

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00762

# DNA 甲基化和组蛋白修饰在克隆动物发育过程中的作用

郭磊<sup>1</sup>, 李慧<sup>1,2</sup>, 韩之明<sup>1</sup>

1. 中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101;
2. 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875

**摘要:** 体细胞核移植在农业应用、生产疾病模型动物、转基因家畜或产生人胚胎干细胞来治疗人类的疾病方面有巨大的应用潜力。虽然已经成功克隆出多种哺乳动物, 但该技术仍存在一些未解决的问题, 包括产生克隆动物的效率低和克隆动物的异常等。异常的表现遗传重编程是克隆胚胎发育失败的一个重要因素。文章重点论述了 DNA 甲基化、组蛋白修饰及其与克隆胚胎发育的关系。了解表现遗传调控机制有助于解决核移植技术中存在的问题, 有利于更好地应用这项技术。

**关键词:** 体细胞核移植; 表现遗传修饰; DNA 甲基化; 组蛋白修饰

## Effect of DNA methylation and histone modification during the development of cloned animals

GUO Lei<sup>1</sup>, LI Hui<sup>1,2</sup>, HAN Zhi-Ming<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
2. College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

**Abstract:** Somatic cell nuclear transfer (SCNT) has great potential for agricultural applications, generation of medical model animals, transgenic farm animals or generating human embryonic stem cells for treatment of human diseases. Cloned animals derived from somatic cells have been generated in several mammal species, but there are still some unsolved problems with current cloning technology, for example, the low efficiency of animal cloning and the abnormal development of cloned animals. One critical factor of these developmental failures of cloned embryos is the aberrant epigenetic reprogramming. This review focuses on DNA methylation and histone modifications and the relationship between these two epigenetic modifications and the development of cloned embryos. Understanding the mechanisms of epigenetic regulation will be useful to solve the technical problems of SCNT and enable better applications of this technology.

**Keywords:** somatic cell nuclear transfer; epigenetic modification; DNA methylation; histone modifications

大约半个世纪前, 细胞核移植实验首先在两栖类动物中开展<sup>[1]</sup>。克隆羊 Dolly 的出生证明了高度分化的成年哺乳动物细胞可以恢复全能性且能够发育

成新的动物个体<sup>[2]</sup>。随后牛、小鼠、山羊、猪、猫、兔、马、骡和犬等动物均被成功克隆<sup>[3]</sup>, 但是获得克隆动物的效率低。大多数克隆动物在妊娠期就死亡,

收稿日期: 2009-11-13; 修回日期: 2010-03-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30770245)和国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2008AA101006)资助

作者简介: 郭磊(1984-), 男, 博士研究生, 专业方向: 发育生物学。Tel: 010-64807055; E-mail: guolei@ioz.ac.cn

通讯作者: 韩之明(1974-), 女, 副研究员, 博士, 专业方向: 发育生物学。Tel: 010-64807090; E-mail: hanzm@ioz.ac.cn

只有极少数可以活着出生甚至存活至成年。即使是存活下来的克隆动物也伴有大量的表型异常和不同程度的发育缺陷,主要表现为:呼吸衰竭、肥胖症、免疫缺陷、肾和大脑发育异常、胎水过多、胎儿肥大、胎盘肥大、多趾、溶血、皮肤皱褶粗糙等等,这些都限制了克隆技术的应用<sup>[4,5]</sup>。

目前认为克隆胚胎发育异常是体细胞基因组在卵母细胞质中经历的去分化、恢复全能性及启动胚胎发育的重编程过程不完全即表观遗传修饰的异常造成的。表观遗传修饰是指非基因序列改变所致基因表达水平的变化,这种变化可通过减数分裂或/和有丝分裂遗传。表观遗传修饰主要包括3种调节机制:DNA甲基化、组蛋白翻译后修饰和microRNA介导基因转录调控<sup>[6]</sup>。本文重点论述了DNA甲基化、组蛋白修饰及其关系,以及二者在克隆动物发育过程中的作用。

