



## **Biotechnologiczne, genetyczne oraz epigenetyczne aspekty sztucznej aktywacji rekonstruowanych oocytów w klonowaniu somatycznym świń**

Marcin Samiec

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

### **Artificial activation of porcine oocytes in somatic cell cloning procedure – biotechnological, genetic and epigenetic aspects**

#### Summary

In the somatic cell cloning of pigs, nuclear transfer-derived oocytes are artificially stimulated with the use one of the three experimental protocols: 1) electrical, chemical or physicochemical delayed activation (i.e., post-activation); 2) simultaneous fusion and electrical activation (SF-EA) or simultaneous electrofusion and physicochemical activation, as well as 3) chemical sequential (combined) electrical and chemical activation. In the first activation protocol, somatic cell nuclei at G0/G1 or G2/M stages are introduced into enucleated Metaphase II oocytes (ooplasts), which are activated 30 minutes to several hours after nuclear transfer. In the second activation protocol, somatic cell nuclei at G1 or G0 stage are introduced into non-activated Metaphase II ooplasts and simultaneously obtained clonal nuclear-cytoplasmic hybrids are activated. In turn, the third activation protocol includes the SF-EA followed by an additional treatment of the reconstituted oocytes with chemical factors, which is initiated after a 1-2-h delay. The concentration of calcium cations in the fusion/activation medium affects not only the transition from meiotic to mitotic control of cell cycle of clonal cybrids, but also the degree of ploidy of reconstructed zygotes as a result of both emission of second polar body and formation of pseudopronucleus/pseudopronuclei. The artificial stimulation of reconstituted oocytes also determines the processes of architectural remodeling and epigenetic reprogramming of donor cell nuclei in nuclear-transferred embryos. Moreover, the transcriptional and translational activity of genes (eg *Oct-3/Oct-4*) that are crucial for preimplantation development of porcine cloned embryos is dependent on physicochemical parameters of calcium oscillations induced by activation of clonal nuclear-cytoplasmic hybrids.

#### 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

**Key words:**

porcine cloned embryo, clonal cybrid, activation,  $\text{Ca}^{2+}$  ion, calcium oscillations, *Oct-3/Oct-4* gene expression, NEBD, PCC, NS, pseudopronucleus, donor nuclear chromatin, architectural remodeling, donor genomic DNA, epigenetic reprogramming.

## **1. Systemy aktywacji rekonstruowanych oocytów świni w procedurze klonowania somatycznego**

W klonowaniu somatycznym świń, do sztucznej stymulacji programu rozwojowego rekonstruowanych oocytów stosuje się obecnie dwa układy doświadczalne: 1) protokół opóźnionej aktywacji (tj. postaktywacji) elektrycznej, dwustopniowej postaktywacji chemicznej lub fizykochemicznej; 2) protokół jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej lub jednoczesnej elektrofuzji i aktywacji fizykochemicznej. W pierwszym układzie jądra komórek w stadiach G0/G1 albo G2/M podziału mitotycznego wprowadza się na drodze elektrofuzji lub bezpośredniej (docytoplazmatycznej) mikroiniekcji do wyjądrzonych oocytów (ooplastów/cytoplastów) w stadium metafazy II. podziału mejotycznego (MII), które są aktywowane w przedziale czasowym od 30 minut do maksymalnie 4 godzin po zabiegu transplantacji jąder komórkowych (1-4). W drugim układzie doświadczalnym jądra komórek w fazie G1 lub G0 podziału mitotycznego przenosi się do enukleowanych, nieaktywowanych oocytów w stadium MII i równocześnie aktywuje się uzyskane hybrydy jądroowo-ooplazmatyczne, określane także mianem klonalnych hybryd cytoplazmatycznych lub cybryd klonalnych (1,5,6).

### **1.1. Wpływ zewnątrzkomórkowych jonów wapniowych na przedwczesną aktywację rekonstruowanych oocytów**

Ostatnio udowodniono, że można kontrolować inicjację lub zahamowanie procesu przedwczesnej aktywacji rekonstruowanych cybryd klonalnych na etapie fuzji cytoplastu i komórki-dawcy jądra, uzupełniając lub usuwając z roztworu do elektroporacji (elektropermeabilizacji) błon plazmatycznych kompleksów komórek somatycznych i ooplastów nieorganiczne sole wapnia w momencie rekonstrukcji enukleowanych oocytów metodą elektrofuzji. Wykazano bowiem, że kationy wapnia obecne w roztworze izotonicznego dielektryku, niezbędnego do fuzji komórek w polu elektrostatycznym, mogą już w niewielkim stężeniu (0,1 mM/L lub nawet do 0,05 mM/L) indukować molekularne procesy wewnątrzkomórkowe, towarzyszące aktywacji cybryd klonalnych. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Kurome i wsp. (7) potwierdzają, że nawet w warunkach obniżonej do 50  $\mu\text{M/L}$  koncentracji chlorku wapnia ( $\text{CaCl}_2$ ) w roztworze do elektrofuzji, w stosunkowo wysokim odsetku oocytów rekonstruowanych z jąder interfazowych fibroblastów płodowych zachodziły procesy strukturalnej rearanżacji chromatyny przedwcześnie skondenso-

wanej do chromosomów płytki pseudometafazowej. Procesy te są charakterystyczne dla przemodelowania konformacji genomu jądrowego, jakie następuje w wyniku zainicjowania procesu aktywacji oocytów. Przemiany konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej, które zostały zapoczątkowane w trzeciej godzinie po przeniesieniu jąder komórek somatycznych do enukleowanych oocytów, były trójstopniowe. Pierwszy etap tych transformacji obejmował segregację skondensowanych chromosomów ułożonych w pseudomejotyczną płytkę metafazową wrzeczona kariokinetycznego w anafazie podziału ekwacyjnego, która zachodziła w ok. 13,5% aktywowanych elektrycznie cybryd klonalnych. Drugi etap reorganizacji materiału genetycznego był związany z despiralizacją (dekondensacją) *de novo* chromosomów, która miała miejsce w ok. 11,0% zrekonstruowanych hybryd cytoplazmatycznych w telofazie. Z kolei trzecia faza architektonicznej rearanżacji chromatyny jądrowej dotyczyła procesów odtworzenia otoczki jądrowej w telofazie II. podziału pseudomejotycznego i pęcznienia formującego się jądra interfazowego, które zachodziły w ok. 24,0% aktywowanych cybryd klonalnych. Natomiast po ośmiu godzinach od elektrofuzji kompleksów ooplast-komórka somatyczna, w ponad 61,0% cybryd klonalnych zaobserwowano obecność jednego pseudoprzedjądrza, a w pozostałych 23,0% zrekonstruowanych zygot zdiagnozowano dwa rzekome mikroprzedjądrza. Uformowanie się tych parapronuklearnych struktur jest istotnym dowodem na to, że niskie stężenie kationów wapnia ( $50 \mu\text{M/L CaCl}_2$ ) w roztworze do elektropermeabilizacji błon cytoplazmatycznych kompleksów cytoplast-komórka somatyczna jest czynnikiem wystarczającym do zainicjowania aktywacji blisko 85,0% zrekonstruowanych oocytów (tab.). W badaniach przeprowadzonych przez Boquest'a i wsp. (3) oraz Kurome i wsp. (7), przedwczesna aktywacja cybryd klonalnych wywołana dodatkiem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w niskiej koncentracji (odpowiednio, 0,1 mM/L oraz 0,05 mM/L) do izotonicznego roztworu dielektryku, który był użyty do fuzji fibroblastów płodowych z enukleowanymi oocytami, spowodowała, że aktywność podziałowa w 2. dniu hodowli *in vitro* zrekonstruowanych zarodków utrzymywała się na wysokim poziomie (odpowiednio, ok. 45,0 oraz 70,0%).

## **1.2. Prawdliwość definiowania protokołów aktywacyjnych: postaktywacja fizyczna lub chemiczna czy dwustopniowa aktywacja fizykochemiczna?**

Jeśli uwzględnimy opisane w poprzednim podrozdziale uwarunkowania, to stosowane dawniej przez wielu autorów (2,8,9) określanie protokołów aktywacyjnych mianem modelu postaktywacji zrekonstruowanych oocytów jest, jak się wydaje, błędne; większość z tych oocytów mogła bowiem ulec przedwczesnej aktywacji z powodu obecności niewielkiej dawki jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w roztworze do elektrofuzji kompleksów cytoplast-komórka somatyczna. Bardziej uzasadnione w tym przypadku jest definiowanie takich protokołów aktywacyjnych jako systemów sekwencyjnej (dwustopniowej) aktywacji fizykochemicznej. Pierwszy etap takiego protokołu sta-

nowi aktywacja fizyczna, towarzysząca fuzji ooplastów z komórkami somatycznymi. Już w momencie fuzji w polu elektrostatycznym, rekonstruowane oocyty są poddawane działaniu słabych bodźców aktywujących, którymi są śladowe ilości kationów wapnia, wnikające ze środowiska zewnątrzkomórkowego do cytoplazmy cybryd klonalnych poprzez mikropory (mikrokanały) powstające okresowo w oolemmie pod wpływem jej odwracalnej permeabilizacji, wywołanej impulsami prądu stałego. Następnie, z opóźnieniem czasowym, od 1 do 2 godzin, w stosunku do jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej rekonstruowanych oocytów, cybrydy klonalne świńi poddawane są ponownie działaniu czynników aktywujących, należących do grupy mediatorów chemicznych. Ma to na celu wzmocnienie natężenia wewnątrzkomórkowego sygnału wapniowego, którego mechanizm transdukcji w środowisku cytoplazmatycznym indukuje uruchomienie programu rozwojowego zygot klonalnych. Ten drugi etap egzogennej stymulacji aktywności podziałowej bruzdkowania zrekonstruowanych zygot klonalnych, można określić mianem ich opóźnionej reaktywacji lub aktywacji *de novo*.

W procedurze klonowania somatycznego świń, w ramach badań własnych (10), wykorzystano protokół określany mianem dwustopniowej aktywacji fizykochemicznej lub sekwencyjnej aktywacji mieszanej cybryd klonalnych, na który składa się: 1) równoczesna fuzja i aktywacja elektryczna rekonstruowanych oocytów w roztworze do elektrostymulacji, uzupełnionym minimalną dawką kationów wapnia o tzw. wartości progowej (stężenie rzędu 50  $\mu\text{M/L}$   $\text{CaCl}_2$ ) oraz 2) opóźniona reaktywacja chemiczna w procedurze sekwencyjnej, tzn. przy wykorzystaniu dwóch czynników. Pierwszy czynnik, jakim był antybiotyk jonoforowy (jonomycyna wapnia) w wysokim stężeniu 15  $\mu\text{M/L}$ , stanowił właściwy aktywator. Drugim czynnikiem był cykloheksimid (CHXM, ang. *cycloheximide*) – niespecyficzny inhibitor syntezy białek, który po wznowieniu i progresji cyklu pseudomejotycznego zrekonstruowanych oocytów z metafazy do anafazy II. podziału odwracalnie blokuje proces reaktywacji czynnika dojrzewania mejotycznego (MPF, ang. *Maturation/Meiosis-Promoting Factor*), hamując resyntezę cykliny B, stanowiącej jego podjednostkę regulatorową. W wyniku wykorzystania tego złożonego protokołu sztucznej aktywacji cybryd klonalnych, odsetek dzielących się zarodków świńi zrekonstruowanych z jąder transfekowanych fibroblastów płodowych utrzymywał się po 48 godzinach hodowli *in vitro* na poziomie około 73,0%. Był on znacznie wyższy od odsetka dzielących się zarodków zrekonstruowanych z jąder transfekowanych fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników, który wynosił około 56,5% (10).

