivem SCNT k chybnému snížení DNA metylace v genu *Snrpn* (Mann *et al.*, 2003). K určení, zda je metylace pozměněna také u klonovaného skotu, byl určen metylační profil tohoto genu u *in vivo*, *in vitro* a SCNT získaných embryí. Jednotlivé metylační profily byly mezi sebou porovnány. Výsledky ukázaly, že SCNT embrya jsou nápadně hypometylována. (Lucifero *et al.*, 2006). Tento výsledek je tedy shodný se studiemi u myši.

Klonování skotu je často doprovázeno syndromem velkých potomků (LOS). Vzhledem k tomu, že růstové abnormality jsou dnes spojovány hlavně s narušením imprintingu, byly provedeny expresní analýzy genů *Igf2*, *Igf2r* a *H19*. U klonů, které uhynuly krátce po narození, bylo testováno osm důležitých orgánů (mozek, močový měchýř, srdce, játra, ledviny, plíce, slezina a brzlík). U přeživších dospělých klonů byly testovány tři tkáně (kůže, svaly a játra). Získané výsledky byly poté porovnány s kontrolami. Například exprese *Igf2r* byla ve srovnání s kontrolami zvýšená v močovém měchýři a mozku. U zbylých orgánů nebyly rozdíly v expresi již tak výrazné. Navzdory těmto malým rozdílům mezi klonovanými a kontrolními jedinci, některé klony vykazovaly extrémně vysokou expresi v určitých orgánech. Celkově bylo zjištěno, že expresní úroveň daných imprintovaných genů je mezi časně uhynulými klonovanými jedinci vysoce variabilní. U přežívajících dospělých klonů byla tato variabilita také nalezena, ale byla mnohem menší. Jedinou výjimkou byla exprese *Igf2* ve svalech, která byla oproti kontrolám zvýšená (Yang *et al.*, 2005).

Velká část klonů hyne v průběhu perinatálního období. Tato smrt je často způsobena různými abnormalitami placenty. Kvůli objasnění, zda chybná DNA metylace imprintovaných genů souvisí s předčasným úhynem SCNT plodů, byla provedena analýza metylačního vzoru regulačních oblastí čtyř imprintovaných genů (*Peg3*, *Xist*, *Peg10* a

MAOM) u čtyř spontánně potracených plodů (AF1 – AF4). Geny Peg3, Xist a Peg10 jsou exprimovány paternálně. Peg3 kóduje transkripční faktor s motivem zinkových prstů, který se podílí na růstu a maternálním chování. Xist (X inactive-specific transcript) je důležitý gen podílející se na inaktivaci X chromosomu. Peg10 hraje důležitou roli během savčího vývoje. Posledním zkoumaným genem byl MAOM (monoamine oxidase type A). Tento gen je exprimován maternálně a je to hlavní faktor regulace úrovně serotoninu během těhotenství.

Výsledky analýzy ukázaly, že abnormální DNA metylace byla nalezena v různém rozsahu v každém ze čtyř testovaných klonů. Regulační oblasti všech čtyř imprintovaných genů u AF3 byly silně hypometylované. AF2 vykazoval ve srovnání s AF3 menší ztrátu metylace v genech Peg3 a Xist. Regulační oblast genu Peg10 byla opět výrazně hypometylovaná. Poslední dva plody AF1 a AF4 si udržely mnohem lepší metylační stav ve všech testovaných genech, i když jistá ztráta metylace zde byla přesto patrná. Odlišná metylační úroveň jednotlivých klonů naznačuje, že epigenetické přeprogramování během klonování by mohlo být neorganizovaným a náhodným procesem. Konečné výsledky opět potvrzují, že během SCNT dochází k narušení metylačního stavu imprintovaných genů. Stále ještě ale nevíme, jestli je to způsobeno nekompletním epigenetickým přeprogramováním během preimplantačního vývoje nebo neefektivním udržením metylace ve stádiích pozdějších (Liu *et al.*, 2008).

5. Faktory ovlivňující úroveň metylace u klonovaných embryí

5.1. DNA metyltransferasa

Bylo zde již několikrát zmíněno, že během časného embryonálního vývoje klonů dochází k chybné DNA metylaci. Abnormality v metylačním vzoru vznikají jak na úrovni celého genomu, tak mohou být vztaženy pouze na určité genomové oblasti. Navíc se zdá, že i při použití stejných postupů a stejných donorových buněk dochází ke vzniku odlišných metylačních chyb u jednotlivých klonů. Za správné udržení metylačního vzoru odpovídá Dnmt1 protein, respektive jeho vhodná exprese, regulace a lokalizace. Při zkoumání expresní úrovně proteinů Dnmt1s a Dnmt1o v klonovaných myších embryích však bylo zjištěno, že dochází k jejímu narušení.

