

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

EPIGENETIČKO PROGRAMIRANJE GAMETA U ŽIVOTINJA

EPIGENETIC PROGRAMMING IN ANIMAL GAMETES

SEMINARSKI RAD

Iva Sošić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: Prof.dr.sc. Gordana Lacković-Venturin

Zagreb, 2017.

SADRŽAJ:

1. UVOD	2
2. EPIGENETIČKO PROGRAMIRANJE GAMETA SISAVACA	3
2.1. Metilacija DNA u sisavaca	3
2.2. Mehanizmi uspostavljanja i održavanja DNA metilacije	5
2.3. Veza metilacije s histonskim modifikacijama	8
2.4. Uloga transkripcije i RNA	9
3. EPIGENETIČKO NASLJEĐIVANJE KROZ GAMETE SISAVACA	10
4. ZAKLJUČAK	11
5. LITERATURA	12
6. SAŽETAK	13
7. SUMMARY	14

1. UVOD

Tijekom procesa stvaranja gameta koje će biti sposobne stvoriti novi organizam, odvijaju se složene epigenetičke promjene. Epigenetički uzorci koji su se uspostavili tijekom razvoja embrija su stabilni u somatskim stanicama odrasle jedinke, ali se reprogramiraju u germinativnoj liniji kako bi se zajamčila pluripotentnost budućih preimplantacijskih embrija (Wei i sur. 2015). Za proces je ključna metilacija DNA, koja je stabilna oznaka utišanih gena, a uz nju se pojavljuju i različite histonske varijante i modifikacije (Heard i sur. 2014). Primordijalne germinativne stanice (PGS) stvorene u razvoju embrija imaju sebi svojstvene epigenetske obrasce koje je potrebno izbrisati da bi bila moguća *de novo* uspostava metilacijskih obrazaca DNA karakterističnih za muške i ženske gamete. Nakon oplodnje, slijedi novi val DNA demetilacije poseban za muški i ženski genom, koji će omogućiti *de novo* metilaciju specifičnu za vrstu stanice koja će nastati diferencijacijom. Postfertilizacijska demetilacija neće obuhvatiti spolno-specifične utisnute (eng. *imprinted*) gene što će rezultirati spolno-specifičnom ekspresijom (Smallwood i sur. 2012b).

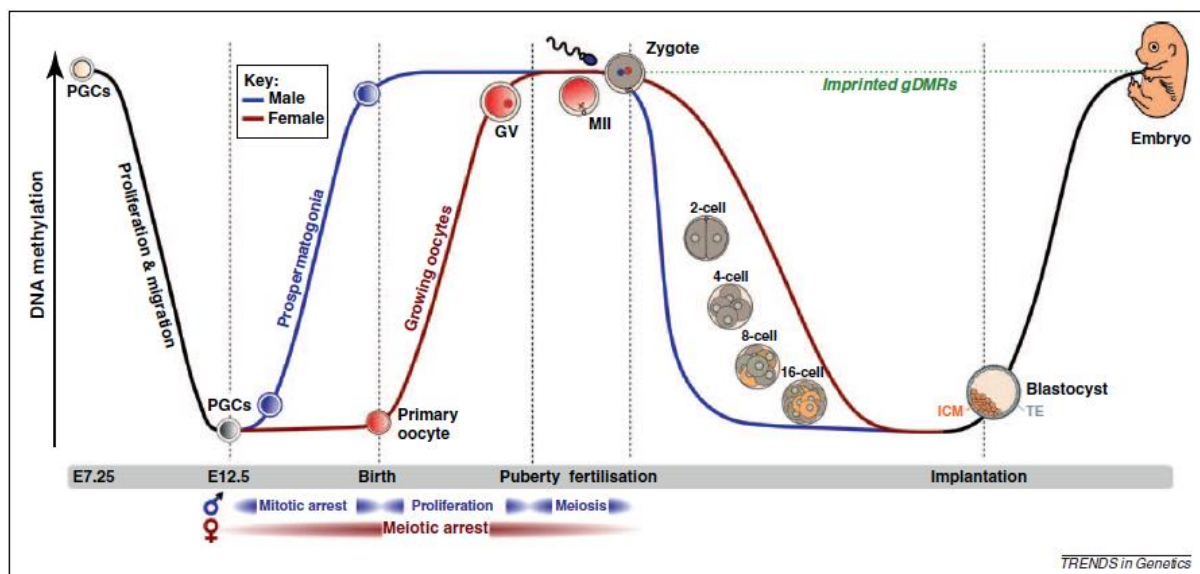
Važno je naglasiti da epigenetički obrasci u gametama mogu biti okolišno promijenjeni te da su zabilježeni brojni slučajevi transgeneracijskog nasljeđivanja takvih epimutacija, unatoč tome što reprogramiranje između generacija predstavlja najveću barijeru sustavu epigenetičkog nasljeđivanja (Wei i sur. 2015).