Hyun i wsp. (1) uzyskali niższy odsetek dzielących się zarodków klonalnych zrekonstruowanych z enukleowanych dojrzałych *in vitro* oocytów loch lub loszek oraz z jąder transgeniczných fibroblastów płodowych (odpowiednio, ok. 68,0 oraz 59,0%), wykorzystując podobny protokół dwustopniowej aktywacji fizykochemicznej cybryd klonalnych. Protokół ten różnił się bowiem jedynie zastosowaniem niespecyficznego inhibitora kompetycyjnego kinaz cyklino-zależnych – 6-dimetyloaminopuryny (6-DMAP, ang. *6-Dimethylaminopurine*) zamiast inhibitora translacji – cykloheksimidu.

## **2. Genetyczna zależność rearanżacji chromatyny jądrowej i ploidalności genomu komórek somatycznych od zewnątrzkomórkowego stężenia jonów $\text{Ca}^{2+}$ w procedurach aktywacji cybryd klonalnych świni**

### **2.1. Procesy warunkujące strukturalne przemodelowanie chromatyny jądrowej komórek somatycznych w następstwie jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej ( $F_E/A_E$ ) rekonstruowanych oocytów**

Stężenie kationów wapnia w roztworze do jednoczesnej fuzji i stymulacji elektrycznej rekonstruowanych oocytów ma także istotny wpływ na efektywność procesu aktywacji, która mierzona jest intensywnością i/lub częstością postaktywacyjnych przemian jakościowych oraz ilościowych w przestrzennym przemodelowaniu konfiguracji chromatyny jąder komórek somatycznych w ooplazmie zrekonstruowanych oocytów. Drugim wskaźnikiem aktywacji programu rozwojowego cybrydy klonalnej jest stopień ploidalności genomu jądrowego komórki somatycznej, uzależniony od zdolności wyrzucania rzekomych ciałek kierunkowych II. rzędu, czyli tzw. struktur parapolocytarnych, w wyniku szczątkowej cytokinezy biegunowej. Interfazowa chromatyna jądrowa komórki somatycznej zostaje poddana strukturalno-funkcjonalnej rearanżacji do postaci zespołów przedwcześnie skondensowanych chromosomów skonfigurowanych w pseudomejotyczną płytkę metafazową. Chromosomy metafazowe ulegają następnie segregacji w anafazie, która jest spolaryzowana do strefy korytkalnej ooplazmy. Rozdzielone zespoły chromatyd siostrzanych (chromosomów niehomologicznych) w wyniku towarzyszącej procesowi kariokinezy powtórnej dekondensacji i odtworzeniu otoczki jądrowej formują jedno rzekome przedjądrze o prawidłowej objętości nukleoplazmy i haploidalnej liczbie cząsteczek DNA w ooplazmie oraz zbitą masę chromatydową, eliminowaną w postaci haploidalnych struktur parapolocytarnych. Te wyrzucane pod osłonkę przejrzystą oocytu szczątkowe komórki pseudopolocytowe zawierają jedynie poronne wrzeciono kariokinezy, które jest otoczone śladową objętością cytoplazmy (tab.) (3,7,11).

Jeżeli sztuczna aktywacja cybrydy klonalnej nie doprowadzi do zainicjowania procesu przedwczesnej kondensacji egzogennej chromatyny jądrowej, wówczas genom komórki somatycznej o diploidalnej liczbie cząsteczek DNA ulega bezpośredniemu podziałowi kariokinetycznemu na dwa haploidalne mikropseudopredjądrza. Oznacza to, że takie dikariotyczne cybrydy klonalne utraciły zdolność usuwania połowicznej liczby cząsteczek DNA w wyniku biegunowej cytokinezy. Brak obecności rzekomych ciałek kierunkowych w przestrzeni okołozólkowej oocytów zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych w fazach G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cyklu mitotycznego jest zjawiskiem korzystnym. Zachowują one prawidłową ploidalność, czyli są diploidalne (2n). Natomiast jest to zjawisko niekorzystne w przypadku oocytów zrekonstruowanych z jąder komórek w fazach G<sub>2</sub>/M cyklu mitotycznego. W takich cybrydach klonalnych występuje bowiem diploidalna liczba chromosomów (2n) dwuchro-

matydowych oraz zreplikowana (4C) ilość DNA i może dochodzić do nieprawidłowości (mutacji) genomowych, np. tetraploidii. Dlatego też wykazują one niskie kompetencje rozwojowe do stadium moruli/blastocysty w warunkach hodowli *in vitro*. Jest to spowodowane głównie wynikającym z miksploidii blastomerów (obecności dwóch lub więcej linii komórek o zróżnicowanym stopniu ploidalności) zjawiskiem mozaicyzmu genetycznego (tab.) (7,9,11).

## **2.2. Wpływ zwiększonego stężenia zewnątrzkomórkowych jonów $\text{Ca}^{2+}$ na przemodelowanie chromatyny jąder komórek somatycznych oraz przedimplantacyjny potencjał rozwojowy zarodków klonalnych uzyskiwanych w wyniku $\text{F}_E/\text{A}_E$ rekonstruowanych oocytów**

Cheong i wsp. (11) udowodnili, że w wyniku podwyższenia stężenia kationów wapnia w roztworze do jednoczesnej fuzji i aktywacji oocytów rekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych, których cykl mitotyczny został zsynchronizowany *in vitro* w stadiach G0/G1, wzrastał odsetek dikariotycznych cybryd klonalnych z około 23,0 do 43,0%. W tych cybrydach nie zachodził proces przedwczesnej kondensacji chromatyny jądrowej (PCC, ang. *Premature Chromatin Condensation*), lecz charakteryzowały się one bezpośrednią progresją cyklu pseudomejotycznego do interfazy I. podziału bruzdkowania, co potwierdzała obecność dwóch haploidalnych mikropseudoprzedjądrzy w diploidalnych zygotach klonalnych o łącznej liczbie chromosomów oraz cząsteczek DNA, odpowiednio,  $2n=38$  oraz  $2C=38$ . Natomiast odsetek cybryd klonalnych wykazujących prawdopodobnie znacznie niższy potencjał rozwojowy, w których miał miejsce proces PCC jąder komórek somatycznych oraz proces wyrzucenia pod osłonkę przejrzystą rzekomego ciała kierunkowego z haploidalną liczbą chromosomów niehomologicznych ( $1n=19$ ) oraz cząsteczek DNA ( $1C=19$ ), ulegał istotnemu spadkowi (z ok. 73,0 do 53,0%). W następstwie szczytkowej cytokinezy biegunowej, ograniczonej tylko do warstwy korowej zrekonstruowanych oocytów, w ich cytoplazmie zdiagnozowano obecność jednego haploidalnego pseudoprzedjądrza. Ponadto, w badaniach przeprowadzonych przez Cheong'a i wsp. (11) stwierdzono dodatnią korelację między poziomem stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w roztworze do jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej oocytów świni rekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych a odsetkiem pomyślnie zfuzjowanych kompleksów cytoplasm-komórka somatyczna w stosunku do liczby dojrzałych *in vitro* oocytów poddawanych mikromanipulacjom oraz odsetkiem blastocyst rozwijających się z zaklasyfikowanych do hodowli *in vitro* cybryd klonalnych. Gdy zabieg jednoczesnej fuzji i aktywacji rekonstruowanych oocytów przeprowadzany był w izotonicznym roztworze mannitolu z dodatkiem 0,1 mM/L  $\text{CaCl}_2$  przy zastosowaniu dwóch następujących bezpośrednio po sobie impulsów prądu stałego o natężeniu pola elektrostatycznego 125 V/mm oraz czasie trwania każdego z nich rzędu 30  $\mu\text{s}$ , efektywność elektrofuzji kompleksów ooplast-fibroblast oraz wskaź-

nik formowania blastocyst klonalnych w warunkach pozaustrojowych utrzymywały się na poziomie, odpowiednio, ok. 67,0 oraz 6,0%. Natomiast w wyniku indukcji fuzji kompleksów enukleowany oocyt-fibroblast płodowy oraz równoczesnej inicjacji procesu aktywacji rekonstruowanych cybryd klonalnych w roztworze dielektryku uzupełnionym jonami  $\text{Ca}^{2+}$  o dziesięciokrotnie wyższej koncentracji (1,0 mM/L), odsetek pomyślnie zfuzjowanych z komórkami-dawcami jąder ooplastów oraz odsetek uzyskanych blastocyst wynosiły, odpowiednio, ok. 85,0 oraz 16,0%. Podobną zależność między stężeniem kationów wapnia w roztworze do elektroporacji błon cytoplazmatycznych kompleksów ooplast-komórka somatyczna a odsetkiem pomyślnie zrekonstruowanych oocytów świni oraz odsetkiem blastocyst rozwijających się z hodowanych *in vitro* zarodków klonalnych zaobserwowano w eksperymentach Lee i wsp. (12). Podwyższenie koncentracji jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z 0,1 mM/L do 1,0 mM/L w roztworze dielektryku do jednoczesnej fuzji i aktywacji oocytów rekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych, która indukowana była poprzez generowanie pojedynczego 50- $\mu$ sекundowego impulsu prądu stałego o sile pola elektrycznego rzędu  $2,0 \text{ kV} \times \text{cm}^{-1}$  doprowadziło zarówno do zwiększenia odsetka ooplastów pomyślnie zfuzjowanych z komórkami-dawcami jąder (ok. 68,5 vs. 82,5%), jak i odsetka blastocyst uzyskanych w warunkach pozaustrojowych (ok. 12,0 vs. 20,0%).

W badaniach własnych (10) zdecydowano się na wykorzystanie w protokole jednoczesnej fuzji i aktywacji rekonstruowanych oocytów roztworu izotonicznego mannitolu uzupełnionego chlorkiem wapnia ( $\text{CaCl}_2$ ) w koncentracji 20x wyższej w stosunku do wartości progowej. Ustaloną eksperymentalnie niezbędną dawkę minimalną jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (0,05 mM/L) powiększono bowiem do poziomu 1,0 mM/L. Pozwoliło to na uzyskanie wysokiej (blisko 85,0%) wydajności procesu elektrofuzji ooplastów z transfekowanymi fibroblastami skóry dorosłych osobników oraz ok. 17,5% blastocyst w stosunku do liczby pomyślnie zfuzjowanych kompleksów ooplast-komórka-dawca jądra. Odsetek uzyskanych w wyniku elektrofuzji kompleksów cytoplazmatyczno-płodowy fibroblast cybryd klonalnych, które zachowały żywotność (nienaruszoną integralność ultrastrukturalną plazmolemy), osiągnął jeszcze wyższy poziom (ok. 87,0%). Potencjał rozwojowy *in vitro* do stadium blastocysty cybryd klonalnych rekonstruowanych z jąder transfekowanych fibroblastów płodowych był także znacznie wyższy (ok. 30,0%) (10).

