Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Predikce imprintovaných genů u hlodavců

Bakalářská práce

Michaela Kazíková

Vedoucí práce: Mgr. Lenka Gahurová, Ph.D.

České Budějovice 2023

Kazíková, M., 2023. Predikce imprintovaných genů u hlodavců. [Prediction of imprinted genes in rodents. Bc. Thesis, in Czech.] – 73 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis was focused on imprinted genes of rodents. Mouse imprinted genes and their characteristics, which have been previously identified, were used as a template for this research. The aim was to bioinformatically predict germline differentially methylated regions and associated imprinted genes of rat and naked mole-rat, experimentally confirm these results and compare identified potentially imprinted genes in these species with imprinted genes in mice.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice, 8.12.2023 .....

Michaela Kazíková

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí práce Mgr. Lence Gahurové Ph.D. zejména za obrovskou pomoc a nekonečnou trpělivost, kterou se mnou měla po celou dobu tvorby této bakalářské práce. Dále jí musím poděkovat za vytvoření velmi přátelské atmosféry, celá práce s ní se nesla ve velmi kamarádském duchu, čehož si velmi vážím. V neposlední řadě jí musím poděkovat za velmi pečlivé zasvěcení do pro mě zcela nového tématu a za ochotu mi odpovídat na miliony otázek, které jsem na ní během celé práce měla. Mé velké díky samozřejmě patří také mé rodině a příteli, kteří mi byli obrovskou oporou po celou dobu psaní této práce.

Obsah

1 Úvod ... 1
1.1 Genomický imprinting ... 1
1.2 Objevení genomického imprintingu ... 2
1.3 Ustanovení genomického imprintingu ... 2
1.4 Metylace jako nástroj imprintingu ... 3
1.5 Hypotézy evolučního vzniku imprintingu ... 5
1.5.1 Teorie sexuálního antagonismu ... 5
1.5.2 Teorie příbuzenství ... 5
1.5.3 Teorie parentálního konfliktu ... 6
1.6 Genomický imprinting u myší ... 7
1.6.1 Obecné informace o myším genomu ... 7
1.6.2 Charakteristika imprintovaných oblastí myších oocytů ... 8
1.6.2.1 Transkripce ... 8
1.6.2.2 CpG ostrovy ... 8
1.6.2.3 TGCCGC sekvence ... 9
1.6.3 Přehled genů, které ve svém promotoru nebo genovém těle obsahují maternálně metylovaný gDMR ... 9
1.6.3.1 *H13/Mcts2* gDMR ... 9
1.6.3.2 *Blcap/Nnat gDMR* ... 10
1.6.3.3 Gnas/Nespas gDMR ... 11
1.6.3.4 *Peg10/Sgce gDMR* ... 12
1.6.3.5 *Peg3/Usp29 gDMR* ... 13
1.6.3.6 Snrpn gDMR ... 14
1.6.3.7 *Inpp5f gDMR* ... 14
1.6.3.8 *Kcnq1/Kcnq1ot1 gDMR* ... 15
1.6.3.9 Plagl1 gDMR ... 15
1.6.3.10 Grb10 gDMR ... 16
1.6.3.11 *Commd1/Zrsr1 gDMR* ... 16
1.6.3.12 *Trappc9/Peg13 gDMR* ... 17
1.6.3.13 Slc38a4 gDMR ... 18
1.6.3.14 *Igf2r/Airn gDMR* ... 18
1.6.3.15 Impact gDMR ... 19
1.6.3.16 Mest gDMR ... 19
1.6.3.17 *Herc3/Nap1l5 gDMR* ... 20

1.6.3.18 Cdh15 gDMR 21
1.7 Genomický imprinting u dalších savců 21
1.7.1 Genomický imprinting u člověka 21
1.7.2 Genomický imprinting u potkana 22
1.7.3 Genomický imprinting u krávy 23
2 Cíle práce 24
3 Metody a materiál 25
3.1 Bioinformatická část 25
3.2 Laboratorní část 28
3.2.1 Získávání vzorků z izolace DNA 28
3.2.2 Bisulfitová konverze 29
3.2.3 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) 30
4 Výsledky 35
4.1 Bioinformatická část 35
4.2 Laboratorní část 41
5 Diskuse 47
6 Závěr 50
7 Použité zdroje 52
8 Internetové zdroje a databáze 72
9 Přílohy 73

1 Úvod

1.1 Genomický imprinting

Diploidní organismy nesou v genomu svých buněk dvě sady chromozomů – jednu od matky, jednu od otce. Z pohledu mendelovské genetiky mají jak maternálně, tak paternálně zděděné alely homologních chromozomů stejný potenciál pro svou expresi, tj. alela zděděná od matky se podílí na vzniku následných produktů stejným dílem jako alela zděděná od otce. Genomický imprinting se však této teorii vymyká. Genomický imprinting je fenomén, jehož příčinou dochází pomocí epigenetického značení v kontrolní oblasti k nerovnoměrné expresi rodičovských alel v závislosti na pohlaví, od kterého byly zděděny. Epigenetické značení (nejčastěji metylace DNA) umlčuje jednu z rodičovských alel, a exprese tak probíhá jenom z jedné alely. Takto umlčené geny jsou známy jako imprintované geny (Kobayashi, 2021). Ze živočichů se imprinting vyskytuje jenom u savců.

Většina imprintovaných genů není v genomu rozmístěna rovnoměrně, nýbrž se vyskytují v klastrech (Barlow & Bartolomei, 2014). Každý z klastrů je pod kontrolou tzv. kontrolního regionu pro imprinting (anglicky imprinting control region, ICR), což je úsek DNA, který může být metylovaný, a ovlivňuje transkripci genů v daném klastru (Bartolomei & Ferguson-Smith, 2011). Metylace ICR je zavedena už v zárodečné linii, samičí nebo samčí, a proto se tyto regiony nazývají také zárodečné diferenciálně metylované oblasti (anglicky germline differentially methylated regions, gDMRs). Tato metylace je rezistentní vůči demetylaci v raném embryonálním vývoji. Geny pod kontrolou ICR značeného DNA metylací se nazývají kanonické imprintované geny. Naproti tomu nekanonické imprintované geny nemají původně ICR s DNA metylací, nýbrž mají v kontrolním regionu na jedné alele kompaktnější chromatin s represivní histonovou modifikací, trimetylací lysinu 27 na histonu 3 (H3K27me3). Díky kompaktnímu chromatinu je opět dosaženo monoalelického umlčení exprese genu. H3K27me3 se ale během embryogeneze ztrácí a je nahrazeno monoalelickou DNA metylací (Chen & et al, 2020; Inoue et al., 2017). V této práci se budeme zabývat jenom kanonickým imprintingem.

Genomický imprinting má největší vliv zejména na vývoj embrya během embryogeneze, jak je také znázorněno pokusy laboratoří J. McGratha a a D. Soltera v následující kapitole. Nesprávně nastavený genomický imprinting u jednotlivých klastrů, kdy

jsou exprimovány obě alely, anebo naopak ani jedna, je původem nemála vrozených vad jako například Prader-Williho či Silver-Russellova syndromu (Butler & Palmer, 1983; Nicholls et al., 1989).

1.2 Objevení genomického imprintingu

V roce 1984 laboratoře Jamese McGratha a Devora Soltera zveřejnily přelomovou informaci o existenci fenoménu, který popírá dosud známou mendelovskou genetiku. V rámci svých experimentů vytvořily embrya obsahující dvě sady chromozomů vždy jen od jednoho pohlaví rodiče (spojením dvou prvojader od dvou jedinců stejného pohlaví), tím daly vzniku androgenetickým (dvě sady chromozomů od jedinců samčího pohlaví) a gynogenetickým (dvě sady chromozomů od jedinců samičího pohlaví) embryím.

Zjistily, že žádné zkoumané uniparentální embryo nebylo schopné dokončit normální embryogenezi, nadpoloviční většina z nich se však vyvinula do stádia moruly/blastuly. Už během tohoto krátkého vývoje ale bylo možné pozorovat abnormality mezi těmito typy embryí. Androgenetická embrya přednostně vyvíjela extraembryonální a placentární struktury na úkor embrya, přičemž u gynogenetických embryí tomu bylo naopak. Z výsledků bylo patrné, že i přes fakt, že obě pohlaví poskytují embryu stejnou genetickou informaci (stejné geny ve stejném množství), jejich praktické využití se výrazně liší. Tímto experimentem byla poprvé prokázána existence rozdílných expresí parentálních alel později známa jako genomický imprinting (McGrath & Solter, 1984).

1.3 Ustanovení genomického imprintingu

Již v raném stádiu postimplantačního embryonálního vývoje můžeme v myším embryu pozorovat jak somatické buňky, tak vznikající primordiální zárodečné buňky, které dají následně vzniku zárodečným buňkám. Oba typy buněk zmíněné výše mají v tuto chvíli stejné epigenetické značení – metylace imprintovaných úseků DNA se nijak neliší mezi somatickými a budoucími zárodečnými buňkami (Spears & Swales, 2005). Kolem devátého až desátého dne vývoje dochází k migraci primordiálních zárodečných buněk do genitální lišty, tj. do části embrya, ze kterého se následně budou vyvíjet vaječníky u samic či varlata u samců. Po příchodu primordiálních buněk do vyvíjející se gonády dochází k první vlně demetylace, při které se téměř kompletně vymazává předchozí metylace včetně imprintovaných regionů. V této fázi dochází k vymazání metylace zděděné od rodičů a reaktivaci druhého inhibovaného

chromozomu X v samičí zárodečné linii, který je potřebný pro správný vývoj samičích pohlavních buněk (Kato et al., 1999; Tam et al., 1994). Epigenom specifický pro samčí pohlavní buňky se ustanovuje třináctý den po oplození. Jinak tomu je u oocytů. Vývoj oocytů se v embryogenezi zastavuje v profázi meiózy I (Tang et al., 2016). K dalšímu vývoji dochází až od období puberty, kdy oocyty rostou (zvětšují svůj objem), restartují meiózu, a může dojít k jejich ovulaci a oplození, po kterém nastává dokončení meiotického dělení. Právě během tohoto postnatálního vývoje oocytů, konkrétně během růstu oocytů, dochází k ustanovení jejich epigenetického značení (Bonnet-Garnier et al., 2013).

Další vlna přeprogramování přichází krátce po oplodnění. Demetylace a následné znovu ustanovení metylace je potřebné k vymazání informace, která určuje buněčnou linii buněk, tzn. je potřebná pro obnovu pluripotence buněk raného embrya, aby se buňky mohly rozrůznit a následně tvořit jednotlivé tkáně (Lee et al., 2014). Z takto ustanovených buněk se odděluje linie primordiálních zárodečných buněk a cyklus se uzavírá.

Ačkoli během vývoje dochází ke dvěma vlnám přeprogramování metylace celého genomu jak u samců, tak u samic, některé části genomu zůstávají vůči těmto vlnám imunní. Při druhé vlně přeprogramování je nezbytné, aby imprintované gDMRs zůstaly metylované, a tím se zajistila správná regulace genů spadajících pod tyto oblasti v somatických buňkách. Oblasti gDMRs, které mají být v genomu imprintovány, jsou před demetylací chráněny pomocí udržovací metyltransferázy DNMT1 (viz následující kapitola) a pomocného proteinu UHRF1, který napomáhá spojení DNMT1 s chromatinem (Bostick et al., 2007; Hirasawa et al., 2008). Nezbytná je také přítomnost proteinu ZFP57, který rozeznává metylované sekvence TGCCGC, které jsou přítomny ve všech myších ICRs. Tato jeho funkce pomáhá naverbování metyltransferázy DNMT1 do oblastí, které mají zůstat metylovány (Strogantsev et al., 2015).

1.4 Metylace jako nástroj imprintingu

Metylace DNA je jeden z nejrozšířenějších způsobů umlčení genové exprese v rámci genomického imprintingu. Metylace je spojení metylové skupiny s pátým uhlíkem cytosinu. Jedná se o kovalentní vazbu, metylové skupiny jsou poskytovány z S-adenosinmethioninu. Přenos metylových skupin z donoru zajišťují DNA metyltransferázy (Ehrlich & Wang, 1981; Okano et al., 1998). Metylace se v rámci genomu vyskytuje převážně na po sobě následujících CG párech (CpG), které jsou metylované symetricky na obou řetezcích DNA (Bird, 2002). Po

sobě následující CG dinukleotidy se mohou shlukovat v tzv. CpG ostrovech, které se hojně vyskytují v promotorech genů (Illingworth et al., 2010). Tyto ostrovy v promotorech jsou většinou nemetylované a dávají tak genu možnost podstoupit transkripci. Pokud k metylaci těchto oblastí dochází, metylované CpG ostrovy se mohou stát nástrojem použitým k monoalelickému umlčení v rámci genomického imprintingu. (Schübeler, 2015).

Aktuálně jsou známy tři typy metyltransferáz – DNMT1, DNMT2 a DNMT3. Při metylaci DNA po předchozí vlně demetylace se uplatňuje aktivita enzymů rodiny DNMT3. Zástupci této enzymové rodiny mají schopnost metylovat DNA *de novo*, tedy připojovat metylové skupiny bez nutné přítomnosti jednoho již metylovaného řetězce DNA. Díky této schopnosti se zástupci enzymové rodiny DNMT3 podílejí zejména na stanovení epigenetických značek typických pro zárodečné buňky obou pohlaví, tedy oocytů a spermií, a v embryonálním vývoji. Mezi nejznámější enzymy této skupiny patří DNMT3A a DNMT3B, které mají aktivní transmetylázovou aktivitu (přenášejí methylové skupiny z jedné sloučeniny na jinou) a aktivně se v různých časových horizontech podílejí na metylaci jak oocytů, tak spermií. Enzym DNMT3L postrádá svou transmetylázovou aktivitu, tudíž sám o sobě není schopný připojovat metylové skupiny k DNA řetězci. Je ale schopný vázat se k DNMT3A i DNMT3B. Jeho nepřítomnost u samic má za příčinu neustanovení DNA metylace oocytů a následní letálnost embryí kvůli chybějící metylaci v imprintovaných regionech, u samců postrádající tento enzym nedochází ke správnému vývoji spermií a samci se tak stávají neplodnými.

Dalším enzymem podílejícím se na metylaci DNA je enzym DNMT1. Tento enzym má také transmetylázovou aktivitu, jako tomu bylo u enzymu DNMT3. Zásadním rozdílem mezi těmito dvěma enzymy je potřeba přítomnosti templátu, podle kterého by se ustanovovala metylace nová. Zatímco DNMT3 metyltransferáza je schopna připojovat metylové skupiny bez přítomnosti jakéhokoli vzoru, u DNMT1 metyltranferázy tomu tak není. DNMT1 potřebuje ke své správné funkci přítomnost jednoho již metylovaného řetězce DNA (hemimetylované DNA), podle kterého metyluje řetězec druhý. Tato jeho funkce se uplatňuje v udržování metylace během mitotického dělení somatických buněk.

Poslední známou metyltransferázou je DNMT2. Z počátku nebyla známá žádná její aktivita spojená s metylací DNA, pozdější studie však prokázaly, že se tento enzym podílí na metylaci velmi specifické sekvence DNA. Hladina této metyltranferázy v buňce je tedy nižší

než DNMT1 či DNMT3, a byla tak hůře detekovatelná (Howell et al., 2001; Spears & Swales, 2005).

1.5 Hypotézy evolučního vzniku imprintingu

Existuje několik hypotéz, které by mohly vysvětlovat, z jakého důvodu se genomický imprinting u savců vyvinul.

1.5.1 Teorie sexuálního antagonismu

Můžeme zmínit například teorii sexuálního antagonismu, která je spojována s pohlavně specifickým selekčním tlakem. Tato teorie naznačuje, že obě pohlaví mají protichůdné zájmy, což znamená, že alely jejich genů jsou vystaveny sexuálně antagonistické selekci. Výsledkem této selekce je, že alely zděděné od matky budou přilepšovat ženskému pohlaví a alely od otce pohlaví mužskému. Kdyby však docházelo ke stejné expresi obou alel (tedy alely benefitní pro samice a druhé alely benefitní pro samce), docházelo by u potomka k intralokusovému pohlavnímu konfliktu. Je-li potomek například samicí, alela od otce, která je výhodnější pro samce, by snižovala jeho fitness a bránila by tak dosažení jeho fenotypového pohlavního optima. Umlčením alely od rodiče, který není stejného pohlaví jako potomek, se tak potomek může přiblížit k tomuto optimu (Patten et al., 2014).

1.5.2 Teorie příbuzenství

Teorie příbuzenství (neboli také teorie rodičovského antagonismu) je založená na faktu, že se rodičovské alely v sociálním prostředí setkávají s různými vzorci příbuznosti, tedy že se v různém měřítku setkávají jedinci s matčinými či otcovskými příbuznými. Jako příklad můžeme vzít embryonální vývoj, kde jsou si všechna embrya z 50 % příbuzná jak mezi sebou, tak s matkou. Pokud ale matka počala s různými otci, jednotlivá embrya si nemusí být po otcovské stránce vůbec příbuzná. Je tedy v zájmu matky rozpoložit své zdroje mezi své potomky rovnoměrně (je si s nimi stejně příbuzná). Jelikož ale vyvíjející se embrya nemusí sdílet stejného otce, je v zájmu otce (a také samotného embrya), aby právě jeho potomek mohl čerpat co nejvíce z matčiných zdrojů.

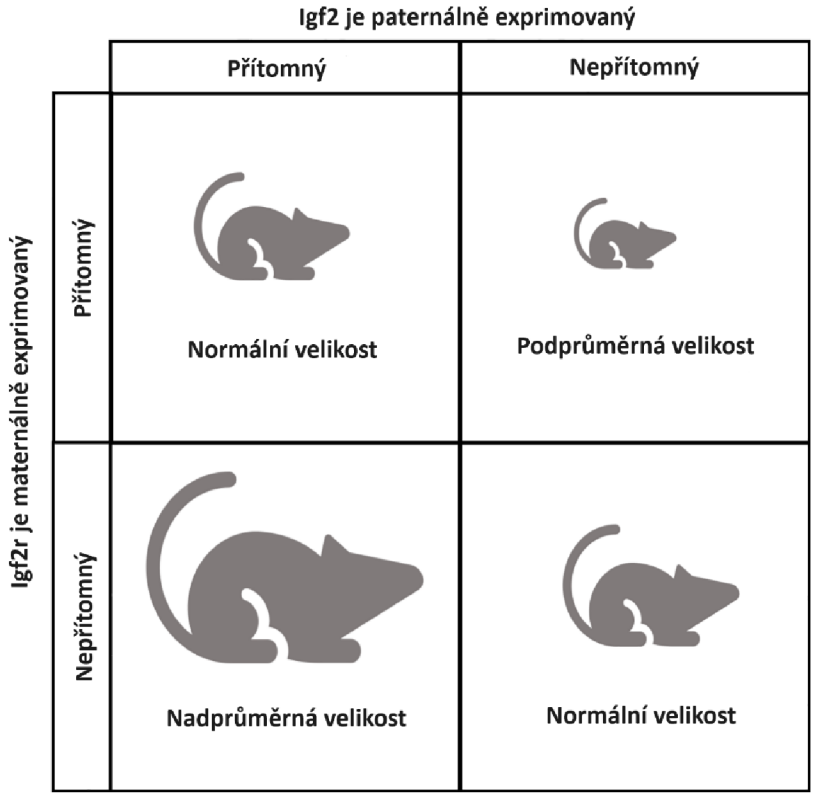
Teorie příbuzenství je velmi podobná s teorií parentálního konfliktu (viz následující kapitola) jen s tím rozdílem, že teorie příbuzenství zahrnuje nejen vztah matka/otec, ale

i samotné embryo (mládě), které se v různých mírách stýká s různě si příbuznými jedinci a je tedy i v jeho zájmu, aby případně nepřilepšilo méně příbuznému jedinci, či nepřihoršilo jedinci jemu více příbuznému (Haig, 1997; Haig, 2002).

1.5.3 Teorie parentálního konfliktu

Mezi nejvíce uznávané hypotézy o vzniku genomického imprintingu patří hypotéza parentálního konfliktu. Je vysvětlována jako konflikt mezi rodiči o mateřské zdroje pro vyvíjející se embryo. Zatímco samice (matka) je schopná počít s více samci a se všemi jejími mláďaty si je stejně příbuzná, jejím záměrem je distribuovat všechny zdroje mezi její potomky rovnoměrně. V opačném případě je to u samců. Jejich záměrem je, aby právě jejich potomci byli nejsilnější a zvýšili tak jejich pravděpodobnost dostat jejich genetickou informaci do dalších generací. Právě nejspíše proto paternálně zděděné alely kladou vyšší požadavky na tělo matky než alely zděděné od matky. Tyto samčí požadavky na samici také snižují pravděpodobnost jejího dalšího úspěšného rozmnožování. Tímto tedy vzniká genetický konflikt mezi pohlavími (Moore & Haig, 1991).

Nejlepším příkladem podporující tuto teorii je exprese Igf2 genu (insuline-like growth factor 2) a *Igf2r* genu (insuline-like growth factor 2 receptor). Igf2 je gen podílející se na růstu organismu a je paternálně exprimovaný. *Igf2r* je gen kódující receptor, maternálně exprimovaný, na který se váže výše zmíněný Igf2, jeho vázáním reguluje růst organismu. Po experimentálním vypnutí genu Igf2 se rodila menší mláďata, než je zvykem. Po vypnutí genu *Igf2r* se naopak rodila mláďata větší (**Obr.1**). Vzájemnou spoluprací těchto genů, ale také při nefunkčnosti obou genů, dochází k normálnímu embryonálnímu růstu embryí (Ågren & Clark, 2018).



Obr. 1: Ilustrace hypotézy genetického konfliktu na příkladu Igf2 a *Igf2r* genu (převzato z Ågren & Clark, 2018).

1.6 Genomický imprinting u myší

1.6.1 Obecné informace o myším genomu

Myší genom se ve spoustě ohledů podobá genomu lidskému. Bylo zjištěno, že až 90 % myšího i lidského genomu lze rozdělit do segmentů, které si vzájemně odpovídají pořadím genů v porovnání s jejich společným předkem. Podobají se i velikostí genomů či počtu protein kódujících genů (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Pravděpodobně díky své velké podobnosti s lidským genomem se myší genom stal jedním z nejprobádanějších i v rámci genomického imprintingu.

Velikost myšího genomu se pohybuje okolo 2,5 Gb rozdělených do 20 párů chromozomů (Bolcun-Filas & Schimenti; Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Celkový počet genů nacházející se v myší DNA byl v roce 2018 určen na 49 244, z čehož přibližně polovinu zastupují geny kódující proteiny (Bult et al., 2019). V rámci myšího genomu bylo zatím identifikováno 388 imprintovaných genů a 24 oblastí řídících imprinting (ICRs), jejichž metylace zajišťuje umlčení genů v jednotlivých klastrech, ve kterých je většina

imprintovaných genů lokalizována (Santini et al., 2021). Ze zmíněných 24 oblastí jsou tři metylovány v paternální alele (metylace je ustanovena ve spermiích) a 21 v maternální (metylace je ustanovana v oocytech) (Kobayashi, 2021).

1.6.2 Charakteristika imprintovaných oblastí myších oocytů

V této práci se budeme zabývat maternálně imprintovanými regiony, které jsou metylovány v oocytech. Tyto regiony mají několik charakteristik, které je odlišují od jiných metylovaných oblastí. Jsou to oblasti, které jsou metylovány v oocytech a nemetylovány ve spermiích, většinou mají 50 % metylaci v somatických buňkách, a nejsou demetylovány během vlny celogenomové demetylace po oplození (Kühnel et al., 2020). Další charakteristikou je, že tyto oblasti jsou uvnitř transkribovaných úseků, a jsou to CpG ostrovy obsahující specifickou sekvenci TGCCGC. Tyto charakteristiky jsou blíže popsány v následujících podkapitolách.

