

돼지 초기수정란에서 Dnmt1o와 Dnmt1s 상류 영역의 DNA 메틸화 변화

김현미² · 김성우¹ · 조상래³ · 김현¹ · 박재홍¹ · 조재현⁴ · 양보석¹ · 고응규^{1,†}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, ²농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오횡공학과,

³농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장, ⁴경상대학교 수의과대학

DNA Methylation Change of Dnmt1o and Dnmt1s 5'-Region in the Early Porcine Embryo

Hyun-mi Kim², Sung-woo Kim¹, Sang-Rae Cho¹, Hyun Kim¹, Jae-Hong Park¹,
Jae-Hyeon Cho³, Boh-Suk Yang¹ and Yeoung-Gyu Ko^{1,†}

¹Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

²Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

³Subtropical Genetics Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea

⁴Institute of Life Science, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT

In the present study, we identified differentially methylated region (DMR) upstream of Dnmt1o and Dnmt1s gene in early porcine embryos. Porcine Dnmt1o had at least one DMR which was located between -530 bp to -30 bp upstream from transcription start site of the Dnmt1o gene. DNA methylation analyses of Dnmt1o revealed the DMR to be hypomethylated in oocytes, whereas it was highly methylated in sperm. Moreover, the DMR upstream of Dnmt1o was gradually hypermethylated from oocytes to two cells and dramatically changed in the methylation pattern from four cells to BL stages in an *in vivo*. In an IVF, the methylation status in the DMR upstream of Dnmt1o was hypermethylated from one cell to eight cells, but demethylated at the Morula and BL stages, indicating that the DNA methylation pattern in the Dnmt1o upstream ultimately changed from stage to stage before the implantation. Next, to elucidate whether DNA methylation status of Dnmt1s upstream is stage-by-stage changed in during porcine early development, we analyzed the dynamics of the DNA methylation status of the Dnmt1s locus in germ cell, or one cell to BL cells. The Dnmt1s upstream was highly methylated in one and eight cells, while less methylated in two, four, morula, and BL cells. Taken together, our data demonstrated that DNA methylation and demethylation events in upstream of Dnmt1o/Dnmt1s during early porcine embryos dramatically occurred, and this change may contribute to the maintenance of genomewide DNA methylation in early embryonic development.

(Key words : DNA methyltransferase, DNA methylation, Porcine, Differentially methylated region)

서론

DNA 메틸화는 chromatin의 remodeling에 관여하고 유전자의 silencing·안정화 등, 후성학적 조절기구로서 중요하다. 포유류의 몸을 구성하는 다양한 조직과 세포는 각각 고유의 DNA 메틸화 패턴을 형성하고 있고, 개체발생·세포의 분화에 DNA 메틸화가 중요한 역할을 하고 있다 (Shiota 등, 2002). DNA 메틸화는 cytosine과 guanine이 연속된 배열, 5'-CG-3' 배열(CpG)을 갖는 cytosine에 DNA 메틸화 전이 효소(DNA methyltransferase; Dnmt)에 의해서 이루어진다. 포유동물에서 DNA 메틸화 효소들은 Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3l로 5개로 구성

되어 있고, 세포분열 시 메틸화의 유지, 탈 메틸화, 신규 메틸화 기능을 갖고 있으며, 이들 Dnmt family 분자가 복잡하게 협조해 가면서 genome DNA상의 메틸화를 형성하고 있다(Bestor, 2000; Chen and Li, 2004). 특히 Dnmt1은 체세포에서 폭넓게 발현하고, 세포복제 동안 핵 내 위치하며, 낭세포에 메틸화의 유지기능을 갖고 있다. 마우스에서 Dnmt1의 Knockout 경우 X-chromosome inactivation, 각인유전자의 심각한 손상시키며, 배 발달 중 임신중기에 배 사망에 이른다(Li 등, 1992). Dnmt1은 마우스의 경우 exon1의 구분에 따라 난모세포 특이적으로 발현하는 Dnmt1o, Pachytene기 정모세포 특이적인 Dnmt1p, 그리고 체세포에서 폭넓게 보이는 Dnmt1s의 3 종류의 iso-form이 존재한다(Mertineit 등, 1998). Dnmt1p