W badaniach przeprowadzonych nad klonowaniem somatycznym świń przez Im'a i wsp. (13) efektywność procesu elektrofuzji kompleksów ooplast-komórka-dawca jądra, który był indukowany w uzupełnionym 1,0 mM/L jonów  $\text{Ca}^{2+}$  roztworze do jednoczesnej fuzji i aktywacji oocytów rekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych, okazała się o blisko 10,0% niższa niż w eksperymentach własnych (10) (ok. 78,0 vs. 87,0%). Podobnie, odsetek blastocyst, które uzyskano po 6 dniach hodowli *in vitro* zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych, osiągnął blisko dwukrotnie niższą wartość (13) niż w badaniach własnych (10) (ok. 17,0 vs. 30,0%).

### **3. Mechanizm przekazywania sygnału wapniowego w aktywacji transkrypcyjnej genów homeotycznych w komórkach zarodków uzyskiwanych techniką klonowania somatycznego**

Zróżnicowane parametry oscylacji wapniowych mogą mieć istotny wpływ na aktywację określonych czynników transkrypcyjnych, np. czynników białkowych takich jak: *Oct-1*, *Oct-2*, *Oct-3/Oct-4*, regulujących transkrypcję genów histonowych w jądrach blastomerów zarodków klonalnych świni ulegających stopniowemu strukturalnemu przemodelowaniu i epigenetycznemu przeprogramowaniu (tab.). Wykrycie takich zależności stanowiłoby niepodważalny dowód na to, że przekazywanie sygnału wapniowego w postaci cyklicznych fal wylewów jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do ooplazmy pełni bardzo istotną funkcję biologiczną w sztucznie aktywowanych cybrydach klonalnych, pozwalając na regulację metabolizmu na tak podstawowym poziomie, jakim jest indukcja ekspresji genów. Powstaje zatem fundamentalne pytanie, czy sygnał wapniowy przenoszony w postaci oscylacji w jednakowym stopniu oddziałuje na różne procesy regulowane przez jony  $\text{Ca}^{2+}$ . Obecnie wiadomo, że częstotliwość, a także amplituda falowych wyrzutów kationów wapnia w oocytach rośnie w miarę wzrostu natężenia bodźca aktywującego. Wykazanie ścisłego związku pomiędzy parametrami fizykochemicznymi pulsacyjnych wylewów jonów  $\text{Ca}^{2+}$  a aktywacją określonych czynników transkrypcyjnych stanowiłoby bezpośredni dowód na to, że oscylacje wapniowe mogą indukować specyficzną odpowiedź genomu zarodkowego na poziomie ekspresji genów (14-16). Przyjmując założenie, że różny próg wrażliwości na częstotliwość, amplitudę oraz okres trwania kaskadowych fal wpływu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  dotyczy wielu czynników transkrypcyjnych występujących w jądrach komórek somatycznych wprowadzonych do enukleowanych oocytów świni, można wysunąć hipotezę, że mechanizm ten zapewnia specyfikę odpowiedzi egzogenego DNA w zależności od natężenia sygnału jonowego. Od rodzaju uaktywnianych czynników transkrypcyjnych zależy bowiem, jaka pula genów ulegnie ekspresji na określonym etapie rozwoju przedimplantacyjnego. U podstaw zróżnicowanego wpływu częstotliwości, czy, w mniejszym stopniu amplitudy oscylacji wapniowych na aktywność różnych czynników transkrypcyjnych w cybrydach klonalnych może leżeć długość okresu półtrwania aktywnej formy danego czynnika w podlegającym epigenetycznemu przeprogramowaniu genomie jądrowym komórek somatycznych. Wydaje się, że do rozpoczęcia kawitacji zarodka świni wymagane jest nieprzerwane gromadzenie w całym rozwoju przedimplantacyjnym produktów transkrypcji oraz czynników transkrypcyjnych niezbędnych do zajścia procesu formowania blastocysty (17-19).



### 3.1. Uzależnienie profilu ekspresji genu *Oct-3/Oct-4* od parametrów fizykochemicznych oscylacji wapniowych w aktywowanych cybrydach klonalnych

Bardzo interesujące pozostaje pytanie, które geny i czynniki transkrypcyjne są odpowiedzialne za określenie różnych losów rozwojowych komórek węzła zarodkowego i trofoektodermi w blastocystach świni. Doświadczenia ostatnich lat pokazują, że jednym z takich genów może być gen *Oct (OTF)-3/Oct (OTF)-4* (ang. *Octamer DNA Motif Binding Protein/Octamer Binding Transcription Factor-3/4*), kodujący czynnik transkrypcyjny wiążący się z oktamerem nukleotydów rdzenia nukleosomowego. Należy on do rodziny białek POU, czyli białek zawierających domenę homeotyczną, tzw. homeodomenę, połączoną ze specyficznym motywem HTH (motyw uskrzydłonego  $\alpha$ -heliksu- $\beta$ -skrętu- $\alpha$ -heliksu; z ang. *Winged Helix-Turn-Helix*), rozpoznającym specyficzne sekwencje nukleotydowe w obrębie zewnętrznej powierzchni podwójnego  $\alpha$ -heliksu DNA (14,20,21). Przypuszcza się, że cytoplazmatyczny kompleks czynnika transkrypcyjnego Oct-4 jest defosforylowany przez  $Ca^{2+}$ -zależną fosfatazę. Aktywna podjednostka białka Oct-4 przemieszcza się następnie do jądra komórkowego pochodzenia somatycznego w poszczególnych blastomerach zarodka klonalnego, gdzie indukuje transkrypcję określonych genów. Podjednostka ta może ulegać w nukleoplazmie szybkiej refosforylacji i powracać na drodze transportu aktywnego lub dyfuzji ułatwionej (z udziałem nośników białkowych, np. eksportyny1 współdziałającej z nukleoporyną RanBP2/NUP358 i GTPazą Ran) do cytoplazmy blastomerów w bardzo krótkim czasie (prawdopodobnie krótszym niż 1 minuta). Utrzymanie zatem podwyższonej aktywności białka Oct-4 wymaga stosunkowo wysokiej częstotliwości, a tym samym krótszego okresu trwania oscylacyjnych impulsów wapniowych, dostarczanych zrekonstruowanym oocytom wraz z działaniem sztucznych aktywatorów. Wszystko wskazuje na to, że tylko w takich warunkach możliwa jest ekspresja genu *Oct-4* w genomowym DNA komórek somatycznych ulegającym epigenetycznemu przeprogramowaniu przez cały okres rozwoju przedimplantacyjnego (tab.).

### 3.2. Wpływ supresji transkrypcyjnej genu *Oct-3/Oct-4* na niską jakość zarodków klonalnych uzyskiwanych w następstwie nieodpowiednich procedur sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów

Sugeruje się, że aktywność genu kodującego czynnik transkrypcyjny Oct-4 związana jest z zachowaniem przez blastomery totipotencji. Zróżnicowana tkankowo ekspresja genu *Oct-4* obserwowana jest po raz pierwszy w rozwoju ontogenetycznym w czasie formowania blastocysty. Stwierdzono brak białka Oct-4 w komórkach trofoblastu, wykrywa się je tylko w węźle zarodkowym, czyli embrioblaście (ICM, ang. *Inner Cell Mass*) (17,22,23). W przypadku zbyt słabej aktywacji zrekonstruowanych oocytów świni, która prowadzi do generowania pulsacyjnych wyrzutów jonów

Ca<sup>2+</sup> o bardzo niskiej częstotliwości i amplitudzie, ekspresja genu *Oct-4* w blastomerach utrzymywałaby się na bardzo niskim poziomie w wyniku braku regresywnych zmian epigenetycznych w stopniu metylacji reszt cytozyny DNA transferowanych jąder komórek somatycznych (tab.). Z kolei represja transkrypcyjna genu *Oct-4* w jądrach większości blastomerów zarodków klonalnych świnii mogłaby być główną przyczyną zaburzeń w procesach embriomorfogenetycznych i formowania blastocyst o obniżonej jakości, ocenianej na podstawie całkowitej liczby komórek oraz tzw. pseudoblastocyst, z niezbyt wyraźnie wyodrębnionym węzłem zarodkowym i niewielką objętością blastocelu, a także formowania figur parablastocystarnych, przypominających puste pęcherze trofoblastyczne (nie zawierające embrioblastów) (4,9,14,19).

#### **4. Znaczenie sztucznej aktywacji oocytów dla procesów strukturalnego przemodelowania chromatyny jądrowej oraz epigenetycznego przeprogramowania genomu komórek somatycznych w zarodkach klonalnych**

Chociaż nie ustalono dotąd jednoznacznej definicji określającej przeprogramowanie jąder komórkowych, to jednak można przyjąć, że proces ten, a przynajmniej jego wstępny etap, obejmuje wszystkie zmiany konformacyjne i cytobiochemiczne, którym podlegają jądra komórek somatycznych w interfazie podziału mitotycznego po wprowadzeniu do ooplastów, których cykl mejotyczny został fizjologicznie zablokowany w metafazie II (MII). Te zmiany konfiguracyjne prowadzą w następstwie sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów do upodobnienia się tych jąder pod względem strukturalno-funkcyjnym do przedjądrzy zygoty. Jądro komórki somatycznej wprowadzone do dojrzałego *in vitro* lub *in vivo* oocytu, niezależnie od tego, czy zostało dostarczone na drodze fuzji komórkowej czy mikroiniekcji, podlega swoistym procesom transformacji ultrastrukturalnej oraz konwersji molekularnej, które są analogiczne do tych, jakie zachodziłyby we własnym aparacie jądrowym oocytu. Pomimo usunięcia materiału genetycznego oocytu, wysoko receptywna cytoplazma enukleowanego oocytu MII zachowuje właściwości narzucające wprowadzonemu jądru taki stan, jaki miałyby jej własne jądro w tym samym stadium mejozy. Dlatego też, zjawisko morfologicznej adaptacji chromatyny mitotycznej do warunków cytofizjologicznych ooplazmy jest uzależnione od podporządkowania się genomu komórki somatycznej oddziaływaniu białkowych czynników regulatorowych w poszczególnych punktach kontrolnych (restrykcyjnych) II. podziału mejotycznego oocytu. To zjawisko swoistego naśladowania, tj. mimetyzmu, procesów molekularnych, towarzyszących naturalnemu przebiegowi cyklu mejotycznego jest określane jako przejście DNA genomowego komórki-dawcy jądra z mitotycznej do pseudomejotycznej kontroli jego aktywności transkrypcyjnej i metabolicznej (24,25). Jeżeli do nieaktywowanych, wyjądrzonych oocytów MII wprowadzi się ja-

kierunek jądra interfazowe, to pod wpływem wysokiego stężenia czynnika dojrzewania mejozy (MPF) i stabilizującego go czynnika cytotatycznego (CSF, ang. *Cytostatic Factor*) dochodzi w nich bardzo szybko do: 1) zaniku otoczki jądrowej (NEBD, ang. *Nuclear Envelope Breakdown*) oraz 2) dyspersji jąder. W kolejnym etapie ma miejsce 3) kondensacja chromatyny i wyróżnicowanie się chromosomów, które zostają zakotwiczone centromerami do mikrotubuli kinetochorowych płytki metafazowej uformowanej w obrębie wrzeciona kariokinetycznego. Ten ostatni proces, nosi nazwę spiralizacji *de novo*, respiralizacji lub przedwczesnej spiralizacji (kondensacji) chromosomów, bądź chromatyny interfazowej komórki-dawcy jądra (PCS oraz PCC, ang. *Premature Chromosome Spiralization/Premature Chromosome (Chromatin) Condensation*). Nomenklatura ta wynika z faktu odróżnienia tego procesu od zmian konfiguracji przestrzennej obejmujących zaawansowaną heterochromatynizację genomu i spiralizację chromosomów potomnych (niehomologicznych) podczas fizjologicznej metafazy II. podziału mejozy, tzn. zachodzącej we właściwym momencie cyklu komórkowego (po przekroczeniu interkinetycznego punktu restrykcyjnego MI/MII) (26,27).