1.6.2.1 Transkripce

V roce 2009 byla transkripci připsána jedna ze zásadních rolí v genomickém imprintingu (Chotalia et al., 2009). Procházející transkripce byla navržena jako jeden z faktorů pro specifikaci míst, které mají být metylovány u samice v oocytech. Je známo, že mateřské gDMRs jsou tvořeny CpG ostrovy, které jsou často umístěny v promotorech genů. Následně bylo zjištěno, že přes tyto gDMRs vždy prochází transkripce jiného genu, nebo jsou tyto geny transkribovány z alternativního promotoru, který je lokalizován před promotorem (anglicky upstream) s gDMR. Právě díky svému intragenovému umístění se tak gDMRs ocitají v oblastech genu, kde aktivně probíhá transkripce v době, kdy se ustanovují metylační značky v oocytech. Nevyhnutelná role aktivní transkripce pro ustanovení *de novo* DNA metylace v imprintovaném gDMR byla experimentálně prokázána pro klastr genu *Gnas* (Chotalia et al., 2009) a *Plagl1* (Veselovska et al., 2015).

1.6.2.2 CpG ostrovy

Jak už bylo zmíněno, imprintované geny se většinou nevyskytují samostatně, ale jsou k nalezení ve skupinách tzv. klastrech (nazývané také jako imprintované domény) a každý z těchto klastrů se podrobuje kontrole jedné diferenciálně metylované oblasti (gDMR, ICR). V savčím genomu se vyskytují CG páry většinou s připojeným metylovým zbytkem (Eckhardt et al., 2006). V genomu však můžeme nacházet také nemetylované sekvence, kde jsou CG

páry s vyšší denzitou, než jinde v genomu (tzv. CpG ostrovy), které mohou být dlouhé až 1 kb (Cooper et al., 1983; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Tyto sekvence se vyskytují u člověka z 60–70 % hlavně v promotorových oblastech a to, že jsou většinově nemetylované, umožňuje normální transkripci genů (Weber et al., 2007). Jelikož se CpG ostrovy vyskytují hojně hlavně v oblastech bohatých na promotory, jsou také hojně nalézány v gDMRs. Jak už název tohoto regionu naznačuje, CpG ostrovy jsou v této oblasti metylovány (tím i promotory v daném místě) a geny v přiléhajícím klastru jsou regulovány – imprintovány (Suzuki et al., 2011).

1.6.2.3 TGCCGC sekvence

V experimentu skupiny Quenneville et al., zabývající se funkcí proteinu ZFP57 (zinc finger protein 57) a jeho kofaktoru KAP1 (KRAB-associated protein 1), byla ve spojitosti se zkoumaným proteinem objevena vazebná sekvence TGCCGC. ZFP57/KAP1 hraje důležitou roli v udržování DNA metylace imprintovaných gDMRs díky své schopnosti interagovat s proteiny DNMT1 a UHRF1. Bylo zjištěno, že protein ZFP57 se v rámci genomu váže pouze na gDMR imprintované alely. V rámci tohoto experimentu byla také zjištěna přesná sekvence, na kterou se je tento protein schopný vázat. Touto sekvencí byla právě již výše zmíněná sekvence TGCCGC. Vazba ZFP57 k této specifické sekvenci byla zkoumána na 91 vzorcích, z toho se ZFPT57 81× úspěšně na danou sekvenci navázal. Jelikož víme, že se ZFP57 váže jen ke gDMR imprintované alely a zároveň se váže v rámci gDMR na určitou sekvenci, můžeme tuto sekvenci považovat za charakteristickou vlastnost pro imprintované gDMRs (Quenneville et al, 2011; Strogantsev et al., 2015).

1.6.3 Přehled genů, které ve svém promotoru nebo genovém těle obsahují maternálně metylovaný gDMR

1.6.3.1 *H13/Mcts2* gDMR

H13

H13 (Histocompatibility minor 13), také znám pod názvem *Hm13*, je protein-kódující gen. Protein exprimovaný z tohoto genu se nachází v endoplazmatickém retikulu, kde katalyzuje vnitromembránovou proteolýzu a následně štěpí signální peptidy z preproteinů. Podílí se tak na vzniku lymfocytických epitopů a je tak důležitou složkou pro správnou funkci imunity (Zhang et al., 2022). Je známo pět různých transkriptů exprimovaných z genu *H13*. Vznikají z jednoho promotoru za využití různých polyadenylačních míst. *H13* prochází přes imprintovaný gDMR v promotoru genu *Mcts2*, který ovlivňuje různé použití *H13*

polyadenylačních míst, a tak se podílí na řízení exprese transkriptů tohoto genu. Transkripty *H13* a, b a c jsou exprimovány z paternálně, zatímco transkripty d a e jsou exprimovány z maternální alely (Wood et al., 2008). Zvýšená exprese genu *H13* je spojována se vznikem rakovin jater (Zhang et al., 2022).

Mcts2

Mcts2 (Malignant T-Cell Amplified Sequence 2) je imprintovaný retrogen lokalizovaný uvnitř genu *H13*, gDMR se nachází v jeho promotoru. Jedná se o kopii genu *Mcts1*, má tedy stejné funkce. Tento gen, stejně jako *Mcts1*, má velký význam v buněčném růstu – zkracuje čas, během kterého se buňka množí, urychluje G1 fázi a vstup buňky z G1 fáze do S fáze (Dierov et al., 1999). Dále se na příklad podílí na translaci na ribozomech či má vliv na signální dráhu aktivovanou při poškození DNA (Hsu et al., 2007; Skabkin et al., 2010. Tento gen je metylovaný na maternální alele, tudíž je exprimovaný z otcovské alely v embryonálním vývoji a v mozku novorozenců. Chybný imprinting u *Mcts2* může mít vliv na vznik různých druhů rakoviny (Wood et al., 2007).

1.6.3.2 *Blcap/Nnat gDMR*

Blcap

Mezi hlavní funkce genu *Blcap* (neboli Bladder Cancer-Associated Protein gene) patří zpomalování/zastavování růstu buňky či indukce apoptózy (Yao et al., 2007). Díky tomu je spojován s rakovinami, ve kterých v mnoha případech chybí či dochází ke snížení jeho exprese (Gromova et al., 1999; Rae et al., 2000). *Blcap* patří mezi imprintované geny a také obsahuje jeden imprintovaný gen (*Nnat*), jehož promotor překrývá gDMR, v rámci svého intronu (Evans et al., 2001). Monoalelická exprese *Blcap* genu však probíhá pouze v mozku. U myší byly zjištěny dva jeho transkripty (*Blcap_v1a, Blcap_ v2a*), které se liší v tom, z jaké alely jsou exprimovány. *Blcap_v1a*, který má svůj promotor downstream od *Nnat*, je primárně exprimovaný z mateřské alely. *Blcap_v2a*, který má svůj promotor upstream od genu *Nnat*, je naopak primárně exprimovaný z alely zděděné od otce (Schulz et al., 2009).

Nnat

Nnat (Neuronatin) je imprintovaný gen, jehož promotor překrývá gDMR, a nachází se v intronu imprintovaného genu *Blcap*. Tento gen patří mezi první objevené imprintované geny, které jsou specifické pro placentální savce (Evans et al., 2005). Je maternálně imprintovaný, exprese tedy probíhá pouze z otcovské alely (Sowpati et al., 2008). Jsou známy dva transkripty tohoto genu – alfa a beta (Dou & Joseph, 1996). K expresi *Nnat* dochází v rané embryogenezi,

kde se podílí na vývoji mozku (Joseph et al., 1995). Díky *Nnat* genu a jeho schopnosti uvolňovat vápník z intracelulárních zásob dochází k diferenciaci pluripotentních buněk a stávají se z nich buňky neuronální (Lin et al., 2010). *Nnat* má však silné predispozice k nesprávnému skládání a následnému tvoření agregátů. Tvorba agregátů a následná buněčná smrt je spojována s Laforovou chorobou (Sharma et al., 2013; Surendran et al., 2005). Při vysokých hladinách glukózy se *Nnat* opět shlukuje a může ničit pankreatické beta buňky (Joe et al., 2008).

1.6.3.3 Gnas/Nespas gDMR

Gnas

Gen *Gnas* patří mezi imprintované geny. Má několik různých promotorů, které dávají vzniku různým produktům (Weinstein et al., 2001). Mezi jeden z nejdůležitějších produktů patří α -podjednotka G – proteinu (Weiss et al., 2000). G-protein je součástí membránových receptorů, které reagují na signály z okolí buňky (např. hormony a neurotransmitery) a zajišťují buněčnou odpověď. Zdali je tato podjednotka v buňce imprintovaná nebo ne, záleží na tom, v jaké tkáni se buňka nachází. Bývá exprimována z mateřské alely primárně ve vaječnících, štítné žláze, hypofýze a v proximálních tubulech nefronů, v těchto orgánech je paternálně imprintována (Germain-Lee et al., 2002; Haqward et al., 2001; Liu et al., 2003; Mantovani et al., 2002; Yu et al., 1998). Tento gen zajišťuje aktivní transkripci přecházející přes dva gDMR – jeden v alternativním promotoru genu *Gnas*, a druhý v promotoru překrývajícího genu *Nespas*.

Nespas

Nespas je imprintovaný gen lokalizován v rámci tkáňově specificky imprintovaného genu *Gnas*. Jeho promotor překrývá maternálně metylovaný gDMR. Tento gen patří mezi paternálně exprimované geny, je tedy maternálně imprintovaný (Williamson et al., 2002). Kóduje dlouhou nekódující RNA, která je potřeba pro metylaci DMR genu *Nesp*, který se nachází na sense vlákně mateřské alely, a tak snižuje jeho expresi (Williamson et al., 2011). Působení genu *Nespas* na gen *Nesp* zajišťuje správnou expresi genu *Gnas*. Hlavní rolí *Nespas* genu je tedy zajišťovat metylaci DMR *Nesp* genu, a tím udržovat *Nesp* gen imprintovaný na paternální alele (Tibbit et al., 2015).

1.6.3.4 *Peg10/Sgce gDMR*

Peg10

Gen *Peg10* (Paternally Expressed Gene 10) je maternálně imprintovaný gen, tzn. je exprimovaný jen z paternální alely, podle čeho také získal svůj název (Ono et al., 2001). Jedná se o velmi konzervovanou sekvenci v rámci placentálních savců. K nejvyšší expresi proteinu pocházejícího z tohoto genu dochází v placentě (Ono et al., 2003). *Peg10* je gen odvozený od retrotranspozonů skupiny Ty3/Gypsy. Jedná se o retrotranspozony, které mají na koncích dlouhé opakující se úseky (LTR - anglicky long terminal repeats) (Ono et al., 2001). Skládá se ze dvou exonů, druhý z nich obsahuje dva otevřené čtecí rámce (Lux et al., 2010; Volff et al., 2001). Tento exon si nese prvek, který dokáže posunout ribozomální rámec, a tak vytvořit z jednoho transkriptu dva různé produkty i bez alternativního sestřihu původní mRNA (Clark et al., 2007). Gen v sobě kóduje jak vlastní mRNA, tak kapsid, který napomáhá vzniklé mRNA přenosu mezi buňkami (Segel et al., 2021). V rámci experimentu, kdy byl myším jejich gen *Peg10* vypnut, byl zjištěn jeho obrovský význam v embryonálním vývoji. Při vypnutí *Peg10* docházelo ke chybnému vývoji placenty u myších embryí a k jejich následnému úmrtí. Hraje totiž velkou roli v diferenciaci trofoblastových kmenových buněk. *Peg10* se tak stal prvním důkazem o důležitosti retrotranspozonů v savčím vývoji (Ono et al., 2006). Dále se na příklad podílí na diferenciaci adipocytů a v poslední době bývá také spojován s různými typy rakovin (Hishida et al., 2007; Li et al., 2018; Xiong et al., 2012). Zajímavostí také je, že *Peg10* pro začátek translace nepoužívá typický start kodon AUG, ale využívá kodon CUG, což může být spojováno s jeho schopností změny ribozomálního rámce (Lux et al., 2010). V kanonickém promotoru tohoto genu se nachází gDMR, ale v oocytech je transkripce iniciována z upstream promotoru a zabezpečuje tak aktivní transkripci přes tento gDMR (Veselovska et al., 2015).

Sgce

Sgce (Epsilon-Sarcoglycan Gene) je imprintovaný gen lokalizován uvnitř genu *Peg10*. *Sgce* gen je maternálně imprintovaný, exprimovaný z paternální alely zejména v plicích, srdci, kosterní svalovině. Slabá exprese genu *Sgce* byla prokázána i v mozku, zde ale docházelo k expresi z maternální alely (Ettinger et al., 1997; Piran et al., 2000). Tento gen kóduje transmembránový protein, který je součástí dystrofinového glykoproteinového komplexu (Ettinger et al., 1997). Role tohoto komplexu je mechanická stabilizace a signalizace mezi buněčnou kostrou, membránou a extracelulární matrix v srdeční a kosterní svalovině (Lapidos et al., 2004). Je považován za jednoho z původců Silver-Russelova syndromu vznikající

maternální uniparentální dizomií v této části chromozomu. Silver-Russelův syndrom se vyznačuje zejména embryonální a postnatální retardací růstu (Wakeling et al., 1998).

1.6.3.5 *Peg3/Usp29 gDMR*

Peg3

Peg3 neboli Paternally Expressed Gene 3 je další gen exprimovaný z paternální alely (je tedy maternálně imprintovaný) (Kaneko-Ishino et al., 1995). K největší expresi tohoto genu dochází ve vaječnících, varlatech, placentě a v mozku (Kim et al., 1997). *Peg3* kóduje transkripční faktor, protein vázající se na DNA pomocí zinkových prstů, a působící jako represor několika dalších genů (Kuroiwa et al, 1996). Mezi jeho hlavní funkce v těle patří řízení procesů spojených se spouštěním laktace či zajištění péče o potomstvo u samic, dále na příklad řídí diferenciaci adipocytů či mužské sexuální chování (Curley et al., 2004; Curley et al., 2005; Li et al., 1999; Swaney et al., 2008). Také byl prokázán jeho vliv na velikost potomstva – potomstvo s mutantní paternální alelou se vykazovalo menším vzrůstem než potomstvo bez mutantní alely (Li et al., 1999). Díky interakci s dalšími proteiny se dále podílí na příklad ve spouštění apoptózy a dalších buněčných procesů (Relaix et al., 1998; Relaix et al., 2000). Také pomáhá k degradaci β-kateninu, čímž inhibuje Wnt signální dráhu (Jiang et al., 2010). Je známo, že u mnoha onkologických pacientů s rakovinami vaječníků či prsu bývá problém v imprintingu právě tohoto genu – oblast zajišťující imprinting *Peg3* bývá často nestabilní a může docházet k její hypermetylaci, a tím ke snížení exprese *Peg3* (Dowdy et al., 2005; Feng et al., 2008; Huang & Kim, 2009; Chen et al., 2011; Kohda et al., 200; Maegawa et al., 2001).

Usp29

Usp29 (Ubiquitin-Specific Processing Protease) je maternálně imprintovaný gen umístěný v rámci genu *Peg3*. Jedná se o velmi dlouhý gen, otevřený čtecí rámec je však lokalizován jen v pátém (posledním) exonu tohoto genu (Kim et al., 2000). Délka *Usp29* genu víceméně odpovídá genům kódující dlouhé nekódující RNA, které se podílejí na zajišťování imprintingu u dalších genů. I přes to, že *Usp29* kóduje protein, byl zjištěn jeho vliv na transkripci a úroveň metylace genu *Zfp264*. Sníženou expresí *Usp29* genu došlo k hypometylaci u genu *Zfp264* na mateřské alele a k jeho expresi i přes to, že je původně maternálně imprintovaný. Také byl zjištěn jeho vliv na vzrůst embrya během prenatálního vývoje. Postnatální růst je poté zajištěn genem *Peg3* (He et al., 2016). V promotoru tohoto genu a genu *Peg3* se nachází gDMR, které je překryté upstream promotorem genu *Peg3*.

1.6.3.6 Snrpn gDMR

Překladem genu *Snrpn* (Small Nuclear Ribonucleoprotein polypetid N) vzniká podjednotka malého jaderného ribonukleoproteinu (Glenn et al., 1993). Malý jaderný ribonukleoprotein (snRNP) je komplex složený z nekódujících RNA (snRNA) s bílkovinami, spolu s dalšími *Snrpn* dávají vzniku spliceozomu, který je zodpovědný za sestřih pre-mRNA v jádře (Lerner & Steitz, 1979; Will & Lührmann, 2011). Maternální alela genu *Snrpn* je imprintována, tudíž k expresi dochází jen z paternální alely (Leff et al., 1992). Exprese není specifická čistě pro jednu tkáň, k největší expresi však dochází v mozku a srdci (McAllister et al., 1988). U lidí delecí v paternálně zděděné alele nebo uniparentální dizomií v chromozomovém úseku 15q11-q13 či špatnému imprintingu v imprintigovém centru genu *Snrpn* dochází k onemocnění zvanému Prader-Williho syndrom (Ledbetter et al., 1981), (Nicholls et al., 1989; Reed & Leff, 1994). V alternativním promotoru tohoto genu se vyskytuje gDMR, které zajišťuje imprinting daného klastru.

1.6.3.7 *Inpp5f gDMR*

Inpp5f

Inpp5f (také znám jako *Sac2*) je gen bialelicky exprimovaný, jelikož jeho CpG island je málo metylovaný, a tím nedochází k jeho umlčení (Choi et al., 2005). V mozku myši byly objeveny dva transkripty tohoto genu (*Inpp5f_v2, Inpp5f_v3*), které však imprintované jsou. Obě dvě genové varianty byly popsány jako paternálně exprimované v myším mozku (Choi et al., 2005; Woods et al., 2007). Tento imprintovaný gen produkuje inositol polyfosfatázu-5-fosfatázu F (Inositol polyphosphate-5-phosphatase F) patřící do rodiny inositol fosfatáz, které hrají velkou roli v recyklaci synaptických vezikul a mají tak zásadní funkci v exocytóze či endocytóze na nervových zakončení. Také se hojně podílejí na vývinu mozku u savců (Arai et al., 2001; Choi et al., 2005). Také svou schopností degradovat fosfatidylinisotil 3,4,5-trifosfát či fosfatidylinositol 4,5-bifosfát se podílí na regulaci některých signálních drah (Cremona et al., 1999), (Dorn & Force, 2005; Minagawa et al., 2001; Wan et al., 2001). Transkriptu *Inpp5f-v3* chybí Sac doména, která je nezbytná pro aktivaci inositol fosfatáz. Tuto doménu však obsahuje *Inpp5f-v2*, a tak je předpokládána spojitost a vzájemná spolupráce právě těchto dvou paternálně exprimovaných transkriptů na vývoji mozku (Yan et al., 2011). gDMR tohoto klastru je lokalizováno v alternativním promotoru tohoto genu.

1.6.3.8 *Kcnq1/Kcnq1ot1 gDMR*

Kcnq1

Kcnq1 (Potassium Voltage-Gated Channel, KQT-like Subfamily Q, Member 1) se nachází v imprintovaném klastru, který je rozdělen, přičemž každá z částí je pod kontrolou jiného ICR (Baskin et al., 2014). Má dvě hlavní izoformy transkriptů – izoformu 1 a izoformu 2. Exprese izoformy 2 je specifická pro srdce, přičemž exprese izoformy 1 se nevztahuje jen k jedné tkáni. Typicky se obě izoformy exprimují z alel zděděných od obou rodičů. Při embryogenezi však dochází k metylaci IC2 a k umlčení izoformy 1 genu *Kcnq1* na otcovské alele, po porodu dochází k opětovné expresi z obou rodičovských alel (Baran et al., 2015; Lee ar al., 1997; Neyroud et al., 1999). Represe genu *Kcnq1* na paternálně alele je zajišťována nekódující RNA *Kcnq1ot1*, která je naopak metylovaná a umlčená na mateřské alele (Korostowski et al., 2012). *Kcnq1* kóduje α-podjednotku draslíkových kanálů, které jsou důležité zejména v repolarizaci akčního potenciálu v srdci (Barhanin et al., 1996). *Kcnq1* zajišťuje aktivní transkripci přes gen *Kcnq1ot1*, v jehož promotoru je lokalizován gDMR tohoto klastru.

Kcnq1ot1

Kcnq1ot1 je imprintovaný gen nacházející se v rámci genu *Kcnq1*. Tento gen dává vzniku dlouhé nekódující RNA. *Kcnq1ot1* je exprimován z paternální alely antisense vláknem, potlačuje expresi *Kcnq1* na sense vlákně a zároveň také umlčuje geny, které se nacházejí kolem *Kcnq1ot1* na antisense vlákně. Mezi ty patří například *Cdkn1c* (Cyclin Dependent Kinase inhibitor 1C), který se podílí na kontrole růstu embrya. *Cdkn1c* se v normálním případě exprimuje z mateřské alely, protože na mateřské alele nedochází k expresi *Kcnq1ot1*, který by *Cdkn1c* reprimoval (Baskin et al., 2014). Při poruše imprintingu v IC2 dochází k expresi *Kcnq1ot1* na obou alelách, a tím represi Cdkn1c i na mateřské alele. Bialelickou represí *Cdkn1c* může dojít ke vzniku onemocnění zvanému Beckwith-Wiedemannův syndrom (Valente et al., 2019).

1.6.3.9 Plagl1 gDMR

Plagl1 neboli Pleomorphic Adenoma of the Salivary Gland Gene like kóduje protein patřící mezi tzv. zinkové prsty, které se většině případů vážou na DNA a fungují jako transkripční faktory, tj. ovlivňují transkripci genu a tím i růst buňky či indukuje apoptózu (Spengler et al., 1997). *Plagl1* obsahuje CpG ostrov metylovaný na mateřské alele, exprese tedy probíhá z paternální alely (Kamiya et al., 2000). Paternální uniparentální dizomie,

duplikace genu na paternálně alele či chyba v imprintingu na mateřské alele má za následek novorozenecký *diabetes mellitus* (Gardner et al., 1999). Snížená exprese *Plagl1* je spojována s rakovinami prsu či vaječníků (Cvetkovic et al., 2004). gDMR tohoto klastru je umístěn v upstream oocytově specifickém promotoru tohoto genu.

1.6.3.10 Grb10 gDMR

Gen *Grb10* neboli Growth-factor Receptor Bound 10 produkuje protein patřící do rodiny adaptorových proteinů Grb7 (Han et al., 2001). Protein GRB10 se váže na inzulínové receptory či na receptory inzulínu podobných růstových faktorů I a inhibuje aktivitu tyrosinkinázy, která je součástí těchto receptorů. GRB10 tedy brání šíření signálu z inzulinových receptorů či z receptorů inzulinu podobných faktorů dál do buňky, a tím inhibuje růst (He et al., 1998). Umlčení tohoto genu se liší u myši a u člověka. U lidských embryí dochází k expresi genu *Grb10* v mozku převážně z paternální alely, v kosterních svalech dochází k expresi jedné izoformy *Grb10* převážně z mateřské alely, v ostatních tkáních dochází k bialelické expresi tohoto genu (Blagitko et al., 2000; Hitchins et al., 2001). U myších embryí dochází k expresi převážně z mateřské alely kromě mozku, kde dochází k expresi z obou alel (Hitchins et al., 2002; Miyoshi et al., 1998). V dospělosti je *Gbr10* exprimován v mozku hlavně z paternální alely (Hikichi et al., 2003). Těmito odchylkami se *Grb10* stal prvním známým genem, který se svou alelickou expresí liší mezi lidmi a myšmi (Blagitko et al., 2000). Maternální duplikace *Grb10* genu má za následek menší vzrůst embryí, zatímco paternálně duplikace tohoto genu se projevuje větším vzrůstem (Cattanach et al., 1998). Alternativní promotor tohoto genu funguje jako gDMR pro daný klastr.