2. EPIGENETIČKO PROGRAMIRANJE GAMETA SISAVACA

Budući da su majčinski i očinski genomi različito programirani, oba su nužna za razvoj embrija. Te funkcionalne razlike su prisutne zbog diferencijalne ekspresije majčinskih i očinskih alela utisnutih gena tijekom razvitka. Primjerice, u muških spolnih stanica za vrijeme embriogeneze aleli gena H19 i Rasgrf1 su metilirani u 5' uzvodnoj regiji. Kod ženki, geni Igfr2 i Snprn dobivaju utiske u oociti. Navedeni geni su diferencijalno metilirane regije (DMR), a njihove delecije dovode do gubitka utiskivanja. Metilacijski obrasci utisnutih gena održavaju se u somatskim tkivima kroz razvoj embrija, ali će biti obrisani u primordijalnim germinativnim stanicama (Li 2002).

2.1. Metilacija DNA u sisavaca

Metilacija DNA je ključna epigenetička oznaka za uspostavljanje genskih utisaka (Slika 1.) u sisavaca (Li 2002). Epigenetičke oznake služe za regulaciju genske ekspresije. Tako je metilacija DNA promotora uglavnom povezana s transkripcijskim utišavanjem. Kako bi se održalo diferencirano stanje stanice, ključno je da ove oznake ostaju sačuvane prilikom diobe stanica (Smallwood i sur. 2012b).



Slika 1. DNA metilacija se mijenja epigenetičkim reprogramiranjem za vrijeme razvoja embrija. PGS se javljaju u embriju oko 7. dana te se tijekom njihove migracije u genitalne nabore globalno briše DNA metilacija (crna linija). Nakon determinacije spola, u prekursorima germinativnih stanica uspostavlja se novi DNA metilacijski pejzaž koji je karakterističan za određeni spol. U muških embrija (plava linija) *de novo* metilacija se dešava prije mejoze, u spermatogonijama zaustavljenim u mitozu i dovršava prije rođenja. U ženskim embrijima (crvena linija) primarne oocite ulaze u mejozu i zaustavljaju se u fazi diplotena. Metilacijski uzorak je uspostavljen nakon rođenja u folikularnoj fazi rasta oocite zaustavljene u profazi I mejoze. Poslije oplodnje dolazi do novog vala demetilacije, aktivno u očinskom i pasivno u majčinskom genomu. To ne uključuje utisnute gDMR (zeleno linija) što rezultira roditeljski-specifično metiliranim alelima u ranom embriju. Pri implantaciji blastociste i determinaciji staničnih linija uspostavlja se novi metilacijski pejzaž vezan za staničnu diferencijaciju (Smallwood i sur. 2012b).

Različiti slijedovi mogu biti mete *de novo* metilacije DNA. U sisavaca su to gotovo uvijek CpG dinukleotidi. Oni su malo zastupljeni i izolirani u genomu te u pravilu metilirani, ali u specifičnim regijama mogu biti prisutni u velikoj gustoći, tvoreći tako CpG otoke (eng. CGI = CG *islands*) koji se često nalaze na promotorskim mjestima i pretežno su nemetilirani. Međutim, postoje i metilirani CpG otoci kod kojih postoji velika razlika u metilaciji između ženki i mužjaka (900 specifično metiliranih regija u oocitama i 60 u spermijima). Među njima se nalazi mali broj utisnutih gDMR (DMR germinativne linije) koji kontroliraju specifičnu monoalelnu ekspresiju utisnutih gena. Budući da se tijekom replikacije DNA metilacija ponovno uspostavlja samo na CpG mjestima gdje je DNA metiltransferaza DNMT1 aktivna, metilacija utisnutih gDMR se poslije oplodnje održava kao cjeloživotna memorija roditeljskog porijekla alela u novoj generaciji (Smallwood i sur. 2012b).

