



Biochemiczne, molekularne i biofizyczne uwarunkowania dojrzewania i aktywacji oocytów świni w aspekcie zapłodnienia oraz klonowania somatycznego

Marcin Samiec

Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, Balice k. Krakowa

Maturation and activation of porcine oocytes in the aspect of fertilization and somatic cell cloning – biochemical, molecular and biophysical determinants

Summary

The commonly used source of nuclear recipient cells in the somatic cell cloning of pigs are *in vivo*-matured (ovulated) or *in vitro*-matured oocytes, reversibly blocked at the second metaphase (MII) stage. One of the most important factors that significantly affect the developmental competences of porcine cloned embryos is the artificial activation of oocytes reconstructed with somatic cell nuclei. The ability of an artificial stimulus to activate MII-stage oocytes and to initiate embryo development is essential for successful cloning by somatic cell nuclear transfer. This ability is especially important for species such as the pig where relatively little is known about early embryonic development and where *in vitro* handling procedures have not been optimized. An optimal time frame to activate gilt or sow oocytes may depend on both the time required for completion of nuclear-cytoplasmic maturation and the time by which aging process of mature oocytes starts. Cytoplasmic maturation is likely to include changes in the properties, size, and density of cytoplasmic Ca^{2+} release channels necessary for the oocyte to elicit an increase in intracellular Ca^{2+} concentration in response to the activating stimuli and subsequent development. Activation of oocytes, which has been induced either during fertilization or by artificial agents during the cloning procedure, evokes the cytosolic calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) oscillations or single $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transients. Despite the uncertainty of how the initial rises in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ are prompted, it is widely accepted that physiological or artificial activation stimulates the phosphoinositide pathway, with

Adres do korespondencji

Marcin Samiec,
Dział Biotechnologii
Rozrodu Zwierząt,
Instytut Zootechniki –
Państwowy Instytut
Badawczy,
32-083 Balice k. Krakowa;
e-mail:
msamiec@izoo.krakow.pl

biotechnologia

3 (86) 59–84 2009

the generation of *myo*-inositol-1,4,5-*trisphosphate* (InsP₃) by the enzymatic action of phospholipase C (PLC), and the subsequent release of calcium cations from endoplasmic reticulum. Further investigation into the role of PLC isoforms as the triggers of [Ca²⁺]_i increases has led to the recent identification of a sperm-specific PLC (PLC-ξ) as the putative sperm-derived oocyte activating factor. It is known that InsP₃-mediated calcium signaling pathway is responsible for downregulation of maturation-promoting factor (MPF), which contributes to such events during oocyte activation as resumption and termination of meiosis, extrusion of the second polar body, pronuclear formation, transition from meiotic to mitotic control of cell cycle and initiation of embryonic cleavage.

Key words:

pig, somatic cell cloning, reconstructed oocyte, meiotic maturation, artificial activation, MPF, CSF, MAPK, Ca²⁺ ion, PLC, PIP₂, InsP₃, ryanodin receptor, calcium-release channel.

1. Wstęp

Podstawowym celem pracy było dokonanie szczegółowego przeglądu literatury (z uwzględnieniem badań własnych) z zakresu biochemicznych, molekularnych i biofizycznych uwarunkowań procesu aktywacji oocytów świni. W pracy scharakteryzowane zostały dokładnie poszczególne etapy aktywacji oocytów w warunkach fizjologicznych (w procesie zapłodnienia) lub w warunkach embriologii eksperymentalnej (w klonowaniu somatycznym). Istotną częścią pracy poświęconą została określeniu wpływu dojrzewania meiotycznego na aktywację oocytów oraz wykazaniu ścisłych zależności pomiędzy tymi dwoma procesami. Wyszczególnione zostały również mechanizmy i czynniki regulatorowe procesów dojrzewania jądrowo-cytoplazmatycznego oraz aktywacji oocytów. Ponadto, zwrócona została uwaga na znaczenie różnic i podobieństw w profilu przyrostu stężenia jonów wapnia w ooplazmie, jakie występują pomiędzy naturalną aktywacją oocytów świni, a sztuczną aktywacją zrekonstruowanych oocytów w klonowaniu somatycznym z wykorzystaniem rozmaitych czynników aktywujących (fizycznych lub chemicznych). Dlatego też uwzględnione zostały bieżące opinie na temat optymalnej metody (optymalnych metod) sztucznej aktywacji oocytów w klonowaniu świń. Nie bez znaczenia pozostaje także wyodrębnienie zasadniczych różnic w procesach dojrzewania i aktywacji pomiędzy oocytami owulowanymi a oocytami poddanymi hodowli *in vitro*.

2. Molekularne podłoże strukturalno-funkcjonalnych zmian zachodzących podczas dojrzewania mejotycznego i aktywacji oocytów-biorców jąder komórek somatycznych w klonowaniu świń

2.1. Czynniki warunkujące proces dojrzewania mejotycznego oocytów w warunkach wewnątrz- i pozaustrojowych

W procedurze klonowania somatycznego świń powszechnie wykorzystywane źródło biorców egzogennych jąder komórkowych stanowią dojrzałe *in vivo* oocyty. Są one pozyskiwane z jajowodów stymulowanych hormonalnie samic-dawczyń (1,2). Kolejnym źródłem komórek-biorców są oocyty pozyskiwane poubojowo z jajników loch lub loszek. Takie oocyty osiągają dojrzałość mejotyczną (jądrową) i cytoplazmatyczną, a także epigenomową w warunkach *in vitro* (3,4). Charakterystyczną cechą dojrzałych oocytów jest przejściowe zatrzymanie się cyklu komórkowego w metafazie drugiego podziału mejotycznego (MII).

Morfologiczna i biochemiczna kondycja zarodków klonalnych świń, a w konsekwencji ich zdolności rozwojowe, w znacznym stopniu uwarunkowane są dobrą jakością oocytów wykorzystanych w procedurze klonowania, charakteryzującą się pełną synchronizacją dojrzałości jądrowej, cytoplazmatycznej i epigenomowej (2,3,5). Osiągnięcie stanu dojrzałości epigenomowej jest związane z uzyskaniem przez oocyt właściwego stopnia zaawansowania epigenetycznych modyfikacji kowalencyjnych DNA genomowego oraz białek histonowych rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. Modyfikacje te obejmują, odpowiednio metylację/demetylację reszt cytozyny DNA oraz deacetylację/acetylację reszt lizyny i argininy histonów H3 i H4. Epigenetyczne przemodelowanie konfiguracji przestrzennej oraz przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej chromatyny jądrowej dojrzałych mejotycznie oocytów jest również ściśle skoordynowane z zakończeniem procesów regulujących zjawisko rodzicielskiego piętna genomowego (tj. matczynego imprintingu gametycznego). Optymalny wzorzec dojrzałości jądrowo-cytoplazmatyczno-epigenomowej jest obserwowany w owulowanych oocytach, które osiągnęły kompetencję mejotyczną w pęcherzykach jajnikowych samic-dawczyń. Jednakże ze względów ekonomicznych częściej wykorzystywanym źródłem komórek-biorców są oocyty pozyskiwane do dojrzewania *in vitro* z jajników loszek i loch rzeźnych. Stosowane dotychczas metody pozaustrojowej hodowli niedojrzałych oocytów świni nie pozwalają na uzyskiwanie w pełni satysfakcjonującego odsetka oocytów wykazujących skoordynowaną dojrzałość jądrowo-cytoplazmatyczną (6,7). Poprawę efektywności dojrzewania mejotycznego *in vitro* osiągnięto po zastosowaniu dwustopniowych systemów hodowli oocytów (8,9). Pierwszy etap hodowli *in vitro* obejmuje inkubację niedojrzałych oocytów w pożywce uzupełnionej liofilizowanymi hormonami oraz odpowiednimi czynnikami odwracalnie blokującymi cykl mejotyczny w stadium diplotenu, tj. dyfuzyjnego diplotenu profazy podziału redukcyjnego, czyli w stadium pę-

cherzyka zarodkowego (GV, ang. *Germinal Vesicle*). Stosunkowo często stosowanymi suplementami hormonalnymi są: mieszanina gonadotropiny kosmówkowej wyekstrahowanej z surowicy krwi źrebnych klaczy (eCG/PMSG) i ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG), wyizolowanej z moczu ciężarnych kobiet lub ludzka gonadotropina menopauzalna (hMG), uzyskana z moczu kobiet w okresie klimakterium. Do powszechnie wykorzystywanych syntetycznych analogów endogennych związków hamujących I. podział mejotyczny oocytów należą: 1) inhibitory procesu rozpadu otoczki jądrowej pęcherzyka zarodkowego takie jak cykliczny dibutyryloadenozynomonofosforan (dwumaślan cAMP/db-cAMP) (5,10), jak również 2) specyficzne (selektywne) supresory aktywności kinaz cyklino-zależnych (CDKs) takie jak: izosteryczne inhibitory kompetycyjne serynowo-treoninowej kinazy białkowej p34^{cdc2}, np. enancjomery R lub S roskowityny (11-13) oraz butyrylolakton I (12,14,15). Innymi, stosunkowo często stosowanymi związkami biochemicznymi z klasy ektopowych antagonistów procesu wznowienia podziału mejotycznego są: 3) odwracalne represory syntezy białek (translacji), zapobiegające resyntezie cykliny B, podjednostki regulatorowej czynnika dojrzewania mejotycznego (MPF), takie jak cykloheksimid (CHXM) (14,16), a także 4) niespecyficzne supresory aktywności kinaz z rodziny CDK takie jak: inhibitor kompetycyjny (izosteryczny) kinazy białkowej czynnika MPF oraz kinazy aktywowanej przez mitogeny (MAPK), np. 6-dimetyloaminopuryna (6-DMAP) (12), lub 5) selektywne inhibitory izoenzymów 3. rodziny III. typu fosfodiesteraz cyklicznych nukleotydów (PDE-3), odpowiedzialnych za inaktywację cyklicznego 3',5'-adenozynomonofosforanu (cAMP) na drodze jego hydrolitycznego rozkładu do 5'-adenozynomonofosforanu (5'-AMP), np. milrinon (15). Procedura indukowanego wydłużania okresu blokowania podziału redukcyjnego oocytów w stadium diktiotenu pozwala na przyspieszenie tempa synchronizacji dojrzewania mejotycznego *ex vivo* w heterogennej populacji oocytów I. rzędu, pozyskanych z pęcherzyków jajnikowych loszek lub loch rzeźnych.

Drugi etap hodowli *in vitro* oocytów obejmuje ich inkubację w pożywce pozbawionej hormonów oraz egzogennych blokerów cyklu mejotycznego w stadium GV. Taka strategia sekwencyjnej hodowli umożliwi lepszą koordynację nabywania kompetencji mejotycznej przez oocyty, czyli zdolności do wznowienia i ukończenia mejozy. Efektem tego jest z kolei zmniejszenie stopnia asynchronii między dojrzałością jądrową, epigenomową i cytoplazmatyczną oocytów, których cykl komórkowy osiągnął stadium MII (2,4).