1.6.3.11 *Commd1/Zrsr1 gDMR*

Commd1

Gen *Commd1* tvořící protein zvaný Copper Metabolism Domain Containing 1 (také známý pod jménem Murr1) společně s dalšími devíti geny patří do skupiny genů COMM. Jejich společným znakem je přítomnost COMM domény na uhlíkatém konci vytvořených proteinů. Tato doména zajišťuje spojování proteinů s dalšími proteiny. *Commd1* byl nalezen u všech obratlovců, u savců však patří k jednomu z nejvíce konzervovaných genů (Burstein et al., 2005). *Commd1* je paternálně imprintovaný v mozku myší, jeho exprese je tedy v této tkáni zajišťována mateřskou alelou. Imprinting *Commd1* není zajištěný metylací či histonovými modifikacemi, nýbrž se předpokládá, že umlčení tohoto genu na paternální alele je zajištěno expresí genu *U2af1-rs1*, který se nachází na antisense vlákně na paternální alele a je

maternálně metylovaný (Hatada et al., 1993; Wang et al., 2004). *Commd1* je známý pro jeho schopnost inhibovat NF-κB díky schopnosti ubiquitinovat tento transkripční faktor (Maine et al., 2007). NF-κB je transkripční faktor, který ovlivňuje expresi genů zahrnutých na příklad v buněčném růstu, imunitní odpovědi či apoptóze (Karin & Lin, 2002). Dále je také spojován na příklad s regulací mědi v těle, kvůli čemu také dostal své jméno (van De Sluis et al., 2002).

Zrsr1

Gen *Zrsr1* je imprintovaný gen lokalizován v rámci prvního intronu genu *Commd1*. Jedná se o maternálně imprintovaný gen, exprese probíhá z paternální alely v placentě a v některých dalších dospělých tkáních. *Zrsr1* je do genu *Commd1* vložen v opačném směru a jeho metylace je závislá na transkripci probíhající přes *Commd1*. Společně se *Zrsr2* patří *Zrsr1* mezi tzv. minor splicing factors, které mají zásadní roli v alternativní sestřihu. Jejich hlavní funkcí je rozpoznávání U12 intronů, které jsou velmi konzervované mezi eukaryotickými organismy. Většina genů obsahující U12 introny se podílí na procesech jako RNA procesování, DNA replikaci nebo v buněčném cyklu, a tím tak např. na embryonálním vývoji. Bylo zjištěno, že se gen *Zrsr1* společně se *Zrsr2* podílí na přeprogramování embrya během zygotické aktivace genomu, kdy embryo začne po oplození transkribovat svou DNA (Gómez et al., 2020). Promotor genu *Zrsr1* obsahuje gDMR zodpovědné za umlčení genů v tomto klastru.

1.6.3.12 *Trappc9/Peg13 gDMR*

Trappc9

Trappc9 (Trafficking Protein Particle Complex 9) je známý také jako NIK-and-IKK2-binding protein (NIBP). K expresi tohoto genu dochází hlavně v neuronech mozku, svalech, srdci nebo v ledvinách (Hu et al., 2005). *Trappc9* je v mozku ze 70 % exprimován hlavně z mateřské alely (Liang et al., 2020). *Trappc9* kóduje protein, který společně s dalšími komponenty dává vzniku TRAPP II komplexu, který je součástí vnitrobuněčného transportu, konkrétně se podílí na přenosu vezikulů mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho komplexem (Barrowman et al., 2010). *Trappc9* je také spojován s regulací NF-κB signální dráhy. Protein vzniklý z tohoto genu interaguje s NIK (NF-κB inducing kinase) a s IKKβ (inhibitor of nuclear factor kappa-β kinase), které jsou důležitými složkami NF-κB signální dráhy. *Trappc9* slouží jako zesilovač těchto dvou zmíněných produktů (Hu et al., 2005). Bylo zjištěno, že jedinci postrádající mateřskou alelu tohoto genu se vyznačovali menším mozkem,

změnami v chování či obezitou, přičemž jedinci postrádající alelu zděděnou od otce se zdáli být bez pozměny (Liang et al., 2020).

Peg 13

Peg 13 (Paternally Expressed Gene 13) je gen lokalizovaný v rámci genu *Trappc9*. Kóduje dlouhou nekódující RNA, která je exprimována z paternálně zděděné alely (Smith et al., 2003). K největší expresi genu dochází v mozku (Davies et al., 2003). *Peg13* patří ke genům, které se podílejí na vývoji chování jedinců. Jedinci, kteří nesli specifickou mutaci v genu *Peg13*, preferovali stejné pohlaví (zejména samci). Samice s touto mutací se vykazovaly zhoršenou péčí o potomstvo, díky které docházelo k sekundárnímu umírání mláďat (Keshavarz et al., 2004). V promotoru tohoto genu se nachází gDMR pro daný klastr.

1.6.3.13 Slc38a4 gDMR

Slc38a4 (Solute Carrier Family 38 Member 4) je transportér aminových kyselin, který je významný pro vývoj placenty při embryonálním vývoji (Bröer, 2014). Při ztrátě imprintingu paternální alely dochází k hypoplazii a následně k redukci hmotnosti samotného plodu (Matoba et al., 2019). Promotor tohoto genu funguje jako gDMR pro tento klastr.

1.6.3.14 *Igf2r/Airn gDMR*

Igf2r

Igf2r (Insulin-like Growth Factor 2 Receptor) je gen kódující dlouhý transmembránový glykoprotein sloužící jako receptor, který patří mezi velmi konzervované geny v rámci obratlovců. Tento gen je paternálně imprintovaný, tudíž primárně exprimovaný z mateřské alely (Barlow et al., 1991). Imprinting zde zajišťuje přítomnost CpG ostrovu a zde přítomná metylace ve druhém intronu genu *Igf2r* (Wutz et al., 1997). Je také označován jako CI-MPR (cation-independent mannose 6-phospahte receptor) díky své schopnosti vázat glykoproteiny obsahující právě manózu 6-fosfát. Mezi látky obsahující manózu 6-fosfát, které se vážou na *Igf2r* receptor, patří na příklad hydrolázy syntetizované v endoplazmatickém retikulu, následně transportované do Golgiho aparátu. Jeho funkcí je navázat tyto nově vzniklé hydrolázy a nasměrovat je do lyzozomů, kde tyto hydrolázy slouží k degradaci určitých látek (Dahms et al., 1989). *Igf2r* však dostal svůj název podle *Igf2* (Insulin-like Growth Factor 2). Jeho hlavní funkcí je pohlcení (endocytóza) tohoto faktoru a jeho nasměrování do lyzozomů k degradaci (Ellis et al., 1996). Tímto způsobem se *Igf2r* podílí na regulaci růstu embrya. Bylo

zjištěno, že nižší či nulová exprese tohoto genu vede k přílišnému vzrůstu či k deformacím srdce v embryonálním vývoji, které nejsou slučitelné se životem (Lau et al., 1994).

Airn

Airn je imprintovaný, maternálně exprimovaný gen lokalizován na antisense vlákně proti genu *Igf2r*. Jedná se o gen, který dává vzniku lncRNA (long noncoding RNA) (Seidl et al., 2006). Jeho hlavní rolí je zajištění paternálního imprintingu genu *Igf2r*. Expresí této nekódující RNA dochází k metylaci promotoru genu *Igf2r*, a tím k jeho umlčení (Sleutels et al., 2002). Promotor genu *Airn* obsahuje gDMR zodpovědný za umlčení genů tohoto klastru.

1.6.3.15 Impact gDMR

Gen *Impact* kóduje evolučně konzervovaný protein, jehož funkce nebyla do roku 2005 popsána. V roce 2005 bylo zjištěno, že se *Impact* podílí na udržování stále vysoké translace v buňkách při nedostatku aminokyselin. Exprese tohoto genu byla zjištěna primárně v mozku (Pereira et al., 2005). K umlčení tohoto genu dochází u myší na maternální alele. U člověka k imprintingu tohoto genu nedochází. Největší rozdíl mezi tímto genem u myší a lidí je v přítomnosti CpG ostrovu, organizace genu je jinak u obou druhů velmi podobná. U myší se v prvním intronu *Impact* genu nachází CpG ostrov, který je velmi metylovaný na mateřské alele, metylace otcovské alely chybí. Tento CpG ostrov chybí u lidí, tudíž zde nedochází k umlčování (Okamura et al., 2000). Promotor tohoto genu byl anotován jako gDMR pro daný klastr.

1.6.3.16 Mest gDMR

Mest (Mesoderm-specific Transcript) je gen také známý jako *Peg1* (Paternally Expressed Gene 1). Z jednoho z jeho jmen vyplývá, že jde o gen exprimovaný z paternální alely, alela zděděná od matky je metylována a umlčena. K maternálnímu imprintingu dochází v mnoha embryonálních tkáních (např. v mozku, srdci atd.), převážně v tkáních mezodermálního původu (Kaneko-Ishino et al, 1995). Imprinting je zprostředkován přítomností metylovaného CpG ostrovu na mateřské alele v prvním intronu a prvním exonu genu *Mest* (Lefebvre et al., 1997). *Mest* kóduje protein patřící do rodiny alfa/beta hydroláz, které některé fungují v regulaci metabolismu tuků či jsou zahrnuty v regulaci signálních drah (Kaneko-Ishino et al., 1995; Lord et al., 1997). *Mest* je spojován s inhibicí glykolizace LRP6 (Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 6) při adipocytogenezi, a tím s regulací

kanonické či nekanonické Wnt signalizace (Junf et al., 2011). Podobná funkce *Mest* genu je známá v rámci vývoje centrální nervové soustavy, kde ovlivňování kanonické a nekanonické Wnt signalizace hraje velkou roli ve vývinu neuronů (Mesman et al., 2017). Bylo zjištěno, že delecí paternální alely tohoto genu dochází k nesprávnému růstu embrya a placenty. Samice, u kterých docházelo k menší expresi genu *Mest*, se projevovalo netypické mateřské chování (Lefebvre et al., 1998). *Mest* překrývá a zajišťuje aktivní transkripci probíhající přes transkript, jehož promotor byl anotován jako gDMR tohoto klastru.

1.6.3.17 *Herc3/Nap1l5 gDMR*

Herc3

Herc3 tvoří protein patřící do rodiny Herc, která se vyznačuje přítomností jak Hect domény, tak RCC1-like domény. Proteiny obsahující Hect doménu mohou tvořit thioesterové vazby mezi ubiquitinem a cílovým proteinem a mohou se tak podílet na degradaci cílového proteinu. Fungují tedy jako ubiquitin-ligázy (Huibregtse et al., 1995). RCC1-like doména umožňuje proteinům spoustu různých funkcí jako výměnu guaninu v DNA, enzymatickou inhibici nebo interakci s dalšími proteiny (Bischoff & Ponstingl, 1991; Gao & Patel, 2005; Rosa & Barbacid, 1997). *HERC3* jako takový zastává roli ubiquitin-ligázy jako součást procesu degradace proteinů (Schwarz et al, 1998). Sám může být také ubiquitinován a degradován, čímž se udržuje jeho normální hladina v buňce (Cruz et al., 2001). *Herc3* sám o sobě imprintovaný není, jen překrývá gDMR a imprintovaný gen *Nap1l5*. I když sám není imprintovaný, imprintovaný gen *Nap1l5* tento gen svým umlčením ovlivňuje. Gen *Herc3* má více polyadenylačních míst, které mohou být pro expresi využity. Na paternální alele, kde je *Nap1l5* exprimovaný, dochází k využití upstream polyadenylačního místa *Herc3*. Naopak na mateřské alele, kde je *Nap1l5* imprintovaný, dochází k využití downstram polyadenylačního místa, zde vzniklé proteiny fungují jako ubiquitin-ligázy a podílí se na degradaci proteinů v proteazomu (Cowley et al., 2012; Cruz et al., 2001). Tento gen zajišťuje aktivní transkripci procházející přes promotor genu *Nap1l5*, který obsahuje gDMR.

Nap1l5

Nap1l5 je imprintovaný gen lokalizován v rámci svého neimprintovaného hostitelského genu *Herc3*. Jedná se o maternálně imprintovaný gen, exprese tedy probíhá z otcovské alely. K expresi dochází jak v myších embryích, tak i v dospělých tkáních jako například v mozku či v nadledvinkách (Smith et al., 2003). Mimo to, že tento gen má zásadní

vliv na gen *Herc3*, tak je u člověka považován za tumorový supresor, jelikož negativně ovlivňuje proliferaci buněk (Harada et al., 2002).

1.6.3.18 Cdh15 gDMR

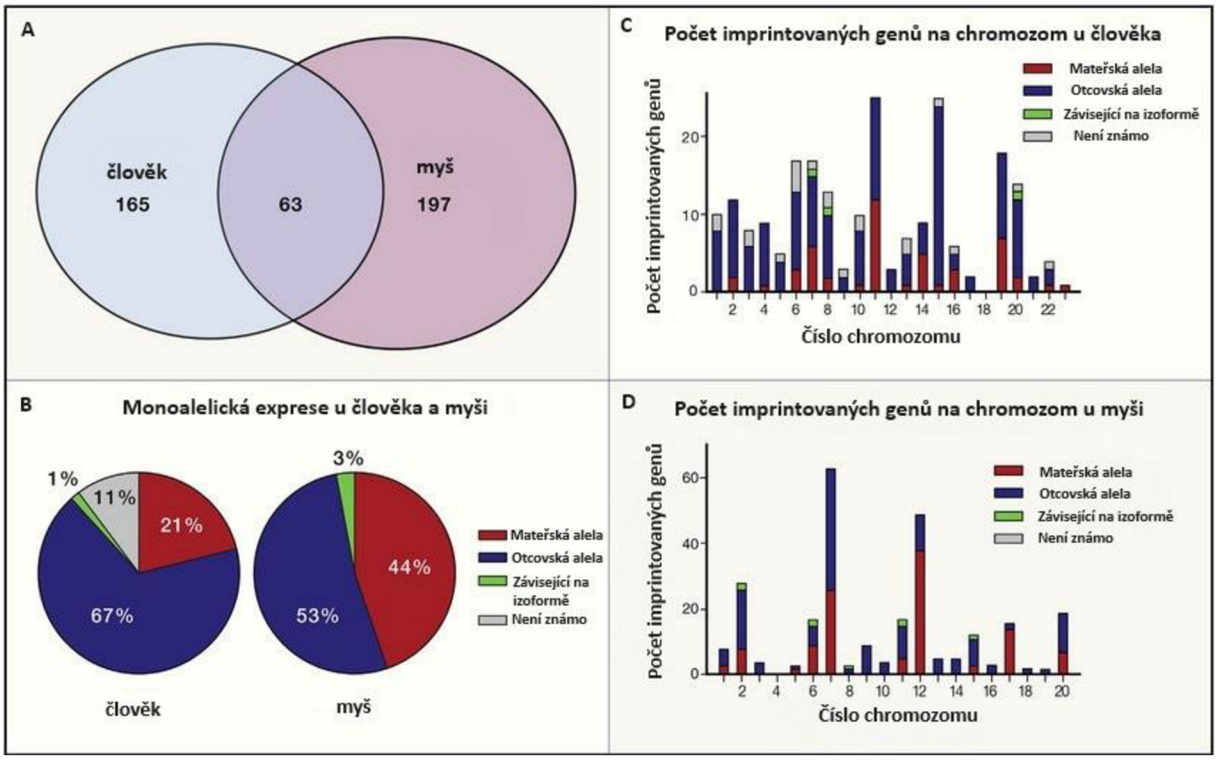
Cdh15 je maternálně imprintovaný gen kódující protein cadherin 15 (také znám pod jménem muscle cadherin 15) patřící do rodiny cadherinových proteinů (Proudhon et al., 2012; Yagi & Takeichi, 2000). Tyto proteiny se vyskytují na povrchu buněk a zprostředkovávají jejich přilnutí (Takeichi et al., 1981). Jeho exprese je primárně situována v mozku a v kosterním svalstvu (Shimoyama et al., 1998). Bylo zjištěno, že mutace v rámci tohoto genu jsou příčinou řady mentálních postižení (Bhalla et al., 2008). Gen *Cdh15* překrývá gDMR pro daný klastr a zajišťuje tím transkripci probíhající přes tento region.

1.7 Genomický imprinting u dalších savců

1.7.1 Genomický imprinting u člověka

V současné době je známo 100 – 150 lidských imprintovaných genů regulovaných 25 kontrolními oblastmi imprintingu (Jima et al., 2022; Santoni et al., 2017). V roce 2022 skupina Jima et al. zorganizovala celogenomové bisulfitické sekvenování lidského genomu, které odhalilo dohromady 332 potenciálně kandidátních ICRs (z toho 19 již dříve známých) (Jima et al., 2022). Celkový počet imprintovaných genů u člověka se odhaduje v rozmezí 300 – 1000 (Luedi et al., 2007). Z těchto čísel je patrné, že výzkum lidského genomického imprintingu je teprve na začátku. Pokud porovnáme genomický imprinting u myší a lidí, v dnešní době nalezme 63 konzervovaných imprintovaných genů, ale až téměř 200 imprintovaných genů, které jsou specifické pro každý z druhů. Dále se imprintované geny mezi těmito dvěma druhy liší v původu monoalelické exprese. Zatímco u myši je počet imprintovaných genů exprimovaných z paternální a maternální alely téměř vyrovnaný, u člověka převažují geny, jejichž exprese probíhá z alely paternální (**Obr. 2**).

Genomický imprinting u lidí je často spojován s vrozenými poruchami. Imprintované geny mají obrovský vliv v prenatálním či postnatálním vývoji (Tucci et al., 2019). Chybně zavedená metylace gDMRs imprintovaných genů může vést u lidí k tzv. poruchám imprintingu, které jsou spojovány s celou řadou syndromů či například s psychickými poruchami jako je schizofrenie nebo bipolární afektivní porucha (Butler, 2009; Chao et al., 2022). Spousta imprintovaných genů je v poslední době spojována také s rakovinou, diabetem či obezitou (Murphy & Jirtle, 2003).



Obr. 2: Porovnání imprintingu mezi člověkem a myší. A) Počet imprintovaných genů u člověka a myši, překryv kruhů značí počet společných imprintovaných genů. B) Grafické znázornění parentální monoalelické exprese. C) Počet imprintovaných genů na chromozom u člověka. D) Počet imprintovaných genů na chromozom u myši (převzato a upraveno od Tucci et al., 2019).

1.7.2 Genomický imprinting u potkana

Potkan společně s myší patří k nejvíce důležitým modelům pro zkoumání lidských nemocí (Lindblad, 2004). Potkan se tak stal třetím savcem, jehož genom byl osekvenován (po člověku a myši). Velikost jeho genomu byla stanovena na přibližně 3 Gb a počet jeho genů je odhadován na přibližně stejný počet jako u člověka (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004). Bylo u něj nalezeno 20 autosomálních chromozomů společně s jedním pohlavním chromozomem (2n=42) (Ricciuti et al., 1973). Do roku 2023 bylo u potkana známo jen 13 imprintovaných genů (Kobayashi, 2021). V roce 2023 proběhl výzkum, který toto číslo rozšířil na 30 imprintovaných genů (19 kanonických, 11 nekanonických). Všechny námi zkoumané metylované gDMRs u myši vykazují metylaci a následné umlčení asociovaného promotoru i u potkana (Richard Albert et al., 2023).

1.7.3 Genomický imprinting u krávy

Krávy patří k člověkem nejvíce využívaným zvířatům, není tedy divu, že se studium genomického imprintingu zaměřilo právě i na ně. Velikost jejich genomu byla určena na přibližně 2,8 Gb rozdělených do 30 párů chromozomů (29 autosomálních chromozomů a 1 pohlavní) (Zimin et al., 2009). V rámci kravího genomu bylo nalezeno a potvrzeno 26 imprintovaných genů (Tian, 2014). V roce 2016 proběhla studie, která však objevila 53 genů, které se vykazovaly monoalelickou expresí, studium genomického imprintingu u krav tedy není ani zdaleka u konce (Chen et al., 2016). Podle současných poznatků uvedených na stránce GeneImprint (https://www.geneimprint.com) by měly krávy a myši sdílet kolem 30 stejných imprintovaných genů

Mezi známé poruchy imprintingu u krav (a také ovcí) patří tzv. Large offspring syndrome, který se vyznačuje nadprůměrnou velikostí telete po porodu, neochotou sát mateřské mléko či úmrtím během perinatálního období (Garry et al., 1996; Walker et al., 1996; Young et al., 1996).

2 Cíle práce

Jak ukazuje předchozí kapitola, poznatky o genovém imprintingu jsou známé zejména u myši a v menší míře u člověka. Z hlodavců byl imprinting studován jenom u myši a potkana. My jsme chtěli využít známé charakteristiky imprintovaných gDMR (kapitola 1.6.2) a zjistit, jestli je možné jich využít při predikci konzervace imprintingu u jiných druhů v porovnání s myší. Pro analýzu jsme si zvolili potkana (*Rattus norvegicus*), protože u tohoto druhu byl imprinting studován, a je proto možné naše predikce porovnat s experimentálními výsledky jiných skupin, a rypoše lysého (*Heterocephalus glaber*). U tohoto druhu bylo v literatuře zmíněno, že je možné, že evolučně ztratil genový imprinting. A to kvůli nedostatku parentálního konfliktu v jejich sociálním systému, kde se samec celý život páří jen s jednou samicí (Bhattacharya & Wilkins, 2019). Pro experimentální ověření našich bioinformatických predikcí u rypoše lysého jsme chtěli místo zavedené metody s vyšší časovou náročností vyzkoušet rychlou a jednoduchou metodu pomocí qPCR v reálním čase.

Tato práce měla cíle:

1. Bioinformaticky predikovat, jestli jsou regiony u potkana a rypoše lysého homologní s myšími gDMRs také imprintovány
2. Laboratorně prokázat pravdivost naší predikce na příkladě rypoše lysého.

3 Metody a materiál

3.1 Bioinformatická část

V tomto výzkumu bylo použito devatenáct anotovaných gDMRs, které byly prokázány jako imprintované a maternálně metylované u myši (Veselovska et al., 2015). Na základě konzervovanosti genů asociovaných s gDMRs uvedených v tabulce (**Tab.1**) mezi myší *(Mus musculus)* a námi zkoumanými druhy potkanem *(Rattus norvegicus)* a rypošem lysým *(Heterocephalus glaber)* byly predikovány lokace gDMRs u těchto druhů. Na základě znaků imprintovaných gDMRs, a to konkrétně přítomnosti procházející transkripce, CpG ostrovů a přítomnosti specifické sekvence rozeznávané proteinem ZFP57, který se váže na imprintované gDMR, jsme u každého potenciálního gDMR předpověděli, jestli je imprintovaný, nebo ne.

Tab. 1: Seznam použitých anotací myších imprintovaných gDMR metylovaných v maternální alele.