Međutim, većina metiliranih CpG otoka u germinativnim stanicama nije utisnuta gDMR, a biološka funkcija takvih otoka je nepoznata. Do sada je potvrđeno da metilacija CpG otoka nije potpuno vezana za utiskivanje nego je snažan faktor i u određivanju metilacijskog statusa u preimplatacijskim embrijima (Smallwood i sur. 2012a). Također, mnogi ne-utisnuti CpG otoci metilirani u oocitama poslije oplodnje zadržavaju znatan stupanj metilacije, što bi moglo utjecati na razinu ekspresije pridruženih gena te na ranu specifikaciju staničnih linija (Smallwood i sur. 2012b).

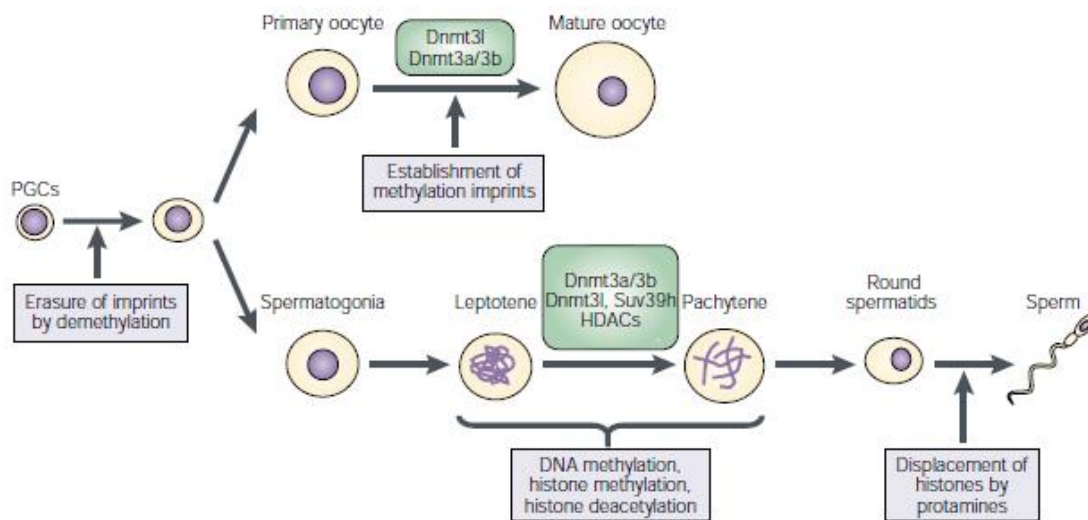
2.2. Mehanizmi uspostavljanja i održavanja DNA metilacije

Smatra se da ne postoji univerzalni mehanizam *de novo* DNA metilacije budući da su pojedini faktori potrebni za metilaciju određenih utisnutih gDMR, ali ne i ostalih. Proces obuhvaća potpunu metilaciju stotine CpG dinukleotida utisnutih gDMR ili CpG otoka. Središnju ulogu imaju članovi DNMT3 obitelji. DNMT3A i DNMT3B su aktivni enzimi s kojima DNMT3L, unatoč tome što nema katalitičku domenu, stupa u interakciju djelujući kao kofaktor koji potiče njihove metiltransferazne aktivnosti. Sva tri proteina su eksprimirana u jezgrama muških i ženskih germinativnih stanica, ali su u oocitama samo DNMT3A i DNMT3L uključeni u metilaciju utisnutih gDMR i CpG otoka te RE (repetitivnih elemenata) (Smallwood i sur. 2012b). Oocyte DNMT3L- deficijernih ženki ne mogu uspostaviti majčinski specifične metilacijske utiske što rezultira gubitkom monoalelne ekspresije majčinski utisnutih gena. Embriji nastali iz takvih oocita imaju poremećen razvoj te umiru sredinom gestacije što dokazuje da metilacijski utisci dobiveni tijekom sazrijevanja oocite služe kao majčinski genomske utisci (Li 2002).

U muškoj liniji i DNMT3B ima važnu ulogu – metilaciju gDMR utisnutog lokusa *Rasgrf1* i RE (Smallwood i sur. 2012b). Ekspresija velikog broja gena koji upravljaju napretkom spermatogeneze i održavaju identitet spermatogenih staničnih tipova regulirana je DNA metilacijom. Tako DNMT3A-deficijentan miš ima abnormalne spermatocite u profazi mejoze i daje malo zrelih spermija, dok DNMT3L-deficijentan miš uopće nema zrelih spermija jer se spermatogeneza zaustavlja kad spermatocite ulaze u mejozu (Li 2002). Miš deficijentan za histonske metiltransferaze *Suv39h1* i *Suv39h2* je također sterilan, ali zbog mejotskog aresta koji se dogodi u pahitenu zbog otežanog sparivanja homolognih kromosoma (Li 2002).