Během normálního embryonálního vývoje probíhá exprese Dnmt1s až v postimplantačních stádiích. V klonovaných embryích však byla zjištěna exprese tohoto proteinu v osmi-buněčném stádiu. Prvním vysvětlením této chyby může být, že klonované embryo postrádá vhodné posttranskripční genové regulační mechanismy, které jsou v normálních embryích běžné. Další možnost jak tuto chybu vysvětlit je, že somatické donorové jádro vykazuje vysokou expresi Dnmt1s. Oocytární forma Dnmt1 je oproti somatické hojná v preimplantačním období. V normálních embryích je kromě osmi-buněčného stádia, kdy protein vstupuje do jádra za účelem udržení imprintingu, lokalizována v cytoplasmě. Po provedení expresní analýzy tohoto proteinu u klonovaných embryí se zjistilo, že během osmi-buněčného stádia se většina proteinu stále nachází v cytoplasmě. Je dosti možné, že došlo k narušení určitých translokačních mechanismů, a to tak, že donorové jádro chybně expimovalo důležité embryonální importní proteiny. To poté mohlo mít vliv na jaderné umístění jak Dnmt1s tak Dnmt1o.

Somatická forma metyltransferasy je méně stabilní než forma oocytární. Pokud tedy spojíme chybnou lokalizaci Dnmt1o a nestabilitu Dnmt1s, nepřekvapí nás, že metylace imprintovaných regulačních sekvencí může být ztracena. Zdá se tedy, že chybná exprese a lokalizace důležitých metyltransferas můžou být zodpovědné za chyby vzniklé v DNA metylaci u klonovaných embryí (Chung *et al.*, 2003).

Mohla by mít epigenetická změna v donorové buňce vliv na vývoj klonů? Na tuto otázku se pokusili odpovědět Wee *et al.*, (2007). Trichostatin A (TSA) je látka schopná měnit

aktivitu enzymů, například histon acetyltransferasy nebo Dnmt. Část somatických buněk, určených pro jaderný přenos, byla ošetřena TSA, čímž u nich došlo ke snížení exprese Dnmt. Metylační úroveň byla sledována na satelitní I sekvenci. Metylační stav této sekvence byl v donorovém jádře ošetřeném TSA podstatně nižší než v jádře neošetřeném. Donorové buňky byly dále přeneseny do enukleovaných oocytů a aktivovány. Během časného vývoje embrya byla poté metylace udržena na stejné úrovni jako v donorovém jádře u obou typů embryí. Epigenetická změna vzniklá v donorovém jádře po přidání TSA tedy neměla žádný vliv na přeprogramování v DNA metylaci během časného vývoje. Nicméně se ukázalo, že donorová jádra takto ošetřena, zlepšila vývoj klonovaných embryí. Vysvětlení může být takové, že epigenetické změny vzniklé v somatickém jádře, zvýšily expresi důležitých embryonálních genů. Na úvodní otázku tedy můžeme odpovědět, že změna epigenetického stavu donorové buňky může mít vliv na vývojové schopnosti klonů.

Jiný způsob, jak změnit metylační stav donorové buňky, je použití hypomorfní alely Dnmt1. Exprese proteinu z hypomorfní alely probíhá ve sníženém množství. Bylo zjištěno, že donorové buňky nesoucí tuto alelu, jsou oproti kontrolám hypometylovány. Tento stav by mohl mít pozitivní vliv na tvorbu embryonálních kmenových buněk. Změřením metylačního stavu donorových buněk nesoucích hypomorfní alelu Dnmt1 bylo zjištěno, že promotor Oct4 je jen částečně metylován a promotor Nanog není metylován skoro vůbec. Oba tyto geny hrají důležitou úlohu při utváření pluripotentního stavu embrya. Jádra byla přenesena do enukleovaných oocytů a kultivována až do stadia blastocysty. Izolace embryonálních kmenových buněk byla až třikrát úspěšnější než z kontrolních klonů. Toto zjištění napovídá, že hypometylace donorového somatického jádra může zvýšit jeho citlivost k přeprogramování během klonování (Blelloch *et al.*, 2006).

