

Uloga metilacije DNA tijekom embrionalnog razvoja životinja

Ivanković, Nina

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:119301>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-01-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**ULOGA METILACIJE DNA TIJEKOM EMBRIONALNOG
RAZVOJA ŽIVOTINJA**

**THE ROLE OF DNA METHYLATION DURING EMBRYONIC
DEVELOPMENT OF ANIMALS**

SEMINARSKI RAD

Nina Ivankovi

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Gordana Lackovi -Venturin

Zagreb, 2014.

Sadržaj

1.....	U
vod.....	2
2.....	M
etilacija DNA tijekom embrionalnog razvoja sisavaca	2
2.1.....	E
enzimatska aktivnost.....	2
2.2.....	P
promjene u metilacijskom uzorku	5
2.3.....	U
loga metilacije DNA	7
3.....	L
literatura.....	12
4.....	S
sažetak.....	13
5.....	S
summary.....	13

1. Uvod

DNA metilacija je epigeneti ka modifikacija prona ena u genomu višestani nih organizama. U beskralješnjaka, poput *Drosophila melanogaster* (L.), DNA metilacija je prisutna u niskim razinama tijekom ranog embrionalnog razvoja, ali nije prisutna u odraslih jedinki (Lyko i sur. 2000). U kralješnjaka je DNA metilacija prona ena u somatskim i u nediferenciranim stanicama (Geiman i Muegge 2010). Upravo zbog toga se istraživanja, koja podrobnije ispituju ulogu metilacije DNA, baziraju na eksperimentima provedenima na kralješnjacima. Unutar kralješnjaka preferiraju se sisavci pošto sam ovjek, *Homo sapiens*, spada u navedeni razred. Više o ulozi DNA metilacije želi se saznati istraživanjem metilacije u stanicama odraslih jedinki te jedinki tijekom njihova razvoja. U ovom seminaru bavit emo se ulogom metilacije DNA tijekom embrionalnog razvoja sisavaca. Model korišten tijekom istraživanja je miš, *Mus musculus* (L.) (Geiman i Muegge 2010, Combes i Whitelaw 2010). Stanice na kojima je provedeno istraživanje su oplo ena jajna stanica, zigota, stanice specifi nih razvojnih stadija poput embrionalnih mati nih stanica (ESC) te spolne prastanice i germinativne stanice (Combes i Whitelaw 2010).

2. Metilacija DNA tijekom embrionalnog razvoja sisavaca

2.1. Enzimatska aktivnost

Metilacija DNA provodi se DNA metiltransferazama (Dnmt) (Lyko i sur. 2000). Dnmt prenosi metilnu skupinu sa kofaktora S-adenozil-L-metionina na ⁵C atom citozina ime nastaje 5-metil citozin (sl. 1). U sisavaca citozin se metilira najviše u sklopu CpG dinukleotida. ak je 80% od svih CpG dinukleotida metilirano (Geiman i Muegge 2010). CpG dinukleotid komplementarno je vezan za istu sekvencu na drugom lancu DNA, lancu suprotne orijentacije. Time se omogu ava naslje ivanje metilacijskog uzorka direktno na

novosintetizirani lanac tijekom replikacije DNA (sl. 2). Nasljeđivanje metilacijskog uzorka provodi se DNA metiltransferazom 1 (Dnmt1) (Alberts i sur. 2008). Dnmt1 lokalizirana je u području replikacijske vilice. Pcna i Np95 su proteini koji pomažu Dnmt1 u što vjernijem prenošenju metilacijskog uzorka sa „starog“ na novosintetizirani lanac DNA. Uz Dnmt1 u DNA metiltransferaznu skupinu enzima ubrajamo i Dnmt3a i Dnmt3b. Oni, za razliku od Dnmt1 vrše *de novo* metilaciju. Dnmt3l je protein koji interagira s *de novo* Dnmt enzimima i povećava efikasnost metilacije (sl. 3). Ciljanom delecijom Dnmt enzima u miša dolazi do inhibiranja razvoja embrija tijekom ranih razvojnih stadija. Osim delecije, može doći i do određenih mutacija kako u Dnmt tako i u proteinima s kojima oni interagiraju. Mutacijom se može uzrokovati ili smanjena aktivnost Dnmt enzima ili se onemogućuje interakcija Dnmt s drugim proteinima esencijalnim u metilacijskom procesu. Sve navedeno dovodi do pojave različitih poremećaja u odrasloj dobi (Geiman i Muegge 2010).

