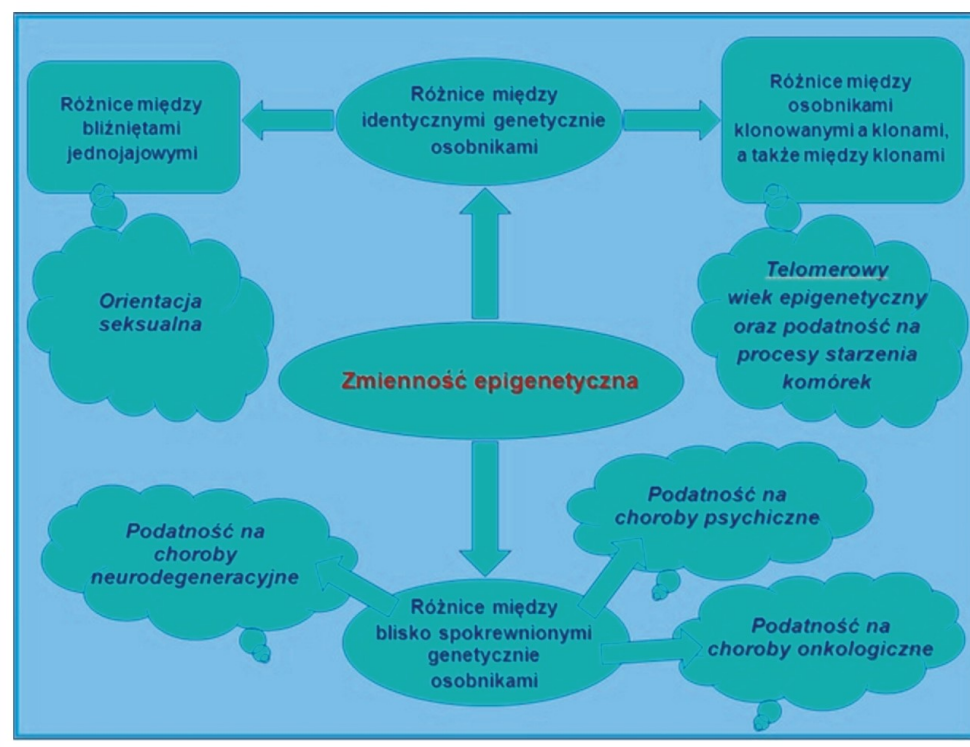


Marcin Samiec
Maria Skrzyszowska

**EPIGENETYCZNE PODŁOŻE PRZEMODELOWANIA
CHROMATYNY JĄDROWEJ ORAZ
PRZEPROGRAMOWANIA AKTYWNOŚCI
TRANSKRYPCYJNEJ GENOMU KOMÓREK
SOMATYCZNYCH W ONTOGENETYCZNYM
ROZWOJU SSAKÓW KLONALNYCH**
MONOGRAFIA



Marcin Samiec
Maria Skrzyszowska

**Epigenetyczne podłoże
przemodelowania chromatyny jądrowej
oraz przeprogramowania aktywności
transkrypcyjnej genomu komórek
somatycznych w ontogenetycznym
rozwoju ssaków klonalnych**

Epigenetic foundations of remodeling
of nuclear chromatin and reprogramming
of transcriptional activity for somatic
cell-derived genome in the ontogenetic
development of cloned mammals

M O N O G R A F I A

Kraków 2016

**INSTYTUT ZOOTECHNIKI
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY**

32-083 Balice, ul. Krakowska 1, tel. 12 357 2500 fax 12 2856733
e-mail: izooinfo@izoo.krakow.pl *internet:* http://www.izoo.krakow.pl

DYREKTOR INSTYTUTU ZOOTECHNIKI PIB
prof. dr hab. Eugeniusz Herbut

Redakcja naukowa:

dr hab. Marcin Samiec

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

Recenzenci:

dr hab. Wiesława Młodawska

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Instytut Nauk Weterynaryjnych, Zakład Weterynarii, Rozrodu i Dobrostanu Zwierząt

dr hab. Daniel Lipiński, prof. nadzw. UP

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii,
Katedra Biochemii i Biotechnologii, Zakład Diagnostyki Molekularnej

Opracowanie redakcyjne:

mgr Magdalena Bielska

Skład tekstu:

Maria Makarewicz

Opracowanie graficzne i projekt okładki:

mgr Bogusława Krawiec

Ilustracja na okładce

dr hab. Marcin Samiec

ISBN 978-83-7607-294-4

© Copyright by Instytut Zootechniki PIB

Ark. wyd. 7,1. Ark. druk. 6,7.

Druk: Zespół Wydawnictw i Poligrafii IZ PIB, 32-083 Balice k. Krakowa.

Prezentowana praca uzyskała wsparcie finansowe z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (Umowa nr INNOMED/I/17/NCBR/2014) w ramach programu „INNOMED” pt.: *„Opracowanie innowacyjnej technologii wykorzystania tkanek transgenicznych świń dla celów biomedycznych”*.
Akronim: „MEDPIG”.

Ponadto, niniejsza monografia naukowa uzyskała wsparcie finansowe z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (Decyzja nr DZP/BIOSTRATEG-II/344/2016) w ramach strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG jako projekt badawczy pt.: *„Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju”*.
Akronim: „BIODIFF”.

Spis treści

Część I – Epigenetyczne uwarunkowania ontogenetycznego rozwoju ssaków	7
1. Czy tylko geny decydują o rozwoju osobniczym ssaków?	9
1.1. Oocyty i zarodki ssaków jako obiekt badań epigenetycznych mechanizmów determinujących stopień ekspresji genów	9
1.2. Mechanizmy epigenetyczne w roli procesów różnicujących zakres „odczytu wania” jednakowych kodów genetycznych oraz procesów warunkujących zróżnicowany wzorzec aktywności transkrypcyjnej genomu w komórkach	9
1.3. Konfiguracja przestrzenna i stopnie kondensacji chromatyny jądrowej oraz epigenetycznie-zależne zmiany w stopniu ekspresji genów i interakcje zachodzące między różnymi modyfikacjami epigenetycznymi	12
1.4. Struktura, funkcje oraz dziedziczenie kodu epigenetycznego na poziomie DNA jądrowego i na poziomie chromatyny jądrowej	19
1.5. Czynniki oraz mechanizmy warunkujące epigenetyczne przemodelowanie matczynej i ojcowskiej chromatyny jądrowej przed i po aktywacji zarodkowego programu rozwojowego oocytu	20
1.6. Mechanizmy determinujące przeprogramowanie pamięci epigenetycznej genomu jądrowego w rozwoju zarodkowym	23
1.7. Zaburzenia w epigenetycznym przemodelowaniu i przeprogramowaniu genomu jądrowego zarodków	24
1.8. Sztuczna transformacja/modulacja profilu pamięci epigenetycznej genomu jądrowego zarodków oraz zastosowanie praktyczne sztucznej modulacji epigenetycznej komórek	25
Część II – Epigenetyczne uwarunkowania ontogenetycznego rozwoju ssaków klonalnych	31
2. Biotechnologiczne, molekularne oraz epigenetyczne podstawy klonowania somatycznego ssaków	33
3. Architektoniczne i epigenetyczne przemodelowanie chromatyny jądrowej oraz epigenetyczne przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek somatycznych w klonalnych zarodkach ssaków	38
3.1. Jakie zależności istnieją między rozwojem zarodków klonalnych a transkrypcyjnym przeprogramowaniem epigenetycznej pamięci zakodowanej w strukturze i funkcjach kwalencyjnych modyfikacji genomu komórek somatycznych?	38
3.2. Molekularne mechanizmy epigenetycznego przemodelowania konformacji chromatyny jądrowej w rozwoju zarodków uzyskiwanych techniką klonowania somatycznego	39
3.3. Molekularne mechanizmy przeprogramowania epigenetycznej informacji dziedzicznej w rozwoju zarodków uzyskiwanych techniką klonowania somatycznego	49

3.4. Transkrypcyjne przeprogramowanie epigenetycznej pamięci zakodowanej w strukturze i funkcjach rodzicielskiego piętna genomowego komórek somatycznych w zarodkach klonalnych	52
4. Wpływ metod sztucznej synchronizacji cyklu podziałowego oraz sztucznej modulacji epigenetycznej komórek-dawców jąder na konformacyjne przemodelowanie chromatyny oraz przeprogramowanie epigenomowo-zależnej aktywności transkrypcyjnej DNA w zarodkach klonalnych	54
5. Wpływ metod rekonstrukcji enukleowanych oocytów na przemodelowanie konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej oraz przeprogramowanie epigenetycznie uwarunkowanej aktywności transkrypcyjnej somatogenicznego DNA w zarodkach klonalnych	58
6. Znaczenie intergenomowej komunikacji między DNA mitochondrialnym a DNA jądrowym w przed- i poimplantacyjnym rozwoju zarodków klonalnych	64
7. Epigenetyczne przeprogramowanie telomerów w chromosomach uformowanych z somatogenicznej chromatyny jądrowej w rozwoju osobniczym ssaków klonalnych	69
8. Podsumowanie: Rola epigenetycznego dziedziczenia strukturalno-funkcjonalnych rearanżacji DNA genomowego w klonowaniu somatycznym ssaków oraz znaczenie sztucznej modulacji/transformacji epigenomowej komórek-dawców jąder, oocytów-biorców jąder i aktywowanych cybryd klonalnych	73
9. Abstract of monograph	76
10. Piśmiennictwo	78

Część I

Epigenetyczne uwarunkowania ontogenetycznego rozwoju ssaków

Redakcja naukowa:
MARCIN SAMIEC

1. Czy tylko geny decydują o rozwoju osobniczym ssaków?

1.1. Oocyty i zarodki ssaków jako obiekt badań epigenetycznych mechanizmów determinujących stopień ekspresji genów

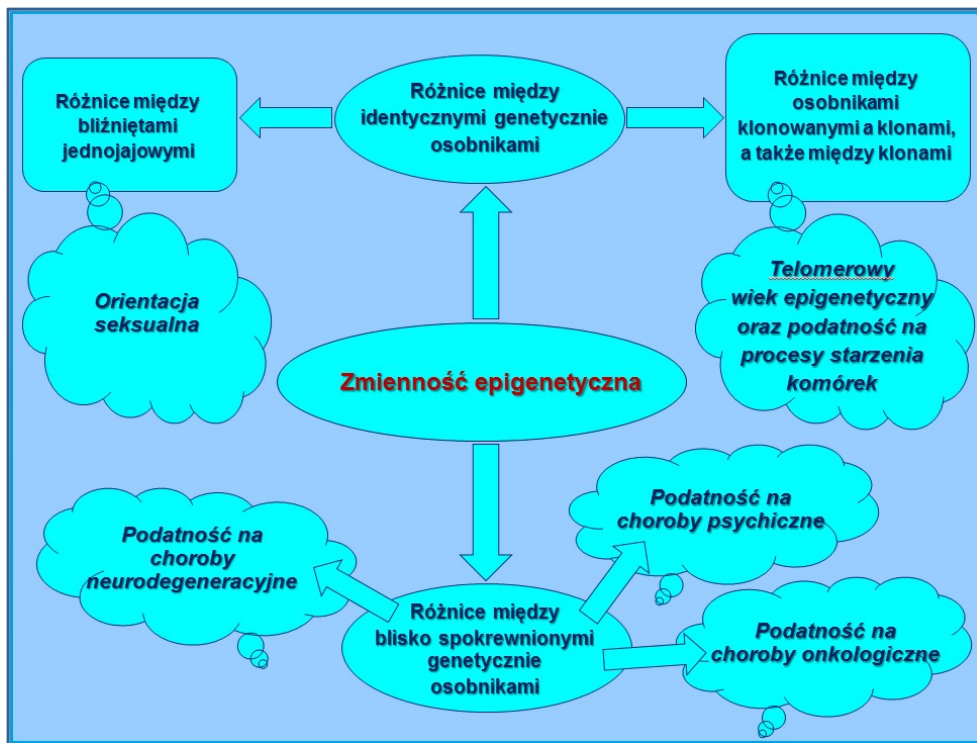
Jeszcze dwadzieścia lat temu odpowiedź na to pytanie wydawałaby się całkiem oczywista. Tak. Tylko geny stanowią główny element decydujący o ekspresji cech genotypowych i fenotypowych w rozwoju ontogenetycznym ssaków. Jednakże na obecnym etapie badań uważa się, że również czynniki pozagenowe, czyli epigenetyczne spełniają niezwykle istotną rolę w regulacji ekspresji genów w czasie ontogenezy ssaków (w tym także człowieka), już od momentu zapłodnienia komórki jajowej i powstania zygoty, poprzez fazy przed- i poimplantacyjnego rozwoju zarodkowego, a także rozwoju płodowego, po rozwój pre- i postnatalny oraz późniejsze okresy życia osobniczego aż do śmierci. Dlatego też oocyty i zarodki ssaków są doskonałym obiektem do analizy czynników determinujących procesy epigenetycznej regulacji ekspresji genów (Bortvin i in., 2003; Brunetti i in., 2008; Cervera i in., 2009). Analiza tych czynników może przyczynić się do pełniejszego poznania molekularnych mechanizmów leżących u podstaw procesu przeprogramowania, czyli rearanżacji epigenetycznych modyfikacji genomu jądrowego podczas rozwoju zarodków uzyskanych zarówno w wyniku zapłodnienia *in vivo* lub zapłodnienia *in vitro* (IVF; ang. *in vitro fertilization*), jak i w wyniku klonowania somatycznego (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*). Dotychczasowa wiedza na temat czynników warunkujących proces epigenetycznego przeprogramowania genomu we wczesnych etapach rozwoju zarodkowego jest bowiem niespójna i fragmentaryczna (Han i in., 2003; Jouneau i Renard, 2003; Allegrucci i in., 2005).

1.2. Mechanizmy epigenetyczne w roli procesów różnicujących zakres „odczytania” jednakowych kodów genetycznych oraz procesów warunkujących zróżnicowany wzorzec aktywności transkrypcyjnej genomu w komórkach

Molekularny scenariusz epigenetycznej regulacji ekspresji osobniczych cech genotypowych i fenotypowych stanowią procesy różnicujące możliwości wykorzystania informacji zapisanej w identycznych sekwencjach nukleotydów DNA i procesy determinujące zróżnicowany profil przyszłej aktywności transkrypcyjnej genów w komórkach danego organizmu (Bortvin i in., 2003; Pfister-Genskow i in., 2005; Buganim i in., 2013; Niemann, 2016). Informacja epigenetyczna, w odróżnieniu od informacji genetycznej, która jest zapisana w sekwencji nukleotydów DNA (tj. jego strukturze I-rzędowej), jest zakodowana w strukturze i funkcjach kowalencyjnych modyfikacji DNA oraz związanych z DNA białek histonowych chromatyny jądrowej. Analiza jakościowa i ilościowa tych modyfikacji jest przedmiotem badań nowej gałęzi genetyki molekularnej określanej mianem

epigenetyki lub epigenomiki. Epigenetyka zajmuje się zatem badaniem dziedzicznych zmian funkcjonalnych zarówno w komórkowych wzorcach, jak i w ilościowym profilu ekspresji genów. Zmiany te nie wynikają z rearanżacji w sekwencjach nukleotydów DNA (mutacji genowych), lecz są efektem stabilnych i odwracalnych modyfikacji biochemicznych DNA oraz białek histonowych chromatyny jądrowej, które są powielane w kolejnych generacjach komórek potomnych. W praktyce epigenomika opisuje mechanizmy pozagenowej regulacji biochemicznej strukturalno-funkcjonalnych właściwości DNA i białek chromatynowych, w wyniku których genetycznie identyczne komórki danego osobnika, a także genetycznie identyczne osobniki danego gatunku (bliźnięta jednojajowe/monozygotyczne) wykazują zróżnicowaną (tkankowo-specyficzną) ekspresję genów, co jest podłożem międzykomórkowej lub międzyosobniczej zmienności fenotypowej (Jin i in., 2014; Taudt i in., 2016). Występowanie międzyosobniczych różnic we wzorcach epigenetycznych modyfikacji genomu prowadzi do ujawniania się zmienności genotypowej i fenotypowej nie tylko między bardzo blisko spokrewnionymi genetycznie osobnikami (bliźnięta dwujajowe/dizygotyczne, półrodzeństwo, osobniki linii zimbredowanych), lecz także między identycznymi genetycznie osobnikami danego gatunku (ryc. 1) (Singh i in., 2002; Archer i in., 2003; Ollikainen i Craig, 2011; Yu i in., 2012; Li i in., 2013a; Roifman i in., 2016). U człowieka konsekwencją zróżnicowania (dywersyfikacji) epigenetycznej kontroli aktywności genomu u blisko spokrewnionych lub monogenetycznych osobników jest ich odmienna podatność (wrażliwość lub oporność) na choroby neurodegeneracyjne i choroby psychiczne (Lee i Sachdev, 2014; Wong i in., 2014, 2015; Castellani i in., 2015; Li i in., 2016; Malki i in., 2016; Walker i in., 2016), a także choroby onkologiczne (Galetzka i in., 2012; Kratz i in., 2014; Roos i in., 2014, 2016). Zmienność epigenetyczna obserwowana wśród identycznych genetycznie osobników (bliźniąt monozygotycznych) może wyrażać się również ich odmienną orientacją seksualną (Rice i in., 2013; Balter, 2015). U człowieka potwierdzone są przypadki par bliźniąt monozygotycznych zarówno płci żeńskiej, jak i męskiej, w przypadku których jedna z sióstr bliźniaczych wykazywała orientację homoseksualną, a druga heteroseksualną lub też jeden z braci bliźniaczych wykazywał orientację heteroseksualną, a drugi – homoseksualną, przy czym należy podkreślić, że każde z bliźniąt było wychowywane w tym samym środowisku rodzinnym i podlegało tym samym uwarunkowaniom społeczno-kulturowym (Rice i in., 2012; Ngun i Vilain, 2014). Różnice w epigenetycznych modyfikacjach DNA jądrowego znajdują także odzwierciedlenie w zmienności genotypowej i fenotypowej między osobnikami poddanymi klonowaniu (dawcami komórek somatycznych do zabiegu klonowania) oraz ich klonami (bliźniaczymi replikami), a także między samymi osobnikami klonalnymi (czyli klonami somatycznymi) (Miyashita i in., 2002; Archer i in., 2003; Jeon i in., 2005; Betts i in., 2006; Rodriguez-Osorio i in., 2012). Zmienność ta przejawia się w zróżnicowanym wieku epigenetycznym, który związany jest nie tylko z odmiennym tempem skracania się terminalnych odcinków chromosomów (telomerów) w okresie pourodzeniowym/postnatalnym (dzieciństwo i życie dorosłe), lecz także w okresie rozwoju zarodkowego i płodowego, z odmienną aktywnością biokatali-

tyczną telomerazy, enzymu odpowiedzialnego za odtwarzanie pierwotnej długości telomerów w każdym cyklu podziałowym komórek i w każdej rundzie replikacji DNA. Ze względu na fakt, że w okresie rozwoju postnatalnego wewnątrzkomórkowa aktywność telomerazy całkowicie wygasa (poza nielicznymi wyjątkami, do których zaliczane są np. komórki linii płciowej, leukocyty krwi obwodowej oraz komórki nowotworowe), zdolność do regeneracji struktury telomerów ulega również całkowitemu zanikowi. To z kolei przejawia się zróżnicowaną wewnątrzgrupową podatnością na procesy replikacyjnego i fizjologicznego starzenia się komórek wśród poszczególnych osobników klonalnych należących do monogenetycznej populacji, jaką jest somatyczny klon, którego każdy przedstawiciel stanowi wierną kopię osobnika sklonowanego (Kühholzer-Cabot i Brem, 2002; Bekaert i in., 2004; Schaezlein i Rudolph, 2005; Kurome i in., 2008; Gomes i in., 2011).



Ryc. 1. Epigenetycznie uwarunkowana dywersyfikacja wewnątrzpopulacyjna i międzypopulacyjna jako główny powód zróżnicowania genotypowego i fenotypowego między osobnikami o bardzo wysokim współczynniku spokrewnienia addytywnego (inbredu) oraz między identycznymi genetycznie osobnikami danego gatunku

1.3. Konfiguracja przestrzenna i stopnie kondensacji chromatyny jądrowej oraz epigenetycznie-zależne zmiany w stopniu ekspresji genów i interakcje zachodzące między różnymi modyfikacjami epigenetycznymi

Modyfikacje epigenetyczne DNA i białek histonowych mają decydujący wpływ na konfigurację przestrzenną (konformację) i stopień zaawansowania procesów kondensacji chromatyny jądrowej (Kim i in., 2002; Bui i in., 2007; Fisher i Fisher, 2011). W jądrze komórkowym cząsteczka DNA nie tworzy spontanicznie struktur skondensowanych, gdyż przeciwdziałają temu gęsto rozmieszczone odpychające się ładunki ujemne grup fosforanowych. Kondensacja genomowego DNA zachodzi dzięki tworzeniu się kompleksów kwasu nukleinowego z białkami, co prowadzi do powstania chromatyny. Podstawową powtarzającą się podjednostką strukturalną chromatyny jest nukleosom, w skład którego wchodzi niewielkie białko zasadowe (ze względu na przewagę grup aminoacylowych lizyny i argininy), zwane histonami oraz DNA. Rdzeń nukleosomu zbudowany jest z DNA o długości 146–147 par zasad (pz) oraz przypominającego walec białkowego oktameru, na którym to DNA jest nawinięte. Oktamer zawiera po dwa histony H2A, H2B, H3 i H4. Dodatkowo DNA, nawinięte na histonowy oktamer, jest przytrzymywane wraz ze swoim wchodzącym i wychodzącym fragmentem przez pojedynczy histon łącznikowy H1, który wraz z rdzeniem nukleosomu tworzy tzw. chromatosomal. Histon łącznikowy działa jak klamra zapobiegająca oddzieleniu się zwoju DNA od rdzenia nukleosomu. Pomiędzy kolejnymi chromatosomalami występuje odcinek wolnego DNA o zmiennej długości. Jest to tzw. DNA łącznikowe. Chromatosom wraz z przyległym DNA łącznikowym stanowi nukleosom i zapewnia 6–7-krotną kondensację DNA. Włókna nukleosomowe (włókna chromatynowe 10–11 nm) ulegają spontanicznej spiralizacji w jonowych warunkach panujących wewnątrz jądra komórkowego, tworząc włókna o średnicy ok. 30 nm (tzw. solenoidy), które stanowią natywną formę dla aktywnej transkrypcyjnie chromatyny (euchromatyny) i zwiększają współczynnik upakowania DNA do około 40×. Helikoidalne zwiniecie łańcucha nukleosomów (tj. utworzenie solenoidu), a następnie pofałdowanie solenoidu i utworzenie domen stabilizowanych przez białka niehistonowe daje dalsze upakowanie cząsteczki DNA i dalszą kondensację włókien nukleosomowych, co prowadzi do uformowania nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny. Najwyższy stopień kondensacji chromatyna osiąga w stadium metafazy w okresie podziałowym cyklu mitotycznego lub mejotycznego komórki, tworząc chromosomy metafazowe (wówczas stopień upakowania DNA dochodzi do ok. 10 000×). W okresie interfazowym (międzypodziałowym) cyklu komórkowego chromatyna jest bardziej rozluźniona, jednak pewien stopień jej kondensacji jest konieczny ze względu na duże liniowe rozmiary cząsteczki DNA w porównaniu z rozmiarami komórki. Funkcja histonów nie ogranicza się tylko do bycia składowym elementem chromatyny. Histony, ulegając kilku modyfikacjom posttranslacyjnym, wpływają na ekspresję genów poprzez zmianę struktury chromatyny (Sarmiento i in., 2004; Seki i in., 2005; Kungulovski i Jeltsch, 2016). Kluczem do morfologicznego i funkcjonalnego zróżnicowania komórek w obrębie ludzkiego

organizmu jest ustalanie swoistych wzorców ekspresji genów. Genom ludzki zawiera około 25–30 tys. genów, przy czym w każdej komórce tylko część z nich ulega ekspresji. Za ustalanie takich wzorców ekspresji współodpowiedzialne są modyfikacje epigenetyczne. Obejmują one przede wszystkim: metylację DNA, modyfikacje histonów i struktury chromatyny, a także funkcje regulatorowe niekodującego RNA (np. mikroRNA) (Dean i Santos, 2003; Kim i in., 2004; Santos i Dean, 2004). Do najważniejszych modyfikacji białek histonowych należą acetylacja oraz metylacja grupy ϵ -aminowej lizyny w obrębie *N*-aminowych końców w tzw. ogonach histonowych, wystających na zewnątrz nukleosomów. Udział histonów w zmienności epigenetycznej nie zależy wyłącznie od rodzaju modyfikacji i miejsca jej wystąpienia, ale także od jej wpływu na proces metylacji samego DNA. Podstawowym następstwem zmian epigenomowych jest występowanie czasowej, przestrzennej i tkankowo-specyficznej zmienności genotypowej i fenotypowej tego samego genomu, opartej na jego zróżnicowanym statusie epigenetycznym (Kourmouli i in., 2004; Liu i in., 2004; Nagashima i in., 2007; Mason i in., 2012).

Początkowo uważano, że zmiany w poziomie i tempie ekspresji genów są głównie wynikiem procesów metylacji regionów promotorowych genomowego DNA. Metylacja DNA należy do jednych z najtrwalszych i najlepiej poznanych biochemicznych modyfikacji epigenetycznych. Metylacja stanowi poreplikacyjną modyfikację DNA, która jest zawsze symetryczna i obejmuje obie komplementarne nici DNA. Miejsce metylacji nie jest przypadkowe. Dotyczy tylko reszt cytozyny, wchodzących w skład sekwencji 5'-CG-3' (5'-cytydino-3'-monofosforylo-5'-guanozyny-3'), czyli dinukleotydów CpG, które są nazywane wyspami CpG. Proces metylacji jest przeprowadzany przy udziale enzymów przenoszących grupy metylowe – cytozyna-specyficznych metylotransferaz DNA (DNMTs; ang. *DNA methyltransferases*). Enzymy te katalizują reakcję przyłączenia grup metylowych pochodzących od donora *S*-adenozylu-*L*-metioniny do atomu węgla C5 w obrębie pierścienia pirymidynowego cytozyny. Produktami tej reakcji są: zmetylowany DNA i *S*-adenozylu-*L*-homocysteina. Do tej pory zidentyfikowano pięć aktywnych izoform enzymów (izozymów) z rodziny metylotransferaz DNA: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b i DNMT3L (Dean i in., 2003; Armstrong i in., 2006; Corry i in., 2009; Xu i in., 2013). Ze względu na sposób metylacji DNA enzymy DNMT można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej należy izoenzym DNMT1, który charakteryzuje się silną preferencją do hemimetylowanego DNA i odpowiedzialny jest za metylację zachowawczą, polegającą na przyłączaniu grup $-CH_3$ do nowo zsyntetyzowanej nici DNA w miejscach komplementarnych do miejsc metylowanych na nici matczynej. Funkcja biokatalityczna metylotransferazy DNMT1 polega zatem na utrzymywaniu stanu metylacji podczas replikacji DNA i powielaniu wzorów metylacji DNA na nowo syntetyzowaną nić (Reik i in., 2003a; Shi i in., 2004; Enright i in., 2003, 2005; Buganim i in., 2013). Druga grupa metylotransferaz DNA to enzymy DNMT3a i DNMT3b, odgrywające kluczową rolę w metylacji *de novo*, czyli przyłączaniu grup metylowych do dinukleotydów CpG w zupełnie nowych miejscach. Ten typ metylacji powoduje zatem zmianę wzoru metylacji konkretnych fragmentów genomu i występuje przede wszystkim

w stosunkowo wczesnej (przed- i okołoinplantacyjnej) fazie rozwoju embrionalnego ssaków (zarodki w stadiach moruli i blastocysty oraz gastrule) (Lorincz i in., 2002; Kang i in., 2003; Shi i Wu, 2009). Z kolei izozym DNMT3L nie wykazuje ogólnej aktywności enzymatycznej w procesach globalnej metylacji DNA, ale działa jako czynnik stymulujący aktywność biokatalityczną enzymów DNMT3a i 3b. Tworzone między tymi trzema izoformami enzymów kompleksy wykazują większą zdolność wiązania DNA i *S*-adenozylometioniny. Ponadto metylotransferaza DNMT3L jest zaangażowana w przemodelowanie konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej i w procesy deacetylacji histonów (Santos i in., 2002, 2003; Shi i in., 2003a; Huan i in., 2013). Natomiast funkcja izoformy DNMT2 nie jest do końca wyjaśniona, ale w świetle ostatnich badań wydaje się, że enzym DNMT2 jest odpowiedzialny raczej za metylację tRNA niż DNA. Do niedawna sądzono, że enzym DNMT2 jest zaangażowany w utrzymywanie wzorów metylacji DNA, ale z powodu wykazanej ostatnio funkcji metylowania RNA uważa się, że raczej pełni on rolę w metylacji zachowawczej RNA (Deshmukh i in., 2011; Esteves i in., 2011).

Metylacja DNA ma głównie na celu, choć nie zawsze, wyciszenie aktywności transkrypcyjnej genów. Genom człowieka zawiera ok. 29 tys. wysp CpG, tj. obszarów DNA (o długości ok. 1 kbp) o zwiększonej w porównaniu z całym genomem zawartości sekwencji CpG, zlokalizowanych w około 50–60% promotorów genów, tj. wszystkich genów metabolizmu podstawowego i w około 40% genów swoistych tkankowo (Renard i in., 2002; Han i in., 2003; Whitworth i Prather, 2010). Uważa się, że aktywne transkrypcyjnie geny wykazują hipometylację promotorów, podczas gdy transkrypcyjnie nieaktywne sekwencje są zazwyczaj zmetylowane. Dinukleotydy CpG znajdujące się poza wyspami CpG są rozmieszczone przede wszystkim w obrębie sekwencji powtórzonych lub centromerów i to one zwykle ulegają metylacji, która jest procesem gwarantującym stabilność chromosomalną, ochronę przed obcym DNA, czy powstrzymywanie translokacji chromosomowych (Shi i in., 2003b, 2004; Zhao i in., 2010a). U podstaw wyciszenia ekspresji genów (supresji/represji transkrypcyjnej) poprzez metylację DNA leżą dwa kluczowe mechanizmy: 1) blokowanie przyłączania koaktywatorów transkrypcji, czyli utrudnianie przez grupy metylowe dostępu czynników transkrypcyjnych do regionów promotorowych genów oraz 2) stymulowanie przyłączania białek efektorowych MBPs (ang. *methyl-CpG-binding proteins*), które zawierają domeny MBDs (ang. *methyl-CpG-binding domains*), wiążące zmetylowane reszty cytozyny DNA w obrębie wysp CpG (Kang i in., 2002, 2003; Reik, 2007; Diao i in., 2013). O sile wiązania białek MBP do określonych sekwencji DNA mogą decydować ilość i lokalne zagęszczenie dinukleotydowych sekwencji CpG. Zahamowanie funkcji białek MBP znosi efekt wyciszający transkrypcję, wywołany metylacją wysp CpG. Hamowanie transkrypcji przez procesy metylacji DNA następuje też w wyniku ich pośredniego wpływu na kondensację chromatyny jądrowej, a mianowicie poprzez interakcję białek MBP z białkami modyfikującymi kowalencyjnie histony i z kompleksami przemodelującymi chromatynę oraz poprzez aktywację enzymów z grupy deacetylaz histonowych (HDACs; ang. *histone deacetylases*) (Nagashima

i in., 2007; Ding i in., 2008; Liu i in., 2004, 2012). Szczególnymi przykładami procesów metylacji DNA są również: 1) unieczynnienie jednego z alleli genu podczas gametogenezy, noszące nazwę imprintingu gametycznego, czyli rodzicielskiego (matczynego lub ojcowskiego) piętnowania genomowego oraz 2) inaktywacja jednego z chromosomów X w somatycznych komórkach żeńskich (Eggan i in., 2000; Wrenzycki i in., 2002; Lee i in., 2003a; Lucifero i in., 2002, 2004; Paoloni-Giacobino i Chaillet, 2004; Jeon i in., 2008). Warto przy tym podkreślić, że metylotransferaza DNA – DNMT3L, podobnie jak izoenzymy DNMT3a i DNMT3b, umożliwia znakowanie grupami metylowymi *de novo*, z tym że jest odpowiedzialna za występowanie matczynego piętnowania genomowego. W przypadku transformacji nowotworowej zauważalne są zaburzenia homeostazy poziomu metylacji reszt cytozyny DNA poprzez hipometylację globalną genomu oraz hipermetylację specyficzną dla miejsc promotorowych genów supresorowych nowotworów. Utrwalone wzorce metylacji DNA są nie tylko konsekwencją przyłączania grup metylowych do reszt cytozynowych, lecz także efektem procesów demetylacji (Mayer i in., 2000; Ning i in., 2013; Nashun i in., 2015). Te ostatnie mogą być procesami zależnymi, jak i niezależnymi od replikacji DNA. Demetylacja DNA zależna od jego replikacji zwana jest również demetylacją pasywną i występuje wówczas, gdy izoenzym DNMT1 (którego aktywność biokatalityczna ulega gwałtownemu zahamowaniu przez specyficzne/selektywne inhibitory metylotransferaz DNMT1) nie metyluje nowo zsyntetyzowanego łańcucha DNA, co prowadzi do powstania niezmetylowanego DNA po drugim cyklu replikacyjnym. Ten rodzaj demetylacji DNA ma miejsce w bardzo wczesnych fazach przedimplantacyjnego rozwoju zarodków (przypada na okres bruzdkowania zarodków po zapłodnieniu komórki jajowej, czyli między stadiem zygoty a stadiem moruli) i dotyczy genomu matczynego, a po aktywacji transkrypcyjnej – również genomu zarodkowego (Christians i in., 1994; Esteves i in., 2011; Lagutina i in., 2010, 2011; Diao i in., 2013). Z kolei demetylacja aktywna wysp CpG, która bezpośrednio po zapłodnieniu komórki jajowej obejmuje procesy eliminacji reszt $-CH_3$ w obrębie genomu ojcowskiego, przebiega niezależnie od replikacji DNA i zachodzi na drodze enzymatycznej. Wydaje się, że w warunkach niewielkiego stężenia donora grup metylowych, jakim jest *S*-adenozylometionina, izoenzymy DNMT3a i 3b mogą funkcjonować nie tylko jako metylotransferazy DNA, ale także jako deaminazy 5-metylocytozyny. Deaminacja 5-metylocytozyny do tyminy, a następnie wolna od błędów naprawa DNA (przywrócenie pary G:C) stanowią jeden z prawdopodobnych mechanizmów aktywnej demetylacji DNA w rozwoju osobniczym ssaków (Simonsson i Gurdon, 2004; Eilertsen i in., 2007).