[†] Corresponding author : Phone: +82-63-620-3535, E-mail: kog4556@korea.kr

의 전사산물은 정모세포에서 다량 존재하지만, 단백질은 존재하지 않으나, Dnmt1o의 경우는 난자 형성과 착상 전 수정란 발달 과정에 고 발현되고, 그 단백질의 분자량은 Dnmt1s의 190 kD보다 N-terminal 118개 아미노산이 짧은 175 kD의 분자량으로 발현된다(Mertineit 등, 1998). 최근에 마우스뿐만 아니라 돼지 수정란에서 Dnmt1o 전사산물과 단백질이 동정되어 그것의 존재와 기능이 제시되었다(Jeong 등, 2009).

본 연구는 정자, 난자뿐만 아니라 1-cell에서 배반포까지의 초기 발달 과정에서 Dnmt1 유전자의 iso-form인 Dnmt1o와 Dnmt1s 발현을 조절하는 메틸화 가변 영역으로 추정되는 DMR(differentially methylated region) 영역의 DNA 메틸화 변화 양상을 bisulfite sequencing 및 pyosequencing 방법으로 분석하였다. 착상 전 초기 배 발달 중에 DNA 메틸화에 중요한 기능을 하는 Dnmt1o와 Dnmt1s의 발현을 조절하는 이들 유전자 상류 영역의 DNA 메틸화 패턴을 해석하였다.

재료 및 방법

정자, 난자 및 체외수정란의 회수

별도의 표기가 없는 한 본 실험에 사용된 시약은 Sigma사(St. Louis, Mo, USA) 제품을 사용하였고, 실험에 사용된 동물관리 및 절차는 국립축산과학원 동물복지위원회(Suwon, Korea)의 승인을 얻었다. 돼지 정자는 동결 용해된 랜드레이스 정액을 이용하였고, MII 난자는 도축장에서 도축된 돼지의 난소에서 난포로부터 채취하여 체외 성숙시켜 시험에 공시하였다. 체외성숙에 배양액은 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol(PVA), 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine, 38.5°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 40시간 동안 체외성숙을 실시하였다. 난자들은 IVF 배양액에서 3회 세척 후, 대략 35~40 난자가 50 µl drop 내로 옮겨졌다. 수정에 사용된 배양액은 113 mM NaCl, 3 mM KCl, 7.5 mM CaCl₂ · 2H₂O, 5 mM sodium pyruvate, 11 mM glucose, 20 mM Tris, 2 mM caffeine, 2% BSA 조성으로 구성되었다. 수정은 희석한 신선한 정액을 2회 washing 후 5×10⁵/ml 농도로 6시간 수정하였다. 수정된 난자는 0.5 ml의 배양액에서 38.5°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 40시간 동안 체외배양하였다. 발달단계별 수정란은 3회 이상 PBS를 이용 washing 후 회수하였다. Genomic DNA 추출에 MII 난자는 200개, 2-cell 100개, 4-cell 50개, 8-cell 25개, 상실배 20개, 배반포 10개를 회수 사용 전까지 -80°C에 보관하였다.

체내수정란의 회수

발달 단계별 체내수정란의 회수를 위하여 7~11개월령 랜드레이스 처녀돈을 이용, 과배란처리를 하여 회수하였다. HCG 주사 후 24~36시간에 자연종부시켰고, 종부일을 0일로 하여 국립축산과학원내 도축장에서 도축하였다. 생식기의 회수 후 PBS를 이용 난관을 관류하여 1일 후 1-cell, 2일 후 2-cell, 3일 후 4-cell, 4~5일에 걸쳐 8-cell, 상실배를 회수하였다. 배반포의 회수는 자연종부 6일 후, 즉 HCG 주사 후(배란 후 약 120시간) 168시간에 도축 후 생식기를 회수하였다. PBS를 이용 자궁 관류하여 수정란은 30분 내에 37°C의 0.1%(w/v) PVA를 첨가한 Tyrode's lactate-HEPES를 이용하여 세척 Genomic DNA 추출 전까지 -80°C에 보관하였다.

