

## **Zárójelentés: A Dnmt3b DNS metiltransferáz tetraciklinnel szabályozott túltermelésének hatása transzgénikus egerekben**

**Ifjúsági F48899**

**Témavezető: Hiripi László**

### **Bevezetés, célkitűzések**

A DNS metiláció alapvető molekuláris folyamat, mely szoros kapcsolatban van az embrionális fejlődéssel, imprinting folyamatokkal, az X kromoszóma inaktiválódásával, és bizonyos rákos folyamatok kialakulásával. A DNS metiláció elsősorban az úgynevezett CpG szigeteken a citozin esetében tapasztalható, de a CG helyektől függetlenül is bekövetkezhet. A DNS metilációs mintázat a nagyon korai embrionális fejlődés során alakul ki, és a sejtek osztódását követően a létrejött utódsejtekben fennmarad. Ezeknek a folyamatoknak a véghezvitelét emlőszállatokban mai ismereteink szerint három DNS metiltransferáz enzim végzi. A három ismert DNS metiltransferáz a Dnmt1, Dnmt3a, valamint Dnmt3b (1,2,3.). Létezik egy negyedik enzim az eukariótákban, mely a Dnmt2 nevet viseli, azonban aktivitása nagyon alacsony, szerepéről nagyon keveset tudnak, és emiatt nem sorolják be az igazán fontos metiltransferázok közé. Bizonyos adatok szerint csak citoplazmában elhelyezkedő tRNS metiltransferáz (4). Újabb adatok alapján azonban mégis van szerepe a fejlődésbiológiai folyamatokban (5). A Dnmt1, Dnmt3a, valamint Dnmt3b enzimek funkciói részben átfednek, de alapvető különbségek tapasztalhatók szubsztrátspecifitásukban *in vivo* és *in vitro* is.

A Dnmt1 enzim olyan DNS molekulák metilációját végzi el, melyek már részlegesen metiláltak, tehát elsősorban az a funkciója, hogy a már kialakult DNS metilációs mintázatot véglegesen létrehozza. Így tehát a metilációs mintázat fenntartásának fontos szereplője (6). Ha ez a fenntartó enzim hiányosan működik, abban az esetben a teljes genomra kiterjedő alulmetilált (hipometilált) állapot jön létre, mely az egerekben a magzatok korai elhullását okozza (7).

A szintetizálódott új DNS molekulák *de novo* metilációjáért a Dnmt3a valamint a Dnmt3b enzimek a felelősek. Hiányukban a Dnmt1-hez hasonlóan a célzott génmódosítással létrehozott mutáns egerek korán elpusztulnak. A Dnmt3a mutáns egér születése után néhány héttel, míg a Dnmt3b hiányos egér már a korai embrionális korban elpusztul (8). A kettős knock-out model sokkal súlyosabb fenotípust mutat (9), mely azt jelzi, hogy a két enzim bizonyos mértékben képes ellátni egymás funkcióját, illetve vannak átfedő funkcióik. Azonban a két enzimnek vannak speciális funkcióik is, melyeket nem lehet helyettesíteni.

A Dnmt3b enzim képes a nagyon magas GC tartalmú szekvenciák metilálódását is elvégezni. Ilyen szekvenciák találhatóak a kromoszómák centroméra körüli szatellit ismétlődő egységeiben. Az ICF szindróma (immundeficiencia, arc környéki torzulások jellemzik) egy olyan emberi öröklődő betegség, melyben ezek a régiók alulmetiláltak. Bebizonyosodott, hogy az emberi Dnmt3b génjében található mutációk, kapcsolhatók ehhez a szindrómához. Dnmt3a mutációt viszont még sohasem mutattak ki ilyen betegség esetében (10).

A dnmt3a génhez is köthetők valószínűleg speciális funkciók. Ez a gén sokkal inkább fontos a genomban található bizonyos egykópiás gének pontos metilációs mintázatának létrejöttéhez. Mindkét enzim képes elvégezni a nem CG helyek metilációját is, azonban ez a típusú funkciójuk még nincs teljes mértékben tisztázva (11).

A DNS metilációs mintázata a nagyon korai embrionális korban alakul ki. Míg a petesejt valamint a spermium DNS-e magas szintű metilációt mutat, addig a megtermékenyülést követően ez a metilációs szint törlődik. A metilációs mintázat törlődésének folyamata egyelőre nem tisztázott. A DNS metilációs mintázatának törlődését követően a de novo metiltransferázok - Dnmt3a és 3b- a Dnmt1 segítségével a hólyagcsíra időszakra újratehermítik a DNS metilációs mintázatát. Ez azután fennmarad az osztódások során. A Dns metilációja az emlősökben még egyszer törlődik, valamint újraépül. Ez az időszak az ivarsejtek kialakulása. Az ivarsejtek kialakulása folyamán az ősvarsejtek még magas DNS metilációs szinttel jellemeztek, az érés során a DNS elveszíti metilációs mintázatát, de az az érett petesejtben és spermiumban már ismételtelen helyreáll. Ebben az időszakban alakul ki bizonyos anyai valamint apai géneknek a későbbi monoalléles kifejeződésnek megfelelő epigenetikai mintázata (12).

A Dnmt3a valamint 3b metiltransferáz különböző splicing izoformákat képes létrehozni. A Dnmt3b esetében két aktív izoforma, a 3b1 valamint a 3b2 aktív. Ezekről bebizonyosodott, hogy a spermatogenezis során kialakuló új metilációs mintázat kialakulása során különböző stádiumokban kapcsolódnak be (13). Az ismert Dnmt3b3, Dnmt3b4, Dnmt3b5, Dnmt3b6 metiltransferáz funkcióval nem rendelkeznek, de a metiláció szabályozásában pozitív illetve negatív regulátorként szerepet játszhat.

Mivel a Dnmt3b fokozottan működik bizonyos típusú tumorokban, ezért feltételezik, hogy szerepet játszik bizonyos tumorok kialakulásában is (14).

A Dnmt3b RNS 3' nem transzlálódó régiója tartalmaz egy specifikus elemet (15). Ezt az elemet CPE elemnek nevezik, és lényegében egy speciális poly-A motívum. A CPE motívumhoz speciális fehérjék képesek kapcsolódnak (pl a CPEB nevezetű fehérje a cyclin-B1 fehérje esetén). A

CPE motívumhoz kapcsolódó fehérjék képesek a poly-A farok hosszának szabályozásával irányítani a fehérjék megjelenési idejét. Ilyen módon a fehérje szigorúan szabályozott módon jelenhet meg térben és időben. A Dnmt3b fehérje korábbi vizsgálataink szerint a petesejtben nagyon szigorúan meghatározott helyen található, mégpedig a petesejt külső rétegébe lokalizálódik (16). Hasonló kifejeződést mutat a petesejtben a Dnmt1 fehérje is, és a Dnmt1 RNS szintén hordoz CPE motívumot. Véleményünk szerint ez a speciális elrendeződés biztosítja azt, hogy a megtermékenyülést követően mikor megtörténik a metilációs mintázat törlődése, akkor azt ne zavarják meg a Dns metiltranszferáz enzimek. A törlődés időszaka mindössze néhány órára tehető.

