

Clonagem por transferência nuclear e genes relacionados à pluripotência celular

Cloning by nuclear transfer and pluripotent genes

T.F. Braga^{1,2}, M.M. Franco²

¹Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Correspondência: thiagobraga86@gmail.com

Resumo

O processo de clonagem por transferência nuclear de células somáticas é uma biotecnologia com aplicações potenciais para a saúde humana, melhorias nos índices produtivos e reprodutivos dos animais de produção e preservação de espécies ameaçadas de extinção. No entanto, essa tecnologia é prejudicada por uma reprogramação epigenética incompleta, o que resulta na repressão ou superexpressão de alguns genes que provocam alterações genéticas placentárias e fetais. Para que esse processo ocorra de maneira satisfatória, genes relacionados à diferenciação celular devem ser silenciados, e outros, referentes ao programa embrionário, ativados. A estrutura responsável por essa “reprogramação” é o ovócito enucleado, que precisa desmetilar o núcleo das células doadoras sem afetar os genes *imprinted*, marcados de forma sexo-específica e de expressão monoalélica, responsáveis pelo desenvolvimento embrionário normal.

Palavras-chave: epigenética, expressão gênica, pluripotência celular.

Abstract

The process of cloning by somatic cell nuclear transfer is a biotechnology with potential application to human health, improvements in production and reproduction animal rates and preservation of endangered species. However this technology is hampered by an incomplete epigenetic reprogramming, resulting in suppression or overexpression of some genes that cause genetic placental and fetal changes. For this process occur satisfactorily genes related to cellular differentiation must be silenced and others related to the embryonic program have to be activated and the structure responsible for this “reprogramming” is the enucleated oocyte, which needs demethylate the core of donor cell without affecting imprinted genes, sex-specific marked and with monoallelic expression, responsible for normal embryonic development.

Keywords: cellular pluripotency, epigenetic, gene expression.

Introdução

O processo de clonagem por meio da transferência nuclear (TN) de células somáticas foi executado com êxito em uma variedade de espécies de mamíferos (camundongos, ovelhas, bovinos, suínos, entre outros) e tem aplicações potenciais para a saúde humana, melhorias nos índices produtivos e reprodutivos dos animais de produção e preservação de espécies ameaçadas de extinção. A geração de animais viáveis por meio dessa técnica demonstra que o núcleo de células somáticas diferenciadas de mamíferos pode ser reprogramado quando transferido a um ovócito enucleado.

Atualmente, o grande entrave que dificulta alcançar melhores índices de sucesso na clonagem por TN é a ocorrência de uma reprogramação epigenética incompleta do núcleo das células somáticas doadoras. A estrutura responsável por essa “reprogramação” ou “desprogramação” é o ovócito enucleado, que precisa desmetilar o núcleo transferido até o ponto em que ele seja capaz de gerar qualquer tipo celular. Porém, esse processo não pode afetar os genes *imprinted*, que são genes de expressão monoalélica, marcados de forma sexo-específica, necessários para um desenvolvimento embrionário normal.

As características que determinam que uma célula seja diferenciada são comandadas por diferentes padrões de metilação e alterações pós-traducionais das histonas que formam a eucromatina (menos metilada e mais transcricionalmente ativa) e a heterocromatina (mais metilada e menos transcricionalmente ativa), sendo que cada tipo celular tem seu próprio padrão de metilação de DNA e de modificações nas histonas. Fibroblastos de pele são utilizados rotineiramente como células doadoras de núcleo, principalmente pela facilidade de obtenção de tecido necessário para realização do cultivo celular primário. No entanto, esse tipo celular possui um grau de diferenciação muito avançado, o que prejudica a ação de desprogramação realizada pelo ovócito.

A utilização de células menos diferenciadas, como, por exemplo, as células do *cumulus*, pode facilitar o processo de reprogramação realizado pelo ovócito. De maneira geral, é necessário que essas células utilizadas como doadoras de núcleo sofram uma reprogramação epigenética, ou seja, é preciso que percam sua memória

epigenética de células diferenciadas e se tornem células capazes de gerar todos os tipos celulares de um indivíduo. Para isso, genes que agregam a ela tal função diferencial devem ser silenciados, e outros do programa embrionário ativados, como, por exemplo, fatores de transcrição, responsáveis pela aquisição e manutenção do estado pluripotente celular.