#### **4.1. Etapy strukturalnego przemodelowania chromatyny jąder komórek somatycznych w zrekonstruowanych oocytach przed i po sztucznej aktywacji ich programu rozwojowego**

W środowisku cytoplazmatycznym oocytu-biorcy, egzogenna chromatyna pochodzenia somatycznego podlega zatem oddziaływaniu enzymatycznych czynników warunkujących charakter jej konformacyjnych rearanżacji w sposób ściśle związany z przebiegiem cyklu mejozy. Czynniki te to MPF i CSF w stadium metafazy II oraz kompleks białkowy ligazy ubikwitynowej, inicjujący anafazę podziału wyrównawczego (All), czyli cyklosom (APC/C, ang. *Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*) po przekroczeniu punktu kontrolnego wrzeciona kariokinetycznego stadiów MII/All. Chromatyna komórki-dawcy jądra podlega także oddziaływaniu białkowych czynników regulujących epigenetycznie poziom jej aktywności transkrypcyjnej. Są nimi: 1) ooplazmatyczne i/lub nukleoplazmatyczne (kariolimfatyczne) inhibitory kompetycyjne metylotransferaz/metylaz DNA (DNMTs, ang. *DNA Methyltransferases/Methylases*), m.in. blokery izosteryczne izoenzymów DNMT1o i DNMT3a/3b; 2) represory aktywności białek wiążących się ze zmetylowanymi dinukleotydami, tzw. wysepkami konformacyjnymi CpG (5'-cytydino-3'-monofosforylo-5'-guanozyny-3'), czyli minisekwencjami paliandromowymi <sup>Me</sup>CpG DNA genomowego (MeCPs, ang. *Methyl-CpG-Binding Proteins*) oraz (3) acetylotransferazy/acetylazy histonów H3/H4 (HATs, ang. *Histone Acetyltransferases/Acetylases*). Do tej grupy czynników należą również: 4) inhibitory izosteryczne deacetylaz białek histonowych (HDACs, ang. *Histone Deacetylases*); 5) białka supresorowe metylotransferaz histonów (HMTs, ang. *Histone Methyltransferases*) oraz 6) demetylazy/deiminazy histonów (HDMs, ang. *Histone Demethyla-*

ses/*Deiminas*) i 7) złożone kompleksy białkowe o aktywności enzymatycznej ATPaz, odpowiedzialne za architektoniczną (konformacyjną) rearanżację chromatyny jądrowej (ChRs, ang. *Chromatin Remodeling Complexes*) (28,29).

Wystawienie nagiej oraz silnie skondensowanej w wyniku NEBD i PCC chromatyny oraz białek jądrowych na długotrwałe działanie czynników ooplazmatycznych, determinujących epigenomowo-zależny profil ekspresji lub supresji transkrypcyjnej genów, jest warunkiem koniecznym do tego, aby zaszło pełne przemodelowanie i przeprogramowanie jąder komórek somatycznych, a w konsekwencji prawidłowy rozwój zrekonstruowanych oocytów (24,26,30).

Konformacyjne przemodelowanie wprowadzonych jąder nie jest zjawiskiem jednorazowym, lecz ciągiem przemian zachodzących podczas kolejnych podziałów mitotycznych w okresie bruzdkowania zarodków. Z tego względu dodatkowa runda NEBD i PCC, jakiej podlegają jądra somatyczne w ooplazmie dojrzałych oocytów, może mieć korzystny wpływ na ich przemodelowanie. Z wydłużeniem czasu ekspozycji jąder somatycznych na działanie czynników ooplazmatycznych wzrasta stopień zaawansowania strukturalno-funkcjonalnych modyfikacji jąder komórkowych, co z kolei wpływa na prawidłowy przebieg złożonych i wielofazowych przemian, jakim podlegają jądra w odpowiedzi na zewnętrzny sygnał aktywacyjny (26,31,32). W standardowym modelu postaktywacji oocyty są pobudzane do dalszego rozwoju w kilka godzin po transplantacji jądra komórkowego. Po sztucznej aktywacji zrekonstruowanego oocytu wokół zdekondensowanej chromatyny powstaje nowa otoczka jądrowa, a odtworzone jądro interfazowe rozpoczyna program przemodelowania konfiguracji przestrzennej zgodnie z przebiegiem cyklu komórkowego aktywowanego oocytu. Pierwszą oznaką architektonicznego przemodelowania jądra jest jego pęcznienie (NS, ang. *Nuclear Swelling*) w ooplazmie. Znaczny wzrost objętości jądra jest obserwowany w zrekonstruowanych oocytach świni. Rozpulchnienie uformowanych po ukończonym podziale pseudomejotycznym jąder interfazowych jest procesem kilkustopniowym i w końcu prowadzi do osiągnięcia przez nie rozmiarów zbliżonych do rozmiarów przedjądrzy fizjologicznych. Dlatego też jądra odtworzone, w następstwie sztucznej aktywacji cybryd klonalnych, bardzo często określa się mianem rzekomych przedjądrzy lub pseudopredjądrzy. Stanowią one strukturalno-funkcjonalny ekwiwalent właściwych przedjądrzy, które powstają w warunkach fizjologicznych po zapłodnieniu oocytu. Prawidłowe ich uformowanie jest podstawowym symptomem wskazującym z jednej strony na pełną i szybką odpowiedź oocytu na sygnały jonowe dostarczane przez sztuczne aktywatory, a z drugiej – na wysoką efektywność zastosowanej po rekonstrukcji enukleowanego oocytu procedury aktywacji (tab.). Zwiększenie średnicy jądra interfazowego jest spowodowane prawdopodobnie przemieszczaniem się pewnych białek ooplazmatycznych do kariolimfy, a także późniejszą wymianą białek pomiędzy cytoplazmą komórki-biorcy a nukleoplazmą wprowadzonego jądra (17,24). Ważną rolę w procesie przemodelowania i przeprogramowania jądrowego odgrywa wymiana czynników zaangażowanych w regulację zarówno struktury chromatyny, jak i tkankowo-specyficznej eks-

presji genów, na czynniki pochodzące z oocytu. Czynniki te mogą pokierować zmianami konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej, zgodnie z aktualnymi wymaganiami zrekonstruowanego oocytu i zarodka. Wydłużona ekspozycja chromatyny komórki somatycznej – dawcy jądra na działanie białek strukturalnych i enzymatycznych oocytu-biorcy jest konieczna do prawidłowego zainicjowania procesu prze-programowania genomu przed aktywacją programu rozwojowego cybrydowej zygoty klonalnej. W zarodkach zrekonstruowanych z interfazowych jąder somatycznych w fazach G0 i G1 cyklu komórkowego indukowane są albo procesy: NEBD, PCC, a następnie NS (w przypadku protokołu postaktywacji lub jednoczesnej fuzji i aktywacji), albo tylko NS (przy wyborze protokołu preaktywacji). W tym ostatnim przypadku wprowadzenie jądra do enukleowanego oocytu, w którym było już obecne jądro obłonione, nie powoduje żadnych zmian morfologicznych przeniesionego jądra, a najwyżej jego wzrost.

Okres, w którym zachodzą NEBD, PCC i/lub NS, dotyczy zastępowania czynników białkowych związanych z chromatyną jądrową białkami pochodzenia ooplazmatycznego, a DNA genomowy jest epigenetycznie modyfikowany, w celu pełnego prze-modelowania i przeprogramowania, niezbędnego do utrzymania rozwoju ontogenetycznego zarodka do końca ciąży (tab.) (26,33,34).

W klonowaniu somatycznym, coraz częściej źródłem dawców jąder są komórki, których cykl mitotyczny został sztucznie zablokowany w prometafazie lub metafazie w następstwie ich kilkugodzinnej ekspozycji na działanie odwracalnych inhibitorów polimeryzacji tubuliny włókien kinetochorowych i biegunowych wrzeczona podziałowego oraz włókien gwiazdzistych astrosfery (centrosfery) diplosomowej (najczęściej kolcemidu [demekolcyny] lub nokodazolu). Ponieważ chromatyna prometafazowa lub metafazowa jest silnie zespiralizowana (skondensowana) i generalnie transkrypcyjnie nieaktywna, wymiana połączonych z chromatyną czynników koniecznych do przeprogramowania genomu musi nastąpić podczas dekondensacji chromatyny komórki-dawcy po aktywacji zrekonstruowanego oocytu. Oznacza to, że czynniki wymagane do prze-modelowania i przeprogramowania egzogennej chromatyny są obecne w cytozolu podczas wznowionego II. podziału pseudomejotycznego oraz pierwszego cyklu mitotycznego bruzdkowania zarodków i nie ulegają biodegradacji bezpośrednio po aktywacji oocytu. Dlatego też przestrzennie prze-modelowane jądra interfazowe, pochodzące z przedwcześnie skondensowanej chromatyny, tj. zdespiralizowanych chromosomów parametafazowych (pseudometafazowych) komórek somatycznych, nazywane są strukturami paraproneuklearnymi lub pseudoprzedjądrzami. Przypuszcza się, że dopiero w tej zdespiralizowanej i zdekondensowanej *de novo* chromatynie interfazowej o znacznie zwiększonej objętości somatogenicznego pseudoprzedjądrza następuje inicjacja procesu prze-programowania epigenetycznie uwarunkowanej aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego (tab.) (31,35).