Rozpoczęcie dojrzewania mejotycznego wywołane jest wzrostem aktywności czynnika MPF, inicjującego fazę podziałową cyklu komórkowego. Czynnikiem ten należy do rodziny kinaz cyklino-zależnych (CDK) i jest heterodimerem złożonym z podjednostki katalitycznej, serynowo-treoninowej kinazy białkowej CDK1 (homologicznej z kinazą wyizolowaną z komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Schizosaccharomyces pombe* cdc2/CDC28) o masie cząsteczkowej 34 kDa, oraz z podjednostki regulacyjnej, cykliny B o masie molekularnej 56 kDa (17,18). Aktywny kompleks MPF (p34^{cdc2}/p56^{cdc13}) powoduje podwyższenie poziomu fosforylacji wielu białek pod-

czas przejścia z fazy G2 do M podziału mitotycznego komórek somatycznych oraz podczas wznowienia, zahamowanego w stadium diktiotenu, podziału mejotycznego oocytów. Dlatego też bezpośrednio lub pośrednio zapoczątkowuje, podstawowe dla cyklu komórkowego oocytu procesy, m.in. rozpad otoczki jądrowej/pęcherzyka zarodkowego (NEBD/GVBD), dyspersja komponentu włóknistego i ziarnistego jąderka w wyniku nukleololizy, utworzenie wrzeciona kariokinetycznego oraz kondensacja chromatyny. Do wielu substratów, na które oddziałuje heterodimerski kompleks białkowy kinazy p34^{cdc2} z cykliną B, należą m.in. histon H1 (którego ufosforylowana forma prawdopodobnie wymagana jest do kondensacji chromatyny), laminy (uczestniczące w biodestrukcji otoczki jądrowej), a także nukleolina (białko C23 potencjalnie zaangażowane w rozproszenie/rozmontowanie struktury jąderka) (19,20).

2.2. Procesy determinujące stan dojrzałości mejotycznej oocytów

Oocyty MII świni i innych gatunków ssaków z wyjątkiem myszy są komórkami acentriolarnymi, tzn. takimi, które w czasie dojrzewania mejotycznego utraciły centriole w wyniku ich ubikwitynizacji i proteasomowej degradacji w stadium anafazy I. Oocyty, które osiągnęły stan dojrzałości jądrowo-cytoplazmatycznej, zachowują jednak centra organizujące mikrotubule (MTOCs, ang. *Microtubule Organizing Centres*) w postaci niezdublikowanych w interkinezie mejotycznej centrosomów o acentriolarnej konformacji astrosfery. W pozbawionej fizjologicznie centriol cytoplazmie dojrzałych *in vivo* lub *in vitro* oocytów świni, pod wpływem bardzo wysokiej koncentracji MPF i stabilizującego go czynnika cytostatycznego (CSF, ang. *Cytostatic Factor*) nie występuje otoczka jądrowa, a żeńska chromatyna utrzymywana jest w postaci silnie skondensowanych chromosomów matecznych, ułożonych w biegunowo zlokalizowanej płycie metafazowej acentriolarnego wrzeciona II. podziału mejotycznego (21,22). W oocytach MII świni przestrzenną orientację biegunowego wrzeciona kariokinetycznego w cytoplazmie determinuje miejsce wyrzucenia I. ciała kierunkowego (I. ck) do przestrzeni okołozółtkowej. Płaszczyzna pozioma przebiegająca symetrycznie do długiej osi płytki metafazowej oocytu skierowana jest prostopadłe do wycinka powierzchni oolemy, do którego bezpośrednio przylega I. ck. Wrzeciono II. podziału mejotycznego znajduje się zatem tuż pod powierzchnią oolemy w tzw. podbłonowej strefie warstwy korykalnej oocytu świni. Kąt nachylenia I. ck w stosunku do płaszczyzny płytki metafazowej nie ulega zmianie przez około 3 godziny od momentu ukończenia procesu tzw. poronnej (szczątkowej) cytokinezy biegunowej, której efektem jest odcięcie ck od oolemy (23,24). W sytuacji fizjologicznej (zapłodnienie monospermiczne), czynnikiem, który odblokowuje nietrwale zahamowany w metafazie II. podział mejotyczny oocytu jest plemnik. Wnikając do ooplazmy, wprowadza on tam własne organelle komórkowe: jądro komórkowe, niezdublikowany centrosom pochodzenia ojcowskiego składający się z dwóch centriol siostrzanych (proksymalnej i dystalnej), oraz spiralę mitochondrialną (25,26).

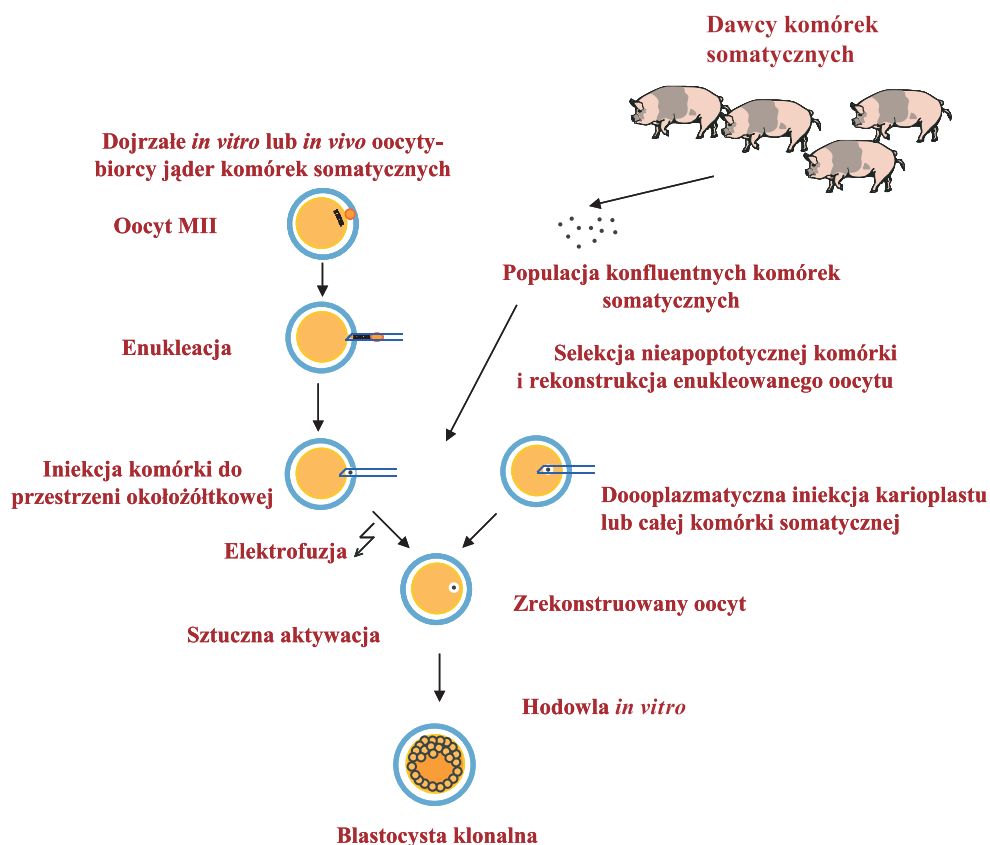
2.3. Molekularny scenariusz zmian biochemicznych i ultrastrukturalnych zachodzących w zrekonstruowanych oocytach MII przed sztuczną aktywacją

W procedurze klonowania, źródłem dawców jąder komórkowych, a także innych organelli takich jak mitochondria lub centrosomy są najczęściej hodowane *in vitro* komórki somatyczne, których cykl mitotyczny został sztucznie zsynchronizowany w fazach G0/G1 lub G2/M. Organelle komórek somatycznych są wprowadzane do środowiska cytoplazmatycznego enukleowanego oocytu, tj. ooplastu (cytoplastu), podczas zabiegu jego rekonstrukcji, czyli zastąpienia jego własnego genomu przez DNA genomowy i mitochondrialny komórek-dawców jąder. Rekonstrukcja enukleowanego oocytu, czyli utworzenie klonalnej hybrydy jądrowo-cytoplazmatycznej, określanej także cybrydową zygotą klonalną lub rekonstruowaną cybrydą klonalną może przebiegać albo na drodze niechirurgicznej, tzn. przy wykorzystaniu metody elektrofuzji kompleksów ooplast-komórka somatyczna, albo coraz częściej – na drodze mikrochirurgicznej, tzn. docytoplazmatycznej mikroiniekcji karioplastów lub całych komórek somatycznych (rys. 1). W przypadku komórek w fazach G0/G1 mitozy, do ooplastów w stadium MII mejozy przenoszony jest genom jądrowy złożony z diploidalnej liczby chromosomów ($2n$) oraz z diploidalnej (niezreplikowanej) liczby cząsteczek DNA ($2C$) wraz z niezreplikowanymi mitochondriami i centrosomami o dicentriolarnej konfiguracji astrosfery. Natomiast w przypadku komórek w fazach G2/M mitozy, do cytoplastów MII przenoszone są: genom jądrowy charakteryzujący się diploidalną liczbą chromosomów ($2n$) oraz tetraploidalną (zreplikowaną) liczbą chromatyd/cząsteczek DNA ($4C$), a także zduplikowane mitochondria i diplosomy. Te ostatnie złożone są z dwóch siostrzanych centrosomów o tetracentriolarnej strukturze przestrzennej astrosfery. W pozbawionej centriol ooplazmie zrekonstruowanych oocytów MII świni, interfazowe jądra oraz dicentriolarne centrosomy lub tetracentriolarne diplosomy komórek somatycznych podlegają regulacyjnemu oddziaływaniu czynników białkowych kontrolujących przebieg cyklu mejozy (25,27). Do grupy najważniejszych białek ooplazmatycznych, które mają wpływ na strukturalne przemodelowanie chromatyny oraz centrów organizujących cytoskielet mikrotubularny komórek-dawców jąder (MTOCs) należą: czynnik dojrzewania mejozy (MPF), posiadający aktywność kinazy histonu H1 oraz czynnik cytotatyczny (CSF), którego aktywność jest uwarunkowana przez kaskadę enzymatyczną kinaz białkowych: $p39^{Mos}$ lub $p74^{Raf}/MEK/MAPK/p33^{CDK2}$ lub $p90^{rsk}$, aktywowanych za pośrednictwem mitogenów (C-MAPKs, ang. *Cascade of Mitogen-Activated Protein Kinases*) (28,29).

2.4. Molekularny scenariusz zmian biochemicznych i ultrastrukturalnych zachodzących w zrekonstruowanych oocytach MII po sztucznej aktywacji

Wznowienie cytofizjologicznie zablokowanej mejozy zrekonstruowanego oocytu MII uzyskuje się przez zastosowanie odpowiedniej procedury sztucznej aktywacji (fizycznej, chemicznej lub fizykochemicznej) (rys. 1).

Aktywacja oocytów, zarówno naturalna, spowodowana penetracją plemnika, jak i sztuczna, wywołana działaniem różnych bodźców fizykochemicznych, powoduje szybki spadek aktywności MPF oraz stopniowe obniżenie aktywności CSF. Umożliwia to następującą sekwencję zdarzeń: 1) rozejście się chromosomów potomnych (tj. chromatyd siostrzanych) do przeciwległych biegunów wrzeciona kariokinetycznego; 2) wyrzucenie II. ciała kierunkowego w następstwie tzw. poronnej cytokine-



Rys. 1. Schemat klonowania somatycznego świń metodą transplatacji jąder komórkowych. Sztuczna aktywacja oocytów zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych (tj. klonalnych hybryd jądro-cytoplazmatycznych) stanowi trzeci etap procedury klonowania.

zy biegunowej; 3a) podział gametogenicznego diplosomu złożonego z dwóch centrioli ojcowskich oraz z matczynego materiału acentriolarnego, czyli eliminację acentriolarniej astrosfery pochodzenia oocytarnego lub 3b) podział tetracentriolarnego diplosomu somatogenicznego, czyli redukcję liczby centrosomów somatycznych z dwóch dicentriolarnych struktur do jednej dwucentriolarniej astrosfery. W kolejnych etapach mają miejsce: 4) dekondensacja chromatyny oraz intensywne nukleogeneza (biogeneza jąderka) w telofazie i odtworzenie otoczki jądrowej, a w efekcie uformowanie jądra interfazowego (w przypadku zapłodnienia jest to utworzenie dwóch przedjądrzy zygoty: męskiego i żeńskiego) oraz 5) duplikacja centrosomu (biogeneza diplosomu) w okresie między późnym stadium G1 a inicjacją fazy S, a także 6) autoreplikacja genomu mitochondrialnego i proliferacja mitochondriów w stadium G2 interfazy (30,31). Pierwotnie zdekondensowana chromatyna jądrowa komórki somatycznej w stadium G0/G1 lub rzadziej G2 mitozy ulega zatem w ooplazmie zrekonstruowanego oocytu MII, o wysokiej koncentracji aktywnego czynnika MPF, gwałtownej rearanżacji w pseudomejotyczną płytkę metafazową w procesie przedwczesnej spiralizacji i kondensacji chromosomów (PCS oraz PCC, ang. *Premature Chromosome Spiralization/Condensation*). Następnie po egzogennej aktywacji zrekonstruowanego oocytu zespół przedwcześnie skondensowanych chromosomów pochodzenia somatycznego przybiera w wyniku redespiralizacji i dekondensacji *de novo* postać sferycznego pęcherzyka ograniczonego odtworzoną otoczką jądrową, a jego morfologia nie zmienia się istotnie aż do pierwszego podziału bruzdkowania, prócz tego, że jego objętość ulega zwiększeniu (NS, ang. *Nuclear Swelling*). Wewnątrz przemodelowanego w środowisku cytoplazmatycznym oocytu jądra komórki somatycznej mają jednak miejsce zmiany biochemiczne, polegające na syntezie (autoreplikacji) DNA. Jednym ze zjawisk zachodzących po aktywacji zrekonstruowanego oocytu, które są odpowiedzialne za przemiany strukturalno-funkcjonalne chromatyny jądrowej jest spadek aktywności czynnika cytostatycznego (25,32).