5.2. Stáří donorové buňky

Chyby v metylaci DNA nemusí být způsobeny až během epigenetického přeprogramování, ale mohou být již nesený donorovou buňkou použitou pro jaderný přenos. Se zvyšujícím se stářím donorové buňky můžeme taky očekávat zvyšující se počet chyb. Navzdory tomu, použití fetálních a adultních somatických buněk pro jaderný přenos bylo z pohledu počtu získaných klonů stejně úspěšné (Hill *et al.*, 2000). Vypadá to tedy, že stáří buněk není pro jaderné klonování rozhodující (shrnutí Wakayama, 2007; shrnutí Rideout *et al.*, 2001).

5.3. Stupeň diferenciacie

Z mnoha pokusů dnes již víme, že klonování pomocí embryonálních kmenových buněk je oproti buňkám adultním mnohem úspěšnější. Příčinou je nejspíš odlišný stav diferenciacie. Méně diferencované buňky, jako jsou například již zmiňované embryonální či somatické kmenové buňky, vykazují snazší přeprogramovatelnost do embryonální podoby než buňky, které jsou již konečně diferencované.

Efektivita přeprogramování byla například sledována mezi nervovými kmenovými buňkami a jejími již diferencovanými protějšky. Terminálně diferencované neurony byly velmi neefektivními donorovými jádry. Naopak nervové kmenové buňky byly přeprogramovány srovnatelně dobře jako kmenové buňky pocházející z časného embrya (Blelloch *et al.*, 2006).

V Kapitole 3 byl podrobně popsán pokus týkající se správné reaktivace genu Oct4, který je důležitý pro postimplantační vývoj embrya. Tento gen je exprimován v embryonálních kmenových buňkách. V buňkách adultních je jeho exprese umlčena. Pokud pro jaderné klonování použijeme buňku z dospělého jedince, Oct4 a jemu podobné geny se musí nejprve reaktivovat, a teprve poté se může klon vyvíjet i po implantaci. V případě, že použijeme embryonální kmenovou buňku, kde jsou tyto geny exprimovány v plném rozsahu, vyhneme se tak problémům s chybným přeprogramováním. To může být hlavní důvod proč klony, pro které byla použita jako donorová jádra embryonální kmenové buňky, mají vyšší šanci na úspěšný vývoj (Rideout *et al.*, 2001).

5.4. Fáze buněčného cyklu donorové buňky

Jádro somatické buňky se může nacházet v různých stádiích buněčného cyklu. Pro SCNT byly použity donorové buňky v různých fázích cyklu (G0, G1, G2, M) a všechny byly kompetentní pro vznik klonovaných embryí. Nejvíce klonovaných zvířat však bylo získáno z buněk, které se nacházely ve fázi klidové (G0). Důvodem je nejspíš zvýšená epigenetická plasticita, způsobená chromatinovým uspořádáním a sníženou transkripční aktivitou, která usnadňuje přeprogramování genomu. Pro získání donorových jader je tedy lépe použít buňky méně se dělící. Ne všechny takovéto buňky jsou však vhodné pro klonování. Například neurony a jiné konečně diferencované buňky jsou kvůli své malé plasticitě genomu pro klonování dosti nevhodné. Další výhodou použití buňky v G0 fázi je diploidní genom, který je nutný pro normální vývoj embrya (shrnutí Armstrong *et al.*, 2006).

6. Závěr

Tato práce nastiňuje průběh přeprogramování metylačního vzoru somatického donorového jádra během jaderného přenosu. Při srovnání normálních a jaderným přenosem vzniklých embryí dochází ve většině případů k chybám v DNA metylaci. Tyto chyby jsou patrné u všech zde sledovaných druhů, bez ohledu na jejich odlišné průběhy přeprogramování. Nesprávné nastavení nového metylačního vzoru má poté vliv na genovou expresi. Pokud chyba nastane v genech ovlivňujících další vývoj embrya, například v imprintovaných genech nebo genech zodpovědných za navození pluripotentního stavu, často poté dochází k předčasné smrti takovýchto embryí. Na průběh epigenetického přeprogramování může mít vliv řada faktorů jako je například množství Dnmt v donorové buňce nebo stáří, stupeň diferenciace a fáze buněčného cyklu donorové buňky.