Cofnięcie transkrypcyjnego „zegara biologicznego” genomu komórek somatycznych, które utraciły już swoją totipotencję lub pluripotencję w procesie różnicowa-

nia, do statusu jądra zygoty, musi obejmować zarówno przemodelowanie chromatyny jądrowej jak i przeprogramowanie genomu w celu pełnego przywrócenia zarodkowego wzorca ekspresji genów (36,37). Przemodelowanie wprowadzonych jąder dotyczyłoby zatem zachodzących w obrębie somatycznej chromatyny przemian tautomerycznych jej konformacji określanych łącznie mianem konstytucyjno-metabolicznej rearanżacji aparatu jądrowego (27,30). Wadliwe przemodelowanie (rearanżacja) konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej komórek somatycznych w potomnych blastomerach bruzdkujących zarodków klonalnych może być uwarunkowane nieprawidłowymi zmianami konformacyjnymi i epigenetycznymi powstałymi w czasie przedwczesnej kondensacji chromosomów w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów, które są z kolei powodem różnic w zdolności do odtwarzania interfazowej postaci chromatyny jądrowej (tj. formowania pseudopredjędry) przez cybrydowe zygoty klonalne. Ponadto może mieć ono wpływ na błędne modyfikacje kowalencyjne białek histonowych konstytutywnej heterochromatyny jądrowej (głównie w regionie pericentromerowym chromosomów) w kolejnych stadiach rozwoju przed- i poimplantacyjnego zarodków oraz płodów klonalnych. To z kolei może zahamować przeprogramowanie wielu genów pochodzących z jądra komórki somatycznej, które są podstawowe dla poszczególnych faz embryo- i fetogenezy. Inhibicja procesu przeprogramowania poszczególnych genów miałaby miejsce wskutek indukcji nukleosomowej supresji transkrypcyjnej w różnicujących się komórkach zarodkowych i płodowych (tab.) (36,38,39).

**Tabela**

**Znaczenie sztucznej aktywacji oocytów zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych**

Wpływ aktywacji na:	Inicjacja i regulacja procesów:
1	2
wznowienie i ukończenie cyklu mejotycznego zrekonstruowanego oocytu	przekroczenie punktu kontrolnego metafaza II/ anafaza II podziału mejotycznego (wyrównawczego/ekwacyjnego) spadek poziomu i aktywności czynników MPF oraz CSF (kaskady enzymatycznej kinaz ERK/MAPK) poprzez degradację proteasomową cyklin B i A w anafazie II
uruchomienie programu rozwojowego zarodka klonalnego	przejście z mejotycznej do mitotycznej kontroli cyklu komórkowego strukturalne oraz epigenetyczne przemodelowanie chromatyny komórki-dawcy jądra oraz uformowanie pseudopredjędry determinacja genetycznej/epigenetycznej kontroli przed- i poimplantacyjnych kompetencji rozwojowych zarodków i płodów klonalnych: – wpływ na stopień ekspresji genów głównych dla rozwoju przedimplantacyjnego np. <i>Oct-3/Oct-4</i> lub regulacji procesów apoptozy embrionalnej np. <i>bad</i> – wpływ na przeprogramowanie pamięci epigenetycznej DNA jądrowego komórki somatycznej: – uwarunkowana epigenetycznie kontrola aktywności transkrypcyjnej genów oraz procesów związanych ze zjawiskiem rodzicielskiego piętna gametycznego (imprintingu genomowego)

1	2
uruchomienie programu rozwojowego zarodka klonalnego	wpływ na ooplazmatyczny wzorec dziedziczenia genomu mitochondrialnego: – ograniczenie zjawiska heteroplazmii mtDNA oraz zaburzeń w komunikacji między genomem jądrowym i mitochondrialnym

#### 4.2. Etapy przeprogramowania pamięci epigenetycznej genomu jądrowego komórek somatycznych w aktywowanych cybrydach klonalnych

Przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej DNA jądrowego komórek somatycznych obejmowałoby zmiany epigenomowe, przebiegające dwustopniowo w pre- i postimplantacyjnej fazie rozwoju zarodków klonalnych świni. Informacja epigenetyczna, w odróżnieniu od informacji genetycznej, która zapisana jest w sekwencji nukleotydów DNA (tj. jego strukturze 1-rzędowej), zakodowana jest w strukturze i funkcjach kowalencyjnych modyfikacji DNA oraz białek histonowych. Modyfikacje te stanowią procesy metylacji reszt cytozyny łańcucha polinukleotydowego podwójnej  $\alpha$ -helisy DNA jądrowego i/lub mitochondrialnego oraz procesy metylacji i acetylacji reszt lizyny, bądź argininy histonów H3 oraz H4 rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej (36,40). Wymienione procesy mogą mieć charakter globalny i obejmować w sposób ciągły znaczną część genomu jądrowego i/lub mitochondrialnego lub mogą być ograniczone do pewnych specyficznych sekwencji di-, tri- i oligonukleotydowych DNA (zarówno eksonów, intronów, sekwencji niepowtarzalnych/ unikatowych jak i sekwencji powtarzających się tandemowo lub w sposób rozproszony w całym genomie). Mogą one ograniczać się także do krótkich sekwencji reszt aminoacylowych w łańcuchach polipeptydowych białek histonowych lub do niektórych struktur przestrzennych chromatyny jądrowej.

Analiza jakościowa i ilościowa tych modyfikacji jest przedmiotem badań nowej gałęzi genetyki molekularnej określanej mianem epigenomiki. Profil pamięci epigenetycznej zależy zatem z jednej strony od częstotliwości metylacji DNA/histonów i stopnia acetylacji białek histonowych, a z drugiej – od wzajemnych korelacji między tymi dwoma rodzajami modyfikacji kowalencyjnych genomu oraz od stosunku ilościowego globalnych lub sekwencyjnie-specyficznych miejsc metylacji DNA do miejsc metylacji i deacetylacji histonów lub jego odwrotności, tj. liczby miejsc demetylacji DNA do liczby miejsc demetylacji i acetylacji histonów (41,42). Przeprogramowanie epigenetycznej pamięci komórkowej dotyczy również strukturalno-funkcjonalnych rearanżacji chromatyny jądrowej związanych ze zmianami długości terminalnych odcinków chromosomów, czyli telomerów (43,44). Epigenomowe modyfikacje biochemiczne w obrębie chromatyny telomerowej uzależnione są z kolei od aktywności biokatalitycznej enzymu telomerazy (45,46). Prawidłowy przebieg przeprogramowania epigenetycznej kontroli aktywności transkrypcyjnej genomu komórek somatycznych w zarodkach klonalnych jest także w dużym stopniu uwarunkowany inhibicją represji nukleosomowej DNA przez zależne od ATP wielopodjednost-

kowe białka z rodziny *brahma* np. BRG1 oraz BRM, które są homologiczne z czynnikami białkowymi drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z grupy SWI2/SNF2 (ang. *Switch of Mating Type/Sucrose Non-Fermenting*). Te kompleksy białkowe zaangażowane są w przebudowę chromatyny somatycznej (zmiany w topologii DNA) najpierw w ooplazmie oocytu-biorcy jądra, a następnie w cytozolu blastomerów zarodków znajdujących się w kolejnych stadiach rozwoju przedimplantacyjnego (32,37,47). Zarówno informacja zapisana w kodzie genetycznym jak i tzw. pamięć epigenetyczna są dziedziczne, a zaburzenia ich dziedziczenia występują w czasie nieprawidłowego lub niepełnego przeprogramowania (rearanżacji) aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego w przed- i poimplantacyjnym rozwoju (39,48).

W pierwszym etapie, proces epigenetycznego przeprogramowania jąder komórek somatycznych obejmuje dwucykliczną falę intensywnej demetylacji aktywnej (niezależnej od replikacji) i pasywnej (zależnej od replikacji) w obrębie reszt cytozyny DNA, której towarzyszy hiperacetylacja i demetylacja reszt lizyny i argininy histonów (głównie H3 oraz H4) (30,49). Jej początkowa faza zachodzi między stadium zygoty, a późnym stadium 4-komórkowym, w którym ma miejsce inicjacja aktywności transkrypcyjnej genomu zarodkowego świni, czyli przejście z matczynej do zarodkowej kontroli nad ekspresją genów niezbędnych do dalszego rozwoju. Natomiast końcowa faza demetylacji DNA oraz demetylacji i acetylacji białek histonowych przypada na okres embriogenezy między stadium 6-8-blastomerowym a stadium moruli/blastocysty (50,51).

Drugi etap epigenetycznie uwarunkowanego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej rozpoczyna się od gwałtownej remetylacji połowicznej (hemimetylacji) reszt cytozyny DNA w komórkach epiblastu, której towarzyszy deacetylacja i metylacja lub di-/tri-metylacja *de novo* histonów rdzenia nukleosomowego – w stadium późnej blastocysty ulegającej procesowi gastrulacji. Podczas gdy w komórkach linii somatycznej, wywodzących się z węzła zarodkowego blastocysty ma miejsce przywrócenie globalnych modyfikacji epigenetycznych w formie remetylacji reszt cytozyny w obrębie dinukleotydów CpG (5'-cytydino-3'-monofosforylo-5'-guanozyny-3'), to w komórkach pozazarodkowych pochodzących z linii komórek trofoektodermalnych utrzymywany jest stan hipometylacji genomu jądrowego komórek-dawców (20,32,38). Modyfikacje epigenomowe prowadzą łącznie do zmian w stopniu ekspresji poszczególnych genów na skutek represji/supresji nukleosomowej (tj. wyciszenia, ang. *silencing*) lub stymulacji (tj. wzmocnienia, ang. *enhancing*) ich aktywności transkrypcyjnej (27,33).



## 5. Czy metoda rekonstrukcji enukleowanych oocytów może wywołać przedwczesną stymulację programu rozwojowego cybrydowych zygot klonalnych?

### 5.1. Znaczenie depozytów wapniowych zlokalizowanych w jądrze komórki somatycznej dla procesu transdukcji przedwczesnego sygnału aktywującego w cybrydach klonalnych

Nie można wykluczyć, że technika elektrofuzji kompleksów ooplast-komórka-dawca jądra, stosowana powszechnie do rekonstrukcji enukleowanych oocytów w klonowaniu somatycznym świń, jest powodem przedwczesnej mobilizacji wewnątrzkomórkowych rezerwuarów wapniowych w ooplastach. Wyjaśnienie leży, być może, w zdolności części transferowanych jąder komórkowych do generowania pulsacyjnych wyrzutów  $\text{Ca}^{2+}$  po rozpadzie ich otoczki jądrowej (NEBD) w środowisku cytoplazmatycznym cybrydowych zygot klonalnych. Znaczna część heteroplazmatycznej puli endogennych kationów wapnia i magnezu w interfazowych komórkach somatycznych przenika już przez pory otoczki jądrowej do przestrzeni międzybłonowej jądra komórkowego (tzw. przestrzeni okołojądrowej). Odbywa się to na zasadzie transportu aktywnego z udziałem specyficznej ATPazy zależnej od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , czyli jądrowej pompy wapniowej, podobnej do tej występującej w siateczce śródplazmatycznej (ER, ang. *Endoplasmic Reticulum*). Jest ona zlokalizowana w zewnętrznej błonie jądrowej (52), natomiast w wewnętrznej błonie otoczki jądrowej znajdują się kanały, które uwalniają bezpośrednio do nukleoplazmy jony  $\text{Ca}^{2+}$  oraz w mniejszym stopniu jony  $\text{Mg}^{2+}$ , wypełniające wbrew gradientowi stężeń przestrzeń perinuklearną (53,54). Jakie jest stężenie kationów wapniowych w jądrze i czy zależy ono od koncentracji jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytozolu? Niektórzy z autorów sugerują, że sumaryczny poziom wapnia w nukleoplazmie i w przestrzeni międzybłonowej otoczki jądrowej jest taki sam jak w cytoplazmie, gdyż jony  $\text{Ca}^{2+}$  mogą swobodnie przenikać przez pory jądrowe. Inni autorzy twierdzą zaś, że pory jądrowe mogą przyjmować konformację zamkniętą i wówczas stanowią barierę przestrzenną dla  $\text{Ca}^{2+}$ , a ich otwarcie powoduje gwałtowny napływ tych jonów z przestrzeni perinuklearnej do kariolimfy lub ich dyfuzję ułatwioną bądź bierny transport beżnośnikowy z przestrzeni okołojądrowej do cytoplazmy w zależności od kierunku gradientu stężenia wapnia (55,56). Aktywność wielu czynników transkrypcyjnych oraz białek enzymatycznych jest jednak zależna od stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i/lub  $\text{Mg}^{2+}$  zakumulowanych w kariolimfie (52). Są to m.in. czynniki transkrypcyjne wiążące się z oktamerem nukleotydów rdzenia nukleosomowego (np. Oct [OTF]-3/Oct [OTF]-4, ang. *Octamer DNA Motif Binding Protein/Octamer Binding Transcription Factor-3/4*) oraz enzymy jądrowe z grupy endonukleaz restrykcyjnych (np. DNaza I czy NUC18), polimeraz DNA i polimeraz RNA oraz proteaz (proteaz serynowych czy kalpain). Efektywna elektrofuzja somatycznych komórek-dawców jąder z enukleowanymi oocytami