Bisulfite Sequencing에 의한 DNA 메틸화 해석

우선 Genomic DNA 추출은 Ko 등(2005)의 방법에 준하여 추출하였고, sodium bisulfite genomic sequencing은 Clark 등(1994)의 방법에 따라 수행하였다. 간략히 bisulfite genomic sequencing 방법을 설명하면 EcoRI 처리된 약 2 µg의 genomic DNA가 0.33 M NaOH에서 37°C에서 15분 동안 denature시켰고, pH 5의 2 M의 sodium metabisulfite와 0.5 mM의 hydroquinone 농도로 55°C에서 12시간 빛을 차단하여 반응시켰다. Bisulfite 처리된 샘플은 Wizard DNA clean-Up system(Promega, Madison, WI)을 이용하여 정제하였다. Bisulfite 처리된 DNA는 AmpliTaq Gold(Applied Biosystems)을 이용하여 H19 메틸화 가변 영역을 표 1의 primer set을 이용하여 증폭시켰다. PCR 증폭 조건은 94°C에서 10분간 pre-denaturation 반응 후, 94°C에서 30초, annealing 온도는 56°C에서 30초, 72°C에서 1분간 43회 반응시켰고, 72°C에서 10분간 신장시켜 증폭 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel 전기영동하여 증폭 여부를 확인한 후 증폭된 PCR 산물의 염기 서열은 pGEM T-easy vector system(Promega, USA)을 이용하여 PCR 산물을 클로닝한 후, Bigdye terminator와 ABI 377 자동 염기 서열 분석 장치(PE Applied Biosystems, U.S.A.)를 이용하여 염기 서열을 결정하였다. 결정된 염기 서열은 BLAST를 이용하여 상동성을 검색하였고, DNA Sequence Navigator(PE Applied Biosystems, USA) program을 사용하여 분석하였다.

Pyrosequencing에 의한 DNA 메틸화 해석

Bisulfite 처리된 genomic DNA는 표 1의 Dnmt1o, Dnmt1s 상류 영역을 증폭하기 위하여 Pyrosequencing Assay Design Software (Biotage AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 PCR primer와 sequencing primer를 설계하였다. 이때 sequencing primer와 상보적인 strand의 PCR

Table 1. Primer sequence of Dnmt1o and Dnmt1s for bisulfite PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
Dnmt1o	F: 5'-TATTGAGTAGGGTTAGGAATTGA-3' R: 5'-CCTACCCCTAACCAATTAATCAAAAA-3'	610
Dnmt1s	F: 5'-AGGTAAGGTTTTTAGTAAATAGAA-3' R: 5'-ACAAACAACCCTAAGCTTTT-3'	244

Table 2. Primers for pyrosequencing analysis of the bovine Dnmt1o and Dnmt1s gene

Region	PCR primers	Length	Sequencing primers	CpG #
Dnmt1o		645	5'-ATTAGATTTAAATTATGT-3'	8,9,10,11
	F: 5'-TTTATTGAGTAGGGTTAGGAATTGA-3'		5'-AAAAATGTTGATTGGG-3'	5,6,7
	R: 5'-TCCTCACACAATAAACAAAAAT-3'		5'-GGATGTTGTGGIATGTAGT-3'	3,4
			5'-GGAATGTGGGGATGTT-3'	1,2
Dnmt1s	F: 5'-AGGTAAGGTTTTAGTAAATAGAA-3'	244	5'-AAGTTTGGATTAGTTTATTT-3'	11~24
	R: 5'-ACAAACAACCCTAACITTT-3'		5'-GTATAATTAGTTTTATGAG-3'	1~10