Primjećeno je da se vrijeme DNA metilacije i metilacije histona H3-K9 tijekom spermatogeneze podudara sa deacetilacijom histona. Sržni histoni su hiperacetilirani u spermatogonijama i pre-leptotnim spermatocitama, ali ne i u spermatocitama u leptotenu i

pahitenu kao ni u većini spermataida što indicira da DNA metilacija i modifikacije histona suprimiraju globalnu ekspresiju gena dok su spermatocite u mejozi (Slika 2.). Međutim, moguće je i da modifikacije histona imaju ulogu u reguliranju kromosomske arhitekture koja se dinamično mijenja u spermatogenezi (Li 2002).



Slika 2. Epigenetičko reprogramiranje tijekom gametogeneze (Li 2002).

Postfertilizacijski se genom mužjaka aktivno demetilira oksidacijom 5mC u 5hmC pomoću Tet proteina. Potencijalna uloga 5hmC je i pozitivna regulacija gena u diferencijaciji tijekom spermatogeneze. No, ne može se sa sigurnošću reći je li 5hmC samo nusprodukt propusne demetilacije ili je zaista marker aktivacije transkripcije koji regrutira proteinske partnere.

S druge strane, majčinski se genom demetilira pasivno tako što se metilacija gubi svakom diobom stanice jer se tijekom replikacije ne održava metilacija (Smallwood i sur. 2012b).

Utisnuti lokusi se reprogramiraju u germinativnoj liniji, ali se u postzigotnoj fazi odupiru globalnoj demetilaciji. Postoje mehanizmi koji zadržavaju DNA metilaciju kontrolnih regija utisaka – ICR (eng. *imprint control regions*) usprkos globalnoj demetilaciji tako što pomoću majčinskog faktora PGC7 sprečavaju demetilaciju vezanjem H3K9me2 i blokiranjem spomenutih Tet3 enzima (Heard i sur. 2014, Wei i sur. 2015). Ključnu ulogu u postfertilizacijskom održavanju metiliranosti ima i DNA vezujući faktor ZFP57 s KAP1/Trim28 proteinima i H3K9me3 (Heard i sur. 2014).

ZFP57 je član proteinske obitelji KRAB cinkovih prstiju koji osim u postfertilizacijskom održavanju metilacije, ima ulogu i u uspostavljanju *de novo* DNA metilacije gDMR utisnutih Snrpn gena u gametama. KRAB proteini su DNA vezujući transkripcijski represori koji

stupaju u interakciju s KAP1 korepresorskim kompleksom koji može regrutirati faktore povezane s DNA metilacijom i represivnom formacijom kromatina (Smallwood i sur. 2012b).

Pokazano je da u embrijima može doći do pravilne metilacije unatoč tome što je ženka ZFP57 deficitarna, tako da se pretpostavlja da postoji dodatna, još nepoznata epigenetička oznaka na Snpn utisnutim gDMR u oocitima koja se zadržava postfertilizacijski, a prepoznaje ju metilacijska mašinerija somatskih stanica embrija koja onda povraća metilaciju specifičnu za roditeljske alele. Ponovno stjecanje te metilacije ovisi o tome eksprimira li zigota ZFP57. Dakle, ZFP57 vjerojatno stupa u interakciju s tom nepoznatom oznakom i promovira *de novo* metilaciju (Smallwood i sur. 2012b).

Pronađeni su i drugi trans-djelujući faktori u *de novo* DNA metilaciji. Primjerice, u gestacijskoj abnormalnosti, obiteljskoj BHM (eng. *biparental hydratidiform mole*) embrijima nedostaju metilacije majčinskih gDMR što dovodi do autosomalnog recesivnog nasljeđivanja s majčinskim efektom. Naime, u BHM majkama postoje mutacije NLRP7 i C6orf221 čiji proteini vjerojatno tvore kompleks koji bi mogao biti povezan s metilacijom. Pronađen je i s NLRP7 povezani protein, NLRP2 čija mutacija također dovodi do poremećaja utiskivanja, Beckwith-Wiedemannovog sindroma. Proteini piRNA puta također imaju ulogu u *de novo* DNA metilaciji, ali se čini da je to karakteristično za mušku germinativnu liniju. Delecija takvih proteina, primjerice MILI i MIWI2 proteina uzrokuje poremećenu metilaciju retrotranspozona (Smallwood i sur. 2012b). Utvrđeno je da ukupna razina metiliranosti nakon demetilacije PGS iznosi <10% (Smallwood i sur. 2012b), a neke od regija koje zadrže svoje oznake i izbjegnu remodeliranje PGS su upravo one povezane s ponavljanjima. Primjerice, IAP retrotranspozoni (eng. *intracisternal A-particle class*) od kojih su IAPTR1 elementi najmobilniji te potencijalno mutageni, trebaju biti utišani čak tijekom reprogramiranja gameta, pa ostaju visoko metilirani (Heard i sur. 2014). Represija repetitivnih elemenata kao što su retrotranspozoni (SINE, LINE, LTR) je važna u germinativnim stanicama koje prenose genetičku informaciju između generacija jer reaktivacija retrotranspozona u spolnim stanicama dovodi do neuspješne mitoze (Smallwood i sur. 2012b).

