



Charakterystyka zdolności rozwojowej oocytów ssaków w aspekcie zapłodnienia i rozwoju zarodkowego. Cz. II. Regulacja dojrzałości cytoplazmatycznej i genomowej*

Jolanta Opiela, Lucyna Kątska-Książkiewicz

Dział Biotechnologii Rozrodu, Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt,
Instytut Zootechniki, Balice

Characterization of mammalian oocyte competence to undergo fertilization and embryonic development. II. Regulation of cytoplasmic and genomic maturation

Summary

Near the end of the growth phase, mammalian oocyte achieves competence to undergo three aspects of maturation, i.e. nuclear, cytoplasmic and genomic. This review will consider some aspects of cytoplasmic and genomic maturation, as the nuclear maturation was already presented. The roles of the protein synthesis, bi-directional communication between oocyte and granulosa cells and calcium oscillations required for acquiring cytoplasmic maturation are discussed. The relevant information on genomic imprinting that causes functional differences between paternal and maternal genomes and plays an essential role in mammalian development is reviewed. Moreover, the present findings regarding oocyte-specific genes required for expression of cytoplasmic and genomic competencies are described.

Key words:

oocyte, cytoplasmic maturation, genomic imprinting, TPZs, Cx37, GDF-9, BMP-15, Ca²⁺.

Adres do korespondencji

Jolanta Opiela,
Dział Biotechnologii
Rozrodu,
Immuno- i Cytogenetyki
Zwierząt,
Instytut Zootechniki,
ul. Krakowska 1,
32-083 Balice.

* Cz. I tego zagadnienia *Charakterystyka zdolności rozwojowej oocytów ssaków w aspekcie zapłodnienia i rozwoju zarodkowego: I. Dojrzałość jądrowa i molekularne aspekty jej regulacji* została opublikowana w „Biotechnologii” 2004, 3 (66), 140-151.

1. Wprowadzenie

Dojrzałość oocytu jest podstawowym warunkiem jego zdolności do zapłodnienia i prawidłowego rozwoju zarodkowego, a następnie płodowego. Uzyskanie tych zdolności wymaga osiągnięcia oprócz dojrzałości jądrowej [1] także dojrzałości cytoplazmatycznej oraz genomowej.

Dojrzałość cytoplazmatyczna oocytu, związana z nabyciem dojrzałości molekularnej i strukturalnej, warunkuje zarówno zdolność do zapłodnienia jak i do zapoczątkowania oraz kontynuacji podziałów mitotycznych zarodka [2,3]. Osiągnięcie dojrzałości cytoplazmatycznej nie jest jednak równoznaczne z osiągnięciem pełnej dojrzałości oocytu, gdyż w hodowli *in vitro* może dojść do zaburzeń w epigenetycznej modyfikacji genów, wynikiem czego jest nieprawidłowy rozwój zarodka, a następnie płodu. Dojrzałość genomowa jest równoznaczna z prawidłowym zakończeniem procesów epigenetycznych, towarzyszących nabyciu imprintingu genomu matczynego [2].

2. Dojrzałość cytoplazmatyczna

Dotychczasowa znajomość procesów prowadzących do osiągnięcia zarówno funkcjonalnej jak i molekularnej dojrzałości cytoplazmatycznej oocytu ma charakter fragmentaryczny, szczególnie w porównaniu z poznaniem mechanizmów towarzyszących dojrzewaniu jądrowemu [1,2]. Oocyty, uzyskane z małych pęcherzyków antralnych, wykazują ograniczoną zdolność rozwojową w porównaniu z oocytami pochodzącymi z pęcherzyków większych [4]. Jednakże, jak wykazano w licznych doświadczeniach, nawet w przypadku oocytów pochodzących z większych pęcherzyków antralnych, tylko część (np. u bydła ok. 40%), mimo uzyskania *in vitro* stadium MII, rozwija się po zapłodnieniu do stadium blastocysty. Wskazuje to, że oocyty osiągające dojrzałość *in vitro* mogą nie wykazywać pełnych zdolności rozwojowych na skutek zaburzeń w syntezie białek, nieprawidłowości w transporcie sygnałów, jonów (zwłaszcza jonów wapnia), a także różnych innych substancji, które w konsekwencji prowadzą do nieprawidłowego dojrzewania cytoplazmy [5].

2.1. Synteza białek

W fazie wzrostu oocyt syntetyzuje i magazynuje białka i matczyny mRNA, które są konieczne dla prawidłowego przebiegu rozwoju przedimplantacyjnego, szczególnie podczas krytycznych, w warunkach *in vitro*, etapów rozwoju zarodka jak aktywacja genomu zarodkowego (u bydła w stadium 8-16-komórkowym) oraz przejście ze stadium moruli do blastocysty, w których to etapach często dochodzi do zahamowania podziałów zarodka.

W wykonanej analizie porównawczej oocytów dojrzewających *in vivo* i *in vitro* wykazano występowanie znacznych różnic, zarówno w ilości jak i jakości badanych białek [6,7]. Dla przykładu: w dojrzewających *in vitro* oocytach ludzkich stwierdzono brak 9 specyficznych białek, które są obecne w oocytach dojrzewających *in vivo* [6]. Również u bydła wykazano obniżoną zawartość białek w oocytach dojrzewających *in vitro* w porównaniu do dojrzewających *in vivo* [7]. Białka, które nie są syntetyzowane podczas dojrzewania *in vitro* lub też powstają w mniejszej ilości niż w warunkach *in vivo*, uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego i warunkują prawidłowy rozwój zarodka, a następnie płodu.

