

后生遗传修饰及其对动物克隆的影响

李文雍^{1,2} 郁卫东^{1,2} 陈清轩^{1*}

¹(中国科学院遗传与发育生物学研究所 北京 100080)

²(中国科学院研究生院 北京 100080)

摘 要 近年来,不断有新的哺乳动物和两栖类动物被成功克隆,但这并不能掩盖克隆效率过低和克隆动物异常的现实,为了解决这一问题,人们对克隆机理进行了大量研究。高度分化的体细胞核在去核的卵质中去分化和再程序化不完全是导致动物克隆失败的主要原因,而去分化和再程序化不完全主要是由于基因组去甲基化不充分和过早再甲基化引起克隆胚中甲基化水平比正常胚中偏高所致,这可引起一些重要基因的正常表达,尤其是印记基因。这些机制的研究对提高克隆效率有着重要意义。

关键词 后生遗传,克隆,再程序化,甲基化,基因组印记

中图分类号 Q813 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2003)01-0009-04

克隆绵羊“多莉”的诞生^[1]在生命科学界引起了一场革命,也改写了部分生物学理论。它表明高度分化的哺乳动物成年体细胞也可在去核的卵母细胞中去分化和再程序化,恢复全能性。近年来动物克隆得到了长足的发展,新的克隆动物相继问世,如鼠^[2]、牛^[3]、山羊^[4]、猪^[5,6]、兔^[7]。然而克隆效率极低(小于3%)、克隆动物异常是目前克隆技术的一大难题,胚胎、胎儿或新生儿死亡率极高,极少数能全程发育的个体也表现为超重、呼吸系统疾病等异常表型,这是导致新生个体死亡的主要原因,即使个别表型正常者也存在有免疫缺陷、关节炎或肾、脑畸形等问题,导致克隆动物后期死亡^[8-11]。造成这些问题的原因是什么?其分子机理如何?引起了科学家们极大的兴趣。

大量研究表明克隆效率可能与下列因素有关:移植前胚胎损伤、体外培养的时间过长及培养液成分、重组胚中供体与受体线粒体的作用、核基因组与线粒体基因组的相互关系、体细胞核在卵质中去分化和再程序化不足^[12,13]以及其他不确定因素。去分化和再程序化不足是克隆失败的主要原因,这主要集中在三方面的研究:第一,在形态上,包括核的膨胀、核仁消失、核膜崩解以及早熟染色体凝集等等^[14-16];第二,基因表达,主要包括印记基因的表达与沉默、重要的发育相关基因的表达和基因表达模式;第三,后生遗传修饰的改变,主要指基因组甲基化水平的变化,它可引起基因的正常表达,尤其是印记基因的正常表达^[17-19],从而导致胚胎发育异常^[20-23]。近年来,本室承担 973 国家重点基础研究发展规划项目,对细胞核在去核的卵质中去分化和再程序化及

其全能性进行了研究^[24-26],本文结合本室的研究工作就基因组甲基化以及甲基化对基因表达、印记基因和动物克隆的影响的研究进展进行综述。

1 基因组甲基化

后生遗传(Epigenetic)指通过遗传而产生的基因表达修饰,且不能被逆转,此类遗传改变主要指染色体结构的改变和 DNA 甲基化状态的改变。DNA 甲基化是一种主要的基因组后生遗传修饰,它调节着基因组功能的主要方面^[27]。哺乳动物细胞 DNA 中的胞嘧啶约有 5% 被甲基化成为 mCpG 形式,其中 70% 发现在 CG 富含岛上,而 CG 岛又常位于转录调控区或其附近,mCpG 是 DNA 甲基化的唯一形式,这种特征可以通过维持性甲基化酶 Dnmt1 实现,另外体内还存在一种构建性甲基化酶,它可以使完全非甲基化的 DNA 从头甲基化。体内甲基化有 3 种存在状态:(1)高度甲基化,如女性的一条 X 染色体;(2)在诱导下去甲基化,如发育阶段特异性;(3)保持低水平甲基化,如持家基因。基因组甲基化模式在分化的体细胞中通常是稳定且可以遗传的,但在哺乳动物中的生殖细胞发育期和植入前胚胎期,甲基化模式通过大规模的去甲基化和再甲基化形成新的甲基化模式,并产生有发育潜能的细胞^[27],如图 1 所示。