## 1 DNA甲基化

DNA甲基化作用是在DNA甲基转移酶的作用下,将S-腺苷蛋氨酸的甲基转移到DNA特定核苷酸的碱基上的过程。DNA甲基化修饰是一种重要的表观遗传修饰现象<sup>[7]</sup>,它广泛存在于原生生物、植物、部分真菌及动物中,但在酵母(*Saccharomyces*)、秀丽小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)及黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中不存在。在哺乳动物中,DNA甲基化修饰主要发生在CpG二核苷酸的胞嘧啶残基上,在基因组中呈不均匀分布。通常将基因组中CpG二核苷酸丰富的区域称为CpG岛,这些CpG岛主要分布在基因的5'端,如启动子区域、非翻译区及第一外显子区域<sup>[8]</sup>。DNA甲基化能够在不改变DNA分子一级结构的情况下调节基因组的功能,在生命活动中起着重要的作用,如保持基因组遗传物质的稳定性、调控基因的表达、建立表观遗传模式以及参与细胞及胚胎的形态建成等。

DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)分为两种:从头型(*de novo*)甲基转移酶和组成型甲基转移酶。DNMT1为组成型甲基转移酶,它有两种异形体即卵母细胞型DNMT1 $\alpha$ 和体细胞型DNMT1 $\beta$ 。DNMT1以甲基化的亲代DNA链为模板使子代DNA链的相应位点发生甲基化,从而维持了甲基化在细胞分裂过程中亲子代之间的传递。DNMT1 $\alpha$ 存在于

除8-细胞以外的各分裂时期胚胎的胞质中。在8-细胞时期,DNMT1 $\alpha$ 进入细胞核,参与维持着床前胚胎的DNA甲基化水平。DNMT1 $\beta$ 在着床前并没有表达翻译或累积,它的主要功能是维持遗传得到的和早期胚胎重新建立的甲基化形式<sup>[9]</sup>。DNMT3是从头型甲基转移酶,DNMT3由有活性的DNMT3a和DNMT3b及没有活性但具有激活功能的DNMT3L组成,参与早期胚胎和胚胎干细胞中新甲基化模式的建立<sup>[10]</sup>。DNMT2的功能还不清楚。

DNA甲基化可以引起基因转录抑制,但这一过程是直接的还是间接的仍不清楚。直接抑制可能是阻止转录因子与启动子区域的结合引起的。间接抑制可能是甲基化CpG结合域蛋白2(Methyl-CpG-binding protein 2, MeCP2)通过甲基化CpG结合域(Methyl-CpG-binding domain, MBD)结合到甲基化的DNA序列上,使组蛋白去乙酰化酶聚集到此处并且发挥作用形成去乙酰化抑制转录的染色质结构造成的<sup>[11]</sup>。

## 2 组蛋白修饰

染色质最基本的组成部分是核小体,它是由两个H2A-H2B和两个H3-H4组成的八聚体及缠绕在其上的DNA组成的。H1为可变的连接组蛋白,每个核小体只有一个H1,在核小体的外面,处于DNA进入和离开核小体核心的位置上。组蛋白既是染色体结构的组成成分,又能够调节基因表达。组蛋白的N端尾巴游离于核小体之外可进行多种类型的转录后修饰,包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、SUMO化、ADP-核糖基化及生物素化等。这些修饰可以组合在一起出现,共同组成了所谓的“组蛋白密码(Histone code)”调控基因表达<sup>[12]</sup>。

组蛋白的乙酰化是研究最早的组蛋白翻译后修饰,它可以发生在H2A赖氨酸-5、-9、-13, H2B赖氨酸-5、-12、-15、-20, H3赖氨酸-4、-9、-14、-18、-23、-24、-27及H4赖氨酸-5、-8、-12、-16、-127等残基上。组蛋白乙酰化通过两个方面调节基因转录:整体组蛋白乙酰化和特异的启动子区域的组蛋白乙酰化。整体组蛋白乙酰化与一般的基因转录活性相关。特异启动子的乙酰化是调控基因表达的重要机制。组蛋白乙酰基转移酶(Histone acetylases,