A kutatás célja az emberi Dnmt3b DNS metiltranszferáz túltermeltetése az embrionális fejlődés korai szakaszaiban. Előzetes vizsgálatok szerint széleskörű promóterrel szabályozott Dnmt3b-t túltermelő egerek a korai embrionális korban elpusztulnak. Kizárólag olyan transzgénikus egereket sikerült létrehozni ilyen módon, melyek hordozzák a transzgént, de nem expresszálják azt (Jaenisch személyes közlés 2003). A gén fehérjetermékének széleskörű túltermelése valószínűleg ugyanolyan komoly zavarokat okoz a DNS metilációban mint a fehérje hiánya. Ezért olyan módszerrel szerettem volna túltermelni a transzgént, hogy

1. szabályozható módon működjön
2. ha túltermeljük, a megfelelő időben, expresszáljon a megfelelő helyen.

E két cél elérését úgy akartam elérni, hogy olyan nukleinsav konstrukciókat hozok létre, melyek nem tartalmazzák a fent leírt CPE motívumot. Ezáltal ha sikerül túltermeltetni a transzgént, az nagy valószínűséggel nem fog kizárólag kortikális kifejeződést mutatni, hanem jelen lesz a korai embrióban közvetlenül a DNS mellett. Ezáltal funkcionálisan is működőképpé válik. Az időben irányított kifejeződést kétféleképpen céloztam elérni. Az első módszerrel a megfelelő cDNS konstrukcióról in vitro transzkripciót végzünk, majd a megfelelő védősapkával ellátott RNS molekulát közvetlenül mikroinjektáljuk az érett petesejtbe, valamint a korai embriókba. Ezzel a módszerrel, ha az RNS molekulák funkcionálisan aktívak, akkor közvetlenül az embrionális fejlődés nagyon korai szakaszaiban befolyásolhatjuk a dns metilációt, abban az időszakban amikor az epigenetikai mintázat törlődésnek kell bekövetkeznie. Mivel a módszert még nem alkalmazta senki, emiatt kimenetele is kétséges lehet. Ebből adódóan választottam egy másik megközelítést is, ahol olyan transzgénikus egereket hozok létre, melyekben a Dnmt3b enzim működése tetraciklinnel szabályozható.

A transzgént természetesen szintén a korai embrionális fejlődés során szeretnénk bekapcsolni. A működő transzgént ezt követően RNS, valamint fehérje szinten szándékoztunk

nyomon követni. Megfelelő expresszió megléte esetén azt várjuk, hogy az embrionális fejlődés során a DNS metilációs mintázata megváltozik, kisebb-nagyobb zavart szenvedhet. Ez megnyilvánulhat globális alulmetiláltságban, mivel a globális metiláltság létrejöttében a Dnmt3b kulcsszerepet játszik. Ezentúl anyai, illetve apai imprintinget mutató gének metiláltságát is megváltozhat. Itt elsősorban a H19, Igf2r, valamint Snrpn génekre gondolok, melyeknek jól ismert, és jellemzett ún. különböző módon metilált régiót hordoznak. Ez a régió játsza a döntő szerepet az imprinting folyamatokban az egyes gének esetén.

## **Eredmények és értékelésük**

### *1. Az egér Dnmt3b teljes hosszúságú cDNS klónozása a CPE motívum nélkül*

C57BL6XCBA keresztezésből származó nőstény egereket termékenyítettem meg, majd a keresztezésből származó hólyagcsíra állapotú embriókból RNS-t izoláltam a Qiagen Rneasy kitje segítségével. Az RNS-ből RT PCR módszerrel felszaporítottam a Dnmt3b cDNS-t, úgy hogy az ne hordozza a 3' nem transzlálódó régióban a fent jellemzett CPE motívumot, és a poly-A szignált. A megfelelő cDNS létrehozásához a Promega Acces RT-PCR egy lépéses kitjét használtam az alábbi Dnmt3b specifikus primerek felhasználásával.

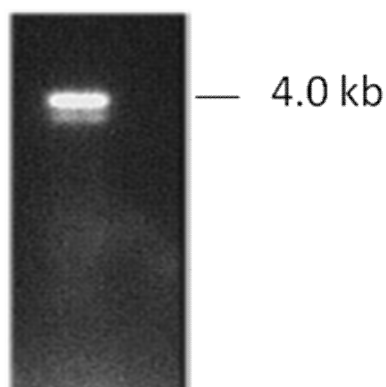
DnmtF: 5' ctccccgctgccccgctccggc 3'

DnmtR 5' ccattacgatggcatttctga 3'

A primerek egy 4053 bp hosszúságú cDNS szaporítottak fel. A felszaporított cDNS végeire TAQ polimeráz segítségével illesztettem egy terminális adenozil csoportot, hogy ezt követően T vektorba klónozzam. A T-vektort házilag állítottuk elő pBluescript II SK vektorból. Ezt a vektort használtam a további klónozási lépések folyamán. A T vektorból EcoRI valamint részleges HindIII emésztést követően a cDNS fragmentet átklónoztuk pMF-T7 vektorba (a vektort Makovics Ferenctől kaptam) EcoRI-HindIII helyre. Ezen lépés során a 3' nem transzlálódó régió az EcoRI emésztés miatt 40 bp-ral rövidül. A pMF-T7 vektor tartalmaz egy T7 promótert valamint SV40 poly-A szignált. A vektor így alkalmas arra, hogy in vitro transzkripcióval működőképes RNS-t hozzunk létre.

A klónozási lépéseket követően a pMF-T7-Dnmt3b konstrukciót felhasználva az Ambion mMessage mMachine T7 ultra kit felhasználásával in vitro transzkriptumot készítettem. A kit alkalmas lineáris plazmidról védősapkával és poly-A farokkal ellátott funkcionális mRNS

molekulák készítésére, melyek használhatók mikroinjektálásra. A plazmidot XbaI emésztéssel linearizáltam, majd követtem a gyártó utasításait. A létrejött in vitro transzkriptum képe az 1. ábrán látható.



1. ábra A létrehozott in vitro transzkriptum gélelektroforézis képe 1% denaturáló gélben, etídium bromiddal megfestve.

Az elkészült in vitro transzkriptumot ezt követően az Ambion Megaclear kitjének segítségével tisztítottam. A transzkriptum így már alkalmas a mikroinjektálásra.

### *1. In vitro transzkriptum mikroinjektálása érett petesejtekbe*

A mikroinjektálást érett petesejtekbe, valamint korai egysejtes embriókba terveztem elvégezni. A petesejt mikroinjektálás kivitelezéséhez azonban szükséges volt az egér in vitro fertilizáció beállítására, hogy a megszürt petesejtekből élő állatokat hozzunk létre. Az in vitro fertilizáció optimalizálásához a Jacksons laboratórium kissé módosított protokollját használtam. C57BL6XCBA keresztezésből származó F1 hibrid egereket szuperovuláltattam, majd petesejteket nyertem. A petesejteket HTF fertilizációs médiumcseppekbe helyeztem. A termékenyítéshez FVBN törzset használtam. A vas defferens-ből spermiumokat mostam ki, és szintén HTF médiumban tároltam. 10 perces inkubáció után az élő spermiumok felúsznak a médium tetejére, és begyűjthetők. A megtermékenyítő cseppben a spermiumszámot körülbelül 1millió/ml koncentrációra állítottam be. Ezt követi a fertilizáció négy órán keresztül, 37 fokos hőmérsékleten. A termékenyítő lépést mosási lépés követi HTF médiumban, majd a megtermékenyített petesejteket KSOM tenyésztő médiumba helyeztem. A módszerrel 70-80% termékenyülési arányt sikerült elérni, ami az irodalmi

adatoknál kicsit gyengébb, de használható.