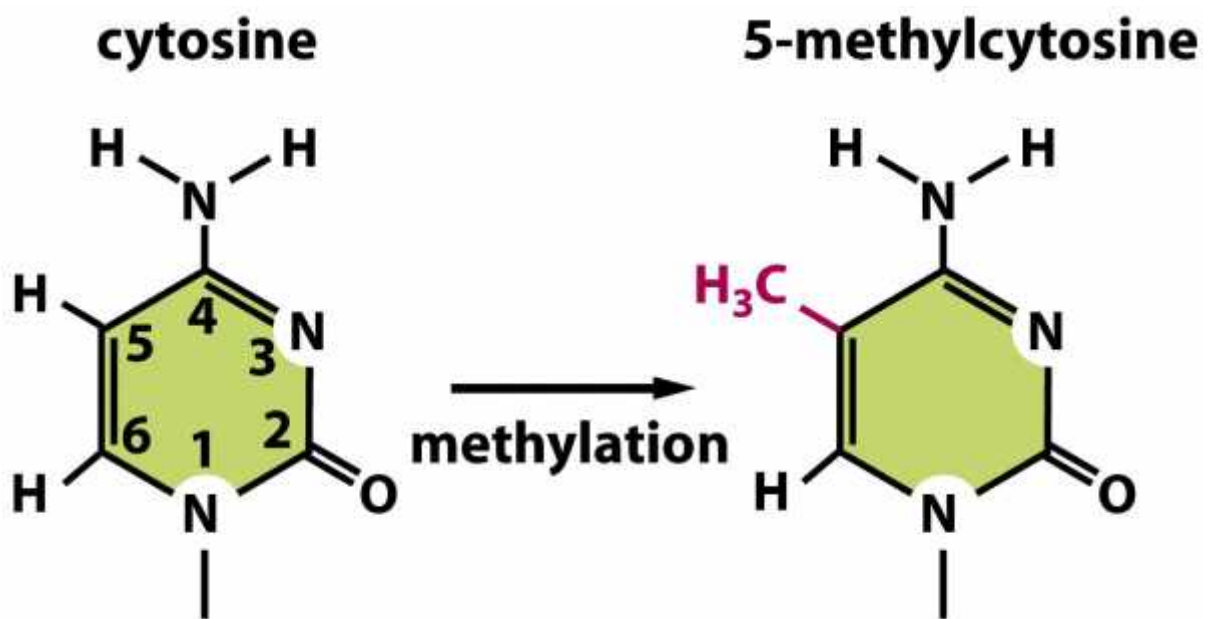


Figure 7-79 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Slika 1. DNA metilacija (preuzeto iz Alberts i sur. 2008).

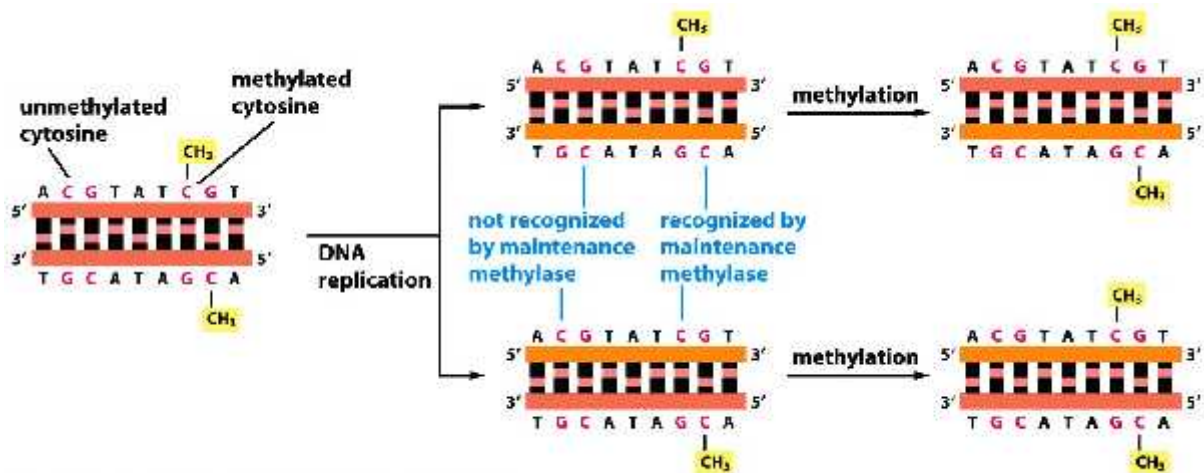
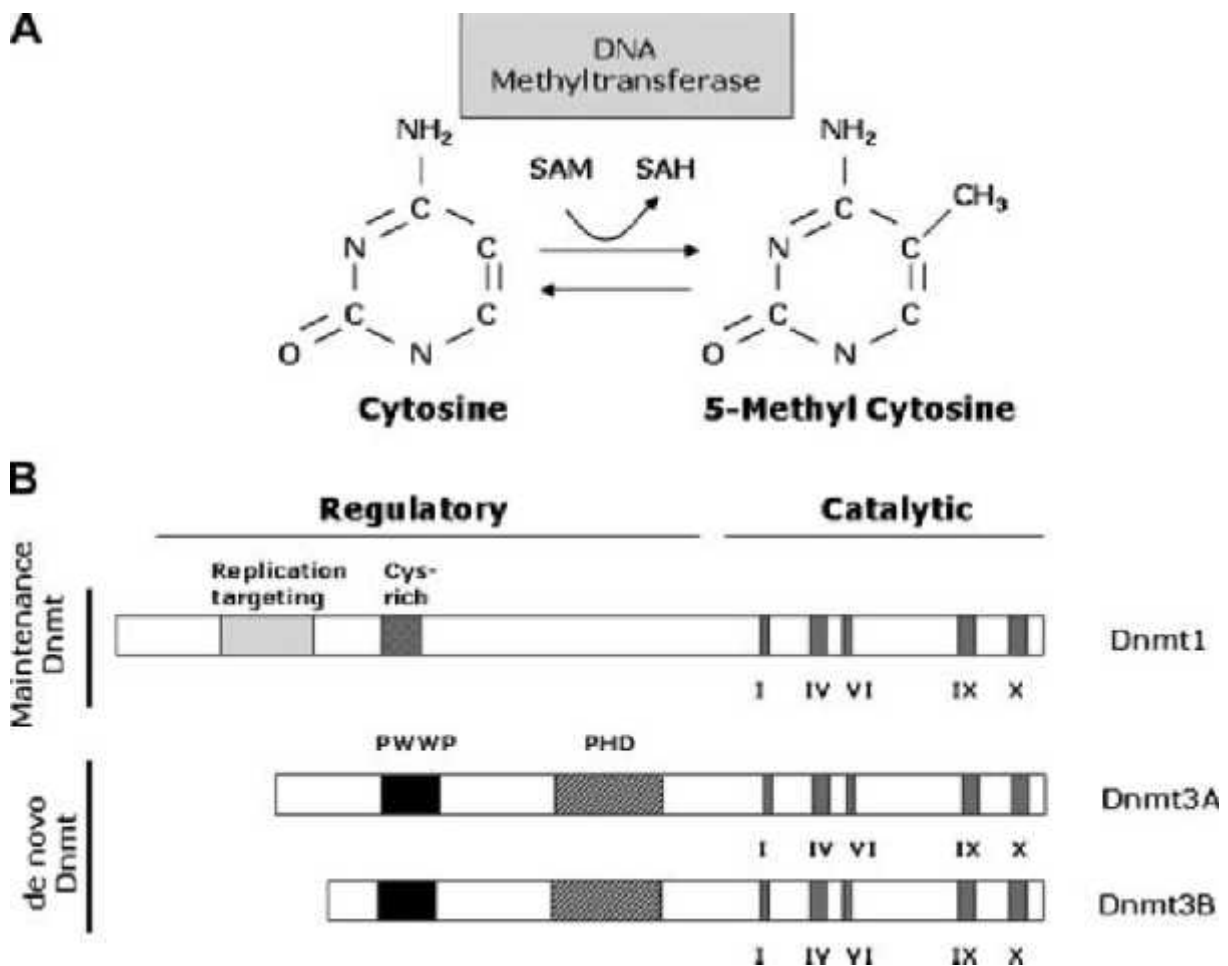