Metylacja DNA wywiera istotny wpływ na interakcje DNA z białkami histonowymi rdzenia nukleosomowego, prowadząc do zmian w strukturze przestrzennej chromatyny oraz dostępności DNA dla czynników i maszyny transkrypcyjnej. Tym samym przyczynia się ona do spadku lub, niezmiernie rzadko, do wzrostu tempa transkrypcji, w zależności od tego jakie – pozytywne czy negatywne – elementy regulatorowe genów są w te procesy zaangażowane. Metylacja wysp CpG w promotorach genów jest rozpoznawana przez białka MBPs. Białka te za-

wierają na *N*-aminowym końcu domenę MBD, a w części środkowej domenę transkrypcyjnej represji nukleosomowej – TRD (ang. *transcription repression domain*). Po rozpoznaniu zmetylowanego DNA, białka MBPs mogą aktywować enzymy z rodziny deacetylaz histonów (HDACs) i/lub korepresory transkrypcji, co prowadzi do silnej kondensacji chromatyny i blokowania sekwencji promotora danego genu, uniemożliwiając dostęp czynnikom transkrypcyjnym (Yamanaka i in., 2009; Zhao i in., 2009, 2010a, b; Costa-Borges i in., 2010). Odkrycie białek wiążących się do metylowanych sekwencji CpG i „mobilizujących” w tych regionach deacetylazy histonów (HDACs) miało niebagatelne znaczenie w poznaniu roli metylacji DNA. Co więcej, okazało się, że procesy metylacji DNA i deacetylacji histonów są prawdopodobnie silnie powiązane w generowaniu struktury nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny (Armstrong i in., 2006; Prather i in., 2009).

Początkowo uważano, że procesy modyfikacji DNA są nadrzędne w stosunku do modyfikacji histonów, ale wyniki najnowszych badań wskazują, że epigenetyczne modyfikacje histonów również mogą zapoczątkowywać procesy metylacji DNA (Bui i in., 2007; Reik, 2007). Tym samym w epigenetycznych mechanizmach regulacji ekspresji genów niemniej ważną rolę od metylacji DNA odgrywiają reakcje acetylacji i deacetylacji histonów rdzenia nukleosomowego (głównie histonów H3 i H4), katalizowane przez enzymy należące do acetylotransferaz histonowych (HATs; ang. *histone acetyltransferases*) i deacetylaz histonowych (HDACs). Badania ostatnich lat wykazały, że acetylotransferazy histonów (HATs) pełnią funkcję koaktywatorów transkrypcji, podczas gdy deacetylazy histonów (HDACs) są jej korepresorami (Lee i in., 2010; Kumar i in., 2013). W związku z tym udało się potwierdzić pozytywną lub negatywną korelację między kowalencyjnymi modyfikacjami białek chromosomowych (tj. acetylacją lub deacetylacją histonów rdzeniowych) a ekspresją genów (Dean i in., 2003; Gonzales-Cope i in., 2016).

Posttranslacyjne modyfikacje kowalencyjne w *N*-końcach ogonów histonowych takie jak: acetylacja, metylacja, ubikwitynacja, fosforylacja, biotynylacja, sumoilacja i ADP-rybozylacja histonów odgrywiają krytyczną rolę w regulacji transkrypcji genów. Modyfikacje biochemiczne białek histonowych chromatyny jądrowej są katalizowane i regulowane nie tylko przez swoiste enzymy, tj. acetylotransferazy histonowe (HATs), deacetylazy histonowe (HDACs), metylotransferazy histonowe (HMTs; ang. *histone methyltransferases*) i demetylazy histonowe (HDMs; ang. *histone demethylases*), ale także przez kinazy białkowe, fosfatazy, enzymy związane z ubikwityną i białkiem SUMO i tzw. kompleksy białkowe będące koaktywatorami transkrypcji, takie jak p300/CBP (ang. *protein 300kDa/cAMP response element-binding [CREB] protein*), mające aktywność acetylotransferaz histonowych (HATs). Działanie wszystkich wymienionych wcześniej enzymów decyduje o strukturze epigenetycznego kodu histonowego, który w połączeniu z białkami związanymi z chromatyną determinuje profil ekspresji genowej w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne (Vignon i in., 2002; Yamanaka i in., 2009; Smith i in., 2012). Epigenetycznie zmodyfikowane histony grupują się w dwóch kompleksach białkowych, TrxG (ang. *Trithorax group*) i PcG (ang. *Poly-*

comb group). Niektóre z elementów składowych tych kompleksów wykazują aktywność metylotransferaz histonowych (HMT), podczas gdy inne odgrywają rolę w utrzymywaniu równowagi między heterochromatyną (białka związane z PcG) oraz euchromatyną (białka związane z TrxG). Białka te wiążą się do sekwencji PRE, czyli specyficznych miejsc DNA reagujących na ich sygnały (tj. rozpoznających domeny białek PcG tzw. elementów odpowiedzi; ang. *Polycomb Response Elements*) lub wykazują wysokie powinowactwo do sekwencji TRE (elementów odpowiedzi na sygnały białek TrxG; ang. *Trithorax Response Elements*). Sekwencje PRE, które są odpowiedzialne za rozpoznawanie białek PcG, oraz sekwencje TRE, które są odpowiedzialne za rozpoznawanie białek TrxG, są zlokalizowane w obrębie regionów promotorowych genów kodujących białka zaangażowane w metylację DNA, w kowalencyjne modyfikacje histonów, w ATP-zależne prze-modelowanie nukleosomów i w procesy regulatorowe z udziałem mikroRNA (Andreu-Vieyra i Matzuk, 2007; Rajasekhar i Begemann, 2007).

Metylacja dwóch reszt lizyny w różnych pozycjach w tym samym typie histonu, katalizowana przez metylotransferazy histonowe (HMTs) w obecności donora grup metylowych ($-CH_3$) – *S*-adenozylometioniny, może dawać efekt dwójki, związany zarówno z wyciszeniem, jak i z aktywacją transkrypcyjną genów. Przy tym należy podkreślić, że reszty lizynowe histonów mogą być mono-, di- oraz trimetylowane. Przykładowo, mono-, di- i trimetylacja reszt lizynowych zarówno w pozycjach 4 i 36, która zachodzi w histonie H3, związana jest z utworzeniem aktywnej transkrypcyjnie i zdekondensowanej euchromatyny. Z kolei, w przeciwieństwie do procesów metylacji reszt lizyny histonu H3 w pozycjach 4 i 36, procesy di- i trimetylacji reszt lizyny histonu H3 w pozycji 9 i procesy mono- i trimetylacji reszt lizyny histonu H3 w pozycji 27, czy też procesy mono- i trimetylacji reszt lizyny w pozycji 20 w histonie H4, skutkują represją transkrypcyjną i silną kondensacją chromatyny jądrowej, a więc powstaniem zamkniętej struktury heterochromatyny (Fournier i in., 2002; Armstrong i in., 2006; Smith i in., 2012). Procesy pojedynczej i podwójnej metylacji mogą dotyczyć także reszt argininy histonów H3 i H4, ale wpływ tych modyfikacji epigenetycznych na strukturę chromatyny nie jest dobrze poznany (Bui i in., 2007; Rodriguez-Osorio i in., 2012). Wzór metylacji histonów rdzeniowych chromatyny jest bardzo stabilny i utrzymuje się przez kolejne podziały komórkowe dzięki aktywności metylotransferazy histonowej (HMT), przenoszącej grupę metylową z *S*-adenozylometioniny na resztę lizyny lub argininy. Enzym ten metyluje *de novo* syntetyzowane histony, gdy w ich pobliżu znajdują się już zmetylowane histony (Kourmouli i in., 2004; Fisher i Fisher, 2011). Zmetylowane reszty są miejscem rekrutacji różnych białek, w tym białka HP1 (ang. *heterochromatin protein 1*), utrzymującego stan chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie czy białek z rodziny ING (ang. *inhibitor of growth family*), które uznawane są za geny supresorowe transformacji nowotworowej (Bonk i in., 2007; Deshmukh i in., 2011; Buganim i in., 2013).

Pomimo niezwykle wysokiej stabilności epigenetycznych modyfikacji metylujących histony rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej (głównie H3 i H4) odkryto enzymy spełniające funkcje demetylujące reszty lizyny i argininy

w tych histonach, które należą do rodziny demetylaz histonowych (HDMs) (Corry i in., 2009; Narbonne i in., 2012). Z kolei z aktywacją transkrypcyjną genomu wiąże się fosforylacja reszt seryny i treoniny histonów rdzeniowych, przypuszczalnie dzięki odpychaniu się ujemnego ładunku fosfohistonów i DNA. Takie oddziaływanie dekondensuje chromatynę i ułatwia dostęp czynników transkrypcyjnych do regionów promotorowych genów (Prather i in., 2009; Kungulovski i Jeltsch, 2016). Ubikwitynacja, poza rozluźnianiem struktury chromatyny i ułatwianiem transkrypcji, stanowi też warunek następującej po niej metylacji histonów rdzeniowych (Sarmiento i in., 2004; Seki i in., 2005). Dokładna funkcja tych dwóch ostatnich modyfikacji nie jest bliżej poznana, podobnie jak najsłabiej poznanego procesu modyfikacji posttranskrypcyjnych białek histonowych – sumoilacji (Shi i Wu, 2009; Fisher i Fisher, 2011). Z aktywacją transkrypcyjną genomu związany jest również proces acetylacji histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. Modyfikacja ta polega na neutralizującym dodatni ładunek acetylowaniu reszt lizynowych w *N*-końcowych domenach histonów, przez co osłabieniu ulega powinowactwo białka histonowego i DNA oraz rozluźnia się struktura chromatyny (Kim i in., 2002; Jouneau i Renard, 2003; Nashun i in., 2015). Umożliwia to przyłączenie czynników transkrypcyjnych do wybranych sekwencji DNA, inicjację transkrypcji oraz zaburzenie zwijania *N*-końców histonu, co blokuje kondensację chromatyny oraz indukuje jej dekondensację (Vignon i in., 2002; Mason i in., 2012). Acetylacja jest procesem odwracalnym i katalizowanym przez enzym acetylotransferazę histonów (HAT) przy udziale donora grup acetylowych ($-COCH_3$), jakim jest acetylo-CoA. Odwrotny do acetylacji proces deacetylacji reszt lizyny histonów chromatyny jądrowej jest rezultatem działania deacetylaz histonowych (HDACs), które usuwają grupy acetylowe z reszt lizynowych w *N*-końcach ogonów histonowych (Rybouchkin i in., 2006; Gonzales-Cope i in., 2016).

Należy podkreślić, że procesy zachodzące w ramach zmian epigenetycznych nie są efektywne jako procesy pojedyncze. Białka MBP przyłączone do metylowanego DNA tworzą kompleksy z enzymami HDACs i ten etap dopiero prowadzi do kondensacji chromatyny (heterochromatynizacji) i transkrypcyjnego wyciszenia genów. Białka modyfikujące histony, takie jak: HP1, LSD1 (ang. *lysine-specific demethylase 1*), czy PRMT1 (ang. *protein arginine methyltransferase 1*) przyczyniają się do nasilenia aktywności biokatalitycznej metylotransferaz DNA (DNMTs), odpowiedzialnych za procesy metylacji DNA. Kowalencyjne modyfikacje histonów oraz procesy metylacji DNA są zatem zjawiskami współzależnymi, mogącymi się wzajemnie indukować. Wcześniejszy pogląd, że metylacja DNA jest pierwotna względem modyfikacji biochemicznych histonów, zweryfikowano w ostatnich latach. Okazało się bowiem, że deacetylacja i hipermetylacja reszt lizyny w białkach histonowych zachodzą przed metylacją reszt cytozyny DNA, jednocześnie warunkując ten proces (Nagashima i in., 2007; Ning i in., 2013).

Podsumowując, modyfikacje epigenomowe prowadzą łącznie do zmian w stopniu ekspresji poszczególnych genów. Zmiany w aktywności transkrypcyjnej genów odbywają się na skutek represji/supresji nukleosomowej (tj. wyciszenia ekspresji genów; ang. *gene silencing*), indukowanej: 1) hipermetylacją DNA i reszt

lizyny histonów; 2) demetylacją reszt argininy histonów i 3) hipoacetylacją reszt lizyny histonów chromatyny jądrowej. Mogą one także odbywać się na skutek stymulacji aktywności transkrypcyjnej genów (tj. wzmocnienia ekspresji genów; ang. *gene expression enhancing*), której towarzyszy: 1) demetylacja reszt cytozyny DNA i reszt lizyny histonów; 2) hipermetylacja reszt argininowych histonów i 3) hiperacetylacja reszt lizyny histonów H3 i H4 (Santos i in., 2002, 2003; Armstrong i in., 2006; Buganim i in., 2013).

1.4. Struktura, funkcje oraz dziedziczenie kodu epigenetycznego na poziomie DNA jądrowego i na poziomie chromatyny jądrowej

Całkowity wzorzec oraz poziom stabilności modyfikacji epigenetycznych genomu jądrowego oraz białek histonowych chromatyny jądrowej (epigenom) leżą u podstaw tzw. pamięci epigenetycznej komórki o ściśle określonym (tkankowo-specyficznym) wzorcu ekspresji genów, który z kolei determinuje stopień zróżnicowania komórkowego. Profil pamięci epigenetycznej komórki jest informacją precyzyjnie zaszyfowaną w postaci kodu epigenetycznego, którego sekwencje są zgrupowane, zaprogramowane i odczytywane w sposób złożony, tj. na poziomie dwóch podstawowych układów strukturalno-funkcjonalnych: 1) epigenomowego kodu metylującego DNA (metylomu) oraz 2) epigenomowego kodu histonowego chromatyny (epigenomu histonowego). Profil pamięci epigenetycznej zależy zatem z jednej strony od częstotliwości metylacji DNA i histonów oraz stopnia acetylacji białek histonowych, a z drugiej – od pozytywnych lub negatywnych korelacji między tymi dwoma rodzajami modyfikacji kowalencyjnych genomu, a także od stosunku ilościowego globalnych lub sekwencyjnie-specyficznych miejsc metylacji DNA do miejsc metylacji i deacetylacji histonów lub jego odwrotności, tj. miejsc demetylacji DNA do miejsc demetylacji i acetylacji histonów (Reik i in., 2003b; Whitworth i Prather, 2010; Wen i in., 2014).

Informacja zaprogramowana w kodzie epigenetycznym, uwarunkowanym przez sekwencję kowalencyjnych modyfikacji DNA i białek chromatyny jądrowej, jest dziedziczna, podobnie jak informacja zapisana w kodzie genetycznym, uwarunkowanym przez sekwencję nukleotydów DNA. Wysoka odziedziczalność utrwalonego profilu pamięci epigenetycznej komórek o ich wzorcu ekspresji genów jest potwierdzeniem wysokiej międzypokoleniowej stabilności kodu epigenetycznego w komórkach linii rodzicielskiej oraz w komórkach linii potomnych. Z kolei zaburzenia w dziedziczeniu pamięci epigenetycznej prowadzą często do utrwalenia błędnych rearanżacji (tzw. epimutacji) we wzorcach kowalencyjnych modyfikacji DNA i chromatyny jądrowej w kolejnych generacjach komórek. Zaburzenia w dziedziczeniu kodu epigenetycznego mają miejsce głównie w wyniku nieprawidłowego lub niepełnego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego w komórkach rozwijających się zarodków. Są one bezpośrednią przyczyną akumulowania epimutacji w kolejnych sekwencjach kowalencyjnych modyfikacji DNA i chromatyny jądrowej w liniach potomnych komórek za-

rodkowych (Yamazaki i in., 2003; Wee i in., 2007; Yang i in., 2007; Wang i in., 2011a).

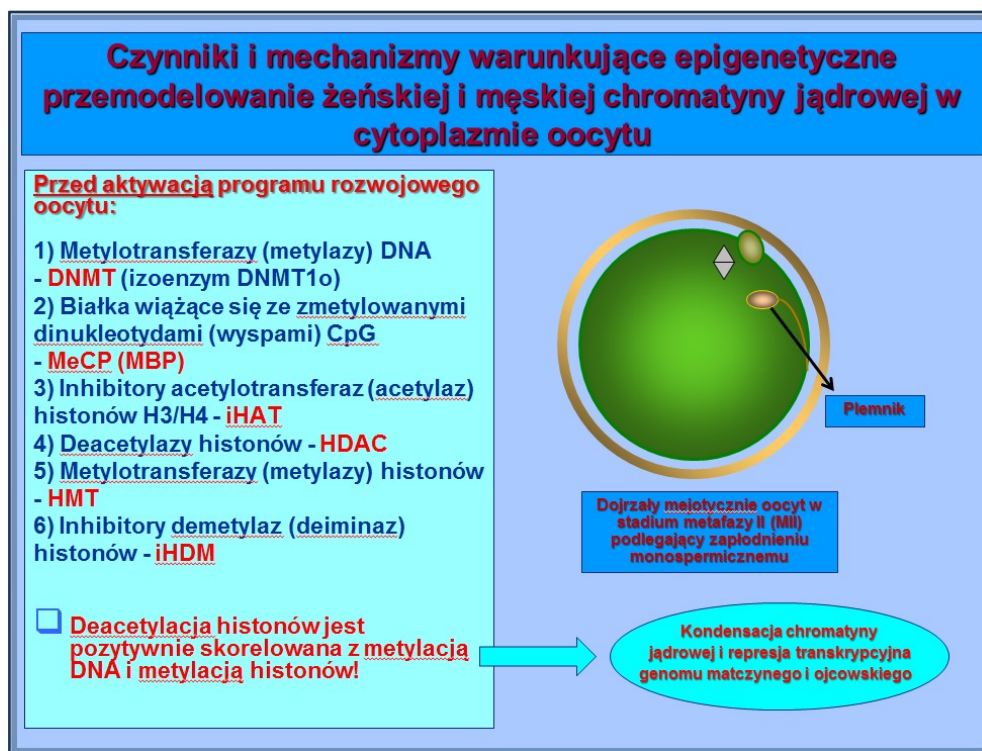
1.5. Czynniki oraz mechanizmy warunkujące epigenetyczne przemodelowanie matczynej i ojcowskiej chromatyny jądrowej przed i po aktywacji zarodkowego programu rozwojowego oocytu

Wstępny etap przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej genomów rodzicielskich w oocytach znajdujących się w stadium metafazy II podziału mejozytycznego (MII) oraz w 1-blastomerowych zarodkach (zygotach) ssaków stanowi strukturalne (architektoniczne) i epigenetyczne przemodelowanie chromatyny jądrowej (ryc. 2, 3). Obejmuje ono wszystkie zmiany konformacyjne i biochemiczne, jakim podlega żeńska (matczyzna) i męska (ojcowska) chromatyna jądrowa w wyniku zapłodnienia dojrzałego mejozytycznego oocytu w stadium MII przez plemnik (Fissore i in., 1999; Novak i in., 2004; Santos i Dean, 2004; Eilertsen i in., 2007). Te zmiany strukturalno-funkcjonalne prowadzą w następstwie aktywacji zapłodnionych oocytów (zygot) do powstania interfazowych jąder komórkowych (przedjądrzy). Mechanizm epigenetycznego przemodelowania matczynej/oocytarnej i ojcowskiej/plemnikowej chromatyny jądrowej jest związany z intensywnymi modyfikacjami kowalencyjnymi reszt lizyny i argininy białek histonowych rdzenia nukleosomowego (głównie histonów H3 i H4) (Reik i in., 2003a, b; Deshmukh i in., 2011).

Przed aktywacją programu rozwojowego oocytu MII w następstwie zapłodnienia żeńska i męska chromatyna jądrowa podlegają oddziaływaniu obecnych w ooplazmie białkowych czynników regulujących epigenetycznie poziom aktywności transkrypcyjnej genomu matczynego i ojcowskiego (ryc. 2) (Santos i in., 2002; Sarmiento i in., 2004; Esteves i in., 2011). Do czynników tych należą:

- 1) metylotransferazy (metylazy) DNA – DNMTs (m.in. specyficzny dla oocytów izoenzym DNMT1o);
- 2) białka wiążące się ze zmetylowanymi dinukleotydami (wyspami) CpG – MBPs;
- 3) inhibitory acetylotransferaz (acetylaz) histonów H3 i H4 – iHATs;
- 4) deacetylazy histonów – HDACs;
- 5) metylotransferazy (metylazy) histonów – HMTs;
- 6) inhibitory demetylaz (deiminaz) reszt lizyny histonów – iHDMs.

W wyniku oddziaływania tych czynników mają miejsce zaawansowane procesy metylacji/deacetylacji reszt lizyny histonów H3 i H4 oraz procesy demetylacji reszt argininy tych histonów (Kourmouli i in., 2004; Liu i in., 2004). Należy podkreślić, że deacetylacja histonów jest pozytywnie skorelowana z metylacją DNA i metylacją reszt lizyny histonów (Dean i in., 2003; Shi i Wu, 2009). Efektem tych procesów jest zarówno kondensacja żeńskiej i męskiej chromatyny jądrowej, czyli heterochromatynizacja genomu matczynego i ojcowskiego, jak i represja transkrypcyjna genomów rodzicielskich (ryc. 2).



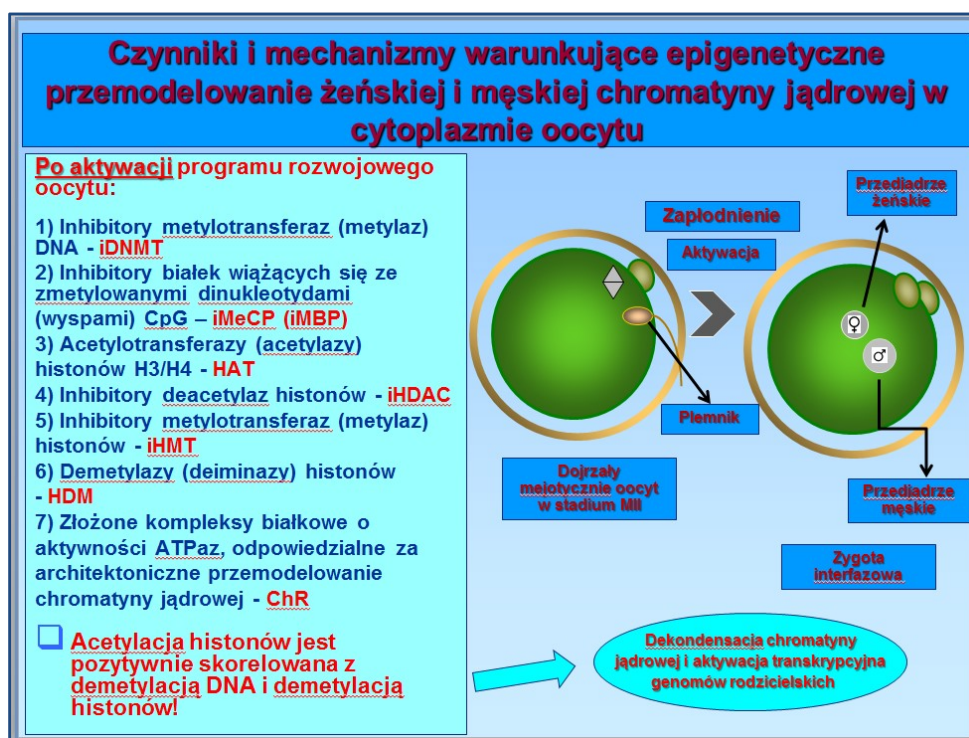
Ryc. 2. Wstępny etap przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego w cytoplazmie oocytu ssaka – strukturalne i epigenetyczne przemodelowanie żeńskiej i męskiej chromatyny przed aktywacją zarodkowego programu rozwojowego

Z kolei po aktywacji programu rozwojowego monospermicznie zapłodnionego oocytu MII na żeńską i męską chromatynę jądrową oddziałują antagonistyczne do wspomnianych wcześniej ooplazmatyczne i nukleoplazmatyczne czynniki kontrolujące aktywność transkrypcyjną genomów rodzicielskich (ryc. 3) (Vignon i in., 2002; Wrenzycki i Niemann, 2003; Nashun i in., 2015). Wśród tych czynników niezwykle istotną rolę odgrywają:

- 1) inhibitory metylotransferaz (metylaz) DNA – iDNMTs;
- 2) inhibitory białek wiążących się ze zmetylowanymi dinukleotydam CpG – iMBPs;
- 3) acetylotransferazy (acetylazy) histonów H3 i H4 – HATs;
- 4) inhibitory deacetylaz histonów – iHDACs;
- 5) inhibitory metylotransferaz (metylaz) histonów – iHMTs;
- 6) demetylazy (deiminazy) reszt lizyny histonów – HDMS;

7) złożone kompleksy białkowe o aktywności ATPaz, odpowiedzialne za architektoniczne przemodelowanie chromatyny jądrowej – ChRs (ang. *chromatin remodelers*).

W wyniku oddziaływania tych czynników zachodzą takie procesy jak: demetylacja/acetylacja reszt lizyny oraz metylacja reszt argininy białek histonowych (Liu i in., 2004; Corry i in., 2009; Gonzales-Cope i in., 2016). W tym przypadku należy podkreślić, że acetylacja histonów jest pozytywnie skorelowana z demetylacją DNA i demetylacją reszt lizyny histonów (Mayer i in., 2000; Niemann i in., 2002; Bui i in., 2007; Ning i in., 2013). Procesom tym towarzyszy: 1) dekondensacja chromatyny maczycznej i plemnikowej, tj. euchromatynizacja żeńskiego i męskiego genomu jądrowego, a następnie – po odtworzeniu otoczek jądrowych – 2) uformowanie interfazowych jąder zygoty (mniejszego przedjądrza żeńskiego i większego przedjądrza męskiego) oraz 3) aktywacja transkrypcyjna genomów rodzicielskich (ryc. 3).



Ryc. 3. Wstępny etap przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego w cytoplazmie oocytu i zygoty ssaka – strukturalne i epigenetyczne przemodelowanie żeńskiej i męskiej chromatyny po aktywacji zarodkowego programu rozwojowego

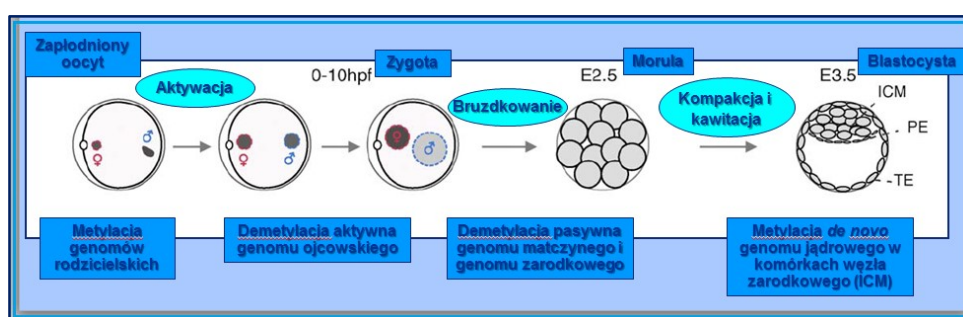
1.6. Mechanizmy determinujące przeprogramowanie pamięci epigenetycznej genomu jądrowego w rozwoju zarodkowym

Przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej DNA jądrowego pochodzenia oocytarnego/matczynego i plemnikowego/ojcowskiego (ryc. 4) dotyczy dwustopniowo przebiegających, nie tylko w cytoplazmie zapłodnionych oocytów, lecz także w przed- i poimplantacyjnej fazie rozwoju zarodków, zmian biochemicznych w obrębie informacji zapisanej w postaci kodu epigenetycznego na poziomie metylacji DNA (tzw. metylomu) oraz na poziomie epigenomu histonowego chromatyny jądrowej (Kang i in., 2002; Cezar i in., 2003; Armstrong i in., 2006; Buganim i in., 2013).

W pierwszym etapie proces epigenetycznego przeprogramowania rodzicielskich genomów jądrowych obejmuje dwucykliczną falę intensywnej demetylacji aktywnej (niezależnej od replikacji) w obrębie reszt cytozyny DNA ojcowskiego i demetylacji pasywnej (zależnej od replikacji) w obrębie reszt cytozyny DNA matczynego, którym towarzyszy hiperacetylacja i demetylacja reszt lizyny histonów (głównie H3 oraz H4) oraz metylacja reszt argininy histonów H3 i H4. Początkowa faza (I cykl) tych kowalencyjnych modyfikacji DNA oraz białek histonowych męskiej i żeńskiej chromatyny jądrowej zachodzi między stadium zygoty a stadium rozwojowym zarodka, w którym ma miejsce inicjacja aktywności transkrypcyjnej genomu zarodkowego, czyli przejście z matczynego do zarodkowego kontroli nad ekspresją genów niezbędnych do dalszego rozwoju (Allegrucci i in., 2005; Bonk i in., 2007, 2008; Corry i in., 2009). Moment aktywacji transkrypcyjnej genomu zarodkowego u różnych gatunków ssaków występuje w innych okresach przedimplantacyjnej fazy embriogenezy, np. u myszy – we wczesnym stadium 2-komórkowym, u świni, szczura i ssaków z rzędu naczelnych (w tym człowieka) – w późnym stadium 4-blastomerowym, natomiast u królika i przeżuwaczy (bydło, owce, kozy) – w stadiach 8–16-blastomerowych. Końcowa faza (II cykl) demetylacji reszt cytozyny DNA, a także acetylacji i demetylacji reszt lizyny oraz metylacji reszt argininy białek histonowych ma z kolei miejsce między stadium rozwojowym przypadającym na okres po aktywacji transkrypcyjnej genomu zarodkowego a stadiami moruli i blastocysty (Christians i in., 1994; Beaujean i in., 2004; Shi i in., 2004; Lagutina i in., 2010, 2011).

Drugi etap epigenetycznie uwarunkowanego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej DNA genomowego rozpoczyna się z chwilą osiągnięcia przez rozwijający się zarodek stadium późnej blastocysty ulegającej procesowi gastrulacji. Cechą charakterystyczną dla przebiegu tego etapu epigenetycznej rearanżacji genomu jądrowego jest gwałtownie postępująca fala metylacji *de novo* reszt cytozyny DNA w komórkach węzła zarodkowego (embrioblastu/ICM; ang. *inner cell mass*), różnicujących się następnie w komórki epiblastu (ektodermy pierwotnej) oraz hipoblastu (endodermy pierwotnej). Ponadto należy wyszczególnić istnienie mechanizmu dodatniego sprzężenia zwrotnego między procesami remetylacji DNA a procesami deacetylacji i metylacji *de novo* reszt lizyny oraz demetylacji *de novo* reszt argininy histonów rdzenia nukleosomowego. W komórkach linii somatycznej

(somatogenicznej), wywodzących się z wyspecjalizowanych komórek wężła zarodkowego zasiedlających epiblast i hipoblast, ma miejsce ilościowe przywrócenie globalnych modyfikacji epigenetycznych w formie remetylacji reszt cytozyny w obrębie dinukleotydów CpG. Niemniej jednak w tym ostatnim przypadku jest ustalany zupełnie nowy kod epigenetyczny w wyniku tkankowo-specyficznego różnicowania komórek. Natomiast w komórkach pozazarodkowych, pochodzących z linii komórek trofoektodermalnych, jest utrzymywany stan hipometylacji genomu jądrowego (Yang i in., 2007; Shi i Wu, 2009; Yamanaka i in., 2009; Buganim i in., 2013).