Intensywna synteza białek w oocytach większości gatunków następuje przed wznowieniem procesu dojrzewania oocyty. U kozy, świni, owcy i krowy w obecności inhibitorów syntezy białek oocyty nie są zdolne do wznowienia mejozy [8] co dowodzi, że te nowo syntetyzowane białka biorą udział w dojrzewaniu. Proces transkrypcji całkowicie wygasa podczas dojrzewania mejotycznego, a ekspresja genów jest regulowana w tym czasie wyłącznie na poziomie translacji [9,10]. Informacja, przepisana z DNA na mRNA – wówczas gdy transkrypcja była możliwa – zostaje zmagazynowana, natomiast translacja w celu zapoczątkowania syntezy łańcucha białkowego następuje później, niezależnie od procesu transkrypcji [9,10]. W jądrze komórki ssaka do mRNA dołączany jest ogon poly-(A), o przeciętnej długości 250-300 reszt adenozylowych. Podczas transportu mRNA z jądra do cytoplazmy następuje skracanie ogona poly-(A) [11]. Natomiast aktywacja zmagazynowanego, będącego w spoczynku, mRNA polega na wydłużeniu ogona poly-(A) [12]. Wydłużenie ogona poli-(A) w cytoplazmie skorelowane jest z aktywacją translacji [13]. Dla regulacji tego procesu konieczna jest fosforylacja zarówno czynników inicjujących translację (eIFs, *eukaryotic initiation factors*) jak i ich regulatorów [14].

Najlepiej scharakteryzowanym czynnikiem inicjującym translację jest eIF4E (*cap binding protein*), należący do kompleksu eIF4F (*cap-binding complex*). Ten ostatni kompleks tworzą 3 podjednostki, oprócz wspomnianego już czynnika eIF4E, enzym eIF4A (będący helikazą RNA) oraz czynnik eIF4G [15]. Białko eIF4E rozpoznaje „kapturek” na końcu 5' łańcucha mRNA, tj. 7-metyloguanozynę (m7GpppN). Z kolei helikaza RNA, tj. czynnik eIF4A, rozwija drugorzędową strukturę mRNA z wykorzystaniem energii ATP [16]. Natomiast czynnik eIF4G współdziała z eIF4A, eIF4E oraz kilkoma innymi białkami jak np. PABP (*poly(A)-binding protein*) i kinazami białkowymi. Reasumując, kompleks eIF4F stymuluje tworzenie kompleksu mRNA-rybosom, niezbędnego w tworzeniu łańcucha polipeptydowego. Tomek i wsp. (2002) w przeprowadzonych badaniach wykazali, że w stadium GV synteza białek jest niewielka. Natomiast w GVBD, kiedy następuje fosforylacja eIF4E, wzrasta ona 3-krotnie w porównaniu do poziomu w stadium GV. Z kolei w stadium MII translacja odpowiada znowu tej, jaką stwierdzono w stadium GV, mimo obecności ufosforylowanego czynnika eIF4E [9]. Informacje te uzupełniły badania Melo Sterza i wsp. (2003), w których wykazano, że zahamowanie translacji w stadium MII może następować w skutek zablokowania czynnika eIF4F przez białko wiążące 4E-BP1, potencjalny inhibitor tego czynnika [17].

2.2. Rola komórek wzgórka jajonośnego oraz wybranych białek w dojrzałości cytoplazmatycznej oocytu

Jednym z warunków koniecznych dla uzyskania dojrzałości cytoplazmatycznej oocytu jest zachowanie prawidłowej łączności z komórkami ziarnistymi pęcherzyka [18,19] poprzez wypustki komórek ziarnistych, tzw. TPZs (*transzonal projections*), które przenikając przez osłonkę przejrzystą docierają do powierzchni oolemy [20]. Dzięki tej łączności może następować dwukierunkowa wymiana sygnałów, jonów oraz różnych związków między oocytem a komórkami ziarnistymi. Bezpośrednie połączenia szczelinowe (*gap junctions*), będące jedną z form TPZs, umożliwiają międzykomórkowy transport małych cząsteczek o masie poniżej 1 kDa [21]. Połączenia szczelinowe budują białka należące do rodziny koneksyn. Dotychczas wykryto ponad 20 białek należących do tej rodziny [21,22]. U bydła, ekspresja specyficznej koneksyny zależna jest od stadium rozwoju pęcherzyka; np. koneksyna 37 (Cx37) obecna jest w pęcherzykach przedantralnych, a jej ekspresja wyraźnie zmniejsza się podczas wzrostu pęcherzyka i powstawania antrum [23]. Przerwanie połączeń szczelinowych typu *gap-junction* między oocytem a komórkami ziarnistymi, które może nastąpić w wyniku wyłączenia genu Cx37, uniemożliwia wznowienie mejozy [24]. Carabatsos i wsp. (2000) w przeprowadzonych doświadczeniach wykazali, że oocyty myszy Cx37^{-/-} charakteryzowały się zdekondensowaną chromatyną, typową dla stadium GV, oraz interfazowym układem mikrotubul. Brak kondensacji chromatyny był przyczyną zablokowania transkrypcji, a w konsekwencji ekspresji genów. W badaniach tych wykazano, że połączenia szczelinowe są niezbędne zarówno dla uzyskania dojrzałości jądrowej jak i cytoplazmatycznej. Połączenia TPZ umożliwiają przepływ związków energetycznych i wymianę jonową, dzięki czemu komórki ziarniste pełnią funkcję odżywczą w stosunku do oocytu, a także transportują związki parakrynnne produkowane przez oocyt, a odgrywające niezwykle istotną rolę w uzyskaniu jego kompetencji rozwojowej. Za przykład może tu służyć różnicujący czynnik wzrostu GDF-9 (*growth differentiation factor-9*), należący do rodziny transformujących czynników wzrostu TGFβ (*transforming growth factor β*). Oocyty myszy z wyłączonym genem GDF-9 osiągając normalną wielkość nie uzyskują kompetencji mejotycznej [25]. Podobną rolę przypisuje się receptorowi kinazy prototyrozyny, c-kit, który zlokalizowany jest w błonie komórkowej oocytu oraz jego ligandowi kit, będącemu tworem komórek ziarnistych [26]. Mutacje w receptora c-kit prowadzą do bezpłodności u myszy oraz manifestują się błędami w gametogenezie [26]. Czynnik wzrostu GDF-9 oraz kompleks kit/kit ligand współdziałają ze sobą w regulacji wzrostu oocytu, proliferacji oraz różnicowaniu komórek ziarnistych [26,27]. Wykazano ponadto, że białka te biorą udział w osiągnięciu dojrzałości cytoplazmatycznej [20,28].