może przyspieszyć inicjację dyfuzji ułatwionej tych dwuwartościowych kationów (z udziałem białek nośnikowych, np. eksportyny 1 współdziałającej z nukleoporyną CAN/NUP214) do cytozolu klonalnych hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych świni. Nukleoporyna CAN/NUP214 jest peryferyjnym białkiem (glikoproteina) jądrowych kompleksów porowych (NPCs, ang. *Nuclear Pore Complexes*), o masie cząsteczkowej 214 kDa. Stanowi ona produkt ekspresji onkogenu *CAN*, związanego z reorganizacją (rearanzacją) chromosomów w komórkach ostrej białaczki szpikowej człowieka. Proces docytoplazmatycznego transportu kationów wapniowych i magnezowych w cybrydowych zgotach klonalnych miałby najprawdopodobniej miejsce po biodegradacji białek jądrowych kompleksów porowych (NPCs) na skutek dezagregacji otoczki jądrowej indukowanej fosforylacją lamin przez cząsteczki aktywnej kinazy CDK1/p34<sup>cdc2</sup> (ang. *Cyclin-Dependent Kinase 1/34 kDa Cell Division Control 2 Protein Kinase*) pochodzenia oocytarnego, która stanowi podjednostkę katalityczną czynnika MPF. Z kolei elektryczna mikroporacja plazmolemmy ooplastu i indukowany w jej wyniku pojemnościowy napływ ektopowych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do środowiska cytoplazmatycznego rekonstruowanego oocytu może zapoczątkować aktywację wewnątrzblonowych domen receptorów powierzchniowych, skoniugowanych z kinazą tyrozynową lub białkiem sprzęgającym nukleotydy guaninowe z grupy guanozyno-5'-difosforanów lub guanozyno-5'-trifosforanów (GDP/GTP), tj. białkiem  $G_p/G_q$ . Aktywacja receptorowej kinazy tyrozynowej lub białka  $G_p/G_q$  przebiegałaby przy współdziałaniu jonów wapnia i magnezu uwolnionych z kariolimfy interfazowych jąder komórek somatycznych do ooplazmy. Te dwa ostatnie białkowe czynniki regulacyjne mogłyby stymulować centrum katalityczne enzymu fosfoinozytydazy, odpowiedzialnego za hydrolizę fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu ( $\text{PIP}_2$ , ang. *Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate*) do *myo*-inozytolo-1,4,5-trisfosforanu ( $\text{InsP}_3$ , ang. *Myo-Inositol-1,4,5-Trisphosphate*) i 1,2-diacylglicerolu (DAG, ang. *Diacylglycerol*) (15,57,58). Przyłączenie ligandów  $\text{InsP}_3$  do swoistych receptorów kanałów wapniowych generowałoby kaskadową serię opróżnień wewnątrzooocytarnych depozytów  $\text{Ca}^{2+}$  aż do momentu uruchomienia mechanizmu dodatniego sprzężenia zwrotnego między szybkością wynurzania się oscylacyjnych wyrzutów wapnia a progresywnym blokowaniem synergistycznym (odwrażliwianiem) receptorów  $\text{InsP}_3$ -zależnych kanałów wypływu wapnia przez makrocząsteczki agonistów i jony  $\text{Ca}^{2+}$  (59,60).

## **5.2. Interferencja sygnałów kalcemicznych w cybrydach klonalnych uzyskiwanych w wyniku jednoczesnej fuzji i aktywacji ooplastów i komórek somatycznych**

Stymulacja endogennego szlaku transdukcji sygnału wapniowego w rekonstruowanych oocytach za pośrednictwem heteroplazmatycznych i kariolimfatycznych kationów wapnia komórek somatycznych może prowadzić do aktywacji fosfolipazy  $A_2$  oraz tzw. niepojemnościowego, czyli niezależnego od stopnia opróżnienia maga-

zynów ER, napływu egzogennych jonów  $Ca^{2+}$  do cybryd klonalnych. Napływ ten jest indukowany przez kwas arachidonowy i ma miejsce tylko podczas trwania oscylacji wapniowych (61,62). Przypuszcza się zatem, że interfazowe jądra komórkowe wprowadzone do ooplastów na drodze ich elektrofuzji z komórkami somatycznymi dostarczają rekonstruowanym oocytom dostatecznie silnych sygnałów stymulujących wewnątrzkomórkowe depozyty wapniowe. Ponadto, sygnały te są wspomagane przez właściwe bodźce aktywujące, aplikowane w trakcie elektropermeabilizacji błon cytoplazmatycznych. Inną przyczyną przedwczesnego uruchomienia kanałów uwalniania endogennych jonów  $Ca^{2+}$  z magazynów wewnątrzkomórkowych może być także proces starzenia się rekonstruowanych oocytów świni w następstwie stosunkowo czasochłonnego (2-4-godzinnego) zabiegu klonowania somatycznego (63,64). Wywołony w starzejących się enukleowanych oocytach świni mechanizm spontanicznej autoaktywacji, poprzedzającej pojawienie się właściwej fali przyrostu kationów wapniowych generowanej przez bodźce fizyczne (impulsy elektryczne) w momencie jednoczesnej fuzji i aktywacji rekonstruowanych oocytów może znacznie zwiększyć efektywność sztucznej stymulacji cybryd klonalnych do dalszego rozwoju. Wysokie natężenie sygnałów jonowych w rekonstruowanych oocytach świni spowodowane nałożeniem się na siebie efektów oscylacji jonów  $Ca^{2+}$  wywołanych dwoma różnymi czynnikami: starzeniem się oocytów, stopniowo inicjującym proces apoptozy oraz elektroporacją błony cytoplazmatycznej doprowadza do zwiększenia się zdolności rozwojowych hodowanych *in vitro* zarodków do stadium blastocysty.

## **6. Próby zapobiegania przedwczesnej aktywacji oocytów świni rekonstruowanych techniką klonowania somatycznego – praktyczne możliwości i ograniczenia**

Ostatnio w klonowaniu somatycznym świń zwraca się szczególną uwagę na eliminowanie lub ograniczanie wszelkich czynników, które mogą sprzyjać przedwczesnej aktywacji cybryd klonalnych. Przedwczesna aktywacja może bowiem uniemożliwić ekspozycję interfazowych jąder oraz dicentriolarnych centrosomów lub tetra-centriolarnych diplosomów komórek somatycznych na regulacyjne oddziaływanie czynników białkowych kontrolujących przebieg cyklu pseudomejotycznego w pozabawionej centriol cytoplazmie oocytów MII świni. Do grupy najważniejszych białek ooplazmatycznych, które mają wpływ na strukturalne przemodelowanie chromatyny oraz centrów organizujących cytoszkielet mikrotubularny komórek-dawców jąder (MTOCs, ang. *Microtubule Organizing Centres*) należą czynnik dojrzewania mejotycznego oocytów (MPF), posiadający aktywność kinazy histonu H1 oraz czynnik cytostatyczny (CSF), którego aktywność jest uwarunkowana przez kaskadę enzymatyczną kinaz białkowych: Mos lub Raf/MEK/MAPK/CDK2 lub p90<sup>rsk</sup>, aktywowanych za pośrednictwem mitogenów (C-MAPKs, ang. *Cascade of Mitogen-Activated Protein Kinases*). Kaskada ta jest zapoczątkowana przez produkty ekspresji protoonkogenów

*c-mos* lub *c-raf*, tj. odpowiednio, fosfotransferazę białkową Mos o masie cząsteczkowej 39 kDa (p39<sup>Mos</sup>) lub fosfotransferazę Raf określaną także p74<sup>Raf</sup>. Te tzw. nadrzędne serynowo-treoninowe kinazy należące do rodziny kinaz kinazy MAPK/ERK (MAPKKs/MEKs; ang. *MAPK/ERK Kinase Kinases*) są odpowiedzialne za fosforylację centrum aktywnego kinazy MAPK/ERK (MAPKK/MEK; ang. *MAPK/ERK Kinase*). Następnie, uaktywniona postać kinazy MEK fosforyluje reszty aminoacylowe tyrozyny oraz treoniny w obrębie centrum katalitycznego serynowo-treoninowej kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny (MAPK, ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*). Ze względu na regulacyjny wpływ czynników mitogennych na aktywność biokatalityczną kinazy MAP, określaną jest ona także często mianem kinazy o aktywności regulowanej przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ERK, ang. *Extracellular-Regulated Kinase*). Ufosforylowana kinaza MAP/ERK odpowiada z kolei prawdopodobnie pośrednio lub bezpośrednio za regulację aktywności zarówno heterodimerowego kompleksu białkowego kinazy CDK2 (p33<sup>CDK2</sup>) oraz cykliny E lub cykliny A, jak i serynowo-treoninowej kinazy o masie cząsteczkowej 90 kDa, katalizującej fosforylację białka S6 pochodzącego z podjednostki mniejszej 40S rybosomów określanej mianem kinazy p90<sup>rsk</sup> (ang. *p90 Ribosomal S6 Protein Kinase*) (65,66).