primer은 5'에 biotin으로 modify하여 합성하였고, PCR 조건은 Bisulfite sequencing PCR 조건과 같다. Streptavidin sepharose HP bead(Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden)를 이용한 PCR 산물의 정제는 Vacuum Prep Workstation을 이용하여 진행하였다. Primer의 annealing 후 500 ng의 single strand DNA 결합 단백질 (Sigma, St Louis, MO)이 sequencing 반응 혼합물에 가해졌다. Sequencing은 제공된 방법에 준하여 SNP reagent kit (Pyrosequencing, Uppsala, Sweden)와 함께 PSQ 96MA system 장비를 이용하여 분석하였다. Data의 분석은 장비에 제공된 software의 allele 정량 algorithm을 이용하여 분석하였다.

결 과

초기 배 발달 중 Dnmt1o 상류 영역의 DNA 메틸화 변화

돼지 생식세포인 정자, 난자, 그리고 수정 후 1-cell에서 배반포까지 착상 전 초기 배 발달 단계의 수정란에서 Dnmt1o 발현 조절 영역인 전사 개시점 상류 -30 bp에서 -675 bp내 645 bp 영역에 존재하는 11개의 CpG site에 대하여 pyrosequencing 법에 의하여 발달단계별 메틸화의 변화를 조사하였다. Dnmt1o 상류 영역은 정자의 경우 63.82% 고 메틸화 되었고, MII stage 난자의 경우는 40.91%로 저 메틸화 되어 있었다(그림 1). 난관 및 자궁 관류에 의해 회수된 체내수정란의 경우 수정 후 1-cell에서는 63.18% 메틸화를 보였다. 이것은 수정에 따라 Dnmt1o 상류 영역 CpG site가 부분적인 탈 메틸화 및 신규메틸화 일어남을 의미하고 있다. 이후 2-cell에서 75%로 고 메틸화로 신규메틸화가, 4-cell에서 51.91%로 탈 메틸화, 8-cell에서 71.91% 신규 메틸화, 상실배, 배반포에서는 70.27, 44.27%로 점점 탈 메틸화 되어 가는 패턴을 보였다. 이들 결과는 초기 배 발달 세포분열 과정에서 발달 stage 별로 급격한 또는 부분적인 신규 메틸화 및 탈 메틸화가 일어나고 있음을 의미한다. 체외수정란의 경우에 있어서도 발달 stage 별로 체내수정란과 비슷한 양상으로 메틸화의 변화를 보이고 있었다. 특히 배반포의 경우 체내수정란의 44.27%에 비하여 61.55%로 고 메틸화 양상을 보여 체외 수정에 따른 인위적인 조작 및 배양액 조성에 따라 메틸화 패턴이 달라지고 있음을 의미하고 있다.

초기 배 발달 중 Dnmt1s 상류 영역의 DNA 메틸화 변화

돼지 생식세포인 정자, 난자, 그리고 수정 후 1-cell에서

배반포까지 착상 전 초기 배 발달 단계의 수정란에서 Dnmt1s exon1을 포함하는 상류 -229 bp 범위까지의 244 bp에 존재하는 24개의 CpG site에 대하여 pyrosequencing법에 의하여 초기 발달 단계별 메틸화의 변화를 조사하였다. CpG site가 다수 분포하는 CpG Island 영역인 Dnmt1s 상류 영역은 정자와 난자에서 각각 4.41%와 2.08%의 저 메틸화 상태를 보였고, 수정 후 1-cell에서는 17.20%로 메틸화의 증가되었으며, 2-, 4-cell까지 약간의 감소 이후, 8-cell에서 재 증가 후, 상실배, 배반포에서 감소하였다. Dnmt1s 상류 영역은 수정 후 초기 배 발달 stage 별로 메틸화의 변화를 보였으나, 전반적으로 저 메틸화 수준으로 Dnmt1o 상류 영역의 전반적인 고 메틸화 패턴과는 달리 그 변화 정도가 미비한 수준을 보였다.