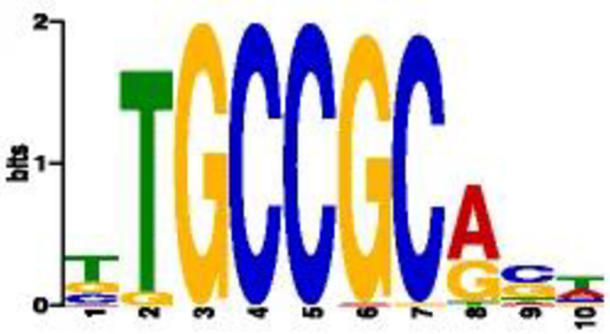
Anotace	Chromozom	Začátek gDMR	Konec gDMR
Promotor genu *Mcts2*, překrytý genem *H13*	2	152 686 373	152 688 026
Promotor genu *Nnat*, překrytý genem *Blcap*	2	157 559 077	157 562 195
Promotor genu *Nespas*, překrytý genem *Gnas*	2	174 294 362	174 301 063
Alternativní promotor genu *Gnas*, překrytý genem *Gnas*	2	174 325 376	174 329 137
Promotor genů *Sgce* a *Peg10*, překrytý neobvyklým upstream promotorem genu *Peg10*	6	4 746 743	4 749 483
Promotor genů *Peg3* a *Usp29*, překrytý upstream promotorem genu *Peg3*	7	6 727 076	6 731 546
Alternativní promotor genu *Snrpn*, překrytý genem *Snrpn*	7	60 002 495	60 006 697
Alternativní promotor of *Inpp5f*, překrytý genem *Inpp5f*	7	128 687 509	128 688 826
Promotor genu *Kcnq1ot1*, překrytý genem *Kcnq1*	7	143 294 831	143 296 905
Hlavní promotor genu *Plagl1*, překrytý upstream oocytově specifickým promotorem *Plagl1*	10	13 089 891	13 092 325
Alternativní promotor genu *Grb10*, překrytý genem *Grb10*	11	12 025 124	12 027 097
Promotor genem *Zrsr*, překrytý genem *Commd1*	11	22 971 610	22 974 212
Promotor genu *Peg13*, překrytý genem *Trappc9*	15	72 808 971	72 811 158
Promotor genu *Slc38a4*, překrytý neobvyklým transkriptem identifikovaným v myších oocytech	15	97 054 839	97 055 853
Promotor genu *Airn,* překrytý genem *Igf2r*	17	12 741 303	12 742 950
Promotor genu *Impact*, překrytý upstream neobvyklým promotorem genu *Impact* a/nebo neobvyklým genem	18	12 971 926	12 975 001
Promotor nedostatečně popsaného transkriptu, překrytý genem *Mest*	6	30 734 932	30 739 966
Promotor genu *Nap1l5*, překrytý genem *Herc3*	6	58 906 126	58 907 344
Překrytý genem *Cdh15*	8	122 864 135	122 865 765

Náš bioinformatický výzkum probíhal z velké většiny v programu SeqMonk v1.47.1 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk/), který nám pomohl vizualizovat potřebné geny a jejich transkripty či CpG ostrovy potřebné pro identifikaci gDMRs u potkana a rypoše lysého. Pro zobrazení sekvence genů byla použita webová stránka www.ensembl.org, kde jsme mohli vyhledávat námi potřebné sekvence (TGCCGC a modifikace této sekvence) spojované s imprintingem. Pro kontrolu byly pomocí těchto programů analyzovány gDMRs taktéž u myši podle dodaných anotací (**Tab.1**). U myši jsme pracovali s genomem GRCm38, u potkana s genomem Rnor_6.0, a u rypoše s genomem hetGla2.

Prvním krokem bylo určení hypotetické pozice gDMR v genomu potkana a rypoše. Toto určení probíhalo na základě evoluční konzervace umístění gDMR u myší, kde byla jejich pozice již potvrzena. Mezi okolnosti, které byly brány v potaz při určování pozice gDMR, patřil například výskyt stejných genů u námi zkoumaných zástupců, jejichž promotory byly u myši popsány jako pozice gDMRs či podobná pozice CpG ostrovů v DNA mezi myšmi a námi zkoumanými zástupci.

Dalším krokem v našem bioinformatickém výzkumu bylo zjišťování transkripce. Jednou z podmínek, které musí imprintovaný gDMR splňovat je, že přes něj prochází transkripce v oocytech, a tedy se nachází v transkribované oblasti. Jelikož nám byly známy geny, obklopující námi zkoumané úseky, transkripční aktivitu v našem požadovaném úseku udávala aktivní transkripce genu umístěného okolo našeho zkoumaného potenciálního gDMR. Pro tuto analýzu jsme použili dostupné RNA-seq datasety z oocytů potkana (GSE112622) (Brind'Amour et al., 2018) a RNA-seq data z oocytů rypoše vygenerované v naší laboratoři (GSE236457) (Behluli et al., 2023). Datasety byly již procesovány s cílem odstranění adapterů a bází s nízkou kvalitou pomocí programu Trim Galore! V0.6.2 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) se základními parametry a mapovány na genomy (Rnor_6.0 pro potkana a hetGla2 pro rypoše) pomocí programu Hisat2 v2.1.0 se základními parametry (Kim et al., 2019). Namapovaná data jsme zobrazili v programu Seqmonk, kde jsme na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti RNA-seq readů v hledaných genech určili, jestli je daný gen exprimován a tedy jestli se potenciální gDMR nachází v transkribované oblasti. Hledané geny byly homology myších genů, které zabezpečují transkripci přes myší gDMRs. V případě nepřítomnosti homologního genu jsme s pomocí RNA-seq dál zjisťovali, jestli přes potenciální gDMR probíhá transkripce jiného, i neanotovaného, genu.

U každého ze zkoumaných druhů byly taktéž v potenciálních gDMRs vyhledávány sekvence TGCCGC, další varianty této sekvence a taktéž reverzní komplement, který nám pomohl obsáhnout jak forward (směr 5‘ - 3') vlákno, tak vlákno reverzní (směr 3' – 5‘) (**Obr. 3, Tab. 2**). Přítomnost námi vyhledávané sekvence (případně jejích dalších variant) byla prokázána v blízkosti vazebných míst proteinu ZFP57, jehož přítomnost je nezbytná k udržení paměti metylace většiny imprintovaných gDMRs převážně v myších embryích či v embryonálních kmenových buňkách (Strogantsev et al., 2015).



Obr. 3: Vyhledávaná sekvence a její varianty. Jednotlivé báze jsou odlišeny barevně, frekvence přítomnosti různých bází je znázorněna různou velikostí (převzato a upraveno ze Strogantsev et al., 2015).

Tab. 2: Varianty vyhledávané sekvence TGCCGC rozeznávané proteinem ZFP57 a jejich reverzní komplementy.

Varianta sekvence	Reverzní komplement
TGC CGC	GCG GCA
GGC CGC	GCG GCC
TGC TGC	GCA GCA
TGC CGT	ACG GCA
TGC CGG	CCG GCA

3.2 Laboratorní část

V této části bylo naším úkolem laboratorně potvrdit naše bioinformaticky získané výsledky ohledně predikce imprintovaných genů u rypoše lysého. Naším cílem bylo experimentálně zjistit hladinu DNA metylace vybraných regionů v somatických tkáních rypoše – pokud se jedná o imprintované regiony, hladina metylace by měla být přibližně 50 %, v opačném případě budou plně metylované nebo bez metylace.

3.2.1 Získávání vzorků z izolace DNA

Naše zkoumané vzorky byly získány při pitvě samičky rypoše lysého *(Heterocephalus glaber)*. Z vybraných sedmi orgánů (plíce, srdce, slezina, játra, ledvina, kosterní sval a hnědý tuk) jsme odebrali vzorky přibližně 3 x 3 x 3 mm a následně jsme z čerstvě odebraných tkání izolovali DNA.

Pro izolaci DNA jsme odebrané tkáně nejdřív disociovali v 700 µl STE pufru (ve složení 1 M NaCl, 200 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA) s 15 µl proteinkinázy K (Sigma Aldrich/Merck, roztok 10 mg/ml). Vzorky byly umístěny do blokové termální lázně s třepačkou, kde byly po dobu tří hodin míchány na 900 rpm při teplotě 55 °C. Aktivita proteinkinázy K byla pak inaktivována zvýšením teploty na 70 °C a vzorky byly takto ponechány po dobu pěti minut v blokové lázni.

Poté byly vzorky umístěny na pět minut na led. Následovala centrifugace vzorků při 4 °C na otáčky 14000 rpm. Na spodní straně zkumavky byl vytvořen pelet se zbytky tkání, supernatant vzniklý nad peletem obsahoval námi požadovanou rozpuštěnou DNA. Supernatant byl odebrán a přemístěn do nových 1,5ml Eppendorf zkumavek. K námi odebranému supernatantu obsahujícímu DNA bylo přidáno 700 µl isopropanolu k vysrážení DNA. Zkumavky s DNA a isopropanolem byly umístěny do centrifugy a byly točeny na otáčky 14000 rpm při 4 °C po dobu pěti minut. Na dně se vytvořil pelet, který nyní obsahoval DNA. Supernatant vzniklý nad peletem byl odebrán a odstraněn.

Získaná DNA byla promývána 70% etanolem k vyčištění vzorku od zbylých solí. Následovala opět centrifugace vzorků po dobu pěti minut na otáčky 14000 rpm a supernatant (etanol) vzniklý nad peletem byl opět odebrán. Zkumavky se poté nechaly otevřené na přibližně 5 minut, aby došlo k odpaření zbytkového etanolu. Po odpaření zbytkového etanolu

ze vzorku byla DNA smíchána s HPLC vodou a inkubována v blokové lázni při 65 °C na dobu pěti minut. Získaná DNA byla uchovávaná při -20°C.

3.2.2 Bisulfitová konverze

Bisulfitová konverze byla zásadním krokem v našem výzkumu. Právě díky ní jsme schopni zjistit, zda je námi pozorovaný úsek DNA metylován či nikoli. Principem této metody je přeměna nemetylovaného cytosinu na uracil pomocí bisulfitu sodného. Pro tuto reakci byl zvolen EpiTech Bisulfite Kit (48) od firmy QIAGEN a bylo postupováno podle dodaného protokolu.

Po rozmrazení našich vzorků byl připraven bisulfitový mix přidáním 800 µl vody bez RNáz a DNáz k dodanému mixu. Následně byly v PCR mikrozkumavkách smíchány kompontenty pro samotnou reakci (**Tab. 3**). Následně byl obsah zkumavek lehce zvortexován pro smíchání všech komponent. Se vzorky bylo pracováno při pokojové teplotě (15-25 °C).

Tab. 3: Komponenty a jejich množství potřebné pro bisulfitickou konverzi.

Komponenty	Množství na reakci (µl)
DNA (~200 ng/µl)	20
Bisulftový mix	85
DNA ochranný pufr	35
Celkové množství	140

Následně byly zkumavky s reakční směsí vloženy do termocykléru, který byl nastaven podle instrukcí dodavatele používaného kitu (**Tab. 4**). Samotná reakce probíhala 5 hodin.

Tab. 4: Podmínky termocykléru potřebné pro bisulfitickou konverzi.

Krok	Čas (min)	Teplota (°C)
Denaturace	5	95
Inkubace	25	60
Denaturace	5	95
Inkubace	85	60
Denaturace	5	95
Inkubace	175	65
Pauza	nedefinováno	20

Následovalo čištění DNA od bisulfitového mixu. Vzorky byly transferovány z PCR mikrozkumavek do Eppendorf zkumavek o objemu 1,5 ml. Do každé ze zkumavek bylo přidáno 560 µl BL pufru, tato směs byla lehce zvortexována a centrifugována. Následně byl obsah zkumavek transferován do zkumavek s kolonkami a nechal se centrifugovat po dobu jedné minuty na plné otáčky. Tekutina na dně zkumavky byla odebrána. Tento krok byl opakován s 500 µl BW pufru. Následovalo přidání 500 µl BD pufru a vzorky byly ponechány po dobu patnácti minut k inkubaci v pokojové teplotě. Manipulace s BD pufrem by měla být velmi opatrná, jelikož při delším otevření by mohlo dojít k acidifikaci pufru z ovzduší. Po patnácti minutách byl obsah opět centrifugován po dobu jedné minuty na plné otáčky a prošlý obsah opět vyňat. Následovalo opětovné přidání 500 µl BW pufru a centrifugace po dobu jedné minuty na plné otáčky, tento krok byl ještě jednou zopakován.

Kolonky s DNA byly přemístěny do nových zkumavek a opět centrifugovány po dobu jedné minuty, abychom se zbavili přebytečné tekutiny. Abychom se zbavili veškeré tekutiny, byly zkumavky vloženy navíc ještě do blokové lázně a ponechány s otevřenými víčky při 56 °C po dobu pěti minut, aby došlo k vypaření.

Kolonky byly vloženy do nových zkumavek. Do středu každé z kolonek bylo přidáno 20 µl EB pufru a směs byla opět centrifugována po dobu jedné minuty. Po tomto kroku by se ve zkumavce měla vyskytovat vyčištěná bisulfiticky konvertovaná DNA.

3.2.3 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

Získaná DNA (před i po bisulfitické konverzi) byla použita pro kvantitativní PCR v reálném čase. Byl použit qPCRBIO SyGreen Mix (PCR Biosystems). Komponenty a použité množství jsou znázorněné v tabulce (**Tab. 5**), podmínky použité pro naši qPCR jsou znázorněny v **tabulce 6**. Celkový objem reakce byl 10 µl.

Použité primery (**Tab. 7**) byly vybrané pomocí programu Primer3web v4.1.0 (https://primer3.ut.ee/) podle základních parametrů s úpravou optimální délky produktu na 80 - 250 bp, optimálního množství GC párů na 60 % (jedná se převážně o CG bohaté oblasti) a úpravou optimální Tm primerů na 62 °C (maximální Tm 65 °C) pro co největší obsah CpG pozicí. Sekvence pro vyhledání primerů byly získány z rypošího genomu HetGla2 a byly 500 bp dlouhé (+/- 250 bp od pozice identifikované jako lokalizace gDMR).

Tab. 5: Komponenty a jejich množství potřebné pro kvantitativní PCR v reálném čase.

Komponenty	Množství na reakci (µl)
2X qPCRBIO SyGreen Mix	5
Forward primer	0,3
Reverse primer	0,3
Voda	3,4
Templátová DNA (10-50 ng/µl)	1

Tab. 6: Podmínky termocykléru potřebné pro qPCR.

Krok	Čas	Teplota (°C)
Denaturace	15 minut	95
Denaturace	25 sekund	94
Hybridizace	25 sekund	57 – 65*
Elongace	30 sekund	72
Čtení PCR destičky	/	/
Křivka tání	/	57-94

* Teplota použitá pro hybridizaci primerů v experimentu byla stanovena pro různé primery odlišně, bližší informace k použitým teplotám nalezneme v kapitole 4.2.

Primery byly vybrány tak, aby cílily na námi vybrané imprintované gDMRs (u genů *Impact*, *Nnat*, *Nap1l5*, *Igf2r*). U dvou regionů je imprintace očekávaná (*Nnat*, *Nap1l5*), u dalších dvou nikoli (*Impact*, *Igf2r*). Zbylé regiony (*Gapdh_gb*, *Gapdh_p1*, *Gapdh_p2*, *inter_1*, *inter_2*) slouží jako kontrolní. Regiony *Gapdh_p1* a *Gapdh_p2* by měly být nemetylované. Naopak regiony *Gapdh_gb*, *inter_1* a *inter_2* by měly být stoprocentně metylované. Ke každé sekvenci jsou připravené 2 páry primerů. Jeden z párů je specifický pro případ, kdyby došlo k bisulfitické konverzi – C by se měnilo na U (region by byl nemetylovaný, v názvu primeru označený jako „BS“), druhý pár je specifický pro metylované regiony, u nichž nedošlo ke konverzi, tudíž by měly zůstat identické s původní DNA (v názvu primeru označený jako „norm“). Pro každý region jsme porovnali rychlost amplifikace extrahované a bisulfiticky konvertované DNA pro normální a bisulfitické primery pomocí metody delta Ct.

Tab. 7: Seznam použitých primerů.

Název primeru	Sekvence
*Impact*_HG_norm_F	ACTAATGAGGACACCGCCCG
*Impact*_HG_norm_R	ACATGGCTGAGAGGAACGCA
*Impact*_HG_BS_F	ACTAATGAGGACACCACCCA
*Impact*_HG_BS_R	ACATGGCTGAGAGGAACACA
*Nnat*_HG_norm_F	GACAGGGATCGCGGCAATTG
*Nnat*_HG_norm_R	CCCAACAGCGGACTCCAAGA
*Nnat*_HG_BS_F	GACAGGGATCACAGCAATTG
*Nnat*_HG_BS_R	CCCAACAGCAGACTCCAAGA
*Nap1l5*_HG_norm_F	ACCCACCGCCACTCACTG
*Nap1l5*_HG_norm_R	AATTCGCTCCGCAGAAGACG
*Nap1l5*_HG_BS_F	ACCCACCACCACTCACTG
*Nap1l5*_HG_BS_R	AATTCACTCCACAGAAGACA
*Igf2r*_HG_norm_F	AGTCCCTCCACGAACGCTAC
*Igf2r*_HG_norm_R	CCAGGCCTCGGAGTTCACC
*Igf2r*_HG_BS_F	AGTCCCTCCACAAACACTAC
*Igf2r*_HG_BS_R	CCAGGCCTCAGAGTTCACA
*Gapdh_p1*_HG_norm_F	TTTATCTCCCTCCCGCAGCC
*Gapdh_p1*_HG_norm_R	CCGTCCTTCACTCACCCGTT
*Gapdh_p1*_HG_BS_F	TTTATCTCCCTCCCACAGCC
*Gapdh_p1*_HG_BS_R	CCATCCTTCACTCACCCATT
*Gapdh_p2*_HG_norm_F	GGTCGGGCTGTAAAGGTCACT
*Gapdh_p2*_HG_norm_R	GGCAGGAGTAAAGGTCGGCT
*Gapdh_p2*_HG_BS_F	GGTCAGGCTGTAAAGGTCACT
*Gapdh_p2*_HG_BS_R	GGCAGGAGTAAAGGTCAGCT
*Gapdh_gb*_HG_norm_F	GATTGTCAGGTGAGCGCCCT
*Gapdh_gb*_HG_norm_R	CTACCATGAGCCCCTCCACG
*Gapdh_gb*_HG_BS_F	GATTGTCAGGTGAGCACCCT
*Gapdh_gb*_HG_BS_R	CTACCATGAGCCCCTCCACA
*inter_1*_HG_norm_F	TTCCACGAACAGCCCCTCTC
*inter_1*_HG_norm_R	GGTGCGGGTGTCTGGTATCT
*inter_1*_HG_BS_F	TTCCACAAACAGCCCCTCTC
*inter_1*_HG_BS_R	AGTGCAGGTGTCTGGTATCT
*inter_2*_HG_norm_F	CCCCTGGCTACAAATGAGACG
*inter_2*_HG_norm_R	GTAAGAGCCGAGTCCTGCAG
*inter_2*_HG_BS_F	CCCCTGGCTACAAATGAGACA
*inter_2*_HG_BS_R	GTAAGAGCCAAGTCCTGCAG

Bylo provedeno celkem 17 qPCR reakcí. Jejich pořadí, jak byly postupně prováděny, je znázorněno v **tabulce 8**. V prvních 5 reakcích byla hledána správná teplota nasedání primerů našich kontrolních regionů (*Gapdh_gb*, *Gapdh_p2*, *inter_1*, *inter_2*) na bisulfiticky nekonvertovaných DNA. Dle výsledků reakcí byla teplota nasedání primerů u regionů *Gapdh* ustanovena na 62 °C, u regionů *inter* byla teplota stanovena na 65 °C. Následovalo 12 reakcí s různými kombinacemi DNA a primerů (jak primerů pro kontrolní regiony, tak primerů pro námi zkoumané geny). Bisulfiticky konvertované vzorky DNA byly vždy ředěny 1:1 s vodou kvůli jejich malému množství.

V průběhu qPCR bylo provedeno měření čistoty DNA vzorků na Nanodropu. U bisulfiticky konvertovaných vzorků DNA byla zjištěna kontaminace, proto byly tyto vzorky pročištěny pomocí kitu Monarch PCR DNA Cleanup (5 μg) podle protokolu dodaného výrobcem. Nejlépe po vyčištění dopadly bisulfiticky konvertované DNA vzorky jater, srdce, sleziny a hnědého tuku, proto byla většina následujících reakcí provedena právě na nich. qPCR reakce 10 – 17 byly provedeny již za použití přečištěných bisulfiticky konvertovaných vzorků DNA.

Tab. 8: Přehled provedených qPCR reakcí.

	DNA	Primery	Teplota (°C)
1.	játra, ledvina, plíce	*Gapdh_gb*_norm, *Gapdh_gb*_BS, *Gapdh_p2*_norm, *Gapdh_p2*_BS	57
2.	játra, ledvina, plíce	*inter_1*_norm, *inter_1*_BS, *inter_2*_norm, *inter_2*_BS	60
3.	játra, ledvina, plíce	*Gapdh_gb*_norm, *Gapdh_gb*_BS, *Gapdh_p2*_norm, *Gapdh_p2*_BS	62
4.	játra, ledvina, plíce	*inter_2*_norm, *inter_2*_BS, *inter_2*_norm, *inter_2*_BS	62
5.	játra, ledvina, plíce	*inter_2*_norm, *inter_2*_BS, *inter_2*_norm, *inter_2*_BS	65
6.	játra_norm, játra_BS, ledvina_norm, ledvina_BS	*Gapdh_gb*_norm, *Gapdh_gb*_BS, *Gapdh_p2*_norm, *Gapdh_p2*_BS	62
7.	játra_norm, játra_BS, ledvina_norm, ledvina_BS	*inter_2*_norm, *inter_2*_BS, *inter_2*_norm, *inter_2*_BS	65
8.	srdce_norm, srdce_BS, plíce_norm, plíce_BS	*Gapdh_gb*_norm, *Gapdh_gb*_BS, *Gapdh_p2*_norm, *Gapdh_p2*_BS	62
9.	srdce_norm, srdce_BS, plíce_norm, plíce_BS	*inter_2*_norm, *inter_2*_BS, *inter_2*_norm, *inter_2*_BS	65
10.	játra_norm, játra_BS, srdce_norm, srdce_BS	*inter_2*_norm, *inter_2*_BS, *inter_2*_norm, *inter_2*_BS	65
11.	játra_norm, játra_BS, srdce_norm, srdce_BS	*Impact*_norm, *Impact*_BS, *Nnat*_norm, *Nnat*_BS	62
12.	plíce_norm, plíce_BS, ledvina_norm, ledvina_BS	*Nap1l5*_norm, *Nap1l5*_BS, *Igf2r*_norm, *Igf2r*_BS	62
13.	plíce_norm, plíce_BS, ledvina_norm, ledvina_BS	*Gapdh_p1*_norm, *Gapdh_p1*_BS, *Gapdh_p2*_norm, *Gapdh_p2*_BS	62
14.	slezina_norm, slezina_BS, hnědý tuk_norm, hnědý tuk_BS	*Nap1l5*_norm, *Nap1l5*_BS, *Igf2r*_norm, *Igf2r*_BS	62
15.	slezina_norm, slezina_BS, hnědý tuk_norm, hnědý tuk_BS	*Gapdh_p1*_norm, *Gapdh_p1*_BS, *Nnat*_norm, *Nnat*_BS	62
16.	slezina_norm, slezina_BS, sval_norm, sval_BS	*Igf2r*_norm, *Igf2r*_BS, *Nap1l5*_norm, *Nap1l5*_BS	65
17.	slezina_norm, slezina_BS, sval_norm, sval_BS	*Gapdh_p1*_norm, *Gapdh_p1*_BS, *Nnat*_norm, *Nnat*_BS	65

4 Výsledky

4.1 Bioinformatická část

Bioinformatickou část naší práce jsme započali ujištěním či imprintované gDMRs u myší, které byly použity jako templát pro náš výzkum, opravdu splňují charakteristiky imprintovaných gDMRs (viz kapitola 1.6.2 – konkrétně přítomnost přecházející transkripce, CpG ostrovu a sekvence TGCCGC nebo podobných sekvencí), které byly aplikovány dále v našich bioinformatických predikcích u potkana a rypoše. Dle našich výsledků všechny zkoumané gDMRs všechny tyto charakteristiky splňují až na *Slc38a4*, u kterého nebyly nalezeny žádné TGCCGC sekvence či sekvence jim příbuzné (**Příloha I**).