A *Dnmt3b* védősapkával ellátott funkcionális transzkriptumát egér érett oocytákba mikroinjektáltam. Az injektáláshoz a petesejteket szuperovuláltatott egerekből mostam ki, majd hyaluronidáz enzimmel kezeltem, hogy a petesejtekről eltávolítsam a kumulusz sejtek nagy részét. Az mRNS-t kétféle pufferrel mikroinjektáltam az oocytákba (10 mM Tris, 0.15 mM EDTA valamint 5mM Tris 0.1 mM EDTA pH 7.4). Az RNS-t 0.01-0.1 mg/ml koncentrációban szúrtam. Az injektálás során kb. 5 picoliter mennyiséget juttattam be az oocytákba, ahol a petesejt magját sejtetem. Az általam használt módszerrel az oocyták maximum 20%-a élte túl a részben citoplazmáris, részben magi szúrás. Megemlítem hogy 5 pl mennyiség ebben az esetben elég nagy mennyiségnek számít, hagyományos mikroinjektálás során ez csak kb. 1 pl. Ebben az esetben azonban szükség van erre, hogy minél nagyobb valószínűséggel jusson az mRNS a DNS közelébe. A túlélés sem az RNS koncentrációtól, sem a felhasznált puffertől nem függött lényegesen, habár a 0.1 mg/ml koncentráció kisebb túlélést eredményezett a petesejtek számára. Megállapítottam, hogy ebben az állapotban nagyon érzékenyek az oocyták, különösen ha nagy térfogatban és elsősorban citoplazmárisan kapták a szúrás. Az eredményeket kissé javította a hűtött mikroszkópos tárgylemez használata, mely rigidebbé, és ezáltal ellenállóvá tette a petesejteket, ez azonban az in vitro termékenyítési eredményeket befolyásolta negatívan.

A túlélő petesejteket mesterségesen termékenyítettem, mely a szúrt embriók esetében csak 55%-os hatékonyságú volt, szemben a kontrol embriók esetében tapasztaltnal. Az embriókat in vitro körülmények között tenyésztettem hólyagcsíra állapotig KSOM médiumban. A tenyésztés folyamán az embriók további 60%-a pusztult el. Mivel ennek a pusztulásnak nagy része bekövetkezett a 8 sejtes stádium eléréséig, ezért én ezt személy szerint inkább a szúrás következményének tartom, és nem a nagymértékben megzavart DNS metilációnak. Azonban ez utóbbi sem zárható ki. Ilyen korai embriókból azonban nem lehet megfelelő mennyiségű DNS-t tisztítani sem metiláció érzékeny Southern vizsgálatokhoz, sem megbízható biszulfid szekvenáláshoz. Mivel a petesejtek szúrása esetén túl magas volt az embrióveszteség, ezeket az embriókat nem ültettem álvemhes nőstényekbe, hanem úgy döntöttem, hogy a mikroinjektálást a korai egysejtes stádiumban végzem, mely sokkal könnyebben kivitelezhető.

## 2. *A Dnmt3b mRNS mikroinjektálása korai embriókba.*

Mivel az in vitro transzkriptum szúrása érett petesejtekbe nagyon kis hatékonysággal

működött, ezért áttértem a korai embriók mikroinjektálására. A módszer előnye, hogy nem szükséges hozzá IVF procedúra, valamint az embriók sejtmembránja sokkal jobban tűri a mikroinjektálást, mint a petesejteké. Összesen 227 embrió mikroinjektálását végeztem el, amikor még két előmagvat tartalmaztak az embriók. Ebben az esetben közvetlenül az előmagba injektáltam 5 pl RNS-t 0.5 mg/ml koncentrációban. A két előmag összeolvadása után lebomlik a maghártya, ebben a stádiumban is végeztem mikroinjektálást, a citoplazmába. A túlélte embriókat kétésejtes állapotban visszaültettem álvemhes anyák petevezetőibe. Összesen 63 embrió volt alkalmas a beültetésre, melyeket öt álvemhes anyába ültettem. Összesen 12 utódot sikerült nyerni. A megszületett utódok semmilyen fenotipikus jellegükben nem különböztek a normál egerektől. Minden utód termékenynek bizonyult. Mivel a DNS metilációja fontos szerepet tölt be az embrionális fejlődésben, ezért azt vártam, hogy a megszületett utódok között lesznek olyanok, melyek fejlődési hiányokkal küzdenek. Természetesen itt sem zárható ki, hogy csak azok az utódok születtek meg, melyekben nem történt jelentős zavar a DNS metilációban, azonban mivel 12 utód közül mindegyik teljesen normális én ez utóbbi lehetőséget elvettem.

A Dnmt3b a tumorfejlődésben is szerepet játszik, ezért a megszületett állatokat 10 hónapos korukban felboncoltuk. Egyetlen állatnál sem találtunk elváltozásokat. A felboncolt állatok májából DNS tisztítást végeztünk, és metiláció érzékeny southern, valamint bisulfit szekvenálásnak vetettük alá a májmintákat. Mivel a Dnmt3b részt vesz a globális metiláltsági mintázat létrehozásában, többek között a centroméra körüli kis szatellit szekvenciák metilálásában, ezért végeztük el a metiláció érzékeny Southern (leírása később) hibridizációt, próbaként felhasználva az egér kis szatellit szekvenciáját. Mivel az embrionális korban a globális metilációs mintázat újra kialakul, ezért csak nagyon erős hipermetiláltság esetén vártam különbséget az mRNS injektált utód, valamint kontrol társaik között. A kontrol állatokat szintén injektálás során hoztam létre, azonban az injektáláshoz csak az injektáló puffert alkalmaztam RNS mentesen. A kontroll és RNS injektált állatok tehát teljesen azonos módon jöttek létre. A kísérletben a vártnak megfelelően nem tapasztaltam különbséget a metilációs southern mintázatában. Minden állatban, beleértve kontrol csoportot is, erős metiláltságot találtam az adott próbát használva (17).