Figure 7 B0 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Slika 2. Održavanje metilacijskog uzorka kroz replikacijske cikluse putem Dnmt1 (maintenance methylase) (preuzeto iz Alberts i sur. 2008).



Slika 3. DNA metiltransferaze. A: Do DNA metilacije dolazi DNA metiltransferaznim (Dnmt) enzimima. Donor metilne skupine je S-adenozil metionin (SAM), a nakon metilacije SAM postaje S-adenozil homocistein (SAH). B: Prikaz katalitičkih i regulatornih domena Dnmt. Katalitičke domene označene su rimskim brojevima.

Regulatorne domene su različite u Dnmt1 i de novo Dnmt, a određuju s kojim proteinima će Dnmt interagirati te mjesta na koja će se vezati (preuzeto iz Geiman i Muegge 2010).

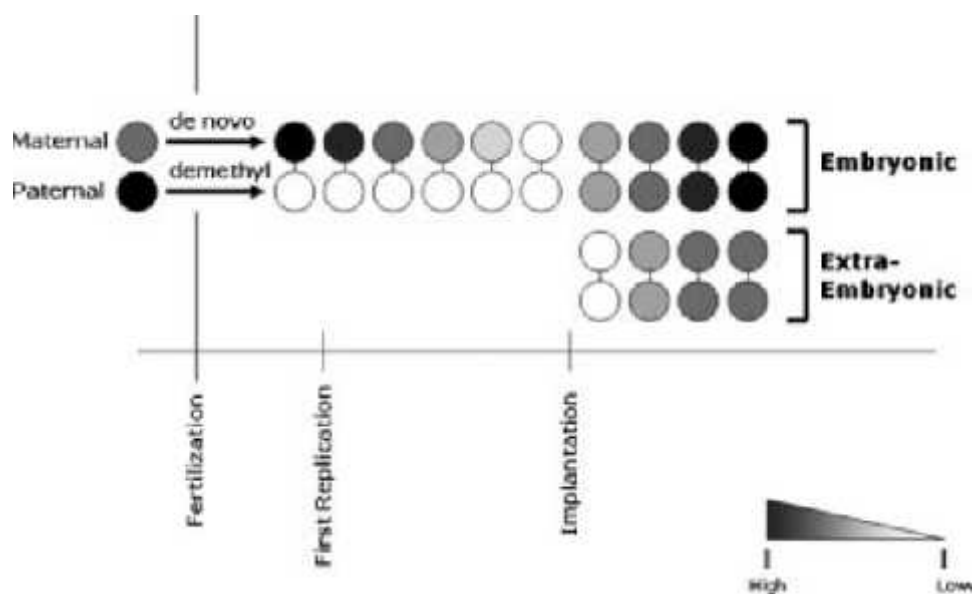
Uz metilaciju DNA tijekom embrionalnog razvoja javlja se i demetilacija. Demetilacija DNA može biti pasivna i aktivna. Kao pasivan proces javlja se uslijed inhibiranog djelovanja enzima Dnmt1. Spomenuti enzim se tijekom pasivne demetilacije normalno sintetizira u citoplazmi, ali se i zadržava u istom staničnom odjeljku pa je njegovo djelovanje na DNA u jezgri onemogućeno. Pasivnom demetilacijom DNA se demetilira tijekom više replikacijskih ciklusa (Geiman i Muegge 2010). Uz pasivnu, u stanici se provodi i aktivna demetilacija. Do danas nije otkriven mehanizam aktivne demetilacije te postoji više modela. Jedan od modela aktivne demetilacije smatra da do nje dolazi djelovanjem ten-eleven translocation 1 (TET1) enzima. TET1 oksidira 5-metil citozin u 5-hidroksimetil citozin. Baza 5-hidroksimetil citozin se potom izrezuje djelovanjem timin DNA glikozilaze, a tijekom daljnjeg popravka, navedena baza se zamjenjuje nemetiliranom bazom citozin (Kohli i Zhang 2013). Drugi model pretpostavlja da do aktivne demetilacije dolazi djelovanjem Activation induced cytidine deaminase (Aid ili Aicda) i Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1 (ApoBec1) enzima. Aid i ApoBec1 deaminiraju 5-metil citozin u timin. Popravkom T:G krivo sparenog baznog para dobivamo demetilirani citozin bez pojave ikakvih mutacija (Combes i Whitelaw 2010).