Ryc. 4. Schemat epigenetycznego przemodelowania i przeprogramowania genomu jądrowego w przedimplantacyjnym rozwoju zarodków myszy. Objasnienia skrótów: ICM – węzeł zarodkowy/embrioblast (ang. *inner cell mass*); PE – endoderma pierwotna/hipoblast (ang. *primitive endoderm*); TE – trofoektoderma/trofoblast (ang. *trophectoderm*)

1.7. Zaburzenia w epigenetycznym przemodelowaniu i przeprogramowaniu genomu jądrowego zarodków

Błędne rearanżacje zachodzące w epigenetycznym przemodelowaniu i przeprogramowaniu genomu jądrowego zarodków (tzw. epimutacje) prowadzą do nieprawidłowych zmian we wzorcach ekspresji genów odpowiedzialnych za regulację rozwoju zarodkowego (Mann i Bartolomei, 2002; Mann i in., 2003; Fernandez-Gonzales i in., 2004; Kim i in., 2004; Bonk i in., 2008). Rezultatem nadmiernej demetylacji reszt cytozyny genomowego DNA, której towarzyszy stan hipometylacji i hiperacetylacji histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej, jest nadekspresja tych genów (Inoue i in., 2002; Lee i in., 2003a; Ogawa i in., 2003; Young i in., 2003; Mann i in., 2004; Paoloni-Giacobino i Chaillet, 2004; Deshmukh i in., 2011; Narbonne i in., 2012). Z kolei nadmierna metylacja reszt cytozyny DNA, która przyczynia się do utrwalenia stanu hipermetylacji i hipoacetylacji histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny, powoduje wyciszenie aktywności transkrypcyjnej genów kontrolujących embriogenezę (Kang i in., 2002; Lorincz i in., 2002; Bortvin i in., 2003; Cezar i in., 2003; Park i in., 2004a; Pfister-Genskow

i in., 2005; Wee i in., 2007; Bonk i in., 2007, 2008; Matoba i in., 2014). Mutacje epigenetyczne, które są często obserwowane w rozwoju zarodków i płodów uzyskiwanych na drodze technologii wspomaganego rozrodu zwierząt (klonowanie somatyczne, zapłodnienie *in vitro*), skutkują wieloma negatywnymi konsekwencjami (De Sousa i in., 2001; Chavatte-Palmer i in., 2002; Hill i in., 2002; Koo i in., 2002; Niemann i in., 2002; Young i in., 2003; Fernandez-Gonzales i in., 2004; Shi i in., 2004; Park i in., 2005; Smith i in., 2012). Wśród najpoważniejszych skutków epimutacji należy wymienić:

- 1) niski przed- i poimplantacyjny potencjał rozwojowy zarodków;
- 2) słabą jakość przedimplantacyjnych zarodków;
- 3) zaburzenia procesów implantacji blastocyst w *endometrium* macicy i procesów powstawania łożyska (placentacji) oraz liczne wady anatomico-histologiczne łożyska;
- 4) wysoką śmiertelność zarodków i płodów w okresie okołoimplantacyjnym oraz okołourodzeniowym;
- 5) wysoki odsetek poronień (resorpcji płodów) w I trymestrze ciąży;
- 6) transformację nowotworową komórek w zarodkach i płodach;
- 7) zaburzenia w procesach różnicowania komórek w ramach ich tkankowo- i organospecyficznego specjalizacji w czasie histo- i organogenezy;
- 8) wady rozwojowe płodów i potomstwa, wynikające z letalnych lub subletalnych efektów anatomico- i histopatologicznych w obrębie różnych narządów wewnętrznych;
- 9) ujawnienie się fenotypowych cech charakterystycznych dla syndromów nadmiernej masy okołourodzeniowej potomstwa (ang. *Large Offspring Syndrome*; LOS) oraz przerostu (hiperplazji i hipertrofii komórek) łożyska (ang. *Large Placenta Syndrome*; LPS);
- 10) brak spontanicznych porodów.

1.8. Sztuczna transformacja/modulacja profilu pamięci epigenetycznej genomu jądrowego zarodków oraz zastosowanie praktyczne sztucznej modulacji epigenetycznej komórek

Czynnikiem determinującym nie tylko przed- i poimplantacyjny potencjał rozwojowy, lecz także jakość zarodków jest stopień zaawansowania epigenetycznych modyfikacji ich genomu jądrowego. Obniżenie aktywności transkrypcyjnej DNA genomowego może być spowodowane gwałtownym wzrostem częstotliwości takich zmian w pamięci epigenetycznej komórek zarodkowych (blastomerów) jak: 1) procesy metylacji reszt cytozyny DNA oraz 2) procesy deacetylacji reszt lizyny histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej (Bonk i in., 2007, 2008; Yamanaka i in., 2009; Whitworth i Prather, 2010; Deshmukh i in., 2011). Jednakże te szkodliwe dla funkcji fizjologicznych i przeżywalności blastomerów transformacje biochemiczne genomu jądrowego można zahamować, a nawet odwrócić ich przebieg w kierunku wzrostu natężenia ekspresji genów, korzystnego dla aktywno-

ści metabolicznej i proliferacyjnej komórek zarodkowych. Jednym ze sposobów odwrócenia zaawansowanych zmian we wzorcu kowalencyjnych modyfikacji epigenetycznych, które obejmują gwałtowną metylację DNA lub spadek poziomu acetylacji białek histonowych, wydaje się być ekspozycja oocytów i/lub zarodków na działanie syntetycznych analogów endogennych związków odwracalnie hamujących aktywność metylotransferaz DNA (inhibitory DNMT) oraz deacetylaz histonów (inhibitory HDAC) (Li i in., 2008; Cervera i in., 2009; Zhao i in., 2010a; Wang i in. 2011a, b; Song i in., 2014).

Do grupy inhibitorów DNMT należą:

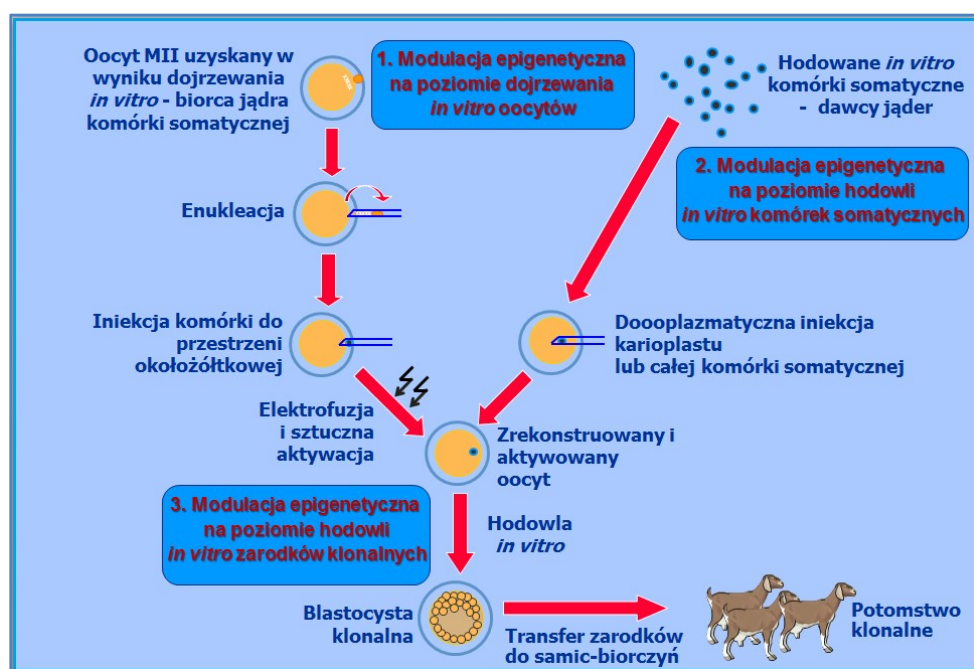
- 1) 5-aza-2'-deoksycytydina (decytabina; 5-aza-dC) (Enright i in., 2005; Ding i in., 2008; Huan i in., 2013; Ning i in., 2013);
- 2) zebularyna (nukleozydowy analog cytydyny) (Diao i in., 2013; Xiong i in., 2013);
- 3) *S*-adenozylhomocysteina (SAH) (Jeon i in., 2008).

Z kolei druga grupa egzogennych modulatorów epigenetycznych z rodziny inhibitorów HDAC obejmuje:

- 1) trichostatynę A (*N*-arylowa/*N*-fenyłowa pochodna kwasu hydroksamowego; TSA) (Wee i in., 2007; Li i in., 2008; Lee i in., 2010b; Bo i in., 2011; Samiec i in., 2015);
- 2) skryptaid (hydroksyamid kwasu 6-(1,3-dioksy-1*H*,3*H*-benzo[de]izokwinolin-2-ylo)-heksanowego) (Van Thuan i in., 2009; Zhao i in., 2009, 2010b; Xu i in., 2013; Wen i in., 2014);
- 3) kwas walproinowy (kwas 2-propylopentanowy/kwas 2-propyłowalerianowy; VPA) lub walproinian sodu (2-propylopentanian sodu/2-propyłowalerian sodu; SV) (Costa-Borges i in., 2010; Kim i in., 2011; Sangalli i in., 2014);
- 4) oksamflatynę (aromatyczna/*N*-fenyłowa pochodna sulfonoamidu kwasu hydroksamowego) (Su i in., 2011; Park i in., 2012);
- 5) butanian sodu (maślan sodu; NaBu) (Das i in., 2010; Liu i in., 2012; Kumar i in., 2013);
- 6) *bis*hydroksyamid kwasu *m*-karboksycynaminowego (CBHA) (Dai i in., 2010; Song i in., 2014).

Wyniki licznych badań wskazują, że zastosowanie inhibitorów DNMT i/lub inhibitorów HDAC do sztucznej transformacji profilu pamięci epigenetycznej genomu jądrowego hodowanych *in vitro* oocytów i zarodków różnych gatunków ssaków (ryc. 5) wywiera pozytywny wpływ na złożone procesy przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej genów. Ten korzystny wpływ przejawia się w przywróceniu scenariusza prawidłowego i pełnego przeprogramowania pamięci epigenetycznej jąder komórkowych w rozwijających się zarodkach i płodach oraz w przywróceniu prawidłowego wzorca ekspresji genów w ich komórkach poprzez zwiększenie częstotliwości pasywnej i aktywnej demetylacji reszt cytozyny DNA oraz osłabienie natężenia deacetylacji (tj. wzmożoną hiperacetylację) reszt lizyny histonów chromatyny jądrowej (Wu i in., 2008; Martinez-Diaz i in., 2010; Wang i in., 2011a; Song i in., 2014). Pośrednim wskaźnikiem właściwego przebiegu procesu epigenetycznego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej DNA ge-

nomowego w transformowanych/modulowanych epigenetycznie zarodkach, które uzyskano na drodze technologii wspomaganego rozrodu zwierząt (ARTs; ang. *assisted reproductive technologies*) takich jak: klonowanie somatyczne (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*), standardowe zapłodnienie *in vitro* (IVF; ang. *in vitro fertilization*) i mikrochirurgiczne zapłodnienie *in vitro* techniką docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI; ang. *intracytoplasmic sperm injection*), jest ich wysoki przed- i poimplantacyjny potencjał rozwojowy oraz poprawa ich jakości morfologicznej i cytobiochemicznej (Wee i in., 2007; Yang i in., 2007; Shi i Wu, 2009; Diao i in., 2013).



Ryc. 5. Modulacja profilu pamięci epigenetycznej genomu jądrowego zarodków kozy domowej uzyskiwanych na drodze klonowania somatycznego

Obecnie sztuczna modulacja epigenetyczna komórek znajduje także praktyczne zastosowanie w nowoczesnych terapiach antynowotworowych (tzw. epiterapiach) (Galetzka i in., 2012; Hitchins, 2015; Roos i in., 2014, 2016). Z jednej strony celem onkologicznych epiterapii nowej generacji jest wykorzystanie egzogennych modulatorów/modyfikatorów epigenetycznych, albo z grupy niespecyficznych bądź specyficznych inhibitorów DNMT i/lub HDAC, albo z grupy ektopowych acetylotransferaz (acetylaz) histonów (HATs) i/lub demetylaz reszt lizyny

histonów H3 oraz H4 (HDMs), do wywołania stosunkowo szybkiej i skutecznej inaktywacji kaskady patogenetycznych procesów wewnątrzkomórkowej kancerogenezy (karcynogenezy) (Huang i Wen, 2015; Jankowska i in., 2015; Maes i in., 2015; Riedel i in., 2015). Z drugiej zaś strony celem tych nowatorskich metod epigenetycznie uwarunkowanej chemioterapii przeciwnowotworowej jest inicjowanie procesów nieodwracalnego unicestwiania, tj. starzenia się i mortalizacji (uśmierlenia) komórek neoplastycznych (nowotworowych) poprzez uaktywnienie antymitogennego/cytostatycznego profilu oddziaływania ścieżek epigenomowo-zależnej supresji złośliwej transformacji onkogennej komórek (Kratz i in., 2014; Jia i in., 2016; Kamdar i in., 2016; Benevolenskaya i in., 2016).

Wyżej wymienione strategie epigenetycznej terapii onkologicznej są coraz częściej stosowane w badaniach przedklinicznych i w próbach klinicznych związanych z opracowaniem i optymalizacją leczenia:

- 1) raków pochodzenia zarodkowego (potworniaki i rozrodczaki jajnika, nasieniaki jąder, kosmówczaki, rdzeniaki zarodkowe);
- 2) nowotworów hematologicznych (ostra białaczka szpikowa, przewlekła białaczka limfocytowa, zespoły mielodysplastyczne, chłoniaki);
- 3) nowotworów jelita grubego (okrzężnicy), prostaty i piersi.

Ponadto aplikacyjne możliwości sztucznej transformacji epigenetycznej komórek przy użyciu ektopowych inhibitorów DNMT i/lub HDAC bądź acetylaz i/lub demetylaz reszt lizyny białek histonowych (HATs i/lub HDMs) zostały zwiększone poprzez ich wykorzystanie w nowoczesnych metodach epiterapeutycznych, stosowanych nie tylko w przypadku zdiagnozowania u pacjentów chorób neurodegeneracyjnych, lecz również w przypadku identyfikacji u nich konkretnych jednostek chorobowych, które są ujęte w aktualnych klasyfikacjach psychiatrycznych (Best i Carey, 2010; Qureshi i Mehler, 2011; Shimamura i in., 2011; Ai i in., 2012; Brunet i Berger, 2014; Lee i Sachdev, 2014; Tremolizzo i in., 2014; Maes i in., 2015).

Te nowatorskie metody terapii epigenetycznej są bowiem ukierunkowane na próby przedkliniczne oraz praktykę kliniczną, optymalizującą strategie leczenia takich chorób neurodegeneracyjnych jak:

- 1) choroba Alzheimerera;
- 2) choroba Parkinsona;
- 3) choroba Huntingtona (płásawica Huntingtona);
- 4) stwardnienie rozsiane (łac. *sclerosis multiplex* – SM; ang. *multiple sclerosis* – MS);
- 5) stwardnienie zanikowe boczne (choroba Charcota, choroba Lou Gehriga, choroba neuronu ruchowego; łac. *sclerosis lateralis amyotrophica* – SLA; ang. *amyotrophic lateral sclerosis* – ALS) (Gray i Dangond, 2006; Cacabelos i Torrellas, 2014; Devall i in., 2014; Wang i in., 2014; Bennett i in., 2015; Feng i in., 2015b; Gjoneska i in., 2015; Küçükali i in., 2015; Narayan i in., 2015; Pihlstrøm i in., 2015; Valor, 2015; Fagone i in., 2016; Neven i in., 2016).

Wspomniane wcześniej epiterapie nowej generacji znajdują także coraz szersze zastosowanie w przedklinicznej i klinicznej fazie badań, mających na celu

stworzenie nowoczesnych i doskonalenie już istniejących metod leczenia takich chorób psychicznych jak:

- 1) choroba afektywna dwubiegunowa (psychoza maniakalno-depresyjna, cyklofrenia);
- 2) schizofrenia;
- 3) depresja;
- 4) autyzm;
- 5) demencja;
- 6) alkoholizm;
- 7) skłonności samobójcze, autodestrukcyjne i neurotyczne (Archer i in., 2010; Ai i in., 2012; Lee i Sachdev, 2014; Wong i in., 2014; Tremolizzo i in., 2014; Castellani i in., 2015; Ibi i González-Maeso, 2015; Januar i in., 2015; Fries i in., 2016; Walker i in., 2016).

O istotności błędnych modyfikacji biochemicznych DNA i chromatyny jądrowej jako epimutacji determinujących występowanie różnych fenotypów chorobowych świadczyć może tworzenie elektronicznych katalogów biomedycznych (baz danych), które obejmują wzajemne zależności między mutacjami genetycznymi (genowymi i chromosomowymi), mutacjami epigenetycznymi w obrębie kodu metylującego DNA (metylomu) oraz kodu histonowego chromatyny (epigenomu histonowego) oraz rearanżacjami struktury przestrzennej (architektoniki) chromatyny jądrowej i rozwojem cech genotypowych i fenotypowych charakterystycznych dla określonych jednostek chorobowych (Ai i in., 2012; Brunet i Berger, 2014; Devall i in., 2014; Bennett i in., 2015; Hitchins, 2015; Huang i Wen, 2015; Pihlstrøm i in., 2015; Riedel i in., 2015). Najpełniejszym, jak dotąd, uwzględniającym wszystkie te powiązania katalogiem wydaje się być baza danych DANCER (ang. *Disease-Annotated Chromatin Epigenetics Resource*) (Archer i in., 2010; Küçükali i in., 2015; Lardenoije i in., 2015; Narayan i in., 2015; Yan i in., 2016).

Część II

Epigenetyczne uwarunkowania ontogenetycznego rozwoju ssaków klonalnych

Redakcja naukowa:
MARCIN SAMIEC

2. Biotechnologiczne, molekularne oraz epigenetyczne podstawy klonowania somatycznego ssaków

Technologia klonowania somatycznego reprezentuje jedną z metod genetycznej/genomowej inżynierii embrionalnej, która w przeciwieństwie do transgenetyki zwierząt obejmuje mikromanipulacje dotyczące już nie pojedynczych genów DNA jądrowego, lecz całego genomu jądrowego i/lub mitochondrialnego zarówno interfazowych komórek somatycznych – dawców jąder, jak i żeńskich komórek płciowych (dojrzałych *in vitro* lub *in vivo* oocytów, których cykl mejotyczny został zablokowany w stadium metafazy II; MII), stanowiących źródło biorców dla egzogennej informacji genetycznej. Spośród wszystkich technik klonowania ssaków klonowanie somatyczne umożliwia uzyskiwanie najbardziej licznych klonów, czyli grup identycznych genetycznie osobników. W klonowaniu somatycznym ssaków dostęp do komórek-dawców jąder jest praktycznie nieograniczony. Próbkę tkanek pobierane drogą biopsji od osobników dorosłych lub płodów składają się z setek tysięcy komórek, które dodatkowo można namnażać w warunkach hodowli *in vitro*. Ponadto w przypadku klonowania określonych osobników dorosłych biopsję tkanek przeprowadzać można wielokrotnie, uzyskując za każdym razem identyczne klony (Samiec i Skrzyszowska, 2011a, b).

Klonowanie metodą transplantacji jąder komórek somatycznych do enukleowanych oocytów MII wykorzystywane jest obecnie w technologiach wspomaganego rozrodu (ARTs) wielu gatunków ssaków, w tym różnych gatunków zwierząt gospodarskich. Wykorzystanie tej technologii w embriologii eksperymentalnej oraz w molekularnej genetyce populacji ma ważne znaczenie dla hodowli zwierząt gospodarskich. Klonowanie jako metoda rozrodu aseksualnego ma związek m.in. z możliwością produkcji i/lub multiplikacji monogenetycznego i jedнопłciowego potomstwa o wysokiej wartości hodowlanej i użytkowej, którego identyczność genotypowa i fenotypowa z progenitorowym dawcą transkrypcyjnego aparatu jądrowego i mitochondrialnego komórki somatycznej dotyczy jedynie DNA genomowego. Osobniki, które są uzyskiwane na drodze klonowania somatycznego, różnią się bowiem pod względem cech fenotypowych, uwarunkowanych losową segregacją matczyngo/oocytarnego oraz somatogenicznego genomu mitochondrialnego (mtDNA) w następstwie cytoplazmatycznego (pozajądrowego) dziedziczenia materiału genetycznego (Samiec, 2005a, b). Niemniej jednak szczególnie wysoka wartość aplikacyjna technologii klonowania somatycznego jest związana z możliwością uzyskiwania identycznych genotypowo i fenotypowo zwierząt transgenicznych, czyli zwierząt o transformowanych genomach jądrowych, cennych ze względu na produkt ekspresji zmodyfikowanych genów (Samiec i Skrzyszowska, 2011a). Wydajność syntezy rekombinowanych białek transgenicznych przez transformowane genetycznie osobniki klonalne wydaje się być zależna w pewnym stopniu od wpływu heteroplazmatycznych źródeł genotypu mitochondrialnego (tzw. mitotypu) na profil aktywności transkrypcyjnej zmodyfikowanych genów DNA jądrowego, a zależność ta może mieć charakter korelacji negatywnej

o wysokim współczynniku odziedziczalności oraz powtarzalności regresywnej danej cechy ilościowej i jakościowej, wynikającej z transgenizacji stada hodowlanego (Samiec, 2005b). Niezwykle istotnym dla produkcji/powielania osobników klonalnych, będących założycielami linii zwierząt transgenicznych (ang. *clonal founder animals*), jest zatem problem generowania potomstwa identycznego również w zakresie genomu mitochondrialnego, czyli będącego nośnikami jedynie homoplazmatycznych kopii mtDNA, pochodzących albo z oocytów-biorców, albo z somatycznych komórek-dawców zmodyfikowanych genetycznie jąder. Nie bez znaczenia pozostaje bowiem wpływ dziedziczenia pozajądrowej informacji genetycznej, zakumulowanej w mitochondrialnych rezerwuarach komórek zarówno linii somatycznej (somatogenicznej), jak i germinalnej (gametogenicznej) na aktywność transkrypcyjną *loci* takich cech ilościowych (ang. *quantitative trait loci*; QTL) jak np. niektóre cechy reprodukcyjne m.in. plenność czy płodność, a także cechy użytkowe/produkcyjne, m.in. te związane z mięsnością (powierzchnia oka połędwicy czy zawartość tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej, tkanki łącznej śródmięśniowej i międzymięśniowej oraz tkanki tłuszczowej w poszczególnych wyrebach tuszy lub półtuszy) lub te związane z wydajnością mleczną (pojemność syntezy, sekrecji i eejkcji mleka w skali jednego dnia, jak również w całym okresie laktacji) klonalnych osobników transgenicznych (Samiec, 2005a; Samiec i Skrzyszowska, 2011a). Genetyczne uwarunkowania cech plenności czy płodności od heteroplazmatycznego lub homoplazmatycznego wzorca segregacji genomu mitochondrialnego mogą z kolei wpływać na procesy międzypokoleniowej transmisji transgenów w liniach komórek płciowych kolejnych generacji sklonowanych zwierząt z transformowanym genotypem jądrowym. Natomiast genetyczna korelacja negatywna lub pozytywna między dziedziczonymi wraz z DNA genomowym cechami determinującymi wydajność mleczną lub wydajność rzeźną transgenicznych zwierząt klonalnych a profilem aktywności transkrypcyjnej genów DNA mitochondrialnego może być odpowiedzialna z jednej strony za zróżnicowany poziom tkankowo-specyficznej lub organo-specyficznej ekspresji (tj. stopień zahamowania lub uaktywnienia supresji transkrypcyjnej) obcogatunkowych konstrukcji genowych. Z drugiej strony wspomniana wcześniej korelacja ujemna lub dodatnia może również rzutować na schemat/profil ekspresji ksenogenicznych konstrukcji genowych, czyli transgenów w poszczególnych komórkach, tkankach i organach zmodyfikowanych genetycznie osobników klonalnych. Ten schemat aktywności transkrypcyjnej zintegrowanych z genomem jądrowym transgenów może przyjmować charakter homogeny lub heterogeny, czyli może on skutkować indukcją lub też brakiem występowania transgenicznego mozaicyzmu/chimeryzmu u zwierząt klonalnych. Obcogatunkowe, ekspresyjne konstrukcje genowe, które ulegają inkorporacji do genomowego DNA komórek zlokalizowanych w poszczególnych tkankach i narządach transgenicznych osobników klonalnych mogą kodować np. takie rekombinowane białka terapeutyczne, których synteza i sekrecja (egzo- lub endokrynną) jest ukierunkowana na komórki wydzielnicze gruczołu mlekowego lub tkankę mięśniową gładką i poprzecznie prążkowaną wchodzącą w skład wszystkich organów, układów i części ciała u zwierząt gospodarskich (Ju i in., 2015).

Intergenomowa komunikacja między DNA mitochondrialnym a transgenem trwale zintegrowanym z DNA jądrowym może być także powodem różnic w efektywności indukowanej przez niego ukierunkowanej mutagenzie (monoallelicznej delecji lub insercyjnej inaktywacji) genu kodującego miostatynę – specyficzne dla komórek tkanki mięśniowej białko hormonalne, hamujące na drodze regulacji parakrynej przyrost (hipertrofię i hiperplazję) mięśni szkieletowych i gładkich (Zhou i in., 2013).

Atrakcyjność klonowania poszczególnych gatunków zwierząt gospodarskich jest w tym przypadku zdeterminowana możliwościami aplikacyjnymi hormonalnego lub enzymatycznego produktu ekspresji zmodyfikowanego genu. Od tego bowiem zależy przede wszystkim skala i zasięg prowadzonych badań. Mimo że pierwszym uzyskanym ssakiem klonalnym była owca, to znacznie większy zasięg miały prace ukierunkowane na klonowanie somatyczne (SCNT) u bydła, a w ostatnich latach badania z tego zakresu koncentrują się głównie na świniami. Transgeniczne krowy (Liu i in., 2013; Luo i in., 2015), owce (Deng i in., 2013; Zhang i in., 2013), kozy (Meng i in., 2013; Feng i in., 2015a) i świnie (Lu i in., 2015; Ozawa i in., 2015; Ma i in., 2016) mogą stać się i powoli stają się żywymi fabrykami produkującymi i dostarczającymi w fizjologicznych wydzielinach (mleko/siara, plazma nasienia) i wydalinach (mocz), a także płynach ustrojowych (krew) ludzkie rekombinowane białka terapeutyczne (Wang i in., 2013).

Atrakcyjność klonowania świń wiąże się z możliwością wykorzystania tkanek i narządów transgenicznych osobników tego gatunku ssaków jako alternatywnego źródła przeszczepów w medycynie transplantacyjnej u ludzi (Oropeza i in., 2009; Phelps i in., 2009; Ahn i in., 2011; Hwang i in., 2015). Ksenotransplantacja z wykorzystaniem tkanek i organów świni, najbardziej kompatybilnych z ich ludzkimi odpowiednikami (ze względu na 96-procentową zgodność genetyczną, a także znaczne podobieństwa odnotowane w obrazie topograficznym oraz w charakterystyce morfologicznej, cytologicznej, histologicznej, anatomicznej i w wydolności fizjologicznej poszczególnych narządów i ich układów w organizmie) jest niezwykle obiecującą perspektywą transplantologii oraz immunologii transplantacyjnej. Jednak główną barierą w uzyskaniu znaczącego postępu w transplantacji organów świni jest obecność ksenogenicznych determinant antygenowych, tj. disacharydowych epitopów galaktozylo- α -1,3-galaktozy (α -Gal) na powierzchni komórek śródbłonna naczyń krwionośnych, które są odpowiedzialne za nadostre lub ostre odrzucanie przeszczepów heterologicznych w organizmach naczelnych oraz potencjalnych ludzi-biorców (Klymiuk i in., 2010; Jeong i in., 2013). Reakcja przyłączenia reszt α -D-galaktozy do powierzchniowych epitopów α -Gal, wchodzących w skład glikoproteinowych lub glikolipidowych antygenów transbłonowych komórek endotelialnych naczyń włosowatych oraz małych tętniczek jest katalizowana przez enzym α -1,3-galaktozylotransferazę (α -1,3-GT) (Fujimura i in., 2008a, b; Ramsoondar i in., 2009; Kurome i in., 2013). Próby unieczynnienia jednego z alleli genu kodującego α -1,3-GT (gen *HGT2*; locus GGTA1) prowadzono już na innych gatunkach zwierząt. Uzyskano na przykład żywe myszy ze znokautowanym genem

α -1,3-GT przy wykorzystaniu zmodyfikowanych genetycznie zarodkowych komórek macierzystych (Thall i in., 1995; Chong i in., 2000). U owiec również możliwa była skuteczna ukierunkowana delecja pojedynczych alleli dwóch niezależnych genów kodujących enzym α -1,3-GT oraz patologiczne białko prionowe (PrP^{Sc}) w fibroblastach płodowych użytych w procedurze klonowania somatycznego jako źródło dawców jąder komórkowych (Denning i in., 2001). Z powodów wymienionych wcześniej, podstawę do optymizmu stworzyły dwa niezależne badania autorstwa Dai i in. (2002) oraz autorstwa Ramsoondara i in. (2003). Autorzy obu tych prac uzyskali ogółem 9 transgenicznych prosiąt klonalnych, charakteryzujących się obecnością zinaktywowanego metodą rekombinacji homologicznej allelu genu α -1,3-GT, do wyprodukowania których wykorzystano transformowane/zno-kautowane genetycznie fibroblasty płodowe. Zastosowanie strategii rekombinacji homologicznej genów przy użyciu technik *knock-in* (tj. ich insercyjnego unieczynienia) lub *knock-out* (tj. sterowanej mutagenezy za pośrednictwem transgenicznych wektorów kierunkowych typu pułapek genowych; ang. *gene-traps*) w celach indukowania celowanej, mono- i/lub biallelicznej deficytencji genów kodujących określone enzymy, odpowiedzialne za powstawanie powierzchniowych determinant antygenowych świnie, może mieć ważne implikacje dla obniżenia międzygatunkowej bariery immunologicznej w organizmie potencjalnego biorcy przeszczepu ksenogenicznego. To z kolei może przyczynić się w oczywisty sposób do osłabienia lub opóźnienia reakcji humoralnego waskularnego odrzucenia ksenotransplantu (Nottle i in., 2007; Aigner i in., 2010; Shimatsu i in., 2013).

Efektywne klonowanie somatyczne ssaków, omijając drogę rozrodu płciowego, stwarza zatem możliwość dostarczania monogenetycznego potomstwa, wywodzącego się nie tylko z wyselekcjonowanych pod względem wybitnych cech wartości hodowlanej (genetycznej) i użytkowej dorosłych zwierząt, lecz przede wszystkim z transgenicznych osobników. W ciągu ostatnich dwudziestu lat na drodze wewnątrz- lub międzygatunkowego klonowania somatycznego uzyskano dosyć liczne transgeniczne i nietransgeniczne potomstwo:

- nie tylko u różnych gatunków lub międzygatunkowych niepłodnych mieszańców (bastardów) zwierząt udomowionych takich jak:
 - 1) bydło (Forsberg i in., 2002; Green i in., 2007; Hoshino i in., 2009; Liu i in., 2013; Luo i in., 2015);
 - 2) kozy (Keefer i in., 2002; Lan i in., 2006; Meng i in., 2013; Zhou i in., 2013; Feng i in., 2015a);
 - 3) owce (McCreath i in., 2000; Loi i in., 2002; Deng i in., 2013; Zhang i in., 2013);
 - 4) świnie (Lee i in., 2005a; Watanabe i in., 2005; Brunetti i in., 2008; Deng i in., 2011; Richter i in., 2012; Kurome i in., 2013; Li i in., 2013b; Ju i in., 2015; Lu i in., 2015; Ozawa i in., 2015; Ma i in., 2016);
 - 5) koniowate – konie domowe, muły (Galli i in., 2003; Woods i in., 2003; Lagutina i in., 2005; Hinrichs i in., 2006, 2007);
 - 6) chińskie bawoły błotne (Shi i in., 2007);

- 7) wielbłądy jednogarbne – dromedary/dromadery (Wani i in., 2010);
 - 8) koty domowe (Shin i in., 2002; Choi i in., 2007; Yin i in., 2005, 2008a, b);
 - 9) psy domowe (Lee i in., 2005b; Jang i in., 2007, 2008a, b; Hong i in., 2009; Hossein i in., 2009);
 - 10) tchórzofretki (Li i in., 2006a);
 - 11) króliki (Chesné i in., 2002; Skrzyszowska i in., 2006a; Li i in., 2006b, 2009; Meng i in., 2009);
 - 12) myszy (Ono i in., 2001; Wakayama i in., 1998, 2008; Mizutani i in., 2015);
 - 13) szczury (Zhou i in., 2003),
- lecz także u kilku gatunków zagrożonych lub niezagrożonych wyginieciem ssaków wolno żyjących takich jak:
 - 14) gaur (Lanza i in., 2000a);
 - 15) muflon (Loi i in., 2001);
 - 16) europejski jelen szlachetny/czerwony (Berg i in., 2007);
 - 17) banteng azjatycki/jawajski (Sansinena i in., 2005);
 - 18) afrykański dziki kot nubijski (Gómez i in., 2004);
 - 19) arabski pustynny kot piaskowy (Gómez i in., 2008);
 - 20) euroazjatycki wilk szary (Kim i in., 2007; Oh i in., 2008);
 - 21) kojot preriowy (Hwang i in., 2013),
 - a nawet u wymarłego podgatunku koziorożca hiszpańskiego/iberyjskiego:
 - 22) koziorożca pirenejskiego (dzika koza górską – bucardo) (Folch i in., 2009).

Jednakże dotychczasowa wydajność klonowania somatycznego różnych gatunków ssaków, mierzona odsetkiem urodzonego potomstwa w stosunku do liczby zrekonstruowanych oocytów, jest wciąż niska i nie przekracza z reguły 2–5% (Samiec i Skrzyszowska, 2011a, b; Buganim i in., 2013). Biotechnologiczne możliwości klonowania metodą transplantacji jąder komórek somatycznych do enukleowanych oocytów MII wyprzedziły bowiem znacznie zrozumienie biologicznych uwarunkowań, a w szczególności aspektów molekularnych i epigenetycznych tej metody (Yang i in., 2007; Whitworth i Prather, 2010). Mimo to podstawy biologiczne, jakie zostały stworzone w zakresie genetycznej/genomowej inżynierii embrionalnej, zwłaszcza w ciągu ostatnich dwudziestu lat, umożliwiły opracowanie kompleksowej technologii wspomaganego rozrodu zwierząt z wykorzystaniem procedury klonowania somatycznego, która może spełniać w wielu przypadkach warunki dla jej zastosowania do realizacji ograniczonych celów praktycznych (Loi i in., 2016; Niemann, 2016).