Dobro je spomenuti da se pozornost posvetila i istraživanju posebnih karakteristika slijedova za specifično regrutiranje metilacijske mašinerije. Poznato je da su DNMT3A i DNMT3B specifični za posebne ciljne slijedove, a dodatak DNMT3L smanjuje tu selektivnost i omogućava uniformniju metilaciju meta u genomu. Zanimljivo je da je razmak između CpG dinukleotida unutar CpG otoka predložen kao determinanta slijeda koja odlučuje koji će se CpG otoci metilirati. Naime, tetramerni kompleks DNMT3A:DNMT3L ima dva katalitička

mjesta DNMT3A razdvojena udaljenošću 8-10 pb DNA. Dakle, CpG otoci s CpG udaljenim 8-10 bp bi bile preferencijalne mete kompleksa. Međutim, budući da se ta periodičnost ne javlja kod svih slijedova čija metilacija ovisi o ovom kompleksu, moguće je da je slijed važna komponenta samo za funkciju nekih faktora kao što je ZFP57. Mete metilacije u genomu bi mogle biti određene uzorcima histonskih modifikacija koje su djelomično determinirane transkripcijskom aktivnošću, a zahtijevaju rasklapanje faktora vezanih na CpG otoke zaslužnih za stvaranje kromatina nepristupačanog za metilaciju (Smallwood i sur. 2012b).

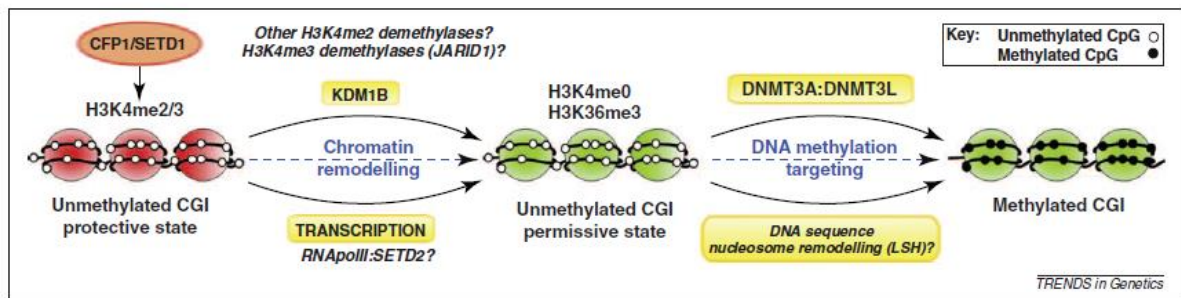
2.3. Veza metilacije s histonskim modifikacijama

Histonske varijante i histonske modifikacije sa sebi pridruženim "pisačkim" i "čitačkim" kompleksima mogu održavati kromatinska stanja te su potencijalni nositelji epigenetske informacije (Heard i sur. 2014).

