

돼지 체세포복제 35일령 태아에서 H19 메틸화 가변 영역의 DNA 메틸화 변화

고응규^{1,*}, 임기순², 황성수², 오건봉², 우제석², 조상래¹, 최선호¹, 이풍연¹, 연성흠¹, 조재현³

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, ²농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오통합과, ³경상대학교 수의과대학

DNA Methylation Change of H19 Differentially Methylated Region (DMR) in Day 35 of Cloned Pig Fetuses

Yeoung-Gyu Ko^{1,*}, Gi-Sun Im², Seongsoo Hwang², Keon-Bong Oh², Jae-Seok Woo², Sang-Rae Cho¹, Sun-Ho Choi¹, Poongyeon Lee¹, Sung-Heum Yeon¹ and Jae-Hyeon Cho³

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

³Institute of Life Science, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT

This study was performed to identify the differentially methylated region (DMR) and to examine the mRNA expression of the imprinted H19 gene in day 35 of SCNT pig fetuses. The fetus and placenta at day 35 of gestation fetuses after natural mating (Control) or of cloned pig by somatic cell nuclear transfer (SCNT) were isolated from a uterus. To investigate the mRNA expression and methylation patterns of H19 gene, tissues from fetal liver and placenta including endometrial and extraembryonic tissues were collected. The mRNA expression was evaluated by real-time PCR and methylation pattern was analyzed by bisulfite sequencing method. Bisulfite analyses demonstrated that the differentially methylated region (DMR) was located between -1694 bp to -1338 bp upstream from translation start site of the H19 gene. H19 DMR (-1694 bp to -1338 bp) exhibits a normal monoallelic methylation pattern, and heavily methylated in sperm, but not in oocyte. In contrast to these finding, the analysis of the endometrium and/or extraembryonic tissues from SCNT embryos revealed a complex methylation pattern. The DNA methylation status of DMR Region in porcine H19 gene upstream was hypomethylated in SCNT tissues but hypermethylated in control tissues. Furthermore, the mRNA expression of H19 gene in liver, endometrium, and extraembryonic tissues was significantly higher in SCNT than those of control ($p < 0.05$). These results suggest that the aberrant mRNA expression and the abnormal methylation pattern of imprinted H19 gene might be closely related to the inadequate fetal development of a cloned fetus, contributing to the low efficiency of genomic reprogramming.

(Key words : imprinting gene, H19, DNA methylation, porcine, nuclear transfer)

서 론

포유류에서 체세포 복제 개체를 만드는 것이 가능하다는 것이 증명된 이후(Wilmot 등, 1997) 많은 동물 중에서 복제동물이 생산되었다. 복제동물은 epigenetic 관점에서 세포의 분화나 genome 유전자 발현 조절 기구를 명확히 할 수 있는 중요한 생물이나 복제동물은 체세포 복제에 따른 DNA 메틸화에 따른 후성적 유전자 재구성 이상이 있고(Ohgane 등, 2001; Kremenskoj 등, 2006), 이들 불완전한 리프로그래밍은 배발달 및 임신 실패의 원인이 된다(Shi와 Haaf, 2002). 이들 리프로그래밍은 특정 게놈 영역에서 다양한 메커니즘에 의해 독립적으로 일어난다. 포유류의 몸을 구성하는 다양한 조직과 세포는 각각

고유의 DNA 메틸화 패턴을 형성하고 있으며, 개체 발생 및 세포의 분화에 DNA 메틸화가 중요한 역할을 한다(Shiota 등, 2002). 특히 DNA 메틸화는 배우자형성과 초기 배발달 과정에서 전 게놈 영역에서 DNA 메틸화 리프로그래밍에 관여하여(Reik 등 2001; Ko 등, 2005) 프로그램된 유전자 발현과 정상 발달에 작용한다.