2.2. Promjene u metilacijskom uzorku

Unutar oplojene jajne stanice genom oca je hipermetiliran u odnosu na genom majke i po njemu se aktivno demetilirati. Aktivna demetilacija traje do prve asimetrične diobe zigote, a demetiliraju se različite regije u genomu poput ponavljajućih elemenata te tkivno-specifičnih i *housekeeping* gena. Demetilacija ne zahvaća gene poput H19 koji su utisnuti u oboje genomu. Unutar zigote, uz demetilaciju oboje genoma, također dolazi i do metilacije majinog genoma putem *de novo* metiltransferazne aktivnosti. Metilacija majinog i demetilacija oboje genoma omogućeni su njihovom razmjerno velikom prostornom udaljenošću u unutar zigote i/ili razlikom u kromatinskoj strukturi. Različita kromatinska struktura pogodovala bi djelovanju enzima, specifičnih za jedan od dva navedena procesa, na određenu roditeljsku DNA molekulu. Nakon prve diobe zigote, majin genom se po njemu demetilirati. Demetilacija je pasivna, a osim majinog zahvaća i oboje genom. Ovaj sekundarni val demetilacije na majinom genomu pogađa različite skupine gena. Regije koje nisu zahvaćene demetilacijom

su kontrolna regija utisnutih gena te IAP ponavljaju i elementi kod kojih je demetilacija minimalna. Do stadija morule pasivna demetilacija roditeljskih genoma prestaje i oni se nalaze na podjednako niskoj razini DNA metilacije (Geiman i Muegge 2010).

Od stadija morule razina DNA metilacije raste (Geiman i Muegge 2010). Morula je nakupina vrsto zapakiranih stanica, blastomera koje se diferenciraju u stanice trofoblasta, iz kojih nastaje fetalni dio placente, i embrioblasta (iliti unutarnje stani ne mase, ICM) (<http://en.wikipedia.org>), iz kojih nastaje embrio (<http://www.mhhe.com>). Stanice embrioblasta razlikuju se od stanica trofoblasta po ve oj razini DNA metilacije. Pove ana razina metilacije u stanicama embrioblasta zadržava se tijekom daljnjeg razvoja pa tako i fetusno somatsko tkivo ima ve u razinu DNA metilacije od placente (sl. 4). Održavanje razlike u DNA metilaciji izme u navedenih stanica, tkiva esencijalno je za normalan razvoj embrija. Narušavanje ove razlike u kloniranim embrijima doprinosi prekidu embrionalnog razvoja (Geiman i Muegge 2010). Uz razliku u razini DNA metilacije embrionalne mati ne stanice (ESC), koje tvore embrioblast, razlikuju se od stanica trofoblasta i u genskoj ekspresiji. U ESC ekspimiraju se transkripcijski faktori octamer-binding 4 (Oct4) te Nanog homeobox (Nanog), a u stanicama trofoblasta caudal type homeobox 2 (Cdx2) (Combes i Whitelaw 2010).



Slika 4. Promjena u DNA metilacijskom uzorku tijekom embrionalnog razvoja. Crna boja ozna čava visoku, a bijela nisku razinu DNA metilacije (preuzeto iz Geiman i Muegge 2010).

Embrionalne mati ne stanice su pluripotentne te se stoga diferenciraju u različite stani ne tipove. Diferencijacija ESC se može inducirati tijekom njihova uzgoja u kulturi *in*

in vitro što je omogućilo istraživanja koja uspoređuju nediferencirane ESC sa somatskim (ili djelomično diferenciranim) derivatima. Somatske stanice razlikuju se od ESC prema većoj razini metilacije prisutne u promotorskim regijama specifičnih gena. Specifični geni, kod kojih DNA metilacija uzrokuje utišavanje genske ekspresije, su pluripotentni geni, Oct4 i Nanog, Hox i Pax obitelji razvojnih gena te tkivno-specifični geni. Metilacijom promotorskih regija tkivno-specifičnih gena možemo regulirati njihovu ekspresiju. Tkivno-specifična genska ekspresija vidljiva je u SERPINB5 gena. Ovaj potencijalni tumor supresor gen ekspresiran je u epitelijalnom tkivu dojke, dišnih puteva, kože i prostate, ali ne u fibroblastima, limfocitima, srcu i bubregu. Do inhibiranja transkripcije dolazi metilacijom CpG otoka u promotorskoj regiji gena, a re-ekspresija u fibroblasta postiže se demetilacijom navedenog područja (Geiman i Muegge 2010). Istraživanja su također pokazala da svaka stanična linija posjeduje jedinstven metilacijski uzorak što, ako znamo da DNA metilacija uzrokuje tkivno-specifičnu gensku ekspresiju (Geiman i Muegge 2010), dodatno doprinosi zaključku da je DNA metilacija jedna od mehanizama koji uzrokuju diferencijaciju nediferenciranih stanica.

Iz epiblasta, diferencijacijom potaknutom stanicama izvanembrionalnog ektoderma i visceralnog endoderma, nastaju spolne prstanice. One najprije migriraju u ekstraembrionalni mezoderm iz kojeg se vraćaju nazad u embrio (<http://www.springer.com>), u područje posteriornog endoderma. Iz endoderma, spolne prstanice migriraju u područje genitalnih nabora (<http://php.med.unsw.edu.au>). Svaka spolna prstanica, prije dolaska do genitalnih nabora, sadrži specifičan epigenetički program koji se sastoji od roditeljskih utisaka te markera naslijeđenih od ostalih predaka. Epigenetičko reprogramiranje nastupa povodom dolaska prstanica u područje genitalnih nabora, a podrazumijeva brzu, aktivnu demetilaciju DNA. U muškim germinativnim stanicama demetilira se 60%, a u ženskim spolnim stanicama 70% DNA. Demetilacija pogađa većinu klasa genomskih elemenata s iznimkom retrotranspozona s long terminal repeats (LTR) sekvencama. Metilacija ovog pokretnog genetičkog elementa, osim što je esencijalna za stabilnost genoma, je transgeneracijski nasljedna (Combes i Whitelaw 2010).