HATs)的作用是把乙酰基转移到组蛋白赖氨酸残基上。目前为止发现了 3 种 HATs: GNAT、p300/CBP、MYST(MOZ、Ybf2/Sas3、Sas2 和 TIP60)<sup>[13]</sup>。组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylases, HDACs)与 HATs 一起影响染色质包装,并根据与酵母组蛋白去乙酰化酶的同源性分成 4 类<sup>[14]</sup>。类 HDACs 包括 HDAC1、HDAC2、HDAC3 和 HDAC8,它们与酵母中 Rpd3 蛋白是同源的,且都在细胞核中有定位。除了 HDAC8,其他的在机体中分布广泛。Wilson 等<sup>[15]</sup>报道 类 HDACs 的多个成员参与了 p21 的转录抑制并且通过抑制 HDACs 可以诱导生长抑制和凋亡。类 HDACs 包括 HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9a、HDAC9b 和 HDAC10,与酵母中 Hda1 蛋白是同源的。它们在细胞核及细胞质中发挥作用,可能有调节非组蛋白成分乙酰化的作用。类 HDACs 被认为是转录辅阻遏物,它们不直接结合到 DNA 上,而是通过特异的 DNA 结合蛋白聚集到基因组的特定区域。类 HDACs 由 SIRT 蛋白 1-7 组成,与酵母 Sir2 蛋白同源性较高,通过 NAD<sup>+</sup>来完成去乙酰基的作用。类 HDAC 仅有 HDAC11,在结构上与 类和 类 HDACs 都有相似点,其表达和功能还不清楚。有些非组蛋白的蛋白也是 HDACs 的底物,如 p53、E2Fs、GAGT1、Bcl-6、Stat3、HMGs、HSP90、NF- $\kappa$ B、微管蛋白、转运蛋白、核激素受体和  $\beta$ -catenin 等。例如 HDAC1 有调节 p53 转录活性的作用,去乙酰化有降低 p53 稳定性、抑制它与 DNA 之间的相互作用和 p53 反式作用因子的激活作用,从而调节 p53 介导的细胞生长与凋亡<sup>[16]</sup>。

组蛋白甲基化多发生在位于 H3、H4 的赖氨酸和精氨酸残基上,其中组蛋白 H3 氨基端拖尾上的 K4 和 K9 便是其中的两个甲基化的常发位点。组蛋白的甲基化修饰是由组蛋白甲基转移酶来执行的。这些赖氨酸的氨基侧链可以发生单甲基化、二甲基化和三甲基化<sup>[17]</sup>。因甲基化位点的不同,组蛋白赖氨酸甲基化可以对转录起激活或抑制作用。组蛋白甲基转移酶的主要特点是含有 SET 结构域。Suv39 蛋白是最早被发现的组蛋白赖氨酸甲基转移酶。Suv39 可以直接作用于组蛋白 H3K9 使之甲基化, H3K9 甲基化在 X 染色体沉默、异染色质形成、DNA 甲基化以及转录调控等方面发挥重要作用。

组蛋白磷酸化指对组蛋白 N 端氨基酸残基的磷酸化修饰。组蛋白磷酸化与转录调节、DNA 损伤的修复和染色质凝集相关<sup>[18]</sup>。其中 H2AX 的磷酸化参与 DNA 损伤的修复过程; H3 丝氨酸 10、丝氨酸 28 及苏氨酸 3、苏氨酸 11 和 H4 丝氨酸 1 的磷酸化与染色质凝集相关<sup>[18,19]</sup>。组蛋白 H3 的磷酸化是激活 ERK 和 p38MAPK 信号通路中的一个重要的中间步骤<sup>[6]</sup>。

泛素化发生在组蛋白 H1、H2A、H2B 和 H3 上。组蛋白 H2B 泛素化广泛存在于真核生物中。在芽殖酵母中组蛋白 H2BK123 经常被泛素化,而在人类、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)和拟南芥(*Arabidopsis*)中分别是 K120、K119 和 K143 发生泛素化。组蛋白泛素化修饰在调节染色质结构、基因表达和基因组稳定性上起重要的作用<sup>[20]</sup>。