3. Architektoniczne i epigenetyczne przemodelowanie chromatyny jądrowej oraz epigenetyczne przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek somatycznych w klonalnych zarodkach ssaków

3.1. Jakie zależności istnieją między rozwojem zarodków klonalnych a transkrypcyjnym przeprogramowaniem epigenetycznej pamięci zakodowanej w strukturze i funkcjach kowalencyjnych modyfikacji genomu komórek somatycznych?

Główną przyczyną, zarówno niskiego potencjału rozwojowego zarodków i płodów klonalnych, jak i słabej jakości morfologicznej przedimplantacyjnych zarodków klonalnych (morul i blastocyst), jest nieprawidłowa adaptacja transferowanych jąder somatogenicznych do warunków biochemicznych mikrośrodowiska cytoplazmatycznego oocytu, czyli ich niekompletne lub wadliwe przemodelowanie/przeprogramowanie w cytoplazmie enukleowanych oocytów (Koo i in., 2002; Cezar i in., 2003; Dean i in., 2003; Moreira i in., 2003; Bonk i in., 2007; Whitworth i Prather, 2010). Jest ono również powodem zaburzeń procesu placentacji oraz licznych wad anatomo-histologicznych łożyska (De Sousa i in., 2001; Kim i in., 2002; Bortvin i in., 2003; Hiendleder i in., 2004; Mann i in., 2004). Błędy występujące podczas transkrypcyjnego przeprogramowania genomu komórek somatycznych przyczyniają się również do zwiększonej odpowiedzi immunologicznej ze strony układu odpornościowego matek zastępczych, dlatego też antygeny głównego układu zgodności tkankowej zarodków/płodów klonalnych są rozpoznawane przez środowisko wewnątrzmaciczne samicy-biorczyni jako antygeny przeszczepów allogenicznych (w przeciwieństwie do zarodków i płodów uzyskiwanych na drodze zapłodnienia, traktowanych przez system immunologiczny matki jako przeszczepy semiallogeniczne). Do innych skutków wadliwego przemodelowania/przeprogramowania jąder komórek somatycznych należy zaliczyć wysoką śmiertelność zarodków i płodów klonalnych, odpowiednio, w peri-implantacyjnym oraz perinatalnym okresie rozwoju ontogenetycznego, a także wysoki odsetek poronień (resorpcji płodów klonalnych) w I trymestrze ciąży (Hill i in., 2002). Należy zwrócić również uwagę na wady rozwojowe płodów i potomstwa klonalnego wynikające z letalnych lub subletalnych efektów anatomo- i histopatologicznych w obrębie różnych narządów wewnętrznych (płuca, serce, wątroba, nerki), a także na często diagnozowany syndrom nadmiernej masy okołourodzeniowej potomstwa klonalnego (ang. *Large Offspring Syndrome*; LOS) (Chavatte-Palmer i in., 2002; Han i in., 2003; Reik i in., 2003a; Fernandez-Gonzales i in., 2004) oraz przerostu (hiperplazji i hipertrofii komórek) łożyska (ang. *Large Placenta Syndrome*; LPS) (Inoue i in., 2002; Lee i in., 2003a; Young i in., 2003; Mann i in., 2004). W postnatalnym okresie rozwoju obserwuje się u świń klonalnych i innych gatunków ssaków obniżoną odporność humoralną oraz komórkową, spowodowaną niewydolnością układu immunologicznego, zaburzenia krążenia krwi, zapalenie opon mózgowych, wrodzoną ślepotę i głuchotę, będącą wynikiem nieprawidłowo wykształ-

conych gałek ocznych i worków spojówkowych, a także przewodów słuchowych i małżowin usznych. Odnotowano również przypadki obniżonej płodności osobników męskich, czego przykładem były knury klonalne z hipoplazją tkanki śródmiąższowej (Leydiga) w jądrach (Lai i in., 2002; Archer i in., 2003; Ramsoondar i in., 2003; Kolber-Simonds i in., 2004; Park i in., 2004b, 2005).

3.2. Molekularne mechanizmy epigenetycznego przemodelowania konformacji chromatyny jądrowej w rozwoju zarodków uzyskiwanych techniką klonowania somatycznego

Chociaż nie ustalono dotąd jednoznacznej definicji określającej przeprogramowanie jąder komórkowych, to jednak można przyjąć, że proces ten, a przynajmniej jego wstępny etap – strukturalne (morfologiczne/architektoniczne) przemodelowanie, obejmuje wszystkie zmiany konformacyjne i cytobiochemiczne, jakim podlegają jądra komórek somatycznych znajdujących się w interfazowym okresie cyklu mitotycznego, po ich wprowadzeniu do enukleowanych/wyjądrzonych oocytów (ooplastów), których cykl mejotyczny został fizjologicznie zablokowany w stadium MII. Te zmiany konfiguracyjne prowadzą w następstwie sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów do upodobnienia się tych jąder pod względem strukturalno-funkcyjnym do przedjądrzy zygoty (Mann i Bartolomei, 2002; Renard i in., 2002; Yang i in., 2007; Esteves i in., 2011). Jądro komórki somatycznej wprowadzone do dojrzałego *in vitro* lub *in vivo*, wyjądrzonego oocytu w momencie jego rekonstrukcji*, 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 (Lacham-Kaplan i in., 2000; Galli i in., 2002; Kawano i in., 2004; Kurome i in., 2003, 2013). Pomimo usunięcia materiału genetycznego oocytu MII wysoko receptywna ooplazma zachowuje właściwości narzucające wprowadzonemu jądru taki stan, jaki miałoby jej własne jądro w tym samym momencie cyklu mejotycznego. Dlatego też zjawisko morfologicznej adaptacji chromatyny mitotycznej do warunków cytofizjologicznych, panujących w mikrośrodku ooplazmatycznym jest zależne od podporządkowania się genomu komórki somatycznej oddziaływaniu białkowych czynników regulatorowych w poszczególnych punktach kontrolnych/restrykcyjnych II podziału mejotycznego oocytu (Han i in., 2003; Moreira i in., 2003; Reik i in., 2003a; Shi i in., 2003b). To zjawisko swoistego naśladowania, tj. mimetyzmu procesów molekularnych, towarzyszących naturalnemu przebiegowi cyklu

* Szczegółowe objaśnienia dotyczące metod rekonstrukcji enukleowanych oocytów MII (ooplastów) z jąder komórek somatycznych oraz uzyskiwania w ich następstwie zrekonstruowanych/zrekonstruowanych oocytów, które z cytologicznego punktu widzenia stanowią hybrydy jądro-cytoplazmatyczne (określane również mianem cybrzyd klonalnych lub cybrzydowych zygot klonalnych), znajdują się w rozdziale 5.

mejotycznego, jest określane jako przejście DNA genomowego komórki-dawcy jądra z mitotycznej do pseudomejotycznej kontroli jego aktywności transkrypcyjnej i metabolicznej (Vignon i in., 2002; Jouneau i Renard, 2003). Jeżeli do nieaktywowanych wyjądrzonych oocytów MII, wprowadzi się jakiegokolwiek jądra interfazowe, to – pod wpływem wysokiego stężenia czynnika dojrzewania mejotycznego (MPF; ang. *maturation/meiosis promoting factor*) i stabilizującego go czynnika cytotatycznego (CSF; ang. *cytostatic factor*) – dochodzi w nich bardzo szybko do zaniku otoczki jądrowej (NEBD; ang. *nuclear envelope breakdown*) oraz dyspersji jąderka. W kolejnym etapie ma miejsce kondensacja chromatyny i wyróżnicowanie się chromosomów, które zostają zakotwiczone centromerami do mikrotubuli kinetochorowych płytki metafazowej uformowanej w obrębie wrzeciona kariokinetycznego (Tani i in., 2001). 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*) (Campbell i Alberio, 2003; Dean i in., 2003; Han i in., 2003; Reik i in., 2003b). 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 mejotycznego, tzn. zachodzącej we właściwym momencie cyklu komórkowego (po przekroczeniu interkinetycznego punktu kontrolnego/restrykcyjnego MI/MII) (Campbell i Alberio, 2003; Dean i in., 2003).

W środowisku cytoplazmatycznym oocytu-biorcy, egzogenna chromatyna pochodzenia somatogenicznego podlega nie tylko oddziaływaniu enzymatycznych czynników warunkujących charakter jej konformacyjnych rearanżacji w sposób ściśle związany z przebiegiem cyklu mejotycznego (Han i in., 2003; Tani i in., 2003). Czynniki te stanowią: MPF i CSF w stadium metafazy II (tj. przed sztuczną aktywacją zrekonstruowanego oocytu, tj. cybrydy klonalnej) oraz kompleks białkowy ligazy ubikwitynowej, inicjujący anafazę podziału wyrównawczego (AII), czyli cyklosom (APC/C; ang. *anaphase-promoting complex/cyclosome*) po przekroczeniu punktu kontrolnego wrzeciona kariokinetycznego metafaza II/anafaza II (MII/AII) w następstwie aktywacji programu rozwojowego cybrydy klonalnej. Przed sztuczną aktywacją cybryd klonalnych, wprowadzona do ooplazmy chromatyna komórki-dawcy jądra podlega także oddziaływaniu białkowych czynników regulujących epigenetycznie poziom jej aktywności transkrypcyjnej. Są nimi: 1. ooplazmatyczne metylotransferazy/metylazy DNA (DNMTs; ang. *DNA methyltransferases/methylases*), m.in. izoenzymy DNMT1o i DNMT3a/3b; 2. białka wiążące się ze zmetylowanymi dinukleotydami, tzw. wysepkami konfiguracyjnymi CpG (5'-cytydino-3'-monofosforylo-5'-guanozyny-3'), czyli minisekwencjami paliandromowymi ^{Me}CpG DNA genomowego (MeCPs; ang. *methyl-CpG-binding proteins*) oraz 3. inhibitory acetylotransferaz/acetylaz histonów H3/H4 (iHATs; ang. *histone acetyltransferase/acetylase inhibitors*). Do tej grupy czynników należą również: 4. deacetylazy białek histonowych (HDACs; ang. *histone deacetylases*); 5. metylotransferazy histonów (HMTs; ang. *histone methyltransferases*) i 6. inhibi-

tory demetylaz/deiminaz histonów (iHDMs; ang. *histone demethylase/deiminase inhibitors*). Konsekwencją oddziaływania tej złożonej grupy endogennych modulatorów epigenetycznych są procesy deacetylacji histonów, którym towarzyszą pozytywnie z nimi skorelowane procesy metylacji DNA oraz metylacji białek histonowych. Pośrednim skutkiem wyżej wspomnianych modyfikacji epigenomowych jest silna kondensacja chromatyny i represja transkrypcyjna genomu somatogenicznego w cytoplazmie nieaktywowanych ooplastów MII (Santos i Dean, 2004; Rybouchkin i in., 2006; Bui i in., 2007; Buginim i in., 2013). Z kolei w zrekonstruowanych oocytach, które poddano sztucznej aktywacji, chromatyna komórki-dawcy jądra podlega oddziaływaniu odmiennych czynników regulatorowych profilu epigenetycznego DNA genomowego. Wśród nich należy wymienić: 1. ooplazmatyczne i/lub nukleoplazmatyczne (kariolimfatyczne) inhibitory kompetycyjne metylotransferaz/metylaz DNA (iDNMTs; ang. *DNA methyltransferase/methylase inhibitors*), m.in. blokery izosteryczne izoenzymów DNMT1o i DNMT3a/3b; 2. represory aktywności białek wiążących się ze zmetylowanymi dinukleotydam, tzw. wysepkami konfiguracyjnymi CpG (5'-cytydino-3'-monofosforylo-5'-guanozyny-3'), czyli minisekwencjami paliandromowymi ^{Me}CpG DNA genomowego (iMeCPs; ang. *methyl-CpG-binding protein inhibitors*) oraz 3. acetylotransferazy/acetylazy histonów H3/H4 (HATs; ang. *histone acetyltransferases/acetylases*). Ponadto czynniki te są reprezentowane przez: 4. inhibitory izosteryczne deacetylaz białek histonowych (iHDACs; ang. *histone deacetylase inhibitors*); 5. białka supresorowe metylotransferaz histonów (iHMTs; ang. *histone methyltransferase inhibitors*) oraz 6. demetylazy/deiminazy histonów (HDMs; ang. *histone demethylases/deiminases*) i 7. złożone kompleksy białkowe o aktywności enzymatycznej ATPaz, odpowiedzialne za architektoniczną (konformacyjną) rearanżację chromatyny jądrowej (ChRs; ang. *chromatin remodeling complexes*). W następstwie oddziaływania tej całej kaskady regulatorów pamięci epigenetycznej somatogenicznych jąder komórkowych, w aktywowanej ooplazmie cybryd klonalnych mają miejsce procesy acetylacji histonów, które są pozytywnie skorelowane z procesami demetylacji DNA oraz demetylacji histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. Terminalnym efektem tych wszystkich postaktywacyjnych modyfikacji epigenomowych jest dekondensacja chromatyny jądrowej i aktywacja transkrypcyjna genomu komórek somatycznych w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów poddanych sztucznej stymulacji zarodkowego programu rozwojowego (Jouneau i Renard, 2003; Kim i in., 2004; Armstrong i in., 2006; Corry i in., 2009; Zhao i in., 2010a).

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 (Vignon i in., 2002; Dean i in., 2003; Mann i in., 2003; Shi i in., 2003a). Przemodelowanie konformacji 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 somatogeniczne w cytoplazmie enukleowanych oocytów MII, może mieć korzystny wpływ na ich przemodelowanie. Z wydłużeniem czasu ekspozycji transferowanych jąder somatogenicznych na działanie czynników ooplazmatycznych wzrasta stopień zaawansowania strukturalno-funkcjonalnych modyfikacji chromatyny jądrowej, co z kolei wpływa na prawidłowy przebieg złożonych i wielofazowych przemian, jakim podlegają jądra w odpowiedzi na zewnętrzny sygnał aktywacyjny (Campbell i Alberio, 2003; Dean i in., 2003; Beaujean i in., 2004). W standardowym modelu postaktywacji uzyskane cybrydy klonalne są pobudzane do rozwoju zarodkowego z jedno- lub kilkugodzinnym opóźnieniem czasowym w stosunku do momentu rekonstrukcji enukleowanego oocyty, czyli przeprowadzenia mikrochirurgicznego zabiegu transplantacji jądra komórkowego do ooplazmy. Po sztucznej aktywacji zrekonstruowanego oocyty wokół zdekondensowanej chromatyny powstaje nowa otoczka jądrowa, a odtworzone jądro interfazowe rozpoczyna program przemodelowania konfiguracji przestrzennej zgodnie z przebiegiem cyklu komórkowego aktywowanego oocyty. Pierwszą oznaką architektonicznego przemodelowania jądra jest jego wzrost (pęcznienie; ang. *nuclear swelling*; NS) w cytoplazmie komórki-biorcy. 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, które zostały odtworzone w okresie międzypodziałowym w następstwie sztucznej aktywacji cybryd klonalnych, określa się bardzo często mianem rzekomych przedjądrzy lub pseudo-przedjądrzy (Moreira i in., 2003; Wrenzycki i Niemann, 2003; Zhao i in., 2010a). Stanowią one strukturalno-funkcjonalny ekwiwalent właściwych przedjądrzy, które powstają w warunkach fizjologicznych po zapłodnieniu oocyty (Fissore i in., 1999; Mayer i in., 2000; Lai i in., 2001, 2002; Lee i in., 2003c; Moreira i in., 2003; Sarmiento i in., 2004; Bang i in., 2013). Prawidłowe ich uformowanie jest kluczowym czynnikiem wskazującym z jednej strony na pełną i szybką odpowiedź oocyty na sygnały jonowe dostarczane przez sztuczne aktywatory, a z drugiej – na wysoką efektywność zastosowanej po rekonstrukcji enukleowanego oocyty procedury aktywacji. 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. Białka te należą głównie do grupy modulatorów epigenetycznych oraz czynników regulatorowych cyklu pseudomejotycznego i mitotycznego (Kim i in., 2002; Novak i in., 2004; Lorthongpanich; i in., 2010). Ważną rolę w procesie przemodelowania i przeprogramowania jądrowego odgrywa wymiana czynników zaangażowanych w regulację zarówno struktury chromatyny, jak i tkankowo-specyficznej ekspresji genów na czynniki pochodzenia oocytyarnego. Czynniki te mogą pokierować zmianami konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej, zgodnie z aktualnymi wymaganiami zrekonstruowanego oocyty i za-

rodka. Wydłużona ekspozycja chromatyny komórki somatycznej – dawcy jądra na działanie białek strukturalnych i enzymatycznych oocyty-biorcy jest konieczna do prawidłowego zainicjowania procesu przeprogramowania genomu przed momentem aktywacji programu rozwojowego cybrydowej zygoty klonalnej. W oocytach zrekonstruowanych z interfazowych jąder somatogenicznych w fazach G0 i G1 cyklu komórkowego indukowane są albo procesy: NEBD, PCC, a następnie NS (przy wyborze protokołu postaktywacji lub protokołu jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej), albo tylko NS (przy wyborze protokołu preaktywacji lub protokołu jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej). W przypadku protokołu preaktywacji, wprowadzenie jądra do enukleowanego oocyty, w którym było już obecne jądro obłonione, nie powoduje żadnych zmian morfologicznych transferowanego jądra, a najwyżej jego pęcznienie (Campbell i Alberio, 2003; Santos i Dean, 2004; Rodriguez-Osorio i in., 2012).

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 przemodelowania i przeprogramowania, niezbędnego do utrzymania rozwoju ontogenetycznego zarodka do końca ciąży (Campbell i Alberio, 2003; Han i in., 2003; Beaujean i in., 2004).

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że szereg czynników aktywujących, a w szczególności zmnożona elektrostymulacja, indukuje proces uwalniania do przestrzeni okołozótkowej przez zrekonstruowane oocyty niektórych gatunków ssaków (świnia, mysz) dodatkowych struktur przypominających ciała kierunkowe, nazywanych pseudopolocytami lub rzekomymi ciałkami kierunkowymi (Miyoshi i in., 2000, 2002; Ono i in., 2001; Wakayama i in., 1998, 2008; Hwang i in., 2015; Mizutani i in., 2015; Hua i in., 2016; Huang i in., 2016; Kim i in., 2016).

Wysoka wrażliwość oocytów świni oraz myszy na wszelkie sygnały jonowe dostarczane przez sztuczne aktywatory, niezależnie od stopnia inwazyjności ich parametrów fizykochemicznych obniża z pewnością próg tolerancji cybrydowych zygot klonalnych na wielkość natężenia sygnałów jonowych dostarczanych przez egzogenne bodźce stymulujące inicjację programu rozwojowego zrekonstruowanych zarodków oraz czyni je komórkami bardziej podatnymi na wyrzucanie struktur parapolocytarnych II rzędu w porównaniu z oocytami innych gatunków zwierząt gospodarskich (bydło, owce, kozy). Dlatego też w przypadku rekonstrukcji oocytów świni z jąder komórek w fazach G0/G1 zaleca się łączenie protokołów aktywacji z post-aktywacyjną inkubacją cybryd klonalnych w pożywce zawierającej 5–7,5 µg/mL cytochalazyny B (CB) przez co najmniej 2 godziny (Onishi i in., 2000; De Sousa i in., 2002; Miyoshi i in., 2002; Lee i in., 2016). Jest to uzasadnione tym, że cytochalazyna B jako inhibitor polimeryzacji mikrofilamentów aktynowych, będących głównym składnikiem cytoszkieletu i membranoszkieletu oocyty, hamuje jego szczytkową (poronną) cytokinezę biegunową, a więc zapobiega uwolnieniu do przestrzeni okołozótkowej pseudopolocytu. Wynikiem tego jest zachowanie normalnego diploidalnego statusu ($2n=38$ chromosomów), przez upodobniające się do przedjądrzy zapłodnionych komórek jajowych (zygot) pod względem

morfolologicznym i cytofizjologicznym, interfazowe jądra somatogeniczne, które uległy konfiguracyjnemu (architektonicznemu) przemodelowaniu w środowisku cytoplazmatycznym zrekonstruowanych oocytów i z tego powodu określane są mianem struktur paraproneuklearnych, rzekomych przedjądrzy lub pseudopredjądrzy. Prawidłowa ploidia genomu jądrowego, decydująca w dużym stopniu o wysokim potencjale rozwojowym zarodków klonalnych świni zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych, których cykl mitotyczny został zsynchronizowany *in vitro* na granicy stadiów G0/G1 lub G2/M, zależy więc nie tylko od odpowiedniej koordynacji faz cyklu podziałowego komórek-dawców jąder oraz oocytów MII, lecz także od stopnia progresji lub regresji procesu emisji (wyrzucenia) II ciała kierunkowego w wyniku wznowienia cyklu pseudomejotycznego uzyskanych cybryd klonalnych. Wyróżnicowane, w następstwie przedwczesnej kondensacji presyntetycznej lub postsyntetycznej chromatyny jądrowej komórek-dawców w stadiach G0/G1 lub G2/M, chromosomy każdej z 19 homologicznych par płytki metafazowej, składają się, odpowiednio, z pojedynczych chromatyd niesiostrzanych lub z podwójnych chromatyd siostrzanych, czyli posiadają diploidalną (2C) lub tetraploidalną (4C) liczbę cząsteczek DNA. Gdyby proces uwolnienia dodatkowej struktury parapolocytarnej został zainicjowany w wyniku sztucznej aktywacji oocytu, wówczas prawidłowa ploidia byłaby zachowana tylko w przypadku cybryd klonalnych posiadających przemodelowane jądra komórkowe, które zostały przeszczepione w fazach G2/M. Połowa cząsteczek DNA (2C) zostałaby usunięta wraz z wyrzuconym pod osłonkę przejrzystą oocytu rzekomym ciałkiem kierunkowym, a druga połowa zostałaby zachowana w formie zrearanżowanej chromatyny formującej pseudopredjądrze, a następnie po ponownej replikacji osiągnęłaby przed I podziałem bruzdkowania powtórnie poziom tetraploidalny (4C). Natomiast w przypadku niewyrzucenia polocyty II rzędu prawidłowa ploidia cybrydowej zygoty klonalnej byłaby tylko wtedy utrzymana, gdyby do ooplastu MII zostało wprowadzone jądro komórki w fazach G0/G1 (posiadające 2C DNA). Transfer jąder komórek somatycznych w stadiach G0/G1 wymaga zatem z reguły kombinacji systemu aktywacji zrekonstruowanych oocytów (zwłaszcza metodą elektroimpulsacji) z ich post-inkubacją w obecności cytochalazyny B (Lee i in., 2003c, 2005a; Miyoshi i in., 2005).

Znakomitą egzemplifikacją powyższych rozważań jest wykorzystanie procedury połączenia opóźnionej w stosunku do momentu rekonstrukcji stymulacji elektrycznej hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych z ich 3-godziną post-inkubacją w pożywce z dodatkiem 5 µg/mL CB przez Tomii i in. (2005). Badacze ci, w warunkach hodowli *in vitro*, uzyskali 12,3% blastocyst klonalnych o średniej liczbie komórek sięgającej poziomu 54, w wyniku transplantacji jąder płodowych komórek fibroblastycznych do enukleowanych oocytów (ooplastów) świni. Natomiast po transplantacji jąder w fazach G2/M potrzeba stosowania protokołu post-aktywacji sprzężonego z traktowaniem oocytów cytochalazyną B została wyeliminowana na rzecz sygnałów aktywacyjnych wzmocnionych przez podwyższenie stężenia odpowiednich aktywatorów chemicznych lub wydłużenie czasu ich oddziaływania na oocyty, bądź przez znaczne zwiększenie natężenia impulsów prądu stałego lub

prolongowanie czasu ich trwania (Lai i in., 2001; Ono i in., 2001). Ponadto wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Miyoshi i in. (2000) wskazują, że oocyty rekonstruowane z jąder hodowanych komórek zarodkowych wyprowadzonych z węzłów zarodkowych wylęgłych blastocyst świni, inkubowane po aktywacji w pożywce uzupełnionej 7,5 µg/mL cytochalazyny B, wykazywały znacznie wyższe kompetencje rozwojowe do stadium blastocysty niż cybrydy klonalne niepoddawane działaniu CB. Postaktywacyjna inkubacja sklonowanych zarodków w obecności CB przez 0–1 godzinę okazała się zbyt krótka, aby zapobiec wyrzuceniu dodatkowych struktur parapolocytarnych, dlatego też ponad 80% zygot charakteryzowało się obecnością jednego pseudopredjadrza i jednego ciała kierunkowego. Sugeruje to, że w tak krótkim okresie czasu CB nie jest w stanie spowodować całkowitej depolimeryzacji większości mikrofilamentów aktynowych oocyty, co uniemożliwia skuteczne zablokowanie poronnej cytokinezy biegunowej i indukuje uwolnienie pseudopolocytu do przestrzeni okołozółtkowej sklonowanego zarodka. Z kolei wydłużenie czasu ekspozycji na działanie cytochalazyny B do 2–4 godzin przyczyniło się do powiększenia populacji zarodków z dwoma pseudopredjadrzami i brakiem dodatkowych ciałek kierunkowych do poziomu 58–67%. To ostatnie zjawisko tłumaczy się tym, że efektywne oddziaływanie CB polega na zahamowaniu cytokinezy bez jakiegokolwiek negatywnego wpływu na przebieg kariokinezy, czego efektem jest powstanie dikariotycznej (dwujądrowej) interfazowej zygoty. Uzupełnieniem powyższych rezultatów była obserwacja wpływu CB na dalszy rozwój zarodkowy zrekonstruowanych oocytów. Okazało się bowiem, że odsetek zarodków, które rozwinęły się do stadium blastocysty po 7 dniach hodowli *in vitro* był istotnie wyższy po 2-godzinnym traktowaniu cybrydowych zygot klonalnych cytochalazyną B (23%) niż w grupie kontrolnej (5%) (Miyoshi i in., 2000). Sugerując się tymi wynikami, w badaniach własnych zastosowano także kompleksową metodę dwustopniowej aktywacji fizykochemicznej lub jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej zrekonstruowanych oocytów świni i ich post-inkubacji w obecności CB przez 1,5–2 godziny, gdyż źródłem komórek-dawców jąder były w tym przypadku hodowane *in vitro* do stanu pełnej konfluencji fibroblasty płodowe lub fibroblasty tkanki skórnej ucha dorosłych osobników, których cykl mitotyczny był poddawany sztucznej synchronizacji w fazach G1/G0 poprzez inhibicję kontaktową ich migracji i proliferacyjnego wzrostu (Skrzyszowska i in., 2008; Samiec i Skrzyszowska, 2012, 2014; Samiec i in., 2015).

Interesującym aspektem sztucznej aktywacji hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych w klonowaniu somatycznym świń jest także zachowanie zdolności do szczątkowej (śladowej) cytokinezy biegunowej, czyli do wyrzucania pseudopolocytów przez znaczną część enukleowanych oocytów świni elektroaktywowanych w momencie ich rekonstrukcji (Cheong i in., 2002; Kurome i in., 2003; Lee i in., 2003b, 2005a; Miyoshi i in., 2005). Wydaje się, że przedwczesna kondensacja interfazowej chromatyny (PCC) jąder komórek somatycznych w klonalnych cybrydach ssaków jest warunkiem wstępnym i koniecznym do uwolnienia dodatkowych struktur przypominających ciała kierunkowe. Niemniej jednak procedura jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej (F/A) uniemożliwia zajęcie

w stosunkowo wysokim odsetku zrekonstruowanych oocytów świni procesów rozpadu otoczki jąder somatogenicznych oraz przedwczesnego wyróżnicowania (spiralizacji) chromosomów. W mikrośrodowisku ooplazmatycznym takich cybryd klonalnych odnotowuje się bowiem obniżony poziom czynnika MPF oraz wysoką aktywność takich czynników epigenetycznych jak: inhibitory enzymów DNMTs oraz HDACs czy enzymy HATs. W konsekwencji w wyżej wspomnianych cybrydach klonalnych nie stwierdza się tzw. szczątkowej cytokinezy i wyrzucenia do przestrzeni okołozółtkowej rzekomych ciałek kierunkowych II rzędu. Zamiast tego dochodzi w nich – wskutek przejścia z mejotycznej do mitotycznej kontroli cyklu komórkowego – do kariokinezy, czyli bezpośredniego podziału interfazowych jąder somatogenicznych. Po ukończonej kariokinezie, w każdym zrekonstruowanym oocycie zostają uformowane, w następstwie bardzo ograniczonego pęcznienia, dwa niezależne pseudoprzedjądrza o małej objętości i średnicy (tzw. mikropseudoprzedjądrza). Pomimo tego, w wyniku zastosowania F/A zrekonstruowanych oocytów świni, obserwowany jest również relatywnie duży udział subpopulacji uzyskanych cybryd klonalnych, w przypadku których dochodzi do inicjacji procesów NEBD oraz PCC w obrębie jąder somatogenicznych, wprowadzonych do ooplazmy charakteryzującej się utrzymaniem stosunkowo wysokiego stężenia czynnika MPF oraz zachowaniem zwiększonej aktywności czynników epigenetycznych z grupy enzymów DNMTs oraz HDACs czy z grupy inhibitorów enzymów HATs. Po zajściu procesów NEBD oraz PCC ma miejsce kontynuacja II podziału pseudomejotycznego, której efektem końcowym jest szczątkowa cytokineza (wyrzucenie pseudopolocyty). W kolejnym etapie ukończony cykl mejotyczny przechodzi w skoordynowany sposób w interfazę I cyklu mitotycznego bruzdkowania, w czasie której zostają sfinalizowane procesy odtworzenia otoczki jądrowej, gwałtownego pęcznienia powstającego jądra interfazowego oraz uformowania pojedynczego pseudoprzedjądrza o dużej objętości i średnicy. Dlatego też zastosowanie strategii F/A wymusza konieczność post-inkubacji klonalnych cybryd świni, które zostały zrekonstruowane z jąder komórek somatycznych w fazach G0/G1 lub G1/G0, w pożywce z dodatkiem cytochalazyny B, w celu inhibicji procesu wyrzucania struktur parapolocytarnych II rzędu do przestrzeni okołozółtkowej oraz zachowania prawidłowej ploidii somatogenicznego genomu w blastomerach rozwijających się zarodków klonalnych (Lee i in., 2005a, 2016; Miyoshi i in., 2005; Samiec i Skrzyszowska, 2012, 2014; Hwang i in., 2015; Hua i in., 2016; Huang i in., 2016).

Stężenie kationów wapnia w roztworze do jednoczesnej fuzji i stymulacji elektrycznej zrekonstruowanych oocytów świni ma także istotny wpływ na efektywność procesu aktywacji, która mierzona jest intensywnością i/lub częstością post-aktywacyjnych 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 rearanzacji do postaci zespołów przedwcześnie skondensowanych chromosomów skonfigurowanych w pseudomejotyczną płytkę metafazową. Chromosomy metafazowe ulegają następnie segregacji w anafazie, która jest spolaryzowana do strefy kortikalnej ooplazmy. Rozdzielone zespoły chromatyd siostrzanych (chromosomów niehomologicznych) w wyniku towarzyszącej procesowi kariokinezy powtórnej dekondukcji 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 oocyty szczątkowe komórki pseudopolocytowe zawierają jedynie poronne wrzeciono kariokinetyczne, które jest otoczone śladową objętością cytoplazmy (Boquest i in., 2002; Cheong i in., 2002; Kurome i in., 2003).

Jeżeli sztuczna stymulacja cybrydy klonalnej przy zastosowaniu strategii F/A 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 okołozółkowej oocytów zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych w fazach G0/G1 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 G2/M cyklu mitotycznego. W takich cybrydach klonalnych występuje bowiem diploidalna liczba chromosomów (2n) dwuchromatydowych 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 (Cheong i in., 2002; Kurome i in., 2003; Koo i in., 2004).

Cheong i in. (2002) udowodnili, że w wyniku podwyższenia stężenia kationów wapnia z poziomu 0,1 mM/L do 1,0 mM/L w roztworze do jednoczesnej fuzji i aktywacji oocytów świni zrekonstruowanych 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), lecz charakteryzowały się one bezpośrednią progresją cyklu pseudomejotycznego do interfazy I podziału bruzdkowania, co potwierdzała obecność dwóch haploidalnych mikropseudopredjądrzy 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 rze-

komego 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 szczątkowej cytokinezy biegunowej, ograniczonej tylko do warstwy korowej zrekonstruowanych oocytów, w ich cytoplazmie zdiagnozowano obecność jednego haploidalnego pseudoprzedjądźra (Cheong i in., 2002).

W klonowaniu somatycznym ssaków, źródłem dawców jąder mogą być również komórki, których cykl mitotyczny został sztucznie zahamowany w prometafazie lub metafazie w następstwie ich kilkugodzinnej ekspozycji na działanie odwracalnych blokerów polimeryzacji tubuliny włókien kinetochorowych i biegunowych wrzeciona podziałowego oraz włókien gwiazdzistych astrosfery (centrosfery) diplosomowej (Ono i in., 2001; Lai i in., 2001, 2002; Kim i in., 2016). Zakłócenie dynamicznej homeostazy między reakcjami polimeryzacji oraz depolimeryzacji mikrotubuli wrzeciona kariokinetycznego komórek somatycznych, przejściowo blokujące anafazową segregację chromosomów potomnych (chromatyd siostrzanych), jest indukowane przez takie specyficzne inhibitory allosteryczne (niekompetycyjne) polimerazy tubuliny jak kolcemid/demekolecyna, nokodazol lub kolchicyna. Z uwagi na fakt, że chromatyna prometafazowa lub metafazowa jest silnie zespiralizowana/skondensowana i generalnie transkrypcyjnie nieaktywna, wymiana połączonych z chromatyną czynników koniecznych do przeprogramowania genomu musi mieć miejsce podczas dekondensacji chromatyny komórki-dawcy po aktywacji zrekonstruowanego oocyty. Oznacza to, że czynniki, których obecność jest wymagana do zapoczątkowania i progresji procesów przemodelowania i przeprogramowania egzogennej chromatyny, są obecne w cytozolu podczas wznowionego II podziału pseudomejotycznego oraz pierwszego cyklu mitotycznego 1-blastomerowego zarodka klonalnego (cybrydowej zygoty klonalnej) i nie ulegają biodegradacji bezpośrednio po aktywacji zrekonstruowanego oocyty. Dlatego też przestrzennie przemodelowane jądra interfazowe, pochodzące z przedwcześnie skondensowanej chromatyny, tj. ze zespiralizowanych chromosomów parametafazowych/pseudometafazowych komórek somatycznych, nazywane są strukturami parapronuklearnymi lub pseudoprzedjądźrami. Przypuszcza się, że inicjacja procesu przeprogramowania epigenetycznie uwarunkowanej aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego następuje dopiero w zdespiralizowanej i zdekondensowanej *de novo* chromatynie, która jest zakumulowana wewnątrz somatogenicznych pseudoprzedjądźry (Renard i in., 2002; Campbell i Alberio, 2003; Dean i in., 2003).