2.3. Uloga metilacije DNA

Kao što smo već napomenuli u prethodnom poglavlju, nakon fertilizacije dolazi do demetilacije koja zahvaća oba genoma i traje do stadija morule. Od stadija morule *de novo* metiltransferaznom aktivnošću dolazi do ponovne metilacije. Dnmt3a i Dnmt3b odgovorni su

za uspostavljanje novih DNA metilacijskih uzoraka koji se naslijeđuju tijekom niza replikacijskih ciklusa enzimatskom aktivnošću u Dnmt1. DNA metilacijom dolazi do represije genske ekspresije (Alberts i sur. 2008). Do represije, osim DNA metilacijom, može doći i komplementarnim vezanjem nekodirajuće RNA na DNA, regrutiranjem histonskih deacetilaza putem metil-DNA vezanih proteina ili samih Dnmt, regrutiranjem heterokromatinskih enzima i drugim mehanizmima (Geiman i Muegge 2010). DNA metilacija uzrokuje utišavanje genske ekspresije putem metilacije promotorskih regija ili regulatornih sekvenci određenog gena. Time se sprečava vezanje proteina specifičnih za inicijaciju transkripcije. Sama stanica dodatno sadrži niz proteina koji specifičnim vezanjem na metiliranu DNA također blokiraju pristup drugim proteinima. DNA metilacija kao jedan od mehanizama represije osigurava da se unutar stanice ne transkribiraju nepotrebni geni (Alberts i sur. 2008). Pošto znamo da su u svakom staničnom tipu ekspimirani određeni, tkivno-specifični geni te da svaki stanični tip posjeduje jedinstven metilacijski uzorak (Geiman i Muegge 2010) možemo zaključiti da je DNA metilacija potrebna tijekom stanične diferencijacije. To je dodatno potvrđeno spoznajom da je DNA metilacija, promjenom kromatinske strukture, uključena u regulaciju razvojnog potencijala te identiteta stanice (Combes i Whitelaw 2010).

Stanična diferencijacija samo je jedna od posljedica djelovanja metilacije na kromatinsku strukturu DNA. DNA metilacijom inaktivira se X kromosom u ženke sisavca. Inaktivacija X spolnog kromosoma u ženki je nužna radi kompenzacije doze. Kompenzacija doze podrazumijeva da oba spola imaju jednaku količinu genskih produkata u svojim stanicama. Pošto ženke u svojim stanicama sadrže dva X spolna kromosoma, a mužjaci samo jedan, u ženki dolazi do inaktivacije jednog X kromosoma. Do inaktivacije dolazi kada ženski embrio ima nekoliko tisuća stanica, a sama inaktivacija je slučajna. Daljnjom mitozom sve stanice nastale iz stanice u kojoj je početnom inaktivacijom aktivna određena kopija X kromosoma imaju i inaktiviranu majčinu kopiju X kromosoma (sl. 5). Premda DNA metilacija doprinosi inaktivaciji X kromosoma putem genske represije, inicijacija same inaktivacije potaknuta je ekspresijom XIST RNA, nekodirajuće RNA u području X-inaktivacijskog središta (X-inactivation center, XIC). XIST RNA nastaje isključivo transkripcijom s inaktivnog X kromosoma, pošto je promotorska regija XIST gena na aktivnom X kromosomu metilirana. XIST transkript se ne translacira već se veže duž inaktivnog X kromosoma, od XIC prema krajevima kromosoma, te uz DNA metilaciju također doprinosi utišavanju genske ekspresije (Alberts i sur. 2008).