哺乳动物原始生殖细胞中基因组是高度甲基化的,在胚胎发育早期原始生殖细胞发育中,雌、雄生殖细胞中 DNA 去甲基化到 13.5d 胚胎期已完成,雄性生殖细胞再甲基化的开始是在 15d 胚胎,一直持续到出生后;而雌性生殖细胞中再

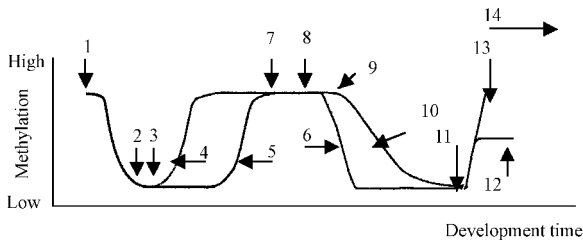


图 1 哺乳动物不同发育时期的甲基化水平的变化(Reik, 2001)

Fig.1 Changes of methylation level of different developmental stages in mammals

1. Primordial germ cells ; 2. Embryonic day 13.5 ; 3. Embryonic day 15.5 ; 4. Male ; 5. Female ; 6. Paternal genome ; 7. Mature oocytes and spermatozoan ; 8. Zygote ; 9. DNA replication ; 10. Maternal genome ; 11. Blastocyst ; 12. Extraembryonic lineage ; 13. Embryonic lineage ; 14. Maintain methylation level

甲基化发生在出生后的卵生长期,因为卵的生长是一个滞后的发育过程。在成熟的精子和卵中基因组也是高度甲基化的,受精后最初几次卵裂,去甲基化酶清除 DNA 上几乎所有的来自亲代的甲基化标记,首先父源基因组立即进行去甲基化,而母源基因组则要依赖于 DNA 的复制,滞后去甲基化,二者大约在植入前后均再甲基化,构建性甲基化酶从 DNA 重新建立一个新的甲基化模式,再甲基化程度在胚性细胞中高于非胚性细胞^[27-29]。近来研究发现,后生遗传修饰还包括组蛋白乙酰化作用(hypoacetylation)和组蛋白 H3-Lys9 的甲基化,组蛋白的这种翻译后修饰是一种重要的调节机制,它可以诱发染色质结构的改变,从而引起遗传外基因调控以及染色体特殊亚结构域的形成,H3-Lys9 的甲基化可能为雌性哺乳动物 X-染色体的失活提供一种后生印记(epigenetic imprint)^[30]。

2 甲基化与基因表达

任何体细胞都保持了它们受精后的完整基因组成分,但不同类型的细胞却发挥不同的功能,这是细胞分化的结果,细胞分化的本质是基因组中不同基因被选择性激活,而这种选择性激活与基因组的甲基化有密切关系。研究表明,基因表达与 CG 甲基化程度呈负相关^[19,31],在研究宿主对外来活动元件的作用反应时发现,当外源 DNA 侵入机体时,宿主通过对外来 DNA 进行甲基化修饰而使外源基因关闭。转录的充分激活和完全阻遏之间的调节开关决定于甲基化 CpG 程度与启动子强度的平衡。

甲基化抑制转录的原因可能是(1)胞嘧啶的甲基化可能加强阻遏蛋白或降低激活蛋白与 DNA 的结合(2)mCpG 的甲基,伸入 DNA 双螺旋结构的大沟,以影响 DNA 与结合蛋白的相互作用;(3)胞嘧啶的甲基化改变 DNA 各种构象间的平衡,如 B-DNA 转变成 Z-DNA,从而影响了 DNA 专一序列与结合蛋白的结合(4)将转录因子识别的 DNA 序列,转变为转录抑制物的结合位点。