Následovalo určení hypotetické lokalizace gDMRs (**Tab. 9**) a následné vyhledávání charakteristik imprintovaných gDMRs u potkana (**Tab. 10**). Jak je popsané v metodách, očekávali jsme, že lokalizace gDMRs bude konzervována mezi potkanem a myší. Hypotetická lokalizace gDMRs potkana byla stanovena na základě lokalizace v promotorech konzervovaných genů nebo v konzervovaných CpG ostrovech. Abychom mohli považovat gDMR za imprintovaný, musel region splňovat podmínku procházející transkripce a aspoň jednu další (tj. buď obsahovat CpG ostrov či TGCCGC a příbuzné sekvence). U rypoše bylo postupováno podle stejného postupu.

Tab. 9: Hypotetické lokalizace potkaních gDMRs.

Názvy u myši	Lokalizace gDMR	Důvod pozice gDMR
Promotor genu *Mcts2*, překrytý genem *H13*	ch3:148167190	*Mcts2* promotor
Promotor genu *Nnat*, překrytý genem *Blcap*	ch3:154043805-154044419	promotor *Nnat* + CGI
Promotor genu *Nespas*, překrytý genem *Gnas*	ch2:174294362-174301063	dva CGIs vevnitř *Gnas* u myši i potkana, u myši jsou to gDMRs
Alternativní promotor genu *Gnas*, překrytý genem *Gnas*	ch2:174327294-174331145	dva CGIs vevnitř *Gnas* u myši i potkana, u myši jsou to gDMRs
Promotor genů *Sgce* a *Peg10*, překrytý neanotovaným upstream promotorem genu *Peg10*	ch4:29794749-29796752	CpG ostrov, *Peg10* má počátek 417 bp upstream
Promotor genů *Peg3* a *Usp29*, překrytý upstream promotorem genu *Peg3*	n/a	*Peg3* má upstream TSS, ale *Usp29* je daleko
Alternativní promotor genu *Snrpn*, překrytý genem *Snrpn*	n/a	chybí jasný alt. promotor nebo CGI
Alternativní promotor *Inpp5f*, překrytý genem *Inpp5f*	ch7:200105205-200110692	mezi 5.a 6. exonem od konce genu, ale chybí GGI nebo alt. promotor
Promotor genu *Kcnq1ot1*, překrytý genem *Kcnq1*	n/a	není *Kcnq1ot1* gen ani CpG ostrov jako u myši
Kanonický promotor genu *Plagl1*, překrytý upstream oocytově specifickým promotorem *Plagl1*	ch1:7219186-7220105	CpG ostrov
Alternativní promotor genu *Grb10*, překrytý genem *Grb10*	ch14:92116725-92117767	CpG ostrov
Promotor genem *Zrsr*, překrytý genem *Commd1*	ch14:107750162	promotor *Zrsr1*
Promotor genu *Peg13*, překrytý genem *Trappc9*	n/a	*Peg13* nenalezen
Promotor genu *Slc38a4*, překrytý neanotovaným transkriptem	ch7:138527361	promotor *Slc38a4*
Promotor genu *Airn*, překrytý genem *Igf2r*	ch1:48204838-48205956	CGI se shoduje s CGI u myši
Promotor genu *Impact*, překrytý upstream neanotovaným promotorem genu *Impact* a/nebo neanotovaným genem	ch18:4326560-4327891	CGI
Promotor neanotovaného transkriptu, překrytý genem *Mest*	n/a	neanotovaný transkript nepřítomen u potkana, *Mest* má rozdílnou strukturu
Promotor genu *Nap1l5*, překrytý genem *Herc3*	ch4:89150813-89151241	CpG ostrov se shoduje se CpG u myši + *Nap1l5* promotor
Překrytý genem *Cdh15*	ch19:55686809-55688309	má být na exonech 9-13

Tab. 10: Charakteristiky imprintovaných gDMRs vyhledávané u potkana.

Názvy u myši	Transkripce přes gDMR/ICR	CGI (CpG ostrov)	Počet sekvencí TGCCGC	Počet sekvencí příbuzných TGCCGC
Promotor genu *Mcts2*, překrytý genem *H13*	ano	ne	0	1
Promotor genu *Nnat*, překrytý genem *Blcap*	ano	ano	4	5
Promotor genu *Nespas*, překrytý genem *Gnas*	ano	ano	1	3
Alternativní promotor genu *Gnas*, překrytý genem *Gnas*	ano	ano	0	6
Promotor genů *Sgce* a *Peg10*, překrytý neanotovaným upstream promotorem genu *Peg10*	ano	ano	5	9
Promotor genů *Peg3* a *Usp29*, překrytý upstream promotorem genu *Peg3*	nedá se určit	n/a	n/a	n/a
Alternativní promotor genu *Snrpn*, překrytý genem *Snrpn*	ano	ne	n/a	n/a
Alternativní promotor *Inpp5f*, překrytý genem *Inpp5f*	ano	ne	n/a	n/a
Promotor genu *Kcnq1ot1*, překrytý genem *Kcnq1*	ano	ne	n/a	n/a
Kanonický promotor genu *Plagl1*, překrytý upstream oocytově specifickým promotorem *Plagl1*	ano	ano	6	2
Alternativní promotor genu *Grb10*, překrytý genem *Grb10*	ano	ano	2	14
Promotor genem *Zrsr*, překrytý genem *Commd1*	ano	ne	1	2
Promotor genu *Peg13*, překrytý genem *Trappc9*	ano	n/a	n/a	n/a
Promotor genu *Slc38a4*, překrytý neanotovaným transkriptem	nedá se určit	ne	1	1
Promotor genu *Airn*, překrytý genem *Igf2r*	ano	ano	8	2
Promotor genu *Impact*, překrytý upstream neanotovaným promotorem genu *Impact* a/nebo neanotovaným genem	ano	ano	1	20
Promotor neanotovaného transkriptu, překrytý genem *Mest*	ano	ano	n/a	n/a
Promotor genu *Nap1l5*, překrytý genem *Herc3*	ano	ano	2	5
Překrytý genem *Cdh15*	ano	ne	0	3

Z **tabulky 9** je patrné, že u pěti námi zkoumaných gDMRs (*Peg3*/*Usp29, Snrpn, Kcnq1*/*Kcnq1ot1, Trappc9*/*Peg13, Mest*) jsme nebyli schopni najít jejich lokalizaci, tudíž následné hledání charakteristik imprintovaných gDMRs nám bylo značně ztíženo. U těchto gDMRs jsme byli schopni zkoumat jen procházející transkripci a přítomnost CpG ostrovů, nikoli vyhledávat TGCCGC (a příbuzné) sekvence. Tyto gDMRs jsme tedy nebrali v potaz, protože hledání charakteristik pro imprintované gDMRs bez jejich lokalizace by nemělo smysl. Z našich výsledků lze dále vypozorovat (**Tab. 10**), že devět z devatenácti zkoumaných gDMRs splňovaly všechny námi zkoumané charakteristiky (*Blcap*/*Nnat*, *Gnas*/*Nespas*, *Gnas*, *Peg10*/*Sgce*, *Plagl1*, *Grb10*, *Igf2r*/*Airn*, *Impact*, *Herc3*/*Nap1l5*). U těchto gDMRs nemáme důvod k tomu, abychom přítomnost imprintingu neočekávali. Další tři gDMRs (*H13*/*Mcts2*, *Commd1*/*Zrsr*, *Cdh15*) splňují podmínku procházející transkripce a jednu další (buď přítomnost CpG ostrovu nebo přítomné TGCCGC sekvence či sekvence příbuzné). U těchto

gDMRs je taktéž imprinting očekávaný. U ostatních námi zkoumaných gDMRs imprinting neočekáváme, neboť splňují jen podmínku procházející transkripce a žádnou další (*Snrpn*) nebo splňují jednu z podmínek, ale neprochází přes ně transkripce (*Slc38a4*).

Predikce u potkana byla následována predikcí imprintovaných gDMRs u rypoše lysého totožným postupem jako u potkana, tedy určováním hypotetických pozic imprintovaných gDMRs (**Tab. 11**) a hledáním výše zmíněných charakteristik (**Tab. 12**). Jediným rozdílem bylo, že u rypoše jsme nebyli schopni vyhledávat CpG ostrovy, jelikož nejsou anotovány, museli jsme si tedy vystačit jen s procházející transkripcí a přítomností TGCCGC sekvencí (a jim příbuzným sekvencím). Při hledání lokalizace gDMR uvádíme v tabulce jednu bázi (lokalizace počátku genu, kde by se gDMR měl nacházet). Není možné přesně určit, jak gDMR bude velké, ale na základě velikostí gDMRs u myši je velikost gDMRs u rypoše odhadována +/- 250 bp od počátku genu.

Tab. 11: Hypotetické lokalizace rypoších gDMRs.

Názvy u myši	Lokalizace gDMR	Důvod pozice gDMR
Promotor genu *Mcts2*, překrytý genem *H13*	p6:69493828	promotor transkriptu 7664.1, který je možná *Mcts2*
Promotor genu *Nnat*, překrytý genem *Blcap*	p24:39519550	promotor *Nnat*
Promotor genu *Nespas*, překrytý genem *Gnas*	nedá se určit	*Nespas* nepřítomný, nedá se určit, kde v rámci *Gnas* by se gDMR měl nacházet
Alternativní promotor genu *Gnas*, překrytý genem *Gnas*	nedá se určit	nedá se určit, kde v rámci *Gnas* by se gDMR měl nacházet
Promotor genů *Sgce* a *Peg10*, překrytý neanotovaným upstream promotorem genu *Peg10*	p21:79185047	začátek *Peg10*
Promotor genů *Peg3* a *Usp29*, překrytý upstream promotorem genu *Peg3*	nedá se určit	nepřítomný *Usp29*
Alternativní promotor genu *Snrpn*, překrytý genem *Snrpn*	nedá se určit	nedá se určit, kde v rámci *Snrpn* by se gDMR měl nacházet
Alternativní promotor of *Inpp5f*, překrytý genem *Inpp5f*	nedá se určit	nedá se určit, kde v rámci *Inpp5f* by se gDMR měl nacházet
Promotor genu *Kcnq1ot1*, překrytý genem *Kcnq1*	p14:62500381	promotor LOC 106009980, možná odpovídá *Kcnq1ot1*
Kanonický promotor genu *Plagl1*, překrytý upstream oocytově specifickým promotorem *Plagl1*	nedá se určit	nedá se určit, co je kanonický promotor *Plagl1*
Alternativní promotor genu *Grb10*, překrytý genem *Grb10*	p6:39047898	pozice *Grb10* promotoru, možná odpovídá gDMR
Promotor genem *Zrsr*, překrytý genem *Commd1*	nedá se určit	nepřítomný *Zrsr*
Promotor genu *Peg13*, překrytý genem *Trappc9*	nedá se určit	nepřítomný *Peg13*
Promotor genu *Slc38a4*, překrytý neanotovaným transkriptem	p22: 15995086	promotor *Slc38a4*
Promotor genu *Airn*, překrytý genem *Igf2r*	p25:22457201	promotor *Airn*, ale sdílí promotor s *Igf2r*
Promotor genu *Impact,* překrytý upstream neanotovaným promotorem genu *Impact* a/nebo neanotovaným genem	p15:30491898	promotor *Impact*
Promotor neanotovaného transkriptu, překrytý genem *Mest*	nedá se určit	nepřítomný neznámý transkript
Promotor genu *Nap1l5*, překrytý genem *Herc3*	p12:16372994	promotor *Nap1l5*
Překrytý genem *Cdh15*	p8:32331662-32332713	má být na exonech 9-13

Tab. 12: Charakteristiky imprintovaných gDMRs vyhledávané u rypoše.

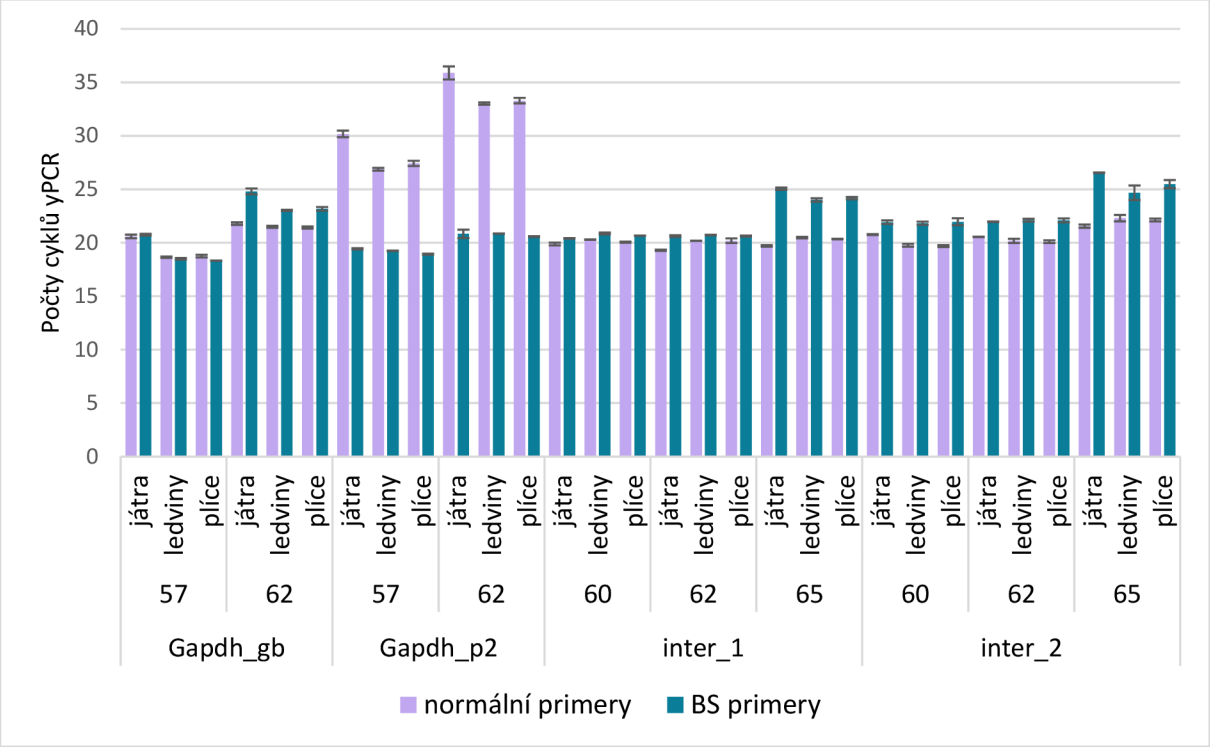
Názvy u myši	Transkripce přes gDMR/ICR	CGI (CpG ostrov)	Počet sekvencí TGCCGC	Počet sekvencí příbuzných TGCCGC
Promotor genu *Mcts2*, překrytý genem *H13*	ano	n/a	1	0
Promotor genu *Nnat*, překrytý genem *Blcap*	ano	n/a	4	3
Promotor genu *Nespas*, překrytý genem *Gnas*	n/a	n/a	n/a	n/a
Alternativní promotor genu *Gnas*, překrytý genem *Gnas*	ano	n/a	n/a	n/a
Promotor genů *Sgce* a *Peg10*, překrytý neanotovaným upstream promotorem genu *Peg10*	ano	n/a	0	0
Promotor genů *Peg3* a *Usp29*, překrytý upstream promotorem genu *Peg3*	n/a	n/a	0	5
Alternativní promotor genu *Snrpn*, překrytý genem *Snrpn*	n/a	n/a	n/a	n/a
Alternativní promotor of *Inpp5f*, překrytý genem *Inpp5f*	ano	n/a	n/a	n/a
Promotor genu *Kcnq1ot1*, překrytý genem *Kcnq1*	ano	n/a	1	1
Kanonický promotor genu *Plagl1*, překrytý upstream oocytově specifickým promotorem *Plagl1*	n/a	n/a	3	4
Alternativní promotor genu *Grb10*, překrytý genem *Grb10*	n/a	n/a	n/a	n/a
Promotor genem *Zrsr*, překrytý genem *Commd1*	n/a	n/a	n/a	n/a
Promotor genu *Peg13*, překrytý genem *Trappc9*	ano	n/a	0	1
Promotor genu *Slc38a4*, překrytý neanotovaným transkriptem	ne	n/a	0	0
Promotor genu *Airn*, překrytý genem *Igf2r*	ne	n/a	n/a	n/a
Promotor genu *Impact*, překrytý upstream neanotovaným promotorem genu *Impact* a/nebo neanotovaným genem	ne	n/a	0	6
Promotor neanotovaného transkriptu, překrytý genem *Mest*	ano	n/a	n/a	n/a
Promotor genu *Nap1l5*, překrytý genem *Herc3*	ano	n/a	1	4
Překrytý genem *Cdh15*	ano	n/a	2	17

Z devatenácti námi zkoumaných regionů jsme nebyli schopni určit hypotetickou pozici gDMRs u devíti regionů (*Gnas*/*Nespas*, *Gnas*, *Peg3*/*Usp29*, *Snrpn*, *Inpp5f*, *Plagl1*, *Commd1*/*Zrsr*, *Trappc9*/*Peg13*, *Mest*). Ze zbývajících desíti regionů se nám podařilo zjistit jak pozici gDMR, procházející transkripci, tak naleznout sekvence TGCCGC (a příbuzné) u pěti regionů (*H13*/*Mcts2*, *Blcap*/*Nnat*, *Kcnq1*/*Kcnq1ot1*, *Herc3*/*Nap1l5*, *Cdh15*). U těchto regionů předpokládáme přítomnost imprintingu. U regionu *Grb10* byla nalezena potenciální pozice gDMR, ale nebyli jsme schopni najít upstream promotor tohoto genu, tudíž jsme nemohli potvrdit či vyvrátit procházející transkripci. Je také možné, že právě námi nalezená potenciální pozice gDMR je ve skutečnosti upstream promotorem, a tudíž neznáme pozici gDMR.

Z tohoto důvodu nebyly transkripce ani sekvence TGCCGC dále zkoumány. Zbývající čtyři regiony byly námi označeny jako neimprintované, jelikož buď splňovaly podmínku procházející transkripce, ale nebyly u nich nalezeny žádné sekvence TGCCGC (*Peg10*/*Sgce*), byly nalezeny TGCCGC sekvence, ale nebyla prokázána procházející transkripce (*Impact*) či region nesplňoval ani podmínku procházející transkripce, ani přítomnost TGCCGC sekvencí (*Slc38a4*). U regionu *Igf2r*/*Airn* jsme byli schopni nalézt hypotetickou lokalizaci gDMR podle myších anotací. Tento region se od toho myšího liší tím, že promotory genů *Airn* i *Igf2r* se nacházejí ve stejném místě, ale pokračují v k sobě opačném směru, tudíž jsme mohli vyloučit transkripci procházející přes promotor genu *Airn*. Sekvence TGCCGC (a příbuzné) nebyly dále vyhledávány (**Tab. 11**) (**Tab. 12**).

4.2 Laboratorní část

Prvním krokem v této části bylo optimalizovat teplotu použitou k nasedání primerů našich kontrolních oblastí (*Gapdh_gb*, *Gapdh_p1*, *Gapdh_p2*, *inter_1*, *inter_2*) na bisulfiticky nezměněné DNA. Prvních pět qPCR reakcí bylo provedeno právě za použití těchto primerů (od každého regionu byly použity primery pro normální DNA i pro bisulfiticky konvertovanou DNA). *Gapdh_p1* v těchto optimalizujících reakcích použit nebyl, teplota pro nasedání byla stanovena stejná jako u *Gapdh_gb* a *Gapdh_p2*. Cílem bylo, aby rozdíl v hodnotě Ct (počet cyklů potřebných pro překročení hodnoty fluorescence pozadí) byl co nejvyšší při použití primerů specifických pro extrahovanou DNA a primerů pro původně nemetylovanou DNA po bisulfitické reakci. U primerů specifických pro nemetylovanou DNA po bisulfitické reakci je změna 1-3 nukleotidů oproti normální sekvenci.

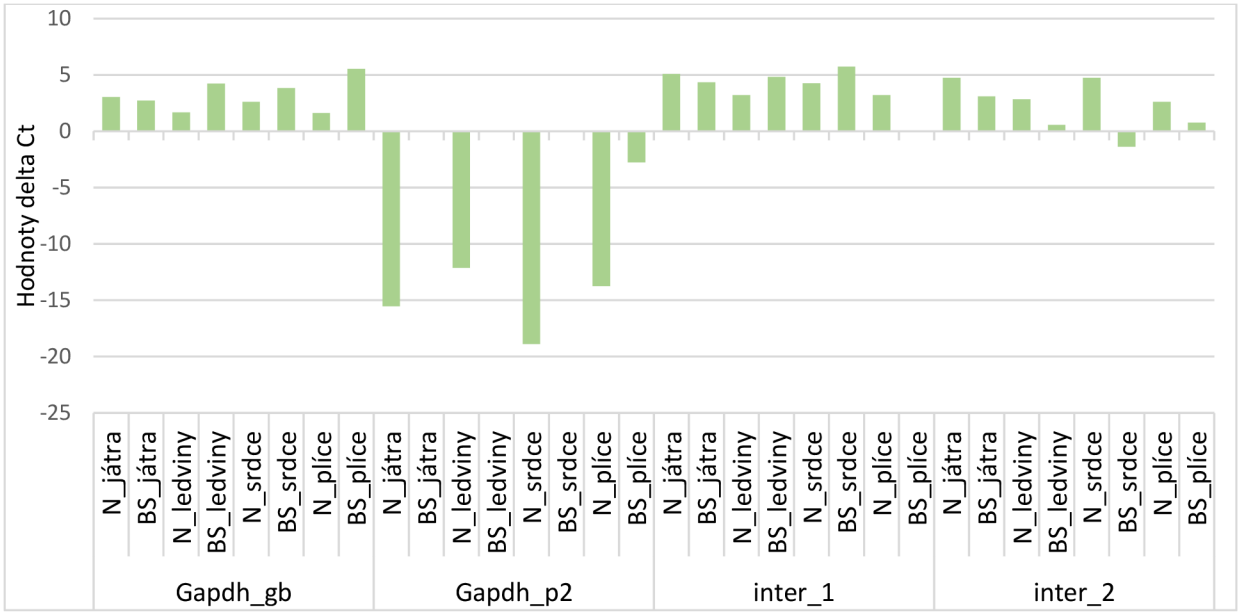


Obr. 4: Porovnání počtu cyklů qPCR potřebných pro namnožení DNA mezi normálními a bisulfitickými primery pro kontrolní regiony na bisulfiticky nezměněné DNA. Osa x zaznamenává použité tkáně, nastavenou teplotu a použité primery. Osa y udává počet cyklů qPCR potřebných pro amplifikaci DNA (hodnota Ct). Růžově je zaznamenaná amplifikace za využití primerů pro bisulfiticky nezměněnou DNA (normální), modře je zaznamenána amplifikace za využití primerů pro DNA po bisulfitické konverzi (BS). V grafu jsou zobrazeny průměry a směrodatné odchylky Ct hodnot.

Z grafu (**Obr. 4**) je patrné, že se zvyšující se teplotou rostou rozdíly v počtu cyklů potřebných pro amplifikaci DNA mezi normálními a BS primery, tedy zvyšuje se specifičnost nasedání primerů. Při nejvyšší využité teplotě byly rozdíly dostatečné (*Gapdh_gb*, *Gapdh_p2* = 62 °C, *inter_1*, *inter_2* = 65 °C), tyto teploty byly dále využívány v následujících reakcích. *Gapdh_gb*, *inter_1* a *inter_2* mají být stoprocentně metylované geny, tedy u nich mají fungovat lépe primery pro bisulfiticky nezměněnou DNA (normální) na bisulfitické nezměné DNA, která byla využita. Z toho vyplývá, že primery pro bisulfiticky změněnou DNA (BS primery) mají mít vyšší počty cyklů pro amplifikaci než primery pro bisulfiticky nezměněnou DNA, což podle našich výsledků odpovídá. *Gapdh_p2* má být nemetylovaný na rozdíl od výše zmíněných genů, ale na nijak neupravované DNA je očekáváno, že bude fungovat stejně, tedy že primery pro bisulfiticky nekonvertovanou DNA budou potřebovat méně cyklů pro amplifikaci DNA. Již v tomto kroku jsme byli schopni zjistit, že tento gen neodpovídá našim

předpokladům. V tomto případě primery specifické pro bisulfiticky konvertovanou DNA, fungovaly daleko lépe.