Kolejnym związkiem parakrynnym z rodziny TGFβ wytwarzanym przez oocyt jest białko morfogenetyczne kości BMP-15 (*bone morphogenetic protein 15*) zwane również GDF-9B. Wykazano, że powstawanie tego białka jest uwarunkowane dzia-

łaniem pojedynczego genu na chromosomie X u ssaków [29]. Białko to odgrywa rolę w regulacji funkcji jajników, co wykazano u owiec ras Inverdale i Hanna [29,30]. W populacjach tych występują mutacje genów sprzężonych z chromosomem X. Osobniki heterozygotyczne pod względem genu BMP-15 owulują więcej komórek jajowych, natomiast u osobników homozygotycznych pod względem tego genu stwierdza się niedorozwój jajników [31]. Rozwój pęcherzyków jajnikowych zostaje wówczas zatrzymany w stadium pęcherzyka I-rzędu [30], przy czym komórki ziarniste nie ulegają proliferacji, natomiast oocyt kontynuuje wzrost. W rezultacie pęcherzyki jajnikowe zawierają prawidłowej wielkości oocyty, otoczone pojedynczą warstwą komórek ziarnistych [32]. Podobny defekt morfologiczny obserwowano u myszy z wyłączonym genem GDF-9 [25]. W przeciwieństwie do owiec, inaktywacja genu BMP-15 u myszy powoduje w tkance jajnikowej minimalne zmiany histopatologiczne. Jajniki myszy BMP-15^{-/-} nie różnią się morfologicznie w porównaniu do myszy BMP-15^{+/-} i BMP-15^{+/+}, lecz owulują mniej komórek jajowych, co skutkuje obniżeniem płodności [33]. Natomiast heterozygoty pod względem genu BMP-15 (BMP-15^{+/-}) nie wykazują podwyższonej płodności, jak to ma miejsce u owiec [33]. Mimo różnic gatunkowych w manifestacji ekspresji genu BMP-15 wykazano, że produkt genu BMP-15 reguluje funkcje jajnika oraz osiągnięcie dojrzałości cytoplazmatycznej oocytu wpływając na proliferację komórek ziarnistych i ich ekspansję w czasie dojrzewania oocytu [33].

2.3. Rola jonów wapnia w dojrzewaniu cytoplazmy; markery dojrzałości cytoplazmatycznej

Stwierdzono, że dla prawidłowego przebiegu procesu dojrzewania cytoplazmy oocytu niezbędny jest odpowiedni poziom jonów Ca²⁺ [34]. Boni i wsp. (2002) w nowszych badaniach wskazują, że poziom jonów Ca²⁺ w błonie komórkowej niedojrzałych oocytów oraz poziom wewnątrzkomórkowych zapasów jonów Ca²⁺ w dojrzałych oocytach mogą służyć jako markery ich kompetencji rozwojowej [35]. Mechanizmy generujące i podtrzymujące oscylacje jonów Ca²⁺ w cytoplazmie oocytu są niezbędne podczas reakcji korowej, dla połączenia ziaren korowych z oolemą, a także dla aktywacji komórki jajowej [36,37].

Innym markerem kompetencji rozwojowej oocytu okazała się dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD), enzym syntetyzowany w pierwszej połowie fazy S, w czasie wzrostu oocytu [38]. Odgrywa on istotną rolę w czasie wzrostu komórki, dostarczając NADPH dla regulacji procesów oksydacyjnych [39]. Zwiększona aktywność enzymatyczna G6PD jest negatywnie skorelowana z kompetencją mejotyczną oocytów, a tym samym efektywnością zapłodnienia i rozwoju zarodkowego [40,41]. Ten marker dojrzałości cytoplazmatycznej może być szczególnie przydatny dla przyżyciowej oceny kompetencji mejotycznej oocytów, w przypadku gdy jako dawczyni nie oocytów do hodowli *in vitro* wykorzystywane są niedojrzałe płciowo samice.