Problemas da clonagem

Durante o processo de clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS), a estrutura da cromatina da célula somática que regula seu estado de diferenciação passa por severas modificações, denominadas reprogramação, na tentativa de levá-la a um estado embrionário (Wilmut et al., 2002). A reprogramação das células somáticas ocorre em um curto período, que vai desde a transferência nuclear até a ativação do genoma zigótico (Zhao et al., 2010). No entanto, o padrão epigenético específico das células somáticas pode dificultar ou tornar inacessível o acesso dos fatores ooplásmicos de remodelamento até a estrutura da cromatina (Tian et al., 2009).

É generalizado o pensamento de que uma reprogramação nuclear epigenética anormal da célula somática doadora, que envolve várias modificações, é a principal causa do desenvolvimento aberrante, tanto do feto quanto da placenta, em animais clonados. A metilação do DNA é uma das principais modificações epigenéticas do genoma, com um papel fundamental na reprogramação nuclear durante a TNCS. Essa modificação ocorre principalmente na posição 5' das citosinas localizadas no dinucleotídeo CpG, mais encontrados em *clusters* denominados ilhas CpG. Em geral, a metilação do DNA em regiões diferencialmente metiladas (RDMs), a qual predominantemente ocorre no promotor ou no primeiro éxon do gene (Larsen et al., 1992), reprime a transcrição gênica (Plass e Soloway, 2002).

Modificações globais e gene-específicas na metilação do DNA em bovinos derivados de fecundação *in vitro* e TNCS foram relatadas por Reik et al. (2001), quando compararam mudanças no padrão de metilação no núcleo das células, utilizando anticorpos para metilcitosina. Em embriões fecundados normalmente, os padrões de metilação maternos e paternos são apagados antes da implantação. A desmetilação ativa do genoma paterno antes do início da primeira replicação do DNA é catalisada por enzimas DNA metiltransferases, enquanto o genoma materno é desmetilado progressivamente a cada divisão na clivagem (Santos et al., 2002). Em embriões bovinos, rapidamente após o processo de desmetilação ocorrer, uma onda de metilação *de novo* global é observada do estágio de oito a 16 células, estabelecendo um novo padrão de metilação embrionário (Dean et al., 2001). Essa metilação *de novo* é catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) DNMT3A e 3B, que têm importantes funções durante a embriogênese inicial (Watanabe et al., 2002). Os padrões de metilação impostos ao genoma pelas DNMTs *de novo*, em pontos definidos durante o desenvolvimento, são mantidos pela DNMT1 e levados a programas de expressão gênica predeterminados durante o desenvolvimento embrionário (Reik et al., 2001).

O alto padrão de metilação característico das células somáticas doadoras de núcleo pode ser um ponto significativo responsável pelas anomalias epigenéticas observadas em embriões clones (Mann et al., 2003). Além disso, o procedimento comum de transferência nuclear por fusão celular, potencialmente, introduz a forma somática da enzima DNMT1, que não está normalmente presente em embriões pré-implantados (Reik et al., 2001). A persistência do padrão de metilação das células somáticas após a fusão, no momento em que o genoma parental sofre um drástico processo de desmetilação, pode ter efeitos deletérios no potencial de desenvolvimento dos embriões clones (Beaujean et al., 2004).

Além das alterações nos padrões de metilação do DNA, modificações que ocorrem nas caudas N-terminais das proteínas histonas, como acetilação, metilação e fosforilação, também interferem no desenvolvimento embrionário. Tais modificações são essenciais para manutenção da estrutura da cromatina e regulação transcricional (Kurdistani et al., 2004). A acetilação recruta ativadores que regulam a atividade gênica e estão relacionados com diversos processos relacionados à cromatina (Kurdistani et al., 2004). Sítios onde ocorrem acetilação são bem conhecidos; entre eles, lisinas (K) altamente conservadas estão incluídas (Bjerling et al., 2002). A metilação das histonas pode sinalizar tanto ativação como repressão gênica, dependendo dos sítios de metilação (Martin e Zhang, 2005). Argininas (R) e lisinas (K) localizadas na porção N-terminal do núcleo das histonas são modificadas por metilação.

Modificações de histonas em embriões clones, no entanto, ainda não são muito compreendidas. Wang et al. (2007) relataram que o uso de tricostatina A pode melhorar o padrão de modificações de histonas de embriões de camundongos clonados, aumentando, assim, o desenvolvimento de embriões derivados de transferência nuclear. Esses resultados sugerem que modificações normais das histonas são necessárias para o estabelecimento normal do desenvolvimento de embriões clones (Wang et al., 2007). Embora poucas modificações de histonas sejam estudadas em embriões clones, Santos et al. (2003) reportaram a ocorrência de hiperacetilação e metilações aberrantes na histona H3. Wu et al. (2010) relataram uma distribuição anormal e altos níveis de acetilação e metilação localizados nos cromossomos antes da ativação genômica de embriões clonados.