3. Biochemiczne, molekularne i biofizyczne uzależnienie fizjologicznej i sztucznej aktywacji oocytów świni od mechanizmu wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału wapniowego

3.1. Podstawowe elementy funkcjonalne szlaku transdukcji sygnału aktywującego oocyt

Czynnikiem decydującym w dużym stopniu o kompetencjach rozwojowych zarodków klonalnych świni oraz innych gatunków ssaków jest sztuczna aktywacja zrekonstruowanych oocytów (rys. 1). Brak skutecznych metod aktywacji oocytów w klonowaniu somatycznym świń dotychczas znacznie ograniczał potencjał rozwoju *in vitro* klonalnych zarodków, stąd poszukiwania nowych, alternatywnych

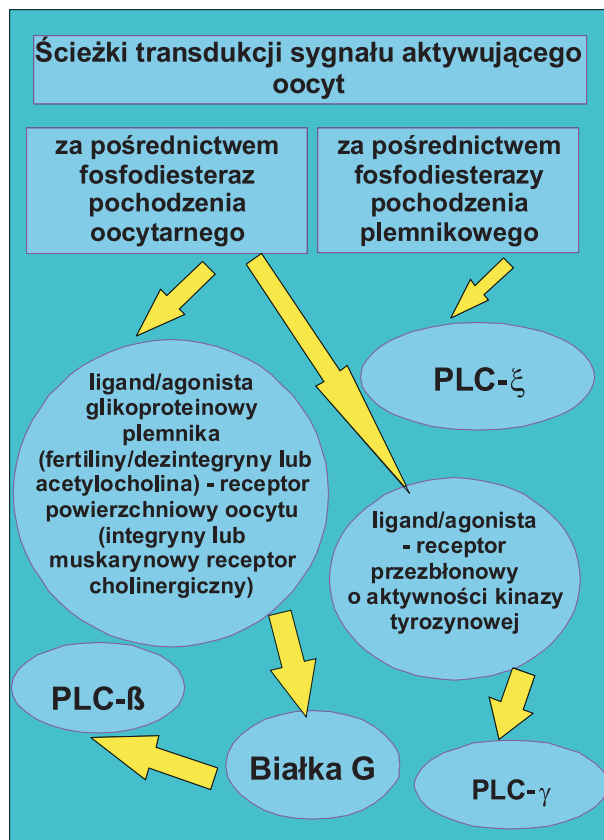
układów doświadczalnych, których istotą było wykorzystanie całkowicie odmiennych źródeł czynników aktywujących, albo modyfikacja parametrów fizykochemicznych procedur stosowanych powszechnie już wcześniej u innych gatunków zwierząt gospodarskich. Obecnie trwają intensywne badania nad opracowaniem takich systemów sztucznej aktywacji zygot klonalnych świni, których mechanizm oddziaływania naśladowałby niemal całkowicie lub przynajmniej w przeważającej części fizjologiczny wzorzec przyrostu wewnątrzkomórkowej koncentracji kationów wapnia $[Ca^{2+}]_i$, obserwowany podczas zapłodnienia oocytów świni. Do tej pory nie wyjaśniono jednoznacznie, jaki jest molekularny scenariusz sekwencji zdarzeń składających się na proces transdukcji egzogenego sygnału aktywującego, który wyzwała uwalnianie się jonów wapnia po wnikięciu plemnika do oocytu MII świni. Wyniki badań przeprowadzonych przez Sun'a i wsp. (33), Funahashi i wsp. (34) oraz Machaty i wsp. (35) wskazują, że plemnik spełnia rolę pierwotnego przekaźnika uczestniczącego w przetwarzaniu informacji I. rzędu, czyli sygnału aktywującego katabolizm fosfolipidów inozytolowych, który jest z kolei odpowiedzialny za mobilizację kaskady cyklicznych wahań cytozolowego stężenia kationów wapnia. Dlatego wiąże się on z jednej strony ze specyficznym receptorem położonym w warstwie zewnętrznej oolemy, ulegającym interakcji z tzw. łącznikowym białkiem G_p/G_q (p, ang. *phospholipid*) określanym także mianem białka stymulatorowego (G_s) dla cyklu reakcji hydrolitycznego rozkładu glicerofosfolipidów inozytolowych oraz dla syntezy wtórnych przekaźników sygnałowych (tzw. informatorów II. rzędu) z grupy cyklicznych nukleotydów, w tym cyklicznego 3',5'-adenozynomonofosforanu (cAMP). Białko $G_{S(p)}$ jest integralnym składnikiem oolemy sprzęgającym aktywny kompleks złożony z pierwszorzędowego czynnika sygnałowego, tj. liganda (agonisty) oraz z receptora powierzchniowego oocytu ze specyficznym efektorowym systemem enzymatycznym fosfodiesteraz oraz cyklaz adenylanowych. Czynnikiem sygnałowym stanowią zewnątrzkomórkowa glikoproteina błonowa plemnika z grupy fertilin (dezintegryn), zestryfikowana/N-acetylowa pochodna amin biogennych, np. lipotropowego neurotransmitera – acetylocholina (ACh, ang. *Acetylcholine*), bądź substancje acetylocholino-podobne (analogi ACh). Receptor powierzchniowy oolemy należy do rodziny integryn lub muskarynowych receptorów cholinergicznym mACHR (ang. *Muscarinic Acetylcholine Receptor*) [podtyp M_1]. Nie wyklucza się także interakcji plemnika z transbłonowym receptorem oocytu wykazującym aktywność kinazy tyrozynowej. Za pośrednictwem konformacyjnie (allosterycznie) zmodyfikowanego białka G_p/G_q , wiążącego nukleotyd guaninowy z grupy guanozyno-5'-trifosforanów (GTP, ang. *Guanosine-5'-Triphosphate*) lub kinazy tyrozynowej, funkcjonalnej jednostki receptora przezbłonowego położonej w części cytoplazmatycznej oolemy, odbywa się indukowanie aktywacji izoenzymów efektorowych z podklasy fosfodiesteraz – fosfolipazy/fosfoinozytydazy C (PLC, ang. *Phospholipase C*) typu β oraz γ przy udziale jonów Ca^{2+} (rys. 2) (36-39). Aktywne izoformy fosfolipazy C katalizują hydrolizę wiązania fosfodiesterowego łączącego grupę inozytolo-1,4-bisfosforanu z kwasem fosfatydowym w cząsteczce fosfoinozytydu, tj. fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosfora-

nu (PIP₂, ang. *Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate*) (rys. 3). Przyjmuje się, że zlokalizowany po wewnętrznej stronie oolemy glicerofosfolipid inozytolowy PIP₂, pełniący funkcję prekursora wtórnych przekazników wewnątrzkomórkowych, stanowi centralny element skupiający i przetwarzający sygnały aktywujące program rozwoju oocytu, dostarczane przez penetrujący oolemmę plemnik. Odbiór przez cząsteczki PIP₂ pierwotnych informacji sygnałowych, które są przekazywane z białek receptorowych oolemy pod wpływem bodźca aktywującego (ligandów plemnikowych), jest zatem możliwy przede wszystkim za pośrednictwem białek G_p/G_q (38,40,41).

Produktami lipolitycznego rozkładu fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu są dwa wtórne przekazniki (informatory II. rzędu): *myo*-inozytolo-1,4,5-trisfosforan (InsP₃, ang. *Myo-Inositol-1,4,5-Trisphosphate*) oraz 1,2-diacylglicerol (DAG, ang. *Diacylglycerol*) (rys. 3) oraz arachidonian, który może ulec konwersji do postaci cząsteczek biologicznych efektorów z rodziny prostaglandyn, leukotrienów i tromboksanów. Po fosfolizie PIP₂ hydrofilny, wtórny transmitter tego szlaku sygnałowego InsP₃ jest uwalniany do ooplazmy, a hydrofobowy DAG pozostaje w obrębie oolemy. Gwałtowny wzrost poziomu InsP₃, będącego agonistą specyficznych receptorów odpowiedzialnych za otwieranie kanałów uwalniania wapnia, indukuje kaskadę wyrzutów jonów Ca²⁺ z depozytów wewnątrzkomórkowych, zlokalizowanych w retikulum endoplazmatycznym gładkim (agranularnym; ER_{ag}) oocytu (42,43). Wykazano, że receptory InsP₃-zależnych kanałów wapniowych rodziny 1/typu I (InsP₃R-1, ang. *Myo-Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptor Type I*) są dominującą izoformą białek akceptorowych specyficznych dla 1,4,5-trisfosforanu *myo*-inozytolu (rys. 3), ulegającą ekspresji w błonach cystern i rurkowatych rozgałęzień siateczki śródplazmatycznej bezziańskiej oocytów świni, bydła i myszy (44-48). Mają one strukturę homotetramerów złożonych z czterech identycznych podjednostek białkowych (α_1 , α_2 , α_3 , α_4) o masie molekularnej 310 kDa. Każda podjednostka wiąże jedną cząsteczkę InsP₃ poprzez N-końcowy region (obdarzony dodatnim ładunkiem elektrycznym), bogaty w grupy aminoacylowe argininy i lizyny (49). Z kolei DAG w obecności jonów wapnia i fosfatydyloseryny aktywuje serynowo-treoninową kinazę białkową C (PKC, ang. *Protein Kinase C*) (rys. 3). Ponadto DAG radykalnie zwiększa powinowactwo PKC do jonów Ca²⁺, a wynikiem tego jest pełna aktywacja (wykorzystanie) cytofizjologicznych stężeń kationów wapnia.