Kompetencja mejotyczna oocytów, jak wiadomo, wzrasta wraz z wielkością pęcherzyka jajnikowego, z którego został on uzyskany [6]. Stosowane często metody pozyskiwania niedojrzałych oocytów poprzez nacinanie powierzchni jajnika lub aspirację płynu pęcherzykowego z zawartym w nim oocytem nie pozwalają na precyzyjne określenie wielkości pęcherzyków i ich selekcję, tym samym dostarczają heterogenicznej populacji oocytów, o zróżnicowanych kompetencjach rozwojowych. Odpowiednio przeprowadzona selekcja oocytów jest niezwykle istotnym elementem metody dojrzewania oocytów *in vitro*. Dotychczasowe metody selekcji oocytów oparte były na ich jakości morfologicznej, ocenianej na podstawie stanu cytoplazmy i wyglądu otaczających oocyt komórek wzgórka jajonośnego. Ostatnio opracowano nową, przyżyciową metodę selekcji niedojrzałych oocytów kozy [40], bydła [41] i świni [42] przeznaczanych do dojrzewania *in vitro*. Selekcji dokonywano po przyżyciowym barwieniu kompleksów oocyt-komórki wzgórka jajonośnego brylantowym błękitem krezyłu (BCB, *brilliant cresyl blue*). Barwienie to pozwala na określenie aktywności G6PD – w obecności aktywnego enzymu następuje redukcja koloru błękitnego w barwniku BCB do związku bezbarwnego.

Z najnowszych badań wynika, że zwiększenie odsetka oocytów osiągających *in vitro* dojrzałość cytoplazmatyczną, w przypadku gdy pozyskiwane są z mniejszych pęcherzyków antralnych, można uzyskać w rezultacie wydłużenia stadium profazy I podziału mejotycznego, po zastosowaniu inhibitorów wznowienia mejozy. W przypadku oocytów bydłeczych stosowane mogą być dwa specyficzne inhibitory kinazy MPF: butyrolakton I oraz roskowityna [43]. Podobnie u myszy, odwracalne zablokowanie mejozy inhibitorem fosfodiesterazy – PDE3 zwiększa kompetencje rozwojowe oocytów pochodzących z małych pęcherzyków antralnych [44].

3. Dojrzałość genomowa – genomowy imprinting

Dojrzałość genomowa oocytu jest równoznaczna z prawidłowym zakończeniem procesów epigenetycznych, towarzyszących nabyciu imprintingu genomu matczynego. Obejmuje całokształt epigenetycznych modyfikacji zachodzących w okresie wzrostu oocytu [2]. Skutkiem tych modyfikacji są zmiany w ekspresji genów, powstające bez równoczesnej zmiany w sekwencji DNA. Imprinting oocytów można określić jako monoalleliczną, zależną od płci, ekspresję genu. Imprinting (piętnowanie alleli) jest epigenetycznie kontrolowanym zjawiskiem, gdyż mechanizmy inne niż sekwencja DNA rozróżniają allele rodzicielskie. Podlegające imprintingowi geny posiadają specyficzne znakowanie jednego z alleli rodzicielskich, co prowadzi do zależnych od płci różnic w ekspresji [45]. Napiętnowane allele, pochodzenia matczynego lub ojcowskiego, pod względem funkcjonalnym nie są sobie równe. Stwierdzono, że rozwój zarodków uniparentalnych (powstałych w wyniku połączenia dwóch genomów męskich bądź żeńskich) nie zostaje prawidłowo ukończony. Obserwacje te wskazują na różnice między allelami pochodzenia matczynego i ojcowskiego [45].

Wykazano również, że genomowy imprinting gamet (charakterystyczny dla nich wzór metylacji napiętnowanych genów) jest „wymazywany” dopiero w trakcie rozwoju pierwotnych komórek płciowych. U myszy to „wymazanie” następuje w czasie osiedlania pierwotnych komórek płciowych w gonadzie, tj. między 10. a 12. dniem ciąży [46]. Następnie imprinting ustanawiany jest ponownie, podczas oogenezy i spermatogenezy. Pierwotne komórki płciowe są prawie całkowicie wolne od imprintingu, ale stopniowo, w czasie gametogenezy, następuje specyficzna metylacja DNA, zależna od płci i determinująca ekspresję danego genu, np. gen H19 pochodzenia ojcowskiego w wyniku metylacji zostaje wyłączony, natomiast ten sam gen u samic nie podlega metylacji skutkiem czego następuje jego ekspresja [47-49].