O *imprinting* genômico também é um fator que interfere no desenvolvimento embrionário. Genes *imprinted* são expressos em apenas um dos cromossomos homólogos, e isso ocorre de forma dependente de sua

origem parental, regulados primeiramente pela metilação do DNA nas regiões controladoras de *imprinting* (RCIs). Vários genes *imprinted* possuem funções na regulação tanto do crescimento fetal quanto do placentário, e modificações nesses genes culminam em anormalidades durante o desenvolvimento (Su et al., 2011).

Além das alterações na metilação do DNA, nas proteínas histonas e nos genes *imprinted*, a reativação de genes do programa embrionário é muito importante para o êxito do processo de clonagem por TNCS. Mecanismos moleculares que mantêm/regem um estado de autorrenovação de pluripotência operam em diferentes níveis e incluem (mas não são limitados a) sinalização por LIF e BMP4, bem como inibição da sinalização da ERK, redes de cooperação de fatores de transcrição e mecanismos epigenéticos (Nichols e Smith, 2009). Alguns fatores de transcrição têm sido identificados como essenciais para a formação e/ou manutenção da massa celular interna durante o período de pré-implantação embrionária e a cultura de células-tronco embrionárias de camundongos (Mitsui et al., 2003). Estes constituem um núcleo de transcrição para manter a pluripotência por meio de uma regulação positiva mútua (Boyer et al., 2006) e da regulação de genes-alvo de colaboração, atuando em paralelo a circuitos adicionais e a fatores regulatórios que geram pluripotência (Hu et al., 2010).

Genes relacionados à pluripotência

O gene *Rex-1/Zfp42*

O *Rex-1* (*reduce expression-1*, também conhecido como *Zfp42*) constitui um gene que codifica uma proteína zinc-finger de 37kDa, com funções semelhantes às de fatores de transcrição que se ligam ao DNA. Parte da sequência da proteína produzida pelo *Rex-1* possui alta similaridade com outra proteína zinc-finger, *YY1*, indicando que esses dois genes estão evolutivamente relacionados. Apesar da similaridade entre as sequências, esses genes mostram diferenças na estrutura de seus éxons: toda a região que codifica a proteína do *Rex-1* está localizada em um único éxon, enquanto a região codificante do *YY1* está dividida em cinco éxons individuais (Kim et al., 2007).

Foi inicialmente descoberto como resultado de sua expressão específica em células carcinômicas embrionárias (CCE; Hosler et al., 1989); posteriormente, demonstrou ser expresso em outros tipos de células pluripotentes (Rogers et al., 1991), células progenitoras adultas multipotentes (Jiang et al., 2002), células germinativas do testículo, MCI e em células do trofotoderma inicial de embriões de ratos (Rogers et al., 1991). Em concordância com a expressão restrita nas células pluripotentes autorrenováveis, a expressão do *Rex-1* foi positivamente relacionada ao aumento da pluripotência em células-tronco de ratos (Toyooka et al., 2008), humanos e células-tronco pluripotentes induzidas (Chan et al., 2009). Os níveis de expressão do *Rex-1* são elevados no estágio de pré-implantação de embriões, e níveis moderados de expressão também foram detectados durante a espermatogênese e na placenta (Rogers et al., 1991). De acordo com vários estudos de imunoprecipitação da cromatina, o gene *Rex-1* é comprovadamente controlado por genes mestres de células-tronco como *Oct3/4*, *Sox2* e *Nanog* (Kim et al., 2008).

Alguns estudos relataram que o *Rex-1* está associado a um circuito de ativação gênica que implica o metabolismo proteico, ao invés de estar ligado ao processo de desenvolvimento, o que coincide parcialmente com a função do *Myc*, que é o oposto de genes como *Oct4/Nanog/Sox2* (Kim et al., 2008).

O gene *Oct4/Pou5f1*

O fator de transcrição *Oct4* codificado pelo gene *Oct4*, também conhecido como *Oct3/4* ou *Pou5f1*, pertence à classe V da família *Pou* de fatores de transcrição (Scholer, 1991).

A importância do gene *Oct4* no desenvolvimento embrionário foi comprovada por meio de estudos com embriões de camundongos mutantes (*Oct4^{-/-}*), que morreram durante a implantação em razão da incapacidade de formar ICM (Medvedev et al., 2008). Estes mesmos embriões, cultivados *in vitro*, mostraram que a queda da expressão do *Oct4* reduz a capacidade das células em formar a ICM e causa sua diferenciação em células trofodermas. Porém, a supressão das funções do gene *Oct4* não afetou a manutenção da pluripotência dos blastômeros após a formação do blastocisto. Esse fato mostra que a transativação dependente de *Oct4* nos primeiros estágios embrionários é necessária para manter o estado indiferenciado das células somente quando a primeira linhagem somática (trofoderma) se separa do compartimento pluripotente (ICM).