3.2. Znaczenie aktywności biokatalitycznej fosfolipaz pochodzenia endogenego lub egzogenego w inicjowaniu różnych ścieżek przekazywania sygnału aktywującego oocyt

Na podstawie wyników prowadzonych ostatnio badań nad wyjaśnieniem mechanizmu transdukcji sygnału wapniowego w oocytach ssaków aktywowanych na drodze zapłodnienia *in vitro* udowodniono, że poza ścieżkami sygnalizacji jonowej in-



Rys. 2. Scenariusz udziału fosfodiesteraz oocyty i plemnika z podklasy fosfolipaz/fosfoinozytydazy typu C (PLC) w inicjacji przekazywania sygnału aktywującego komórkę jajową (szczegółowe objaśnienia w tekście).

dukowanymi za pośrednictwem fosfodiesteraz pochodzenia endogennego (wewnątrzocytarnego), tj. z udziałem izoenzymów podtypu β lub γ fosfolipaz z rodziny C (PLC- β lub PLC- γ) (37,50,51), istnieje również alternatywny system przekazywania sygnału wapniowego uruchamiany przez czynniki enzymatyczne pochodzenia egzogenego, tzn. plemnikowego (38,39,52-54). Stymulacja tej ostatniej ścieżki sygnalizacji jonowej w oocytach MII odbywa się na drodze reakcji hydrolitycznego rozkładu wiązań fosfodiesterowych w glicerofosfolipidach inozytowych oolemy. Jest ona katalizowana przez specyficzne izoformy ξ (zeta) fosfoinozytydazy rodziny/typu C (PLC- ξ), pochodzące z zewnątrzkomórkowych domen powierzchniowych, formowanych głównie przez białka glikoproteinowe błony komórkowej segmentu równikowego w obrębie czapeczki tylnej główki plemników (rys. 2 i 3). Cząsteczki enzymu PLC- ξ wprowadzane są zatem do wewnątrzkomórkowej, tj. cytozolowej, warstwy oolemy zapładnianego oocyty w następstwie fuzji błon plazmatycznych

gamety męskiej i żeńskiej (40,55,56). Na tej podstawie można wnioskować, że mikrośrodowisko cytoplazmatyczne lub cytoszkielet podbłonowej (subooplazmatycznej) strefy korykalnej zapłodnionej komórki jajowej są bogate w szereg rozpuszczalnych czynników białkowych wchłoniętych wraz z cytozolem i jądrem plemnika po fuzji błon plazmatycznych gamet lub nierozpuszczalnych, plemnikowych czynników podbłonowych (niecytozolowych), ulegających inkorporacji (internalizacji) do struktury membranoszkieletu oocytu.

Wysokie stężenie endogennych białek plemników w cytoplazmie lub mikrofilamentowym szkielecie błonowym zygot może znacznie ułatwiać strukturalne prze-modelowanie i epigenetyczne przeprogramowanie jąder komórek somatycznych w przedimplantacyjnych zarodkach klonalnych. Te specyficzne białka plemnikowe związane z nukleoplazmą lub materiałem wokółjądrowym (cytoplazmą perinuklearną), a także z cytoszkieletem podbłonowym wykazują zdolność do generowania wielokrotnych cykli opróżnień wewnątrzkomórkowych rezerwuarów wapniowych w oocytach. Wynurzanie się kolejnych fal przyrostu ooplazmatycznej koncentracji wolnych jonów wapnia stanowi końcowy etap molekularnego mechanizmu wtórnego przekazywania Ca^{2+} -zależnych sygnałów aktywujących genetycznie uwarunkowany program rozwoju zarodkowego (57,58). Do niedawna sądzono, że mobilizacja wewnątrzoocytarnych depozytów jonów Ca^{2+} , wywołana stymulacją $InsP_3$ -zależnych kanałów cyklicznie uwalniających wapń do cytozolu trwa, w zależności od gatunku ssaka, stosunkowo krótko, tj. od 2-3 do 3-4 godzin od momentu internalizacji plemnika do środowiska cytoplazmatycznego oocytu. Oscylacyjne wahania w stężeniu kationów wapniowych zanikają zatem stopniowo w całej objętości ooplazmy bezpośrednio przed lub w niedługim czasie po zainicjowaniu procesu formowania przedjądrzy żeńskich i męskich w okresie międzypodziałowym I. cyklu mitotycznego bruzdkowania zarodków (59,60). Wyniki ostatnich badań coraz częściej potwierdzają jednak, że falowy (pulsacyjny) charakter docytozolowych wyrzutów hiperkalcemicznych z cystern i kanalików siateczki śródplazmatycznej gładkiej jest utrzymywany przez cały I. cykl podziałowy zygoty aż do momentu rozpoczęcia okresu interfazowego przez zarodki myszy w stadium 2-blastomerowym. Oscylacje wapniowe trwające przez tak długi okres (od 12 do 24 godzin od momentu zapłodnienia komórki jajowej) mogą być wywoływane tylko i wyłącznie za pośrednictwem tzw. oscylogennych czynników białkowych wprowadzanych wraz z cytozolem perinuklearnym i kariolimfą jądrową lub cytoszkieletem podbłonowym plemnika do ooplazmy bądź membranoszkieletu oocytarnego. Białka te ulegają proteasomowej (zależnej od ubiquityny) degradacji dopiero po ukończeniu interfazy II. cyklu mitotycznego bruzdkowania zarodków (45,59,61-64).

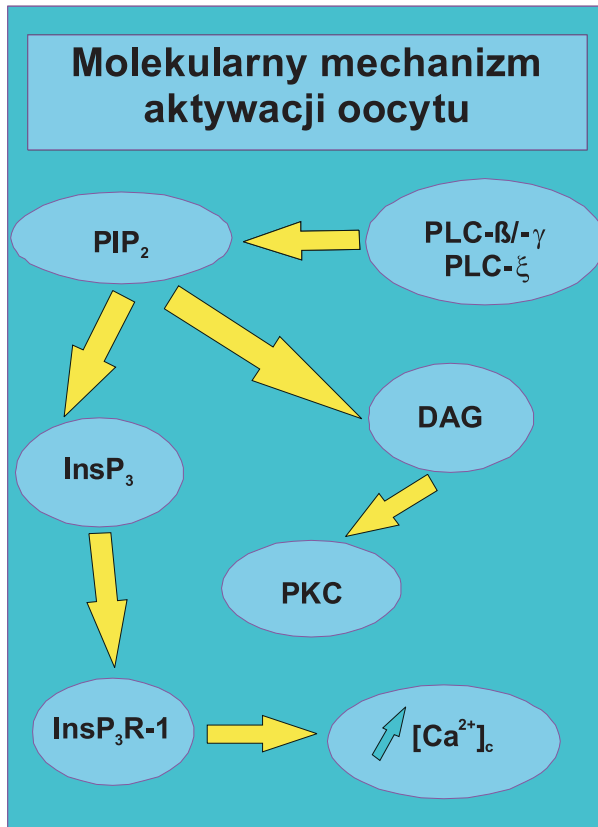
3.3. Plemnikowe białka cytozolowe lub podbłonowe w roli czynników oscylogennych

Potencjalnymi kandydatami do grupy tzw. transkomplementarnych, plemnikowych białek cytozolowych o wysokim stopniu rozpuszczalności, które biorą bezpośredni lub pośredni udział w generowaniu i biochemicznej regulacji długotrwałej kaskady wylewów jonów Ca^{2+} w cytoplazmie oocytów, a następnie zygot i komórek wczesnych zarodków 2-blastomerowych są m.in. 1) specyficzna dla komórek spermatogenicznych izoforma fosfolipazy C, tj. izoenzym PLC- ξ o masie molekularnej 74 kDa (40,53-56); 2) białko indukujące oscylacje kationów wapnia określane oscyliną lub oscyllogenem (o masie cząsteczkowej 33 kDa), wykazujące prawdopodobnie aktywność izomerazy lub deaminazy glukozaamino-6-fosforanowej (41,46,57, 65); 3) receptor powierzchniowy Kit, będący produktem ekspresji protoonkogenu *c-kit* o mimetycznej aktywności kinazy tyrozynowej receptorów transbłonowych oocytu (66) oraz 4) białko perinuklearne zwane też białkiem wokółjądrowej macierzy cytoplazmatycznej (58). Z kolei, do plemnikowych, nierozpuszczalnych białek podbłonowych (niecytozolowych), które kandydują do roli czynników oscylogennych w cyklicznych wahaniami falowych wewnątrzocytarnej koncentracji wolnych jonów Ca^{2+} , należą termostabilne izoformy czynnika białkowego izolowanego z macierzy podbłonowej (membranoszkieletu) segmentu równikowego główki plemnika o masie 30-120 kDa – SOAF (ang. *Sperm-Borne Oocyte-Activating Factor*) (52,58,67).

Dwukrotna mikroiniekcja odpowiednio zbuforowanych ksenogenicznych ekstraktów cytozolowych i nukleoplazmatycznych plemników knura do cytoplazmy rekonstruowanych oocytów była inicjowała w zygotach klonalnych serię wyrzutów jonów Ca^{2+} (tzw. oscylacje wapniowe), niemal idealnie naśladującą wzorzec fizjologicznej aktywacji obserwowanej w czasie zapłodnienia oocytów krowy lub jałówki (68). Pulsacyjny sposób uwalniania kationów wapniowych ze światła retikulum endoplazmatycznego, imitujący oscylacje wapniowe generowane w wyniku monospermicznego zapłodnienia *in vitro* oocytów MII, zidentyfikowano także w komórkach jajowych myszy i klaczy, poddanych docytoplazmatycznej iniekcji homogenatami cytozolo-kariolimfatycznymi, które wyizolowano z główek plemników ogiera (69). Zweryfikowanie tej procedury pseudofizjologicznej aktywacji transkomplementarnej (transcytozoloowej lub transnukleoplazmatycznej) rekonstruowanych oocytów w klonowaniu somatycznym świń pozostaje zapewne już tylko kwestią czasu, bowiem może się ona okazać przełomowym rozwiązaniem, znacznie zwiększającym efektywność sztucznej stymulacji programu rozwojowego cybrydowych zygot klonalnych.

3.4. Elementy regulatorowe szlaku transdukcji sygnału wapniowego w oocytach

Przyrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie $[Ca^{2+}]_c$ (rys. 3) jest podstawowym elementem mechanizmu transdukcji sygnału stymulującego dojrzale oocyt świni do wyjścia z nietrwałego bloku metafazowego II. podziału mejotycznego i uruchomienia programu rozwojowego prawidłowo, tj. monospermicznie, zapłodnionej komórki jajowej (zygoty) (33). Mobilizacja wewnątrzkomórkowych rezerwuarów wapniowych generuje serię powtarzalnych wyrzutów jonów Ca^{2+} , które przyjmują charakter szybkich, krótkotrwałych oscylacji o niskiej częstotliwości i wysokiej amplitudzie odchylenia od jonowej homeostazy stężeniowej w cytozolowej gospodarce kalcemicznej $h-[Ca^{2+}]_c$. Łączny czas trwania tych cyklicznych wahań



Rys. 3. Schemat szlaków transdukcji sygnału aktywującego w dojrzalym mejotycznie oocycie. Główne ogniwa mechanizmu aktywacji oocytu stanowią: fosfolipazy C podtypu β oraz γ (PLC-β/-γ) lub izoforma ξ fosfolipazy C (PLC-ξ); fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP₂); *myo*-inozytolo-1,4,5-trisfosforan (InsP₃); receptory InsP₃-zależnych kanałów wapniowych (InsP₃R); kationy wapnia; 1,2-diacylglicerol (DAG) oraz kinaza białkowa C (PKC) (szczegółowe objaśnienia w tekście).

w przyroście cytoplazmatycznej koncentracji jonów wapnia wynosi w oocytach świni około 2-3 godzin (35). Gwałtowne wynurzanie się kolejnych fal wylewów jonów Ca^{2+} następuje w oocytach świni, a także bydła co 8 do 25 minut (33,35,70). Pojedynczy oscylacyjny wyrzut kationów wapnia ma średnią amplitudę wychyleń od dynamicznej równowagi stężeniowej rzędu 500-556 nM $[\text{Ca}^{2+}]_c$ oraz średni okres trwania 2,5 minuty (35). Przypuszcza się, że czynnikiem wywołującym oscylacyjne zmiany stężenia jonów Ca^{2+} w ooplazmie są cykliczne wahania poziomu *myo*-inozytolo-1,4,5-*trisfosforanu*.