Metilacija se *in vivo* ne odvija na goljoj DNA, već u kromatinskom okruženju, što utječe na sposobnost interakcije *de novo* DNA metilacijskih kompleksa sa svojim metama u genomu. Interakcija specifičnih domena DNMT3 proteina s histonima je regulirana sa specifičnim modifikacijama amino krajeva histonskih repova. Tako je *in vitro* vezanje DNMT3A i DNMT3L inhibirano metilacijom lizinskog ogranka 4 histona 3 (H3K4), a vezanje DNMT3A je potaknuto trimetilacijom H3K36me3. Nemetilirani CpG otoci dobivaju poseban set histonskih modifikacija koje mogu pomoći očuvati stanje hipometilacije DNA. Tako demetilaza H3K36me2, KDM2A veže nemetilirane CpG otoke što rezultira manjkom H3K36me2 na ovim regijama u usporedbi s okolnim regijama. Na CpG otoke koji se metiliraju tijekom diferencijacije embrijskih matičnih stanica ne može se vezati KDM2A te oni dobivaju H3K36me2. Većina nemetiliranih CpG otoka je bogato i s H3K4me3 koja inhibira interakciju DNMT3 s histonima. Obogaćivanje s H3K4me3 ovisi o Cfp1 koji u rastućim oocitama intereagira s H3K4 metiltransferaznim kompleksom Setd1. (Slika 3.) Moguće je da su CpG otoci u germinativnim stanicama u pravilu zaštićeni od DNA metilacije u te da je potrebno veliko remodeliranje histonskih modifikacija (H3K4) ili destabilizacija faktora koji štite od metilacije da bi DNA metilacijska mašinerija pristupila ciljnim CpG otocima. U oocitama deficijencija KDM1B demetilaze H3K4me1/2 dovodi do defekata u uspostavi DNA metilacije na nekoliko utisnutih gDMR. U muškim germinativnim stanicama majčinski utisnuti gDMR bogati su s H3K4me2 što ovu modifikaciju dovodi u vezu sa zaštitom od metilacije tijekom spermatogeneze (Smallwood i sur. 2012b).

Pretpostavlja se da je za *de novo* metilaciju CpG otoka potrebno i nukleosomsko remodeliranje, jer čini CpG dinukleotide dostupnima metilacijskoj mašineriji. Problem je u tome što je tetramerni kompleks DNMT3A:DNMT3L relativno velik u usporedbi s nukleosomom. Jedan tetramer stupa u interakciju s jednim nukleosomom tako da se svaki DNMT3L veže za jedan H3 amino terminalni rep. Kad bi organizacija nukleosoma bila statična, samo mali broj CpG-ova bi bio dostupan tetrameru jer je 146 pb DNA omotano oko nukleosoma (Smallwood i sur. 2012b).

Postoji još jedna poveznica nukleosoma i prijenosa epigenetske informacije. U haploidnoj fazi spermatogeneze nukleosomalni kromatin se prepakira s protaminima da bi se poprimila kompaktna, toroidalna struktura kromatina. Određeni geni povezani s regijama za regulaciju su u ljudi i nekoliko životinjskih vrsta zaštićeni od zamjene s protaminima. Ključne histonske varijante i njihove modifikacije tako ostaju u zigoti i mogu nositi očinsku epigenetsku informaciju važnu za razvoj embrija (Arpanahi i sur. 2009).



Slika 3. Mehanizmi *de novo* DNA metilacije utisnutih gDMR i CpG otoka u ženskim germinativnim stanicama. U nezrelim oocitama nemetilirani CpG otoci su zaštićeni od metilacije specifičnim histonskim modifikacijama. CFP1 stupa u interakciju sa SETD1 kompleksom koji trimetilira H3K4 sprječavajući tako vezanje DNMT3A:DNMT3L kompleksa. Prije uspostave DNA metilacije, ta se "zaštitna" oznaka mora remodelirati. Za to je odgovorna H3K4me2 demetilaza KDM1B. Potencijalna uloga transkripcije u potrebnom remodeliranju kromatina proizlazi iz vezanja SETD2 kompleksa na RNA polimerazu II u cilju postavljanja H3K36me3 oznake koja može regrutirati DNMT3A. U takvom permisivnom stanju kromatina, može doći do metilacije pod uvjetom da su CpG dinukleotidi dostupni metilacijskoj mašineriji. Dodatna razina regulacije određuje koji se CpG otoci smiju metilirati (Smallwood i sur. 2012b).

2.4. Uloga transkripcije i RNA

Čini se da postoji jaka veza transkripcije i metilacije CpG otoka. Osim što H3K36me3, oznaka aktivnih gena regrutira DNMT3A na kromatin, njezina metiltransferaza Setd2 je dio kompleksa vezanog za elongacijski oblik RNA polimeraze. Posljedica transkripcije je remodeliranje nukleosoma što bi moglo biti nužno u promoviranju djelovanja

DNMT3A:DNMT3L za metilaciju velikog broja CpG u CpG otocima (Smallwood i sur. 2012b).

Važno je napomenuti i da oocite sadrže nekodirajuće RNA svih vrsta koje mogu biti stabilne nekoliko dioba i utjecati na rani razvoj embrija (Wei i sur. 2015). Majčinske zalihe malih RNA mogu navoditi modifikacije DNA i histona, pa su kandidati za pokretanje epigenetskog nasljeđivanja (Heard i sur. 2014). Populacije RNA su pronađene i u spermijima (Wei i sur. 2015).