초기 배발달에 중요한 게놈 임프린트 유전자들의 발현 또한 DNA 메틸화에 의해 제어를 받는다(Humpherys 등, 2001). 게놈 각인(임프린팅; imprinting)은 부모로부터 계승된 한 쌍의 대립 유전자 중 그 부모의 성에 따라서 한쪽 부모 유래의 유전자가 우세하게 발현하는 현상이다. 이들 임프린트 유전자들의 후성적 차이가 마우스와 사람에서 많은 연구가 수행되

* Correspondence : E-mail : kog4556@korea.kr

였지만, 돼지에 있어 임프린트 유전자에 대하여 알려진 것은 거의 없다. 일반적으로 사람에서는 49개, 마우스에서는 65개의 임프린트 유전자가 보고되는데 반하여, 가축에서의 보고는 단지 10개의 그치고 있다(Killian 등, 2001). 많은 임프린트 유전자중 특히 IGF2와 H19 domain 내의 중요한 임프린트 유전자는 부정 발현하는 IGF2와 모성 발현하는 H19이 있다. IGF2는 세포증식인자이고, 과발현은 태아 종창에 관여하고, H19은 non-coding RNA로 종창 억제 활성을 갖고 있다고 생각되지만 상세한 기능은 알려져 있지 않다(Weksberg 등, 2005). 이들 유전자의 발현 조절은 H19 상류 2.5kb의 메틸화 가변 영역(differentially methylated region, DMR)인 각인 조절 영역(imprinting control region, ICR)의 DNA 메틸화에 의해 제어 받는다(Thorvaldsen 등, 1998; Bell and Felsenfeld, 2000; Szabo 등, 2000).

본 연구는 임프린트 유전자인 IGF2와 H19 발현을 조절하는 메틸화 가변 영역으로 추정되는 DMR(differentially methylated region) 영역을 동정하고, 임신 35일령 태아 및 태반 조직에서 동정된 DMR 영역의 DNA 메틸화 변화 양상을 bisulfite sequencing 방법으로 분석하였고, mRNA 발현을 real-time PCR 방법으로 분석하였다.

재료 및 방법

별도의 표기가 없는 한 본 실험에 사용된 시약은 Sigma사 (St. Louis, Mo, USA) 제품을 사용하였고, 실험에 사용된 동물의 관리 및 관련 절차는 국립축산과학원 동물복지위원회(Suwon, Korea)의 승인을 획득한 후 이에 따라 수행하였다. 돼지 정자는 동결 용해된 램드레이스 정액을 이용하였고, MII 난자는 도축장에서 도축된 돼지의 난소에서 난포로부터 채취하여 체외성숙시켜 시험에 공시하였고, 복제에 이용된 난자는 실제 현미경 하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 것만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다. 핵이식에 사용된 태아섬유아 세포는 임신 30일령 램드레이스 돼지로부터 채취되었고, 세포는 3~4회 계대 배양 후 10% dimethylsulfoxide 가 함유된 DMEM에 동결 보존 후 용해 공여세포로 핵이식에 사용하였다. 복제란은 동기화 처리된 램드레이스 처녀돈에 외과적 방법에 의해 대략 100~200개가 난관에 이식되었다. 자연 종부(대조구) 및 복제란 이식된 수란돈의 임신의 확인은 초음파진단기를 이용하여 이식 후 30~35일 사이에 확인되었다.

1. 자연 종부 및 복제 태아의 회수

복제란 이식과 자연종부 당일을 0일로 기준하여 자연 종부 및 복제 태아 태반의 회수는 35일령에 각 3두씩 시험 도축에 의해 회수되었다. 태아들은 태아 수와 체중을 측정하였고, 각 태아의 간과 모체측 태반(endometrium)과 태아측 태반(extraem-

brionic tissue)을 분리하여 분석 전까지 -80°C 에 보관하였다.

2. Total RNA 추출과 cDNA의 합성

각 조직 내 total RNA는 0.2 g의 조직을 homogenization 후 1 ml의 Trizol Reagent(Invitrogen, Carlsbad, USA)에 넣고 균질화한 후 에탄올 침전을 수행하여 회수하였으며, DEPC 처리된 PBS 5 μl 에 수집된 난자와 수정란은 Trizol Reagent(Gibco BRL, NY, USA) 100 μl 에 맞춰 회수하였고, 2 μg glycogen(Invitrogen)은 에탄올 침전 전 운반체로서 첨가하였고 RNase free water에 10 μl 에 녹여 사용 전까지 -70°C 에 보존하였다. cDNA 합성은 cDNA synthesis kit(invitrogen)를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다. Real time PCR은 Real time PCR DyNAmo SYBR green qPCR kit(Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 수행하였고, 각 유전자의 발현은 Table 1과 같이 Primer를 이용하였고, 반응은 95°C 10분간 denaturation 후 94°C 10초, 58°C 30초, 72°C 30초에서 50회의 반응 프로그램에 의하여 수행되었고, 유전자 발현의 상대적 정량은 2-ddC_t 방법(Livak와 Scmittgen, 2001)에 의하여 분석하였다.