Mivel a Dnmt3b részt vesz bizonyos anyai valamint apai géneknek a későbbi monoalleles kifejeződésnek megfelelő epigenetikai mintázatának kialakításában, ezért a H19 valamint az Snrpn géneknek különbözőképpen metilált régióit vizsgáltam meg bisulfit szekvenálás segítségével. A bisulfit szekvenálás során a bisulfit kezelés a DNS citozinjait uracillá alakítja, míg a metil-citozint épen hagyja. A módszer során a megfelelő enzimmel (esetünkben hindIII) emésztett DNS

alacsony olvadáspontú agaróz gyöngyökbe ágyazzuk, majd ezt követően az agaróz gyönggyel elvégezzük a biszulfid átalakítást. Mosási lépések után az agaróz gyöngyöt felmelegítjük, és nested PCR reakciót végzünk megfelelően kiválasztott primerekkel. A kapott fragmenteket klónoztam pGem-T easy vektorba, majd megszegvenáltam őket. A szekvenálás után kapott eredmények a 2. ábrán láthatók. A szekvenálás során 3 állatból származó DNS-t szekvenáltam, valamint 3 kontrol állatot. A biszulfid szekvenálás nagyon jó hatékonysággal képes elkülöníteni a citozint a metilált citozintól. Minden egyes állatból 6-10 független klónt elemeztem. A kísérletekhez a következő primereket használtam:

H19OF 5'-GAGTATTTAGGAGGTATAAGAATT-3',

H19OR 5'-ATCAAAAACATAACATAAACCCCT-3',

H19IF 5'-GTAAGGAGATTATGTTTATTTTTGG-3',

H19IR 5'-CCTCATTAAATCCCATAACTAT-3';

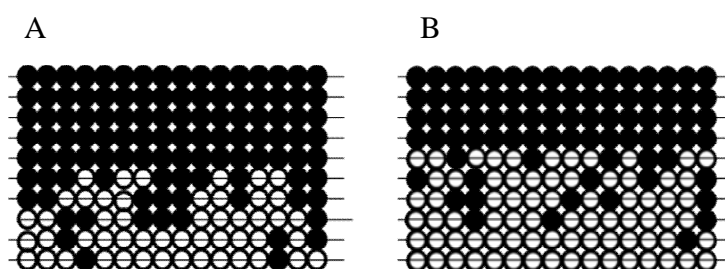
SNRPNOF 5'-TATGTAATATGATATAGTTTAGAAATTAG-3',

SNRPNOR 5'-AATAAACCCAAATCTAAAATATTTTAATC-3',

SNRPNIF 5'-AATTTGTGTGATGTTTGTAAATTATTTGG-3',

SNRPNIR 5'-ATAAAATACACTTTCACTACTAAAATCC-3'.

A kísérletek eredménye alapján elmondható, hogy a H19 gén esetében sikerült elérni kb 15%-kal megnövekedett metilációs szintet. Ez a májban található monoalleles kifejeződését a H19 génnek nem befolyásolta, azonban a 15%-os metilációs különbség a Dnmt3b túltermelésének eredménye. A kísérletek hasonlóan alakultak az 5-ös és 3-as számú állat esetében. A kapott metilációs szint emelkedések a következők 7-es 17%; 5-ös 18%; 3-as 11%.



2. ábra Metilációs mintázat mikroinjektálásból született 7-es, valamint kontrol egér H19 génje esetében. A minták a májból származnak. Minden egyes sor egy külön DNS mintát reprezentál. Minden oszlop egy meghatározott CG hely. A tele körök a metil- citozint, míg az üres körök a nem metilált citozint mutatják. A- mikroinjektálásból született utód, B- kontrol injektálásból született állat

Hasonló vizsgálatokat végeztünk ugyanezek az állatokon az Snrpn gén esetében is. Ott



azonban nem találtunk különbséget az injektált és a nem injektált állatok között. Az eredmények azt mutatják, hogy egyes gének esetében sikerült enyhe hipermetilációt létrehozni. Ez hosszútávon okozhat megemelkedett esélyt tumorok létrehozására. Ennek eldöntésére azonban a kísérleteket speciális genetikai háttéren lenne érdemes megismételni.

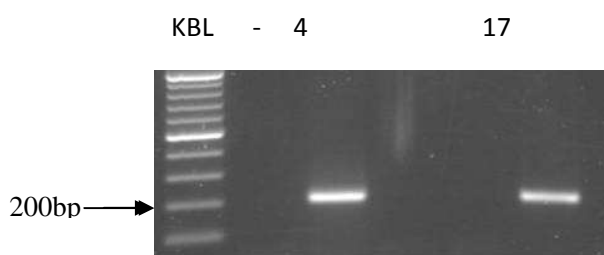
Az örökítő sejtek metilációs mintázatát a H19 valamint az Snrpn géneknél nem vizsgáltuk. Ennek az az oka, hogy az őscsírarsejtek kialakulásakor ismételten törlődik a metilációs mintázat. Ennek újraírásában már nem vehet részt az embrionális korban bejuttatott in vitro transzkriptum. Így az a speciális mintázat, (H19- a spermium teljesen metilált, a petesejt teljes mértékben demetilált; Snrpn- a spermium teljes mértékben demetilált, a petesejt teljes mértékben metilált) amely jellemző erre a két génre biztosan kialakul.

#### *4 A Dnmt3b tetraciklinnel szabályozott génkonstrukció létrehozása*

A korai embrionális túltermeléshez a másik kiválasztott mód a tetraciklinnel regulált Dnmt3b overexpresszió volt. A kísérleti elrendezés az ún. TET-off rendszer volt. Ebben a rendszerben a tetraciklin megvonása hatására indul meg az expresszió. Alapja egy tetraciklin szabályozta transzaktivátor (tTA). Ez a fehérje nem más, mint a tet represszor DNS kötő fehérje és egy erős transzaktivátor fehérjedomén fúziója. Ez a fehérjeegység képes szabályozni minden tetraciklin érzékeny promóterrel indukált fehérje működését. A helyes működéshez tehát két transzgénnek kell együttműködni. Az első transzgén egy széleskörű promóterrel (CMV) szabályozott tTA gén, a második transzgén pedig egy tetraciklin érzékeny promóterrel ellátott célgén, esetünkben a Dnmt3b gén. Tetraciklin hiányában a tTA fehérje kapcsolódik a tetraciklin érzékeny promóterhez, és beindul a Dnmt3b termelése. Tetraciklin jelenlétében a tTA nem képes kapcsolódni a TRE promóterhez, és a célgén inaktív marad. A tetraciklin a rendszerbe itatással juttatható be. A rendszer előnye, hogy a célgén bármikor ki illetve bekapcsolható, hátránya, hogy dupla transzgénikus állat létrehozása szükséges. Szerencsére a CMV-tTA transzgénikus egér könnyen beszerezhető.

A tetraciklin érzékeny promóterrel ellátott Dnmt3b transzgénikus egér létrehozásához az 1. pontban leírt pTRE-Dnmt EcoRI-HindIII fragmentet használtam. A fragment ragadós végét eltávolítottam (bluntoltam), majd a Clontech pTRE-tight vektorába SmaI helyre átklónoztam. A megfelelő orientációt XhoI emésztéssel ellenőriztem. A pTRE-tight vektor tartalmaz egy tetraciklin érzékeny promótert, valamint az SV40-ből származó poly-A szignált. A létrehozott

konstrukció linearizálás után alkalmas transzgenikus állatok létrehozására. A plazmid linearizálását BciVI enzimmel végeztem. Ez az enzim kivág egy kb 5.5 kb hosszúságú fragmentet a pTRE-Dnmt3b plazmidból, mely hordozza a tetraciklin érzékeny promótert, a Dnmt3b cDNS-t a CPE motívumok nélkül, valamint egy SV40 poly-A szekvenciát. A mikroinjektáló fragmentet Qiaquick fragment tisztító kittel tisztítottam agaróz gélelektroforézist követően. A mikroinjektáló oldat (7mM tris 0.15 mM EDTA) koncentrációját 2-3 ng/mikroliter koncentrációra állítottam be. FVBN egerket szuperovuláltattam, majd azokból egysejtes állapotú zigótákat mostam ki. A zigóták apai előmagját a fent leírt konstrukcióval mikroinjektáltam. A mikroinjektálást túlélő 137 embriót 10 álvemhes anyába ültettem vissza. Összesen 44 élő utódot kaptam. Az utódokat a humán Dnmt3b cDNS-re specifikus PCR segítségével teszteltem le. Az utódok közül kettő (#4, #17) bizonyult PCR pozitívnak (3.ábra)



3. ábra Az alapító egyedek tesztelése PCR segítségével. 4, 17,- a pozitív egerek. KBL-kilobázisos létra, -K negatív egér kontrol.