### **6.1. Eliminacja zewnątrzkomórkowych źródeł jonów wapniowych z mediów stosowanych do rekonstrukcji enukleowanych oocytów oraz preaktywacyjnej inkubacji cybryd klonalnych**

Dwustopniowy mechanizm zabezpieczający rekonstruowane oocyty świni przed przedwczesną aktywacją polega na przeprowadzaniu zabiegu transplantacji jąder komórek somatycznych (fuzji ooplastów i komórek-dawców DNA genomowego, bądź bezpośredniej mikroiniekcji doooplazmatycznej karioplastów lub całych komórek) w odpowiednio zbuforowanych mediach o niskiej sile jonowej lub w niskoprzewodzących roztworach pozbawionych wapnia i/lub magnezu, a następnie na kilkugodzinnej inkubacji cybryd klonalnych przed właściwym momentem ich postaktywacji w pożywkach hodowlanych ubogich w jony dwuwartościowe lub całkowicie ich pozbawionych (3,67). Przeprowadzanie transferu jąder komórek somatycznych bądź preinkubacji rekonstruowanych oocytów świni w warunkach bardzo obniżonej przenikalności dielektrycznej jonów Ca<sup>2+</sup> i/lub Mg<sup>2+</sup> umożliwia skuteczne przeciwdziałanie zjawisku hiperaktywacji jądrowo-cytoplazmatycznych hybryd klonalnych. Zjawisko to jest spowodowane interferencją efektów przedwczesnego przyrostu kationów wapnia w cytozolu wywołanego gwałtownym doooplazmatycznym transportem jonów Ca<sup>2+</sup> ze środowiska zewnątrzkomórkowego oraz efektów kaskady wyrzutów wapnia z depozytów wewnątrzocytarnych indukowanej we właściwym momencie zainicjowania aktywacji. Zjawisko hiperaktywacji jądrowo-cytoplazmatycznych hybryd klonalnych generowane drastycznym naruszeniem homeostazy w gospodarce wapniowej oocytu indukuje natychmiastowe uruchomienie szlaku sygna-

łowego apoptozy i zahamowanie procesów strukturalnego przemodelowania chromatyny jądrowej oraz epigenetycznego przeprogramowania DNA genomowego komórek somatycznych w dzielących się zarodkach klonalnych (4,33,40).

## **6.2. Wpływ długości okresu preaktywacyjnej inkubacji zrekonstruowanych oocytów na strukturalne przemodelowanie i epigenetyczne przeprogramowanie jąder komórek somatycznych, przedimplantacyjny potencjał rozwojowy oraz jakość zarodków klonalnych świni**

W klonowaniu somatycznym bydła i małych przeżuwaczy (owca, koza) w celu właściwego przygotowania chromatyny jądrowej do postaktywacyjnych przemian jakościowych i ilościowych w jej konfiguracji przestrzennej preferowany jest 3-6-godzinny (68-70) lub nawet dłuższy 6-10-godzinny (71,72) okres preinkubacji zygot klonalnych w pożywce pozbawionej jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ , lub w pożywce o niskiej sile jonowej. Natomiast, w klonowaniu świń zaleca się skrócenie tego czasu do 3-4 godzin (2,3,64,67), a nawet 0,5-2 godzin (63,64,73,74). Wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Koo i wsp. (8) jednoznacznie wskazują na wyższe kompetencje rozwojowe do stadium blastocysty oraz wyższą jakość morfologiczną zarodków uzyskanych z hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych elektroaktywowanych 2 godziny po fuzji kompleksów ooplast-komórka fibroblastyczna, w porównaniu z cybrydami klonalnymi poddawanych 4- i 6-godzinnej inkubacji przed procedurą sztucznej aktywacji. Blastocysty rozwijające się z cybrydowych zygot klonalnych aktywowanych 2 godziny po zabiegu transplantacji jąder fibroblastów płodowych do enukleowanych oocytów charakteryzowały się prawie dwukrotnie wyższą średnią liczbą komórek, niż blastocysty uzyskane z hodowanych *in vitro* cybryd klonalnych, które aktywowano 6 godzin po rekonstrukcji oocytów (odpowiednio, 30,4 vs. 16,5 komórek). Takie przedziały czasowe między momentem rekonstrukcji oocytów a momentem aktywacji zrekonstruowanych oocytów uważa się u tego gatunku za wystarczające dla właściwych interakcji jądrowo-cytoplazmatycznych w cybrydach klonalnych. Skrócenie czasu ekspozycji wprowadzonych jąder komórkowych na czynniki cytoplazmatyczne oocytu, a tym samym przyśpieszenie momentu postaktywacji zrekonstruowanych oocytów świni związane jest, jak się wydaje, z wcześniejszym (w późnym stadium 4-blastomerowym) niż np. u owiec, kóz i bydła (w stadium 8-16 blastomerów) uruchomieniem aktywności transkrypcyjnej własnego genomu zarodkowego. Uważa się bowiem, że opóźnienie momentu postaktywacji klonalnych hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych świni wpływa negatywnie na cykl przemian towarzyszących epigenetycznemu przemodelowaniu i przeprogramowaniu genomu jądrowego (nDNA, ang. *Nuclear DNA*) oraz mitochondrialnego (mtDNA, ang. *Mitochondrial DNA*) komórki somatycznej podczas pierwszych trzech podziałów bruzdkowania. Opóźnienie, bądź spowolnienie, kilkustopniowego procesu dynamicznych zmian konformacji (architektoniki) i metabolizmu transferowanej chromatyny ko-

mórki-dawcy jądra powoduje, że ukończenie wymaganych modyfikacji epigenetycznych (demetylacji reszt cytozyny DNA oraz demetylacji i hiperacetylacji reszt lizyny, bądź argininy histonów) genomu jądrowego, jak również odpowiednich interakcji między genomem jądrowym a mitochondrialnym, przed momentem inicjacji aktywności transkrypcyjnej genomu zarodkowego staje się niemożliwe. W wyniku braku pełnej realizacji tych podstawowych dla wczesnej embriogenezy przemian somatogenicznego DNA genomowego, zarodki klonalne świni wchodzą w warunkach hodowli *in vitro* w trwałą i nieodwracalny blok rozwojowy (ang. *cleavage-block*) w późnym stadium 4-komórkowym bruzdkowania (39,40).

### **6.3. Czy istnieje zależność między długością okresu preaktywacyjnej inkubacji cybrydy klonalnej świni a rodzajem czynnika aktywującego jej program rozwojowy?**

Długość okresu preinkubacji w doświadczalnym modelu postaktywowanych oocytów świni, jak się wydaje, jest zależna także od rodzaju zastosowanego czynnika indukującego wznowienie zablokowanego w stadium metafazy II cyklu mejotycznego. Przed aktywacją elektryczną, cybrydy zrekonstruowane z jąder komórek somatycznych są zazwyczaj inkubowane w pożywce o niskiej sile jonowej przez 1-2 godziny (4,63). Dwustopniowa aktywacja chemiczna z wykorzystaniem kombinacji tiopochodnych odczynników organicznych z grupy syntetycznych analogów związków tiofenolowych oraz związków disulfhydrylowych, tj. odpowiednio, timerosalu (tiomersalu) i di-tiotreitolu, wymaga jeszcze krótszego czasu trwania preinkubacji zrekonstruowanych oocytów w pożywce wolnej od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i/lub  $\text{Mg}^{2+}$ , a mianowicie od 30 minut do 1 godziny, maksymalnie do 2 godzin (73,74). W przypadku stosowania procedur opartych na połączeniu standardowej aktywacji chemicznej, z użyciem antybiotyku jonoforowego – jonomycyny wapnia, z odwracalną inhibicją cyklino-zależnych serynowo-treoninowych kinaz białkowych za pośrednictwem analogu puromycyny – 6-dimetyloaminopuryny (6-DMAP), okres ekspozycji transferowanego jądra komórki somatycznej na działanie czynników cytozolowych enukleowanego oocytu (ooplastu) jest najczęściej nieznacznie wydłużony do 2-4 godzin (1-3). Takie odstępy czasowe między etapem rekonstrukcji cybryd klonalnych świni a ich aktywacją ułatwiają pełne przemodelowanie chromatyny jądrowej i przeprogramowanie DNA genomowego komórek somatycznych, jednak nie są one stałe i mogą ulegać mniejszym lub większym zmianom w zależności od zastosowanych czynników aktywujących.

## **7. Podsumowanie**

Pomimo różnic w molekularnym mechanizmie przyrostu wewnątrzkomórkowej koncentracji jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cybrydach klonalnych świni, większość powszechnie

stosowanych aktywatorów (impulsy elektryczne, antybiotyki jonoforowe) indukuje tylko pojedynczą falę oscylacji kationów wapnia, zamiast powtarzalnych serii pulsacyjnych wyrzutów jonów  $Ca^{2+}$  generowanych podczas zapłodnienia. Dlatego też zaskakujący może wydawać się fakt, że krótkotrwały wylew kationów wapnia z endogennych rezerwuarów zrekonstruowanych oocytów, który inicjowany jest przez stymulację różnych ścieżek/czynników tego samego szlaku transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych, okazuje się wystarczający, w niektórych przypadkach, do uruchomienia pełnego przed- i/lub poimplantacyjnego programu rozwojowego zarodków klonalnych. Ponadto zaobserwowano pewną tendencję wzrostową w skuteczności aktywacji wśród starzejących się oocytów w stosunku do świeżo dojrzałych meiotycznie oocytów, szczególnie w przypadku ekspozycji cybryd klonalnych na działanie egzogennych czynników stymulujących, które wywołują pojedynczy (przejściowy) wyrzut wewnątrzocytarnych jonów  $Ca^{2+}$ . W związku z tym, obecnie prowadzone są próby nad wydłużaniem okresu, w którym zachodzą oscylacje wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych w cybrydach klonalnych świni. Takie protokoły aktywacyjne mogłyby znaleźć powszechne zastosowanie w klonowaniu somatycznym świń oraz innych gatunków zwierząt gospodarskich z wykorzystaniem oocytów-biorców jąder wykazujących szybkie tempo dojrzewania meiotycznego *in vitro* (3,67).

Ostatnio badania nad sztuczną aktywacją cybryd klonalnych świni koncentrują się raczej na sprzężeniu procedur indukujących wielokrotną mobilizację wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych, które obejmują zmultiplikowaną elektrostymulację lub prolongowanie czasu inkubacji zrekonstruowanych oocytów w roztworach o podwyższonym stężeniu antybiotyków jonoforowych, z systemami długotrwałej (kilkugodzinnej) supresji aktywności cyklino-zależnych kinaz białkowych, m.in. czynnika dojrzewania meiotycznego (MPF) oraz kinazy aktywowanej przez mitogeny (MAPK) (1-4,10).

Podstawowym warunkiem praktycznego stosowania wielu metod sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów świni musi być ich wysoka efektywność, której uzyskiwanie będzie możliwe tylko w wyniku prowadzenia dalszych, szczegółowych badań nad poznaniem molekularnych mechanizmów przekazywania sygnałów jonowych, dostarczanych cybrydom klonalnym wraz ze wzrostem stężenia kationów wapnia w ooplazmie (4,63,64). Optymalnym wzorcem sztucznej aktywacji byłby wzorzec zbliżony do naturalnej aktywacji oocyty 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, jak się wydaje, wymagania te spełniają jedynie takie aktywatory jak timerosal w kombinacji z ditiotreitolem (73,74).