小的泛素相关修饰物(SUMO)与大量的蛋白共价结合在基因表达、染色质结构、信号传导和基因组稳定等生理过程中发挥了重要的作用<sup>[21]</sup>。组蛋白 H2B 和 H4 的大部分 SUMO 位点及 H2A 上一组 SUMO 化位点已经确定,但 H3 的 SUMO 化位点仍然不清楚<sup>[22]</sup>。SUMO 依赖的染色质结构分析揭示了组蛋白的 SUMO 化抑制基因转录。

ADP-核糖基化可以是单个也可以是多个,介导该修饰的酶分别是单 ADP 核糖基转移酶(Mono-ADP-ribosylation, MART)和多 ADP 核糖基转移酶(Poly-ADP-ribosylation, PARP)<sup>[23]</sup>。组蛋白单 ADP-核糖基化发生于 H2A、H2B、H3、H4 和 H1 及其变体上,与 DNA 修复过程和细胞增殖相关<sup>[18]</sup>。而组蛋白多 ADP-核糖基化的功能还没有得到证实,它可能是通过影响染色质的结构来影响“组蛋白密码”<sup>[23]</sup>。

组蛋白的生物素化在人类、黑腹果蝇和其他物种中均有发现<sup>[24]</sup>。在人类细胞中,组蛋白生物素化常发生于 H2A 的 K9、K13、K125、K127 和 K129, H3 的 K4、K9、K18 可能还有 K23 及 H4 的 K5 和 K16。其中 H4K12 的生物素化研究的最多,经研究发现 H4K12 生物素化参与基因阻遏过程。

### 3 DNA 甲基化与组蛋白修饰的关系

在重编程过程中 DNA 甲基化与组蛋白修饰是如何联系在一起的?目前还不是很清楚。许多研究表明, DNA 甲基化与 H3K9me 关系密切。Santos 等<sup>[25]</sup>研



究发现在牛正常着床前胚胎发育过程中, DNA甲基化在 2-细胞至 4-细胞期显著降低, 而 8-细胞后重新甲基化, H3K9 的甲基化和DNA的甲基化变化是平行的。在体细胞克隆牛的着床前胚胎中, H3K9 的过高甲基化伴随DNA的过高甲基化, 这说明在哺乳动物的胚胎中DNA的甲基化和组蛋白的甲基化有机地联系在一起。在拟南芥中, H3K9me可以作为DNA甲基化的一种信号, H3K9me通过与之相连的HP1 将DNA甲基转移酶聚集到目的区域<sup>[26]</sup>。在因Suv39h1/2 突变而缺少H3K9me的ES细胞中, 中心体周围的异染色质出现DNA甲基化水平降低的现象。相反的, DNA甲基化可能也是组蛋白甲基化的信号。Kondo等<sup>[27]</sup>选取了 3 种肿瘤细胞系(HCT116、RKO和SW48), 在这 3 种肿瘤细胞系中, 3 个肿瘤抑制基因*P16*、*MLH1*和*MGMT*的启动子的CpG岛都因不同程度地发生了超甲基化而不能表达。他们用TSA抑制组蛋白的去乙酰化, 结果发现沉默基因座H3K9 的乙酰化水平有所升高, 但对H3K9 的甲基化却没有影响, 基因仍然处于沉默状态。而当用 5-Aza-dC (5-aza-2'-deoxycytidine)阻抑DNA甲基转移酶的作用时, H3K9 的甲基化水平大大降低。