In vivo, o gene *Oct4* é expresso durante o desenvolvimento embrionário inicial (Mitalipov et al., 2003). A expressão materna desse gene ocorre em ovócitos antes da fecundação. Após a fecundação, a expressão de *Oct4* para, porém mRNA e proteínas de *Oct4* podem ser detectadas até o estágio de duas células. A expressão embrionária é ativada após o estágio de duas células, aumentando a quantidade de proteínas *Oct4* nos blastômeros. No estágio de mórula, altos níveis de expressão de *Oct4* são observados. No entanto, quando as células da parte externa da mórula se diferenciam em trofoderma, o nível de expressão diminui acentuadamente. Após a implantação, a expressão de *Oct4* é estritamente restrita às células germinativas primordiais, que são precursoras de gametas. Em camundongos, altos níveis de expressão de *Oct4* são detectados até o estágio de

formação das células precursoras de gametas: prófase da primeira divisão meiótica nas fêmeas e início da espermatogênese em machos recém-nascidos.

A expressão de Oct4 em bovinos e suínos é diferente quando comparada a de camundongos. Nestas espécies, sua expressão não é restrita à ICM dos blastocistos, sendo observada também em células trofodermas. Um padrão similar de expressão também é observado em humanos e cabras (He et al., 2006). Essas diferenças de distribuição de expressão do gene Oct4 estão relacionadas com as particularidades que cada espécie possui durante o desenvolvimento embrionário (Medvedev et al., 2008).

O gene Nanog

Ele foi descoberto como um gene de expressão seletiva, expresso nos estágios de pré-implantação do desenvolvimento embrionário e em cultura de células pluripotentes (Wang et al., 2007). Mais tarde, seu importante papel na manutenção do estado indiferenciado das células-tronco embrionárias foi comprovado (Mitsui et al., 2003).

O mRNA do gene Nanog é primeiramente detectado no estágio de mórula, e seu sinal é localizado na futura ICM em camundongos. No estágio de blastocisto, a expressão do Nanog é limitada à ICM, porém existem traços no trofoderma. Em blastocistos tardios, seu mRNA é detectado somente no epiblasto e não é observado no endoderma primitivo (Mitsui et al., 2003).

Um padrão incomum de distribuição das proteínas Nanog é observado em embriões de caprinos na fase de pré-implantação. No estágio de oito-16 células, a proteína está localizada no núcleo. Um baixo nível de proteínas NANOG é detectado no nucleoplasma de células do trofoderma. Na fase de blastocisto expandido, a localização nucleolar das proteínas é observada na ICM e nas células do trofoderma. Na ICM, além de estarem presentes no nucléolo, as proteínas também são encontradas no nucleoplasma. A partir do 10º dia de desenvolvimento, não são detectadas proteínas no nucleoplasma das células da ICM, e no nucléolo, tanto para as células da ICM quanto para as do trofoderma, a detecção é bem discreta (He et al., 2006).

Em contraste com a expressão do gene Oct4, o Nanog inicia sua expressão nos estágios tardios do desenvolvimento embrionário. A ausência deste gene causa a diferenciação em células do endoderma primitivo, enquanto a repressão da expressão do Oct4 causa diferenciação das células em derivados do trofoderma (He et al., 2006).

Conclusão

O processo de clonagem por transferência nuclear, apesar de ter alcançado êxito, ainda é uma técnica que necessita de melhorias em relação às alterações epigenéticas que ocorrem de forma errônea durante o desenvolvimento de produtos clonados. Um estudo mais aprofundado sobre os processos de metilação do DNA, as alterações nas proteínas histonas e a ativação de genes relacionados à pluripotência é de extrema importância, para se alcançarem melhores índices nas taxas de obtenção de animais viáveis após a aplicação dessa biotecnologia.