Seznam použité literatury

- Armstrong L, Lako M, Dean W, Stojkovic M.** (2006) Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells*. **24**(4):805-814.
- Beaujean N, Hartshorne G, Cavilla J, Taylor J, Gardner J, Wilmut I, Meehan R, Young L.** (2004a) Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr Biol*. **14**(7):R266-267.
- Beaujean N, Taylor J, Gardner J, Wilmut I, Meehan R, Young L.** (2004b) Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*. **71**(1):185-193.
- Blelloch R, Wang Z, Meissner A, Pollard S, Smith A, Jaenisch R.** (2006) Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells*. **24**(9):2007-2013.
- Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, Niveleau A, Comizzoli P, Renard JP, Viegas-Pequignot E.** (2001) Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol*. **11**(19):1542-1546.
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W.** (2001) Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(24):13734-13738.
- Fulka H, St John JC, Fulka J, Hozak P.** (2008) Chromatin in early mammalian embryos: achieving the pluripotent state. *Differentiation*. **76**(1):3-14.
- Han YM, Kang YK, Koo DB, Lee KK.** (2003) Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. *Theriogenology*. **59**(1):33-44.
- Hattori N, Nishino K, Ko YG, Ohgane J, Tanaka S, Shiota K.** (2004) Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem*. **279**(17):17063-17069.

- Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA, Westhusin ME.** (2000) Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol Reprod.* **62**(5):1135-1140.
- Chung YG, Ratnam S, Chaillet JR, Latham KE.** (2003) Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos. *Biol Reprod.* **69**(1):146-153.
- Jaenisch R.** (1997) DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet.* **13**(8):323-329.
- Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM.** (2001a) Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet.* **28**(2):173-177.
- Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Kim HN, Chang WK, Lee KK, Han YM.** (2001b) Typical demethylation events in cloned pig embryos. Clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome. *J Biol Chem.* **276**(43):39980-39984.
- Liu JH, Yin S, Xiong B, Hou Y, Chen DY, Sun QY.** (2008) Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. *Mol Reprod Dev.* **75**(4):598-607.
- Lucifero D, Suzuki J, Bordignon V, Martel J, Vigneault C, Therrien J, Filion F, Smith LC, Trasler JM.** (2006) Bovine SNRPN methylation imprint in oocytes and day 17 in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol Reprod.* **75**(4):531-538.
- Mann MR, Chung YG, Nolen LD, Verona RI, Latham KE, Bartolomei MS.** (2003) Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod.* **69**(3):902-914.
- Nafee TM, Farrell WE, Carroll WD, Fryer AA, Ismail KM.** (2008) Epigenetic control of fetal gene expression. *BJOG.* **115**(2):158-168.

- Niemann H, Tian XC, King WA, Lee RS.** (2008) Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction*. **135**(2):151-163.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG.** (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. **24**(4):372-376.
- Oliveri RS, Kalisz M, Schjerling CK, Andersen CY, Borup R, Byskov AG.** (2007) Evaluation in mammalian oocytes of gene transcripts linked to epigenetic reprogramming. *Reproduction*. **134**(4):549-558.
- Rideout WM, 3rd, Eggan K, Jaenisch R.** (2001) Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*. **293**(5532):1093-1098.
- Sanford J, Forrester L, Chapman V, Chandley A, Hastie N.** (1984) Methylation patterns of repetitive DNA sequences in germ cells of *Mus musculus*. *Nucleic Acids Res*. **12**(6):2823-2836.
- Shi W, Zakhartchenko V, Wolf E.** (2003) Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation*. **71**(2):91-113.
- Wakayama T.** (2007) Production of cloned mice and ES cells from adult somatic cells by nuclear transfer: how to improve cloning efficiency? *J Reprod Dev*. **53**(1):13-26.
- Wee G, Shim JJ, Koo DB, Chae JI, Lee KK, Han YM.** (2007) Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction*. **134**(6):781-787.
- Yamazaki Y, Fujita TC, Low EW, Alarcon VB, Yanagimachi R, Marikawa Y.** (2006) Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos. *Mol Reprod Dev*. **73**(2):180-188.

- Yang J, Yang S, Beaujean N, Niu Y, He X, Xie Y, Tang X, Wang L, Zhou Q, Ji W.** (2007) Epigenetic marks in cloned rhesus monkey embryos: comparison with counterparts produced in vitro. *Biol Reprod.* **76**(1):36-42.
- Yang L, Chavatte-Palmer P, Kubota C, O'Neill M, Hoagland T, Renard JP, Taneja M, Yang X, Tian XC.** (2005) Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Mol Reprod Dev.* **71**(4):431-438.
- Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD.** (2001) Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet.* **27**(2):153-154.
- Young LE, Schnieke AE, McCreath KJ, Wieckowski S, Konfortova G, Fernandes K, Ptak G, Kind AJ, Wilmut I, Loi P, Feil R.** (2003) Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech Dev.* **120**(12):1433-1442.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA.** (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* **318**(5858):1917-1920.