大量的研究表明DNA甲基化和组蛋白乙酰化水平以及两者的关系影响着基因的表达<sup>[11]</sup>。与DNA甲基化区域结合的甲基化CpG结合域蛋白与组蛋白去乙酰化酶都属于基因表达抑制复合物的成员<sup>[6]</sup>。在基因沉默过程中, 外源或内源性信号引起部分DNA序列中CpG 的甲基化, 甲基化CpG 结合域蛋白2(MeCP2)结合到甲基化的胞嘧啶上聚集HDACs使组蛋白去乙酰化, 甲基化CpG结合域蛋白与去乙酰化的组蛋白通过聚集更多的DNA甲基转移酶来加强沉默信号, 从而引起基因沉默。在此过程中组蛋白乙酰化状态可能引起DNA甲基化。因HATs与HDACs之间活性的平衡被打破导致低乙酰化状态, 低乙酰化状态的染色质可能被从头型甲基转移酶所识别, 从而使CpG位点被甲基化。组蛋白去乙酰化酶抑制剂可以影响DNA甲基化水平, 有研究表明人膀胱癌细胞系T24 经过TSA处理后CpG二核苷酸中胞嘧啶未甲基化的水平由 30%提高到 50%<sup>[28]</sup>。

## 4 DNA甲基化、组蛋白修饰与克隆动物发育

克隆动物的成活率较低, 而且存在大量表型异常及不同程度的缺陷, 这些异常的表型和缺陷是由表观遗传修饰异常引起的基因表达异常造成的。目前研究的焦点是 DNA 甲基化及组蛋白乙酰化的异常与克隆动物发育的关系。

### 4.1 着床前克隆胚胎发育

在克隆过程中, 核移植胚胎要想完成正常的发育过程, 在着床前建立功能性的表观遗传修饰模式是必须的。在对克隆胚胎的检测过程中发现了许多DNA甲基化模式的异常。Bourc'his等<sup>[29]</sup>用免疫荧光法检测牛中期染色体, 发现克隆牛胚胎在第一次DNA复制前无主动去甲基化, 被动去甲基化也大为削弱。值得注意的是克隆牛胚胎中的常染色质可以发生持续的去甲基化, 导致在桑椹胚和囊胚期的低甲基化状态, 但异染色质在胚胎发育过程中维持高甲基化状态。在克隆牛囊胚中富含CG的satellite I、satellite II、18S rDNA、art-2 SINE重复序列都表现出异常的甲基化水平, 这些序列显著不同于体外、体内受精的胚胎, 而是具有类似于供体细胞的甲基化水平<sup>[30]</sup>。Kang等<sup>[31]</sup>进一步验证了中心粒卫星DNA satellite I 在单个囊胚中的甲基化状态, 他们发现只有 26%(7/27)的克隆牛囊胚中的satellite I 表现出低甲基化状态, 而有 88%(23/26)的IVF牛囊胚中satellite I 呈低甲基化状态。Chen等<sup>[32]</sup>研究发现单拷贝基因和卫星DNA序列在克隆兔早期胚胎发育过程中存在不同形式的甲基化异常。Mann等<sup>[33]</sup>检测了 5 个印迹基因在克隆小鼠囊胚中的表达, 发现几乎所有克隆胚胎中都存在或多或少的异常, 在*H19* 和*Snprn*基因的差异甲基化区域(Differentially methylated region, DMR)发生异常的甲基化丢失。

在克隆胚胎中不光存在DNA甲基化模式的异常, 也存在大量的组蛋白修饰的异常。Shao等<sup>[34]</sup>研究发现除了 8-细胞期外的整个着床前发育过程中, 小鼠克隆胚胎中的H3K4 二甲基化水平都低于IVF胚胎。Santos等<sup>[25]</sup>研究发现在体细胞克隆牛的着床前胚胎中, H3K9 甲基化水平均高于正常胚胎。Inoue等<sup>[35]</sup>研究证实在 2-细胞期小鼠造血干细胞核移植胚胎中H3K9 和H4K8 的乙酰化水平明显高于卵丘细胞核移