3 甲基化与基因组印记

基因组印记是源于亲本特征特异性表达的现象,在生殖细胞发育期产生,在胚胎发育期保持恒定,在胚胎性腺形成期消除而产生新的印记现象^[31]。它是哺乳动物特有的现

象,在哺乳动物的基因组中有 100 多个印记基因,约占基因总数的 0.1%,在胚胎和成体的二倍体体细胞中,源于父本或母本的等位基因有选择性表达的特征^[32-35]。由于双亲印记基因的模板在甲基化模式上保持不同,所以 DNA 甲基化在基因组印记中具有重要意义。印记基因的这些差异甲基化,不受在早期胚胎中出现的去甲基化和再甲基化以及改变非印记基因甲基化状态因素的影响^[27]。在缺乏甲基化转移酶(Dnmt1)的胚胎中,甲基化特异性等位基因印记丢失,因此,Dnmt1 在体细胞组织中,对亲本印记的保持起着重要作用。将 Dnmt1 cDNA 导入 Dnmt1 缺陷的 ES 细胞中,甲基化作用使非印记的位点恢复,提示 Dnmt1 与印记的启动有关。在野生型或转基因小鼠中,Igf2 基因均只转录父系基因版本,母系版本处于沉默状态,而 Igf2r 基因只有母本传下来的染色体上才有活性。转基因或克隆小鼠缺乏维持性甲基化酶时,母系的 Igf2 基因就表达,小鼠死于胚胎早期,因不能通过 DNA 甲基化决定发育中选择性表达的基因,导致许多基因异常表达。同时 Dnmt1 的缺失或删除差别甲基化区(DMRs)则引起印记的丢失,印记基因都出现 DMRs。Igf2r 基因中有 DMR1 和 DMR2 二个 DMRs。如图 2 所示,DMR1 位于启动子区,DMR2 位与 CpG 岛,DMR2 中含有 4 个甲基化位点 H1-H4^[31]引起 H4 位点重新甲基化的是一个 113bp 的印记盒结构,在印记盒中,3'端 8bp 形成顺式元件与 DMR2 的识别有关,是重新甲基化信号(DNS)5'端 6bp 构成等位基因差别信号(ADS),有二种参与重新甲基化的特异结合蛋白 ADP 和 DNP。在父源等位基因中,DNP 与 DNS 特异结合,从而阻断了 DNP 与 DNS 的结合,这可阻断父源等位基因甲基化,使父本等位基因保持非甲基化状态,此时父源反义 RNA 转录,阻断父源特异性 Igf2r 的表达;而在母源等位基因中,ADP 与 ADS 结合,指导母源等位基因再甲基化,抑制了母源反义 RNA 的转录,母源特异性 Igf2r 表达^[31,36,37]。