A kísérletek során az alábbi primer párokat használtam a tesztelésre:

testF: GATCTTTGGCTTTCCTGTGC

testR: ATGCCTTCAGGAATCACACC

A primer párok a 3. ábrán látható 215 bp hosszúságú specifikus fragmentet szaporítják fel.

A transzgen jelenlétét ezt követően Southern hibridizációval ellenőriztem le az alapító egyedekben. (4. ábra). Az alapító egyedekből genomi DNS-t izoláltam, SacI enzimmel emésztettem, majd a DNS mintákat gélelektroforézist követően Hybond-N+ membránra rögzítettem. Ezt követően a fent leírt primerekkel létrehozott 215 bp hosszúságú DNS szakasszal hibridizáltam a membránt, a Sigma PerfectHyb+ oldatával, az előírásoknak megfelelően. A hibridizációban egy 900 bp. hosszúságú fragmentet vártam. A hibridizáció megerősítette a PCR eredményét. A két pozitív utódot így valódi alapítónak tekinthetjük.



4. ábra A pozitív állatok kiválasztása Southern hibridizációval. A zsebek fölött az alapítók száma, -K negatív egér kontrol, +K plazmid kontrol

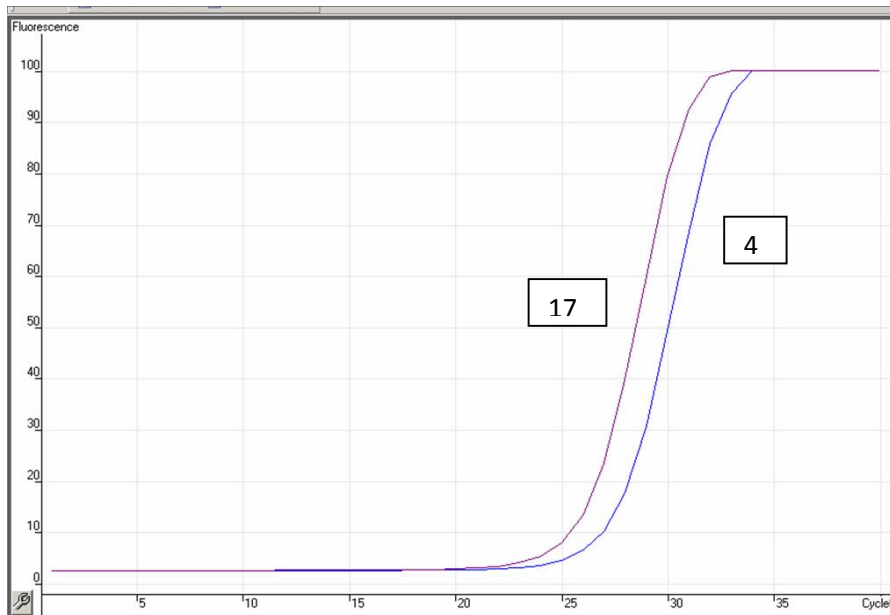
Az alapító egyedeket ezután kereszteztem vad típusú FVBN egerekkel, majd a fent leírt PCR segítségével kiválogattam a pozitív utódokat. Mindkét vonal esetében az utódok körülbelül 50% volt transzgénikus, mely arra utal hogy az alapító egyed nem volt mozaikos beépülésű, valamint hogy az integráció valószínűleg egy integrációs helyre történt meg. A kapott F1 generáció hemizigóta egyedeivel testvérpároztatás után létrehoztam az F2 populációt, melyből slot blot hibridizációval kiválogattam a homozigóta jelölteket. A homozigóta jelölteket ezt követően visszakereszteztem tesztkereszteszés céljából vad egerekkel. Abban az esetben ha a teszt PCR szerint minden utód pozitív, akkor a tesztelt szülő valóban homozigóta volt. A homozigóta vonalat ezt követően homozigóta testvérkereszteszéssel szaporítottam tovább.

A két transzgénikus hemizigóta vonalban meghatároztam a kópiaszámot kvantitatív Real-Time PCR segítségével. A kópiaszám meghatározáshoz az Applied Biosystems Power Sybr green master mixét használtam. A kísérletet az alábbi primerekkel végeztem:

QdnmtF: CCCATTCGAGTCCTGTCATT

QdnmtR: GGTTC AACAGCAATGGACT

A felsokszorozott szakasz 120 bp hosszúságú. A kópiaszám meghatározáshoz az injektált fragment hígítási sorát készítettem el genomi háttér felhasználásával. Majd az 1,2,3,4, 5,10,20 kópiaszám hígítások mellett, megfuttattam a két hemizigóta vonal DNS-ét tartalmazó mintát. A vizsgálatokat a Corbet Research RotorGene 3000 gépen végeztem el. A vizsgálatok eredményét az 5. ábra mutatja.



5. ábra. Kópiaszámmeghatározás kvantitatív Real TimePCR módszerrel. X tengelyen a ciklusszám, Y tengelyen a relatív fluoreszcencia látható. A 17-es és a 4-es minta között pontosan 1 Ct érték különbség van, mely egy ciklust azaz kétszeres különbséget jelent.

Mivel a Real-time PCR-ben a 4-es és 17-es minta között pontosan kétszeres különbség van, valamint a 4-es vonal megfelel a 4 kópiának (az ábrán az egyszerű értelmezés miatt nincs jelölve a hígítási sor), ezért figyelembe véve a hígításnál számítható pontatlanságokat, a 4-es vonal kb 2-4, míg a 17-es vonal 8-10 kópiaszámúnak bizonyult.

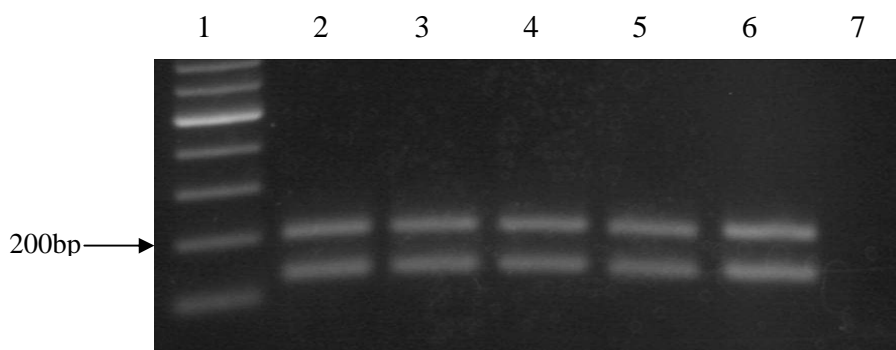
#### 5. A dupla transzgénikus vonal létrehozása

Az általam létrehozott homozigóta transzgénikus vonalat a CMV promóterrel szabályozott tTA homozigóta transzgénikus egérvonallal kereszteztem. Ezt az egérvonalat C. Walsh bocsátotta rendelkezésemre. A két egér keresztezéséből létrejött dupla heterozigóta egyedekből, a már fent leírt módszer segítségével dupla homozigóta állatokat nyertem. A dupla homozigóta jelöltek vad típusú egérrel keresztezett utódait multiplex PCR segítségével azonosítottam, és így választottam ki a megfelelő homozigóta egyedeket. A multiplex reakcióban a fent használt testF és tesR primereket használtam, valamint a CMV specifikus primerpárokat, melyek a következők

cmvtestF: CAAGTACGCCCCCTATTGAC

cmvtestR: TATCCACGCCCATGATGTA

A PCR reakció eredményeként egy 163 bp hosszúságú fragmentet kaptam, valamint a már fent jellemzett 215bp hosszúságú szakaszt. A 6. ábrán látható egy dupla transzgenikus homozigóta egér utódainak PCR vizsgálata. Ha az egér dupla homozigóta, minden utódának PCR pozitívnak kell lennie.