3. 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 μg 의 genomic DNA가 0.33 M NaOH에서 37°C 에서 15분 동안 denature시켰고, pH 5의 2M의 sodium metabisulfite와 0.5 mM의 hydroquinone 농도로 55°C 에서 12시간 빛을 차단하여 반응시켰다. Bisulfite 처리된 샘플은 Wizard DNA clean-Up system(Promega, Madison, USA)을 이용하여 정제하였다. Bisulfite 처리된 DNA는 AmpliTaq Gold(Applied Biosystems, Foster City, USA)을 이용하여 H19 메틸화 가변 영역을 Table 1의 primer set을 이용하여 증폭시켰다. PCR 증폭 조건은 94°C 에서 10분간 pre-denaturation 반응 후, 94°C 에서 30초, annealing 온도는 56°C 에서 30초, 72°C 에서 1분간 43회 반응시켰고, 72°C 에서 10분간 신장시켜 증폭 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel 전기

Table 1. Primer sequences of β -actin and H19 gene for real-time PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
β -actin	F-ACGTGGACATCAGGAAGGAC	210
	R-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	
H19	F-AAAGAGCATCTCAAGCGAGTCT	180
	R-GCTCCTGTACCTGCTACTAAATGAA	

영동하여 증폭 여부를 확인한 후 증폭된 PCR 산물의 염기 서열은 pGEM T-easy vector system(Promega)을 이용하여 PCR 산물을 클로닝하였다. 그 후, Bigdye terminator와 ABI 377 자동 염기 서열 분석 장치(Applied Biosystem)를 이용하여 염기 서열을 결정하였다. 결정된 염기 서열은 BLAST를 이용하여 상동성을 검색하였고, DNA Sequence Navigator(Applied Biosystems) program을 사용하여 분석하였다.

4. 통계 분석

Real-time PCR에 의한 H19유전자의 정량적인 발현율은 Duncan's multiple range test 방법으로 실시하였고, 유의성 검정은 $p < 0.05$ 수준에서 유의차를 인정하였다.

결 과

1. 정자와 난자에서 H19 메틸화 가변 영역의 탐색

우선 H19유전자의 발현을 조절하는 메틸화 가변 영역 탐색을 위하여 임프린트 유전자의 특징인 monoallelic 발현을 하는 돼지 정자와 MII stage 난자세포를 이용 H19 유전자 상류 영역을 포함하여 상류 약 2.7 kb 영역을 Fig. 1에서와 같이 2개 영역 (Region I: H19 상류 -2642에서 -2397, Region II: -1694에서 -1338)으로 구분하여 PCR 증폭 후 클로닝 후 bi-sulfite sequencing에 의하여 그 메틸화 패턴을 검토하였다. 이들 영역은 CpG site가 많이 분포하는 CpG island 영역으로 H19 상류 Region I 의 246 bp내에 28개의 CpG site가 존재하고, Region II 에는 356 bp로 30개의 CpG site가 존재한다. Region I 의 경우의 DNA 메틸화 양상은 정자의 경우 96.83% 고 메틸화 되었고, M II stage 난자의 경우는 100%로 완전히 메틸화 되어 차이를 보이지 않았다(Fig. 1). 30개 CpG가 존재하는 Region II 의 DNA 메틸화 양상은 정자의 경우 99.67% 고 메틸화 되어 있고, 난자는 4.55% 저 메틸화 되었다(Fig. 1). 이들 결과는 H19 상류 -1694에서 -1338 내 Region II의 CpG site가 세포 특이적인 메틸화 가변 영역(DMR)임을 의미하고 있다.

Table 2. Primer sequence of H19 for bisulfite PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
Region I - outer	F: GTTATTTGGGTTAATAGGAAGGTGAT R: ACCTAAAATAACTAAAAAAAC	475
Region I - inner	F: TGGGTTGATTTTTATAGGTTTATTG R: ATAATAAAAAAACACCCCATCCC	246
Region II - outer	F: GTTGTTTAGAGTGGATTTTATTGT R: ACCCAAACCTATACCACCAAAAAC	600
Region II - inner	F: AGGATTTTAGCGGTATTTGTTTAG R: CCGAAAATAAAAATCCCTCCTTAC	356