Bisulfite Sequencing 방법에 의한 체내·체외 배반포에서 DNA 메틸화 분석

앞에서 우리는 pyrosequencing 법에 의하여 착상 전 초기 배 발달단계별 Dnmt1o와 Dnmt1s 상류 영역의 DNA 메틸화 패턴을 분석하였다. Pyrosequencing법이 클로닝 과정 없이 PCR 산물의 직접적인 sequencing으로 분석이 간단 용이하나, 그 정확도에 한계가 있을 것으로 생각되어 체내·체외수정란 배반포와 체세포인 태아섬유아세포(PFF)에 대하여 bisulfite sequencing 방법에 의하여 Dnmt1o 상류 영역의 DNA 메틸화를 재분석하였다. 분석한 영역은 Dnmt1o 발현 조절 영역인 전사개시점 상류 -30 bp에서 -640 bp내 610 bp 영역에 존재하는 8개의 CpG site를 분석하였다. 체내 수정란은 체외 수정란 배반포의 70.45%에 비하여 55.62%의 저 메틸화 되었고, 체세포인 태아섬유아세포는 87.50%의 고 메틸화 패턴을 보였다(그림 2). 이들 결과는 pyrosequencing 법에 의해 분석한 DNA 메틸화 결과(체내 배반포 44.27% vs. 55.62%, 체외 배반포 61.55% vs. 70.45%)와 약간의 차이는 보이지만, 그 결과는 비슷한 결과를 나타냈다.

고 찰

많은 유전자들은 메틸화 가변 영역(DMR)을 가지며, 그 DMR들의 DNA 메틸화 프로파일들은 조직특이적 발달특이적으로 유전자들의 발현을 조절한다(Shiota 등, 2002). 본 논문은 exon1에 따라서 발달 중의 난자 및 초기수정란에서 발현하는 Dnmt1o과 pachytene spermatocyte에서 성 특이적으로 발현하는 Dnmt1p 그리고 체세포에서 발

현하는 Dnmt1s 전사산물을 갖는 Dnmt1의 발현을 제어하는 돼지 Dnmt1o과 Dnmt1s 상류의 메틸화 패턴을 pyrosequencing 법과 bisulfite sequencing 법에 의하여 분석하였다. 마우스에서는 1998년에 초기 배 발달 과정의 Dnmt1o의 발현과 세포 내 위치는 처음 동정되었고(Mertineit 등, 1998), 돼지에 있어서는 최근에 초기 수정란 발달 과정에서 Dnmt1o의 발현과 세포 내 위치가 동정되었다(Jeong 등, 2009).

착상 전 초기배발달 과정은 급격한 탈 메틸화에 의한 genome-wide DNA 메틸화 reprogramming이 일어나는 시기이다(Reik 등, 2001; Ko 등, 2005). 마우스에서는 수정 후 4시간 이내에 응성전핵에서 급격한 탈 메틸화가 발생한다(Santos 등, 2002; Oswald, 2000). 이러한 급격한 탈 메틸화는 마우스 외에 rat, 돼지(Dean 등, 2001), 사람(Fulka 등, 2004; Dean 등, 2001)에서 보이고, 면양과 소에서는 부분적인 약간의 탈 메틸화 현상이 보인다(Beaujean 등, 2004; Dean 등 2001). 본 실험에서 착상 전 초기 배 발달 과정 동안 메틸화 패턴은 Dnmt1o 발현 조절 영역으로 생각되는 DMR에서 정자에서 63.82%, 난자에서 40.91%이고, 수정 후 1-cell에서 63.18%의 메틸화를 보여주는 데(Fig. 1), 난자 측면에서 보면 수정에 의한 세포복제 과