3. EPIGENETIČKO NASLJEĐIVANJE KROZ GAMETE SISAVACA

Epigenetičke oznake se mogu prenositi gametama na potomstvo, budući da oznake nisu uvijek potpuno izbrisane između generacija. Ovakvo nasljeđivanje omogućava bolju prilagodbu potomaka na okolišne uvjete jer im se prenose korisne informacije o okolišu kojeg su iskusili roditelji. Ulogu prenositelja takvih informacija imaju DNA metilacija, kromatinski proteini, ali i ne-kodirajuća RNA u gametama (Wei i sur. 2015).

Dakle, u slučaju da reprogramiranje u germinativnoj liniji zakaže, epigenetičke oznake se mogu zadržati i prenositi na sljedeće generacije. Većina epigenetičkih "mutacija" je ili neutralna ili deletirajuća i često uključuje oslobađanje transpozabilnih elemenata i drugih genomskih parazita (Heard i sur. 2014).

Važno je razlikovati roditeljske (intergeneracijske) efekte, kao što su utjecaj *in utero* izlaganja embrija i njegove germinativne linije škodljivom okolišu, od pravih transgeneracijskih efekata, koji su pronađeni u pojedincima neizloženim početnom signalu ili okolišu koji je pokrenuo promjenu (Heard i sur. 2014).

Brojni su dokazi za transgeneracijsko nasljeđivanje promijenjenog epigenoma u životinja, a ono je primijećeno i u ljudi. Primjerice, nedavno je dokazano da preddijabetes u očeva povećava podložnost potomaka dijabetesu kroz promjene u metilacijskim uzorcima spermija. Velik broj diferencijalno metiliranih lokusa se može prenijeti u Langerhansove otočice potomstva što uzrokuje sniženu toleranciju na glukozu i osjetljivost na inzulin zbog umanjene ekspresije odgovornih gena (Wei i sur. 2015). U drugom istraživanju, dijabetes u majke je

promijenio metilacijske obrasce utisnutih gena oocite, a debljina izazvana prehranom je promijenila DNA metilaciju neutisnutih gena oocite (Wei i sur. 2015).

Specifične promjene u epigenomu gameta F3 generacije mogu uzrokovati i razni toksikanti, uključujući fungicid vinklozolin, dioksin, bisfenol A, pesticid metoksiklor, permetrin, DEET, ugljikovodike mlaznog goriva, ali i stres. Nasljeđivanje promjenjenih epigenoma može se odvijati kroz mušku ili žensku germinativnu liniju. Kritično doba izlaganja toksikantima je period epigenetičkog reprogramiranja razvijajuće germinativne linije koji se podudara s nastupom spolne determinacije gonada fetusa jer se tada spolno specifično remetila DNA (Skinner i sur. 2013). Izmijenjeni epigenom ponaša se kao da je utisnut zato što izbjegava normalnom brisanju DNA metilacije poslije oplodnje te se vezuje uz pojavu bolesti u odrasle jedinke (Wei i sur. 2015).

4. ZAKLJUČAK

Promjene metiliranosti DNA, histonskih modifikacija i stanja kromatina omogućuju pravilan razvoj za vrijeme gametogeneze i embriogeneze u sisavaca. Unatoč tome što su nam danas poznati brojni enzimi i faktori koji sudjeluju u tom procesu, potrebno je sa sigurnošću odrediti njihovu pripadnost određenom regulatornom putu. Mnoga pitanja ostaju otvorena za buduća istraživanja. Primjerice, nije utvrđen mehanizam kojim se odlučuje o potrebi za metiliranjem pojedine regije genoma. Dijelovi modela za uspostavu *de novo* metilacije DNA još su samo nagađanja, a detalji navedenih mehanizama još nisu potpuno poznati. No, dokazi za epigenetičko nasljeđivanje u sisavaca su sad već nepobitni. S razvojem istraživanja, sve je veći naglasak na potrebi za identifikacijom epigenetskih oznaka u ljudi radi potencijalne uloge u sprečavanju ne-genetičkih bolesti (Wei i sur. 2015).

5. LITERATURA

Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz S, Paradowska A, Platts A, Saida M, Steger K, Tedder P, Miller D 2009. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Research* **19**, 1338-1349.

Heard E, Martienssen A, 2014. Transgenerational epigenetic inheritance: Myths and mechanisms. *Cell* **157**, 95–109.

Li E, 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* **3**, 662-73.