2. 임신 35일 태아 및 자궁내막 조직에서 H19 mRNA 발현과 DNA 메틸화 변화

다음으로 임신 35일 태아 간과 태반 조직에서 real-time PCR 방법에 의하여 H19 mRNA 발현을 분석하였다(Fig. 3-A). H19 발현은 복제 처리구의 태아 간 조직과 태반 조직(모체측 태반+태아측 태반)에서 각각 5.53 ± 0.96 , 15.25 ± 0.27 로 대조구의 3.47 ± 0.11 , 7.96 ± 0.31 에 비하여 유의적으로 높은 발현을 보였다($p < 0.05$). 또한 외형적으로 퇴화 중인 복제 태아 간과 태반 조직의 발현은 각각 5.68 ± 0.20 , 18.71 ± 0.51 로, 앞에서 분석한 정상에 가까운 복제 태아에 비하여 보다 높은 발현 양상을 보였다(Fig. 3-A).

다음으로 Fig. 1에서 정자와 난자 분석 결과, 찾아낸 H19의 메틸화 가변 영역인 DMR 영역의 메틸화 양상을 임신 35일 태아 간 조직과 태반 조직에 대하여 분석하였다. 태아 간 조직의 결과, 대조군에 비해 복제에서 DMR 영역이 각 개체 별로 차이를 보이며 저 메틸화 되었다(Fig. 2, 3-B). 특히 복제 #2의 경우는 8.3%의 매우 낮은 메틸화 양상을 나타냈다. 모체측 태반의 경우는 대조구의 #2의 44.2%를 제외하고 80% 전후의 고 메틸화 양상을 보였고, 복제의 경우는 48.9에서 66.1% 범위로 저 메틸화 되었다. 태아측 태반 조직에서는 대조구가 90% 이상 고 메틸화인데 반하여 복제 경우는 36%에서 60%의 범위로 대조구에 비하여 저 메틸화 양상을 나타냈다(Fig. 2, 3-B).

고 찰

IGF2와 H19 임프린트 유전자는 같은 게놈 내 염색체 loci에 존재하고, IGF2는 부계편측 발현을 하고, H19은 모계편측 발현을 한다. 본 연구는 임프린트 유전자 H19 상류 메틸화 가

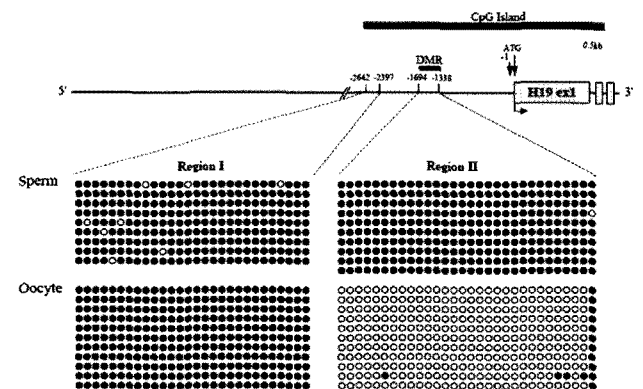


Fig. 1. CpG methylation patterns of porcine H19 upstream in sperm and oocyte. Each line indicates a Region I and a Region II of H19 upstream sequence amplified by PCR from bisulfite converted genomic DNA and has 28 CpG and 30 sites, respectively. Blank and filled circles indicate unmethylated and methylated CpGs, respectively.