V následujících reakcích byly primery pro kontrolní regiony aplikovány jak na normální, tak na bisulfiticky konvertovanou DNA.

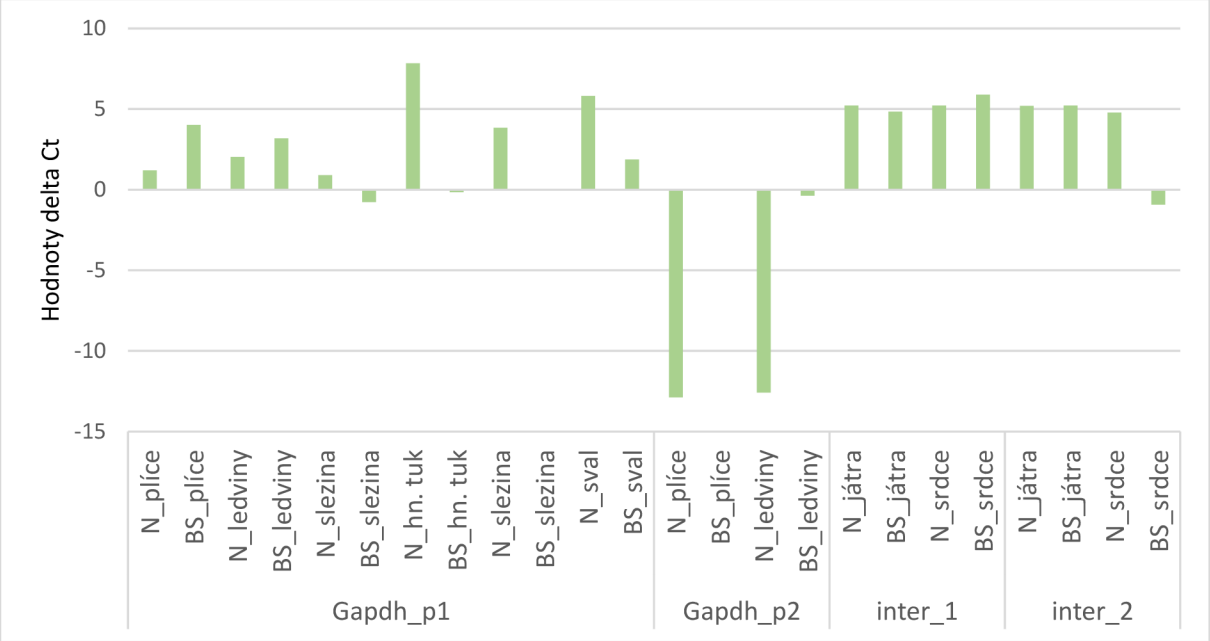


Obr. 5: Výsledky qPCR kontrolních regionů (před přečištěním vzorků) znázorněné hodnotami delta Ct**.** Osa x znázorňuje použité primery a použité tkáně (N = normální DNA, BS = bisulfiticky konvertovaná DNA). Osa y udává hodnoty delta Ct (počty cyklů qPCR při použití primerů pro bisulfiticky konvertovanou DNA mínus počty cyklů qPCR při použití primerů pro bisulfiticky nekonvertovanou DNA). Když kladné hodnoty delta Ct – BS primery fungovaly hůře než normální primery, když záporné hodnoty – BS primery fungovaly lépe než normální primery. Hodnoty delta Ct jsou vypočteny z průměrů Ct hodnot.

Regiony označené *Gapdh_gb*, *inter_1* a *inter_2* mají být metylované, tudíž u nich neočekáváme změnu jak při použití normální, tak bisulfiticky konvertované DNA. Všechny hodnoty delta Ct u těchto regionů by se tedy měla pohybovat v kladných hodnotách, což ve většině případů odpovídá, ale hodnoty by měly být více vyrovnané. *inter_2* nejvíce odpovídá našemu očekávanému výsledku, hodnoty delta Ct u *Gapdh_gb* a *inter_2* kolísají víc, než by u metylovaných genů měly. *Gapdh_p2* jakožto nemetylovaný gen by měl mít záporné hodnoty delta Ct u tkání s bisulfiticky konvertovanou DNA, což se neděje. Záporné hodnoty delta Ct se vyskytují u tkání s bisulfiticky nekonvertovanou DNA. Ve výsledku i tyto reakce potvrzují neočekávané chování genu *Gapdh_p2*, jako tomu bylo i v první sérii reakcí. Po těchto výsledcích následovalo měření vzorků na Nanodropu, které odhalilo kontaminaci

v bisulfiticky konvertovaných vzorcích na základě hodnot 260/280 a 260/230. Bylo provedeno přečišťování těchto vzorků, po kterém se hodnoty 260/280 a 260/230 pohybovaly v očekávaných hodnotách. Výsledky jsou znázorněny grafem (**Obr. 5**).

Po přečištění bisulfiticky konvertované DNA následovala další série reakcí, která opět využívala primery pro kontrolní regiony.

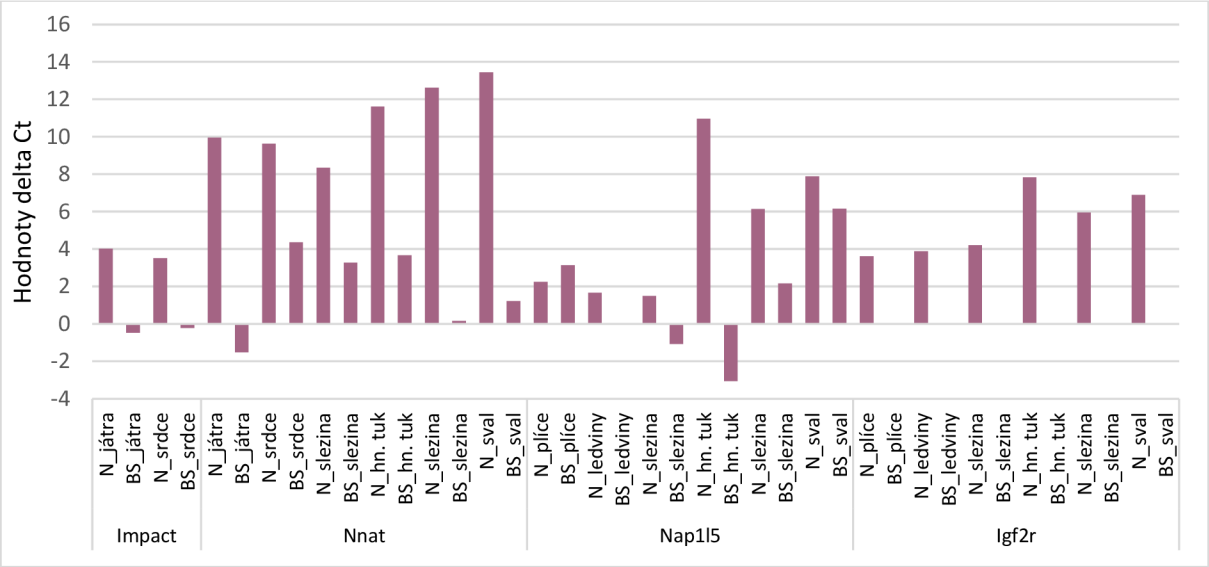


Obr. 6: Výsledky qPCR kontrolních regionů (po přečistění vzorků) znázorněné hodnotami delta Ct. Osa x vyobrazuje použité primery a použité tkáně (N = normální DNA, BS = bisulfiticky konvertovaná DNA). Osa y udává hodnoty delta Ct (počty cyklů qPCR při použití primerů pro bisulfiticky konvertovanou DNA mínus počty cyklů qPCR při použití primerů pro bisulfiticky nekonvertovanou DNA). Když kladné hodnoty delta Ct – BS primery fungovaly hůře než normální primery, když záporné hodnoty – BS primery fungovaly lépe než normální primery. Hodnoty delta Ct jsou vypočteny z průměrů hodnot Ct.

Z grafu (**Obr. 6**) lze vyčíst, že hodnoty delta Ct u genů *inter_1* a *inter_2* jsou už víceméně vyrovnané (až na výjimku BS_srdce) a chovají se optimálně. *Gapdh_p2* se chová stále stejně jako v předchozích reakcích, tedy hodnoty delta Ct jsou stále záporné u tkání s nekonvertovanou DNA, nikoli u tkání s konvertovanou DNA, jak by tomu mělo správně být. V této sérii reakcí byly primery pro gen *Gapdh_gb* vyměněny za primery *Gapdh_p1*, který má být nemetylovaný (společně s *Gapdh_p2*), tedy hodnoty delta Ct u tkání s bisulfiticky konvertovanou DNA se mají pohybovat v mínusu. Ačkoli se *Gapdh_p1* už nechová stejně podivně jako *Gapdh_p2*, stále se nechová optimálně. Hodnoty delta Ct se ve třech z šesti

případů pohybují v kladných hodnotách (BS_plíce, BS_ledviny, BS_sval). Ačkoli se ve zbývajících třech případech (BS_slezina, BS_slezina (jedná se o dva různé pokusy se vzorkem sleziny), BS_hn. tuk) hodnoty pohybují v mínusových hodnotách či na nule, stále jsou hodnoty delta Ct vysoké vzhledem k tomu, že se jedná o nemetylovaný gen.

V poslední sérii reakcí qPCR nebyly použity primery pro kontrolní oblasti ale již primery pro námi zkoumané gDMRs (*Impact*, *Nnat*, *Nap1l5*, *Igf2r*). Dle našich bioinformatických predikcí je imprintace očekávaná u gDMRs *Nnat* a *Nap1l5*, u gDMRs *Impact* a *Igf2r* nikoli.



Obr. 7: Výsledky qPCR námi zkoumaných genů (po přečištění) znázorněné hodnotami delta Ct. Osa x vyobrazuje použité primery a použité tkáně (N = normální DNA, BS = bisulfiticky konvertovaná DNA). Osa y udává hodnoty delta Ct (počty cyklů qPCR při použití primerů pro bisulfiticky konvertovanou DNA mínus počty cyklů qPCR při použití primerů pro bisulfiticky nekonvertovanou DNA). Když kladné hodnoty delta Ct – BS primery fungovaly hůře než normální primery, když záporné hodnoty – BS primery fungovaly lépe než normální primery. Hodnoty delta Ct jsou vypočteny z průměrů Ct hodnot.

Vezmeme-li v potaz, že imprintované geny mají vždy jednu alelu metylovanou a druhou nikoli, tak by se u nich primery pro normální i bisulfiticky konvertovanou DNA na bisulfiticky konvertované DNA měly uplatňovat ve stejné míře. Tedy jejich delta Ct by se měla pohybovat okolo nuly. Toto můžeme pozorovat u výsledků pro gen *Impact*, jehož hodnoty delta Ct se u bisulfiticky konvertované DNA všechny pohybují blízko nule. Delta Ct blízké nule můžeme také pozorovat u gDMR *Nnat* v jaterních a slezinných bisulfiticky

konvertovaných tkáních. Tudíž bychom v těchto tkáních mohli pravděpodobně očekávat imprintaci tohoto genu. Výsledky u gDMRs *Nap1l5* a *Igf2r* již nejsou tolik jednoznačné. U gDMR *Igf2r* můžeme jednoznačně říct, že se nejedná o nemetylovaný gen, jelikož v žádné qPCR reakci s bisulfiticky konvertovanou DNA nedošlo k amplifikaci DNA za použití primerů specifických pro bisulfiticky konvertovanou DNA. Naopak, tento hypotetický gDMR se proto jeví jako plně nebo téměř plně metylovaný. Kvůli relativně vysokým Ct hodnotám pro normální primery použitými s bisulfiticky konvertovanou DNA je možné, že k naměření Ct hodnot by došlo i pro BS primery v případě vyšší koncentrace bisulfiticky konvertované DNA ve vzorcích. U genu *Nap1l5* můžeme pozorovat lepší amplifikaci primerů pro bisulfitickou DNA u konvertované DNA v hnědém tuku, tento gen se tedy jeví v této tkáni jako nemetylovaný. V jiných tkáních by naopak kvůli hodnotám delta Ct okolo 0 mohl být považován za imprintovaný. Výsledky jsou znázorněny v grafu (**Obr. 7**).

5 Diskuse

Naše práce se zabývala genomickým imprintingem u hlodavců. Našimi vybranými zkoumanými zástupci byli potkan (*Rattus norvegicus*) a rypoš lysý (*Heterocephalus glaber*).

Našim prvním úkolem bylo u těchto zástupců bioinformaticky předpovědět polohu jejich gDMRs (také známé jako ICRs), což jsou úseky DNA, jejichž metylace zajišťuje umlčení (imprinting) genů v daném klastru. Základem této bioinformatické části byly již známé myší anotace gDMRs, podle nichž se na základě podobností genomů mezi myšmi a našimi zkoumanými zástupci určovaly jejich hypotetické pozice na DNA u našich zástupců. gDMRs mají několik charakteristik, které musí splňovat, aby byly považovány za gDMRs. Jsou jimi probíhající aktivní transkripce přes daný region, přítomnost CpG ostrovů a přítomnost sekvencí TGCCGC (a jejich modifikace, viz **Tab. 2**), které jsou vazebnými sekvencemi pro protein ZFP57, jež se váže na gDMRs umlčených alel. Právě tyto charakteristiky byly zkoumány na regionech, které jsme v závislosti na podobnostech mezi genomy našich zástupců vybrali jako potenciální gDMRs (**Příloha I).** V naší bioinformatické části nebyly analyzovány CpG ostrovy u rypoše lysého, jelikož jejich anotace nejsou dostupné. Anotace však mohly být provedeny námi například pomocí počítání CpG hustoty. Hlavním problémem bioinformatické části je nedostatečná anotace genů zejména rypoše lysého, kde kvůli tomu nebylo možné stanovit hypotetickou lokalizaci mnohých gDMRs,

Naším dalším úkolem bylo tyto hypotetické polohy gDMRs laboratorně ověřit na jednom námi vybraném zástupci (samice *Heterocephalus glaber*). Byla provedena izolace DNA ze 7 vzorků tkání - plíce, srdce, slezina, játra, ledvina, kosterní sval a hnědý tuk. Část těchto vzorků byla bisulfiticky konvertována tzn. v částech DNA, které nebyly metylované, došlo ke změně v sekvenci – thymin byl přeměněn na uracil. Tudíž sekvence, u kterých došlo ke změně nukleotidu byly nemetylované. Sekvence, u kterých ke změně nedošlo, byly opatřeny metylací. Normální i konvertované vzorky DNA byly použity pro kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Pro qPCR byly vybrané čtyři geny, z nichž dva měly být dle našich bioinformatických predikcí imprintované (*Nnat*, *Nap1l5*) a zbývající dva nikoli (*Impact*, *Igf2r*). Jako kontrolní regiony byly vybrány geny *Gapdh_gb*, *Gapdh_p1*, *Gapdh_p2*, *inter_1* a *inter_2*, jež se měly vykazovat nulovou či stoprocentní expresí. Pro každý z genů byl vždy navržen jeden pár primerů, jeden odpovídal nezměněné sekvenci, druhý odpovídal sekvenci po bisulfitické konverzi. Pro každý region jsme porovnávali rychlost amplifikace extrahované

a případné konvertované DNA jak pro normální, tak bisulfitické primery pomocí metody delta Ct.

Během našeho výzkumu byl publikován článek, který se zabýval experimentálním výzkumem imprintovaných genů u potkana (Richard Albert et al., 2023), tudíž máme materiál k porovnání, zda naše bioinformatické předpovědi byly správné či nikoli. Všechny námi zkoumané gDMRs byly v této studii potvrzené jako imprintované, což se stoprocentně neshoduje s našimi výsledky. Rozdíly můžeme vidět například v gDMRs *Peg3*/*Usp29*, *Snrpn*, *Inpp5f* či *Kcnq1*/*Kcnq1ot1*, které by se jevily podle našich bioinformatických předpokladů jako neimprintované, jelikož kromě probíhající transkripce nesplňovaly ostatní charakteristiky gDMRs jako obsah CpG ostrovů či přítomnost TGCCGC nebo příbuzných sekvencí (hlavně jsme u těchto regionů nebyli schopni určit, kde se jejich gDMRs mají nacházet). Tyto neshody mohou být zapříčiněné nekompletními daty pro potkaní genom (např. možné neanotované CpG ostrovy v námi využitých datech, které se v genomu ale reálně vyskytují či chybějící anotace některých genů). Druhou možností by mohla být neúplná shoda myšího a potkaního genomu. Jelikož jsou naše gDMRs anotované podle toho, kde se vyskytují u myši, není stoprocentně jisté, že geny u potkana mají stejné uspořádání či strukturu (např. gen *Mest*).

Námi prováděné bioinformatické predikce u rypoše lysého předpověděly možný imprinting genu *Nnat* a *Nap1l5*, naopak vyloučily imprinting u genů *Impact* a *Igf2r*. Navzdory našim bioinformatickým predikcím, náš laboratorní výzkum objevil pravděpodobný imprinting u genu *Impact*, který se původně jevil jako neimprintovaný. Naše predikce byly částečně potvrzeny u genu *Nnat*, jelikož naše laboratorní výsledky naznačují výskyt imprintingu tohoto genu v jaterních a slezinných tkáních. U genů *Nap1l5* a *Igf2r* nebyly výsledky jednoznačné. Je důležité podotknout, že námi využitá metoda není klasickým způsobem, jak se genomický imprinting většinou laboratorně zkoumá. Tato metoda byla zvolena jako možná rychlejší alternativa k současné klasické metodě pro výzkum imprintingu, která navíc obsahuje klonování DNA pomocí bakterií a Sangerovu metodu sekvenování, což metodu značně prodlužuje (Zhang et al., 2009). Naše metoda je tedy sice rychlejší, ale za to daleko méně přesná, protože nám poskytuje jen velmi přibližná data. Jelikož nám laboratorní výsledky nevyšly zcela v souladu s našimi predikcemi, možným řešením by mohlo být nahrazení bioinformatické analýzy námi využitou metodou a geny s predispozicemi k imprintingu ověřit již metodou klasickou. Dalším problémem naší metody je, že využíváme předpoklad, že úroveň metylace gDMRs v somatických tkáních by měla být kolem 50 %. Tohle ale neplatí pro všechny gDMRs, protože u myši i člověka byly identifikovány gDMRs,

které jsou imprintovány jenom v embryonálním období. Proto by bylo lepší zkoumat skutečnou alelickou expresi (na základě RNA-seq dat rozřazených mezi paternální a maternální alelu pomocí polymorfismů). U rypoše ale bohužel nejsou zmapovány polymorfní místa, a také nejsou dostupná embrya.

Jedním z důvodů, proč byl pro náš výzkum zvolen právě rypoš lysý, bylo podezření, že u tohoto druhu dochází ke ztrátě imprintingu kvůli nedostatečnému parentálnímu konfliktu, jelikož v jejich společenstvech se celý život rozmnožuje jen jeden pár (Bhattacharya & Wilkins, 2019). Náš laboratorní výzkum úplnou absenci genomického imprintingu nepotvrdil (gen *Impact* a *Nnat* vykazují známky imprintingu). V literatuře je zmíněno, že rypoší genom se podobá spíše genomu lidskému než ostatním hlodavcům (Lewis et al., 2016). Také bylo zmíněno, jak funguje genomický imprinting u lidského genu *Igf2r*. Lidský *Igf2r* je imprintovaný jen v prenatálním vývoji, po narození tento gen imprintaci ztrácí a je exprimován bialelicky. Navíc k monoalelické expresi tohoto genu dochází asi jen u 50 % jedinců (Wutz et al., 2007). Mohlo by být lepší tedy hledat gDMRs na základě podobností s člověkem, a ne myší, a kvůli možnosti polymorfismu na více než jednom jedinci.

6 Závěr

Genomický imprinting se ze všech živočichů vyskytuje jen u savců. Jeho správné ustanovení je kritické pro správný vývoj embrya a je jednou z podmínek k zajištění kvalitního života jedinců. Chybně zavedený genomický imprinting je původcem několika známých onemocnění, mezi něž například patří Prader-Williho či Silver-Russellův syndrom. Jeho evoluční význam není doposud zcela znám, mnozí se však přiklání k pravdivosti teorie parentálního konfliktu, která genomický imprinting vykládá jako konflikt mezi rodiči o mateřské zdroje poskytované vyvíjejícímu se embryu.

Tento epigenetický fenomén byl zkoumán zejména u myší a člověka. Náš výzkum se zaměřoval na hlodavce, konkrétně na potkana (*Rattus norvegicus*) a rypoše lysého, (*Heterocephalus glaber*) s cílem nastínění situace u těchto zástupců dle dostupných myších dat.

Náš výzkum měl dvě části. První část byla zaměřena na bioinformatické predikce imprintovaných gDMRs (zárodečných diferenciálně metylovaných oblastí) u potkana a rypoše lysého. Tyto predikce byly postaveny na základě konzervovanosti genomu mezi našimi zkoumanými zástupci a jejich příbuzné myši, u níž byl genomický imprinting podrobně zkoumán. Podle charakteristik, které by mělo každé gDMR splňovat, byly stanoveny naše predikce. Tyto predikce u vybraných genů rypoše lysého byly dále laboratorně zkoumány za využití námi navržené metody, která by mohla být rychlejší alternativou k současně využívané metodě pro výzkum genomického imprintingu. Naše metoda zahrnovala extrakci DNA ze somatických buněk rypoše lysého následovanou bisulfitickou konverzí a několika sériemi qPCR s primery specifickými pro původní sekvenci a primery specifickými pro nemetylovanou DNA po bisulfitové konverzi, kdy jsou všechny cytosiny změněné na uracily. Výsledky qPCR byly vyhodnocovány metodou delta Ct.

U potkana naše výsledky do velké míry odpovídaly nové studii, která experimentálně zkoumala, které geny jsou imprintovány u potkana. U rypoše kvůli nižší kvalitě anotace genů a nižší konzervaci s myší nebylo možné provést predikci u přibližně poloviny gDMR. Zbylé gDMR byly predikovány jako imprintované, a vyvracejí tak hypotézu, že u rypoše evolučně došlo ke ztrátě imprintingu kvůli chybějícímu parentálnímu konfliktu. Naše experimentální metoda založená na real-time kvantitativní PCR nefungovala optimálně a bylo by lepší použít tradiční metodu pomocí klonování a sekvenace produktů PCR s DNA po bisulfitové konverzi.

Pro definitivní stanovení imprintovaného statusu bychom museli kromě somatických tkání ověřovat alelovo-specifickou metylaci a expresi u rypoších postimplantačních embryí a embryonální části placenty.

7 Použité zdroje

Ågren, J. A., & Clark, A. G. (2018). Selfish genetic elements. *PLoS genetics*, *14*(11), e1007700.

Arai, Y., Ijuin, T., Itoh, M., Takenawa, T., Takashima, S., & Becker, L. E. (2001). Developmental changes of synaptojanin expression in the human cerebrum and cerebellum. *Developmental Brain Research*, *129*(1), 1-9.

Baran, Y., Subramaniam, M., Biton, A., Tukiainen, T., Tsang, E. K., Rivas, M. A., ... & GTEx Consortium. (2015). The landscape of genomic imprinting across diverse adult human tissues. *Genome research*, *25*(7), 927-936.

Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., & Romey, G. (1996). KvLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I Ks cardiac potassium current. *Nature*, *384*(6604), 78-80.

Barlow, D. P., & Bartolomei, M. S. (2014). Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *6*(2), a018382.

Barlow, D. P., Stöger, R., Herrmann, B. G., Saito, K., & Schweifer, N. (1991). The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature*, *349*(6304), 84-87.