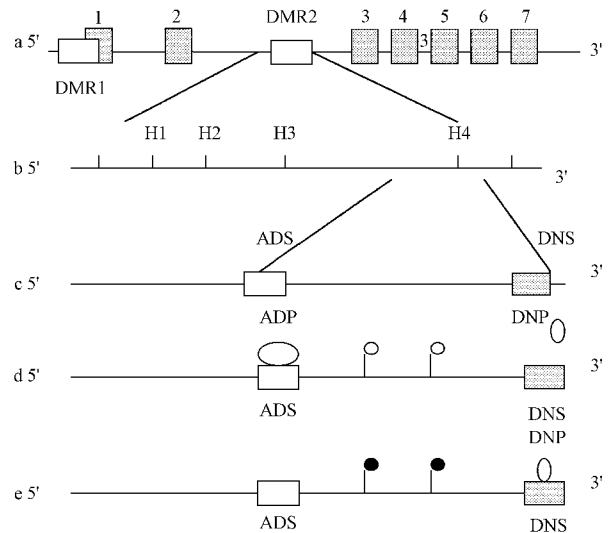


图 2 Igf2r 基因结构及 DMR2 印记盒模式

Fig.2 Structure of Igf2r gene and the model of DMR2 imprinting box a. Igf2r gen(27kb), 1~7 exons, DMR1, DMR2, differentially methylated regions b. DMR2(3kb) H1-H4, methylation sites c. Imprinting box(113bp) DNS, de novo methylation signal; ADS, Allele-discrimination signal d. Paternal allele ADP, protein binds to ADS, DNP, protein binds to DNS e. Maternal allele

4 甲基化与克隆

体细胞克隆目前主要采取细胞核移植技术,即将体细胞核移植到去核的卵母细胞中去,融合、激活后形成重构胚,在重构胚的发育过程中,体细胞核必须放弃已经高度程序化的表达模式,即去分化,采取与胚胎正常发育所必须的基因表达方式,即核的再程序化。去分化和核的再程序化程度对克隆胚的发育起关键作用,作为供体的高度分化的体细胞已完成了特殊形式的抑制性染色质调集装配,如接头组蛋白、多梳蛋白及甲基-CpG-结合蛋白,这些结构将染色质隔分为不同的功能区,并维持细胞分化状态的稳定性,要提高克隆效率,必须删除作为供体的高度分化的成体细胞核的这些结构。M 期卵质中存在的分子伴侣体和酶可以删除这些结构^[38]并能抑制移入核自身的转录活性,从而使其按胞质的信息开始活动^[39]。由于供体核在去核的卵质中去分化和再程序化程度不足,引起一些重要基因,尤其是印记基因表达异常,从而导致克隆失败,这是目前比较容易接受的解释,去分化和再程序化程度不足主要表现在去甲基化不充分和提前再甲基化。在克隆牛的桑葚胚和囊胚中,几个重复序列和单一序列的甲基化水平比正常胚中高的多,不同的基因组区域均发现有甲基化模式异常现象,而且正常的牛胚胎中发现长的散布的核因子序列的去甲基化现象,在克隆胚中没有发现^[12]。尽管发现成纤维细胞核被移入去核的卵质中后,显示出一些去甲基化,但进一步的去甲基化并没有发生,反而过早的从头甲基化在大部分的克隆胚中发生,这可能是因为在体细胞核中 Dnmt1 的存在形式和卵中的不同^[27]。对正常小鼠和克隆小鼠的胎盘、皮肤和肾脏进行组织特异性甲基化模式的比较结果表明,在克隆鼠中,有 4 个 CpG 岛表现甲基化异常,而且不同物种的克隆动物甲基化异常的程度是不同的,这种异常主要表现在组织特异性甲基化位点^[23]。用 RT-PCR 技术,对克隆动物基因表达模式进行分析,发现:一些重要的发育相关基因如 IL6、FGF4、FGFr2^[18]和 Oct4^[13]在核移植的桑葚胚和囊胚中表达异常。在克隆牛的桑葚胚中发现 Mash2 表达过量, DNMT 表达不足, Hsp70 表达消失^[19]。我们用单胚 mRNA 差异显示技术对兔植入前不同发育时期的正常胚和克隆胚进行差示,结果显示,8-16 细胞期的克隆胚中,基因表达模式有较大差异,这是因为兔的早期胚胎发育中,8-16 细胞前属于母型调控,8-16 细胞期合子型调控开始启动。对这一时期的差异片段进行回收、亚克隆、序列分析,发现这些差异表达的基因多数与早期胚胎发育相关。这些研究表明克隆动物胚胎中可能存在损伤后生遗传的再程序化能力。