Precyzyjne dostrojenie parametrów fizycznych (częstotliwości, amplitudy i okresu trwania) oscylacji wapniowych do aktualnych wymagań fizjologicznych i biochemicznych oocytu świni wymaga istnienia swoistego, wewnątrzkomórkowego generatora kaskadowych fal wylewów kationów wapniowych. Mechanizm jego działania może być oparty na istnieniu dodatniego sprzężenia zwrotnego pomiędzy szybkością wypływu jonów wapnia z depozytów ER_{ag} a stężeniem wapnia w cytozolu (71). Początkowo sprzężenie to tłumaczono istnieniem kanałów wapniowych innego niż InsP_3 -zależnego rodzaju, tzw. rianodynowych (RyC, ang. *Ryanodin-Dependent Calcium Release Channel*), które otwierają się pod wpływem podwyższonej koncentracji wapnia w ooplazmie. Jednakże za odrzuceniem tej hipotezy przemawia fakt, że w oocytach ssaków poziom ekspresji genów kodujących receptory rianodyny (RyR, ang. *Ryanodin Receptor*) utrzymuje się na bardzo niskim poziomie (43,48). Poza tym stwierdzono, że receptory te są niezdolne do inicjowania oscylacyjnych wyrzutów jonów Ca^{2+} w oocytach świni, bydła oraz myszy (35,57,72). Bardziej wiarygodna jest, jak się wydaje hipoteza, w której zakłada się, że aktywność InsP_3 -zależnych kanałów wapniowych jest regulowana w oocytach świni przez koncentrację jonów wapnia w cytoplazmie (48). Pojedynczy kanał wapniowy może otworzyć się po przyłączeniu czterech cząsteczek InsP_3 oraz kationu wapniowego. W miarę wzrostu $[\text{Ca}^{2+}]_c$ spowodowanego wypływem wapnia z ER_{ag} coraz większa liczba kanałów ulega otwarciu i całkowity wylew jonów Ca^{2+} jest coraz szybszy. Gdy wewnątrzocytarne stężenie kationów wapnia wzrośnie powyżej pewnej wartości progowej, receptory InsP_3 -zależnych kanałów uwalniania wapnia typu I ($\text{InsP}_3\text{R-1}$) przyłączają drugi jon Ca^{2+} , co powoduje zamknięcie tunelów wypływu kationów wapnia (73,74). Taka swoista zależność wynikająca z uruchomienia mechanizmu progresywnego blokowania synergistycznego, czyli odwracania receptorem 1,4,5-*trisfosforanu myo*-inozytoli $\text{InsP}_3\text{R-1}$ może odpowiadać za generowanie oscylacyjnych fal wypływu wapnia o malejących w czasie parametrach: częstotliwości wynurzania się oraz amplitudy odchylenia od dynamicznej równowagi stężeniowej jonów Ca^{2+} (44,48,63,75). Redukcja wartości parametrów fizykochemicznych oscylacji wapniowych może być także zainicjowana wzrastającą w funkcji czasu aktywnością Ca^{2+} - i Mg^{2+} -zależnych ATPaz ER_{ag} oraz oolemy, a także selektywnych dla jonów Ca^{2+} transbłonowych nośników pochodzących z mitochondriów (tzw. uniporterów wapniowych). To z kolei prowadzi do spadku $[\text{Ca}^{2+}]_c$ przez pompowanie kationów wapnia z powrotem do rezerwuarów siateczki śródplazmatycznej, do środowiska zewnątrzkomór-

kowego oraz depozytów macierzy mitochondrialnej oocyty (49,71,76). Niewykluczone, że sztucznie aktywowane oocyty świni są zdolne również do aktywnego obniżania zawartości wapnia w cytozolu przez stymulację innego rodzaju pompy kationów wapniowych (prawdopodobnie wspomaganej udziałem kanałów potasowych zależnych od jonów Ca^{2+}). Mechanizm działania tego złożonego procesu obniżania stężenia $[\text{Ca}^{2+}]_c$, którego celem jest zachowanie jonowej homeostazy osmotycznej w ooplazmie, polega z jednej strony na przeciwprądowej wymianie jonów Na^+ na Ca^{2+} w oolemmie za pośrednictwem wymienniczy (antyporterów) jonowych $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Z drugiej strony, jest on odpowiedzialny za indukowanie biofizycznych i fizykochemicznych transformacji oocyty. Dotyczą one nie tylko generowania niewielkich zmian napięcia pola elektrostatycznego oraz nieznacznej różnicy w wartościach elektrochemicznego potencjału transmembranowego na obu przeciwległych powierzchniach oolemy, tj. zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej (cytozolowej), lecz także wywoływania zmian objętości komórki. Przypuszcza się także, że na inhibicję oscylacji wapniowych w oocytach może mieć znaczny wpływ przejściowy wzrost aktywności kinazy InsP_3 i fosfatazy InsP_3 , głównych enzymów odpowiedzialnych za obniżanie poziomu *myo*-inozytolo-1,4,5-*tris*fosforanu w cytozolu w sposób zależny od jonów Ca^{2+} (73,77).

Uważa się, że pulsacyjny sposób uwalniania jonów wapnia z depozytów wewnątrzkomórkowych jest konieczny dlatego, że podwyższony poziom kationów wapnia, utrzymujący się w ooplazmie przez dłuższy czas, jest dla oocyty toksyczny. Ogromna nadwrażliwość oocytów świni na gwałtowne zmiany metaboliczne w gospodarce wapniowej jest przyczyną niskiej tolerancji zygot klonalnych na wszelkie odchylenia od opisanego fizjologicznego schematu oscylacji jonów Ca^{2+} (27,78). Dlatego też, w klonowaniu somatycznym świń zaleca się stosowanie tylko takich procedur sztucznej aktywacji hybryd jądrowo-ooplazmatycznych, które spełniałyby warunki wymagane do prawidłowego uruchomienia programu rozwojowego zrekonstruowanych zarodków. Celem takich systemów egzogennej stymulacji zrekonstruowanych oocytów świni do dalszego rozwoju jest uniknięcie wszelkich zakłóceń dynamicznej homeostazy koncentracji kationów wapniowych w cytozolu $h\text{-}[\text{Ca}^{2+}]_c$ (tj. izokalcemii), wynikających zarówno z aplikacji zbyt słabych sygnałów aktywujących jak i sygnałów o zbyt wysokim stopniu inwazyjności parametrów fizykochemicznych, wielokrotnie przekraczającym możliwości adaptacyjne zygot klonalnych (23,48,79). Molekularny mechanizm optymalnego wzorca sztucznej aktywacji cybrydowych zygot klonalnych nie może zatem znacznie odbiegać od oscylacyjnego sposobu rozprzestrzeniania się falowych wyrzutów jonów Ca^{2+} w całej objętości cytozolu, ponieważ tylko w takich warunkach biofizycznych możliwe jest w miarę równomierne rozmieszczenie kationów wapnia w hybrydowym środowisku cytoplazmatycznym o wysokiej pojemności buforowej (24,80). Silnie buforujące właściwości ooplazmy rekonstruowanych oocytów świni stanowią wewnątrzkomórkowy mechanizm obronny zdolny do szybkiego przeciwstawiania się gwałtownym zmianom pH oraz punktu izoelektrycznego ooplazmy, a tym samym zjawisku ekscytotoksycz-

ności jonów wapniowych. W przypadku niehomogenego rozmieszczenia kationów wapnia w cytozolu hybrid klonalnych doprowadzają one do szybkiego zahamowania procesów aktywowanych przy udziale jonów Ca^{2+} (71,81). Być może tylko stała i niska częstotliwość oraz malejąca amplituda kolejnych wylewów kationów wapniowych prowadzące do krótkotrwałego przyrostu i wyrównanej koncentracji kationów wapnia we wszystkich przedziałach wewnątrzkomórkowych zrekonstruowanych oocytów świni są warunkiem koniecznym do prawidłowego przenoszenia efektów oddziaływania jonów Ca^{2+} za pośrednictwem białek wiążących wapń (49,78). Jednym z głównych białek receptorowych wapnia w oocytach ssaków jest kalmodulina. Kompleks Ca^{2+} -kalmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) jest czynnikiem niezbędnym do stymulacji aktywności enzymatycznej zależnej od jonów Ca^{2+} i kalmoduliny kinazy białkowej typu II (CaM-PK-II, ang. *Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II*). Przyпуска się, że oscylacje kationów wapnia stanowią sygnał przenoszony za pośrednictwem aktywnej kinazy CaM-PK-II, który indukuje przejściową inaktywację MPF oraz CSF (82), a następnie odblokowanie cytofizjologicznie zahamowanego w metafazie II. podziału mejotycznego, a tym samym skuteczne uruchomienie dalszego programu rozwojowego rekonstruowanego oocytu świni (83,84). Można zatem zaproponować hipotezę, że aktywacja kinazy CaM-PK-II prowadzi do inicjacji szlaku proteolitycznej degradacji cykliny B podczas przejścia z metafazy do anafazy II. podziału mejotycznego, która jest z kolei bezpośrednim lub pośrednim bodźcem do niezależnej od rozpadu czynnika MPF, molekularnej ścieżki stymulacji centrum katalitycznego konwencjonalnego izoenzymu kalpain, czyli neutralnych/obojętnych proteaz cysteinowych zależnych od jonów Ca^{2+} – kalpains II (m-CANP/m-CL, ang. *Calcium-Activated Neutral Protease/Calpain*) (85). Natywny proenzym (zymogen) izoformy m-CANP/m-CL tej rodziny cytozolowych proteaz tiolowych jest aktywowany na drodze autolitycznej na powierzchni wewnątrzkomórkowej, tj. cytoplazmatycznej oolemy w warunkach wysokiego (milimolarnego) stężenia wolnych kationów wapnia w cytozolu $\text{mM} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i$. Izoenzym m-CANP/m-CL tych endopeptydaz wewnątrzkomórkowych, zawierających w swoim centrum katalitycznym cysteinę i histydynę, odpowiedzialny jest za inaktywację czynnika CSF poprzez biodestrukcję jednego z jego podstawowych składników funkcjonalnych – kinazy p39^{Mos} w środowisku ooplazmatycznym aktywowanej cybrydy klonalnej (86,87). Aby jednak ścieżka biodegradacji cyklin B oraz zahamowania aktywności MPF została uruchomiona, musi dojść do aktywacji wielopodjednostkowego kompleksu białkowego ligazy ubikwitynowej określanego jako kompleks inicjujący anafazę lub cyklisom (APC/C, ang. *Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*) (85). Składniki APC/C to białka strukturalne, regulacyjne i enzymatyczne odpowiedzialne za połączenie z ubikwityną cykliny B lub innych białek, m.in. białek uniemożliwiających przedwczesny rozdział chromatyd siostrzanych w anafazowej segregacji chromosomów, czyli tzw. sekurny Pds1/Cut2 (ang. *Precocious Dissociation of Sister Chromatids 1/Cut Untimely Torn 2*), które mają ulec degradacji, oraz proteasom 26S, który jest bezpośrednio zaangażowany w rozpad ubikwitynowanej cykliny B (88).