植胚胎和正常胚胎。Wee等<sup>[36]</sup>研究也表明组蛋白乙酰化修饰在着床前克隆牛胚胎中存在异常。

由此推测,纠正表观遗传修饰的错误可能有利于提高克隆胚胎的发育率和克隆动物的成功率。Enright等<sup>[37]</sup>分别使用组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA和DNA甲基化转移酶抑制剂 5-Aza-dC (5-aza-2'-deoxycytidine)处理核供体细胞,结果显示使用TSA处理核供体细胞可以提高克隆胚胎的囊胚发育率,而使用 5-Aza-dC处理核供体细胞时克隆胚胎的囊胚发育率显著降低。Kishigami等<sup>[38]</sup>用TSA处理小鼠克隆胚胎,其囊胚发育率明显高于对照组。Iager等<sup>[39]</sup>用TSA对牛克隆胚胎处理 13 个小时后 8 细胞胚胎组蛋白H4K5 的乙酰化水平与IVF组相当,并且显著高于核移植对照组,而且处理后的胚胎的囊胚发育率高于其他两组。我们的研究表明TSA处理的克隆兔胚胎的囊胚发育率明显高于对照组,并且在囊胚阶段乙酰化的H4K12 与正常受精的胚胎有相同的分布模式,即AcH4K12 的表达仅出现在内细胞团上<sup>[40]</sup>。Tsuji等<sup>[41]</sup>使用 5-Aza-dC处理小鼠克隆胚胎,结果发现囊胚发育率显著低于对照组,但短时间的TSA处理有助于提高囊胚发育率。而Ding等<sup>[42]</sup>使用TSA和 5-Aza-dC共同处理克隆牛胚胎,发现其囊胚发育率高于对照组。

#### 4.2 克隆动物胎儿及成体发育

相比着床前胚胎,对克隆胎儿和克隆动物成体的甲基化研究较少。Cezar等<sup>[43]</sup>运用反向高效液相色谱法(Reverse phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC)检测全基因组范围的甲基化胞嘧啶比例,发现成体克隆牛有正常的甲基化水平,而克隆牛胎儿有较低的甲基化程度,特别是流产的克隆牛胎儿,有很大程度的甲基化丢失。Hiendleder等<sup>[44]</sup>用毛细管电泳法得到了相反的结果,克隆牛胎儿有较高的甲基化水平。Ogawa等<sup>[45]</sup>发现印迹基因 *H19* 和 *Igf2* 在克隆小鼠胎儿和胎盘中的表达均降低。Kishigami等<sup>[46]</sup>使用TSA处理ICR小鼠克隆胚胎,结果获得未见发育异常的后代,其克隆效率为 4%~5%,而对照组却没有后代出生。

X染色体失活(X-chromosome inactivation, XCI)异常可能是由DNA甲基化和组蛋白修饰异常造成

的。在雌性动物细胞核移植后代中,失活的X染色体是随机的,这就意味着在供体核中失活的X染色体恢复活性。有报道证实克隆小鼠囊胚阶段失活的X染色体恢复活性,其他研究表明在胚胎发育阶段特别是在孕中晚期的胎盘中X染色体相关基因表达异常,说明X染色体失活基因印迹模式的异常。在胎盘细胞中原来有活性的X染色体更容易失活,这表明在克隆胚胎的胚胎外细胞系中XCI没有发生重编程或发生异常的重编程。在克隆牛的研究中也得到相同的结果。虽然在克隆牛胚胎囊胚阶段没有发现X染色体相关基因的表达异常,而在后面的发育过程中发现死亡胎儿中X染色体相关基因的两个等位基因都表达,而不是正常X染色体失活状态下的母源性特异性表达。值得注意的是成活下来的胎儿,不同于死亡的胎儿,胎盘中只有一条X染色体有活性,这说明异常的X染色体失活模式导致胚胎死亡<sup>[47]</sup>。因为很多存在于X染色体上的基因表达对胎盘发育是重要的,X染色体异常和X染色体相关的基因表达异常对胎盘的发育有重大的影响,这可能是克隆动物胎儿胎盘异常的原因。

#### 5 展望

大量的研究结果表明克隆过程中表观遗传重编程的异常是克隆动物发育异常的重要原因,目前我们还不清楚克隆胚胎表观遗传重编程的机制。动物克隆是研究表观遗传重编程的重要途径,对克隆胚胎重编程机制研究的广泛开展将有助于对克隆胚胎发育分子机制的了解,从而实现动物克隆效率的提高和应用潜能的发挥。