5 结 语

综上所述,尽管多种动物已被成功克隆,但我们并不知道供体核被移入去核的卵质中后发生的分子事件以及核的去分化和再程序化达到什么程度才能保证胚胎正常发育,移植核的抑制性染色质的解除及 DNA 的去甲基化和后续的从头甲基化的具体机制尚不清楚。近年来,对核的去分化和再程序化的机理进行了深入研究,并取得了进展,对基因组甲基化、后生遗传的改变、甲基化对基因表达的影响尤其对印记基因的影响以及由此引起的对动物克隆的影响,均有不同程度的研究。我室将对所获得的差异表达基因作进一步研

究,选择与植入前胚胎发育相关的基因和未知基因,用 RT-PCR 技术进一步确定其差异表达和特异性表达,通过原位杂交和 Confocal 进行定位研究,单胚建库技术的建立^[24],为克隆未知基因的全长提供了方便,并用转基因和基因敲除技术进行功能研究。随着对这些机制的深入研究,将为进一步了解在发育和分化的过程中,后生遗传事件的建立提供可能性,同时也为提高克隆效率提供新的方案。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385**: 810 - 813
- [2] Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **394**: 369 - 374
- [3] Kato Y, Tani T, Sotomuru Y *et al.* Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, **282**: 2095 - 2098
- [4] Baguisi A, Behboodi E, Melican D T *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature biotechnology*, 1999, **17**: 456 - 461
- [5] Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, **407**: 86 - 90
- [6] Onishi A, Iwamoto M, Akita T *et al.* Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, **289**: 1188 - 1190
- [7] Chesne P, Adenot P G, Viglietta C *et al.* Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature biotechnology*, 2002, **20**: 366 - 369
- [8] Wakayama T, Yanagimachi R. Cloning laboratory mouse. *Semin Cell Dev Biol*, 1999, **10**: 253 - 258
- [9] Solter D. Mammalian cloning: Advances and limitations. *Nat Rev*, 2000, **1**: 199 - 207
- [10] Wakayama T, Yanagimachi R. Mouse cloning with the nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev*, 2001, **58**: 376 - 383
- [11] Kishikawa H, Wakayama T, Yanagimachi R. Comparison of oocyte-activating agents for mouse cloning. *Cloning*, 1999, **1**: 153 - 159
- [12] Kang Y K, Koo D B, Park J S *et al.* Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*, 2001, **28**: 173 - 177
- [13] Boiani M, Eckardt S, Scholer H R *et al.* Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes and Development*, 2002, **16**: 1209 - 1219
- [14] Kanka J, Fulka Jr J, Fulka J. Nuclear transplantation in bovine embryo: Fine structural and autoradiographic studies. *Mol Reprod Dev*, 1991, **29**: 110 - 116
- [15] Collas P, Robl J M. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod*, 1991, **45**: 455 - 465
- [16] Lavoie M C, Kelk D, Rumph N *et al.* Transcription and translation in bovine nuclear transfer embryos. *Biol Reprod*, 1997, **57**: 204 - 213
- [17] Koo D B, Kang Y K, Choi Y H *et al.* Developmental potential and transgene expression of porcine nuclear transfer embryos using somatic cells. *Mol Reprod Dev*, 2001, **58**: 204 - 213
- [18] Daniels R, Hall V, Trounson A O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nu-