6. ábra A dupla transzgenikus homozigóta egér utódainak tesztelése. 1. csatorna DNS létra; 2-6 utódok DNS mintája,; 7- kontrol egér DNS

#### 6. A dupla transzgenikus egérvonalak vizsgálata

A dupla transzgenikus egerekben a transzgen aktivációja után lehet elvégezni a megfelelő molekuláris vizsgálatokat. A transzgen aktivációját a tetraciklin itatás megvonásával érhetjük el. A tetraciklint (doxycycline formában) 0,05 mg/ml koncentrációban kevertük az ivóvízbe 5% szacharóz jelenlétében. A tetraciklin megvonást követően vizsgáltuk a Dnmt3b expresszióját a transzgenikus egerekben. A két vonal közül csak az egyikben sikerült expressziót elérni, az alacsonyabb kópiaszámú 4-es vonalban. A másik vonalban három hét tetraciklin megvonást követően sem sikerült RNS szinten detektálni a transzgent. A 4-es vonalban RNS szinten az expressziót RT-PCR, valamint kvantitatív RT-PCR módszerekkel vizsgáltuk. A 4-es vonal minden vizsgált szövete (agy, szív, tüdő, máj, lép, vese, izom, gonádok) expresszálta a transzgent indukció hatására. Az indukciót követően az expresszió három nap múlva jelent meg először mérhetően, majd a 8. napon elérte a maximális expressziós szintet. A kifejeződés azonban minden esetben nagyon gyengének bizonyult. A legerősebb a májban volt, ahol a transzgen expressziója csupán 5%-a az endogén expresszióknak, melyet az egér blasztocisztában lehet mérni (18). A mennyiségi meghatározást kvantitatív real time PCR módszerrel végeztük, Power Cybergreen kitet használva.

Az összehasonlításban belső kontrollnak a Hprt1 génjét választottam. Az RT valamint Realtime PCR vizsgálatokban az alábbi humán Dnmt3b primereket használtam a detektáláshoz:

DnmthrtF: CCCATTCGAGTCCTGTCATT

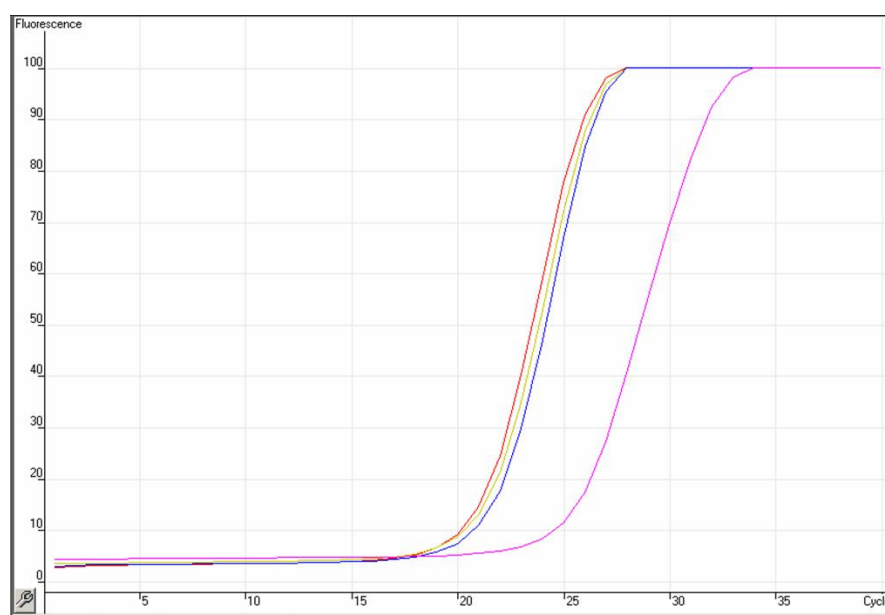
DnmthrtR: GGTTC AACAGCAATGGACT

Az egér endogén Dnmt3b primerek a következők:

dnmtmrtF: GCATGAAGGCCAGATCAAAT

dnmtmrtR: GCTTCCACCAATCACCAAGT

Az egér referenciagénnek a Hprt1 gént választottam. A használt primereket lásd (19). A 4-es vonal májának kvantitatív Real-time PCR vizsgálata a 7. ábrán látható. A vizsgálatok során egyrészt mivel cDNS konstrukcióról van szó, másrészt mivel kvantitatív real-time PCR-t használtam, az RNS-eket mindig Dnáz kezeltem. A cDNS első szálát az Applied Biosystems high capacity cDNS RT kitjével írtam. A képen is jól látható a humán Dnmt3b nagyon alacsony expressziója. A Rotorgene 6 software deltadeltaCT analízise szerint az expresszió mértéke a transzgénikus állatban az említett 5% az endogén génhez viszonyítva. Ez nagyon kevésnek tűnik RNS szinten, mely valószínűleg nem befolyásolja jelentősen a metilációs mintázatot.



7. ábra A homozigóta 4-es vonal májának kvantitatív Real-time PCR vizsgálata. X tengelyen a ciklusszám, Y tengelyen a relatív fluoreszcencia látható. Piros görbe- kontrol blasztociszta hprt1 gén; kék görbe kontrol blasztociszta egér Dnmt3b gén; sárga görbe transzgénikus máj hprt1 gén; lila görbe- transzgénikus máj humán Dnmt3b

A Dnmt3b expressziót fehérje szinten Western hibridizációval vizsgáltuk a transzgénikus vonalakban (8. ábra). A használt humán specifikus ellenanyagot C. Walsh bocsátotta rendelkezésemre. Ez az ellenanyag sajnos nem alkalmas immunhisztológiai vizsgálatokra, csak western hibridizációra. A kereskedelemben kapható általam ismert Dnmt3b ellenanyagok mind keresztreagálnak az egérrel, emiatt használtam ezt a kecskében termeltetett poliklonális ellenanyagot. A másodlagos ellenanyag anti-goat-IgG-Hprt volt. Az immunjelölés után a detektálást az Amersham ECL-plus reagensével végeztem.



8. ábra A Dnmt3b expresszió fehérje szintű detektálása Western hibridizációval a transzgénikus egérvonalakban. –K jelöli a negatív egerekből származó mintákat, 17 illetve 4 jelöli a megfelelő transzgénikus vonalaktól származó mintákat. Pozitív kontrollként transzfektált egér fibroblasztok mintája található.