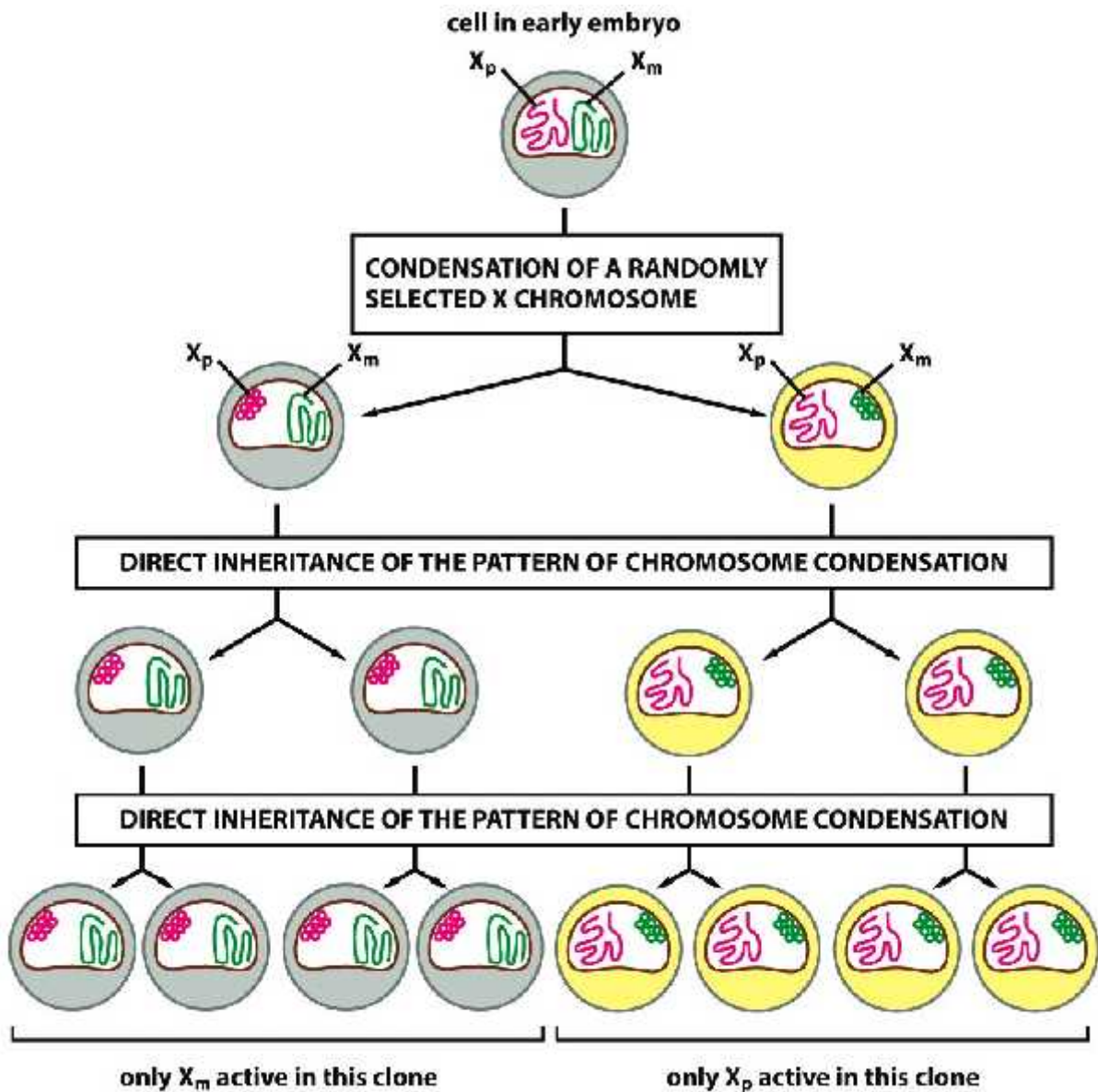


Figure 7-89 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Slika 5. Inaktivacija X kromosoma u ženki sisavaca (preuzeto iz Alberts i sur. 2008).

Putem još jedne nekodirajuće RNA, RNA Airn inicira se post-implantacijski utisak Igf2r. Igf2r je utisnuti gen (Geiman i Muegge 2010). Ekspresija utisnutih gena je specifična jer ovisi o tome da li je alel utisnutog gena potekao od majke ili od oca. Tako se na primjer u stanici transkribira samo o ev alel određenog utisnutog gena dok je transkripcija majinog alela utišana. DNA metilacija jedna je od oznaka putem kojih raspoznavamo majin od o evog alela utisnutog gena. U nekim slučajevima metilacija ne utišava već aktivira ekspresiju specifičnog alela utisnutog gena (sl. 6). Brojni utisnuti geni bitni su u fetalnom razvoju, ali odluka koja se kopira transkribirati određena je već u germinativnim stanicama. U spolnim stanicama demetilacijom se briše utisak pa, ako se utisnuti gen transkribira s majinog alela,

tada u jajnoj stanici nije prisutna metilacija bilo da alel utisnutog gena potječe od oca ili od majke. Metilacija oba alela utisnutog gena prisutna je u spermalnoj stanici (sl. 7). Nakon oplodnje, pošto utisnuti geni nisu podložni demetilaciji u zigoti i stanicama koje se diferenciraju u somatske stanice, genomski utisak je bitan kako tijekom fetalnog razvoja tako i do kraja života odrasle jedinke (Alberts i sur. 2008).