U ssaków około 0,1-1% wszystkich genów podlega piętnowaniu genomowemu [50,51]. Monoalleliczna ekspresja genu i wyciszenie transkrypcji następuje w wyniku metylacji DNA, tj. enzymatycznego przyłączenia reszt metylowych [50,51]. Stwierdzono jednak, że metylacja nie jest jedynym markerem epigenetycznym, który pozwala na rozróżnianie napiętnowanych alleli. Do innych markerów zaliczyć można modyfikację histonów, która polega na acetylacji ich aminokwasów wyłącznie w obrębie allelu podlegającego ekspresji [52]. Metylacja DNA następuje w pozycji 5 cytozyny, głównie w obrębie wysp CpG. Odcinki DNA kontrolujące ekspresję genu zawierają powtórzone sekwencje CpG, które mogą ulegać metylacji. Brak grup metylowych w tych odcinkach związany jest z aktywnością transkrypcyjną genu, natomiast ich metylacja blokuje transkrypcję. W procesie tym uczestniczą specyficzne białka wiążące (MBDs, *methyl-CpG binding proteins*) [53]. Białka te, współdziałając z dwuacetylazami histonowymi (HDAC), powodują kondensację chromatyny uniemożliwiającą transkrypcję [54]. Stwierdzono, że metylacja DNA gwarantuje stabilność chromosomów oraz ich integralność strukturalną poprzez zablokowanie ekspresji bogatych w sekwencje CpG retrotranspozonów [55]. Przyjmuje się, że naznaczenie alleli rodzicielskich wykształciło się w toku ewolucji procesu metylacji, której wyjściowym zadaniem była ochrona genomu [56].

Proces metylacji katalizowany jest przez rodzinę metylotransferaz DNA (Dnmt, DNA *cytosine-5-methyltransferase*). Dotychczas zidentyfikowano kilka metylotransferaz DNA jak np. Dnmt1- odpowiedzialną za utrzymanie stanu metylacji, Dnmt3a i 3b – odpowiedzialne za metylacje *de novo* [57]. Wykryto również białko Dnmt3L, które jest homologiem enzymów Dnmt3a i 3b, jednak nie ma ono w procesie metylacji właściwości katalitycznych [58]. Izofорма metylotransferazy Dnmt1/o, specyficzna dla oocytu, nie jest konieczna dla ustanowienia matecznego imprintingu, ale jest niezbędna dla zachowania metylacji w napiętnowanych loci [59]. Wykazano, że brak metylotransferazy Dnmt1/o w oocytach powodował zamieranie większości płodów mysich podczas ich rozwoju [59].

Rolę imprintingu w czasie wzrostu oocytu doskonale udokumentowały badania z zakresu transplantacji jąder i klonowania, w których używano jąder komórek płciowych w różnych stadiach rozwoju [60]. W doświadczeniach tych wykazano, że potencjał rozwojowy oocytu jest zależny od fazy jego wzrostu, a piętnowanie geno-

mowe następuje podczas wzrostu [61]. Podczas badania możliwości rozwoju zarodków mysich powstałych w rezultacie transplantacji jąder pochodzących z oocytów o zróżnicowanej wielkości stwierdzono, że prawidłowy rozwój może nastąpić jedynie, wówczas gdy źródłem chromatyny matecznej jest oocyt w pełni wyrośnięty, np. w przypadku myszy pobrany po 16. dniu życia. Natomiast użycie chromatyny z oocytów młodszych zwierząt prowadziło do zaburzeń w embriogenezie wskutek niepełnej modyfikacji epigenetycznej genomu oocytu oraz nie ukończonego procesu piętnowania matecznych genów [62].

W badaniach Lucifero i wsp. (2002) wykazano, że w nierosnących, małych oocytach nie występuje jeszcze metylacja, w rosnących oocytach średniej wielkości metylacja alleli ma charakter mozaikowy, natomiast imprinting jest kompletny dopiero w dojrzałych oocytach, w stadium metafazy II. Imprinting genów matecznych rozpoczyna się w okresie pourodzeniowym, stosunkowo późno w procesie oogenezy, bo dopiero w stadium diplotenu pierwszego podziału mejotycznego. Natomiast imprinting genów ojcowskich, jak wykazano na przykładzie genu H19, zostaje zainicjowany stosunkowo wcześniej w procesie spermatogenezy, już w diploidalnych, prenatalnych gonocytach, na długo przed zapoczątkowaniem mejozy, a zakończony jest przed osiągnięciem stadium pachytenu, już po urodzeniu [47]. W oocytach w stadium metafazy II stwierdzono całkowitą metylację DMRs (*differentially methylated regions*) genów Snrpn, Igf2r, Peg3, natomiast brak metylacji tych genów w dojrzałych plemnikach [47].

Po zapłodnieniu część genów ulega demetylacji [48], jednak loci napiętnowane w trakcie rozwoju przedimplantacyjnego zachowują charakterystyczny dla nich wzór metylacji [63]. Wzór ten zachowany jest również w trakcie metylacji *de novo*, która rozpoczyna się w węzle zarodkowym blastocysty przy udziale metylaz *de novo*: Dnmt3a i 3b [64]. Wczesna metylacja *de novo* jest konieczna dla prawidłowego rozwoju płodu. Zarodek, u którego eksperymentalnie zablokowano aktywność metylotransferaz Dnmt3a i b cechują anomalia wszystkich linii komórkowych [64].