A nyolcas ábrán látható, hogy fehérje szinten kizárólag a homozigóta 4.-es vonalban sikerült detektálni a transzgént, de ott is nagyon gyengén expresszált. Ezek az eredmények egybevágnak a kvantitatív RT PCR eredményekkel. A western hibridizáció során nem azonos mennyiségű fehérjét vittem fel az SDS-PAGE gélre, a transzgénikus vonalak esetében ez kétszeres mennyiségű azaz 15 mikrogramm volt, a többi minta esetében csak 7 mikrogramm! A 17-es vonal esetében az expresszió hiányát valószínűleg a nem megfelelő helyre történő integráció okozhatta. Mivel a hagyományos transzgenezis esetében a beépülés helye nem irányítható, ez gyakori probléma transzgénikus állatok esetében. A négyes vonal expressziójának magyarázata sokkal nehezebb kérdés. Természetesen itt is felvetődik az a lehetőség, hogy az integrációs hely környéke befolyásolja a transzgén kifejeződését. Ennek az eldöntésére érdemes lenne meghatározni az integrációs helyet, melyre legegyszerűbb módszer az inverz PCR módszere. Mivel a teljes egér genom ismert, ezért egérben ez megoldható. A transzgént pont azért terveztem irányíthatónak, hogy megfelelő expressziót kapjak. Egy másik lehetséges magyarázat az alacsony expressziós szintre talán a cDNS konstrukció mibenléte. Csak cDNS-t tartalmazó konstrukciók esetében előfordul az elégtelen mértékű megjelenés. Ebben az esetben egy mesterséges intron beiktatásával lehet emelni az expresszió mértékét. (20). Decemberében jelent meg egy cikk ahol a Dnmt3b-t

sikerült először túltermelni in vivo transzgenikus állatokban (21). Ebben az esetben is csak cDNS konstrukciókat alkalmaztak, azonban az ő esetükben nemcsak tetraciklinnel szabályozott volt az expresszió, hanem a transzgént meghatározott lokuszra (*col1a1*) célzottan vitték be. Erre nyilvánvalóan azért volt szükség, mert egyszerűbb módon nem kaptak megfelelő expressziós szintet. Vizsgálataik során ők ezt a célzott helyre beépített irányítható transzgént átkeresztették egy olyan mutáns egértörzsbe, melyben a tumor szupresszor APC gén domináns mutációja található. Ezek az egerek fokozottan képeznek adenomákat, elsősorban a bélrendszerben. Megfelelő modelljei a bélrendszerben előforduló tumorok kialakulásának vizsgálatához. Jaenisch és munkatársai csak ezen a genetikai háttéren tudták kimutatni a *Dnmt3b* túltermelésének hatását! A tumorokban hipermetilált állapot alakult ki a H19 és az *Sfrp* géneknél.

#### *7. A Dnmt3b szabályozott termelésének hatása a metilációs mintázatra*

Habár a 4-es transzgenikus vonalban is csak alacsony expressziót találtam, elvégeztem a metilációs vizsgálatokat. A transzgént több időpontban aktiváltam. Egyrészt a korai embrionális korban, amikor először kialakul a szervezet megfelelő metilációs mintázata, valamint folyamatosan expresszióra bírtam a transzgént. Mivel alacsony mértékű volt az expresszió, kíváncsi voltam, hogy folyamatos alacsony túltermelés okoz-e bármiféle zavart?

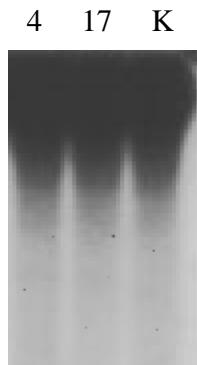
Az első vizsgálatban a korai embrionális korban bekapcsolódó transzgén hatását néztem a globális metiláltsági szint megváltoztatására. A vizsgálatokat metiláció érzékeny Southern hibridizációval végeztem el. A metiláció érzékeny southern hibridizáció során egy metilációra érzékeny restriktív enzimmel (esetünkben *HpaII*) emésztjük a genomot, majd megfelelő próbával hibridizálunk. Mivel én elsősorban globális metiláltsági mintázatban kerestem különbségeket, ezért a globális metiláltságot jelző kis szatellit szekvenciát használtam próbaként. A southern eredményeként hipometiláltság esetén a kapott jel erősen eltolódik a kisebb méretű fragmentek irányába, hipermetiláltság esetén azonban a magas fragmenteknél tapasztalható kompakt jelet kapunk eredményként. A kísérletnél az alábbi primereket használtam a próbakészítéshez:

SatF: TTGGAAACGGGATTTGTAG

SatR: CAGTGTGGTTTTATCATTTC

A próba mérete 166-189 bp hosszúságú, mivel ismétlődő szekvenciát sokszorozunk fel.

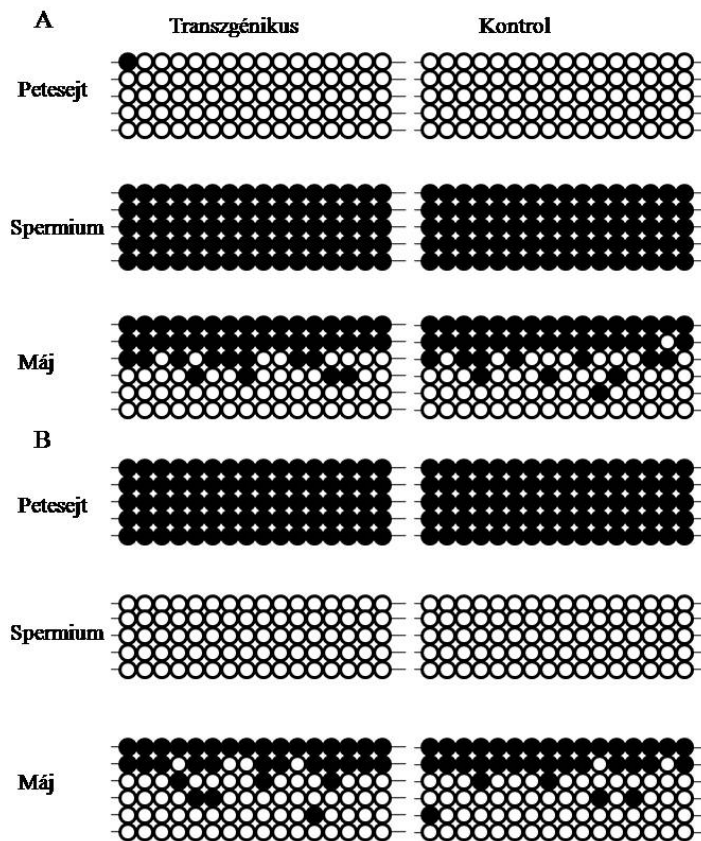




9. ábra Metiláció érzékeny Southern hibridizációs vizsgálat. A számok a megfelelő transzgénikus vonalból származó DNS-t, míg K a kontrol állatból származó DNS-t jelöli

A 9. ábra mutatja a két transzgénikus vonalban az embrionális korban bekapcsolt blasztociszta állapotú embriókból származó DNS minta képét. A 17-es vonalat is használtam a kísérletben mint nem expresszáló kontrol. Mint az ábra is mutatja, sajnos nem sikerült globális szinten megemelni a metiláció szintet. Minden minta hasonlóan viselkedett. Ez az ismert expressziós adatok alapján azonban nem olyan meglepő. Ez a kis méretű expresszió növekedés a 4-es vonalban sem befolyásolta a globális metilációs mintázatot. A kísérletet megismételtem felnőtt állatok esetében ahol a májból származó DNS mintákat vizsgáltam. Itt sem találtam különbséget egyik állatnál sem a kontrolhoz képest.