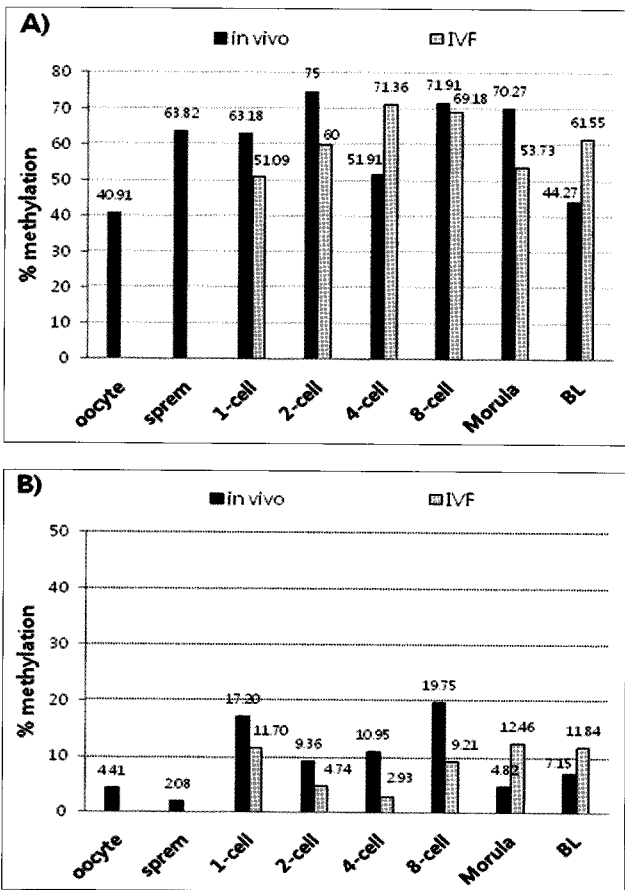


Fig. 1. CpG methylation patterns of porcine Dnmt1o and Dnmt1s 5'-region in the sperm, oocyte and early embryos produced *in vivo* or IVF. Methylation status of Dnmt1o and Dnmt1s 5'-region analyzed by means of pyrosequencing method. Percent methylation of Dnmt1o (A) and Dnmt1s (B) 5'-region is the proportion of methylated CpG sites relative to the whole CpG.

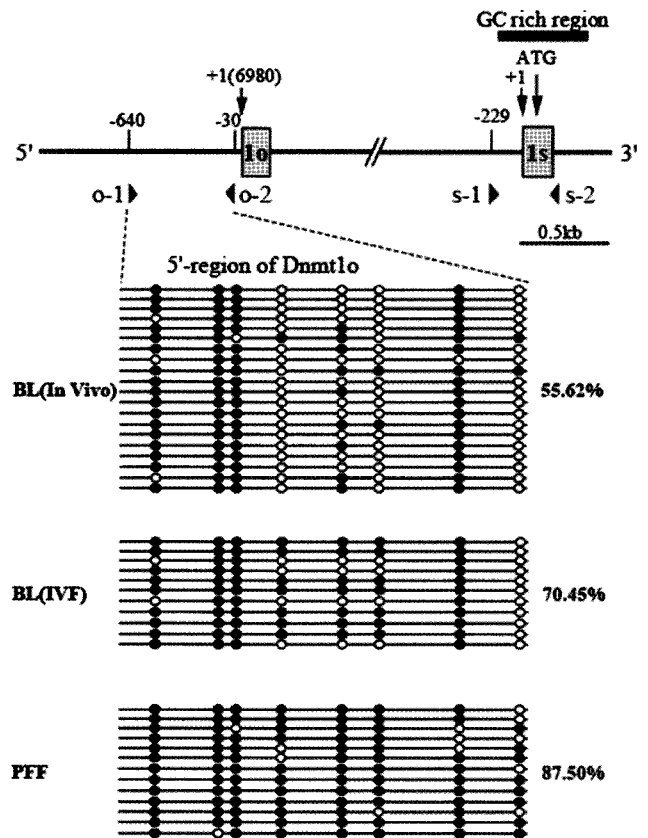


Fig. 2. Methylation patterns of Dnmt1o 5'-region in blastocyst produced *in vivo* or IVF. Methylation status of each CpG in the 5'-regions of Dnmt1o analyzed by means of sodium bisulfite genomic sequencing method, are shown. Blank and filled circles indicate unmethylated and methylated CpGs, respectively.