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

## Literatura

1. 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., (2003), *Biol. Reprod.*, 69, 1060-1068.
2. 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.
3. Boquest A. C., Grupen C. G., Harrison S. J., McIlfratrick S. M., Ashman R. J., d'Apice A. J. F., Nottle M. B., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1283-1287.
4. Samiec M., Skrzyszowska M., Smorağ Z., (2003), *Czech J. Anim. Sci.*, 48, 499-507.
5. Dai Y., Vaught T. D., Boone J., Chen S.-H., Phelps C. J., Ball S., Monahan J. A., Jobst P. M., McCreath K. J., Lamborn A. E., Cowell-Lucero J. L., Wells K. D., Colman A., Polejaeva I. A., Ayares D. L., (2002), *Nat. Biotechnol.*, 20, 251-255.
6. Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.-W., Cheong H.-T., Greenstein J. L., Im G.-S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Hawley R. J., Prather R. S., (2002a), *Science*, 295, 1089-1092.
7. Kurome M., Fujimura T., Murakami H., Takahagi Y., Wako N., Ochiai T., Miyazaki K., Nagashima H., (2003), *Cloning Stem Cells*, 5, 367-378.
8. Koo D.-B., Kang Y.-K., Choi Y.-H., Park J. S., Han S.-K., Park I. Y., Kim S.-U., Lee K.-K., Son D.-S., Chang W.-K., Han Y.-M., (2000), *Biol. Reprod.*, 63, 986-992.
9. Koo D.-B., Kang Y.-K., Park J. S., Park J.-K., Chang W.-K., Lee K.-K., Han Y.-M., (2004), *Theriogenology*, 62, 779-789.
10. Skrzyszowska M., Samiec M., Słomski R., Lipiński D., Mały E., (2008), *Theriogenology*, 70, 248-259.
11. Cheong H.-T., Park K.-W., Im G.-S., Lai L., Sun Q.-Y., Day B. N., Prather R. S., (2002), *Mol. Reprod. Dev.*, 61, 488-492.
12. 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.
13. Im G.-S., Lai L., Liu Z., Hao Y., Wax D., Bonk A., Prather R. S., (2004), *Theriogenology*, 61, 1125-1135.
14. Lee E., Lee S. H., Kim S., Jeong Y. W., Kim J. H., Koo O. J., Park S. M., Hashem M. A., Hossein M. S., Son H. Y., Lee C. K., Hwang W. S., Kang S. K., Lee B. C., (2006), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 348, 1419-1428.
15. Ozil J. P., (1998), *Biophys. Chem.*, 72, 141-152.
16. Bortvin A., Eggan K., Skaletsky H., Akutsu H., Berry D. L., Yanagimachi R., Page D. C., Jaenisch R., (2003), *Development*, 130, 1673-1680.
17. Miyazaki K., Tomii R., Kurome M., Ueda H., Hirakawa K., Ueno S., Hiruma K., Nagashima H., (2005), *J. Reprod. Dev.*, 51, 123-131.
18. Kirchhof N., Carnwath J. W., Lemme E., Anastassiadis K., Scholer H., Niemann H., (2000), *Biol. Reprod.*, 63, 1698-1705.
19. Wuensch A., Habermann F. A., Kurosaka S., Klose R., Zakhartchenko V., Reichenbach H. D., Sinowatz F., McLaughlin K. J., Wolf E., (2007), *Biol. Reprod.*, 76, 983-991.
20. Boiani M., Eckardt S., Scholer H. R., McLaughlin K. J., (2002), *Genes Dev.*, 16, 1209-1219.
21. Beyhan Z., Forsberg E. J., Eilertsen K. J., Kent-First M., First N. L., (2007), *Mol. Reprod. Dev.*, 74, 18-27.
22. Yamazaki Y., Fujita T. C., Low E. W., Alarcón V. B., Yanagimachi R., Marikawa Y., (2006), *Mol. Reprod. Dev.*, 73, 180-188.
23. Kurosaka S., Eckardt S., McLaughlin K. J., (2004), *Biol. Reprod.*, 71, 1578-1582.
24. Campbell K. H. S., (1999), *Cloning*, 1, 3-15.
25. Li X., Kato Y., Tsuji Y., Tsunoda Y., (2008), *Cloning Stem Cells*, 10, 133-142.
26. Campbell K. H. S., Alberio R., (2003), *Reproduction*, 61 (Suppl.), 477-494.
27. Vignon X., Zhou Q., Renard J. P., (2002), *Cloning Stem Cells*, 4, 363-377.
28. Oliveri R. S., Kalisz M., Schjerling C. K., Andersen C. Y., Borup R., Byskov A. G., (2007), *Reproduction*, 134, 549-558.



29. Bonk A. J., Li R., Lai L., Hao Y., Liu Z., Samuel M., Ferguson E. A., Whitworth K. M., Murphy C. N., Antoniou E., Prather R. S., (2008), *Mol. Reprod. Dev.*, 75, 250-264.
30. Dean W., Santos F., Reik W., (2003), *Semin. Cell Dev. Biol.*, 14, 93-100.
31. Han Y. M., Kang Y. K., Koo D. B., Lee K. K., (2003), *Theriogenology*, 59, 33-44.
32. Beaujean N., Taylor J., Gardner J., Wilmut I., Meehan R., Young L., (2004), *Biol. Reprod.*, 71, 185-193.
33. Samiec M., Skrzyszowska M., (2005), *Czech J. Anim. Sci.*, 50, 185-195.
34. Reik W., Santos F., Dean W., (2003), *Theriogenology*, 59, 21-32.
35. Lai L., Park K. W., Cheong H. T., Kuhholzer B., Samuel M., Bonk A., Im G. S., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Prather R. S., (2002b), *Mol. Reprod. Dev.*, 62, 300-306.
36. Cezar G. G., Bartolomei M. S., Forsberg E. J., First N. L., Bishop M. D., Eilertsen K. J., (2003), *Biol. Reprod.*, 68, 1009-1014.
37. Hiendleder S., Mund C., Reichenbach H. D., Wenigerkind H., Brem G., Zakhartchenko V., Lyko F., Wolf E., (2004), *Biol. Reprod.*, 71, 217-223.
38. Dean W., Santos F., Stojkovic M., Zakhartchenko V., Walter J., Wolf E., Reik W., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13734-13738.
39. Samiec M., (2005), *J. Anim. Feed Sci.*, 14, 393-422.
40. Kang Y.-K., Koo D.-B., Park J.-S., Choi Y.-H., Kim H.-N., Chang W.-K., Lee K.-K., Han Y.-M., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 39980-39984.
41. Yang F., Hao R., Kessler B., Brem G., Wolf E., Zakhartchenko V., (2007), *Reproduction*, 133, 219-230.
42. Santos F., Zakhartchenko V., Stojkovic M., Peters A., Jenuwein T., Wolf E., Reik W., Dean W., (2003), *Curr. Biol.*, 13, 1116-1121.
43. Jeon H. Y., Hyun S. H., Lee G. S., Kim H. S., Kim S., Jeong Y. W., Kang S. K., Lee B. C., Han J. Y., Ahn C., Hwang W. S., (2005), *Mol. Reprod. Dev.*, 71, 315-320.
44. Xu J., Yang X., (2001), *Biol. Reprod.*, 64, 770-774.
45. Jiang L., Carter D. B., Xu J., Yang X., Prather R. S., Tian X. C., (2004), *Biol. Reprod.*, 70, 1589-1593.
46. Cui W., Wylie D., Aslam S., Dinnyes A., King T., Wilmut I., Clark A. J., (2003), *Biol. Reprod.*, 69, 15-21.
47. Yang L., Chavatte-Palmer P., Kubota C., O'neill M., Hoagland T., Renard J. P., Taneja M., Yang X., Tian X. C., (2005), *Mol. Reprod. Dev.*, 71, 431-438.
48. Jiang L., Jobst P., Lai L., Samuel M., Ayares D., Prather R. S., Tian X. C., (2007), *Cloning Stem Cells*, 9, 97-106.
49. Kang Y.-K., Yeo S., Kim S.-H., Koo D.-B., Park J.-S., Wee G., Han J.-S., Oh K.-B., Lee K.-K., Han Y.-M., (2003), *Mol. Reprod. Dev.*, 66, 32-37.
50. Zhang Y., Li J., Vилlemaes K., Pedersen A. M., Purup S., Vajta G., (2007), *Cloning Stem Cells*, 9, 357-363.
51. Cho S. K., Kim J. H., Park J. Y., Choi Y. J., Bang J. I., Hwang K. C., Cho E. J., Sohn S. H., Uhm S. J., Koo D. B., Lee K. K., Kim T., Kim J. H., (2007), *Dev. Dyn.*, 236, 3369-3382.
52. Nicotera P., Rossi A. D., (1994), *Mol. J. Biol. Biochem.*, 135, 89-98.
53. Goetz J. G., Nabi I. R., (2006), *Biochem. Soc. Trans.*, 34, 370-373.
54. Marin M. C., Fernandez A., Bick R. J., Brisbay S., Buja L. M., Snuggs M., McConkey D. J., von Eschenbach A. C., Keating M. J., McDonnell T. J., (1996), *Oncogene*, 12, 2259-2266.
55. Perez-Terzic C., Pyle J., Jaconi M., Stegno-Bittel L., Clapham D. E., (1996), *Science*, 273, 1875-1877.
56. Leite M. F., Thrower E. C., Echevarria W., Koulen P., Hirata K., Bennett A. M., Ehrlich B. E., Nathanson M. H., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 2975-2980.
57. Dinnyes A., Hirao Y., Nagai T., (1999), *Cloning*, 1, 209-216.
58. Machaty Z., Ramsoondar J. J., Bonk A. J., Bondioli K. R., Prather R. S., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 667-674.
59. Malcuit C., Knott J. G., He C., Wainwright T., Parys J. B., Robl J. M., Fissore R. A., (2005), *Biol. Reprod.*, 73, 2-13.
60. Uchida K., Miyauchi H., Furuichi T., Michikawa T., Mikoshiba K., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 16551-16560.
61. Varnai P., Balla A., Hunyady L., Balla T., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 7859-7864.
62. 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.

63. Yin X. J., Tani T., Yonemura I., Kawakami M., Miyamoto K., Hasegawa R., Kato Y., Tsunoda Y., (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 442-446.
64. Lee J.-W., Wu S.-C., Tian X. C., Barber M., Hoagland T., Riesen J., Lee K.-H., Tu C.-F., Cheng W. T. K., Yang X., (2003), *Biol. Reprod.*, 69, 995-1001.
65. Ito J., Kawano N., Hirabayashi M., Shimada M., (2004), *Reproduction*, 128, 409-415.
66. Takakura I., Naito K., Iwamori N., Yamashita M., Kume S., Tojo H., (2005), *J. Reprod. Dev.*, 51, 617-626.
67. Miyoshi K., Rzucidlo J., Pratt S. L., Stice S. L., (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 540-545.
68. Wells D. N., Misica P. M., Tervit H. R., (1999), *Biol. Reprod.*, 60, 996-1005.
69. Loi P., Clinton M., Barboni B., Fulka J. Jr., Cappai P., Feil R., Moor R. M., Ptak G., (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 126-132.
70. Keefer C. L., Keyston R., Lazaris A., Bhatia B., Begin I., Bilodeau A. S., Zhou F. J., Kafidi N., Wang B., Baldassarre H., Karatzas C. N., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 199-203.
71. Shiga K., Fujita T., Hirose K., Sasae Y., Nagai T., (1999), *Theriogenology*, 52, 527-535.
72. Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L'Huillier P., Laible G., (2003), *Nat. Biotechnol.*, 21, 157-162.
73. Tao T., Machaty Z., Boquest A. C., Day B. N., Prather R. S., (1999), *Anim. Reprod. Sci.*, 56, 133-141.
74. Kühholzer B., Tao T., Machaty Z., Hawley R. J., Greenstein J. L., Day B. N., Prather R. S., (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 56, 145-148.