Cofnięcie transkrypcyjnego „zegara biologicznego” genomu komórek somatycznych, które utraciły już swoją totipotencję lub pluripotencję w procesie cytodyferencji, do statusu jądra zygoty musi obejmować nie tylko strukturalne (architektoniczne/morfologiczne) przemodelowanie chromatyny jądrowej, lecz także epigenetyczne przeprogramowanie (tj. odróżnicowanie molekularne) genomu w celu pełnego przywrócenia zarodkowego wzorca ekspresji genów (Santos i in., 2002, 2003; Mann i in., 2003; Reik, 2007). Strukturalne przemodelowanie wprowadzonych jąder dotyczy zatem, przebiegających w obrębie somatogenicznej chromatyny, przemian tautomerycznych jej konformacji przestrzennej, które są

określane łącznie mianem konstytucyjno-metabolicznej rearanzacji jądrowego aparatu genetycznego (Cezar i in., 2003; Shi i in., 2003a; Mann i in., 2003; Reik i in., 2003b). Z kolei epigenetyczne przemodelowanie chromatyny jądrowej jest związane z intensywnymi modyfikacjami kowalencyjnymi reszt lizyny i argininy białek histonowych (głównie H3 i H4) jej rdzenia nukleosomowego. Przed sztuczną aktywacją zrekonstruowanego oocyty mają miejsce zaawansowane procesy metylacji/deacetylacji reszt lizyny histonów H3 i H4 oraz procesy demetylacji reszt argininy tych histonów, czego efektem jest przedwczesna kondensacja chromatyny jądrowej, czyli przedwczesna heterochromatyzacja genomu komórki somatycznej. Natomiast po aktywacji zrekonstruowanego oocyty zachodzą procesy odwrotne do wyżej wspomnianych, takie jak: demetylacja/acetylacja reszt lizyny oraz metylacja reszt argininy białek histonowych, którym towarzyszy dekondesacja *de novo* chromatyny somatogenicznej, tzn. ponowna euchromatyzacja genomu jądrowego komórki-dawcy (Liu i in., 2004; Eilertsen i in., 2007; Bang i in., 2013). Wadliwe przemodelowanie konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej komórek somatycznych w potomnych blastomerach bruzdkujących zarodków klonalnych może być zatem uwarunkowane nieprawidłowymi zmianami konformacyjnymi i epigenetycznymi, powstałymi w czasie przedwczesnej kondensacji chromosomów w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów. Zmiany te wydają się być głównym powodem różnic w zdolności do odtwarzania interfazowej postaci chromatyny jądrowej (tj. formowania pseudoprzedjądrzy) przez cybrydowe zygoty klonalne. Ponadto mogą one mieć 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 pochodzenia somatogenicznego, kluczowych dla poszczególnych faz embrio- i fetogenezy, w wyniku indukcji nukleosomowej supresji transkrypcyjnej w różnicujących się komórkach zarodkowych i płodowych (Santos i Dean, 2004; Zhao i in., 2010a; Lorthongpanich i in., 2010).

3.3. Molekularne mechanizmy przeprogramowania epigenetycznej informacji dziedzicznej w rozwoju zarodków uzyskiwanych techniką klonowania somatycznego

Przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej DNA jądrowego komórek somatycznych dotyczy zmian epigenomowych, które przebiegają dwustopniowo w pre- i postimplantacyjnej fazie rozwoju zarodków klonalnych (Mann i Bartolomei, 2002; Renard i in., 2002; Shi i Wu, 2009). Informacja epigenetyczna, w odróżnieniu od informacji genetycznej, zapisanej w sekwencji nukleotydów DNA (tj. jego strukturze I-rzędowej), jest zakodowana w strukturze i funkcjach kowalencyjnych modyfikacji DNA oraz białek histonowych. Najważniejsze z tych modyfikacji są wynikiem procesów metylacji reszt cytozyny łańcucha polinukleotydowego podwójnej α -helisy DNA jądrowego (w obrębie dinukleotydów/wysp CpG, czyli

5'-cytydino-3'-monofosforylo-5'-guanozyny-3') oraz procesów metylacji i acetylacji reszt lizyny, bądź procesów metylacji reszt argininy histonów H3 oraz H4 rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej (Kang i in., 2002, 2003; Reik i in., 2003a, b; Beaujean i in., 2004; Shi i in., 2004). Wymienione wyżej procesy mogą mieć charakter globalny i obejmować w sposób ciągły znaczną część genomu jądrowego 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. Ponadto, profil ten jest uwarunkowany stosunkiem ilościowym globalnych lub sekwencyjnie-specyficznych miejsc metylacji DNA do miejsc metylacji i deacetylacji histonów lub jego odwrotnością, tj. proporcją miejsc demetylacji DNA do miejsc demetylacji i acetylacji histonów (Inoue i in., 2002; Mann i in., 2003; Shi i in., 2003).

Rearanżacja epigenetycznej pamięci komórkowej dotyczy również strukturalno-funkcjonalnej reorganizacji chromatyny jądrowej, która jest związana z konformacyjnymi zmianami długości terminalnych odcinków chromosomów, czyli telomerów (Shiels i in., 1999; Tian i in., 2000; Jeon i in., 2005; Kurome i in., 2008; Gomes i in., 2011). Epigenomowe modyfikacje biochemiczne w obrębie chromatyny telomerowej są z kolei sprzężone z biokatalityczną/enzymatyczną aktywnością telomerazy (Xu i Yang, 2001; Cui i in., 2003; Jiang i in., 2004a).

Prawidłowy przebieg procesów epigenetycznej kontroli aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego zarodków klonalnych jest w dużym stopniu skorelowany dodatnio z inhibicją represji nukleosomowej DNA przez zależne od ATP wielopodjednostkowe 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 są zaangażowane w przebudowę chromatyny somatogenicznej (zmiany w topologii DNA) najpierw w mikrośrodowisku cytoplazmatycznym oocytybiorcy jądra, a następnie w cytozolu blastomerów zarodków znajdujących się w kolejnych stadiach rozwoju przedimplantacyjnego (Vignon i in., 2002; Santos i in., 2003; Van Thuan i in., 2009; Lee i in., 2010; Buganim i in., 2013).

Zarówno informacja zapisana w trójkowym kodzie genetycznym DNA, jak i tzw. pamięć epigenetyczna są dziedziczne, a zaburzenia ich dziedziczenia, czyli mutacje genetyczne (genowe) oraz mutacje epigenetyczne (epimutacje), są skutkiem nieprawidłowego lub niepełnego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego w przed- i poimplantacyjnej fazie rozwoju zarodkowego (Cezar i in., 2003; Dean i in., 2003).

W pierwszym etapie epigenetyczne przeprogramowanie jąder komórek somatycznych w klonalnych zarodkach ssaków charakteryzuje się występowaniem dwucyklicznej fali procesów niezależnej od replikacji DNA demetylacji aktywnej reszt cytozyny oraz zależnej od replikacji DNA demetylacji pasywnej w obrębie dinukleotydów CpG. Równolegle do procesów wzmożonej demetylacji somatogenicznego DNA genomowego zachodzą procesy acetylacji i demetylacji reszt lizyny histonów (głównie H3 oraz H4), a także procesy metylacji reszt argininy histonów H3 i H4 chromatyny jądrowej (Han i in., 2003; Simonsson i Gurdon, 2004; Dai i in., 2010; Song i in., 2014). Faza inicjatorowa i wykonawcza wyżej wymienionych kowalencyjnych modyfikacji genomu komórek-dawców jąder przebiega w okresie post-zygotycznym, a jej pośrednim punktem kontrolnym jest moment aktywacji transkrypcyjnej genomu zarodkowego (Christians i in., 1994; Beaujean i in., 2004; Shi i in., 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2005b; Lagutina i in., 2010, 2011). Z kolei terminalna faza demetylacji reszt cytozyny DNA, jak również hiperacetylacji i hipometylacji reszt lizyny oraz hipermetylacji reszt argininy białek histonowych rozpoczyna się już w okresie przypadającym po aktywacji transkrypcyjnej genomu zarodkowego, a końcowy punkt kulminacyjny tej fazy stanowi moment osiągnięcia przez rozwijające się zarodki klonalne stadiów moruli/blastocysty (Han i in., 2003; Santos i Dean, 2004; Costa-Borges i in., 2010).

Drugi etap epigenetycznego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek somatycznych rozpoczyna się w stadium późnej blastocysty, ulegającej procesowi gastrulacji. Etap ten cechuje fala intensywnej metylacji *de novo* reszt cytozyny DNA w wyróżnicowanych z embrioblastu (ICM; ang. *inner cell mass*) komórkach zasiedlających epiblast (ektoderme pierwotną) oraz hipoblast (endoderme pierwotną). Procesom remetylacji reszt cytozyny DNA w obrębie dinukleotydów CpG towarzyszy deacetylacja i metylacja *de novo* reszt lizyny, a także demetylacja *de novo* reszt argininy histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. W komórkach linii somatogenicznej, wywodzących się z epiblastu (komórki ekto- i mezodermy zarodkowej) oraz z hipoblastu (komórki endodermy zarodkowej), jest realizowany molekularny scenariusz przebiegający w oparciu o inicjację ścieżki ilościowego powtórzenia (rekapitulacji) ogólnego schematu/profilu metylacji reszt cytozyny genomowego DNA komórek-dawców jąder. Jednakże ścieżka remetylacji DNA jądrowego jest finalizowana poprzez zaszyfrowanie i utrwalenie kompletnie nowego kodu epigenetycznego (metylomu) wskutek postępującej cytodyferencjacji, czyli różnicowania komórek somatycznych w ramach embrionalnej histogenezy. Natomiast w komórkach pozazarodkowych, pochodzących z linii komórek trofoblastycznych, jest utrzymywany stan hipometylacji genomu jądrowego komórek-dawców (Dean i in., 2003; Reik i in., 2003a; Beaujean i in., 2004).

Modyfikacje epigenomowe prowadzą do skoordynowanych zmian w stopniu ekspresji poszczególnych genów w kolejnych stadiach przed- i poimplantacyjnego rozwoju zarodków klonalnych. Zmiany w aktywności transkrypcyjnej genów odbywają się na skutek represji/supresji nukleosomowej (wyciszenie aktywności transkrypcyjnej, ang. *gene silencing*), indukowanej hipermetylacją DNA i reszt

lizyny histonów, demetylacją reszt argininy histonów oraz hipoacetylacją reszt lizyny histonów chromatyny jądrowej. Mogą one także odbywać się na skutek stymulacji, czyli wzmocnienia ich aktywności transkrypcyjnej (ang. *gene expression enhancing*), której towarzyszy demetylacja reszt cytozyny DNA i reszt lizyny histonów, hipermetylacja reszt argininowych histonów oraz hiperacetylacja reszt lizyny histonów H3 i H4 (De Sousa i in., 2002; Cezar i in., 2003; Shi i in., 2004).

3.4. Transkrypcyjne przeprogramowanie epigenetycznej pamięci zakodowanej w strukturze i funkcjach rodzicielskiego piętna genomowego komórek somatycznych w zarodkach klonalnych

Istotnym mechanizmem molekularnym epigenetycznego przeprogramowania DNA jądrowego jest także wymazanie („wyzerowanie”) zjawiska genomowego imprintingu rodzicielskiego (piętnowania gametycznego), warunkującego ekspresję jednorodzicielską (uniparentalną), czyli monoalleliczną niektórych genów, np. genów osi somatotropowej, które są odpowiedzialne za regulację procesów proliferacyjnego i metabolicznego wzrostu komórek, tkanek, organów i ciała rozwijających się płodów i urodzonego potomstwa klonalnego (Lucifero i in., 2002, 2004; Obata i Kono, 2002; Paoloni-Giacobino i Chaillet, 2004; Shi i Wu, 2009). Do epigenetycznie napiętnowanych genów osi somatotropowej należą:

- 1) zlokalizowany w chromosomie 17 myszy i w chromosomie 6 człowieka gen receptora insulinopodobnego czynnika wzrostowego typu 2 (*Igf2r*);
- 2) zlokalizowany w chromosomie 7 myszy i w chromosomie 11 człowieka gen niekodującego transkryptu mRNA specyficznego dla wątroby płodowej (*H19*);
- 3) zlokalizowany w chromosomie 7 myszy i w chromosomie 11 człowieka gen insulinopodobnego czynnika wzrostowego typu 2 (*Igf2*) (Davis i in., 2000; Srivastava i in., 2003; Park i in., 2004a; Pfister-Genskow i in., 2005; Smith i in., 2012).

Wymazywanie markerów charakterystycznych dla rodzicielskiego imprintingu genomowego polega na stopniowym (ale ograniczonym jakościowo i ilościowo) usuwaniu metylacji piętnującej allele wybranych genów pochodzenia ojcowskiego (np. genów *Igf2r* i *H19*, które ulegają ekspresji z genomu matczynego) lub usuwaniu metylacji piętnującej allele genów pochodzenia matczynego (np. genu *Igf2*, który jest ekspresjonowany z genomu ojcowskiego) (Fournier i in., 2002; Young i in., 2003; Reik i in., 2003b; Dindot i in., 2004). W kolejnych stadiach rozwoju przedimplantacyjnego klonalnych zarodków ssaków proces ten dotyczy tylko niewielkiej redukcji liczby zmetylowanych wysp CpG (minisekwencji palindromowych ^{Me}CpG) genomu jądrowego w obrębie międzygenowych regionów kontrolnych piętnowania (ICR; ang. *imprinting control regions*), zwanych również centrami piętnowania lub regionami/domenami o zróżnicowanej metylacji (ang. *differentially methylated regions/domains*; DMR/DMD) (Cezar i in., 2003; Ogawa i in., 2003; Mann i in., 2004; Eilertsen i in., 2007). Dlatego też epigenetyczna pamięć komórkowa o tym, w jaki sposób geny DNA jądrowego były pierwotnie wyznaczone w kierunku ekspresji jednorodzicielskiej, zostaje w przeważającej

większości zachowana, czyli z reguły wzorzec ogólnej metylacji piętnującej ojcowski i matczyny genom jądrowy, pochodzący z komórek somatycznych, jest utrzymany w rozwijających się przedimplantacyjnych zarodkach klonalnych. Z uwagi na fakt, że aparat transkrypcyjny brzdękujących zarodków klonalnych wydaje się być niewrażliwy na zależny od piętnowania genomowego ogólny stopień metylacji dinukleotydów CpG, warunkuje to i tak bialleliczną (dwurodzicielską) ekspresję genów zarodkowych (Mann i Bartolomei, 2002; Lorincz i in., 2002; Ruddock i in., 2004; Rodriguez-Osorio i in., 2012).

Następny unikalny cykl demetylacji/remetylacji w ramach globalnych zmian epigenomowych DNA jądrowego ma miejsce podczas gametogenezy i jest konieczny do całkowitego usunięcia rodzicielskiego piętna genomów somatogenicznych w linii pierwotnych komórek płciowych. W komórkach germinalnych utrzymuje się zatem stan hipometylacji DNA jądrowego i dodatkowo jest usuwana metylacja piętnująca geny ulegające ekspresji uniparentalnej, czyli monoallelicznej, co sprawia że ekspresja genów jest podczas gametogenezy bialleliczna. Z kolei, w późniejszych etapach gametogenezy, allele genów, które są umiejscowione w *loci* somatogenicznych chromosomów odziedziczonych po osobnikach męskich, są piętnowane *de novo* według wzoru odpowiedniego dla danej płci genetycznej rozwijającego się płodu klonalnego. Oznacza to, że pierwotny profil genomowego imprintingu rodzicielskiego, tj. schemat metylacji piętnującej geny, które cechuje monoalleliczna aktywność transkrypcyjna, ulega w takich chromosomach odwróceniu, a ogólny poziom metylacji reszt cytozyny DNA osiąga wysoki stopień w odtworzonej z nich chromatynie interfazowej (Davis i in., 2000; Lee i in., 2003a; Ogawa i in., 2003; Allegrucci i in., 2005; Nashun i in., 2015).

Obserwowane często w rozwoju zarodków i płodów uzyskiwanych na drodze technologii wspomaganego rozrodu zwierząt (klonowanie somatyczne, zapłodnienie *in vitro*) zaburzenia, które występują podczas przeprogramowania epigenetycznych markerów determinujących piętno gametyczne w obrębie genu *Igf2r* oraz w obrębie zespołu genów *H19-Igf2*, są przyczyną np. biallelicznej supresji transkrypcyjnej genu *Igf2r* i/lub genu *H19* albo biallelicznej nadekspresji genu *Igf2*. Epimutacje takie jak: 1) nadmierna metylacja reszt cytozyny DNA i hipoacetylacja histonów chromatyny w obrębie matczynych allelów genów *Igf2r* i/lub *H19* oraz 2) nadmierna demetylacja reszt cytozyny DNA i hiperacetylacja histonów chromatyny w obrębie matczynego allelu genu *Igf2* leżą łącznie u podstaw ujawnienia się i rozwoju fenotypowych cech charakterystycznych dla syndromów nadmiernej masy okołourodzeniowej potomstwa (ang. *Large Offspring Syndrome*; LOS) oraz przerostu (hiperplazji i hipertrofii komórek) łożyska (ang. *Large Placenta Syndrome*; LPS) (De Sousa i in., 2001; Chavatte-Palmer i in., 2002; Inoue i in., 2002; Young i in., 2003; Mann i in., 2003, 2004; Fernandez-Gonzales i in., 2004; Smith i in., 2012).

4. Wpływ metod sztucznej synchronizacji cyklu podziałowego oraz sztucznej modulacji epigenetycznej komórek-dawców jąder na konformacyjne przemodelowanie chromatyny oraz przeprogramowanie epigenomowo-zależnej aktywności transkrypcyjnej DNA w zarodkach klonalnych

Potencjał rozwojowy klonalnych zarodków ssaków jest w znacznej mierze uwarunkowany stopniem zaawansowania epigenetycznych modyfikacji DNA jądrowego komórek somatycznych, poddawanych długotrwałej hodowli *in vitro*. Modulacja profilu pamięci epigenetycznej (tj. schematu metylacji DNA oraz acetylacji histonów) w hodowanych *ex vivo* komórkach somatycznych – dawcach jąder może bowiem zależeć od indukcji nukleosomowej supresji transkrypcyjnej przez różne warunki hodowli *in vitro* (np. inhibicję kontaktową w stanie pełnej konfluencji lub głodzenie komórek) (Zhang i in., 2007; Van Thuan i in., 2009; Costa-Borges i in., 2010; Kim i in., 2011).

Synchronizacja cyklu podziałowego komórek-dawców jąder w fazach G0/G1 odgrywa znaczącą rolę w prawidłowym przeprogramowaniu profilu pamięci epigenetycznej egzogenego jądra w środowisku cytoplazmatycznym oocyto-biorcy (Campbell i Alberio, 2003; Skrzyszowska i in., 2006b). Wprowadzenie komórki somatycznej w stan spoczynkowy, jakim jest faza G0 przy wykorzystaniu różnych metod synchronizacji cyklu komórkowego powoduje „wyciszenie” jej genów wskutek zahamowania ich aktywności transkrypcyjnej. Supresja, tj. uspienie (ang. *quiescence*), potencjału proliferacyjnego komórek-dawców oraz represja transkrypcyjna i metaboliczna ich genomu jądrowego mogą być spowodowane czynnikami zadanymi eksperymentalnie lub występować naturalnie po osiągnięciu przez komórkę stanu pełnego zróżnicowania. Silnie skondensowana chromatyna jądrowa z wyraźnymi symptomami represji nukleosomowej wielu regionów DNA genomowego po wprowadzeniu do oocyto-biorcy prawidłowo reaguje na sygnały biochemiczne płynące z jego środowiska cytoplazmatycznego, tzn. na inhibicję aktywności enzymatycznej metylotransferaz DNA (DNMT1 oraz DNMT3a/b) oraz wzrost aktywności biokatalitycznej acetylaz histonów rdzenia nukleosomowego H3 i H4, co umożliwi pełne przeprogramowanie pamięci epigenetycznej egzogenego jądra (Kang i in., 2002, 2003; Dean i in., 2003; Beaujean i in., 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2005a, b). Z dotychczasowych eksperymentów nad klonowaniem ssaków wynika, że źródłem komórek somatycznych, najbardziej podatnych na epigenetyczne przeprogramowanie genomu jądrowego i mitochondrialnego w zrekonstruowanych zarodkach, są fibroblasty płodowe, a także fibroblasty tkanki skórnej dorosłych osobników, których cykl mitotyczny został zsynchronizowany *in vitro* w stadiach G1/G0 lub G0/G1 w wyniku ich hodowli do stanu pełnej konfluencji lub głodzenia (Lee i in., 2003c, 2005a; Kawano i in., 2004; Skrzyszowska i in., 2006a, b, 2008; Brunetti i in., 2008; Kurome i in., 2003, 2013; Samiec i in., 2013a, b). Po osiągnięciu 100% konfluencji, komórki somatyczne podlegają zahamowaniu kontaktowemu (inhibicji kontaktowej) podziałów mitotycz-

nych, w wyniku opanowania całej dostępnej powierzchni naczynia hodowlanego, tj. substratu. Jest to stan, w którym gęstość komórek limituje ich migrację i proliferacyjny wzrost (Lee i in., 2003c, 2005a; Samiec i in., 2014, 2015). Alternatywny system synchronizacji faz cyklu podziałowego, jakim jest głodzenie, określane również mianem deprywacji troficznej komórek-dawców jąder, polega na gwałtownym i długotrwałym obniżeniu (z 10% do 0,5%) stężenia surowicy płodów bydłęcych (FBS; ang. *foetal bovine serum*) w pożywce hodowlanej, tj. głównego źródła mitogenów, polipeptydowych czynników wzrostowych oraz czynników odżywczych (budulcowych i energetycznych) (Ramsoondar i in., 2003; Kawano i in., 2004; Kurome i in., 2003, 2013; Lagutina i in., 2010, 2011). Z kolei takie warunki hodowli *in vitro* mogą powodować drastyczny przyrost stopnia metylacji reszt cytozyny genomowego DNA oraz niekontrolowane zwiększenie stopnia deacetylacji reszt lizyny histonów chromatyny jądrowej w komórkach somatycznych. Może to być przyczyną znaczących odchyłeń od prawidłowego wzorca ekspresji, kluczowych dla przed- i poimplantacyjnego rozwoju zarodków klonalnych, genów na skutek ograniczonej demetylacji DNA, a także hipoacetylacji histonów rdzenia nukleosomowego oraz wynikającej z tego represji transkrypcyjnej przeważającej części somatogenicznego genomu jądrowego (Kang i in., 2003; Cezar i in., 2003). Jednakże zachowanie prawidłowego wzorca metylacji DNA i acetylacji histonów podczas hodowli *in vitro* komórek-dawców jąder jest jednym z czynników niezbędnych do skutecznego epigenetycznego przeprogramowania transplowanego DNA genomowego (Kang i in., 2002; Cezar i in., 2003; Shi i in., 2003a; Enright i in., 2005). W celu pełnego przeprogramowania jądra dawcy w zrekonstruowanym zarodku, cały wzorzec metylacji DNA (tkankowo-specyficzny) wysoce zróżnicowanych komórek linii somatogenicznej musi zostać cofnięty do początkowego (totipotentnego) statusu rozwojowego jądra zygoty na drodze demetylacji reszt cytozyny (Dean i in., 2003; Yang i in., 2007; Narbonne i in., 2012; Rodriguez-Osorio i in., 2012). Ten tkankowo-specyficzny stopień zróżnicowania komórkowego (cytodiferencjacji) może być uwarunkowany zmiennością we wzorcu ekspresji genów w komórkach o różnym fenotypie i specjalizacji strukturalno-funkcjonalnej, wynikającą z różnic we frekwencjach represji transkrypcyjnej oraz aktywności transkrypcyjnej DNA genomowego poszczególnych typów komórek somatycznych.

Utrzymanie właściwego schematu metylacji genomu jądrowego podczas hodowli *in vitro* komórek somatycznych sprzyja również zachowaniu w nienaruszonej postaci mechanizmów odpowiedzialnych za imprinting genomu rodzicielskiego. To z kolei rzutuje na prawidłowe i pełne przeprogramowanie epigenetycznie uwarunkowanej aktywności transkrypcyjnej jąder komórek somatycznych w klonalnych zarodkach ssaków. Przez wiele lat termin „imprinting gametyczny” czy „rodzicielskie piętno genomowe” używany był w odniesieniu do ekspresji alleli określonego genu tylko z jednego genomu rodzicielskiego (tj. ekspresji uniparentalnej bądź monoallelicznej). Istotnym procesem związanym z ekspresją uniparentalną jest wymazanie specyficznego wzorca wyznakowania genu (tzw. kodu epigenetycznego determinującego imprinting gametyczny lub profilu metylacji piętnującej) w następnym pokoleniu. W komórkach somatycznych potomstwa przejawia

się wówczas potencjalna zdolność do ekspresji alleli określonego genu, pochodzących od obojga rodziców, czyli zdolność do ekspresji biallelicznej (dwurodzicielskiej). Jeżeli jednak ulegający ekspresji jednorodzicielskiej, tj. ekspresyjny uniparentalnie gen jest przekazywany od rodzica jednej płci do potomstwa o płci przeciwnej, wzór jego ekspresji musi zostać odwrócony w linii płciowej potomka. „Zerowanie” rodzicielskiego piętna metylacji genów następuje również podczas ich przekazywania między tą samą płcią, ale w tym przypadku przywracany jest taki sam rodzaj znakowania genu. Identyczny przebieg procesu eliminacji rodzicielskiego piętna gametycznego, a następnie jego rekapitulacji, ma miejsce w następstwie dziedziczenia epigenetycznie wyznakowanych genów przez potomstwo uzyskiwane w wyniku klonowania metodą transplantacji jąder komórek somatycznych do enukleowanych oocytów. Dlatego też epigenetyczna pamięć komórkowa o tym, w jaki sposób geny DNA jądrowego były pierwotnie napiętnowane w kierunku ekspresji monoallelicznej, zostaje w całości przywrócona w różnicujących się komórkach linii trofoektodermalnej oraz embrioblastycznej (epi- i hipoblastycznej) poimplantacyjnych zarodków, a także w różnicujących się komórkach linii gametogenicznej w zawiązkach gonad oraz komórkach linii somatogenicznej w poszczególnych tkankach, organach i częściach ciała płodów i urodzonego potomstwa klonalnego (Mann i in., 2003; Ogawa i in., 2003; Beaujean i in., 2004). Z tego wynika, że wzorzec ogólnej metylacji warunkującej uniparentalną aktywność transkrypcyjną i translacyjną DNA genomowego komórek-dawców jąder w klonowaniu somatycznym jest ustanawiany *de novo* w rozwoju ontogenetycznym osobników klonalnych. Wymazywanie epigenetycznych kodów odpowiedzialnych za piętno rodzicielskie zachodzi zatem w każdym pokoleniu, ale zawsze w jednym z alleli zostaje odwrócony jego pierwotny imprinting. Ogranicza to listę epigenetycznych mechanizmów modyfikujących, które mogłyby być odpowiedzialne za zjawisko piętnowania rodzicielskiego (Lucifero i in., 2002, 2004; Mann i in., 2004; Paoloni-Giacobino i Chaillet, 2004).

Stosowane na szeroką skalę metody synchronizacji cyklu mitotycznego hodowanych komórek-dawców jąder w fazach G0/G1 lub G1/G0, takie jak: deprywacja troficzna lub zahamowanie kontaktowe ich aktywności proliferacyjnej, mogą mieć zatem niekorzystny wpływ na epigenetowo-zależny profil aktywności transkrypcyjnej genów DNA jądrowego i mitochondrialnego, poprzez drastyczne osłabienie poziomu tkankowo-specyficznej ekspresji genomu (Enright i in., 2003; Hiendleder i in., 2004; Bowles i in., 2007; Yang i in., 2007; Wu i in., 2008). Obniżenie aktywności transkrypcyjnej DNA genomowego może być bowiem spowodowane gwałtownym wzrostem częstotliwości takich zmian w pamięci epigenetycznej komórki jak: 1. procesy metylacji reszt cytozyny DNA oraz 2. procesy deacetylacji reszt lizyny histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. Jednakże te szkodliwe dla funkcji fizjologicznych i przeżywalności komórek transformacje biochemiczne genomu jądrowego, które są indukowane w warunkach hodowli *in vitro*, można zahamować, a nawet odwrócić ich przebieg w kierunku wzrostu natężenia ekspresji genów, korzystnego dla aktywności metabolicznej i proliferacyjnej komórek (Shi i in., 2003a, b, 2004; Enright i in., 2005; Cervera i in., 2009).

Jednym ze sposobów odwrócenia zaawansowanych zmian we wzorcu kowalencyjnych modyfikacji epigenetycznych jąder komórek somatycznych, które obejmują gwałtowną metylację DNA lub spadek poziomu acetylacji białek histonowych, wydaje się ich ekspozycja na działanie syntetycznych analogów endogennych związków odwracalnie hamujących aktywność metylotransferaz DNA (DNMTs) oraz deacetylaz histonów (HDACs). Do pierwszej grupy sztucznych modyfikatorów epigenetycznych należą: 1) 5-aza-2'-deoksytydyna (5-aza-dC; decytabina) (Enright i in., 2003, 2005; Wang i in., 2011a; Ning i in., 2013); 2) zebularyna (nukleozydowy analog cytydyny) (Diao i in., 2013; Xiong i in., 2013) i 3) *S*-adenozylhomocysteina (SAH) (Jeon i in., 2008). Z kolei druga grupa obejmuje: 1) trichostatynę A (TSA; *N*-arylowa/*N*-fenylowa pochodna kwasu hydroksamowego) (Kishigami i in., 2006; Wee i in., 2007; Lee i in., 2010; Samiec i in., 2015); 2) butanian/maślan sodu (NaBu) (Das i in., 2010; Liu i in., 2012; Kumar i in., 2013) oraz 3) *bis*hydroksamid kwasu *m*-karboksycynaminowego (CBHA) (Dai i in., 2010; Song i in., 2014). Spośród inhibitorów HDACs nowej generacji, o relatywnie niższych właściwościach cytotoksycznych lub embriotoksycznych, należy wskazać: 4) kwas walproinowy (VPA, ang. *valproic acid*; kwas 2-propylopentanowy/kwas 2-propyłowalerianowy) lub walproinian sodu (SV, ang. *sodium valproate*; 2-propylopentanian sodu/2-propyłowalerian sodu) (Costa-Borges i in., 2010; Kim i in., 2011, Sangalli i in., 2014), a także 5) analog, tj. syntetyczną, amfifilową pochodną kwasu hydroksyaminowego – skryptaid (ang. *scriptaid*; hydroksyamid kwasu 6-(1,3-dioksy-1*H*,3*H*-benzo[de]jizokwinolin-2-yl)-heksanowego) (Van Thuan i in., 2009; Zhao i in., 2009, 2010b; Wang i in., 2011b; Wen i in., 2014) oraz 6) oksamflatynę (aromatyczna/*N*-fenylowa pochodna sulfonoamidu kwasu hydroksamowego) (Su i in., 2011; Park i in., 2012).

Wyniki wielu badań sugerują, że zastosowanie niespecyficznych/nie-selektywnych inhibitorów DNMTs bądź HDACs (iDNMTs/iHDACs) do egzogennej modulacji epigenomowej hodowanych *in vitro* somatycznych komórek-dawców jąder i/lub zarodków klonalnych może mieć pozytywny wpływ na złożone procesy strukturalnego przemodelowania chromatyny jądrowej oraz epigenetycznego przeprogramowania DNA genomowego w przedimplantacyjnej fazie rozwoju zarodków klonalnych (Wee i in., 2007; Jeon i in., 2008; Zhao i in., 2009, 2010a, b; Huan i in., 2013). Scenariusz prawidłowego i pełnego przeprogramowania profilu pamięci epigenetycznej jąder somatogenicznych w komórkach zarodków klonalnych może zostać bowiem zrealizowany jedynie przez zwiększenie częstotliwości pasywnej demetylacji reszt cytozyny DNA oraz osłabienie natężenia deacetylacji (tj. wzmożoną hiperacetylację) reszt lizyny histonów chromatyny komórek-dawców jąder i zarodków, które uprzednio poddano egzogennym modyfikacjom epigenomowym (Yang i in., 2007; Bo i in., 2011; Yamanaka i in., 2009; Xu i in., 2013). Pośrednim wskaźnikiem właściwego przebiegu procesu epigenetycznego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej jąder komórek somatycznych w zarodkach klonalnych jest ich wysoki przedimplantacyjny potencjał rozwojowy i/lub poprawa ich jakości morfologicznej i cytobiochemicznej (Cervera i in., 2009; Martinez-Diaz i in., 2010; Kim i in., 2011; Wang i in., 2011a; Diao i in., 2013).