Agradecimentos

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela estrutura de pesquisa; à CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Referências

- Beaujean N, Taylor J, Gardner J, Wilmut I, Meehan R, Young L.** Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, v.71, p.185-193, 2004.
- Bjerling P, Silverstein RA, Thon G, Caudy A, Grewal S, Ekwall K.** Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and *in vivo* specificity. *Mol Cell Biol*, v.22, p.2170-2181, 2002.
- Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Werning M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R.** Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, v.441, p.349-353, 2006.
- Chan E, Ratanasirinrawoot S, Park I, Manos P, Loh Y, Huo H, Miller J, Hartung O, Rho J, Ince T, Daley G, Schlaeger T.** Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol*, v.27, p.1033-1037, 2009.
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W.** Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Nat Acad Sci*, v.98, p.13734-13738, 2001.

- He S, Pant D, Schiffmacher A.** Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: Novel pattern of NANOG protein localization in the nucleolus. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.1512-1522, 2006.
- Hosler BA, LaRosa GJ, Grippo JF, Gudas LJ.** Expression of REX1, a gene containing zinc finger motifs, is rapidly reduced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Mol Cell Biol*, v.9, p.5623-5629, 1989.
- Hu BY, Weick JP, Yu J, Ma LX, Zhang XQ, Thomson JA, Zhang SC.** Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Nat Acad Sci*, v.104, p.4335-4340, 2010.
- Jiang Y, Jahagirdar B, Reinhardt R, Schwartz R, Keene C, Ortiz-Gonzales X, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low W, Largaespada D, Verfaillie C.** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, v.418, p.41-49, 2002.
- Kim J, Chu J, Shen X, Wang J, Orkin S.** An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell*, v.132, p.1049-1061, 2008.
- Kim JD, Faulk C, Kim J.** Retroposition and evolution of the DNA binding motifs of YY1, YY2 and REX1. *Nucleic Acids Res*, v.35, p.3442-3452, 2007.
- Kurdistani SK, Tavazoie S, Grunstein M.** Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell*, v.117, p.721-733, 2004.
- Larsen F, Gundersen M, Frommer M.** CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*, v.13, p.1095-1107, 1992.
- Mann MR, Chung YG, Nolen LD, Verona RI, Lathan KE, Bertolomei MS.** Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod*, v.69, p.902-914, 2003.
- Martin C, Zhang Y.** The diverse function of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.6, p.838-849, 2005.
- Medvedv SV, Shevchenko AI, Mazurok NA, Zakian SM.** Oct4 and Nanog are the key genes in the system of pluripotency maintenance in mammalian cells. *Russ J Genet*, v.44, p.1377-1393, 2008.
- Mitalipov SM, Kuo HC, Hennebold JD, Wolf DP.** Oct4 expression in pluripotent cells of the Rhesus Monkey. *Biol Reprod*, v.69, p.1785-1792, 2003.
- Mitsui k, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S.** The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, v.113, p.631-642, 2003.
- Nichols J, Smith A.** Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, v.4, p.487-492, 2009.
- Plass C, Soloway PD.** DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur J Hum Genet*, v.10, p.6-16, 2002.
- Reik W, Dean W, Walter J.** Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, v.293, p.1089-1093, 2001.
- Rogers M, Hosler B, Gudas L.** Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development*, v.113, p.815-824, 1991.
- Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W.** Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*, v.241, p.172-182, 2002.
- Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W.** Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*, v.13, p.1116-1121, 2003.
- Scholer HR.** Octamania: The POU factors in murine development. *Trends Genet*, v.7, p.323-329, 1991.
- Su J, Yang B, Wang Y, Li Y, Xiong X, Wang L, Guo Z, Zhang Y.** Expression and methylation status of imprinted genes in placentas of deceased and live cloned transgenic calves. *Theriogenology*, v.75, p.1346-1359, 2011.
- Tian XC, Park J, Bruno R, French R, Jiang L, Prather RS.** Altered gene expression in cloned piglets. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.60-66, 2009.
- Toyooka Y, Shimosato D, Murakami K, Takahashi K, Niwa H.** Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development*, v.135, p.909-918, 2008.
- Wang F, Kou Z, Zhang Y, Gao S.** Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol Reprod*, v.77, p.1007-1016, 2007.
- Watanabe D, Suetake I, Tada T, Tajima S.** Stage and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech Dev*, v.118, p.187-190, 2002.
- Wilmot I, Beaujean N, De Souza PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE.** Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, v.419, p.583-587, 2002.
- Wu X, Li Y, Xue L, Wang L, Yue Y, Li K, Bou S, Li GP, Yu H.** Multiple histone site epigenetic modification in nuclear transfer and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Zygote*, v.19, p.31-45, 2010.
- Zhao J, Hao Y, Ross JW, Spate LD, Walters EM, Samuel MS, Rieke A, Murphy CN, Prather RS.** Histone deacetylase inhibitors improve *in vitro* and *in vivo* developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell Reprogram*, v.12, p.75-83, 2010.