A vizsgálatokat ezt követően két meghatározott génen vizsgáltuk tovább, melyek monoalléles kifejeződést mutatnak. Ez a két kiválasztott gén a H19 és az Snrpn voltak. A vizsgálatokat a transzgén folyamatos aktiválása mellett végeztem. A különbözőképpen metilált régiókat a feljebb ismertetett bisulfit szekvenálással vizsgáltam. A 10. ábrán látható, hogy a kontroll és transzgénikus állatok esetében nem lehet kimutatni különbséget sem a májban, sem az ivarsejtekben. Mindkét esetben a kontrolhoz hasonlóan megfelelőképpen alakul ki az apai (H19) valamint anyai (Snrpn) imrinting (22).



10. ábra Metilációs mintázat transzgénikus, valamint kontrol egér H19 (A) és Snrpn (B) génje esetében. Minden egyes sor egy külön DNS mintát reprezentál. Minden oszlop egy meghatározott CG hely. A tele körök a metil- citozint, míg az üres körök a nem metilált citozint mutatják.

A Jaenisch és munkatársai által létrehozott egérben normál szövetekben hasonló változást tapasztaltak, azaz sem a H19 sem az Snrpn gén metilációs mintázata nem változott lényegesen. Tumoros szövetekben azonban többek között a H19 gén metilációs mintázata jelentősen megváltozik. Mivel a transzgén nagyon alacsony mértékben termeli a transzgént, más specifikus génekre kiterjesztve a vizsgálatot sem várhatnánk más eredményt.

A transzgénikus eredmények sajnos az alacsony expresszió miatt nem alkalmasak a publikálásra, a hipermetiláció a mikroinjektált RNS hatására azonban ígéretes eredmény. Szeretném megismételni azonban a fent jellemzett APC mutáns egéren a vizsgálatot.

## Összefoglalás:

Kísérleteim során a Dnmt3b DNS metiltransferázt próbáltam túltermeltetni transzgénikus egérmodellben. A túltermelést szabályozott módon, tetraciklin regulációval, illetve a megfelelő Dnmt3b funkcionális mRNS szabályozott időpontban történő mikroinjektálásával próbáltam elérni. A gén megjelenésének időpontját úgy választottam meg, hogy az lehetőség szerint megzavarja a korai embrionális korban történő metilációs mintázat kialakulását. A kísérletekben a Dnmt3b nem tartalmazta az un. CPE motívumot, így lehetősége van a fehérjének közvetlenül hatni a korai embrionális korban is. A létrehozott transzgénikus egér szabályozott módon, de nagyon alacsony mértékben expresszálta a transzgént. Így nem volt kimutatható szerepe a DNS metilációra sem globális szinten, sem a H19 és Snrpn gének esetében. A mikroinjektált RNS esetében sem sikerült a kis szatellit szekvenciák metiláltságában különbséget találni, azonban a H19 gén megfelelő régiójában enyhe hipermetiláció alakult ki a felnőtt állatok májában.

## Irodalomjegyzék:

1. Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V.  
Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases.  
J Mol Biol. 1988 Oct 20;203(4):971-83.
2. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family.  
Gene. 1999 Aug 5;236(1):87-95.
3. Okano M, Xie S, Li E.  
Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases.  
Nat Genet. 1998 Jul;19(3):219-20.
4. Jeltsch A, Nellen W, Lyko F.  
Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases.  
Trends Biochem Sci. 2006 Jun;31(6):306-8. Epub 2006 May 6.
5. Rai K, Chidester S, Zavala CV, Manos EJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR.  
Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish.  
Genes Dev. 2007 Feb 1;21(3):261-6.

6. Yoder JA, Soman NS, Verdine GL, Bestor TH.  
DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe.  
J Mol Biol. 1997 Jul 18;270(3):385-95.
7. Li E, Bestor TH, Jaenisch R.  
Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.  
Cell. 1992 Jun 12;69(6):915-26.
8. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E.  
DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.  
Cell. 1999 Oct 29;99(3):247-57.
9. Tsumura A, Hayakawa T, Kumaki Y, Takebayashi S, Sakaue M, Matsuoka C, Shimotohno K, Ishikawa F, Li E, Ueda HR, Nakayama J, Okano M.  
Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b.  
Genes Cells. 2006 Jul;11(7):805-14.
10. Maraschio P, Zuffardi O, Dalla Fior T, Tiepolo L.  
Immunodeficiency, centromeric heterochromatin instability of chromosomes 1, 9, and 16, and facial anomalies: the ICF syndrome.  
J Med Genet. 1988 Mar;25(3):173-80.
11. Ramsahoye BH, Binizkiewicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R.  
Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 May 9;97(10):5237-42.
12. Reik W, Dean W, Walter J  
Epigenetic reprogramming in mammalian development.  
Science. 2001 Aug 10;293(5532):1089-93.
13. La Salle S, Oakes CC, Neaga OR, Bourc'his D, Bestor TH, Trasler JM.  
Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L  
BMC Dev Biol. 2007 Sep 18;7:104.
14. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA.  
The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors.  
Nucleic Acids Res. 1999 Jun 1;27(11):2291-8.
15. Carlson LL, Page AW, Bestor TH.  
Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos:

implications for genomic imprinting.  
Genes Dev. 1992 Dec;6(12B):2536-41.

16. Lees-Murdock DJ, McLoughlin GA, McDaid JR, Quinn LM, O'Doherty A, Hiripi L, Hack CJ, Walsh CP.

Identification of 11 pseudogenes in the DNA methyltransferase gene family in rodents and humans and implications for the functional loci. Genomics. 2004 Jul;84(1):193-204.

17. Oka M, Rodić N, Graddy J, Chang LJ, Terada N.

CpG sites preferentially methylated by Dnmt3a in vivo. J Biol Chem. 2006 Apr 14;281(15):9901-8. Epub 2006 Jan 26.

18. Watanabe D, Suetake I, Tajima S, Hanaoka K.

Expression of Dnmt3b in mouse hematopoietic progenitor cells and spermatogonia at specific stages.

Gene Expr Patterns. 2004 Nov;5(1):43-9.

19. Mamo S, Gal AB, Bodo S, Dinnyes A.

Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro.

BMC Dev Biol. 2007 Mar 6;7:14.

20. Palmiter RD, Sandgren EP, Avarbock MR, Allen DD, Brinster RL.

Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jan 15;88(2):478-82.

21. Linhart HG, Lin H, Yamada Y, Moran E, Steine EJ, Gokhale S, Lo G, Cantu E, Ehrich M, He T, Meissner A, Jaenisch R.

Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. Genes Dev.

2007 Dec 1;21(23):3110-22.

22. Li JY, Lees-Murdock DJ, Xu GL, Walsh CP.

Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse.

Genomics. 2004 Dec;84(6):952-60.