#### 参考文献(References):

- [1] Gurdon JB, Byrne JA. The first half-century of nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8048-8052. [\[DOI\]](#)
- [2] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-813. [\[DOI\]](#)
- [3] Yamanaka S. Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2008, 363(1500): 2079-2087. [\[DOI\]](#)
- [4] Han YM, Kang YK, Koo DB, Lee KK. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced *in vitro*. *Therio-*

- genology, 2003, 59(1): 33–44. [\[DOI\]](#)
- [5] Cibelli JB, Campbell KH, Seidel GE, West MD, Lanza RP. The health profile of cloned animals. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(1): 13–14. [\[DOI\]](#)
- [6] Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. Epigenetic control. *J Cell Physiol*, 2009, 219(2): 243–250. [\[DOI\]](#)
- [7] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 2002, 16(1): 6–21. [\[DOI\]](#)
- [8] Shi W, Zakhartchenko V, Wolf E. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation*, 2003, 71(2): 91–113. [\[DOI\]](#)
- [9] Kurihara Y, Kawamura Y, Uchijima Y, Amamo T, Kobayashi H, Asano T, Kurihara H. Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1. *Dev Biol*, 2008, 313(1): 335–346. [\[DOI\]](#)
- [10] Suetake I, Morimoto Y, Fuchikami T, Abe K, Tajima S. Stimulation effect of Dnmt3L on the DNA methylation activity of Dnmt3a2. *J Biochem*, 2006, 140(4): 553–559. [\[DOI\]](#)
- [11] Vaissiere T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res*, 2008, 659(1–2): 40–48. [\[DOI\]](#)
- [12] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000, 403(6765): 41–45. [\[DOI\]](#)
- [13] Eilertsen KJ, Power RA, Harkins LL, Misica P. Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*, 2007, 98(1–2): 129–146. [\[DOI\]](#)
- [14] Lucio-Eterovic AK, Cortez MA, Valera ET, Motta FJ, Queiroz RG, Machado HR, Carlotti CG, Jr., Neder L, Scrideli CA, Tone LG. Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas. *BMC Cancer*, 2008, 8243.
- [15] Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenlicht LH, Mariadason JM. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem*, 2006, 281(19): 13548–13558. [\[DOI\]](#)
- [16] Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett*, 2009, 277(1): 8–21. [\[DOI\]](#)
- [17] Klose RJ, Zhang Y. Regulation of histone methylation by demethyliminination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(4): 307–318. [\[DOI\]](#)
- [18] Misri S, Pandita S, Kumar R, Pandita TK. Telomeres, histone code, and DNA damage response. *Cytogenet Genome Res*, 2008, 122(3–4): 297–307. [\[DOI\]](#)
- [19] Perez-Cadahia B, Drobic B, Davie JR. H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase. *Biochem Cell Biol*, 2009, 87(5): 695–709. [\[DOI\]](#)
- [20] Shukla A, Chaurasia P, Bhaumik SR. Histone methylation and ubiquitination with their cross-talk and roles in gene expression and stability. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(8): 1419–1433. [\[DOI\]](#)
- [21] Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev*, 2004, 18(17): 2046–2059. [\[DOI\]](#)
- [22] Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, Johnson ES, Berger SL. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev*, 2006, 20(8): 966–976. [\[DOI\]](#)
- [23] Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(3): 789–829. [\[DOI\]](#)
- [24] Hassan YI, Zemleni J. A novel, enigmatic histone modification: biotinylation of histones by holocarboxylase synthetase. *Nutr Rev*, 2008, 66(12): 721–725. [\[DOI\]](#)
- [25] Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*, 2003, 13(13): 1116–1121. [\[DOI\]](#)
- [26] Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 2002, 416(6880): 556–560. [\[DOI\]](#)
- [27] Kondo Y, Shen L, Issa JP. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(1): 206–215. [\[DOI\]](#)
- [28] Ou JN, Torrisani J, Unterberger A, Provencal N, Shikimi K, Karimi M, Ekstrom TJ, Szyf M. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(9): 1297–1307. [\[DOI\]](#)
- [29] Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, Niveleau A, Comizzoli P, Renard JP, Viegas-Pequignot E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine

- cloned embryos. *Curr Biol*, 2001, 11(19): 1542–1546. [\[DOI\]](#)
- [30] Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*, 2001, 28(2): 173–177. [\[DOI\]](#)
- [31] Kang YK, Park JS, Koo DB, Choi YH, Kim SU, Lee KK, Han YM. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J*, 2002, 21(5): 1092–1100. [\[DOI\]](#)
- [32] Chen T, Zhang YL, Jiang Y, Liu SZ, Schatten H, Chen DY, Sun QY. The DNA methylation events in normal and cloned rabbit embryos. *FEBS Lett*, 2004, 578(1–2): 69–72. [\[DOI\]](#)
- [33] Mann MR, Chung YG, Nolen LD, Verona RI, Latham KE, Bartolomei MS. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod*, 2003, 69(3): 902–914. [\[DOI\]](#)
- [34] Shao GB, Ding HM, Gong AH, Xiao DS. Inheritance of histone H3 methylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *J Reprod Dev*, 2008, 54(3): 233–238. [\[DOI\]](#)
- [35] Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Hirose M, Noda S, Kim JM, Aoki F, Miyoshi H, Ogura A. Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 10): 1985–1991. [\[DOI\]](#)
- [36] Wee G, Koo DB, Song BS, Kim JS, Kang MJ, Moon SJ, Kang YK, Lee KK, Han YM. Inheritable histone H4 acetylation of somatic chromatin in cloned embryos. *J Biol Chem*, 2006, 281(9): 6048–6057. [\[DOI\]](#)
- [37] Enright BP, Kubota C, Yang X, Tian XC. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod*, 2003, 69(3): 896–901. [\[DOI\]](#)
- [38] Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1): 183–189. [\[DOI\]](#)
- [39] Iager AE, Ragina NP, Ross PJ, Beyhan Z, Cunniff K, Rodriguez RM, Cibelli JB. Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning Stem Cells*, 2008, 10(3): 371–379. [\[DOI\]](#)
- [40] Shi LH, Ai JS, Ouyang YC, Huang JC, Lei ZL, Wang Q, Yin S, Han ZM, Sun QY, Chen DY. Trichostatin A and nuclear reprogramming of cloned rabbit embryos. *J Anim Sci*, 2008, 86(5): 1106–1113. [\[DOI\]](#)
- [41] Tsuji Y, Kato Y, Tsunoda Y. The developmental potential of mouse somatic cell nuclear-transferred oocytes treated with trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Zygote*, 2009, 17(2): 109–115. [\[DOI\]](#)
- [42] Ding X, Wang Y, Zhang D, Guo Z, Zhang Y. Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology*, 2008, 70(4): 622–630. [\[DOI\]](#)
- [43] Cezar GG, Bartolomei MS, Forsberg EJ, First NL, Bishop MD, Eilertsen KJ. Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol Reprod*, 2003, 68(3): 1009–1014. [\[DOI\]](#)
- [44] Hiendleder S, Mund C, Reichenbach HD, Wenigerkind H, Brem G, Zakhartchenko V, Lyko F, Wolf E. Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by *in vitro* techniques. *Biol Reprod*, 2004, 71(1): 217–223. [\[DOI\]](#)
- [45] Ogawa H, Ono Y, Shimozaawa N, Sotomaru Y, Katsuzawa Y, Hiura H, Ito M, Kono T. Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. *Reproduction*, 2003, 126(4): 549–557. [\[DOI\]](#)
- [46] Kishigami S, Bui HT, Wakayama S, Tokunaga K, Van Thuan N, Hikichi T, Mizutani E, Ohta H, Suetsugu R, Sata T, Wakayama T. Successful mouse cloning of an outbred strain by trichostatin A treatment after somatic nuclear transfer. *J Reprod Dev*, 2007, 53(1): 165–170. [\[DOI\]](#)
- [47] Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 295–302. [\[DOI\]](#)