- [19] Wrenzycki C , Wells D , Herrmann D *et al.* Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod* , 2001 , **65** : 309 – 317
- [20] Inoue K , Kohda Y , Lee J *et al.* Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science* , 2002 , **295** : 297
- [21] Humpherys D , Eggan K , Akutsu H *et al.* Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* , 2001 , **293** : 95 – 97
- [22] Eggan K , Akutsu H , Hochedlinger K *et al.* X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* , 2000 , **290** : 1578 – 1581
- [23] Ohgane J , Wakayama T , Kogo Y *et al.* DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* , 2001 , **30** : 45 – 50
- [24] YU W IX (郁卫东) , LI W Y (李文雍) , CHEN Q X (陈清轩) . Construction of cDNA library from single preimplantation embryo. *Journal of Chinese Biotechnology* (中国生物工程杂志) , 2002 , **22** (6) 6 – 9
- [25] YU W IX (郁卫东) , LI W Y (李文雍) , WANG Y Q (王玉阁) *et al.* Identification and isolation of reprogramming gene fragments related to the development of the rabbit reconstructed embryos , *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) , 2002 , **19** (1) 30 – 34
- [26] LI W Y (李文雍) , YU W IX (郁卫东) , CHEN Q X (陈清轩) *et al.* Cloning of Early Mouse Embryo Development Related Genes Using Modified DDRT-PCR. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学报) , 2002 , **18** (6) : 714 – 718
- [27] Reik W , Dean W , Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* , 2001 , **293** : 1089 – 1093
- [28] Rideout III W M , Eggan K , Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* , 2001 , **293** : 1093 – 1098
- [29] Wolffe A P , Matzke M A. Epigenetics : regulation through repression. *Science* , 1999 , **286** : 481 – 486
- [30] Peters A H , Mermoud J E , Jenuwein T *et al.* Histone H3-lys9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet* , 2002 , **30** (1) 77 – 80
- [31] Barlow D P. Competition-a common motif for the imprinting mechanism? *EMBO J* , 1997 , **16** : 6899 – 6905
- [32] Cattanach B M , Jones J. Genetic imprinting in the mouse : implications for gene regulation. *J Inherited Metab Dis* , 1994 , **17** : 403 – 420
- [33] Barlow D P. Gametic imprinting in mammals. *Science* , 1995 , **270** : 1610 – 1613
- [34] John R M , Surani M A. Imprinted genes and regulation of gene expression by epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol* , 1996 , **8** : 348 – 353
- [35] Leighton P A , Seam J R , Ingram R S *et al.* Genomic imprinting in mice-its function and mechanism. *Biol Riprod* , 1996 , **54** : 273 – 278
- [36] Birger Y , Shemer R , Perk J *et al.* The imprinting box of the mouse Igf2 gene. *Nature* , 1999 , **397** : 84 – 88
- [37] Shemer R , Birger Y , Dean W L *et al.* Dynamic methylation adjustment and counting as part of imprinting mechanisms. *Genetics* , 1996 , **93** : 6371 – 6376
- [38] Kikyo N , Wolffe A P. Reprogramming nuclei : insights from cloning , nuclear transfer and heterokaryons. *Journal of Cell Science* , 2000 , **113** : 11 – 20
- [39] Steinbach O C , Wolffe A P , Rupp R. Somatic linker histones causes loss of mesodermal competence in *Xenopus*. *Nature* , 1997 , **389** : 395 – 399

Epigenetic Modifications and Its Impact on Animal Cloning

LI Wen-Yong^{1 2} YU Wei-Dong^{1 2} CHEN Qing-Xuan^{1*}

¹(Institute of Genetics and Developmental Biology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

²(Graduate school of the Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract Despite recent successes in cloning various mammals and amphibians , the low efficiency of animals production and abnormal symptoms in many cloned animals are crucial problems in cloning technology. To overcome these problems , scientists focus on mechanisms of cloning. A possible cause of the low success frequency of cloning is the insufficient dedifferentiation and the inadequate reprogramming of the high differentiated adult somatic nucleus in enucleated oocytes , which caused by incomplete methylation and premature *de novo* remethylation of donor DNA. In cloned embryos the methylation level is higher than normal embryos , and this may cause aberrant expression of several important genes , especially imprinting genes. Study on these mechanisms is very important to improve the rate of successful cloned animals.

Key words epigenetic , clone , reprogramming , methylation , genome imprinting

Received : 07-11-2002

This work was supported by the State Basic Research Development Program (No. G2000016107).

* Corresponding author. Tel : 86-10-62553160 ; E-mail : qingxuanchen@yahoo.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>