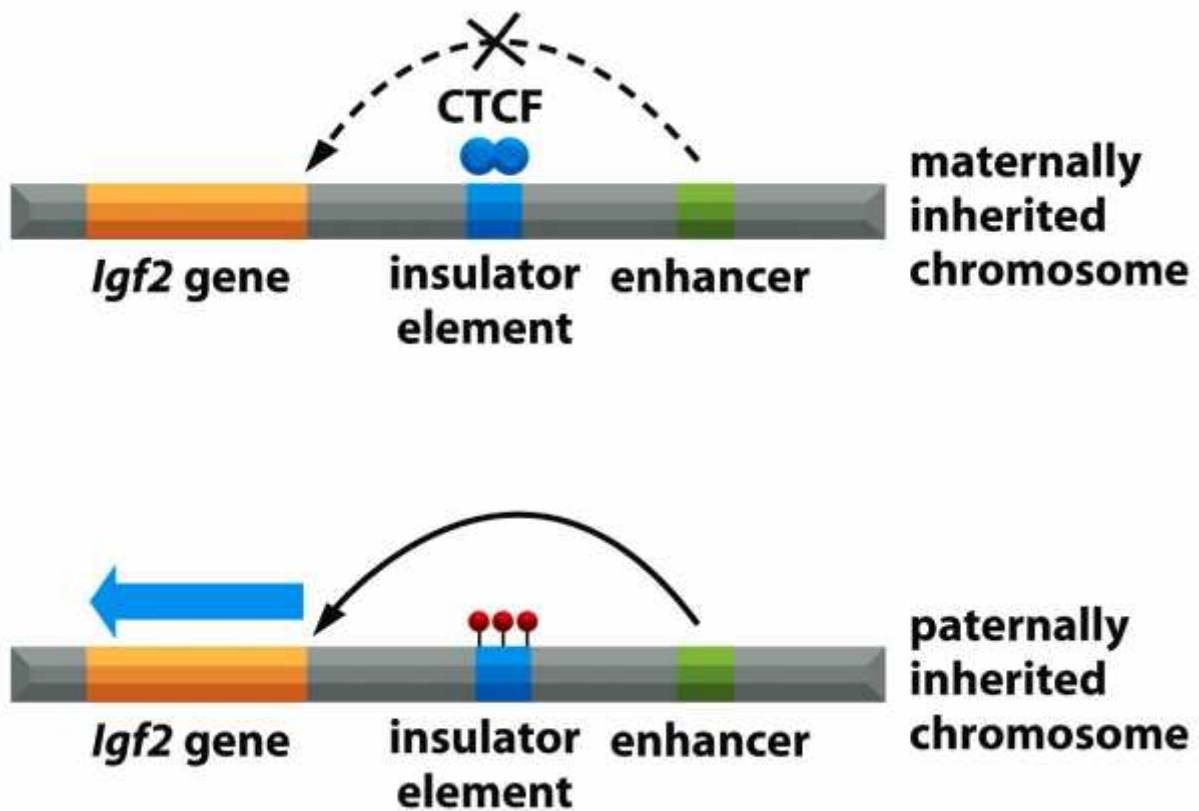


Figure 7-83 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Slika 6. Genomski utisak *Igf2* gena. DNA metilacijom izolacijskog geneti kog elementa (insulator element, plavo) omogućuje se interakcija pojačivača (enhancer, zeleno) i *Igf2* gena (naranasto) i time dolazi do njegove transkripcije (preuzeto iz Alberts i sur. 2008).

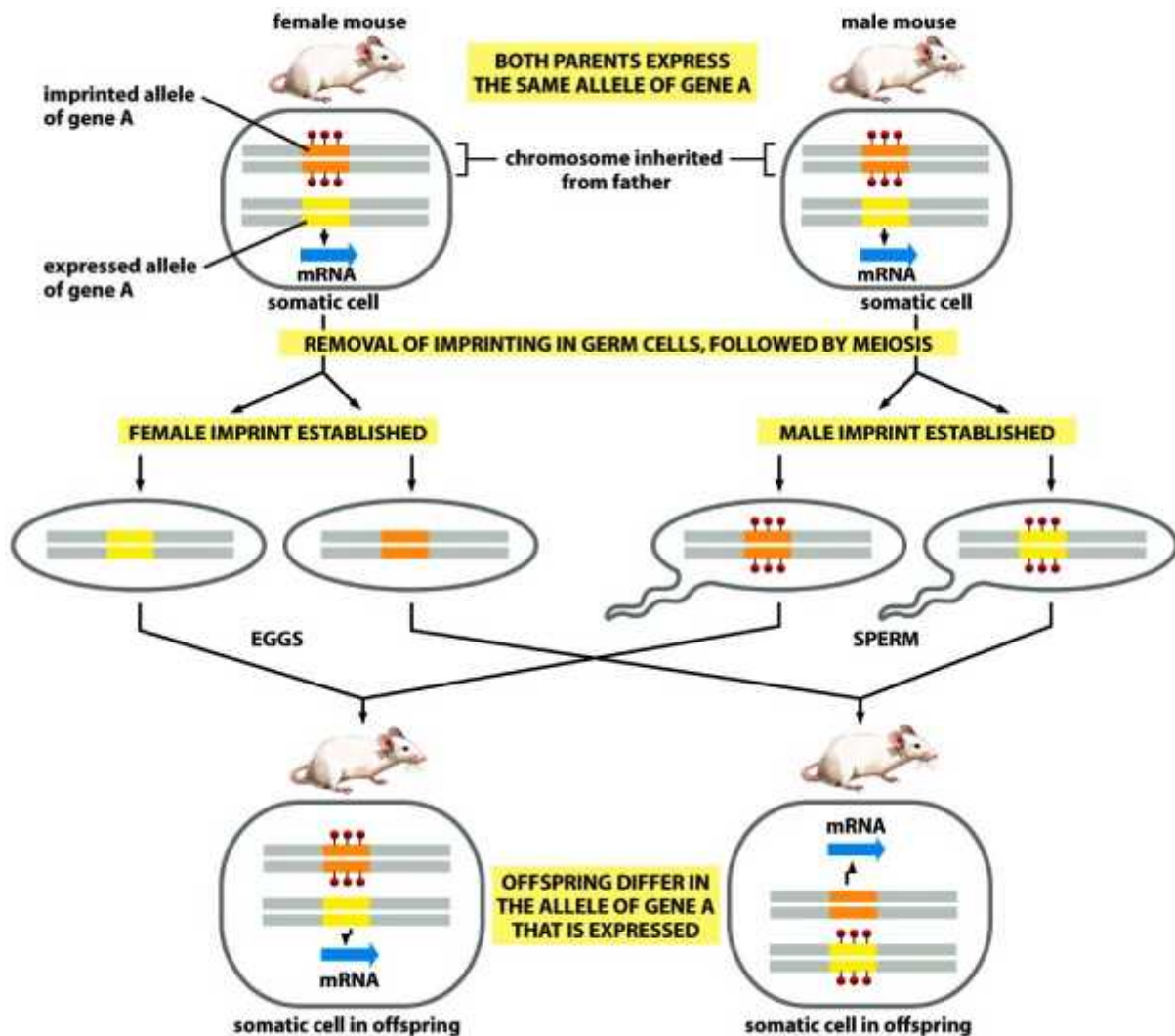


Figure 7-82 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

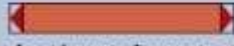


Slika 7. Genomski utisak. U somatskim stanicama, ženke ili mužjaka, ova kopija utisnutog gena (naranasto) je metilirana i inhibirana joj je transkripcija. Materna kopija utisnutog gena (žuto) nije metilirana te se provodi transkripcija. Tijekom formiranja spolnih stanica, ali prije mejoze, u ženskim germinativnim stanicama uklanja se metilacija s ove kopije, a u muškim spolnim stanicama se metilira materna kopija utisnutog gena. Nakon oplodnje u somatskoj stanici potomka metilirana je uvijek ova kopija gena bilo da ju je otac naslijedio od svoje majke ili od svoga oca (preuzeto iz Alberts i sur 2008).