Skinner M, Haque C, Nilsson E, Bhandari R, McCarrey J, 2013. Environmentally Induced Transgenerational Epigenetic Reprogramming of Primordial Germ Cells and the Subsequent Germ Line. *PLoS ONE* **8**, e66318

Smallwood S, Kelsey G, 2012a. De novo DNA methylation: A germ cell perspective. *Trends in Genetics* **28**, 33-42.

Smallwood S, Tomizawa S, Krueger F, Ruf N, Carli N, Segonds-pichon A, Sato S, Hata K, Andrews S, 2012b. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Europe PMC Funders Group* **43**, 811–814.

Wei Y, Schatten H, Sun Q, 2015. Environmental epigenetic inheritance through gametes and implications for human reproduction. *Human Reproduction Update* **21**, 194–208.

6. SAŽETAK

Epigenetički uzorci se uspostavljaju tijekom razvoja embrija i ostaju stabilni u somatskim stanicama odrasle jedinke, ali se reprogramiraju u germinativnoj liniji kako bi se zajamčila pluripotentnost budućih preimplantacijskih embrija. Epigenetičke oznake koje upravljaju ekspresijom gena uključuju DNA metilaciju, histonske varijante i modifikacije. Mete DNA metilacije u sisavaca su gotovo uvijek CpG dinukleotidi. Među CpG otocima se nalaze i diferencijalno metilirane regije germinativne linije od kojih je mali broj utisnut. Geni su utisnuti karakteristično za spol te se njihove oznake ne brišu postfertilizacijski, nego ostaju kao cjeloživotna memorija roditeljskog porijekla alela u novoj generaciji. Metilacija DNA se koristi za utišavanje pokretnih genetičkih elemenata pomoću proteina piRNA puta, a prisutna je i na drugim neutisnutim regijama. Za metilaciju DNA je ključan DNMT3A:DNMT3L kompleks. Dostupnost metilacijske mašinerije pojedinoj regiji genoma reguliraju histonske modifikacije koje se uspostavljaju uz pomoć nekolicine enzima i faktora. Tako CFP1 i SETD1 postavljaju "zaštitnu" oznaku H3K4me3, a KDM1B ju uklanja. Transkripcija je također odgovorna za dostupnost regija metilaciji te za uspostavljanje permisivnog stanja kromatina (H3K36me3) združivanjem RNA polimeraze II sa SETD2. Za postfertilizacijsko održavanje oznaka, ali i za *de novo* DNA metilaciju je posebno bitan ZFP57. Još nije poznato koji faktori utvrđuju koje se regije smiju metilirati. Pogreške u metilaciji i nepotpuna metilacijska mašinerija najčešće će dovesti do nevijabilnosti embrija ili razvoja bolesti u odrasle jedinke. Zakaže li u germinativnoj liniji reprogramiranje, moguće je nasljeđivanje promijenjenog epigenoma kroz gamete. Epigenom može biti promijenjen okolišno, primjerice toksikantima i životnim stilom.

7. SUMMARY

Epigenetic marks are established during the embryo development and remain stable in the somatic cells of an adult but are reprogrammed in the germ line to grant pluripotency of future preimplantation embryos. Epigenetic marks that regulate gene expression include DNA methylation, histone variants and histone modifications. Targets of DNA methylation in mammals are almost always CpG dinucleotides. Among CpG islands there is a small number of imprinted germline differentially methylated regions. Genes are imprinted in asymmetrical fashion in male and female embryos. Their marks are maintained after fertilization as a lifelong memory of parental origin of the allele in the new generation. DNA methylation is also used for silencing mobile genetic elements via piRNA pathway proteins and can also be found at other non-imprinted regions. The DNMT3A:DNMT3L complex is the key protein for DNA methylation. Histone modifications which are established by a variety of enzymes and factors determine accessibility of certain regions of the genome to methylation machinery. Together, CFP1 and SETD1 establish the H3K4me3 "protective" mark, whereas KDM1B removes it. Transcription helps make certain regions of the genome accessible and helps establish a permissive state of chromatin (H3K36me3) through joining of RNA polymerase with SETD2. ZFP57 is an important factor in both post-fertilization maintenance of methylation and *de novo* DNA methylation. It is not yet known which factors decide which regions to methylate. Mistakes during methylation and incomplete methylation machinery will most likely lead to non-viable embryos or development of disease in the adult. Inheritance of changed epigenome is possible if germline reprogramming fails. Epigenome can be environmentally altered either by toxicants or by lifestyle.