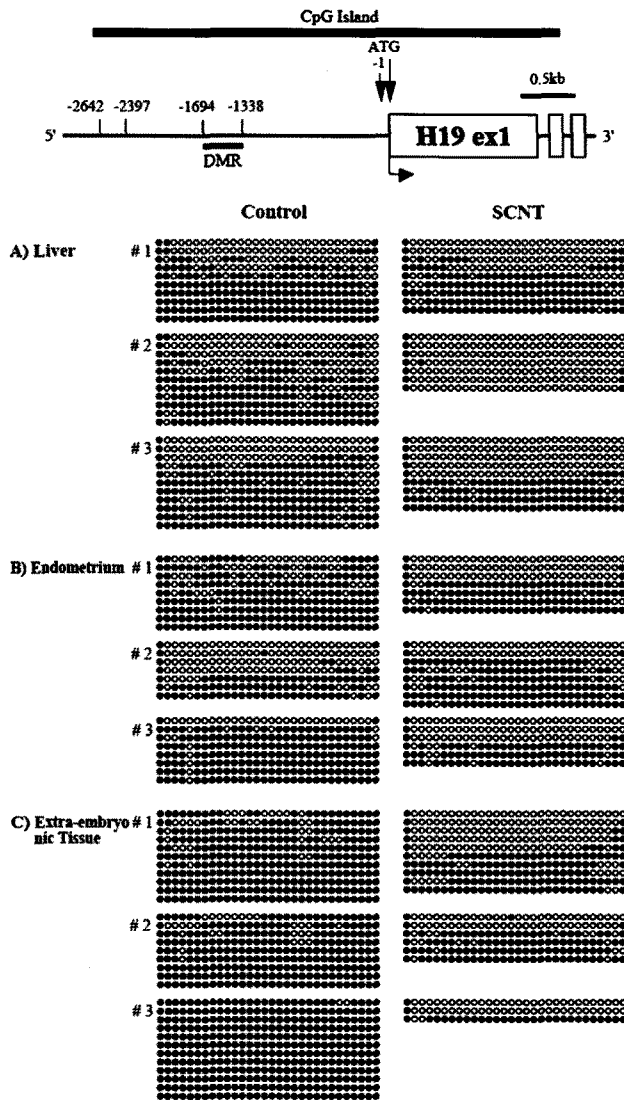


Fig. 2. Methylation patterns of H19 DMR in SCNT and Control pig fetus, endometrium and extraembryonic tissue. Blank and filled circles indicate unmethylated and methylated CpGs, respectively.

변 영역(DMR)을 특정하였고, 착상 후 임신 35일령 태아에서 대조군과 복제 태아 간 및 태반 조직의 H19의 발현과 메틸화 차이를 분석, H19 유전자의 발현이 DNA 메틸화에 의해 제어 받는지를 확인하였다.

임프린트 유전자는 조직특이적인 메틸화 제어 범주에 포함 되는데, 일반적으로 발현이 억제되는 대립유전자(allele)에서 고도의 메틸화 상태를 나타낸다. 발생의 프로그램을 거슬러 올라가면 그 메틸화의 기원이 정자, 난자에서 인식되는 특정 영역의 메틸화 제어 영역에서 유래함을 알 수 있다. 이렇듯 임프린트 유전자의 흥미로운 점은 수정과 발생 후에도 생식세포의 메틸화가 기억되는 것이다. 이러한 관점에서 다른 동물종

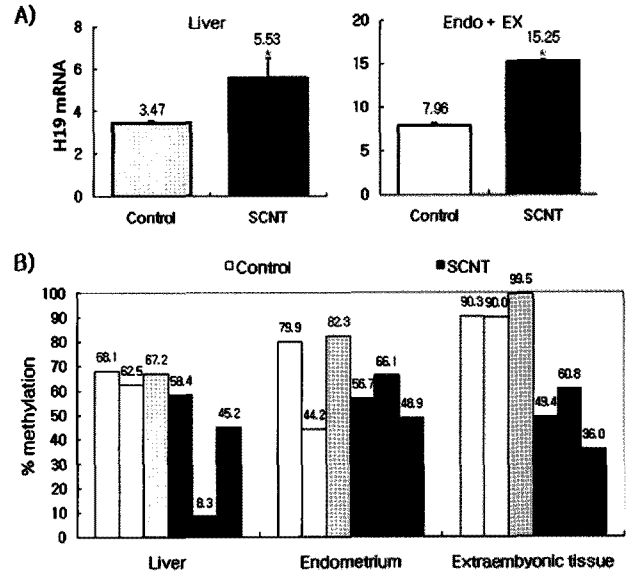


Fig. 3. Expression and methylation patterns of H19 DMR in SCNT and Control pig tissues. A) Real-time PCR analysis of H19. β -actin was used as an internal standard. Data were expressed as mean+SE. Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$) with control. B) Numerical value of methylation of H19 DMR in SCNT and Control pig tissues.