Podlegające piętnowaniu geny ssaków uczestniczą w regulacji wzrostu i rozwoju płodu, w rozwoju i funkcjonowaniu błon płodowych, a także wpływają na zachowanie osobnika po urodzeniu [65]. Większość genów pochodzenia ojcowskiego wspomaga wzrost płodu, natomiast przeważająca większość genów pochodzenia matczynego ma działanie przeciwne [49]. Przykładem jest gen Igf2r (*insulin-like growth factor 2 receptor*), którego produkt białkowy jest regulatorem wzrostu i rozwoju płodu. Myszy, które dziedziczą zmutowany, mateczny allel genu Igf2r padają bezpośrednio po urodzeniu. Dodatkowo obserwowano u nich zwiększoną średnio o 20-25% masę ciała, podwyższony poziom IGF2 we krwi oraz inne anomalia [66]. Analogiczny wzrost masy ciała zaobserwowano u płodów zwierząt domowych powstałych w wyniku klonowania lub pozaustrojowej produkcji zarodków, a zespół tego typu objawów określa się jako syndrom dużego potomstwa (LOS, *large offspring syndrome*). U owiec ze stwierdzonym zespołem LOS, wykazano brak ekspresji genu Igf2r oraz jego błędną metylację [67].

Kolejnym genem podlegającym imprintingowi, który odgrywa istotną rolę w rozwoju zarodka jest gen *Snrpn* (*small nuclear ribonucleoprotein N*). Mikrodelecja lub translokacja tego genu u ludzi następująca w obrębie chromosomu 15 (q11-q13) prowadzi do powstania zespołu Angelmana (AS) lub Pradera-Willego (PWS). W przypadku zespołu Pradera-Willego chromosom 15 pochodzi od ojca, podczas gdy w zespole Angelmana chromosom 15 pochodzi od matki [68]. Pomimo że przyczyną obu zespołów jest defekt tego samego genu to osoby z PWS charakteryzują się fenotypem całkowicie odmiennym od fenotypu AS. Odmiennie fenotypy obu zespołów wskazują na funkcjonalne, zależne od płci, zróżnicowanie rejonu 15q11-13 [45,68]. Różnice w metylacji DNA w obrębie tego regionu wykorzystywane są w diagnostyce wymienionych zespołów. Udokumentowano przypadki podwyższonego występowania zespołów AS i PWS u dzieci poczętych przy użyciu technik wspomaganego rozrodu (IVF i/lub ICSI), co skłania do poszukiwania zależności między stosowaniem tych technik a występowaniem błędów w nabywaniu prawidłowego imprintingu. W dotychczasowych badaniach potwierdzono, że stosowanie technik wspomaganego rozrodu niesie ryzyko wystąpienia takich błędów. Zainteresowanie problematyką imprintingu genomowego oraz epigenetycznego przeprogramowania szczególnie wzrosło w związku z dynamicznym rozwojem technik klonowania ssaków. Dotychczas nie wyjaśniono jeszcze czy przeniesienie wysoko zmetylowanego jądra komórki somatycznej do cytoplazmy wyenukleowanego oocytu jest główną przyczyną niskiej wydajności klonowania somatycznego. Rozważa się, czy oocyt jest zdolny do pełnego przemodelowania epigenetycznego jądra komórki somatycznej, które już jest zmetylowane [50].

4. Geny specyficzne dla uzyskania kompetencji rozwojowej oocytu

Przy wykorzystaniu techniki *knock-out* udało się zidentyfikować specyficzne geny, które uczestniczą w osiągnięciu kompetencji rozwojowej oocytu. Oprócz wcześniej opisanych genów *GDF-9*, *BMP-15*, *Cx37*, których defekty uniemożliwiają prawidłowy wzrost i dojrzewanie oocytu, należy wspomnieć również o genie *FIGa* odpowiedzialnym za formowanie pęcherzyka jajnikowego [69]. Rolę produktów genów *cdc25b*, *c-mos* i *formin-2* omówiono już wcześniej [1]. Specyficzne dla oocytu są również geny *Mater*, *Dnmt1* i *TCL1*. Ich transkrypcja i translacja odbywa się w trakcie oogenezy, natomiast aktywacja następuje dopiero w okresie rozwoju przedimplantacyjnego. Gen *Mater* umożliwia kontynuację podziału zygoty do stadium 2-komórkowego [70]. Wyłączenie genu *Dnmt1* skutkuje błędami w procesie imprintingu genomu [59], natomiast produkt genu *TCL1* umożliwia kompaktację moruli [71].

Odkrycie genów specyficznych dla oocytu, które uczestniczą w jego dojrzewaniu, a następnie w rozwoju zarodka ma znaczenie aplikacyjne, gdyż produkty tych genów mogą służyć jako markery jakości oocytu.

5. Podsumowanie

Dynamiczny rozwój biotechnologii rozrodu, który nastąpił w ostatnich 20. latach ubiegłego stulecia, zaowocował m.in. opracowaniem metod pozwalających na lepsze wykorzystanie potencjału rozrodczego samicy. Wynika ono ze stosowania w rozrodzie zwierząt takich metod biotechnologicznych jak: przenoszenie zarodków, seksowanie nasienia lub zarodków, klonowanie zarodkowe i somatyczne czy otrzymywanie zwierząt transgenicznych. W związku z tym powstało znaczne zapotrzebowanie na gamety żeńskie oraz zarodki, zarówno dla celów hodowlanych jak i doświadczalnych. Prawidłowo dojrzały oocyt musi osiągnąć dojrzałość jądrową, cytoplazmatyczną i genomową. Szczegółowe poznanie mechanizmów kierujących osiągnięciem wszystkich aspektów dojrzałości pozwoliłoby na optymalizację warunków hodowli *in vitro* tak, aby oocyty dojrzewające *in vitro* nie odbiegały jakością od oocytów dojrzewających *in vivo*. Aby to osiągnąć potrzebna jest jednak lepsza znajomość mechanizmów biologii molekularnej oocytów i zarodków.