Barrowman, J., Bhandari, D., Reinisch, K., & Ferro-Novick, S. (2010). TRAPP complexes in membrane traffic: convergence through a common Rab. *Nature reviews Molecular cell biology*, *11*(11), 759-763.

Bartolomei, M. S., & Ferguson-Smith, A. C. (2011). Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *3*(7), a002592.

Baskin, B., Choufani, S., Chen, Y. A., Shuman, C., Parkinson, N., Lemyre, E., ... & Weksberg, R. (2014). High frequency of copy number variations (CNVs) in the chromosome 11p15 region in patients with Beckwith–Wiedemann syndrome. *Human Genetics*, *133*, 321-330.

Behluli, L., Fontanilla, A. M., Andessner-Angleitner, L., Tolar, N., Molina, J. M., & Gahurova, L. (2023). Expression analysis suggests that DNMT3L is required for oocyte de novo DNA methylation only in Muridae and Cricetidae rodents. *Epigenetics & Chromatin*, *16*(1), 43.

Bhalla, K., Luo, Y., Buchan, T., Beachem, M. A., Guzauskas, G. F., Ladd, S., ... & Srivastava, A. K. (2008). Alterations in *CDH15* and KIRREL3 in patients with mild to severe intellectual disability. *The American Journal of Human Genetics*, *83*(6), 703-713.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*, *16*(1), 6-21.

Bischoff, F. R., & Ponstingl, H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature*, *354*(6348), 80-82.

Blagitko, N., Mergenthaler, S., Schulz, U., Wollmann, H. A., Craigen, W., Eggermann, T., ... & Kalscheuer, V. M. (2000). Human GRB10 is imprinted and expressed from the paternal and maternal allele in a highly tissue-and isoform-specific fashion. *Human molecular genetics*, *9*(11), 1587-1595.

Bolcun-Filas, E., & Schimenti, J. C. (2012). Genetics of meiosis and recombination in mice. *International review of cell and molecular biology*, *298*, 179-227.

Bonnet-Garnier, Amelie, et al. "Genome organization and epigenetic marks in mouse germinal vesicle oocytes." *International Journal of Developmental Biology* 56.10-11-12 (2013): 877-887.

Bostick, M., Kim, J. K., Estève, P. O., Clark, A., Pradhan, S., & Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, *317*(5845), 1760-1764.

Brind'Amour, J., Kobayashi, H., Richard Albert, J., Shirane, K., Sakashita, A., Kamio, A., ... & Lorincz, M. C. (2018). LTR retrotransposons transcribed in oocytes drive species-specific and heritable changes in DNA methylation. *Nature communications*, *9*(1), 3331.

Bröer, S. (2014). The SLC38 family of sodium–amino acid co-transporters. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, *466*, 155-172.

Bult, C. J., Blake, J. A., Smith, C. L., Kadin, J. A., & Richardson, J. E., & the Mouse Genome Database Group (2019). Mouse genome database (MGD) 2019. *Nucleic acids research*, *47*(D1), D801-D806.

Burstein, E., Hoberg, J. E., Wilkinson, A. S., Rumble, J. M., Csomos, R. A., Komarck, C. M., ... & Duckett, C. S. (2005). COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(23), 22222-22232.

Butler, M. G. (2009). Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *26*, 477-486.

Butler, M. G., & Palmer, C. G. (1983). Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome.

Cao, X., & Dang, W. (2018). Histone modification changes during aging: cause or consequence?—what we have learned about epigenetic regulation of aging from model organisms. *Epigenetics of aging and longevity*, 309-328.

Cattanach, B. M., Shibata, H., Hayashizaki, Y., Townsend, K. M. S., Ball, S., & Beechey, C. V. (1998). Association of a redefined proximal mouse chromosome 11 imprinting region and U2afbp-rs/U2af1-rs1 expression. *Cytogenetics and cell genetics*, *80*(1-4), 41-47.

Clark, M. B., Janicke, M., Gottesbuhren, U., Kleffmann, T., Legge, M., Poole, E. S., & Tate, W. P. (2007). Mammalian gene *PEG10* expresses two reading frames by high efficiency–1 frameshifting in embryonic-associated tissues. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(52), 37359-37369.

Cooper, D. N., Taggart, M. H., & Bird, A. P. (1983). Unmethlated domains in vertebrate DNA. *Nucleic acids research*, *11*(3), 647-658.

Cowley, M., Wood, A. J., Böhm, S., Schulz, R., & Oakey, R. J. (2012). Epigenetic control of alternative mRNA processing at the imprinted *Herc3/Nap1l5* locus. *Nucleic acids research*, *40*(18), 8917-8926.

Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R., Lüthi, A., Kim, W. T., Takei, K., ... & De Camilli, P. (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*, *99*(2), 179-188.

Cruz, C., Ventura, F., Bartrons, R., & Rosa, J. L. (2001). *HERC3* binding to and regulation by ubiquitin. *FEBS letters*, *488*(1-2), 74-80.

Curley, J. P., Barton, S., Surani, A., & Keverne, E. B. (2004). Coadaptation in mother and infant regulated by a paternally expressed imprinted gene. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *271*(1545), 1303-1309.

Curley, J. P., Pinnock, S. B., Dickson, S. L., Thresher, R., Miyoshi, N., Surani, M. A., & Keverne, E. B. (2005). Increased body fat in mice with a targeted mutation of the paternally expressed imprinted gene *Peg3*. *The FASEB Journal*, *19*(10), 1302-1304.

Cvetkovic, D., Pisarcik, D., Lee, C., Hamilton, T. C., & Abdollahi, A. (2004). Altered expression and loss of heterozygosity of the LOT1 gene in ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, *95*(3), 449-455.

Dahms, N. M., Lobel, P., & Kornfeld, S. (1989). Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(21), 12115-12118.

Davies, W., Smith, R. J., Kelsey, G., & Wilkinson, L. S. (2004). Expression patterns of the novel imprinted genes *Nap1l5* and *Peg13* and their non-imprinted host genes in the adult mouse brain. *Gene expression patterns*, *4*(6), 741-747.

Dierov, J., Prosniak, M., Gallia, G., & Gartenhaus, R. B. (1999). Increased G1 cyclin/cdk activity in cells overexpressing the candidate oncogene, MCT-1. *Journal of cellular biochemistry*, *74*(4), 544-550.

Dorn, G. W., & Force, T. (2005). Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *The Journal of clinical investigation*, *115*(3), 527-537.

Dou, D., & Joseph, R. (1996). Structure and Organization of the HumanNeuronatinGene. *Genomics*, *33*(2), 292-297.

Dowdy, S. C., Gostout, B. S., Shridhar, V., Wu, X., Smith, D. I., Podratz, K. C., & Jiang, S. W. (2005). Biallelic methylation and silencing of paternally expressed gene 3 (*PEG3*) in gynecologic cancer cell lines. *Gynecologic oncology*, *99*(1), 126-134.

Eckhardt, F., Lewin, J., Cortese, R., Rakyan, V. K., Attwood, J., Burger, M., ... & Beck, S. (2006). DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nature genetics*, *38*(12), 1378-1385.

Ehrlich, M., & Wang, R. Y. H. (1981). 5-Methylcytosine in eukaryotic DNA. *Science*, *212*(4501), 1350-1357.

Ellis, M. J., Leav, B. A., Yang, Z., Rasmussen, A., Pearce, A., Zweibel, J. A., ... & Cullen, K. J. (1996). Affinity for the insulin-like growth factor-II (IGF-II) receptor inhibits autocrine IGF-II activity in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Endocrinology*, *10*(3), 286-297.

Ettinger, A. J., Feng, G., & Sanes, J. R. (1997). ε-sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(51), 32534-32538.

Evans, H. K., Weidman, J. R., Cowley, D. O., & Jirtle, R. L. (2005). Comparative phylogenetic analysis of *Blcap/Nnat* reveals eutherian-specific imprinted gene. *Molecular biology and evolution*, *22*(8), 1740-1748.

Evans, H. K., Wylie, A. A., Murphy, S. K., & Jirtle, R. L. (2001). The neuronatin gene resides in a "micro-imprinted" domain on human chromosome 20q11. 2. *Genomics*, *77*(1-2), 99-104.

Feng, W., Marquez, R. T., Lu, Z., Liu, J., Lu, K. H., Issa, J. P. J., ... & Bast Jr, R. C. (2008). Imprinted tumor suppressor genes ARHI and *PEG3* are the most frequently down-regulated in human ovarian cancers by loss of heterozygosity and promoter methylation. *Cancer*, *112*(7), 1489-1502.

Gao, X., & Patel, T. B. (2005). Histidine residues 912 and 913 in protein associated with Myc are necessary for the inhibition of adenylyl cyclase activity. *Molecular pharmacology*, *67*(1), 42-49.

Gardner, R. J., Mungall, A. J., Dunham, I., Barber, J. C., Shield, J. P., Temple, I. K., & Robinson, D. O. (1999). Localisation of a gene for transient neonatal diabetes mellitus to an 18.72 cR3000 (~ 5.4 Mb) interval on chromosome 6q. *Journal of medical genetics*, *36*(3), 192-196.

Garry, F. B., Adams, R., McCann, J. P., & Odde, K. G. (1996). Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology*, *45*(1), 141-152.

Germain-Lee, E. L., Ding, C. L., Deng, Z., Crane, J. L., Saji, M., Ringel, M. D., & Levine, M. A. (2002). Paternal imprinting of Gαs in the human thyroid as the basis of TSH resistance in pseudohypoparathyroidism type 1a. *Biochemical and biophysical research communications*, *296*(1), 67-72.

Glenn, C. C., Porter, K. A., Jong, M. T., Nicholls, R. D., & Driscoll, D. J. (1993). Functional imprinting and epigenetic modification of the human *SNRPN* gene. *Human Molecular Genetics*, *2*(12), 2001-2005.

Gómez-Redondo, I., Ramos-Ibeas, P., Pericuesta, E., Fernández-González, R., Laguna-Barraza, R., & Gutiérrez-Adán, A. (2020). Minor splicing factors *Zrsr1* and *Zrsr*2 are essential for early embryo development and 2-cell-like conversion. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(11), 4115.

Gromova, I., Gromov, P., & Celis, J. E. (1999). Identification of true differentially expressed mRNAs in a pair of human bladder transitional cell carcinomas using an improved differential display procedure. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, *20*(2), 241-248.

Haig, D. (1997). Rodičovský antagonismus, asymetrie příbuznosti a genomický imprinting. *Proceedings of the Royal Society of London. Řada B: Biological Sciences* , *264* (1388), 1657-1662.

Haig, D. (2002). *Genomic imprinting and kinship*. Rutgers University Press.

Han, D. C., Shen, T. L., & Guan, J. L. (2001). The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions. *Oncogene*, *20*(44), 6315-6321.

Harada, H., Nagai, H., Ezura, Y., Yokota, T., Ohsawa, I., Yamaguchi, K., ... & Emi, M. (2002). Down-regulation of a novel gene, DRLM, in human liver malignancy from 4q22 that encodes a NAP-like protein. *Gene*, *296*(1-2), 171-177.

Hatada, L., Sugama, T., & Mukai, T. (1993). A new imprinted gene cloned by a methylation-sensitive genome scanning method. *Nucleic acids research*, *21*(24), 5577-5582.

Hayward, B. E., Barlier, A., Korbonits, M., Grossman, A. B., Jacquet, P., Enjalbert, A., & Bonthron, D. T. (2001). Imprinting of the G s α gene *GNAS*1 in the pathogenesis of acromegaly. *The Journal of clinical investigation*, *107*(6), R31-R36.

He, H., Ye, A., & Kim, J. (2016). Transcriptional Truncation of the long coding imprinted gene *Usp29*. *PLoS One*, *11*(6), e0158004.

He, W., Rose, D. W., Olefsky, J. M., & Gustafson, T. A. (1998). *Grb10* interacts differentially with the insulin receptor, insulin-like growth factor I receptor, and epidermal growth factor receptor via the *Grb10* Src homology 2 (SH2) domain and a second novel domain located between the pleckstrin homology and SH2 domains. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(12), 6860-6867.

Hikichi, T., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., & Ishino, F. (2003). Imprinting regulation of the murine Meg1/*Grb10* and human GRB10 genes; roles of brain-specific promoters and mouse-specific CTCF-binding sites. *Nucleic acids research*, *31*(5), 1398-1406.

Hirasawa, R., Chiba, H., Kaneda, M., Tajima, S., Li, E., Jaenisch, R., & Sasaki, H. (2008). Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA

methylation imprints during preimplantation development. *Genes & development*, *22*(12), 1607-1616.

Hishida, T., Naito, K., Osada, S., Nishizuka, M., & Imagawa, M. (2007). *Peg10*, an imprinted gene, plays a crucial role in adipocyte differentiation. *FEBS letters*, *581*(22), 4272-4278.

Hitchins, M. P., Bentley, L., Monk, D., Beechey, C., Peters, J., Kelsey, G., ... & Moore, G. E. (2002). DDC and COBL, flanking the imprinted GRB10 gene on 7p12, are biallelically expressed. *Mammalian genome*, *13*, 686-691.

Hitchins, M. P., Monk, D., Bell, G. M., Ali, Z., Preece, M. A., Stanier, P., & Moore, G. E. (2001). Maternal repression of the human GRB10 gene in the developing central nervous system; evaluation

Howell, C. Y., Bestor, T. H., Ding, F., Latham, K. E., Mertineit, C., Trasler, J. M., & Chaillet, J. R. (2001). Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, *104*(6), 829-838.

Hsu, H. L., Choy, C. O., Kasiappan, R., Shih, H. J., Sawyer, J. R., Shu, C. L., ... & Gartenhaus, R. B. (2007). MCT-1 oncogene downregulates p53 and destabilizes genome structure in the response to DNA double-strand damage. *DNA repair*, *6*(9), 1319-1332.

Hu, W. H., Pendergast, J. S., Mo, X. M., Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Li, F., ... & Bethea, J. R. (2005). NIBP, a novel NIK and IKKβ-binding protein that enhances NF-κB activation. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(32), 29233-29241.

Huang, J. M., & Kim, J. (2009). DNA methylation analysis of the mammalian *PEG3* imprinted domain. *Gene*, *442*(1-2), 18-25.

Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., & Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(7), 2563-2567.

Chao, Y., Qin, Y., Zou, X., Wang, X., Hu, C., Xia, F., & Zou, C. (2022). Promising therapeutic aspects in human genetic imprinting disorders. *Clinical Epigenetics*, *14*(1), 1-19.

Chen, M. Y., Liao, W. S. L., Lu, Z., Bornmann, W. G., Hennessey, V., Washington, M. N., ... & Bast Jr, R. C. (2011). Decitabine and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibit growth of ovarian cancer cell lines and xenografts while inducing expression of imprinted tumor suppressor genes, apoptosis, G2/M arrest, and autophagy. *Cancer*, *117*(19), 4424-4438.

Chen, Z., & Zhang, Y. (2020). Maternal H3K27me3-dependent autosomal and X chromosome imprinting. *Nature Reviews Genetics*, *21*(9), 555-571.

Chen, Z., Hagen, D. E., Wang, J., Elsik, C. G., Ji, T., Siqueira, L. G., ... & Rivera, R. M. (2016). Global assessment of imprinted gene expression in the bovine conceptus by next generation sequencing. *Epigenetics*, *11*(7), 501-516.

Cheung, P., Allis, C. D., & Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, *103*(2), 263-271.

Choi, J. D., Underkoffler, L. A., Wood, A. J., Collins, J. N., Williams, P. T., Golden, J. A., ... & Oakey, R. J. (2005). A novel variant of *Inpp5f* is imprinted in brain, and its expression is correlated with differential methylation of an internal CpG island. *Molecular and cellular biology*, *25*(13), 5514-5522.

Chotalia, M., Smallwood, S. A., Ruf, N., Dawson, C., Lucifero, D., Frontera, M., ... & Kelsey, G. (2009). Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. *Genes & development*, *23*(1), 105-117.

Illingworth, R. S., Gruenewald-Schneider, U., Webb, S., Kerr, A. R., James, K. D., Turner, D. J., ... & Bird, A. P. (2010). Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS genetics*, *6*(9), e1001134.

Inoue, A., Jiang, L., Lu, F., Suzuki, T., & Zhang, Y. (2017). Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting. *Nature*, *547*(7664), 419-424.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature 409*(6822), 860–921.

Jiang, X., Yu, Y., Yang, H. W., Agar, N. Y., Frado, L., & Johnson, M. D. (2010). The imprinted gene *PEG3* inhibits Wnt signaling and regulates glioma growth. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(11), 8472-8480.

Jima, D. D., Skaar, D. A., Planchart, A., Motsinger-Reif, A., Cevik, S. E., Park, S. S., ... & Hoyo, C. (2022). Genomic map of candidate human imprint control regions: the imprintome. *Epigenetics*, *17*(13), 1920-1943.

Joe, M. K., Lee, H. J., Suh, Y. H., Han, K. L., Lim, J. H., Song, J., ... & Jung, M. H. (2008). Crucial roles of neuronatin in insulin secretion and high glucose-induced apoptosis in pancreatic β-cells. *Cellular signalling*, *20*(5), 907-915.

Joseph, R., Dou, D., & Tsang, W. (1995). Neuronatin mRNA: alternatively spliced forms of a novel brain-specific mammalian developmental gene. *Brain research*, *690*(1), 92-98.

Jung, H., Lee, S. K., & Jho, E. H. (2011). *Mest*/Peg1 inhibits Wnt signalling through regulation of LRP6 glycosylation. *Biochemical Journal*, *436*(2), 263-269.

Kamiya, M., Judson, H., Okazaki, Y., Kusakabe, M., Muramatsu, M., Takada, S., ... & Hayashizaki, Y. (2000). The cell cycle control gene ZAC/*PLAGL1* is imprinted—a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. *Human molecular genetics*, *9*(3), 453-460.

Kaneko-Ishino, T., Kuroiwa, Y., Miyoshi, N., Kohda, T., Suzuki, R., Yokoyama, M., ... & Surani, M. A. (1995). Peg1/*Mest* imprinted gene on chromosome 6 identified by cDNA subtraction hybridization. *Nature genetics*, *11*(1), 52-59.

Kaneko-Ishino, T., Kuroiwa, Y., Miyoshi, N., Kohda, T., Suzuki, R., Yokoyama, M., ... & Surani, M. A. (1995). Peg1/*Mest* imprinted gene on chromosome 6 identified by cDNA subtraction hybridization. *Nature genetics*, *11*(1), 52-59.

Karin, M., & Lin, A. (2002). NF-κB at the crossroads of life and death. *Nature immunology*, *3*(3), 221-227.

Kato, Y., Rideout, W. M., Hilton, K., Barton, S. C., Tsunoda, Y., & Surani, M. A. (1999). Developmental potential of mouse primordial germ cells. *Development*, *126*(9), 1823-1832.

Keshavarz, M., & Tautz, D. (2021). The imprinted lncRNA *Peg13* regulates sexual preference and the sex-specific brain transcriptome in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(10), e2022172118.

Kim, J., Ashworth, L., Branscomb, E., & Stubbs, L. (1997). The human homolog of a mouse-imprinted gene, *Peg3*, maps to a zinc finger gene-rich region of human chromosome 19q13. 4. *Genome research*, *7*(5), 532-540.

Kim, J., Noskov, V. N., Lu, X., Bergmann, A., Ren, X., Warth, T., ... & Stubbs, L. (2000). Discovery of a novel, paternally expressed ubiquitin-specific processing protease gene through comparative analysis of an imprinted region of mouse chromosome 7 and human chromosome 19q13. 4. *Genome research*, *10*(8), 1138-1147.

Kobayashi, H. (2021). Canonical and Non-canonical genomic imprinting in rodents. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2157.

Kobayashi, H. (2021). Canonical and non-canonical genomic imprinting in rodents. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 713878.

Kohda, T., Asai, A., Kuroiwa, Y., Kobayashi, S., Aisaka, K., Nagashima, G., ... & Ishino, F. (2001). Tumour suppressor activity of human imprinted gene *PEG3* in a glioma cell line. *Genes to cells*, *6*(3), 237-247.

Korostowski, L., Sedlak, N., & Engel, N. (2012). The *Kcnq1ot1* long non-coding RNA affects chromatin conformation and expression of *Kcnq1*, but does not regulate its imprinting in the developing heart.

Kuroiwa, Y., Kaneko-Ishino, T., Kagitani, F., Kohda, T., Li, L. L., Tada, M., ... & Surani, M. A. (1996). *Peg3* imprinted gene on proximal chromosome 7 encodes for a zinc finger protein. *Nature genetics*, *12*(2), 186-190.

Kühnel, T., Heinz, H. S. B., Utz, N., Božić, T., Horsthemke, B., & Steenpass, L. (2020). A human somatic cell culture system for modelling gene silencing by transcriptional interference. *Heliyon*, *6*(1).

Lapidos, K. A., Kakkar, R., & McNally, E. M. (2004). The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circulation research*, *94*(8), 1023-1031.

Lau, M. M., Stewart, C. E., Liu, Z., Bhatt, H., Rotwein, P., & Stewart, C. L. (1994). Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes & development*, *8*(24), 2953-2963.

Ledbetter, D. H., Riccardi, V. M., Airhart, S. D., Strobel, R. J., Keenan, B. S., & Crawford, J. D. (1981). Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader–Willi syndrome. *New England Journal of Medicine*, *304*(6), 325-329.

Lee, H. J., Hore, T. A., & Reik, W. (2014). Reprogramming the methylome: erasing memory and creating diversity. *Cell stem cell*, *14*(6), 710-719.

Lee, M. P., Hu, R. J., Johnson, L. A., & Feinberg, A. P. (1997). Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nature genetics*, *15*(2), 181-185.

Lefebvre, L., Viville, S., Barton, S. C., Ishino, F., & Surani, M. A. (1997). Genomic structure and parent-of-origin-specific methylation of Peg1. *Human molecular genetics*, *6*(11), 1907-1915.

Lefebvre, L., Viville, S., Barton, S. C., Ishino, F., Keverne, E. B., & Surani, M. A. (1998). Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene *Mest*. *Nature genetics*, *20*(2), 163-169.

Leff, S. E., Brannan, C. I., Reed, M. L., Özçelik, T., Francke, U., Copeland, N. G., & Jenkins, N. A. (1992). Maternal imprinting of the mouse *Snrpn* gene and conserved linkage homology with the human Prader–Willi syndrome region. *Nature genetics*, *2*(4), 259-264.

Lerner, M. R., & Steitz, J. A. (1979). Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(11), 5495-5499.

Lewis, K. N., Soifer, I., Melamud, E., Roy, M., McIsaac, R. S., Hibbs, M., & Buffenstein, R. (2016). Unraveling the message: insights into comparative genomics of the naked mole-rat. *Mammalian Genome*, *27*, 259-278.

Li, B., Shi, C., Li, B., Zhao, J. M., & Wang, L. (2018). The effects of curcumin on HCT-116 cells proliferation and apoptosis via the miR-491/*PEG10* pathway. *Journal of cellular biochemistry*, *119*(4), 3091-3098.

Li, B., Shi, C., Li, B., Zhao, J. M., & Wang, L. (2018). The effects of curcumin on HCT-116 cells proliferation and apoptosis via the miR-491/*PEG10* pathway. *Journal of cellular biochemistry*, *119*(4), 3091-3098.

Li, L. L., Keverne, E. B., Aparicio, S. A., Ishino, F., Barton, S. C., & Surani, M. A. (1999). Regulation of maternal behavior and offspring growth by paternally expressed *Peg3*. *Science*, *284*(5412), 330-334.

Liang, Z. S., Cimino, I., Yalcin, B., Raghupathy, N., Vancollie, V. E., Ibarra-Soria, X., ... & Logan, D. W. (2020). *Trappc9* deficiency causes parent-of-origin dependent microcephaly and obesity. *PLoS Genetics*, *16*(9), e1008916.

Lin, H. H., Bell, E., Uwanogho, D., Perfect, L. W., Noristani, H., Bates, T. J., ... & Sun, Y. M. (2010). Neuronatin promotes neural lineage in ESCs via Ca2+ signaling. *Stem Cells*, *28*(11), 1950-1960.