3.5. Systemy sztucznej aktywacji rekonstruowanych oocytów świni w klonowaniu somatycznym

W klonowaniu somatycznym świń wykorzystywane są różne strategie aktywacji rekonstruowanych oocytów. Protokół sztucznej aktywacji dotyczy nie tylko rodzaju czynnika aktywującego (aktywatora), ale także momentu jego zastosowania. Czynniki aktywujące powoduje albo uwalnianie jonów wapnia bezpośrednio z depozytów wewnątrzooocytarnych, albo ich dokomórkowy transport ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Sztuczne aktywatory stymulują transbłonowe domeny receptorowe kinazy tyrozynowej lub cząsteczki receptorów powierzchniowych sprzężonych z białkami G. Białka te z kolei biorą udział w przekazywaniu i transformacji egzogenego (jonowego lub cząsteczkowego) sygnału aktywującego na kaskadę enzymatyczną, zapoczątkowaną przez fosfolipazę C podtypu γ lub β (27,36,37). Enzym ten katalizuje rozkład hydrolytyczny fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP_2), zakotwiczonego w wewnętrznej (cytoplazmatycznej) warstwie oolemy, do *myo*-inozytolo-1,4,5-trisfosforanu ($InsP_3$) oraz 1,2-diacylglicerolu (DAG). 1,4,5-trisfosforan *myo*-inozytolo jest wtórnym transmiterem aktywującego sygnału zewnątrzkomórkowego, odpowiedzialnym za otwarcie kanałów wapniowych poprzez $InsP_3$ -zależne receptory w błonach retikulum endoplazmatycznego gładkiego. Uwolnione kationy wapnia wiążą się preferencyjnie z kalmoduliną, która z kolei reguluje aktywność wielu enzymów m.in. fosfataz, kinaz białkowych A i C (PKA, PKC) czy zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny kinazy białkowej typu II (CaM-PK-II), a także zlokalizowanej w oolemmie ATPazy zależnej od Ca^{2+} -kalmoduliny i jonów Mg^{2+} (43-45,70).

W technologii klonowania somatycznego świń powszechnie stosowanymi bodźcami aktywującymi są czynniki fizyczne takie jak: impulsy elektryczne (impulsy prądu stałego) (1,89). Do tych rzadziej stosowanych należą natomiast czynniki chemiczne takie jak: antybiotyki jonoforowe np. jonomycyna wapnia (9,90) lub jonofor Ca^{2+} A23187, czyli kalcymycyna (91), a także timerosal (tiomersal) w kombinacji z ditionitrololem (92,93). Protokół równoczesnej fuzji i aktywacji, w którym te same impulsy elektryczne, jakie inicjują fuzję komórki somatycznej z bezjądrzastym cytoplasmem, stanowią czynnik aktywujący zrekonstruowane oocyty, jest najczęściej wykorzystywany do stymulacji programu rozwojowego cybryd klonalnych świń (9,89). Rzadziej do tego celu stosowany jest protokół postaktywacji, czyli aktywacji inicjowanej czynnikami chemicznymi (jonomycyna wapnia, kalcymycyna, timerosal i ditionitrolole) lub fizycznymi (impulsy prądu stałego) po 1-4 godzinach od wprowadzenia jądra komórkowego do cytoplazmy enukleowanego oocytu (1,8). Po ekspozycji na działanie właściwego aktywatora takiego jak antybiotyk jonoforowy lub impulsy elektryczne, zrekonstruowane oocyty poddawane są zazwyczaj kilkugodzinnej inkubacji w obecności niespecyficznego lub specyficznego inhibitora kompetycyjnego kinaz cyklino-zależnych np. 6-dimetyloaminopuryny (6-DMAP) (8-10,23) lub butyrylolaktonu I (23), bądź w obecności odwracalnego blokera syntezy białek np. cykloheksimidu (CHXM) (90,91).

Optymalnym wzorcem sztucznej aktywacji byłby wzorzec zbliżony do naturalnej aktywacji oocytu świni, inicjowanej przez penetrujący plemnik podczas zapłodnienia, który indukuje kaskadę procesów odpowiedzialnych za uwalnianie do ooplazmy wolnych jonów wapnia w postaci serii pulsacyjnych wyrzutów. Na obecnym etapie badań, wydaje się, że wymagania te spełniają jedynie takie aktywatory jak time-rosal w kombinacji z ditiotreitolem, jednakże tylko w odniesieniu do niektórych gatunków ssaków (świnia, mysz) (93,94).

3.5.1. Profil przyrostu stężenia wolnych jonów wapnia w ooplazmie przy zastosowaniu aktywacji fizycznej z użyciem impulsów elektrycznych

Aktywacja cybryd klonalnych metodą elektroporacji powoduje tymczasowe powstawanie mikroporów w oolemmie zrekonstruowanych oocytów, które umożliwiają bierny transport egzogennych kationów wapnia do komórki, napędzany tzw. dodatnim gradientem stężenia Ca^{2+} . Średnica i liczba tych porów zależy nie tylko od długości trwania impulsów prądu stałego, lecz także od ich liczby, odstępu czasowego między nimi oraz natężenia pola elektrostatycznego (60,95). Elektroaktywacja jest zatem możliwa tylko w warunkach znacznie wyższej koncentracji jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym, jakim jest roztwór izotonicznego dielektryku, w stosunku do cytozolowego poziomu stężenia kationów wapnia.

Wyższy potencjał rozwojowy zarodków klonalnych świni do stadium moruli oraz blastocysty uzyskano po zastosowaniu wielokrotnych impulsów elektrycznych z równoczesnym obniżeniem natężenia pola elektrostatycznego i skróceniem czasu trwania impulsów prądu stałego. Impulsy elektryczne były generowane w określonych przedziałach czasowych (od kilku- do 30-minutowych) dla naśladowania oscylacji wapniowych, występujących podczas zapłodnienia. Kombinacja wielokrotnych impulsów i niskiego natężenia pola elektrostatycznego może powodować mniejsze uszkodzenia oolemy cybryd klonalnych oraz nie indukować zjawiska ekscytotoksyczności kationów wapnia w ooplazmie w porównaniu z oddziaływaniem pojedynczego impulsu przy wysokim natężeniu pola elektrostatycznego (24,79). Mimo że pochodzenie jonów Ca^{2+} podczas aktywacji elektrycznej jest, jak się powszechnie uważa, zewnątrzkomórkowe, to sugeruje się, że elektroporacja może także stymulować uwalnianie wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych.

Aplikacja pojedynczych impulsów prądu stałego prowadzi tylko do jednorazowej mobilizacji wewnątrzocytarnych rezerwuarów wapniowych. Natomiast strategia multiplikacji impulsów elektrycznych pozwala na generowanie długiej serii oscylacyjnych wyrzutów Ca^{2+} , podwyższających wielokrotnie stężenie tych kationów w ooplazmie. Protokół oparty na zwielokrotnieniu impulsacji elektrycznej znacznie upodabnia sztuczną aktywację cybryd klonalnych świni do naturalnej aktywacji spowodowanej penetracją oocytu przez plemnik. Ekspozycja zrekonstruowanych oocytów na nagłe zmiany siły jonowej w roztworze dielektryku utrudnia dokładne zare-

jestrowanie częstotliwości oraz amplitudy falowych wyrzutów Ca^{2+} w ooplazmie. Nie ulega jednak wątpliwości, że oba wspomniane parametry fizyczne cyklicznych wyrzutów wapnia zależą od długości trwania impulsów prądu stałego, ich liczby, odstępu czasowego między nimi, natężenia pola elektrostatycznego, a nawet stężenia egzogennych jonów Ca^{2+} w roztworze do elektroaktywacji. Podstawowy poziom cytozolowej koncentracji wolnych kationów wapnia w oocytach waha się w granicach 20-60 nM/L, a po zmultiplikowanej elektroimpulsacji wzrasta do poziomu ok. 4 mM/L, zbliżonego do stężenia charakterystycznego dla oocytów w trakcie zapłodnienia (35,60,77). Jednakże z powodu wysokiej pojemności buforowej ooplazmy, dodatkowo zwiększonej w wyniku transplantacji jąder komórek somatycznych, gwałtownie podwyższona koncentracja jonów wapnia stopniowo obniża się i powraca do poziomu podstawowego jeszcze przed ukończeniem interfazy pierwszego cyklu podziałowego zarodków klonalnych.

3.5.2. Profil przyrostu stężenia wolnych jonów wapnia w ooplazmie przy zastosowaniu aktywacji chemicznej z użyciem jonomycyny wapnia

Inkubacja zrekonstruowanych oocytów świni w roztworze jonomycyny Ca^{2+} , która jest jedną z odmian jonoforu wapnia, generuje wydłużony logarytmiczny przyrost wewnątrzkomórkowej koncentracji kationów wapnia, co znacznie odróżnia tę strategię sztucznej aktywacji od fizjologicznego wzorca zmian stężenia wapnia w ooplazmie. W przypadku ekspozycji cybryd klonalnych na działanie jonomycyny wapnia, źródło jonów Ca^{2+} obecnych w ooplazmie jest prawdopodobnie zarówno pochodzenia zewnątrzkomórkowego, jak i endogennego. Jonomycyna jako antybiotyk jonoforowy, mający zdolność indukowania transportu biernego nośnikowego (dyfuzji ułatwionej) i swoistej wymiany kationów jednowartościowych ($\text{H}^+/\text{H}_3\text{O}^+$) oraz dwuwartościowych (Ca^{2+} i Mg^{2+}), w pierwszej kolejności mobilizuje wewnątrzocytarne depozyty wapniowe w cysternach retikulum endoplazmatycznego gładkiego. To z kolei na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego pobudza dyfuzję egzogennych kationów wapnia do ooplazmy zrekonstruowanych oocytów świni. Mechanizm stymulacji cybryd klonalnych do dalszego rozwoju polega zatem na indukowaniu dwufazowych zmian w ooplazmatycznej koncentracji jonów wapnia (27,79,96).

W porównaniu ze standardowymi systemami postaktywacji chemicznej stosowanymi powszechnie w klonowaniu somatycznym bydła (97), w których zaleca się około 5-minutową inkubację zrekonstruowanych oocytów w 5- μM roztworze jonomycyny, w klonowaniu świń podwyższenie koncentracji jonomycyny do 15 $\mu\text{M}/\text{L}$ przynosi znacznie lepsze wyniki. Wyrażają się one nie tylko zwiększeniem potencjału rozwojowego hodowanych *in vitro* zarodków klonalnych, lecz także poprawą jakości uzyskanych blastocyst (8,9,23). Prawdopodobnie przyrost koncentracji tego czynnika aktywującego z 5 $\mu\text{M}/\text{L}$ do 15 $\mu\text{M}/\text{L}$ indukuje już nie pojedynczą falę przy-

rostu jonów Ca^{2+} , lecz całą serię repetytywnych wyrzutów logarytmicznych kationów wapnia, przypominającą w większym stopniu fizjologiczny mechanizm uwalniania Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych. Naśladowanie procesu naturalnej aktywacji w warunkach trzykrotnego podwyższenia stężenia jonomycyny w pożywce hodowlanej spowodowane jest także gwałtownym wzbudzeniem wielokrotnych cykli opróżnień rezerwuarów wapniowych w zrekonstruowanych oocytach. Z jednej strony umożliwia to transdukcję dostatecznie silnego sygnału jonowego stymulującego szybkie uruchomienie programu rozwojowego cybryd klonalnych, a z drugiej zaś chroni cybrydową komórkę przed szkodliwymi efektami cytotoksycznymi, związanymi z utrzymującym się przez dłuższy czas wysokim poziomem wapnia w ooplazmie zrekonstruowanych oocytów (9,10,79,90).

3.5.3. Profil przyrostu stężenia wolnych jonów wapnia w ooplazmie przy zastosowaniu aktywacji chemicznej z użyciem timerosalu i ditiotreitolu

Czynnikiem aktywującym, który indukuje długą serię repetytywnych wyrzutów jonów Ca^{2+} o charakterze falowym w dojrzałych mejotycznie oocytach świni jest timerosal (etylortęciotiosalicylan sodu) określany również często tiomersalem według alternatywnej nomenklatury chemicznej. W przeciwieństwie do wszystkich innych bodźców fizykochemicznych, stymulujących tylko pojedynczy przyrost kationów wapnia w ooplazmie partenogenetycznie aktywowanych oocytów MII lub cybryd klonalnych, timerosal generuje oscylacyjne zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , najbardziej przypominające mechanizm aktywacji naturalnej, spowodowanej penetracją oocyty przez plemnik (92,98).