5. Wpływ metod rekonstrukcji enukleowanych oocytów na przemodelowanie konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej oraz przeprogramowanie epigenetycznie uwarunkowanej aktywności transkrypcyjnej somatogenicznego DNA w zarodkach klonalnych

Rekonstrukcja enukleowanego oocytu (cytoplastu/ooplastu) polega na wprowadzeniu w miejsce usuniętego materiału genetycznego genomu jądrowego komórki somatycznej. W klonowaniu ssaków stosowane są różne metody rekonstrukcji oocytów (tab. 1)**. Do powszechnie wykorzystywanych należy procedura niechirurgicznego transferu jądra komórkowego w oparciu o fuzję cytoplastu z komórką somatyczną, indukowaną impulsem/impulsami elektrycznymi (Niemann i in., 2002; Kurome i in., 2003; Skrzyszowska i in., 2008; Martinez-Diaz i in., 2010; Li i in., 2013b) (tab. 1; ryc. 5). Alternatywną techniką rekonstrukcji jest procedura mikrochirurgiczna obejmująca iniekcję całych komórek somatycznych (Lee i in., 2003c; Jiang i in., 2004b) lub karioplastów (Kawano i in., 2004; Watanabe i in., 2005; Hinrichs i in., 2006; Samiec i Skrzyszowska, 2013; Mizutani i in., 2015), bezpośrednio do cytoplazmy wyjądrzonych oocytów (tab. 1; ryc. 5). Karioplast stanowi żywą obłonioną strukturę powstałą wskutek mechanicznie indukowanej lizy całej komórki somatycznej i zawierającą interfazowe jądro komórkowe lub chromosomy metafazowe, które otoczone są cienką warstwą resztkowej cytoplazmy wokółjądrowej (perinuklearnej) określanej mianem perikarionu.

Rekonstrukcja ooplastów, niezależnie od zastosowanej metody, prowadzi do połączenia oraz wymieszania (hybrydyzacji) środowisk cytoplazmatycznych ooplastu i komórki somatycznej lub karioplastu. Konsekwencją tego jest utworzenie klonalnej hybrydy jądrowo-cytoplazmatycznej/jądrowo-ooplastmatycznej (tj. cybrydy klonalnej). Ta hybrydowa komórka, powstała w wyniku hybrydyzacji mikrośrodowisk cytoplazmatycznych komórek, pochodzących z dwóch różnych linii rozwojowych: gametogenicznej (germinalnej/płciowej) oraz somatogenicznej (somatycznej) jest określana mianem zrekonstruowanego lub zrekonstruowanego oocytu bądź cybrydowej zygoty klonalnej.

Technika rekonstrukcji enukleowanych oocytów może w dużym stopniu wpływać na molekularne mechanizmy rearanżacji chromatyny jądrowej komórek somatycznych, które obejmują, zarówno jej strukturalne przemodelowanie, jak i epigenetyczne przeprogramowanie genomowego DNA (Lee i in., 2003c; Kawano i in., 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2005a, b, 2013; Skrzyszowska i in., 2006b; Martinez-Diaz i in., 2010). Połączenie środowisk cytoplazmatycznych dwóch komórek, znajdujących się w różnych stadiach cyklu podziałowego, powoduje bowiem zakłócenie mechanizmów kontrolujących przebieg cyklu i możliwość pojawienia się nieprawidłowości w dalszym rozwoju cybrydowej zygoty klonalnej. Jednakże odpo-

** Dokładna charakterystyka porównawcza poszczególnych metod rekonstrukcji enukleowanych (wyjądrzonych) oocytów ssaków znajduje się w tekście rozdziałów 5 oraz 6. Z kolei ich syntetyczna charakterystyka porównawcza na poziomie biotechnicznym i cytologicznym, molekularnym oraz epigenetycznym została przedstawiona w formie tabeli 1, zamieszczonej na końcu rozdziału 5.

wiedni dobór stanów cytofizjologicznych komórek somatycznych/karioplastów oraz ooplastów w momencie rekonstrukcji cybryd klonalnych^{***} prowadzi z jednej strony do ograniczenia niestabilności genomu, czyli do zmniejszenia jego podatności na mutacje. Z drugiej strony przyczynia się do zredukowania stopnia asynchronii w interakcjach jądrowo-cytoplazmatycznych i obniżenia częstotliwości nieprawidłowych epigenomowo-zależnych rearanżacji egzogennej chromatyny jądrowej (Wilmut i in., 2002; Dean i in., 2003; Kang i in., 2003; Beaujean i in., 2004; Samiec i in., 2013a, b).

W przeciwieństwie do elektrofuzji, mikroiniekcja karioplastu pozwala na selektywne usunięcie dużej części cytoplazmy komórki-dawcy egzogenego jądra, umożliwiając w ten sposób względne rozrzedzenie składników resztek cytoplazmy komórki somatycznej w cytozolowym mikrośrodkowisku ooplastu i wczesnej zygoty. Bezpośrednim tego skutkiem jest uniknięcie niekorzystnego wpływu komponentów cytoplazmatycznych komórki somatycznej na przemodelowanie i przeprogramowanie transferowanego jądra komórki somatycznej, a w konsekwencji na rozwój zrekonstruowanego zarodka. W przypadku transplantacji jąder stosunkowo małych komórek somatycznych (np. komórki wzgórka jajonośnego lub ściennej warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych, głodzone komórki fibroblastyczne) jest preferowana metoda doooplazmatycznej iniekcji karioplastów lub całych komórek-dawców jąder (Wakayama i in., 1998; Cheong i in., 2000; Roh i Hwang i in., 2002; Kurome i in., 2003; Lee i in., 2003c; Jiang i in., 2004b; Kawano i in., 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2013). Odnotowano bowiem relatywnie wyższy potencjał rozwojowy *in vitro* zarodków świni, zrekonstruowanych techniką mikroiniekcji karioplastów lub całych komórek somatycznych, w stosunku do zarodków klonalnych uzyskanych na drodze elektrofuzji (Lee i in., 2003c; Samiec i Skrzyszowska, 2005a; Watanabe i in., 2005). Mała średnica wymienionych wyżej typów komórek somatycznych jest przyczyną znacznego ograniczenia powierzchni ich kontaktu z plazmolemmą enukleowanych oocytów (oolemma), co w konsekwencji prowadzi do obniżenia odsetka zfuzjowanych kompleksów komórek-dawców jąder i ooplastów. Z kolei bezpośrednia iniekcja karioplastów lub całych komórek somatycznych o małej średnicy do cytoplazmy wyjądrzonych oocytów pozwala na uniknięcie problemów technicznych (wynikających z niezapewnienia ścisłej adhezji błon plazmatycznych), które w największym stopniu ograniczają efektywność elektrofuzji komórek-dawców jąder z cytoplazmami (Roh i Hwang, 2002; Lee i in., 2003c; Jiang i in., 2004b; Kawano i in., 2004).

^{***} Właściwa koordynacja stanu cytofizjologicznego komórek somatycznych lub wyizolowanych z nich karioplastów oraz stanu cytofizjologicznego ooplastów w momencie rekonstrukcji cybryd klonalnych jest skutkiem hybrydyzacji środowisk cytoplazmatycznych komórek-dawców jąder w fazie G0 cyklu mitotycznego oraz enukleowanych oocytów-biorców jąder w stadium metafazy II podziału mejotycznego (MII). Analogicznie do sztucznie zablokowanego w stadium G0 cyklu mitotycznego somatycznych komórek-dawców jąder (charakteryzujących się „uśpioną” aktywnością transkrypcyjną, zahamowanym wzrostem proliferacyjnym i spowolnionym metabolizmem wszystkich organelli), cykl podziałowy (mejotyczny) oocytów-biorców jąder podlega również przejściowemu zahamowaniu w następstwie osiągnięcia dojrzałości jądrowo-ooplazmatycznej w stadium MII, w którym mają miejsce procesy zaawansowanej supresji transkrypcyjnej DNA genomowego.

Metoda bezpośredniej mikroiniekcji jąder komórek somatycznych do cytoplazmy enukleowanych oocytów ma jeszcze tę zaletę, że jest najbardziej „czysta” ze wszystkich innych metod transplantacji jąder, gdyż nie wymaga stosowania jakichkolwiek przekazników fizykochemicznych, powodujących często ujemne skutki uboczne obniżające potencjał rozwojowy *in vitro* klonalnych zarodków ssaków. W przeciwieństwie do techniki elektrofuzji komórek, w której wszystkie komponenty komórki-dawcy (zarówno jądrowe, jak i cytoplazmatyczne – organelle i elementy cytoszkieletu) stają się integralną częścią oocyty, w przypadku mikrochirurgicznego transferu jąder, jak wspomniano wcześniej, plazmolemma i ogromna większość materiału cytoplazmatycznego komórki-dawcy jądra jest przecież odrzucana po lizie komórki. Dlatego też tylko śladowe ilości tzw. cytoplazmy resztkowej w postaci wąskiego rąbka obłonionej protoplazmy wokół jądra komórkowego są wprowadzane w formie niewielkiego karioplastu do enukleowanego oocyty. Ma to istotne znaczenie w niektórych badaniach dotyczących interakcji jądrowo-cytoplazmatycznych w klonalnych cybrydach ssaków (Roh i Hwang, 2002; Kawano i in., 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2005a, b; Watanabe i in., 2005; Hinrichs i in., 2006; Wakayama i in., 2008; Mizutani i in., 2015).

Podstawowym paradygmatem, leżącym u podstaw klonowania somatycznego ssaków, jest teza naukowa, według założeń której jądro komórki-dawcy musi zostać całkowicie przeprogramowane epigenetycznie przez specyficzne czynniki pochodzenia oocytarnego w taki sposób, aby mogło pokierować rozwojem cybrydowej zygoty klonalnej do końca ciąży. Znaczna część białkowych czynników nukleoplazmatycznych (kariolimfatycznych) oraz cytozolowych komórki somatycznej, które są bezpośrednio lub pośrednio zaangażowane w molekularne mechanizmy regulujące zarówno profil epigenetyczny jej DNA genomowego, jak i stopień jej strukturalno-funkcjonalnego zróżnicowania, jest związana z chromatyną jądrową. Natomiast skład jakościowy i ilościowy oraz wzajemne proporcje tych czynników wewnątrz komórki somatycznej ulegają zmianom wraz z postępującym stanem cytodyferencjacji. Jeśli cała komórka-dawca jądra zostanie zfuzjowana z wyjądrzonym oocytem, wtedy te specyficzne czynniki pochodzenia somatogenicznego są także transferowane do cytoplazmy oocyty-biorcy. W związku z tym mogą one blokować zdolność endogennych czynników oocytarnych do właściwego przemodelowania i przeprogramowania profilu epigenetycznego, znamiennego dla obcopolodnego (allogenicznego) jądra terminalnie zróżnicowanej komórki somatycznej, w kierunku epigenetycznego statusu charakterystycznego dla jądra totipotentnej komórki zarodkowej, jaką stanowi zygota (Cezar i in., 2003; Lee i in., 2003a, c; 2005a; Shi i in., 2003a; Seki i in., 2005). Wywodzące się z komórki-dawcy jądra, egzogenne czynniki nukleoplazmatyczne i cytoplazmatyczne, które są odpowiedzialne za modulację statusu epigenetycznego DNA genomowego, zostają inkorporowane, wspólnie z własnymi białkami oraz transkryptami matecznymi (cząsteczkami mRNA) oocyty, do przemodelowanego jądra komórki somatycznej (pseudoprzedjądra), po jego uformowaniu w następstwie sztucznej aktywacji zarodkowego programu rozwojowego zrekonstruowanego oocyty, czyli cybrydowej zygoty klonalnej (Campbell i Alberio, 2003; Bang i in., 2013). Z kolei nadmiar tych

obcych (somatogenicznych) czynników modulujących profil epigenetyczny genomu jądrowego komórki-dawcy, jaki może zostać odnotowany w cytoplazmie oocytu zrekonstruowanego w wyniku elektrofuzji ooplastu z komórką somatyczną, może spowodować znaczne rozrzedzenie endogennych czynników epigenetycznych oocytu, wskutek wzajemnego ich wymieszania w hybrydowym środowisku cytoplazmatycznym zygoty klonalnej. Tym samym może to skutkować zmniejszeniem prawdopodobieństwa pełnego przeprogramowania epigenetycznie uwarunkowanej aktywności transkrypcyjnej jądra komórki somatycznej w rozwijającym się zarodku klonalnym (Rybouchkin i in., 2006; Samiec i Skrzyszowska, 2013; Nashun i in., 2015).

Głównym celem procedury doooplazmatycznej mikroiniekcji jąder komórek somatycznych jest uniknięcie wszystkich uprzednio wspomnianych problemów związanych z procesami o podłożu epigenetycznym i molekularnym. Wprowadzenie praktycznie tylko samego jądra komórki-dawcy do cytoplazmy enukleowanego oocytu wielokrotnie zwiększa prawdopodobieństwo właściwego oddziaływania specyficznych czynników cytozolowych oocytu na procesy epigenetycznego prze-modelowania chromatyny jądrowej i przeprogramowania DNA genomowego, ponieważ jedynym źródłem egzogennych białek enzymatycznych i regulatorowych jest w tym przypadku tylko nukleoplazma transplantowanego karioplastu. Znikome ilości perinuklearnej (wokółjądrowej) cytoplazmy, obecnej w karioplaście w postaci tzw. perikarionu, pozostają przypuszczalnie bez większego wpływu na dalszy rozwój cybrydowych zygot klonalnych. Ponadto zredukowanie objętości obc pochodnej cytoplazmy somatogenicznej, transplantowanej w postaci karioplastu do mikrośrodowiska cytozolowego ooplastu, pozwala albo na całkowite uniknięcie albo na znaczne ograniczenie możliwości hybrydyzacji heteroplazmatycznych źródeł DNA mitochondrialnego (mtDNA) oraz mRNA (w tym także policistronowego mRNA mitochondrialnego), pochodzących z somatycznej komórki-dawcy jądrowego materiału genetycznego oraz z enukleowanego oocytu (cytoplastu)-biorcy. Brak zanieczyszczeń w postaci somatogenicznego mtDNA w środowisku cytoplazmatycznym zrekonstruowanego oocytu, czyli brak tzw. heteroplazmii mtDNA, prowadzi jednocześnie do obniżenia częstości występowania zaburzeń w epigenetycznym przeprogramowaniu DNA jądrowego i DNA mitochondrialnego (w następstwie hipermetylacji lub nadmiernej demetylacji reszt cytozyny DNA). Wszelkie zakłócenia dynamicznej homeostazy epigenetycznych modyfikacji genomowego DNA komórek somatycznych mogą bowiem wynikać z asynchronicznego przebiegu architektonicznego i epigenetycznego przemodelowania chromatyny jądrowej, tj. z nieskoordynowanej deacetylacji/acetylacji jej białek histonowych oraz z podwyższenia poziomu represji nukleosomowej. Wymienione wyżej zakłócenia mogą być także efektem asynchronicznych zmian w konfiguracji przestrzennej regulatorowej pętli D „nagich”, kolistych cząsteczek mtDNA pochodzenia oocytnego oraz somatogenicznego, a w konsekwencji mogą być one efektem zaburzeń w intergenomowej komunikacji między DNA jądrowym a DNA mitochondrialnym, jakie mają miejsce w zrekonstruowanych oocytach i w rozwijających się z nich zarodkach klonalnych (Campbell i Alberio, 2003; Samiec, 2005a, b; Srirattana i in., 2011; Narbonne i in., 2012).

Utrzymanie prawidłowego schematu metylacji DNA genomowego oraz acetylacji białek histonowych rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej we wszystkich potomnych blastomerach przedimplantacyjnych zarodków klonalnych, rozwijających się z oocytów zrekonstruowanych wskutek docytoplazmatycznej mikroiniekcji karioplastów, sprzyja również zachowaniu w nienaruszonej postaci mechanizmów odpowiedzialnych za imprinting genomu rodzicielskiego (ekspresję uniparentalną/monoalleliczną). To z kolei rzutuje na bezbłędną rearanżację egzogennej chromatyny oraz przeprogramowanie jądrowego i mitochondrialnego aparatu genetycznego, a nawet, w skrajnych przypadkach, częściowego przemodelowania struktur chromatynowych, umożliwia również uniknięcie zahamowania aktywności transkrypcyjnej przeważającej części genomu zarodkowego we wczesnych etapach embriogenezy (Mann i in., 2003, 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2005b; Seki i in., 2005).

Innym podejściem do tego zagadnienia mogłyby być mikroiniekcja tylko samych chromosomów metafazowych komórki-dawcy, zamiast całej komórki somatycznej lub całego jądra komórki somatycznej (z nienaruszoną integralnością otoczki jądrowej) do enukleowanego oocytu MII. Wydaje się, że taka strategia powinna zapobiec transferowi przeważającej większości specyficznych czynników komórki-dawcy (cytozolowych i nukleoplazmatycznych), co może mieć wpływ na przemodelowanie i przeprogramowanie jądra. W przeciwieństwie bowiem do mikroiniekcji kompletnych jąder interfazowych komórek-dawców, w wyniku mikrochirurgicznego transferu samych płytek metafazowych, powstałe w aktywowanych oocytach, w procesie przemodelowania, rzekome przedjądra zakumulowałyby w macierzy (matriks) jądrowej tylko endogenne białka ooplazmatyczne w formie związanej z chromatyną. Epigenetyczne przeprogramowanie somatogenicznego genomu komórki-dawcy wskutek pełnej synchronizacji faz cyklu mitotycznego karioplastów oraz cyklu mejotycznego ooplastów, znajdujących się w stadiach metafazy, przebiegałoby bez żadnych zaburzeń. Technika bezpośredniej mikroiniekcji chromosomów metafazowych ostatecznie pozwoliłaby zatem na całkowite wyeliminowanie negatywnych skutków oddziaływania na wprowadzony materiał genetyczny nadmiaru egzogennych (heteroplazmatycznych) czynników białkowych, zakłócających wymianę oraz współdziałanie między epigenetycznymi czynnikami jądrowymi i cytozolowymi czynnikami pochodzenia oocytarnego (Ono i in., 2001; Lai i in., 2001, 2002; Samiec i Skrzyszowska, 2005a, b, 2013).

Kolejną zaletą metody mikroiniekcji jest zapobieganie naruszeniu specyficznej dynamicznej równowagi całej kaskady procesów katalizowanych przez różne enzymy regulujące przejście z mejotycznej do mitotycznej kontroli cyklu komórkowego zrekonstruowanych oocytów, a także umożliwienie prawidłowego funkcjonowania rozmaitych białek regulatorowych (z grupy stymulatorów i inhibitorów) w dzielących się zarodkach klonalnych. Transplantacja jąder interfazowych lub płytek metafazowych metodą chirurgiczną ma jeszcze jedną zasadniczą przewagę nad techniką elektrofuzji komórek. Pozwala ona także uniknąć szkodliwego wpływu nie tylko nadmiaru czynników białkowych, często o antagonistycznym działaniu, lecz także niedoboru czynników białkowych reagujących synergistycznie, w następstwie połączenia i wymieszania (hybrydyzacji) dwóch różnych środowisk cytoplazmatycznych komórki-dawcy jądra oraz ooplastu i w konsekwencji powstania cybrydowej zygoty klonalnej (Samiec, 2005a; Samiec i Skrzyszowska, 2005a, b; Seki i in., 2005).

Tabela 1. Analiza porównawcza trzech różnych strategii rekonstrukcji enukleowanych oocytów ssaków na poziomie biotechnicznym/cytologicznym, molekularnym oraz epigenetycznym

Metoda rekonstrukcji enukleowanych oocytów MII	Charakterystyka na poziomie biotechnicznym i cytologicznym	Charakterystyka na poziomie molekularnym	Charakterystyka na poziomie epigenetycznym
Elektrofuzja kompleksów ooplast-komórka somatyczna	Stosunkowo niski stopień inwazyjności metody: – ingerencja generowanego pola elektrostatycznego w ultrastrukturę i funkcje oolemy komórek-biorców jąder oraz plazmolemy komórek-dawców jąder poprzez: • przejściowe formowanie w ich dwuwarstwie fosfolipidowej mikroporów (mikrokanalów), ułatwiających fuzję ooplastów i komórek somatycznych oraz będących drogą biernego transportu dokomórkowego jonów wapnia w przypadku jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej (F/A) rekonstruowanych oocytów	Relatywnie wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia w uzyskanych cybrydach klonalnych: – zjawiska komórkowej heteroplazmii mtDNA – zaburzeń w interakcjach jądro-cytoplazmatycznych – zaburzeń w intergenomowej komunikacji między allogenicznym DNA jądrowym i cząsteczkami mtDNA komórek somatycznych a cząsteczkami mtDNA pochodzenia ooplazmatycznego	Stosunkowo wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia zaburzeń w: – strukturalnym i epigenetycznym przemodelowaniu chromatyny jądrowej – epigenetycznym reprogramowaniu aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek somatycznych w zrekonstruowanych oocytach oraz w rozwijających się w wyniku ich aktywacji zarodkach klonalnych
Dooplazmatyczna mikroiniekcja całych komórek somatycznych	Wysoki stopień inwazyjności metody: – ingerencja w ultrastrukturę plazmolemy, membrano- i cytoszkieletu enukleowanych oocytów poprzez: • bezpośredni transfer mikrochirurgiczny i zdeponowanie w ich ooplazmie komórek somatycznych o małej średnicy i nienaruszonej integralności błony plazmatycznej	Relatywnie wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia w uzyskanych cybrydach klonalnych: – zjawiska komórkowej heteroplazmii mtDNA – zaburzeń w interakcjach jądro-cytoplazmatycznych – zaburzeń w intergenomowej komunikacji między allogenicznym DNA jądrowym i cząsteczkami mtDNA komórek somatycznych a cząsteczkami mtDNA pochodzenia ooplazmatycznego	Stosunkowo wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia zaburzeń w: – strukturalnym i epigenetycznym przemodelowaniu chromatyny jądrowej – epigenetycznym reprogramowaniu aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek somatycznych w zrekonstruowanych oocytach oraz w rozwijających się w wyniku ich aktywacji zarodkach klonalnych
Dooplazmatyczna mikroiniekcja karioplastów	Najwyższy stopień inwazyjności metody: – ingerencja w ultrastrukturę plazmolemy, membrano- i cytoszkieletu komórek-dawców jąder poprzez: • wywołanie mechanicznie indukowanej cytolyzy w celu wyizolowania z nich karioplastów – ingerencja w ultrastrukturę plazmolemy, membrano- i cytoszkieletu enukleowanych oocytów poprzez: • bezpośredni transfer mikrochirurgiczny i zdeponowanie w ich ooplazmie karioplastów	Relatywnie niskie prawdopodobieństwo wystąpienia w uzyskanych cybrydach klonalnych: – zjawiska komórkowej heteroplazmii mtDNA – zaburzeń w interakcjach jądro-cytoplazmatycznych – zaburzeń w intergenomowej komunikacji między allogenicznym DNA jądrowym i cząsteczkami mtDNA komórek somatycznych a cząsteczkami mtDNA pochodzenia ooplazmatycznego	Stosunkowo niskie prawdopodobieństwo wystąpienia zaburzeń w: – strukturalnym i epigenetycznym przemodelowaniu chromatyny jądrowej – epigenetycznym reprogramowaniu aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek somatycznych w zrekonstruowanych oocytach oraz w rozwijających się w wyniku ich aktywacji zarodkach klonalnych

6. Znaczenie intergenomowej komunikacji między DNA mitochondrialnym a DNA jądrowym w przed- i poimplantacyjnym rozwoju zarodków klonalnych

Wzrost kompetencji cytoplazmy oocytów do strukturalnego przemodelowania oraz epigenetycznego przeprogramowania jądrowego i mitochondrialnego genomu komórek somatycznych w przed- i poimplantacyjnych zarodkach klonalnych jest niezwykle istotny, biorąc pod uwagę cytofizjologiczne i biofizyczne ograniczenia możliwości adaptacyjnych cybrydowych zygot klonalnych, powstałych w wyniku hybrydyzacji mikrośrodków cytoplazmatycznych komórek pochodzących z dwóch różnych linii rozwojowych: gametogenicznej oraz somatogenicznej (Lorthongpanich i in., 2010; Esteves i in., 2011; Kungulovski i Jeltsch, 2016). Epigenetyczne przemodelowanie/przeprogramowanie somatogenicznego aparatu jądrowego jest zatem rezultatem wzajemnego oddziaływania czynników zakumulowanych w nukleoplazmie i przyłączonych do chromatyny, skonfigurowanej w płytkę metafazową w następstwie odpowiedniej rearanżacji struktury przestrzennej i represji nukleosomowej, z czynnikami białkowymi cytoplazmy enukleowanego oocyta/ooplastu MII (Eilertsen i in., 2007; Whitworth i Prather, 2010; Mason i in., 2012). Wynika z tego, że te kluczowe dla klonowania somatycznego procesy nie są bezpośrednim efektem podporządkowania się allogenicznego materiału genetycznego warunkom cytofizjologicznym ooplastu MII. Dlatego też jądra komórek somatycznych mają tendencję do minimalizowania stopnia manifestacji własnego programu rozwojowego po wprowadzeniu do obcej cytoplazmy. Niski udział realizacji somatogenicznego programu genetycznego w rozwoju przedimplantacyjnym zarodków klonalnych w dużym stopniu jest przejawem zachowania przez egzogenny aparat jądrowy kompetencji do łatwego dostosowania się do programu mejotycznej, a następnie mitotycznej kontroli punktów restrykcyjnych cyklu komórkowego, narzuconego mu przez środowisko cytozolowe zrekonstruowanych zygot (Armstrong i in., 2006; Corry i in., 2009; Prather i in., 2009). Najprawdopodobniej jednak zdolności transplątowanych jąder do pełnego pokierowania przed- i poimplantacyjnym rozwojem zarodków, a następnie płodów klonalnych są wypadkową prawidłowego przebiegu scenariusza molekularnych mechanizmów, towarzyszących zarówno przemodelowaniu konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej, jak i transkrypcyjnemu przeprogramowaniu genomu komórek somatycznych (Reik, 2007; Yang i in., 2007; Buganim i in., 2013). Dopiero właściwa rearanżacja egzogenego aparatu genetycznego indukuje uruchomienie programu aktywnego oddziaływania genomowego DNA komórki-dawcy na cytoplazmę oraz cząsteczki DNA mitochondrialnego pochodzenia, zarówno oocytarne (matecznego), jak i heteroplazmatycznego (somatogenicznego) w poszczególnych komórkach potomnych (blastomerach) zarodków klonalnych, stanowiących z cytologicznego punktu widzenia hybrydy jądrowo-cytoplazmatyczne, tj. cybrydy (Narbonne i in., 2012; Rodriguez-Osorio i in., 2012).

Mitochondria są półautonomicznymi organellami, posiadającymi własny materiał genetyczny w formie dwuniciowych (heliksowo zwiniętych), kolistych

cząsteczek DNA (mtDNA) o długości około 16 300 do 16 500 par zasad (pz). W mitochondrialnym DNA zakodowana jest informacja o strukturze 13 białek, 22 cząsteczek tRNA oraz 2 cząsteczek rRNA. W biogenezę i funkcje cytofizjologiczne mitochondriów jest zaangażowanych aż 95% białek, będących produktami cytoplazmatycznego systemu translacji, kodowanego przez DNA jądrowy (Bowles i in., 2007; Lagutina i in., 2010). Łączna pula kopii genomu mitochondrialnego w typowej komórce somatycznej ssaka wynosi w przybliżeniu $2-5 \times 10^3$, podczas gdy liczba cząsteczek mtDNA w dojrzałym oocyty (w stadium metafazy II podziału mejotycznego) sięga poziomu $1,6 \times 10^5$ u myszy, $2,5 \times 10^5$ u bydła, $3-5 \times 10^5$ u świni oraz $3-8 \times 10^5$ u człowieka. Średnia liczba mitochondriów w komórce somatycznej oscyluje w granicach 1×10^3 , a jedno organellum jest rezerwuarem od 1 do 10 cząsteczek mtDNA. Z kolei pojedyncze mitochondrium w dojrzałym mejotycznie oocyty zawiera od 1 do 2 kopii genomu mitochondrialnego, co potwierdza, że liczebność wewnątrzocytarnej populacji tych organelli jest z reguły równoważna z całkowitą pulą cząsteczek mtDNA niezapłodnionej komórki jajowej ssaka (Samiec, 2005a; Hiendleder, 2007).

W procedurze klonowania somatycznego mitochondria komórek-dawców jąder są transplantowane wraz z jądrowym aparatem genetycznym do cytoplazmy enukleowanych oocytów-biorców (rekonstrukcja ooplastów; tab. 1)^{****}. Rekonstrukcja enukleowanych oocytów, zarówno na drodze fuzji kompleksów ooplast-komórka somatyczna, indukowanej w polu elektrostatycznym, jak i na drodze dooplazmatycznej iniekcji całych komórek somatycznych lub wyizolowanych z nich karioplastów (tab. 1; ryc. 5), prowadzi do połączenia oraz wymieszania (hybrydyzacji) środowisk cytoplazmatycznych ooplastu i komórki somatycznej lub karioplastu. Z uwagi na fakt, że karioplast jest żywą obłonioną strukturą uzyskaną na skutek mechanicznie indukowanej lizy całej komórki somatycznej oraz zawiera interfazowe jądro komórkowe lub chromosomy metafazowe otoczone cienką warstwą resztkowej cytoplazmy wokółjądrowej (tzw. perikarionem), po wprowadzeniu do ooplastu ów perikarion może być również źródłem mitochondriów (genomu mitochondrialnego) pochodzenia heteroplazmatycznego. Dlatego też zrekonstruowany zarodek klonalny, będący z cytologicznego punktu widzenia hybrydą cytoplazmatyczną (cybrydą), jest nośnikiem genomu mitochondrialnego pochodzenia, zarówno oocytarnego, jak i egzogenego (wprowadzonego z komórką-dawcą jądra) (Samiec i Skrzyszowska, 2005a, b; Burgstaller i in., 2007). W przypadku sklonowanych zwierząt mitochondria są dziedziczone pierwotnie wraz z materiałem ooplazmatycznym. Z kolei mitochondria pochodzące z komórek-dawców jąder ulegają prawdopodobnie podczas kilku pierwszych podziałów mitotycznych bruzdkowania gwałtownej eliminacji z cytoplazmy komórek zarodkowych w stadium anafazy, która jest zależna w dużym stopniu od poliubikwityniza-

^{****} Dokładna charakterystyka porównawcza poszczególnych metod rekonstrukcji enukleowanych oocytów ssaków znajduje się w tekście rozdziału 5. Z kolei, ich syntetyczna charakterystyka porównawcza na poziomie biotechnicznym/cytologicznym, molekularnym oraz epigenetycznym została przedstawiona w formie tabeli 1, która jest umieszczona na końcu rozdziału 5.

cji odpowiednich substratów białkowych. Dlatego też obecność somatogenicznego genomu mitochondrialnego w komórkach blastocyst klonalnych jest trudna do wykrycia technikami inżynierii genetycznej (Samiec, 2005b; Hiendleder, 2007). Molekularny mechanizm jednorodzielskiego (uniparentalnego) dziedziczenia pozajądrowej informacji genetycznej w dzielących się cybrydowych zygotach klonalnych jest zatem regulowany za pośrednictwem biodegradacji wyznakowanych uprzednio przez ubikwitynę białek mitochondrialnych (w tym rybonukleoprotein) oraz nukleolizy pozbawionych histonów i białek niehistonowych cząsteczek mtDNA. Proces proteolitycznego rozpadu mitochondriów pochodzenia heteroplazmatycznego (allogenicznego) jest katalizowany przez złożony system proteasomalny hybrydowych blastomerów o stałej sedymentacji rzędu 26 jednostek Svedberga (tj. proteasom 26S). Mechanizm nukleolitycznej biodestrukcji wszystkich kopii genomu mitochondrialnego komórki somatycznej jest natomiast uwarunkowany prawidłowym stanem czynnościowym wewnątrzkomórkowego cyklu lizosomalnego, sprzężonego z reakcją egzocytozy pęcherzyków endosomalnych. Efektem końcowym tej reakcji jest usunięcie z komórek zarodkowych allogenicznych (obc pochodnych) frakcji mtDNA, uprzednio poddanego internukleosomowej fragmentacji na krótkie odcinki oligonukleotydydowe. Zachodzący w przedimplantacyjnej fazie rozwoju, proces selektywnej segregacji genomu mitochondrialnego komórek-dawców jąder, który jest pośrednio indukowany przez – ulegający heterodimeryzacji z kinazą cyklinozależną cdc20 oraz będący integralną częścią wielopodjednostkowego układu enzymatycznego ligazy ubikwitynowej – kompleks inicjujący anafazę/cyklosom (APC/C), prowadzi stopniowo do powstania komórkowej homoplazmii mtDNA w zrekonstruowanych zarodkach. Jedynie w sporadycznych przypadkach trwała hybrydyzacja obc pochodnych kopii mtDNA, czyli tzw. komórkowa heteroplazmia mtDNA, która wynikała z synergizmu/komplementarności w intergenomowej komunikacji między cząsteczkami mtDNA, odziedziczonymi zarówno z cytoplazmą komórek-dawców jąder, jak i z ooplazmą komórek-biorców jąder, była możliwa do zidentyfikowania w pre- i postnatalnym okresie rozwoju osobników klonalnych (Bowles i in., 2007; Yan i in., 2010, 2011).