Praca wykonana w ramach zamawianego projektu badawczego PBZ-KBN-084/PO6/4.4

Literatura:

1. Opiela J., Kątska-Książkiewicz L., (2004), *Biotechnologia*, 3, 140-151.
2. Eppig J. J., Hosoe M., O'Brien M. J., Pendola F. M., Requena A., Watanabe S., (2000), *Mol. Cell Endocrinol.*, 163, 109-116.
3. Cecconi S., (2002), *J. Reprod. Dev.*, 48, 431-445.
4. Cognie Y., Benoit F., Poulin N., Khatir H., Driancourt M. A., (1998), *J. Reprod. Fertil.*, 112, 379-386.
5. Moor R. M., Dai Y., Lee C., Fulka J. Jr., (1998), *Hum. Reprod. Update*, 4, 223-236.
6. Trounson A., Anderiesz C., Jones G., (2001), *Reproduction*, 121, 51-75.
7. Kastrop P. M. M., Bevers M. M., Destree O. H. J., Kruij T. A., (1991), *Mol. Reprod. Dev.*, 29, 271-275.
8. Motlik J., Kubelka M., (1990), *Mol. Reprod. Dev.*, 27, 366-375.
9. Tomek W., Melo Sterza F. A., Kubelka M., Wollenhaupt K., Torner H., Anger M., Kanitz W., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1274-1282.
10. Smiljakovic T., Melo Sterza F., Kubelka M., Vohnikova Z., Tomek W., (2003), *Biotech Anim. Husbandry*, 19, 1-8.
11. Curtis D., Lehmann R., Zamore P. D., (1996), *Cell*, 81, 171-178.
12. Brevini-Gandolfi T., Favetta L. A., Mauri L., Luciano A. M., Cillo F., Gandolfi F., (1999), *Mol. Reprod. Dev.*, 52, 427-433.
13. Shim C., Lee S. G., Song W. K., Lee C. S., Lee K. K., Kim K., (1997), *Mol. Reprod. Dev.*, 48, 185-193.
14. Hershey W. B., (1991), *Annu. Rev. Biochem.*, 60, 717-755.
15. Pyronnet S., Sonenberg N., (2001), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11, 13-18.
16. Sonenberg N., Gingas A. C., (1998), *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10, 268-275.
17. Melo Sterza F., Vonikova Z., Leiding C., Kanitz W., Kubelka M., Tomek W., (2003), *Proc. 19th Meeting of European Embryo Transfer Association*, 190, Rostock, Germany.
18. Matzuk M. M., Burns K. H., Viveiros M. M., Eppig J. J., (2002), *Science*, 21, 2178-2180.
19. Yamazaki Y., Wakayama T., Yanagimachi R., (2001), *Zygote*, 9, 277-282.
20. Albertini D. F., Combelles C. M. H., Benecchi E., Carabatsos M. J., (2001), *Reproduction*, 121, 647-653.