Timerosal jako czynnik utleniający grupy sulfhydryłowe (tiolowe) receptorów *myo*-inozytolo-1,4,5-trisfosforanu, stanowiących integralną część InsP_3 -zależnych kanałów wapniowych, jest zdolny do wielokrotnej mobilizacji wewnątrzkomórkowych depozytów kationów wapnia w zrekonstruowanych oocytach świni. Dziesięciminutowa inkubacja cybryd klonalnych w pożywce uzupełnionej 200 $\mu\text{M/L}$ timerosalu (92,93) okazała się najbardziej optymalną strategią aktywacji. Wynurzenie się pierwszej fali przyrostu jonów Ca^{2+} w ooplazmie następowało w ciągu 5,5 minut od chwili rozpoczęcia ekspozycji zrekonstruowanych oocytów na działanie timerosalu, a liczba pulsacyjnych wyrzutów wapnia wahała się od dwóch do sześciu. Pierwsza kaskadowa fala wylewu kationów wapnia do ooplazmy wykazywała największą amplitudę wychyleń od równowagi stężeniowej Ca^{2+} . Natomiast kolejne oscylacje wapniowe charakteryzowały się stopniowym obniżaniem się amplitudy i częstotliwości ich występowania. Po 30-45 minutach od rozpoczęcia aktywacji zrekonstruowanych oocytów świni obserwowano całkowity zanik oscylacji w ooplazmie.

Poza korzystnym efektem oddziaływania na cybrydy klonalne świni, timerosal wykazuje jednak niewielkie właściwości cytotoksyczne, gdyż utlenia również grupy tiolowe (-SH) tubuliny do mostków disulfidowych (disiarczkowych; -S-S-). Hamuje on

przez to polimeryzację mikrotubuli kinetochorowych i biegunowych oraz doprowadza do częściowej degradacji wrzeciona kariokinetycznego, a także pozostałych elementów cytoszkieletu mikrotubularnego zrekonstruowanych oocytów (m.in. centrów organizujących cytoplazmatyczną sieć mikrotubuli o konformacji dicentriolarnej astrosfery centrosomów lub tetracentriolarnej astrosfery diplosomów). Dlatego też w procedurach postaktywacji cybryd klonalnych zaleca się stosowanie timerosalu w kombinacji z ditiotreiolem (DTT; 2,3-dihydroksybutano-1,4-ditiolem), disulfhydrylowym związkiem redukującym mostki disiarczkowe (disulfidy) tubuliny oraz białek receptorowych specyficznych dla InsP_3 lub rianodyny, które odpowiedzialne są za cykliczne uwalnianie wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} z rezerwuarów ooplazmatycznych. Ze względu na antagonistyczne właściwości w stosunku do timerosalu, DTT jest zdolny do regeneracji ultrastruktury wrzeciona podziałowego oraz inhibicji oscylacji wapniowych w ooplazmie zrekonstruowanych oocytów świni (27,98).

4. Podsumowanie. Wpływ dojrzewania i sztucznej aktywacji oocytów na uruchomienie programu rozwojowego zarodków klonalnych świni

Sztuczna aktywacja zrekonstruowanych oocytów jest jednym z czynników, które w dużym stopniu decydują o pre- i postimplantacyjnych kompetencjach rozwojowych zarodków klonalnych świni. Różnice pomiędzy poszczególnymi protokołami sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów świni dotyczą zarówno rodzaju czynnika aktywującego, jak i właściwego momentu zastosowania określonego aktywatora (9,23). Optymalny przedział czasowy do zainicjowania aktywacji może zależeć zarówno od czasu wymaganego do uzyskania dojrzałości jądrowej i cytoplazmatycznej oocytów, jak i od czasu pojawienia się pierwszych symptomów starzenia się zrekonstruowanych hybryd jądrowo-ooplazmatycznych (4,7). Wydaje się, że szybsze tempo dojrzewania jądrowo-cytoplazmatycznego, a w konsekwencji wyższą kinetykę procesu starzenia się *in vitro* wykazują oocyty, które swoją kompetencję mejotyczną nabyły w warunkach *in vivo* w porównaniu do oocytów hodowanych *ex vivo*.

Strukturalno-funkcyjnym wyznacznikiem dojrzałości jądrowej oocytów w stadium MII jest stopień zaawansowania procesu wyrzucenia I. ciała kierunkowego do przestrzeni okołoołtkowej. Wyrzucenie I. ck pod osłonkę przejrzystą jest efektem tzw. szczątkowej (poronnej) lub biegunowej cytokinezy oocytu, która prowadzi do powstania obłonionej struktury komórkowej, zawierającej poronne wrzeciono kariokinetyczne oraz perikarion, czyli cienką warstwę ściśle przylegającej do zespołu silnie skondensowanych chromosomów tzw. resztkowej ooplazmy. Oocyty dojrzewające w warunkach pozaustrojowych charakteryzują się często obecnością częściowo (połowicznie) odcinającego się z podłonowej strefy korykalnej ooplazmy I. ck. Dlatego też efektywność sztucznej aktywacji cybryd klonalnych pochodzących z hodowanych *in vitro* oocytów jest zwykle niższa w porównaniu do oocytów dojrze-

wających *in vivo*. W tych ostatnich inicjacja i progresja procesu tzw. cytokinezy biegunowej w telofazie I. podziału mejotycznego przebiega bowiem znacznie szybciej niż w oocytach, które osiągnęły zdolność do wznowienia i ukończenia mejozy w warunkach *ex vivo* (23,25).

Jednym z głównych przejawów dojrzewania cytoplazmatycznego oocytów są prawdopodobnie zmiany właściwości, wielkości i gęstości ooplazmatycznych kanałów uwalniania wapnia (24). Można zatem przypuszczać, że przemiany te stanowią endogenny mechanizm preadaptacyjny oocytów świni do powstania takich warunków w cytozolu, jakie są bezwzględnie wymagane dla wywołania oscylacyjnych wyrzutów jonów Ca^{2+} o odpowiedniej amplitudzie i częstotliwości w odpowiedzi na zadziałanie bodźca indukującego aktywację. Wydaje się bowiem, że stosunek ilościowy kanałów wapniowych przypadający na określoną jednostkę powierzchni cyrstern i kanalików wewnątrzocytarnych rezerwuarów kationów wapnia, głównie siateczki śródplazmatycznej gładkiej, determinuje w dużym stopniu wielkość napięcia sygnałów jonowych pojawiających się w zrekonstruowanych oocytach świni wkrótce po egzogennej stymulacji ich programu rozwojowego. Liczba $InsP_3$ -zależnych kanałów uwalniania wapnia w zewnętrznej warstwie cytoplazmatycznej błon retikulum endoplazmatycznego agranularnego jest znacznie niższa w oocytach dojrziałych *in vitro* niż w oocytach dojrziałych *in vivo* (owulowanych). Dlatego też intensywność transdukcji wewnątrzkomórkowego sygnału wapniowego w następstwie aktywacji zrekonstruowanych oocytów, które nabyły kompetencję mejotyczną w pęcherzykach jajnikowych samic-dawczyń, utrzymuje się na istotnie wyższym poziomie niż w przypadku oocytów hodowanych *in vitro*. O osiągnięciu optymalnego stopnia dojrzałości cytoplazmatycznej oocytów przystosowanych biochemicznie i ultrastrukturalnie do sztucznej aktywacji decyduje też zagęszczenie ziaren korowych w określonej jednostce objętości cytozolu ($100 \mu m^3$), które jest niższe w oocytach dojrziałych *in vitro* niż w oocytach owulowanych, pozyskiwanych z jajowodów stymulowanych hormonalnie samic-dawczyń. Ta ostatnia właściwość oocytów-biorców jąder komórkowych zależy także od odpowiedniego przestrzennego rozmieszczenia sieci mikrofilamentów aktynowych cytoszkieletu i membranoszkieletu, niezbędnych do efektywnej egzocytozy ziaren korowych z warstwy korykalnej ooplazmy po ekspozycji cybrydy klonalnej na działanie określonego aktywatora. Zrekonstruowane oocyty świni spełniające wszystkie wspomniane warunki molekularnej i ultrastrukturalnej przydatności do procedury sztucznej aktywacji mogą posiadać wysokie kompetencje w zakresie przed- i poimplantacyjnego rozwoju zarodków klonalnych (5,24,90).

Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2009-2012 jako projekt badawczy własny nr N N311 315936.

Literatura

1. Onishi A., Iwamoto M., Akita T., Mikawa S., Takeda K., Awata T., Hanada H., Perry A. C. F., (2000), *Science*, 289, 1188-1190.
2. Lee G.-S., Hyun S.-H., Kim H.-S., Kim D.-Y., Lee S.-H., Lim J.-M., Lee E.-S., Kang S.-K., Lee B.-C., Hwang W.-S., (2003), *Theriogenology*, 59, 1949-1957.
3. Hyun S. H., Lee G. S., Kim D. Y., Kim H. S., Lee S. H., Kim S., Lee E. S., Lim J. M., Kang S. K., Lee B. C., Hwang W. S., (2003a), *Theriogenology*, 59, 1641-1649.
4. Hölker M., Petersen B., Hassel P., Kues W. A., Lemme E., Lucas-Hahn A., Niemann H., (2005), *Cloning Stem Cells*, 7, 35-44.
5. Miyoshi K., Rzucidło J., Pratt S. L., Stice S. L., (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 540-545.
6. Miyoshi K., Rzucidło S. J., Gibbons J. R., Arat S., Stice S. L., (2001), *BMC (BioMed Central) Dev. Biol.*, 1, 12-21.
7. Miyoshi K., Rzucidło S. J., Pratt S. L., Stice S. L., (2003), *Biol. Reprod.*, 68, 1079-1086.
8. Betthausen J., Forsberg E., Augenstein M., Childs L., Eilertsen K., Enos J., Forsythe T., Golueke P., Jurgella G., Koppang R., Lesmeister T., Mallon K., Mell G., Misica P., Pace M., Pfister-Genskow M., Strelchenko N., Voelker G., Watt S., Thompson S., Bishop M., (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18, 1055-1059.
9. Hyun S., Lee G., Kim D., Kim H., Lee S., Nam D., Jeong Y., Kim S., Yeom S., Kang S., Han J., Lee B., Hwang W., (2003b), *Biol. Reprod.*, 69, 1060-1068.
10. Boquest A. C., Grupen C. G., Harrison S. J., McIlpatrick S. M., Ashman R. J., d'Apice A. J. F., Nottle M. B., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1283-1287.
11. Coy P., Romar R., Ruiz S., Canovas S., Gadea J., Vazquez F. G., Matas C., (2005), *Reproduction*, 129, 747-755.
12. Le Beux G., Richard F. J., Sirard M. A., (2003), *Theriogenology*, 60, 1049-1058.
13. Romar R., Funahashi H., (2006), *Anim. Reprod. Sci.*, 92, 321-333.
14. Marques M. G., Nicacio A. C., de Oliveira V. P., Nascimento A. B., Caetano H. V., Mendes C. M., Melo M. R., Milazzotto M. P., Assumpção M. E., Visintin J. A., (2007), *Anim. Reprod. Sci.*, 97, 375-381.
15. Grupen C. G., Fung M., Armstrong D. T., (2006), *Reprod. Fertil. Dev.*, 18, 309-317.
16. Ye J., Campbell K. H., Craigon J., Luck M. R., (2005), *Biol. Reprod.*, 72, 399-406.
17. Gautier J., Minshull J., Lohka M., Glotzer M., Hunt T., Maller J. L., (1990), *Cell*, 60, 487-494.
18. Nurse P., Thuriaux P., (1980), *Genetics*, 96, 627-637.
19. Gautier J., Matsukawa T., Nurse P., Maller J. L., (1989), *Nature*, 339, 626-629.
20. Leal C. L., Liu L., (1998), *Anim. Reprod. Sci.*, 52, 51-61.
21. Kikuchi K., Naito K., Noguchi J., Kaneko H., Tojo H., (2002), *Cloning Stem Cells*, 4, 211-222.
22. Watanabe N., Hunt T., Ikawa Y., Sagata N., (1991), *Nature*, 352, 247-248.
23. Yin X. J., Tani T., Yonemura I., Kawakami M., Miyamoto K., Hasegawa R., Kato Y., Tsunoda Y., (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 442-446.
24. Zhu J., Telfer E. E., Fletcher J., Springbett A., Dobrinsky J. R., de Sousa P. A., Wilmut I., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 635-641.
25. Fissore R. A., Long C. R., Duncan R. P., Robl J. M., (1999), *Cloning*, 1, 89-100.
26. Machaty Z., Bonk A. J., Kühholzer B., Prather R. S., (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 57, 290-295.
27. Prather R. S., Tao T., Machaty Z., (1999), *Theriogenology*, 51, 487-498.
28. Fan H.-Y., Tong C., Lian L., Li S.-W., Gao W.-X., Cheng Y., Chen D.-Y., Schatten H., Sun Q.-Y., (2003a), *Biol. Reprod.*, 68, 968-977.
29. Ito J., Kawano N., Hirabayashi M., Shimada M., (2004), *Reproduction*, 128, 409-415.
30. Ito J., Shimada M., (2005), *Mol. Reprod. Dev.*, 70, 64-69.
31. Sun Q.-Y., Wu G.-M., Lai L., Bonk A., Cabot R., Park K.-W., Day B. N., Prather R. S., Schatten H., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 580-588.
32. Machaty Z., Rickords L. F., Prather R. S., (1999a), *Cloning*, 1, 101-109.
33. Sun F. Z., Hoyland J., Huang X., Mason W., Moor R. M., (1992), *Development*, 115, 947-956.
34. Funahashi H., Cantley T. C., Stumpf T. T., Terlow S. L., Day B. N., (1994), *Biol. Reprod.*, 50, 1072-1077.