Istnieje kilka gatunkowo-specyficznych czynników epigenetycznych obecnych w cytoplazmie oocyta, które mogą prowadzić do niekompatybilnego wzorca interakcji jądro-cytoplazmatycznych, albo bezpośrednio po transplatacji jądra komórki-dawcy, albo w późniejszych stadiach rozwoju zarodków klonalnych (Hiendleder i in., 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2014). Z kolei ten potencjalny brak koordynacji we wzajemnych oddziaływaniach czynników jądro-cytoplazmatycznych hybrydowych zygot klonalnych jest prawdopodobnie jednym z powodów ograniczonego potencjału praktycznych możliwości aplikacyjnych technologii klonowania somatycznego. Wykazano, że cząsteczki mtDNA pochodzenia matcznego, zakumulowane w mitochondrialnych rezerwuarach cytozolu oocyta-biorcy jądra, odgrywają istotną rolę w asynchronicznym charakterze interakcji jądro-cytoplazmatycznych. Asynchronia ta obejmuje, zarówno akompatybilne zmiany epigenetycznych modyfikacji somatogenicznego genomu jądro-cytoplazmatycznego komórki-dawcy, kierującego programem rozwojowym zrekonstruowanej cybrydy

klonalnej, jak i brak synergistycznego przebiegu molekularnych mechanizmów regulatorowych, zaangażowanych w punkty restrykcyjne kariokinezy i cytokinezy. Te punkty kontrolne anafazowej segregacji chromosomów pochodzenia somatogenicznego oraz asymetrycznego podziału telofazowego komórkowej hybrydy jądrowo-ooplazmatycznej (cybrydy klonalnej), który jest związany z procesem wyrzucenia do przestrzeni okołozóltkowej tzw. rzekomego ciała kierunkowego (pseudopolocytu), są łącznie odpowiedzialne za skoordynowane przejście z pseudomejotycznej do mitotycznej kontroli cyklu podziałowego po sztucznej aktywacji oocytu zrekonstruowanego z jądra komórki somatycznej (Lagutina i in., 2010; Srirattana i in., 2011).

Ponadto udowodniono, że obecność mitochondrialnego aparatu genetycznego pochodzenia oocytarnego wpływa także na proces implantacji zarodków klonalnych w *endometrium* macicy samic-biorczyń. Z tego też względu, w przypadku występowania zjawiska mitochondrialnej heteroplazmii komórkowej w zrekonstruowanych hybrydach jądrowo-cytoplazmatycznych, nie można wykluczyć niekorzystnego efektu oddziaływania heterogenicznych źródeł cząsteczek mtDNA na przedimplantacyjny rozwój zarodków klonalnych (Hiendleder i in., 2004; Burgstaller i in., 2007). Dlatego też uzyskiwanie zarodków, płodów i potomstwa klonalnego z dokładnie określonymi konstelacjami poszczególnych sekwencji nukleotydowych w odcinkach regulatorowych lub kodujących genomu jądrowego i/lub mitochondrialnego może mieć niezwykle istotne znaczenie w eksperymentach nad rozdziałem efektów oddziaływania genetycznych i/lub epigenetycznych komponentów jądrowych i cytoplazmatycznych, jak również wewnątrzmacicznego środowiska samic-biorczyń na rozwój zarodkowy, płodowy oraz postnatalny osobników klonalnych (Bowles i in., 2007; Hiendleder, 2007).

W hybrydowym środowisku cytoplazmatycznym zygot klonalnych stwierdza się zatem współistnienie genetycznie odmiennych frakcji mitochondrialnego DNA pochodzenia matecznego (oocytarnego) oraz somatogenicznego, czyli wywodzącego się z cytoplazmy allogenicznych komórek somatycznych. Ten pozajądrowy (mitochondrialny) aparat genetyczny klonalnych hybryd jądrowo-ooplazmatycznych zawiera wprawdzie niewielką (ok. 0,01%) część informacji dziedzicznej komórki, lecz ta mtDNA-zależna informacja genetyczna różni się całkowicie od informacji zakodowanej w sekwencji nukleotydów DNA jądrowego, stanowiącego aż 99,99% genomu komórki. W tym aspekcie transplantacja jąder obcopochodnych komórek somatycznych do enukleowanych oocytów-biorców (w sytuacji gdy komórki-dawcy jąder i oocyty wywodzą się od różnych genetycznie osobników tego samego gatunku zwierząt) prowadzi do powstania hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych, które posiadają heterogeniczne kopie mtDNA. Z uwagi na fakt, że z takich heteroplazmatycznych cybryd klonalnych rozwijają się zarodki charakteryzujące się komórkową heteroplazmią mtDNA, może to prowadzić do pozornej identyczności/zgodności genotypowej i fenotypowej uzyskiwanego w wyniku klonowania potomstwa (tylko w stosunku do cech uwarunkowanych dziedziczeniem zależnym od genomu jądrowego). Takie potomstwo klonalne cechuje bowiem pewien stopień zmienności/niezgodności w odniesieniu do cech fenotypowych, uwarunkowanych dziedziczeniem cytoplazmatycznym (pozajądrowo-

wym), które jest zależne od genotypu mitochondrialnego, określanego mianem mitotypu (Burgstaller i in., 2007; Yan i in., 2011; Samiec i Skrzyszowska, 2014).

„Idealny” klon można uzyskać tylko w sytuacji, gdy jądra autogenicznych (własnopochodnych) komórek somatycznych zostaną wprowadzone do enukleowanych oocytów-biorców, a zatem wówczas, gdy komórki-dawcy jąder i oocyty wywodzą się od identycznych genetycznie osobników danego gatunku ssaków, czyli od osobników jednopłciowych (żeńskich). Należy podkreślić, że jedynie ze zrekonstruowanych w ten sposób oocytów, które posiadają homogeniczne frakcje cząsteczek mtDNA, można otrzymać całkowicie homoplazmatyczne cybrydowe zygoty klonalne. W wyniku sztucznej aktywacji takich hybryd jądro-cytoplazmatycznych rozwijają się z nich zarodki klonalne, charakteryzujące się komórkową homoplazmą mtDNA. Skutkuje to oczywiście pełną identycznością/zgodnością genotypową i fenotypową uzyskiwanych w wyniku klonowania somatycznego płodów i urodzonego potomstwa. W związku z powyższym jedynie w przypadku samic klonalnych mitotyp wykazuje homogenny wzorec sekwencji kodujących i regulatorowych we wszystkich kopiach mtDNA komórek linii somatogenicznej i płciowej, przy założeniu, że podczas rozwoju osobniczego genom mitochondrialny nie będzie podlegał spontanicznym lub indukowanym przy udziale reaktywnych form tlenu mutacjom punktowym (Samiec, 2005a, b; Galli i in., 2003; Yan i in., 2010).

Wśród powodów dywersyfikacji (zróznicowania) genetycznego między osobnikami klonalnymi (klonami somatycznymi) a osobnikami klonowanymi (dawcami komórek somatycznych do zabiegu klonowania) należy zatem zdecydowanie wymienić wpływ dziedziczenia mitochondrialnego (pozajądrowego/pozachromosomowego) oraz wpływ środowiska wewnątrzmacicznego samic-biorczyń zarodków klonalnych. Pozajądrowe dziedziczenie materiału genetycznego wynika z mikrochirurgicznego, losowego wprowadzenia kopii obcego mtDNA wraz z cytoplazmą komórki-dawcy jądra do środowiska cytoplazmatycznego oocytu-biorcy. Wymieszanie cząsteczek genomu mitochondrialnego pochodzenia matczynego (oocytarnego) oraz pochodzenia somatogenicznego (zjawisko heteroplazmii mtDNA) prowadzi bowiem do międzyosobniczego zróznicowania w obrębie mitotypu, czego efektem jest wewnątrzpopulacyjna i międzypopulacyjna zmienność genotypowa i fenotypowa, zależna od genomu mitochondrialnego (Bowles i in., 2007; Lagutina i in., 2010; Srirattana i in., 2011). Do różnic fenotypowych między osobnikami klonalnymi a osobnikami klonowanymi przyczyniają się także odmienne uwarunkowania morfologiczne, anatomotopograficzne, histologiczne, fizjologiczne, endokrynologiczne, embriotroficzne i immunologiczne związane z układem rozrodczym matek zastępczych. Ponadto obserwuje się często przełożyskowy (transplacentarny) przeciek mitochondriów leukocytarnych i erytroblastycznych z krwiobiegu matek zastępczych do krwiobiegu płodów klonalnych. Ten rodzaj chimeryzmu leukocytarno-erytroblastycznego, wynikający ze zjawiska heteroplazmii mtDNA w komórkach krwi obwodowej oraz z mozaicyzmu genetycznego w obrębie subpopulacji jądrzastych komórek szeregu hematopoetycznego (krwiotwórczego), może mieć również pewien wpływ na różnice w mitotypie potomstwa klonalnego (Hiendleder i in., 2004; Burgstaller i in., 2007).

7. Epigenetyczne przeprogramowanie telomerów w chromosomach uformowanych z somatogenicznej chromatyny jądrowej w rozwoju osobniczym ssaków klonalnych

Niewyjaśnionym dotychczas problemem pozostaje „epigenetyczny wiek” sklonowanych zwierząt, który skorelowany jest, jak się wydaje, z długością terminalnych odcinków DNA określanych mianem telomerów (Miyashita i in., 2002; Kishigami i in., 2008). Telomery stanowią struktury deoksyrybonukleoproteinowe, których zadaniem jest niezbędna do zajścia nie tylko wolnej od mutacji replikacyjnej rundy DNA genomowego, lecz także kariokinetycznego rozdziału/segregacji chromosomów, stabilizacja struktury oraz konformacji chromatyny jądrowej w okresie podziałowym cyklu mitotycznego komórki (Bekaert i in., 2004; Schatzlein i Rudolph, 2005). Replikacja linearnego DNA eukariotycznej chromatyny jądrowej napotyka na problem polegający na tym, że koniec 5' nici opóźnionej nie może ulec replikacji z powodu braku miejsca dla startera RNA inicjującego replikację. Odcinek starterowy RNA syntetyzowany jest na matrycy opóźnionej nici DNA przez tzw. prymazę, czyli polimerazę RNA, której rolę pełni polimeraza DNA α . Powoduje to niebezpieczeństwo, że chromosomy komórek somatycznych będą ulegały skróceniu z każdą rundą replikacyjną, a tym samym będą traciły informację genetyczną. W komórkach somatycznych ssaków klasyczna izoforma α polimerazy DNA nie posiada zdolności do replikacji semikonserwatywnej (półzachowawczej) końca 5' syntetyzowanego we fragmentach łańcucha DNA opóźnionego replikacyjnie w stosunku do końca 3' kopiowanej w sposób ciągły nici wiodącej (Betts i in., 2006; Gomes i in., 2011). W konsekwencji w każdym cyklu podziałowym komórki nieodtworzone telomerowe sekwencje DNA ulegają sukcesywnej utracie. Z tego też względu długość telomerów stanowi rodzaj swoistego „fizjologicznego zegara mitotycznego” komórki. Skracanie regionów telomerowych chromosomów jest skorelowane pozytywnie z liczbą podziałów komórkowych, a gdy długość telomerów osiąga krytyczny punkt restrykcyjny/kontrolny w aktywnej kariokinetycznie komórce somatycznej, sygnalizuje to zaprogramowany epigenetycznie w strukturze/konfiguracji przestrzennej i funkcjach telomerów moment utraty stabilności chromatyny jądrowej oraz uruchomienie w komórce procesu tzw. starzenia replikacyjnego (Lanza i in., 2000b; Kühholzer-Cabot i Brem, 2002; Kishigami i in., 2008). Do charakterystycznych cech komórek, które ulegają progresywnemu starzeniu replikacyjnemu, należy zaliczyć znaczne zwiększenie średnicy i silnie spłaszczony kształt, spowodowany drastycznym wzrostem objętości ich cytozolu. Te wszystkie wyżej wspomniane transformacje epigenetyczne, genetyczne, cytofizjologiczne, morfologiczne oraz ultrastrukturalne, jakie zachodzą w starzejących się komórkach, prowadzą w pierwszej kolejności do gwałtownego osłabienia tempa wewnątrzkomórkowych procesów anabolicznych oraz do szybkiego spowolnienia kinetyki ich podziałów mitotycznych, a w dalszym etapie – do nieodwracalnego zahamowania ich aktywności metabolicznej oraz proliferacyjnej. W następstwie jednego podwojenia populacji hodowanych *in vitro*

komórek fibroblastycznych tkanki skórnej dorosłych osobników ssaków, długość telomerów ulega skróceniu o około 48 par nukleotydów DNA jądrowego (Xu i Yang, 2001; Jeon i in., 2005).

Telomeraza jest rybonukleoproteinowym kompleksem enzymatycznym, który wykazuje pełną aktywność odwrotnej transkryptazy RNA oraz integrazy DNA tylko w komórkach płciowych i zarodkowych, częściową – w somatycznych komórkach płodowych (ulegających tkankowo-swoistej cytodyferencji), natomiast w komórkach somatycznych dorosłych osobników następuje całkowity zanik aktywności biokatalitycznej tego enzymu (Cui i in., 2003; Jiang i in., 2004a; Betts i in., 2006). Funkcją telomerazy jest odtwarzanie, na drodze odwrotnej transkrypcji własnej matrycy RNA, pierwotnej długości telomerów DNA poprzez syntezę *de novo* (reduplikację) utraconych – w wyniku podziału mitotycznego lub mejotycznego komórek płciowych lub mitotycznych cykli blastomerów w okresie bruzdowania zarodków – powtarzających się tandemowo, niekodujących telomerowych sekwencji DNA (5'-TTAGGG-3'). W ostatniej fazie replikacji półzachowawczej DNA, koniec 3' nici wiodącej wystaje poza koniec 5' nici opóźnionej. Telomeraza zawiera cząsteczkę RNA, która jest częściowo komplementarna do tandemowo powtarzającej się krótkiej sekwencji 5'-TTAGGG-3', występującej na końcu 3' nici wiodącej, dlatego też wydłuża nią wiodącą telomerowego regionu DNA, używając RNA jako matrycy. Następnie enzym odłącza się i wiąże z nowym końcem telomerowym, wydłużając nią wiodącą. Proces wydłużania może zachodzić setki razy, zanim telomeraza ostatecznie oddysocjuje. Wydłużona, odtworzona nią wiodąca służy następnie jako matryca do replikacji końca 5' nici opóźnionej, katalizowanej przez polimerazę DNA α . Te dwa procesy, w czasie których końce 5' DNA ulegają skróceniu podczas podstawowej replikacji semikonserwatywnej i wydłużeniu wskutek aktywności telomerazy, są wzajemnie zrównoważone, dzięki czemu całkowita długość chromosomów pozostaje w przybliżeniu taka sama (Betts i in., 2001; Jeon i in., 2005). Z kolei brak aktywności telomerazy w komórkach somatycznych, stanowiących źródło dawców jąder w procedurze klonowania, a także ściśle ograniczona czasowo i przestrzennie długość sekwencji telomerowych DNA jądrowego są epigenomowo-uwarunkowanymi czynnikami limitującymi żywotność, tempo proliferacji oraz liczbę cykli podziałowych określonej komórki przed osiągnięciem przez nią krytycznego momentu maksymalnego skrócenia telomerów, który jest jednocześnie kontrolnym punktem mitotycznym, sygnalizującym rozpoczęcie i nieodwracalność procesu replikacyjnego starzenia komórki (Kühholzer-Cabot i Brem, 2002; Bekaert i in., 2004).

Problem skracania się telomerów i replikacyjnego starzenia się komórek somatycznych zaobserwowano w chromosomach owcy Dolly, pierwszego sklonowanego ssaka (Shiels i in., 1999; Wilmut i in., 2002). Okazało się bowiem, że telomery w chromosomach klonalnej maciorki Dolly (w wieku 3 lat) były znacznie krótsze od długości telomerów w chromosomach osobników pochodzących z grupy kontrolnej (będących w tym samym wieku i urodzonych wskutek naturalnego rozrodu). Ponadto długość telomerów w chromosomach Dolly była zbliżona do długości telomerów w chromosomach komórek 6-letniej owcy, wykorzystanej jako

dawca komórek somatycznych w procedurze klonowania. W momencie przeprowadzania molekularnej analizy telomerów Dolly miała zatem 3 lata, a jej wiek epigenetyczny odpowiadał rzeczywistemu wiekowi 9-letniej owcy (komórki somatyczne Dolly były o 6 lat starsze epigenetycznie niż ona sama). Urodzona 5 lipca 1996 r. Dolly przeżyła nieco ponad 6,5 roku i została poddana eutanazji w dniu 14 lutego 2003 r. z powodu zdiagnozowania u niej złośliwego nowotworu płuc *Jaagsiekte* (owczego gruczolakoraka płuc). Czynnikiem etiologicznym tej przewlekłej, zakaźnej i śmiertelnej choroby nowotworowej płuc u owiec jest retrowirus JSRV (ang. *Jaagsiekte sheep retrovirus*), odpowiadający za onkogeną transformację komórek nabłonka oskrzeli, tj. pneumocytów typu II oraz oskrzelikowych komórek maczugowatych. Z jednej strony, do roku 2000 Dolly urodziła łącznie 6 jagniąt (w tym bliźnięta i trojaczki), a więc zachowała zdrowie reprodukcyjne oraz charakteryzowała się wysoką płodnością i plennością, czyli jej zdolności rozrodcze po osiągnięciu dojrzałości płciowej i hodowlanej (rozplodowej) nie były upośledzone. Z drugiej jednak strony, w roku 2001, w tylnych kończynach pięcioletniej wówczas Dolly wykryto pierwsze objawy przewlekłej choroby zwyrodnieniowej stawów (osteoartrozy) o podłożu autoimmunologicznym, jaką jest reumatoidalne zapalenie stawów, czyli artretyzm. Warto podkreślić, że schorzenie to występuje stosunkowo często u owiec różnych ras, jednak zwykle nie pojawia się u osobników młodszych niż dziesięcioletnie. Powstają zatem dwa następujące pytania: Czyżby zamiast oczekiwanych 12–15 lat (tyle wynosi bowiem przeciętna długość życia owiec rasy *Finn-Dorset*, której przedstawicielem była maciorka-dawca komórki somatycznej w procedurze klonowania), Dolly żyła o około 6 do 9 lat krócej? Czyżby wykazywała ona szybko postępujące symptomy – będącego następstwem klonowania somatycznego – przedwczesnego, anatomicznego i fizjologicznego starzenia się całego organizmu lub tylko niektórych jego części, tkanek oraz narządów? Rezultaty doświadczeń ukierunkowanych na określenie „wieku telomerowego” owcy Dolly świadczyłyby o tym, że zwierzę sklonowane w wyniku transplantacji, do enukleowanego oocytu, jądra komórki somatycznej (pochodzącej od dorosłego osobnika) jest obciążone epigenetycznie, a w konsekwencji także genetycznie, wiekiem dawcy somatogenicznego DNA genomowego, czyli w chwili urodzenia epigenetycznie/genetycznie jest już znacznie starsze niż w czasie rzeczywistym (Shiels i in., 1999; Cui i in., 2003). Jednakże te informacje, dotyczące owiec klonalnych, nie znalazły odzwierciedlenia w badaniach nad chromosomami wyizolowanymi z komórek somatycznych, pochodzących od bydła klonalnego. Z badań Lanzy i in. (2000b), przeprowadzonych na chromosomach cieląt klonalnych, które zostały uzyskane na skutek rekonstrukcji enukleowanych oocytów z jąder komórek fibroblastycznych, wywodzących się z długotrwałych hodowli *in vitro*, wynikało, że telomery tych młodocianych osobników mają długość przekraczającą nawet nieznacznie długość telomerów w chromosomach zwierząt kontrolnych, mimo że chromosomy komórek-dawców jąder były niemal całkowicie pozbawione telomerów. Analizy te potwierdziły, że końcowe odcinki chromosomów są skutecznie resyntetyzowane w blastomerach bydlęcych zarodków klonalnych, przy udziale wysoce aktywnych telomeraz. Podobnie eksperymenty Tian i in.

(2000) wykazały, że długość telomerów w chromosomach 4 żyjących (ok. 15,4 kpz) oraz 6 padłych osobników (ok. 15,9 kpz) spośród 10 urodzonych cieląt klonalnych (uzyskanych z zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów tkanki skórno-powłokowej ucha lub z jąder komórek wzgórka jajonośnego, wyizolowanych z antralnych pęcherzyków jajnikowych 13-letniej krowy) nie tylko nie różniła się znacząco od długości telomerów, charakterystycznej dla chromosomów zwierząt kontrolnych (ok. 14,7 kpz), lecz także istotnie przewyższała (o ok. 3-3,5 kpz) długość telomerów w chromosomach starzejącej się krowy (ok. 12,4 kpz), która była dawczynią komórek somatycznych, użytych do zabiegu klonowania. Kato i in. (2000) udowodnili natomiast, że u bydła klonalnego do skracania długości telomerów dochodzi tylko w tych tkankach, jakie odpowiadają tkankom, z których bioptatów wyprowadzono hodowlę pierwotne, a z nich linie/szczepy komórek somatycznych, stanowiących źródło dawców jąder wykorzystanych w procedurze klonowania.

Długość telomerów w chromosomach komórek pochodzących z linii klonalnych wyprowadzonych z bioptatów tkanki skórnej, pobranych zarówno od 4 sklonowanych świń transgenicznych (wykazujących ekspresję eGFP) uzyskanych z zarodków zrekonstruowanych z jąder transfekowanych fibroblastów płodowych, jak i od 2 transgenicznych świń uzyskanych z zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów skóry nowonarodzonych świń, była ekwiwalentna z długością telomerów w chromosomach komórek dermalnych, wywodzących się od osobników kontrolnych w tym samym wieku i uzyskanych w wyniku rozrodu naturalnego. Z kolei dwa osobniki klonalne, które padły w okresie 3 do 7 dni po urodzeniu, miały końcowe odcinki chromosomów takiej samej długości jak telomery w chromosomach płodów w III trymestrze ciąży (Jiang i in., 2004a). Analiza terminalnych fragmentów restrykcyjnych (TRF assay; ang. *terminal restriction fragment assay*) w genomowym DNA komórek pochodzących z bioptatów różnych organów/tkanek płodów klonalnych (gonady, serce, wątroba, płuca, nerki i skóra) potwierdziła, że długość telomerów w chromosomach pozostaje na jednakowym poziomie we wszystkich liniach komórkowych, powstających w wyniku cytodyferencji przebiegającej w całym okresie fetogenezy. Powodem tego okazuje się być wysoka efektywność odtwarzania pierwotnej długości końcowych odcinków chromosomów za pośrednictwem aktywnej izoformy enzymu telomerazy w interfazowym cyklu replikacyjnym DNA jądrowego w różnicujących się i zasiedlających nowe nisze tkankowe komórkach somatycznych, które są zaangażowane w wieloetapowe procesy histo- i organogenezy. W okresie postnatalnym telomery ulegają natomiast stopniowemu skracaniu wraz z każdym kolejnym podziałem mitotycznym komórek somatycznych, a redukcja długości telomerów przebiega w sposób tkankowo-specyficzny. Świadczy to o zahamowaniu aktywności biokatalitycznej telomerazy w zróżnicowanych liniach komórek somatycznych, wyprowadzonych z eksplantów tkanki skórnej oraz różnych narządów wewnętrznych, pobranych od loszek i knurków, zarówno przed, jak i po osiągnięciu dojrzałości płciowej (Jiang i in., 2004a; Jeon i in., 2005; Kurome i in., 2008).

8. Podsumowanie: Rola epigenetycznego dziedziczenia strukturalno-funkcjonalnych rearanżacji DNA genomowego w klonowaniu somatycznym ssaków oraz znaczenie sztucznej modulacji/transformacji epigenomowej komórek-dawców jąder, oocytów-biorców jąder i aktywowanych cybryd klonalnych

Przed- i poimplantacyjne zdolności rozwojowe zarodków uzyskiwanych technikami klonowania somatycznego są w znacznym stopniu ograniczone ich niską jakością morfologiczną, która mierzona jest całkowitą liczbą blastomerów bądź stosunkiem ilościowym komórek węzła zarodkowego (embrioblastu) do komórek trofoektodermalnych. Wydaje się, że jedną z głównych przyczyn niskiej kondycji strukturalno-funkcjonalnej klonalnych zarodków ssaków jest niepełne lub nieprawidłowe przemodelowanie architektoniczne, a także epigenetyczne przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej genomu jąder komórek somatycznych w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów, a następnie w cytoplazmie blastomerów dzielących się zarodków (Bonk i in., 2007; Kumar i in., 2007; Yamanaka i in., 2009).

Czynnikiem determinującym zarówno potencjał rozwojowy, jak i jakość klonalnych zarodków ssaków jest stopień zaawansowania epigenetycznych modyfikacji genomowego DNA somatycznych komórek-dawców jąder w warunkach ich długotrwałej hodowli *in vitro*. Powszechnie stosowane metody synchronizacji cyklu mitotycznego hodowanych komórek somatycznych w fazach G0/G1 lub G1/G0, takie jak: głodzenie lub inhibicja kontaktowa ich aktywności podziałowej, mogą prowadzić do znacznego wyciszenia tkankowo-specyficznej ekspresji genów DNA jądrowego i mitochondrialnego (Samiec i Skrzyszowska, 2013; Samiec i in., 2013a, b; Kungulovski i Jeltsch, 2016). Osłabienie aktywności transkrypcyjnej genomu komórek somatycznych może być wynikiem drastycznego wzrostu natężenia kowalencyjnych modyfikacji w ich profilu epigenetycznym. Do najistotniejszych z tych modyfikacji należy zaliczyć hipermetylację reszt cytozyny DNA oraz hipoacetylację reszt lizyny histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej (Santos i in., 2003; Rybouchkin i in., 2006; Wee i in., 2007; Nashun i in., 2015). Niemniej jednak te negatywne w skutkach nasilone zmiany epigenetyczne w wielu regionach genomowego DNA hodowanych *in vitro* komórek-dawców jąder można powstrzymać poprzez ich sztuczną modulację epigenomową, efektem której wydaje się być stosunkowo trwale przywrócenie dynamicznej równowagi biochemicznej na poziomie metylacji DNA oraz acetylacji białek histonowych (Armstrong i in., 2006; Eilertsen i in., 2007; Zhao i in., 2010a). Taka ektopowa modulacja epigenomowo-zależnego profilu aktywności transkrypcyjnej genów DNA jądrowego w komórkach somatycznych może być skutecznie przeprowadzana za pośrednictwem syntetycznych analogów endogennych związków odwracalnie hamujących aktywność deacetylaz histonów (HDACs) (Li i in., 2008; Martinez Diaz i in., 2010; Su i in., 2011; Song i in., 2014). Wśród najbardziej znanych sztucznych modulatorów epigenetycznych należy wymienić zarówno standardowe

inhibitory HDACs, takie jak trichostatyna A (TSA), jak i ich nowych przedstawicieli, tj. skryptaid lub kwas walproinowy/walproinian sodu (VPA/SV) (Costa-Borges i in., 2010; Wang i in., 2011a, b; Sangalli i in., 2014; Wen i in., 2014; Samiec i in., 2015).

Standardowe i nowe inhibitory HDACs, tj. odpowiednio: TSA i skryptaid lub VPA/SV, mogą zostać użyte nie tylko do egzogennej transformacji profilu pamięci epigenetycznej (tzn. schematu acetylacji histonów oraz metylacji DNA) hodowanych *ex vivo* somatycznych komórek-dawców jąder, lecz także do epigenetycznej transformacji komórkowej pamięci dojrzewających *in vitro* oocytów o profilu aktywności transkrypcyjnej DNA genomowego. Wykorzystanie sztucznych modulatorów epigenetycznego przemodelowania/przeprogramowania chromatyny jądrowej hodowanych *in vitro* oocytów wydaje się mieć korzystny wpływ na osiągnięcie przez nie stanu koordynacji między dojrzałością epigenomową a dojrzałością jądrowo-cytoplazmatyczną (Bui i in., 2007; Reik, 2007; Andreu-Vieyra i Matzuk, 2007; Prather i in., 2009; Yamanaka i in., 2009; Samiec i Skrzyżowska, 2012). Syntetyczne modulatory procesów epigenetycznych modyfikacji kowalencyjnych białek histonowych rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej, tj. deacetylacji/acetylacji reszt lizyny histonów H3 i H4, mogą zostać użyte również w celu wywołania wzrostu natężenia epigenomowo-uwarunkowanej ekspresji genów w hodowanych *in vitro* klonalnych zarodkach ssaków (Ding i in., 2008; Kim i in., 2011; Liu i in., 2012; Narbonne i in., 2012).

Cofnięcie transkrypcyjnego „zegara biologicznego” genomu komórek somatycznych, które utraciły już swoją totipotencję lub pluripotencję w procesie różnicowania, do statusu jądra zygoty, musi obejmować zarówno epigenetyczne przemodelowanie chromatyny jądrowej, jak i przeprogramowanie genomu w celu pełnego przywrócenia zarodkowego wzorca ekspresji genów (Corry i in., 2009; Lorthongpanich i in., 2010; Rodriguez-Osorio i in., 2012; Gonzales-Cope i in., 2016). Suplementacja pożywki do hodowli *in vitro* zarodków klonalnych ektopowymi modulatorami epigenetycznymi z rodziny inhibitorów HDACs ułatwia zatem znacznie architektoniczne przemodelowanie chromatyny jądrowej oraz przeprogramowanie pamięci epigenetycznej jąder komórek somatycznych do zarodkowego wzorca transkrypcyjnej aktywności genomu (Zhao i in., 2009, 2010a, b; Costa-Borges i in., 2010; Das i in., 2010; Su i in., 2011; Park i in., 2012; Song i in., 2014). Prawidłowy schemat mechanizmu pełnego przeprogramowania profilu pamięci epigenetycznej jąder komórek somatycznych w zarodkach klonalnych może bowiem zajść poprzez zwiększenie częstotliwości pasywnej demetylacji reszt cytozyny DNA i reszt lizyny histonów, nasilenie metylacji reszt argininy histonów, a także osłabienie natężenia deacetylacji (tj. hiperacetylację) reszt lizyny histonów chromatyny komórek-dawców jąder oraz zarodków, które uprzednio poddano egzogennym modyfikacjom epigenomowym. Schemat ten z kolei prowadzi do bezbłędnej rekapitulacji ekspresji genów w następstwie ich całkowitego odróżnicowania na poziomie epigenetycznym i ponownego uaktywnienia się transkrypcyjnie uśpionych sekwencji kodujących DNA jąder komórek somatycznych w przedimplantacyjnej fazie rozwoju zarodków klonalnych (Cervera i in., 2009; Van Thuan

i in., 2009; Dai i in., 2010; Wang i in., 2011a; Kumar i in., 2013; Samiec i in., 2015; Loi i in., 2016).

Na obecnym etapie badań biotechnologiczne możliwości klonowania somatycznego ssaków, w tym różnych gatunków zwierząt gospodarskich (bydło, owce, kozy, świnie, króliki i konie), przekroczyły znacznie zrozumienie biologicznych uwarunkowań, a w szczególności aspektów molekularnych rozwoju zarodkowego. Wciąż nie wiadomo, czy różnice w kompetencjach rozwojowych cybrydowych zygot klonalnych zrekonstruowanych z jąder różnych typów komórek somatycznych wynikają z odmiennej podatności ich genomu jądrowego oraz mitochondrialnego na epigenetyczne przemodelowanie i przeprogramowanie w blastomerach przedimplantacyjnych zarodków, czy też odgrywają tu rolę jakieś inne dotychczas nierozpoznane czynniki (Campbell i Alberio, 2003; Yang i in., 2007; Shi i Wu, 2009; Buganim i in., 2013). Jednakże to właśnie klonalne zarodki ssaków są doskonałym obiektem do analizy czynników warunkujących właściwe przeprogramowanie epigenetomowo-zależnej aktywności transkrypcyjnej DNA komórek somatycznych. Wiedza ta może przyczynić się do pełniejszego poznania molekularnych mechanizmów tego procesu również w odniesieniu do zarodków uzyskiwanych w wyniku zapłodnienia (Dean i in., 2003; Bonk i in., 2008; Whitworth i Prather, 2010; Deshmukh i in., 2011).

9. Abstract of monograph

While tremendous progress in the field of somatic cell cloning has been achieved during the past few years with the birth of numerous offspring of different mammalian species worldwide, the overall efficiency of SCNT in mammals remains disappointingly low. The current high incidence of pre- and/or postimplantation embryonic, foetal as well as perinatal abnormalities limits the practical applications of somatic cell cloning and contributes to the negative perception of this assisted reproductive technology (ART) to society. The aims are to understand the mechanisms involved in the aberrations for both wide epigenetic transcriptional reprogramming of donor cell-descended nuclear DNA and differential (maternal or paternal) expression patterns of several imprinted (i.e., uniparentally-expressed) genes that can lead to the pathologic syndromes in cloned foetuses and neonates.

The dynamic, several-step epigenetic modifications of donor genome after SCNT (i.e., clonal cybrid reconstruction) include, among others, processes of chromatin architectural remodeling, global changes in overall DNA methylation status, uniparental (monoallelic) expression of imprinted genes, restoration of telomere length, and also X chromosome inactivation in female clones. All these events that take place synchronously with donor nuclear cycle progression in the cytoplasmic microenvironment of embryonic cells give rise to global rearrangement of the somatic genetic apparatus, at various stages of pre- and postimplantation development.