21. Kidder G. M., Mhawi A. A., (2002), *Reproduction*, 123, 613-620.
22. Sohl G., Willecke K., (2003), *Cell Commun. Adhes.*, 173-180.
23. Nuttinck F., Peynot N., Humblot P., Massip A., Dessy F., Flechon J. E., (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 57, 60-66.
24. Carabatsos M. J., Sellitto C., Goodenough D. A., Albertini D. F., (2000), *Dev. Biol.*, 226, 167-179.
25. Carabatsos M. J., Elvin J., Matzuk M. M., Albertini D. F., (1998), *Dev. Biol.*, 204, 373-384.
26. Yoshida H., Takakura N., Kataoka H., Kunisada T., Okamura H., Nishikawa S-I., (1997), *Dev. Biol.*, 184, 122-137.
27. Bodensteiner K. J., Clay C. M., Moeller C. L., Sawyer H. R., (1999), *Biol. Reprod.*, 60, 381-386.
28. Mermillod P., Oussaid B., Cognie Y., (1999), *J. Reprod. Fert. Supp.*, 54, 449-460.
29. Dube J. L., Wang P., Elvin J., Lyons K. M., Celeste A. J., Matzuk M. M., (1998), *Mol. Endocrinol.*, 12, 1809-1817.
30. Smith P., O W.S., Corrigan K. A., Smith T., Lundy T., Davis G. H., McNatty K. P., (1997), *Biol. Reprod.*, 57, 1183-1192.
31. Davis G. H., McEwan J. C., Fennessy P. F., Dodds K. D., McNatty K. P., (1992), *Biol. Reprod.*, 46, 636-640.
32. Braw-Tal R., McNatty K. P., Smith P., Heath D. A., Hudson N. L., Philips D. J., McLeod B. J., Davis G. H., (1993), *Biol. Reprod.*, 49, 895-907.
33. Yan C., Wang P., DeMayo J., DeMayo F. J., Elvin J. A., Carino C., Prasad S. V., Skinner S. S., Dunbar B. S., Dube J. L., Celeste A. J., Matzuk M., (2001), *Mol. Endocrinol.*, 15, 854-866.
34. Santella L., de Riso L., Gagnaniello G., Kyojuka K., (1999), *Exp. Cell Res.*, 248, 567-574.
35. Boni R., Cuomo A., Tosti E., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 839-842.
36. Cheung A., Swann K., Carrol J., (2000), *Hum. Reprod.*, 15, 1389-1395.
37. Ozil J. P., Huneau D., (2001), *Development*, 128, 917-928.
38. Wassarman M., (1988), *The mammalian ovum*, Eds. Knobil E., Neil J. D., 69-102, Raven Press, New York.
39. Tian W. N., Braunstein L. D., Pang J., Stuhlmeier K. M., Xi Q. C., Tian X., Stanton R. C., (1998), *J. Biol. Chem.*, 273, 10609-10617.
40. Rodriguez-González E., López-Béjar M., Velilla E., Paramio M. T., (2002), *Theriogenology*, 57, 1397-1409.
41. Alm H., Torner H., (2003), *Proc. 19th Meeting of European Embryo Transfer Association*, 132, Rostock, Germany.
42. Roca J., Martinez E., Vázquez J. M., Lucas X., (1998), *Reprod. Fert. Dev.*, 10, 479-485.
43. Ponderato N., Lagutina I., Crotti G., Turini P., Galli C., Lazzari G., (2001), *Mol. Reprod. Dev.*, 60, 579-585.
44. Nogueira D., Cortvrindr R., de Matos D. G., Vanhoutte L., Smitz J., (2003), *Biol. Reprod.*, 69, 2045-2052.
45. Lucifero D., Chaillet J. R., Trasler J. M., (2004), *Hum. Reprod Update*, 10, 3-18.
46. Lee J., Inoue K., Ono R., Ogonuki N., Kohda T., Kaneko-Ishino T., Ogura A., Ishino F., (2002), *Development*, 129, 1807-1817.
47. Lucifero D., Mertineit C., Clarke H. J., Bestor T. H., Trasler J. M., (2002), *Genomics*, 79, 530-538.
48. Santos F., Hendrich B., Reik W., Dean W., (2002), *Dev. Biol.*, 241, 172-182.
49. Reik W., Santos F., Dean W., (2003), *Theriogenology*, 59, 21-32.
50. Reik W., Walter J., (2001), *Nat. Rev. Genet.*, 2, 21-32.
51. Ferguson-Smith A. C., Surani M. A., (2001), *Science*, 293, 1086-1089.
52. Gregory R. I., Randall T. E., Johnson C. A., Khosla S., Hatada I., O'Neill L. P., Turner B. M., Feil R., (2001), *Mol. Cell Biol.*, 21, 5426-5436.
53. Bird A. P., Wolffe A. P., (1999), *Cell*, 99, 451-454.
54. Drewell R. A., Goddard C. J., Thomas J. O., Surani M. A., (2002), *Nucleic Acids Res.*, 30, 1139-1144.
55. Yoder J. A., Walsh C. P., Bestor T. H., (1997), *Trends Genet.*, 13, 335-340.
56. Barlow D. P., (1993), *Science*, 260, 309-310.
57. Bestor T. H., (2000), *Hum. Mol. Genet.*, 9, 2395-2402.
58. Bourc'his D., Hu G-L., Lin C. S., Bollman B., Bestor T. H., (2001), *Science*, 294, 2536-2539.

59. Howell C. Y., Bestor T. H., Ding F., Latham K. E., Mertineit C., Trasler J. M., Chaillet J. R., (2001), *Cell*, 104, 829-838.
60. Kono T., Obata Y., Yoshimzu T., Nakahara T., Carroll J., (1996), *Nat. Genet.*, 13, 91-94.
61. Obata Y., Kaneko-Ishino T., Koide T., Takai Y., Ueda T., Domeki I., Shiroishi T., Ishido F., Kono T., (1998), *Development*, 125, 1553-1560.
62. Bao S., Obata Y., Carroll J., Domeki I., Kono T., (2000), *Biol. Reprod.*, 62, 616-621.
63. Olek A., Walter J., (1997), *Nat. Genet.*, 17, 275-276.
64. Okano M., Bell D. W., Haber D. A., Li E., (1999), *Cell*, 99, 247-257.
65. Isles A. R., Wilkinson L. S., (2000), *Trends Cogn. Sci.*, 4, 309-318.
66. Lau M. M., Stewart C. E., Liu Z., Bhatt H., Rotwein P., Stewart C. L., (1994), *Genes Dev.*, 8, 2953-2963.
67. Young L. E., Fernandes K., McEvoy T. G., Butterwith S. C., Gutierrez C. G., Carolan C., Broadbent P. J., Robinson J. J., Wilmot I., Sinclair K. D., (2001), *Nat. Genet.*, 27, 153-154.
68. Buiting K., Gross S., Lich C., Gillessen-Kaesbach G., el-Maarri O., Horsthemke B., (2003), *Am. J. Hum. Genet.*, 72, 571-577.
69. Soyal S. M., Amleh A., Dean J., (2000), *Development*, 127, 4645-4654.
70. Tong Z-B., Gold L., Pfeifer K. E., Dorward H., Lee E., Bondy C. A., Dean J., Nelson L. M., (2000), *Nat. Genet.*, 26, 267-268.
71. Narducci M. G., Fiorenza M. T., Kang S. M., Bevilacqua A., Di Giacomo M., Remotti D., Picchio M. C., Fidanza V., Cooper M. D., Croce C. M., Mangia F., Russo G., (2002), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99, 11712-11717.