Liu, J., Erlichman, B., & Weinstein, L. S. (2003). The stimulatory G protein α-subunit Gsα is imprinted in human thyroid glands: implications for thyroid function in

pseudohypoparathyroidism types 1A and 1B. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *88*(9), 4336-4341.

Lord, C. C., Thomas, G., & Brown, J. M. (2013). Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: Lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1831*(4), 792-802.

Luedi, P. P., Dietrich, F. S., Weidman, J. R., Bosko, J. M., Jirtle, R. L., & Hartemink, A. J. (2007). Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome research*, *17*(12), 1723-1730.

Lux, H., Flammann, H., Hafner, M., & Lux, A. (2010). Genetic and molecular analyses of *PEG10* reveal new aspects of genomic organization, transcription and translation. *PLoS One*, *5*(1), e8686.

Maegawa, S., Yoshioka, H., Itaba, N., Kubota, N., Nishihara, S., Shirayoshi, Y., ... & Oshimura, M. (2001). Epigenetic silencing of *PEG3* gene expression in human glioma cell lines. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, *31*(1), 1-9.

Maine, G. N., Mao, X., Komarck, C. M., & Burstein, E. (2007). COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-κB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *The EMBO journal*, *26*(2), 436-447.

Mantovani, G., Ballare, E., Giammona, E., Beck-Peccoz, P., & Spada, A. (2002). The Gsα gene: predominant maternal origin of transcription in human thyroid gland and gonads. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *87*(10), 4736-4740.

Matoba, S., Nakamuta, S., Miura, K., Hirose, M., Shiura, H., Kohda, T., ... & Ogura, A. (2019). Paternal knockout of *Slc38a4*/SNAT4 causes placental hypoplasia associated with intrauterine growth restriction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(42), 21047-21053.

McAllister, G., Amara, S. G., & Lerner, M. R. (1988). Tissue-specific expression and cDNA cloning of small nuclear ribonucleoprotein-associated polypeptide N. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(14), 5296-5300.

McGrath, J., & Solter, D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, *37*(1), 179-183.

Mesman, S., Van Hooft, J. A., & Smidt, M. P. (2017). *Mest*/Peg1 is essential for the development and maintenance of a SNc neuronal subset. *Frontiers in molecular neuroscience*, *9*, 166.

Minagawa, T., Ijuin, T., Mochizuki, Y., & Takenawa, T. (2001). Identification and characterization of a sac domain-containing phosphoinositide 5-phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(25), 22011-22015.

Miyoshi, N., Kuroiwa, Y., Kohda, T., Shitara, H., Yonekawa, H., Kawabe, T., ... & Ishino, F. (1998). Identification of the Meg1/*Grb10* imprinted gene on mouse proximal chromosome 11, a candidate for the Silver–Russell syndrome gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(3), 1102-1107.

Moore, T., & Haig, D. (1991). Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends in genetics*, *7*(2), 45-49.

Mouse Genome Sequencing Consortium (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature 420*(6915), 520–562.

Murphy, S. K., & Jirtle, R. L. (2003). Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays*, *25*(6), 577-588.

Neyroud, N., Richard, P., Vignier, N., Donger, C., Denjoy, I., Demay, L., ... & Guicheney, P. (1999). Genomic organization of the *KCNQ1* K+ channel gene and identification of C-terminal mutations in the long-QT syndrome. *Circulation research*, *84*(3), 290-297.

Nicholls, R. D., Knoll, J. H., Butler, M. G., Karam, S., & Lalande, M. (1989). Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome. *Nature*, *342*(6247), 281-285.

Nicholls, R. D., Knoll, J. H., Butler, M. G., Karam, S., & Lalande, M. (1989). Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome. *Nature*, *342*(6247), 281-285.

Okamura, K., Hagiwara-Takeuchi, Y., Li, T., Vu, T. H., Hirai, M., Hattori, M., ... & Ito, T. (2000). Comparative genome analysis of the mouse imprinted gene *Impact* and its

nonimprinted human homolog *IMPACT*: toward the structural basis for species-specific imprinting. *Genome research*, *10*(12), 1878-1889.

Okano, M., Xie, S., & Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature genetics*, *19*(3), 219-220.

Ono, R., Kobayashi, S., Wagatsuma, H., Aisaka, K., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., & Ishino, F. (2001). A retrotransposon-derived gene, *PEG10*, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21. *Genomics*, *73*(2), 232-237.

Ono, R., Nakamura, K., Inoue, K., Naruse, M., Usami, T., Wakisaka-Saito, N., ... & Ishino, F. (2006). Deletion of *Peg10*, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nature genetics*, *38*(1), 101-106.

Ono, R., Shiura, H., Aburatani, H., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., & Ishino, F. (2003). Identification of a large novel imprinted gene cluster on mouse proximal chromosome 6. *Genome Research*, *13*(7), 1696-1705.

Patten, M. M., Ross, L., Curley, J. P., Queller, D. C., Bonduriansky, R., & Wolf, J. B. (2014). The evolution of genomic imprinting: theories, predictions and empirical tests. *Heredity*, *113*(2), 119-128.

Pereira, C. M., Sattlegger, E., Jiang, H. Y., Longo, B. M., Jaqueta, C. B., Hinnebusch, A. G., ... & Castilho, B. A. (2005). *IMPACT*, a protein preferentially expressed in the mouse brain, binds GCN1 and inhibits GCN2 activation. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(31), 28316-28323.

Piras, G., El Kharroubi, A., Kozlov, S., Escalante-Alcalde, D., Hernandez, L., Copeland, N. G., ... & Stewart, C. L. (2000). Zac1 (Lot1), a Potential Tumor Suppressor Gene, and the Gene for ε-Sarcoglycan Are Maternally Imprinted Genes: Identification by a Subtractive Screen of Novel Uniparental Fibroblast Lines. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(9), 3308-3315.

Proudhon, C., Duffié, R., Ajjan, S., Cowley, M., Iranzo, J., Carbajosa, G., ... & Bourc'his, D. (2012). Protection against de novo methylation is instrumental in maintaining parent-of-origin methylation inherited from the gametes. *Molecular cell*, *47*(6), 909-920.

Quenneville, S., Verde, G., Corsinotti, A., Kapopoulou, A., Jakobsson, J., Offner, S., ... & Trono, D. (2011). In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated

hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Molecular cell*, *44*(3), 361-372.

Rae, F. K., Stephenson, S. A., Nicol, D. L., & Clements, J. A. (2000). Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. *International Journal of Cancer*, *88*(5), 726-732.

Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, *428*(6982), 493-521.

Reed, M. L., & Leff, S. E. (1994). Maternal imprinting of human *SNRPN*, a gene deleted in Prader–Willi syndrome. *Nature genetics*, *6*(2), 163-167.

Relaix, F., Wei, X. J., Li, W., Pan, J., Lin, Y., Bowtell, D. D., ... & Wu, X. (2000). Pw1/*Peg3* is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(5), 2105-2110.

Relaix, F., Wei, X. J., Wu, X., & Sassoon, D. A. (1998). *Peg3*/Pw1 is an imprinted gene involved in the TNF-NFκB signal transduction pathway. *Nature genetics*, *18*(3), 287-291.

Ricciuti, F., Ruddle, F. H., Cox, D. M., Bobrow, M., Madan, K., Pathak, S., ... & Chen, T. R. (1973). Standard karyotype of the Norway rat, Rattus norvegicus. *Cytogenetic and Genome Research*, *12*(3), 199-205.

Richard Albert, J., Kobayashi, T., Inoue, A., Monteagudo-Sánchez, A., Kumamoto, S., Takashima, T., ... & Kobayashi, H. (2023). Conservation and divergence of canonical and non-canonical imprinting in murids. *Genome biology*, *24*(1), 48.

Rosa, J. L., & Barbacid, M. (1997). A giant protein that stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins forms a cytosolic ternary complex with clathrin and Hsp70. *Oncogene*, *15*(1), 1-6.

Santini, L., Halbritter, F., Titz-Teixeira, F., Suzuki, T., Asami, M., Ma, X., ... & Leeb, M. (2021). Genomic imprinting in mouse blastocysts is predominantly associated with H3K27me3. *Nature Communications*, *12*(1), 3804.

Santoni, F. A., Stamoulis, G., Garieri, M., Falconnet, E., Ribaux, P., Borel, C., & Antonarakis, S. E. (2017). Detection of imprinted genes by single-cell allele-specific gene expression. *The American Journal of Human Genetics*, *100*(3), 444-453.

Segel, M., Lash, B., Song, J., Ladha, A., Liu, C. C., Jin, X., ... & Zhang, F. (2021). Mammalian retrovirus-like protein *PEG10* packages its own mRNA and can be pseudotyped for mRNA delivery. *Science*, *373*(6557), 882-889.

Seidl, C. I., Stricker, S. H., & Barlow, D. P. (2006). The imprinted Air ncRNA is an atypical RNAPII transcript that evades splicing and escapes nuclear export. *The EMBO journal*, *25*(15), 3565-3575.

Sharma, J., Mukherjee, D., Rao, S. N., Iyengar, S., Shankar, S. K., Satishchandra, P., & Jana, N. R. (2013). Neuronatin-mediated aberrant calcium signaling and endoplasmic reticulum stress underlie neuropathology in Lafora disease. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(13), 9482-9490.

Shimoyama, Y., Shibata, T., Kitajima, M., & Hirohashi, S. (1998). Molecular cloning and characterization of a novel human classic cadherin homologous with mouse muscle cadherin. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(16), 10011-10018.

Schübeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature*, *517*(7534), 321-326.

Schulz, R., McCole, R. B., Woodfine, K., Wood, A. J., Chahal, M., Monk, D., ... & Oakey, R. J. (2009). Transcript-and tissue-specific imprinting of a tumour suppressor gene. *Human molecular genetics*, *18*(1), 118-127.

Schwarz, S. E., Rosa, J. L., & Scheffner, M. (1998). Characterization of human hect domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(20), 12148-12154.

Singh, D., Nishi, K., Khambata, K., & Balasinor, N. H. (2020). Introduction to epigenetics: basic concepts and advancements in the field. *Epigenetics and Reproductive Health*, xxv-xliv.

Skabkin, M. A., Skabkina, O. V., Dhote, V., Komar, A. A., Hellen, C. U., & Pestova, T. V. (2010). Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes & development*, *24*(16), 1787-1801.

Sleutels, F., Zwart, R., & Barlow, D. P. (2002). The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature*, *415*(6873), 810-813.

Smith, R. J., Dean, W., Konfortova, G., & Kelsey, G. (2003). Identification of novel imprinted genes in a genome-wide screen for maternal methylation. *Genome research*, *13*(4), 558-569.

Smith, R. J., Dean, W., Konfortova, G., & Kelsey, G. (2003). Identification of novel imprinted genes in a genome-wide screen for maternal methylation. *Genome research*, *13*(4), 558-569.

Sowpati, D. T., Thiagarajan, D., Sharma, S., Sultana, H., John, R., Surani, A., ... & Khosla, S. (2008). An intronic DNA sequence within the mouse Neuronatin gene exhibits biochemical characteristics of an ICR and acts as a transcriptional activator in Drosophila. *Mechanisms of Development*, *125*(11-12), 963-973.

Spengler, D., Villalba, M., Hoffmann, A., Pantaloni, C., Houssami, S., Bockaert, J., & Journot, L. (1997). Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain. *The EMBO journal*, *16*(10), 2814-2825.

Surendran, S., Tyring, S. K., & Matalon, R. (2005). Expression of calpastatin, minopontin, NIPSNAP1, rabaptin-5 and neuronatin in the phenylketonuria (PKU) mouse brain: Possible role on cognitive defect seen in PKU. *Neurochemistry international*, *46*(8), 595-599.

Suzuki, S., Shaw, G., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F., & Renfree, M. B. (2011). The evolution of mammalian genomic imprinting was accompanied by the acquisition of novel CpG islands. *Genome Biology and Evolution*, *3*, 1276-1283.

Swales, A. K. E., & Spears, N. (2005). Genomic imprinting and reproduction. *Reproduction*, *130*(4), 389-399.

Swaney, W. T., Curley, J. P., Champagne, F. A., & Keverne, E. B. (2008). The paternally expressed gene *Peg3* regulates sexual experience-dependent preferences for estrous odors. *Behavioral neuroscience*, *122*(5), 963.

Takeichi, M., Atsumi, T., Yoshida, C., Uno, K., & Okada, T. S. (1981). Selective adhesion of embryonal carcinoma cells and differentiated cells by Ca2+-dependent sites. *Developmental biology*, *87*(2), 340-350.

Tam, P. P., Zhou, S. X., & Tan, S. S. (1994). X-chromosome activity of the mouse primordial germ cells revealed by the expression of an X-linked lacZ transgene. *Development*, *120*(10), 2925-2932.

Tang, W. W., Kobayashi, T., Irie, N., Dietmann, S., & Surani, M. A. (2016). Specification and epigenetic programming of the human germ line. *Nature Reviews Genetics*, *17*(10), 585-600.

Tian, X. (2014). Genomic imprinting in farm animals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, *2*(1), 23-40.

Tibbit, C. J., Williamson, C. M., Mehta, S., Ball, S. T., Chotalia, M., Nottingham, W. T., ... & Peters, J. (2015). Antisense activity across the Nesp promoter is required for *Nespas*-mediated silencing in the imprinted *Gnas* cluster. *Non-coding RNA*, *1*(3), 246-266.

Tucci, V., Isles, A. R., Kelsey, G., Ferguson-Smith, A. C., Bartolomei, M. S., Benvenisty, N., ... & Wilkins, J. (2019). Genomic imprinting and physiological processes in mammals. *Cell*, *176*(5), 952-965.

Valente, F. M., Sparago, A., Freschi, A., Hill-Harfe, K., Maas, S. M., Frints, S. G. M., ... & Cerrato, F. (2019). Transcription alterations of *KCNQ1* associated with imprinted methylation defects in the Beckwith–Wiedemann locus. *Genetics in Medicine*, *21*(8), 1808-1820.

van De Sluis, B., Rothuizen, J., Pearson, P. L., van Oost, B. A., & Wijmenga, C. (2002). Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. *Human molecular genetics*, *11*(2), 165-173.

Veselovska, L., Smallwood, S. A., Saadeh, H., Stewart, K. R., Krueger, F., Maupetit-Méhouas, S., ... & Kelsey, G. (2015). Deep sequencing and de novo assembly of the mouse oocyte transcriptome define the contribution of transcription to the DNA methylation landscape. *Genome biology*, *16*(1), 1-17.

Volff, J. N., Körting, C., & Schartl, M. (2001). Ty3/Gypsy retrotransposon fossils in mammalian genomes: did they evolve into new cellular functions?. *Molecular biology and evolution*, *18*(2), 266-270.

Wakeling, E. L., Abu-Amero, S., Price, S. M., Stanier, P., Trembath, R. C., Moore, G. E., & Preece, M. A. (1998). Genetics of silver-russell syndrome. *Hormone research*, *49*(Suppl. 2), 32-36.

Walker, S. K., Hartwich, K. M., & Seamark, R. F. (1996). The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology*, *45*(1), 111-120.

Wan, Y. S., Wang, Z. Q., Shao, Y., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (2001). Ultraviolet irradiation activates PI 3-kinase/AKT survival pathway via EGF receptors in human skin in vivo. *International journal of oncology*, *18*(3), 461-466.

Wang, Y., Joh, K., Masuko, S., Yatsuki, H., Soejima, H., Nabetani, A., ... & Mukai, T. (2004). The mouse Murr1 gene is imprinted in the adult brain, presumably due to transcriptional

interference by the antisense-oriented U2af1-rs1 gene. *Molecular and cellular biology*, *24*(1), 270-279.

Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., & Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary *Impact* of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics*, *39*(4), 457-466.

Weinstein, L. S., Yu, S., Warner, D. R., & Liu, J. (2001). Endocrine manifestations of stimulatory G protein α-subunit mutations and the role of genomic imprinting. *Endocrine reviews*, *22*(5), 675-705.

Weiss, U., Ischia, R., Eder, S., Lovisetti-Scamihorn, P., Bauer, R., & Fischer-Colbrie, R. (2000). Neuroendocrine secretory protein 55 (NESP55): alternative splicing onto transcripts of the *GNAS* gene and posttranslational processing of a maternally expressed protein. *Neuroendocrinology*, *71*(3), 177-186.

Will, C. L., & Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *3*(7), a003707.

Williamson, C. M., Ball, S. T., Dawson, C., Mehta, S., Beechey, C. V., Fray, M., ... & Peters, J. (2011). Uncoupling antisense-mediated silencing and DNA methylation in the imprinted *Gnas* cluster. *PLoS genetics*, *7*(3), e1001347.

Williamson, C. M., Skinner, J. A., Kelsey, G., & Peters, J. (2002). Alternative non-coding splice variants of *Nespas*, an imprinted gene antisense to Nesp in the *Gnas* imprinting cluster. *Mammalian genome*, *13*, 74-79.

Wilkins, J. F., & Bhattacharya, T. (2019). Intragenomic conflict over bet-hedging. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, *374*(1766), 20180142.

Wood, A. J., Bourc'his, D., Bestor, T. H., & Oakey, R. J. (2007). Allele-specific demethylation at an imprinted mammalian promoter. *Nucleic acids research*, *35*(20), 7031-7039.

Wood, A. J., Roberts, R. G., Monk, D., Moore, G. E., Schulz, R., & Oakey, R. J. (2007). A screen for retrotransposed imprinted genes reveals an association between X chromosome homology and maternal germ-line methylation. *PLoS Genetics*, *3*(2), e20.

Wood, A. J., Schulz, R., Woodfine, K., Koltowska, K., Beechey, C. V., Peters, J., ... & Oakey, R. J. (2008). Regulation of alternative polyadenylation by genomic imprinting. *Genes & development*, *22*(9), 1141-1146.

Wutz, A., Smrzka, O. W., Schweifer, N., Schellander, K., Wagner, E. F., & Barlow, D. P. (1997). Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature*, *389*(6652), 745-749.

Wutz, A., Smrzka, O. W., & Barlow, D. P. (2007, September). Making sense of imprinting the mouse and human *IGF2R* loci. In *Novartis Foundation Symposium 214-Epigenetics: Epigenetics: Novartis Foundation Symposium 214* (pp. 251-263). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd..

Xiong, J., Qin, J., Zheng, Y., Peng, X., Luo, Y., & Meng, X. (2012). *PEG10* promotes the migration of human Burkitt's lymphoma cells by up-regulating the expression of matrix metalloproteinase-2 and-9. *Clinical and Investigative Medicine*, E117-E125.

Yagi, T., & Takeichi, M. (2000). Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes & development*, *14*(10), 1169-1180.

Yan, C., Hongjuan, H., Yanjiang, X., Zhengbin, H., Kai, L., Fengwei, Z., ... & Qiong, W. (2011). Expression patterns of imprinted gene *Inpp5f*-v3 during mouse brain development. *Journal of molecular histology*, *42*, 167-173.

Yao, J., Duan, L., Fan, M., Yuan, J., & Wu, X. (2007). Overexpression of *BLCAP* induces S phase arrest and apoptosis independent of p53 and NF-κB in human tongue carcinoma: *BLCAP* overexpression induces S phase arrest and apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*, *297*, 81-92.

Young, L. E., Butterwith, S. C., & Wilmut, I. (1996). Increased ovine foetal weight following transient asynchronous embryo transfer is not associated with increased placental weight at day 21 of gestation. *Theriogenology*, *1*(45), 231.

Yu, S., Yu, D., Lee, E., Eckhaus, M., Lee, R., Corria, Z., ... & Weinstein, L. S. (1998). Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein α-subunit (Gsα) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the Gsα gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(15), 8715-8720.

Zhang, Y., Rohde, C., Tierling, S., Stamerjohanns, H., Reinhardt, R., Walter, J., & Jeltsch, A. (2009). DNA methylation analysis by bisulfite conversion, cloning, and sequencing of individual clones. *DNA Methylation: Methods and Protocols*, 177-187.

Zhang, G., Lv, X., Yang, Q., & Liu, H. (2022). Identification of HM13 as a prognostic indicator and a predictive biomarker for immunotherapy in hepatocellular carcinoma. *BMC cancer*, *22*(1), 888.

Zimin, A. V., Delcher, A. L., Florea, L., Kelley, D. R., Schatz, M. C., Puiu, D., ... & Salzberg, S. L. (2009). A whole-genome assembly of the do*Mest*ic cow, Bos taurus. *Genome biology*, *10*, 1-10.

Zuo, Z., Zhao, M., Liu, J., Gao, G., & Wu, X. (2006). Functional analysis of bladder cancer-related protein gene: a putative cervical cancer tumor suppressor gene in cervical carcinoma. *Tumor Biology*, *27*(4), 221-226.

8 Internetové zdroje a databáze

https://primer3.ut.ee/ [cit. 05.10.2023]

https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk/ [cit. 26.01.2023]

https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/ [26.01.2023]

https://www.geneimprint.com [cit. 18.10.2023]

9 Přílohy

Příloha I: Charakteristiky imprintovaných gDMRs aplikované na vzorové myší anotace gDMRs.

Popis lokalizace gDMR	Transkripce přes gDMR/ICR	CGI (CpG island)	Počet sekvencí TGCCGC	Počet sekvencí příbuzných TGCCGC	Anotace gDMRs/ICR
Promotor genu *Mcts2*, překrytý genem *H13*	ano	ano	3	5	chr2:152686373-152688026
Promotor genu *Nnat*, překrytý genem *Blcap*	ano	ano	8	13	chr2:157559077-157562195
Promotor genu *Nespas*, překrytý genem *Gnas*	ano	ano	10	14	chr2:174294362-174301063
Alternativní promotor genu *Gnas*, překrytý genem *Gnas*	ano	ano	9	14	chr2:174325376-174329137
Promotor genů *Sgce* a *Peg10*, překrytý neanotovaným upstream promotorem genu *Peg10*	ano	ano	3	6	chr6:4746743-4749483
Promotor genů *Peg3* a *Usp29*, překrytý upstream promotorem genu *Peg3*	ano	ne	8	15	chr7:6727076-6731546
Alternativní promotor genu *Snrpn*, překrytý genem *Snrpn*	ano	ne	10	11	chr7:60002495-60006697
Alternativní promotor of *Inpp5f*, překrytý genem *Inpp5f*	ano	ano	6	4	chr7:128687509-128688826
Promotor genu *Kcnq1ot1*, překrytý genem *Kcnq1*	ano	ano	3	3	chr7:143294831-143296905
Kanonický promotor genu *Plagl1*, překrytý upstream oocytově specifickým promotorem *Plagl1*	ano	ano	6	6	chr10:13089891-13092325
Alternativní promotor genu *Grb10*, překrytý genem *Grb10*	ano	ano	4	14	chr11:12025124-12027097
Promotor genem *Zrsr*, překrytý genem *Commd1*	ano	ano	2	8	chr11:22971610-22974212
Promotor genu *Peg13*, překrytý genem *Trappc9*	ano	ano	5	10	chr15:72808971-72811158
Promotor genu *Slc38a4*, překrytý neanotovaným transkriptem	ano	ano	0	0	chr15:97054839-97055853
Promotor genu *Airn,* překrytý genem *Igf2r*	ano	ano	8	7	chr17:12741303-12742950
Promotor genu *Impact*, překrytý upstream neanotovaným promotorem genu *Impact* a/nebo neanotovaným genem	ano	ne	5	18	chr18:12971926-12975001
Promotor neanotovaného transkriptu, překrytý genem *Mest*	ano	ano	12	19	chr6:30734932-30739966
Promotor genu *Nap1l5*, překrytý genem *Herc3*	ano	ano	5	5	chr6:58906126-58907344
Překrytý genem *Cdh15*	ano	ne	2	0	chr8:122864135-122865765