35. Machaty Z., Funahashi H., Day B. N., Prather R. S., (1997), *Biol. Reprod.*, 56, 921-930.
36. Kim J. H., Machaty Z., Cabot R. A., Han Y. M., Do H. J., Prather R. S., (1998), *Biol. Reprod.*, 59, 655-660.
37. Dupont G., McGuinness O. M., Johnson M. H., Berridge M. J., Borgese F., (1996), *Biochem. J.*, 316, 583-591.
38. Williams C. J., Mehlmann L. M., Jaffe L. A., Kopf G. S., Schultz R. M., (1998), *Dev. Biol.*, 198, 116-127.
39. Carroll D. J., Albay D. T., Terasaki M., Jaffe L. A., Foltz K. R., (1999), *Dev. Biol.*, 206, 232-247.
40. Nomikos M., Blayney L. M., Larman M. G., Campbell K., Rossbach A., Saunders C. M., Swann K., Lai F. A., (2005), *J. Biol. Chem.*, 280, 31011-31018.
41. Wu H., Smyth J., Luzzi V., Fukami K., Takenawa T., Black S. L., Allbritton N. L., Fissore R. A., (2001), *Biol. Reprod.*, 64, 1338-1349.
42. Berridge M. J., (1993), *Nature*, 361, 315-325.
43. He C. L., Damiani P., Parys J. B., Fissore R. A., (1997), *Biol. Reprod.*, 57, 1245-1255.
44. He C. L., Damiani P., Ducibella T., Takahashi M., Tanzawa K., Parys J. B., Fissore R. A., (1999), *Biol. Reprod.*, 61, 935-943.
45. Jellerette T., Kurokawa M., Lee B., Malcuit C., Yoon S. Y., Smyth J., Vermassen E., de Smedt H., Parys J. B., Fissore R. A., (2004), *Dev. Biol.*, 274, 94-109.
46. Parrington J., Swann K., Shevchenko V. I., Sesay A. K., Lai F. A., (1996), *Nature*, 379, 364-368.
47. Parrington J., Brind S., de Smedt H., Gangeswaran R., Lai F. A., Wojcikiewicz R., Carroll J., (1998), *Dev. Biol.*, 203, 451-461.
48. Petr J., Urbankova D., Tomanek M., Rozinek J., Jilek F., (2002), *Anim. Reprod. Sci.*, 70, 235-249.
49. Miyazaki S., Shirakawa H., Nakada K., Honda Y., (1993), *Dev. Biol.*, 158, 62-78.
50. Carroll D. J., Ramarao C. S., Mehlmann L. M., Roche S., Terasaki M., Jaffe L. A., (1997), *J. Cell Biol.*, 138, 1303-1311.
51. Jones K. T., Cruttwell C., Parrington J., Swann K., (1998), *FEBS (The Federation of European Biochemical Societies) Lett.*, 437, 297-300.
52. Perry A. C. F., Wakayama T., Yanagimachi R., (1999), *Biol. Reprod.*, 60, 747-755.
53. Rogers N. T., Hobson E., Pickering S., Lai F. A., Braude P., Swann K., (2004), *Reproduction*, 128, 697-702.
54. Saunders C. M., Larman M. G., Parrington J., Cox L. J., Royse J., Blayney L. M., Swann K., Lai F. A., (2002), *Development*, 129, 3533-3544.
55. Cox L. J., Larman M. G., Saunders C. M., Hashimoto K., Swann K., Lai F. A., (2002), *Reproduction*, 124, 611-623.
56. Yoneda A., Kashima M., Yoshida S., Terada K., Nakagawa S., Sakamoto A., Hayakawa K., Suzuki K., Ueda J., Watanabe T., (2006), *Reproduction*, 132, 393-401.
57. Swann K., Lai F. A., (1997), *Bioessays*, 19, 371-378.
58. Kimura Y., Yanagimachi S., Kuretake S., Bortkiewicz H., Perry A. C. F., Yanagimachi H., (1998), *Biol. Reprod.*, 58, 1407-1415.
59. Jones K. T., Carroll J., Merriman J. A., Whittingham D. G., Kono T., (1995), *Development*, 121, 3259-3266.
60. Ozil J.-P., Huneau D., (2001), *Development*, 128, 917-928.
61. Kono T., Carroll J., Swann K., Whittingham D. G., (1995), *Development*, 121, 1123-1128.
62. Żernicka-Goetz M., Ciemerych M. A., Kubiak J. Z., Tarkowski A. K., Maro B., (1995), *J. Cell Sci.*, 108, 469-474.
63. Jellerette T., He C. L., Wu H., Parys J. B., Fissore R. A., (2000), *Dev. Biol.*, 223, 238-250.
64. Marangos P., FitzHarris G., Carroll J., (2003), *Development*, 130, 1461-1472.
65. Fissore R. A., Gordo A., Wu H., (1998), *Theriogenology*, 49, 43-52.
66. Sette C., Bevilacqua A., Geremia R., Rossi P., (1998), *J. Cell Biol.*, 142, 1063-1074.
67. Ogonuki N., Sankai T., Yagami K., Shikano T., Oda S., Miyazaki S., Ogura A., (2001), *Biol. Reprod.*, 65, 351-357.
68. Knott J. G., Poothapillai K., Wu H., He C. L., Fissore R., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1095-1103.
69. Bedford S. J., Kurokawa M., Hinrichs K., Fissore R. A., (2003), *Reproduction*, 126, 489-499.

70. Fissore R. A., Pinto-Correia C., Robl J. M., (1995), *Biol. Reprod.*, 53, 766-774.
71. Ruddock N. T., Machaty Z., Milanick M., Prather R. S., (2000a), *Biol. Reprod.*, 63, 488-492.
72. Yue C., White K. L., Reed W. A., Bunch T. D., (1995), *Development*, 121, 2645-2654.
73. Malcuit C., Knott J. G., He C., Wainwright T., Parys J. B., Robl J. M., Fissore R. A., (2005), *Biol. Reprod.*, 73, 2-13.
74. Varnai P., Balla A., Hunyady L., Balla T., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 7859-7864.
75. Brind S., Swann K., Carroll J., (2000), *Dev. Biol.*, 223, 251-265.
76. Putney J. W. Jr., Thomas A. P., (2006), *Curr. Biol.*, 16, R812-R815.
77. Machaty Z., Ramsoondar J. J., Bonk A. J., Prather R. S., Bondioli K. R., (2002a), *Biol. Reprod.*, 67, 1133-1139.
78. Ruddock N. T., Machaty Z., Cabot R., Prather R. S., (2001), *Mol. Reprod. Dev.*, 59, 227-234.
79. Jellerette T., Melican D., Butler R., Nims S., Ziomek C., Fissore R., Gavin W., (2006), *Theriogenology*, 65, 1575-1586.
80. Machaty Z., Ramsoondar J. J., Bonk A. J., Bondioli K. R., Prather R. S., (2002b), *Biol. Reprod.*, 66, 667-674.
81. Ruddock N. T., Machaty Z., Prather R. S., (2000b), *Reprod. Fertil. Dev.*, 12, 201-207.
82. Markoulaki S., Matson S., Abbott A. L., Ducibella T., (2003), *Dev. Biol.*, 258, 464-474.
83. Knott J. G., Gardner A. J., Madgwick S., Jones K. T., Williams C. J., Schultz R. M., (2006), *Dev. Biol.*, 296, 388-395.
84. Madgwick S., Levasseur M., Jones K. T., (2005), *J. Cell. Sci.*, 118, 3849-3859.
85. Marangos P., Carroll J., (2004), *Dev. Biol.*, 272, 26-38.
86. Fan H. Y., Huo L. J., Meng X. Q., Zhong Z. S., Hou Y., Chen D. Y., Sun Q. Y., (2003b), *Biol. Reprod.*, 69, 1552-1564.
87. Markoulaki S., Matson S., Ducibella T., (2004), *Dev. Biol.*, 272, 15-25.
88. Huo L. J., Fan H. Y., Liang C. G., Yu L. Z., Zhong Z. S., Chen D. Y., Sun Q. Y., (2004), *Biol. Reprod.*, 71, 853-862.
89. Lee G. S., Kim H. S., Hyun S. H., Lee S. H., Jeon H. Y., Nam D. H., Jeong Y. W., Kim S., Kim J. H., Han J. Y., Ahn C., Kang S. K., Lee B. C., Hwang W. S., (2005), *Theriogenology*, 63, 973-991.
90. Samiec M., Skrzyszowska M., Smorąg Z., (2003), *Czech J. Anim. Sci.*, 48, 499-507.
91. Cheong H. T., Ikeda K., Martinez Diaz M. A., Katagiri S., Takahashi Y., (2000), *Reprod. Fertil. Dev.*, 12, 15-20.
92. Tao T., Boquest A. C., Machaty Z., Petersen A. L., Day B. N., Prather R. S., (1999), *Cloning*, 1, 55-62.
93. Im G. S., Seo J. S., Hwang I. S., Kim D. H., Kim S. W., Yang B. C., Yang B. S., Lai L., Prather R. S., (2006), *Mol. Reprod. Dev.*, 73, 1094-1101.
94. Cheek T. R., McGuinness O. M., Vincent C., Moreton R. B., Berridge M. J., Johnson M. H., (1993), *Development*, 119, 179-189.
95. Didion B. A., Martin M. J., Markert C. L., (1990), *Theriogenology*, 33, 1165-1175.
96. Morgan A., Jacob R., (1994), *Biochem. J.*, 300, 655-672.
97. Forsberg E. J., Strelchenko N. S., Augenstein M. L., Betthausen J. M., Childs L. A., Eilertsen K. J., Enos J. M., Forsythe T. M., Golueke P. J., Koppang R. W., Lange G., Lesmeister T. L., Mallon K. S., Mell G. D., Misica P. M., Pace M. M., Pfister-Genskow M., Voelker G. R., Watt S. R., Bishop M. D., (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 327-333.
98. Machaty Z., Wang W.-H., Day B. N., Prather R. S., (1999b), *Biol. Reprod.*, 60, 1384-1391.