에서 보고된 바와 같이 H19의 메틸화 가변 영역으로 추정되는 H19 상류 영역의 메틸화 상태를 정자와 난자에서 분석하였다. 이들 IGF2와 H19 유전자의 reciprocal 임프린팅은 H19 상류 CTCF binding site 내의 메틸화 가변 영역(DMR)의 DNA 메틸화에 의해 조절되고, 마우스에서는 4개 사람에서는 7개의 CTCF binding site가 존재한다(Hark 등, 2000). 최근에 돼지에서는 DMR 영역 내에 3개의 CTCF binding site가 존재하고 이들 영역이 성숙한 돼지 정자와 난자에서 확실한 메틸화 차이가 보여짐(Han 등, 2008)을, 소에서도 DMR 영역과 보존된 임프린팅 상태를 밝혀졌다(Gebert 등, 2006). 이들 CTCF binding site 내 메틸화 결과는 우리가 분석한 H19 상류 -1694 bp에서 -1338 bp 내 메틸화 가변 영역인 DMR과 유사함을 확인하였다.

많은 유전자들은 그 유전자의 조직, 세포특이적인 발현이 DNA 메틸화에 의해 제어를 받고(Shiota 등, 2002; Ko 등, 2005) 임프린트 유전자들의 발현 또한 DNA 메틸화에 의해 제어를 받는다(Humpherys 등, 2001). 본 실험의 임신 35일 복제돼지 태아, 태반 조직의 메틸화 또한 H19의 발현이 메틸화에 의해 제어 받고 있음을 보여주며, 대부분이 대조군에 비하여 그 DMR 영역의 DNA 메틸화의 차이를 나타냈다. 즉, DMR이 저 메틸화 된 복제 태아 간 조직과 태반 조직에서 H19 고 발현되고, DMR이 고 메틸화 된 자연 증부에서는 저 발현 양상을 보였다(Fig. 3). 한편, 이러한 비정상적인 메틸화의 차이에 의해

제어 받는 복제 태아 및 태반 조직에서 H19의 발현 이상이 복제 발달에서 다양하게 나타나는 배사멸, 퇴화 미이라의 한 원인을 시사한다고 하겠다. 복제 동물의 정상적인 발달에 중요한 많은 유전자의 비정상적인 메틸화와 발현이 많은 그룹에서 보고되었다(Dean 등, 1998; Kang 등, 2002; Ko 등, 2008; Park 등, 2008). H19 유전자는 체세포 복제로 태어나 출생 직후 폐사한 소 태아에서는 비정상적인 부모계 양측 발현(Inoue, 2002; Mann 등, 2003; Zhang 등, 2004)을, 임신 중기 마우스 태아에서는 H19의 낮은 발현, 과메틸화 및 비정상적 발현이 보고되었다(Humpherys 등, 2002; Dean 등, 2003; Ogawa 등, 2003; Santos와 Dean, 2004).

결론적으로 본 연구에서는 돼지 H19 임프린트 유전자의 발현을 조절하는 DMR 영역이 다른 동물과 마찬가지로 잘 보존되어 있으며, 그 발현이 메틸화에 의해 제어받고 있음이 증명되었으며, 복제 태아 및 태반 조직에서 보이는 불완전한 발현과 후성적 정보 중 DNA 메틸화 패턴의 이상이 초기 배발달에 중요함을 확인하였다. 돼지에서는 아직까지 많은 임프린트 유전자들의 발현과 메틸화와 관련된 후성성 연구가 부족한 상태로, 금후 계속적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서 임프린트 유전자인 H19 발현을 조절하는 메틸화 가변 영역으로 추정되는 DMR(differentially methylated region)을 동정하였고, 복제 임신 35일령 태아 및 태반 조직에서 이 DMR 영역의 DNA 메틸화 변화와 mRNA 발현 양상을 조사하였다. 자연 종부 및 핵이식 후 35일령 태아 및 태반 조직이 시험 도축에 의해 회수되었고, mRNA 발현은 real-time PCR에 의하여 정량하였고, 메틸화 패턴은 bisulfite sequencing 법에 의하여 분석하였다. H19 유전자의 메틸화 가변 영역인 DMR은 그 전사 개시점 상류 -1694 bp에서 -1338 bp 내에 존재하였고, 이러한 DMR은 정자에서 거의 완전한 메틸화, 난자에서는 탈 메틸화로 monoallelic DNA 메틸화 패턴을 보였다. 다음으로 복제 임신 35일령 태아 간 및 태반 조직들의 DMR은 영역의 메틸화 패턴을 분석한 결과, 자연 종부는 각각의 조직에서 고 메틸화 된 반면 복제에서는 저 메틸화 양상을 보였다. 게다가 이들 조직의 mRNA 발현은 복제 태아 간, 태반 조직에서 자연종부에 비하여 모두 유의적으로 높은 발현을 보였다($p < 0.05$). 이들 결과는 H19 유전자의 비정상적인 발현과 메틸화는 불완전한 복제 태아 발달과 후성적 유전자 재구성에 영향을 주고 있음을 시사하고 있다.