정에서 메틸화 증가가, 정자 측면에서 보면 탈 메틸화 현상을 보여 이전의 결과들에서 보이는 paternal의 탈 메틸화 범주에 포함된다. 이후 2-cell에서 증가 4-cell에서 51.91% 메틸화 감소 후, 8-cell과 상실배에서 약 70%, 배반포에서 44.27% 메틸화 감소를 보여 다이내믹한 메틸화의 변화를 보이고 있어 세포특이적인 메틸화 패턴이 시기에 존재한다. 이들 결과는 마우스 초기 배 발달 과정의 Dnmt1o 발현과 DNA 메틸화의 다이내믹한 변화와 같이(Ko 등, 2005), 돼지 Dnmt1o DMR의 DNA 메틸화는 착상 전 배 발달 동안에 신규메틸화와 능동적인 탈 메틸화에 의해 일어난다고 할 수 있다. 어쨌든 이들 특정 stage에서 독특한 메틸화 패턴을 갖고 변화하며, 일반적으로 수정 후 genome-wide한 탈 메틸화 현상이 일어나는데, 이것은 DNA 복제와 세포분열에 따른 유지 메틸화 부족에 의한 것으로 알려져 있고(Rougier 등, 1998), 이들 결과는 본 실험의 결과뿐만 아니라 수정 후 포유동물 초기 배 발달 과정은 다이내믹한 epigenetic modification의 큰 축을 차지하고 있는 것 같다.

결론적으로 본 연구에서 우리는 돼지 Dnmt1o과 Dnmt1s 유전자의 발현을 조절하는 상류 영역인 DMR 영역이 마우스와 같이 잘 보존되어 있으며, DNA 메틸화 효소인 Dnmt1 유전자 자체가 세포분화에 따라 다이내믹한 변화를 갖고 있음을 확인하였다. 돼지에서는 아직까지

메틸화와 관련된 epigenetic 연구가 부족한 상태로, 금후 계속적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

인용문헌

1. Beaujean N, Taylor JE, McGarry M, Gardner JO, Wilmut I, Loi P, Ptak G, Galli C, Lazzari G, Bird A, Young LE, Meehan, RR (2004): The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7636-7640.
2. Bestor TH (2000): The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9:2395-2402.
3. Chen T, Li E (2004): Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr Top Dev Biol* 60:55-89.
4. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994): High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22:2990-2997.
5. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W (2001): Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13734-13738.
6. Fulka H, Mrazek M, Tepla O, Fulka J Jr (2004): DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction* 128:703-708.
7. Jeong YS, Dh KB, Park JS, Kim JS, Kang YK (2009): Cytoplasmic localization of oocyte-specific variant of porcine DNA methyltransferase-1 during early development. *Dev Dyna* 238:1666-1673.
8. Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S, Shiota K (2005): Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *J Biol Chem* 280:9627-9634.
9. Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992): Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-26.
10. Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM, Bestor TH (1998): Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* 125:889-897.
11. Reik W, Dean W, Walter J (2001): Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293:1089-1093.
12. Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, Viegas-Pequignot E (1998): Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev* 12:2108-2113.
13. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W (2002): Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241:172-82.
14. Shiota K, Kogo Y, Ohgane J, Imamura T, Urano A, Nishino K, Tanaka S, Hattori N (2002): Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells* 7:961-969.

(접수일자: 2011. 8. 18 / 채택일자: 2011. 8. 25)