Uz genomski utisak, stani nu diferencijaciju te inaktivaciju X kromosoma, DNA metilacijom također inaktiviramo transpozone (Combes i Whitelaw 2010) i retrotranspozone (Geiman i Muegge 2010). Transpozoni i retrotranspozoni su pokretni geneti ki elementi (tab. 1). Oni ine veliki dio našeg genoma, „sebi nu DNA“, a specifi ni su po tome što se ne mogu izbaciti iz stanice. Inaktivacijom njihove transpozicije spreava se njihovo kretanje po genomu time se on stabilizira. Genom je stabiliziran inaktivacijom transpozicije jer se njome

sprje avaju spontane mutacije. Spontanim mutacijama naj eš e dolazi do delecije gena pa, ako je deletirani gen esencijalan, mutacija je letalna (Alberts i sur. 2008).

Tablica 1. Tri klase pokretnih geneti kih elemenata (PGE) (preuzeto iz Alberts i sur. 2008).

Table 5–3 Three Major Classes of Transposable Elements

CLASS DESCRIPTION AND STRUCTURE	SPECIALIZED ENZYMES REQUIRED FOR MOVEMENT	MODE OF MOVEMENT	EXAMPLES
DNA-only transposons			
 short inverted repeats at each end	transposase	moves as DNA, either by cut-and-paste or replicative pathways	P element (<i>Drosophila</i>) Ac-Ds (maize) Tn3 and Tn10 (<i>E. coli</i>) Tam3 (snapdragon)
Retroviral-like retrotransposons			
 directly repeated long terminal repeats (LTRs) at each end	reverse transcriptase and integrase	moves via an RNA intermediate produced by a promoter in the LTR	Copia (<i>Drosophila</i>) Ty1 (yeast) THE1 (human) Bs1 (maize)
Nonretroviral retrotransposons			
 Poly A at 3' end of RNA transcript; 5' end is often truncated	reverse transcriptase and endonuclease	moves via an RNA intermediate that is often produced from a neighboring promoter	F element (<i>Drosophila</i>) L1 (human) Cin4 (maize)

These elements range in length from 1000 to about 12,000 nucleotide pairs. Each family contains many members, only a few of which are listed here. In addition to transposable elements, some viruses can move in and out of host cell chromosomes by transpositional mechanisms. These viruses are related to the first two classes of transposons.

Table 5-3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Prikaz strukture svake klase PGE te opis na ina kretanja po genomu, uz navode enzima koji provode kretanje, specifi no za svaku klasu. Dano je i par primjera za svaku klasu PGE.

3. Literatura

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2008. Molecular biology of the cell 5th edition, 316-317; 467-476.

Combes A. N., Whitelaw E. 2010. Epigenetic reprogramming: Enforcer or enabler of developmental fate? *Development, Growth & Differentiation* 52, 483-491.

Geiman T. M., Muegge K. 2010. DNA methylation in Early Development. *Molecular Reproduction & Development* 77, 105-113.

Kohli R. M., Zhang Y. 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA methylation. *Nature* 502, 472-479.

Lyko F., Ramsahoye B. H., Jaenisch R. 2000. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408, 538-540.

http://en.wikipedia.org/wiki/Inner_cell_mass

http://www.mhhe.com/biosci/genbio/raven6b/graphics/raven06b/other/raven06_60.pdf

http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Primordial_Germ_Cell_Development#Mouse_Migration_Movies

http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9780857298256-c1.pdf?SGWID=0-0-45-1355210-p174127463

4. Sažetak

DNA metilacija provodi se DNA metiltransferazama 1, 3a i 3b. Dnmt1 omogućava nasljeđivanje metilacijskog uzorka sa „starog“ na novosintetizirani lanac DNA tijekom svake DNA replikacije. Dnmt 3a i 3b uspostavljaju novi metilacijski uzorak putem vlastite *de novo* metiltransferazne aktivnosti. Dnmt1, 3a i 3b esencijalni su tijekom razvoja jer je njihovom delecijom inhibiran razvoj embrija, a uslijed njihove mutacije ili mutacije proteina s kojima surađuju, prije i se normalan razvoj i uzrokuju teški poremećaji. Metilacijom DNA u kromatinsku strukturu uvodimo promjene koje onemogućavaju enzimima, transkripcijskim faktorima itd., pristup DNA. Onemogućavanje pristupa DNA dovodi do utišavanja genske ekspresije, ali, kao što smo vidjeli na primjeru genomskog utiska, DNA metilacijom možemo i potaknuti gensku ekspresiju. DNA metilacija stoga, tijekom embrionalnog razvoja, omogućava staničnu diferencijaciju, formiranje genomskog utiska u germinativnim stanicama, ekspresiju utisnutih gena u stanicama na različitom stupnju diferencijacije, inaktivaciju X kromosoma u ženki te inaktivaciju pokretnih genetičkih elemenata.

5. Summary

DNA methylation is carried out by DNA methyltransferases 1, 3a and 3b. Dnmt1 ensures that DNA methylation pattern is maintained after each cell division. Dnmt3a and Dnmt3b are responsible for establishment of new DNA methylation pattern by their *de novo* methyltransferase activity. Dnmt 1, 3a and 3b are known to be essential during embryonic development because targeted deletion of any one of them leads to developmental arrest at early stages of development and because mutations in Dnmt or proteins that cooperate with Dnmt impair normal development leading to severe disorders. DNA methylation changes the chromatin structure and with it changes the accessibility of DNA which leads to gene silencing or activation of gene expression, showed by the example of imprinted genes. Changes mentioned above, caused by DNA methylation, are known to be involved in cellular

differentiation, formation of genomic imprinting in germ cells, expression of imprinted genes in cells on different differentiation levels, X chromosome inactivation and silencing of mobile genetic elements.