참고문헌

Bell AC and Felsenfeld G. 2000. Methylation of a CTCF-de-

pendent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405:408-409.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL and Frommer M. 1994. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 22:2990-2997.

Dean W, Bowden L, Aitchison A, Moore T, Meneses JJ, Reik W and Feil R. 1998. Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: Association with aberrant phenotypes. *Development* 125: 2273-2282.

Dean W, Santos F and Reik W. 2003. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14:93-100.

Gebert C, Wernzycki C, Herrmann D, Groger D, Reinhardt R, Hajkova P, Lucas-Hahn A, Carnwath J, Lehrach H and Niemann H. 2006. The bovine IGF gene is differently methylated in oocyte and sperm DNA. *Genomics* 88:222-229.

Han DW, Im YB, Do JT, Gupta MK, Uhm SJ, Kim JH, Schoeler HR and Lee HT. 2008. Methylation status of putative differentially methylated regions of porcine IGF2 and H19. *Mol. Reprod. Dev.* 75:777-784.

Hark AT, Schonherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levores JM and Tilghman SM. 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405:486-489.

Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander ES, Golub TR and Jaenisch R. 2002. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:12889-12894.

Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM, Biniszkiwicz D, Yanagimachi R and Jaenisch R. 2001. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 293:95-97.

Inoue K, Kohda T, Lee J, Ogonuki N, Mochida K, Noguchi Y, Tanemura K, Kaneko-Ishino T, Ishino F and Ogura A. 2002. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science* 295:297.

Kang YK, Park JS, Koo DB, Choi YH, Kim SU, Lee KK and Han YM. 2000. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J.* 21:1092-1100.

Killian JK, Nolan CM, Wylie AA, Li T, Vu TH, Hoffman AR and Jirtle RL. 2001. Divergent evolution in M6P/IGF2R imprinting from the Jurassic to the quaternary. *Hum. Mol.*

- Genet. 10:1721-1728.
- Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S and Shiota K. 2005. Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *J. Biol. Chem.* 280:9627-9634.
- Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, Imai K, Takahashi S, Hashizume K, Yagi S and Shiota K. 2006. Epigenetic characterization of the CpG islands of bovine Leptin and POU5F1 genes in cloned bovine fetuses. *J. Reprod. Dev.* 52:277-285.
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25:402-428.
- Mann MR, Chung YG, Nolen LD, Verona RI, Latham KE and Bartolomei MS. 2003. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol. Reprod.* 69:902-914.
- Ogawa H, Ono Y, Shimosawa N, Sotomaru Y, Katsuzawa Y, Hiura H, Ito M and Kono T. 2003. Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. *Reproduction* 126:549-557.
- Ohgane J, Wakayama T, Kogo Y, Senda S, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R and Shiota K. 2001. DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 30:45-50.
- Park MR, Hwang IS, Shim JH, Moon HJ, Kim DH, Ko YK, Seong HH and Im GS. 2008. Effect of osmolarity of culture medium on imprinting and apoptotic gene expression in miniature pig nuclear transfer embryos. *Reprod. Dev. Biol.* 32:183-191.
- Reik W, Dean W and Walter J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293:1089-1093.
- Santos F and Dean W. 2004. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* 127:643-51.
- Shi W and Haaf T. 2002. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol. Reprod. Dev.* 63:329-334.
- Shiota K, Kogo Y, Ohgane J, Imamura T, Urano A, Nishino K, Tanaka S and Hattori N. 2002. Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells* 7:961-969.
- Szabo P, Tang SH, Rentsendorj A, Pfeifer GP and Mann JR. 2000. Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Curr. Biol.* 10:607-610.
- Thorvaldsen JL, Duran KL and Bartolomei MS. 1998. Deletion of the H19 differently methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev.* 12:3693-3702.
- Weksberg R, Shuman C and Smith AC. 2005. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 137C:12-23.
- Zhang S, Kubota C, Yang L, Zhang Y, Page R, O'Neill M, Yang X and Tian XC. 2004. Genomic imprinting of H19 in naturally reproduced and cloned cattle. *Biol. Reprod.* 71:1540-1544.

(접수: 2011. 2. 26 / 심사: 2011. 2. 26 / 채택: 2011. 3. 3)