The expression profiles of different genes of somatic cell nuclear genome that are important for embryonic and foetal development or conceptus survival rate should be studied more closely in the early stages of cloned embryos. So far, however, the precise mechanism for the epigenetic anomalies in the nuclear transfer-derived embryos remains unclear. The characterization of more epigenomic parameters that affect the low developmental competences of the SCNT-derived embryos/foetuses, the lethal anatomic- and histopathological defects in the foetal and extrafoetal (placental) tissues as well as the high peri-implantation or perinatal mortality rates and immune dysfunctions in resultant abnormal or deceased/stillborn cloned offspring helps the current somatic cell nuclear transfer technology to identify its problems and to address what should be done to resolve them. It is reasonable that preimplantation cloned embryos are one of the most valuable tools for studies focused on the epigenetic remodeling/reprogramming degree of somatic cell nuclei and parentally-dependent expression levels of donor DNA imprinted genes. Therefore, to improve the efficiency of the present animal cloning methods, more extensive investigations should be performed in order to elucidate all the molecular mechanisms underlying and in order to detect/recognize all the intrinsic biochemical factors determining architectural remodeling and transcriptional reprogramming for epigenetic and parental (gametic) imprinting memory of donor cell genome during early embryogenesis.

Incomplete and aberrant reprogramming of epigenetic memory of somatic cell nuclei in preimplanted nuclear-transferred (NT) embryos is one of the most important factors that limit the cloning effectiveness. The extent of epigenetic genome-wide alterations involving DNA methylation and histone deacetylation that are mediated by DNA methyltransferases (DNMTs) and histone deacetylases (HDACs) can be modulated/reversed via exogenous inhibitors of these enzymes throughout *in vitro* culture of nuclear donor cells, nuclear recipient oocytes and/or cloned embryos. The use of the artificial modifiers of epigenomically-conditioned gene expression leads to inhibition of both chromatin condensation and transcriptional silencing the genomic DNA of somatic cells that provide a source of nuclear donors for reconstruction of enucleated oocytes and generation of cloned embryos. The onset of chromatin decondensation and gene transcriptional activity is evoked by non-specific/non-selective blocking the activity of either DNMTs by 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC), zebularine, *S*-adenosylhomocysteine (SAH) or HDACs by trichostatin A (TSA), valproic acid/sodium valproate (VPA/SV), scriptaid, oxamflatin, sodium butyrate (NaBu) and *m*-carboxycinnamic acid *b*ishydroxamide (CBHA). Epigenomic modulation (epigenetic transformation) of nuclear donor cells, nuclear recipient cells and/or cloned embryos may facilitate and accelerate the reprogrammability for gene expression of donor cell nuclei that have been transplanted into a host ooplasm and subsequently underwent dedifferentiating and re-establishing the epigenetically dependent status of their transcriptional activity during pre- and postimplantation development of NT embryos. Nevertheless, a comprehensive additional work is necessary to determine whether failures in the early-stage reprogramming of somatic cell-inherited genome are magnified downstream in development of cloned conceptuses and neonates.

Cumulatively, at the present stage of investigations, biotechnological possibilities of the strategies used for somatic cell cloning of mammals exceeded the understanding of molecular mechanisms underlying epigenetic remodeling and reprogramming of donor cell genome in nuclear transfer-derived oocytes and embryos. Therefore, it is beyond any doubt that reprogramming of overall epigenetic and specific parental genomic imprinting memory of somatogenic DNA can be found to be one of the most important obstacles for achieving satisfactory effectiveness of SCNT technology in different mammalian species. This effectiveness is measured by the relatively high rate of the cloned progeny born in relation to the number of enucleated oocytes reconstituted with the somatic cell nuclei.

10. Piśmiennictwo

- Ahn, K.S., Kim, Y.J., Kim, M., Lee, B.H., Heo, S.Y., Kang, M.J., Kang, Y.K., Lee, J.W., Lee, K.K., Kim, J.H., Nho, W.G., Hwang, S.S., Woo, J.S., Park, J.K., Park, S.B., Shim, H., 2011. Resurrection of an α -1,3-galactosyltransferase gene-targeted miniature pig by recloning using postmortem ear skin fibroblasts. *Theriogenology*, 75 (5): 933–939.
- Ai, S., Shen, L., Guo, J., Feng, X., Tang, B., 2012. DNA methylation as a biomarker for neuropsychiatric diseases. *Int. J. Neurosci.*, 122 (4): 165–176.
- Aigner, B., Klymiuk, N., Wolf, E., 2010. Transgenic pigs for xenotransplantation: selection of promoter sequences for reliable transgene expression. *Curr. Opin. Organ Transplant.*, 15 (2): 201–206.
- Allegrucci, C., Thurston, A., Lucas, E., Young, L., 2005. Epigenetics and the germline. *Reproduction*, 129 (2): 137–149.
- Andreu-Vieyra, C., Matzuk, M.M., 2007. Epigenetic modifications by Trithorax group proteins during early embryogenesis: do members of Trx-G function as maternal effect genes? *Reprod. Biomed. Online*, 14 (2): 201–207.
- Archer, G.S., Dindot, S., Friend, T.H., Walker, S., Zaunbrecher, G., Lawhorn, B., Piedrahita, J.A., 2003. Hierarchical phenotypic and epigenetic variation in cloned swine. *Biol. Reprod.*, 69 (2): 430–436.
- Archer, T., Beninger, R.J., Palomo, T., Kostrzewa, R.M., 2010. Epigenetics and biomarkers in the staging of neuropsychiatric disorders. *Neurotox. Res.*, 18 (3-4): 347–366.
- Armstrong, L.M., Lako, W., Dean, W., Stojkovic, M., 2006. Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells*, 24 (4): 805–814.
- Balter, M., 2015. BEHAVIORAL GENETICS. Can epigenetics explain homosexuality puzzle? *Science*, 350 (6257): 148.
- Bang, J.I., Yoo, J.G., Park, M.R., Shin, T.S., Cho, B.W., Lee, H.G., Kim, B.W., Kang, T.Y., Kong, I.K., Kim, J.H., Cho, S.K., 2013. The effects of artificial activation timing on the development of SCNT-derived embryos and newborn piglets. *Reprod. Biol.*, 13 (2): 127–132.
- Beaujean, N., Taylor, J., Gardner, J., Wilmut, I., Meehan, R., Young, L., 2004. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 71 (1): 185–193.
- Bekaert, S., Derradji, H., Baatout, S., 2004. Telomere biology in mammalian germ cells and during development. *Dev. Biol.*, 274 (1): 15–30.
- Benevolenskaya, E.V., Islam, A.B., Ahsan, H., Kibriya, M.G., Jasmine, F., Wolff, B., Al-Alem, U., Wiley, E., Kajdacsy-Balla, A., Macias, V., Rauscher, G.H., 2016. DNA methylation and hormone receptor status in breast cancer. *Clin. Epigenetics*, 8: 17.

- Bennett, D.A., Yu, L., Yang, J., Srivastava G.P., Aubin, C., De Jager, P.L., 2015. Epigenomics of Alzheimer's disease. *Transl. Res.*, 165 (1): 200–220.
- Berg, D.K., Li, C., Asher, G., Wells, D.N., Oback, B., 2007. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. *Biol. Reprod.*, 77 (3): 384–394.
- Best, J.D., Carey, N., 2010. Epigenetic therapies for non-oncology indications. *Drug Discov. Today*, 15 (23-24): 1008–1014.
- Betts, D., Bordignon, V., Hill, J., Winger, Q., Westhusin, M., Smith, L., King, W., 2001. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (3): 1077–1082.
- Betts, D.H., Perrault, S., Harrington, L., King, W.A., 2006. Quantitative analysis of telomerase activity and telomere length in domestic animal clones. *Methods Mol. Biol.*, 325: 149–180.
- Bo, F., Di, L., Qing-chang, F., Liang, R., Hong, M., Liang, W., Zhen-hua, G., Zhong-qiu, L., 2011. Effect of trichostatin A on transfected donor cells and subsequent development of porcine cloned embryos. *Zygote*, 19 (3): 237–243.
- Bonk, A.J., Cheong, H.T., Li, R., Lai, L., Hao, Y., Liu, Z., Samuel, M., Ferguson, E.A., Whitworth, K.M., Murphy, C.N., Antoniou, E., Prather, R.S., 2007. Correlation of developmental differences of nuclear transfer embryos cells to the methylation profiles of nuclear transfer donor cells in swine. *Epigenetics*, 2 (3): 179–186.
- 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. Aberrant DNA methylation in porcine *in vitro*-, parthenogenetic-, and somatic cell nuclear transfer-produced blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.*, 75 (2): 250–264.
- Boquest, A.C., Grupen, C.G., Harrison, S.J., McIlpatrick, S.M., Ashman, R.J., d'Apice, A.J.F., Nottle, M.B., 2002. Production of cloned pigs from cultured fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.*, 66 (5): 1283–1287.
- Bortvin, A., Eggan, K., Skaletsky, H., Akutsu, H., Berry, D.L., Yanagimachi, R., Page, D.C., Jaenisch, R., 2003. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development*, 130 (8): 1673–1680.
- Bowles, E.J., Campbell, K.H., St. John, J.C., 2007. Nuclear transfer: preservation of a nuclear genome at the expense of its associated mtDNA genome(s). *Curr. Top. Dev. Biol.*, 77: 251–290.
- Brunet, A., Berger, S.L., 2014. Epigenetics of aging and aging-related disease. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 69 (Suppl 1): S17–S20.
- Brunetti, D., Perota, A., Lagutina, I., Colleoni, S., Duchi, R., Calabrese, F., Seveso, M., Cozzi, E., Lazzari, G., Lucchini, F., Galli, C., 2008. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned pigs derived from *in vitro* transfected adult fibroblasts. *Cloning Stem Cells*, 10 (4): 409–419.

- Buganim, Y., Faddah, D.A., Jaenisch, R., 2013. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat. Rev. Genet.*, 14 (6): 427–439.
- Bui, H.T., Van Thuan, N., Kishigami, S., Wakayama, S., Hikichi, T., Ohta, H., Mizutani, E., Yamaoka, E., Wakayama, T., Miyano, T., 2007. Regulation of chromatin and chromosome morphology by histone H3 modifications in pig oocytes. *Reproduction*, 133 (2): 371–382.
- Burgstaller, J.P., Schinogl, P., Dinnyes, A., Müller, M, Steinborn, R., 2007. Mitochondrial DNA heteroplasmy in ovine fetuses and sheep cloned by somatic cell nuclear transfer. *BMC Dev. Biol.*, 7: 141.
- Cacabelos, R., Torrellas, C., 2014. Epigenetic drug discovery for Alzheimer's disease. *Expert Opin. Drug Discov.*, 9 (9): 1059–1086.
- Campbell, K.H., Alberio, R., 2003. Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reprod. Suppl.*, 61: 477–494.
- Castellani, C.A., Laufer, B.I., Melka, M.G., Diehl, E.J., O'Reilly, R.L., Singh, S.M., 2015. DNA methylation differences in monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia identifies psychosis related genes and networks. *BMC Med. Genomics*, 8: 17.
- Cervera, R.P., Martí-Gutiérrez, N., Escorihuela, E., Moreno, R., Stojkovic, M., 2009. Trichostatin A affects histone acetylation and gene expression in porcine somatic cell nucleus transfer embryos. *Theriogenology*, 72 (8): 1097–1110.
- Cezar, G.G., Bartolomei, M.S., Forsberg, E.J., First, N.L., Bishop, M.D., Eilertsen, K.J., 2003. Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.*, 68 (3): 1009–1014.
- Chavatte-Palmer, P., Heyman, Y., Richard, C., Monget, P., LeBourhis, D., Kann, G., Chilliard, Y., Vignon, X., Renard, J.P., 2002. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol. Reprod.*, 66 (6): 1596–1603.
- Cheong, H.T., Ikeda, K., Martinez Diaz, M.A., Katagiri, S., Takahashi, Y., 2000. Development of reconstituted pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 12 (1-2): 15–20.
- Cheong, H.T., Park, K.W., Im, G.S., Lai, L., Sun, Q.Y., Day, B.N., Prather, R.S., 2002. Effect of elevated Ca^{2+} concentration in fusion/activation medium on the fusion and development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 61 (4): 488–492.
- Chesné, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M. Boulanger, L., Renard, J.P., 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.*, 20 (4): 366–369.
- Choi, E.G., Yin, X.J., Lee, H.S., Kim, L.H., Shin, H.D., Kim, N.H., Kong, I.K., 2007. Reproductive fertility of cloned male cats derived from adult somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 9 (2): 281–290.
- Chong, A., Blinder, L., Ma, L., Yin, D., Shen, J., Williams, J.W., Byrne, G., Schwarz, A., Diamond, L.S., Logan, J.E., 2000. Anti-galactose- $\alpha(1,3)$ galactose antibody production in $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase gene knockout

- mice after xeno and allo transplantation. *Transpl. Immunol.*, 8 (2): 129–137.
- Christians, E., Rao, V.H., Renard, J.P., 1994. Sequential acquisition of transcriptional control during early embryonic development in the rabbit. *Dev. Biol.*, 164 (1): 160–172.
- Corry, G.N., Tanasijevic, B., Barry, E.R., Krueger, W., Rasmussen, T.P., 2009. Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation development. *Birth Defects Res. C Embryo Today*, 87 (4): 297–313.
- Costa-Borges, N., Santaló, J., Ibáñez, E., 2010. Comparison between the effects of valproic acid and trichostatin A on the *in vitro* development, blastocyst quality, and full-term development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.*, 12 (4): 437–446.
- Cui, W., Wylie, D., Aslam, S., Dinnyes, A., King, T., Wilmut, I., Clark, A.J., 2003. Telomerase-immortalized sheep fibroblasts can be reprogrammed by nuclear transfer to undergo early development. *Biol. Reprod.*, 69 (1): 15–21.
- 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. Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.*, 20 (3): 251–255.
- Dai, X., Hao, J., Hou, X.J., Hai, T., Fan, Y., Yu, Y., Jouneau, A., Wang, L., Zhou, Q., 2010. Somatic nucleus reprogramming is significantly improved by *m*-carboxycinnamic acid bishydroxamide, a histone deacetylase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 285 (40): 31002–31010.
- Das, Z.C., Gupta, M.K., Uhm, S.J., Lee, H.T., 2010. Increasing histone acetylation of cloned embryos, but not donor cells, by sodium butyrate improves their *in vitro* development in pigs. *Cell. Reprogram.*, 12 (1): 95–104.
- Davis, T.L., Yang, G.J., McCarrey, J.R., Bartolomei, M.S., 2000. The *H19* methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum. Mol. Genet.*, 9 (19): 2885–2894.
- Dean, W., Santos, F., Reik, W., 2003. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 14 (1): 93–100.
- Deng, W., Yang, D., Zhao, B., Ouyang, Z., Song, J., Fan, N., Liu, Z., Zhao, Y., Wu, Q., Nashun, B., Tang, J., Wu, Z., Gu, W., Lai, L., 2011. Use of the 2A peptide for generation of multi-transgenic pigs through a single round of nuclear transfer. *PLoS One*, 6 (5): e19986.
- Deng, S., Li, G., Zhang, J., Zhang, X., Cui, M., Guo, Y., Liu, G., Li, G., Feng, J., Lian, Z., 2013. Transgenic cloned sheep overexpressing ovine toll-like receptor 4. *Theriogenology*, 80 (1): 50–57.
- Denning, C., Burl, S., Ainslie, A., Bracken, J., Dinnyes, A., Fletcher, J., King, T., Ritchie, M., Ritchie, W.A., Rollo, M., de Sousa, P., Travers, A., Wilmut, I., Clark, A.J., 2001. Deletion of the α (1,3)galactosyl transferase (GGTA1)

- gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat. Biotechnol.*, 19 (6): 559–562.
- Deshmukh, R.S., Østrup, O., Østrup, E., Vejlsted, M., Niemann, H., Lucas-Hahn, A., Petersen, B., Li, J., Callesen, H., Hyttel, P., 2011. DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed *in vivo* and produced by *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. *Epigenetics*, 6 (2): 177–187.
- De Sousa, P.A., King, T., Harkness, L., Young, L.E., Walker, S.K., Wilmut I., 2001. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol. Reprod.*, 65 (1): 23–30.
- De Sousa, P., Dobrinsky, J.R., Zhu, J., Archibald, A.L., Ainslie, A., Bosma, W., Bowering, J., Bracken, J., Ferrier, P.M., Fletcher, J., Gasparrini, B., Harkness, L., Johnston, P., Ritchie, M., Ritchie, W.A., Travers, A., Albertini, D., Dinnyes, A., King, T.J., Wilmut, I., 2002. Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol. Reprod.*, 66 (3): 642–650.
- Devall, M., Mill, J., Lunnon, K., 2014. The mitochondrial epigenome: a role in Alzheimer's disease? *Epigenomics*, 6 (6): 665–675.
- Diao, Y.F., Naruse, K.J., Han, R.X., Li, X.X., Oqani, R.K., Lin, T., Jin, D.I., 2013. Treatment of fetal fibroblasts with DNA methylation inhibitors and/or histone deacetylase inhibitors improves the development of porcine nuclear transfer-derived embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 141 (3-4): 164–171.
- Dindot, S.V., Farin, P.W., Farin, C.E., Romano, J., Walker, S., Long, C., Piedrahita J.A., 2004. Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived *Bos gaurus/Bos taurus* hybrid fetuses. *Biol. Reprod.*, 71 (2): 470–478.
- Ding, X., Wang, Y., Zhang, D., Wang, Y., Guo, Z., Zhang, Y., 2008. Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology*, 70 (4): 622–630.
- Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout III, W., Yanagimachi, R., Jaenisch, R., 2000. X-chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science*, 290 (5496): 1578–1581.
- Eilertsen, K.J., Power, R.A., Harkins, L.L., Misica, P., 2007. Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, 98 (1-2): 129–146.
- Enright, B.P., Kubota, C., Yang, X., Tian, X.C., 2003. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.*, 69 (3): 896–901.
- Enright, B.P., Sung, L.Y., Chang, C.C., Yang, X., Tian, X.C., 2005. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.*, 72 (4): 944–948.

- Esteves, T.C., Balbach, S.T., Pfeiffer, M.J., Araúzo-Bravo, M.J., Klein, D.C., Sinn, M., Boiani, M., 2011. Somatic cell nuclear reprogramming of mouse oocytes endures beyond reproductive decline. *Aging Cell*, 10 (1): 80–95.
- Fagone, P., Mangano, K., Di Marco, R., Touil-Boukoffa, C., Chikovan, T., Signorelli, S., Lombardo, G.A., Patti, F., Mammana, S., Nicoletti, F., 2016. Expression of DNA methylation genes in secondary progressive multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 290: 66–69.
- Feng, X., Cao, S., Wang, H., Meng, C., Li, J., Jiang, J., Qian, Y., Su, L., He, Q., Zhang, Q., 2015a. Production of transgenic dairy goat expressing human α -lactalbumin by somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res.*, 24 (1): 73–85.
- Feng, Y., Jankovic, J., Wu, Y.C., 2015b. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.*, 349 (1-2): 3–9.
- Fernandez-Gonzales, R., Moreira, P., Bilbao, A., Jimenez, A., Perez-Crespo, M., Ramirez, M.A., De Fonseca, F.R., Pintado, B., Gutierrez-Adan, A., 2004. Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (16): 5880–5885.
- Fisher, C.L., Fisher, A.G., 2011. Chromatin states in pluripotent, differentiated, and reprogrammed cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 21 (2): 140–146.
- Fissore, R.A., Long, C.R., Duncan, R.P., Robl, J.M., 1999. Initiation and organization of events during the first cell cycle in mammals: applications in cloning. *Cloning*, 1 (2): 89–100.
- Folch, J., Cocero, M.J., Chesné, P., Alabart, J.L., Domínguez, V., Cognié, Y., Roche, A., Fernández-Arias, A., Martí, J.I., Sánchez, P., Echegoyen, E., Beckers, J.F., Bonastre, A.S., Vignon, X., 2009. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, 71 (6): 1026–1034.
- 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. Production of cloned cattle from *in vitro* systems. *Biol. Reprod.*, 67 (1): 327–333.
- Fournier, C., Goto, Y., Ballestar, E., Delaval, K., Hever, A.M., Esteller, M., Feil, R., 2002. Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *EMBO J.*, 21 (23): 6560–6570.
- Fries, G.R., Li, Q., McAlpin, B., Rein, T., Walss-Bass, C., Soares, J.C., Quevedo, J., 2016. The role of DNA methylation in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 68: 474–488.
- Fujimura, T., Takahagi, Y., Shigehisa, T., Nagashima, H., Miyagawa, S., Shirakura, R., Murakami, H., 2008a. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene-deficient pigs by somatic cell nuclear transfer:

- a novel selection method for Gal alpha 1,3-Gal antigen-deficient cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 75 (9): 1372–1378.
- Fujimura, T., Murakami, H., Kurome, M., Takahagi, Y., Shigehisa, T., Nagashima, H., 2008b. Effects of recloning on the efficiency of production of α 1,3-galactosyltransferase knockout pigs. *J. Reprod. Dev.*, 54 (1): 58–62.
- Galetzka, D., Hansmann, T., El Hajj, N., Weis, E., Irmscher, B., Ludwig, M., Schneider-Rätzke, B., Kohlschmidt, N., Beyer, V., Bartsch, O., Zechner, U., Spix, C., Haaf, T., 2012. Monozygotic twins discordant for constitutive BRCA1 promoter methylation, childhood cancer and secondary cancer. *Epigenetics*, 7 (1): 47–54.
- Galli, C., Lagutina, I., Vassiliev, I., Duchi, R., Lazzari, G., 2002. Comparison of microinjection (piezo-electric) and cell fusion for nuclear transfer success with different cell types in cattle. *Cloning Stem Cells*, 4 (3): 189–196.
- Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R., Lazzari, G., 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 424 (6949): 635.
- Gjoneska, E., Pfenning, A.R., Mathys, H., Quon, G., Kundaje, A., Tsai, L.H., Kellis, M., 2015. Conserved epigenomic signals in mice and humans reveal immune basis of Alzheimer's disease. *Nature*, 518 (7539): 365–369.
- Gomes, N.M., Ryder, O.A., Houck, M.L., Charter, S.J., Walker, W., Forsyth, N.R., Austad, S.N., Venditti, C., Pagel, M., Shay, J.W., Wright, W.E., 2011. Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging Cell*, 10 (5): 761–768.
- Gómez, M.C., Pope, C.E., Giraldo, A., Lyons, L.A., Harris, R.F., King, A.L., Cole, A., Godke, R.A., Dresser, B.L., 2004. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells*, 6 (3): 247–258.
- Gómez, M.C., Pope, C.E., Kutner, R.H., Ricks, D.M., Lyons, L.A., Ruhe, M., Dumas, C., Lyons, J., López, M., Dresser, B.L., Reiser, J., 2008. Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning Stem Cells*, 10 (4): 469–483.
- Gonzales-Cope, M., Sidoli, S., Bhanu, N.V., Won, K.J., Garcia, B.A., 2016. Histone H4 acetylation and the epigenetic reader Brd4 are critical regulators of pluripotency in embryonic stem cells. *BMC Genomics*, 17 (1): 95.
- Gray, S.G., Dangond, F., 2006. Rationale for the use of histone deacetylase inhibitors as a dual therapeutic modality in multiple sclerosis. *Epigenetics*, 1 (2): 67–75.
- Green, A.L., Wells, D.N., Oback, B., 2007. Cattle cloned from increasingly differentiated muscle cells. *Biol. Reprod.*, 77 (3): 395–406.
- Han, Y.M., Kang, Y.K., Koo, D.B., Lee, K.K., 2003. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*, 59 (1): 33–44.
- Hiendleder, S., Prella, K., Brüggerhoff, K., Reichenbach, H.D., Wenigerkind, H., Bebbere, D., Stojkovic, M., Müller, S., Brem, G., Zakhartchenko, V., Wolf, E., 2004. Nuclear-cytoplasmic interactions affect *in utero* developmental

- capacity, phenotype, and cellular metabolism of bovine nuclear transfer fetuses. *Biol. Reprod.*, 70 (4): 1196–1205.
- Hiendleder, S., 2007. Mitochondrial DNA inheritance after SCNT. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 591: 103–116.
- Hill, J.R., Schlafer, D.H., Fisher, P.J., Davies, C.J., 2002. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. *Biol. Reprod.*, 67 (1): 55–63.
- Hinrichs, K., Choi, Y.H., Love, C.C., Chung, Y.G., Varner, D.D., 2006. Production of horse foals via direct injection of roscovitine-treated donor cells and activation by injection of sperm extract. *Reproduction*, 131 (6): 1063–1072.
- Hinrichs, K., Choi, Y.H., Varner, D.D., Hartman, D.L., 2007. Production of cloned horse foals using roscovitine-treated donor cells and activation with sperm extract and/or ionomycin. *Reproduction*, 134 (2): 319–325.
- Hitchins, M.P., 2015. Constitutional epimutation as a mechanism for cancer causality and heritability? *Nat. Rev. Cancer*, 15 (10): 625–634.
- Hong, S.G., Jang, G., Kim, M.K., Oh, H.J., Park, J.E., Kang, J.T., Koo, O.J., Kim, D.Y., Lee, B.C., 2009. Dogs cloned from fetal fibroblasts by nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, 115 (1-4): 334–339.
- Hoshino, Y., Hayashi, N., Taniguchi, S., Kobayashi, N., Sakai, K., Otani, T., Iritani, A., Saeki, K., 2009. Resurrection of a bull by cloning from organs frozen without cryoprotectant in a -80°C freezer for a decade. *PLoS One* 4 (1): e4142.
- Hossein, M.S., Jeong, Y.W., Park, S.W., Kim, J.J., Lee, E., Ko, K.H., Kim, H.S., Kim, Y.W., Hyun, S.H., Shin, T., Hawthorne, L., Hwang, W.S., 2009. Cloning Missy: obtaining multiple offspring of a specific canine genotype by somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 11 (1): 123–130.
- Hua, Z., Xu, G., Liu, X., Bi, Y., Xiao, H., Hua, W., Li, L., Zhang, L., Ren, H., Zheng, X., 2016. Impact of different sources of donor cells upon the nuclear transfer efficiency in Chinese indigenous Meishan pig. *Pol. J. Vet. Sci.*, 19 (1): 205–212.
- Huan, Y.J., Zhu, J., Xie, B.T., Wang, J.Y., Liu, S.C., Zhou, Y., Kong, Q.R., He, H.B., Liu, Z.H., 2013. Treating cloned embryos, but not donor cells, with 5-aza-2'-deoxycytidine enhances the developmental competence of porcine cloned embryos. *J. Reprod. Dev.*, 59 (5): 442–449.
- Huang, C., Wen, B., 2015. “Identification card”: sites on histone modification of cancer cell. *Chin. Med. Sci. J.*, 30 (4): 203–209.
- Huang, J., Zhang, H., Yao, J., Qin, G., Wang, F., Wang, X., Luo, A., Zheng, Q., Cao, C., Zhao, J., 2016. BIX-01294 increases pig cloning efficiency by improving epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Reproduction*, 151 (1): 39–49.
- Hwang, I., Jeong, Y.W., Kim, J.J., Lee, H.J., Kang, M., Park, K.B., Park, J.H., Kim, Y.W., Kim, W.T., Shin, T., Hyun, S.H., Jeung, E.B., Hwang, W.S., 2013. Successful cloning of coyotes through interspecies somatic cell nu-

- clear transfer using domestic dog oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 25 (8): 1142–1148.
- Hwang, I.S., Kwon, D.J., Oh, K.B., Ock, S.A., Chung, H.J., Cho, I.C., Lee, J.W., Im, G.S., Hwang, S., 2015. Production of cloned Korean native pig by somatic cell nuclear transfer. *Dev. Reprod.*, 19 (2): 79–84.
- Ibi, D., González-Maeso, J., 2015. Epigenetic signaling in schizophrenia. *Cell. Signal.*, 27 (10): 2131–2136.
- Inoue, K., Kohda, T., Lee, J., Ogonuki, N., Mochida, K., Noguchi, Y., Tanemura, K., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F., Ogura, A., 2002. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science* 295 (5553): 297.
- Jang, G., Kim, M.K., Oh, H.J., Hossein, M.S., Fibrianto, Y.H., Hong, S.G., Park, J.E., Kim, J.J., Kim, H.J., Kang, S.K., Kim, D.Y., Lee, B.C., 2007. Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 67 (5): 941–947.
- Jang, G., Oh, H.J., Kim, M.K., Fibrianto, Y.H., Hossein, M.S., Kim, H.J., Kim, J.J., Hong, S.G., Park, J.E., Kang, S.K., Lee, B.C., 2008a. Improvement of canine somatic cell nuclear transfer procedure. *Theriogenology*, 69 (2): 146–154.
- Jang, G., Hong, S.G., Oh, H.J., Kim, M.K., Park, J.E., Kim, H.J., Kim, D.Y., Lee, B.C., 2008b. A cloned toy poodle produced from somatic cells derived from an aged female dog. *Theriogenology*, 69 (5): 556–563.
- Jankowska, A.M., Millward, C.L., Caldwell, C.W., 2015. The potential of DNA modifications as biomarkers and therapeutic targets in oncology. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 15 (10): 1325–1337.
- Januar, V., Saffery, R., Ryan, J., 2015. Epigenetics and depressive disorders: a review of current progress and future directions. *Int. J. Epidemiol.*, 44 (4): 1364–1387.
- 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. The analysis of telomere length and telomerase activity in cloned pigs and cows. *Mol. Reprod. Dev.*, 71 (3): 315–320.
- Jeon, B.G., Coppola, G., Perrault, S.D., Rho, G.J., Betts, D.H., King, W.A., 2008. S-adenosylhomocysteine treatment of adult female fibroblasts alters X-chromosome inactivation and improves *in vitro* embryo development after somatic cell nuclear transfer. *Reproduction*, 135 (6): 815–828.
- Jeong, Y.H., Park, C.H., Jang, G.H., Jeong, Y.I., Hwang, I.S., Jeong, Y.W., Kim, Y.K., Shin, T., Kim, N.H., Hyun, S.H., Jeung, E.B., Hwang, W.S., 2013. Production of multiple transgenic Yucatan miniature pigs expressing human complement regulatory factors, human CD55, CD59, and H-transferase genes. *PLoS One*, 8 (5): e63241.
- Jia, M., Gao, X., Zhang, Y., Hoffmeister, M., Brenner H., 2016. Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. *Clin. Epigenetics*, 8: 25.

- Jiang, L., Carter, D.B., Xu, J., Yang, X., Prather, R.S., Tian, X.C., 2004a. Telomere lengths in cloned transgenic pigs. *Biol. Reprod.*, 70 (6): 1589–1593.
- Jiang, M.X., Yang, C.X., Zhang, L.S., Zheng, Y.L., Liu, S.Z., Sun, Q.Y., Chen, D.Y., 2004b. The effects of chemical enucleation combined with whole cell intracytoplasmic injection on panda-rabbit interspecies nuclear transfer. *Zygote*, 12 (4): 315–320.
- Jin, M., Zhu, S., Hu, P., Liu, D., Li, Q., Li, Z., Zhang, X., Xie, Y., Chen, X., 2014. Genomic and epigenomic analyses of monozygotic twins discordant for congenital renal agenesis. *Am. J. Kidney Dis.*, 64 (1): 119–122.
- Jouneau, A., Renard, J.P., 2003. Reprogramming in nuclear transfer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 13 (5): 486–491.
- Ju, H., Zhang, J., Bai, L., Mu, Y., Du, Y., Yang, W., Li, Y., Sheng, A., Li, K., 2015. The transgenic cloned pig population with integrated and controllable GH expression that has higher feed efficiency and meat production. *Sci. Rep.*, 5: 10152.
- Kamdar, S.N., Ho, L.T., Kron, K.J., Isserlin, R., van der Kwast, T., Zlotta, A.R., Fleshner, N.E., Bader, G., Bapat, B., 2016. Dynamic interplay between locus-specific DNA methylation and hydroxymethylation regulates distinct biological pathways in prostate carcinogenesis. *Clin. Epigenetics*, 8: 32.
- Kang, Y.K., Park, J.S., Koo, D.B., Choi, Y.H., Kim, S.U., Lee, K.K., Han, Y.M., 2002. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J.*, 21 (5): 1092–1100.
- 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. Precise recapitulation of methylation change in early cloned embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 66 (1): 32–37.
- Kato, Y., Tani, T., Tsunoda, Y., 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J. Reprod. Fertil.*, 120 (2): 231–237.
- Kawano, K., Kato, Y., Tsunoda, Y., 2004. Comparison of *in vitro* development of porcine nuclear-transferred oocytes receiving fetal somatic cells by injection and fusion methods. *Cloning Stem Cells*, 6 (2): 67–72.
- 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. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol. Reprod.*, 66 (1): 199–203.
- Kim, J.M., Ogura, A., Nagata, M., Aoki, F., 2002. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 67 (3): 760–766.
- Kim, S.H., Kang, Y.K., Koo, D.B., Kang, M.J., Moon, S.J., Lee, K.K., Han, Y.M., 2004. Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 324 (1): 58–63.

- Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Hwang, W.S., Hossein, M.S., Kim, J.J., Shin, N.S., Kang, S.K., Lee, B.C., 2007. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells*, 9 (1): 130–137.
- Kim, Y.J., Ahn, K.S., Kim, M., Shim, H., 2011. Comparison of potency between histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on enhancing *in vitro* development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 47 (4): 283–289.
- Kim, E., Zheng, Z., Jeon, Y., Jin, Y.X., Hwang, S.U., Cai, L., Lee, C.K., Kim, N.H., Hyun, S.H., 2016. An improved system for generation of diploid cloned porcine embryos using induced pluripotent stem cells synchronized to metaphase. *PLoS One*, 11 (7): e0160289.
- Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Thuan, N.V., Wakayama, S., Bui, H.T., Wakayama, T., 2006. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 340 (1): 183–189.
- Kishigami, S., Wakayama, S., Hosoi, Y., Iritani, A., Wakayama, T., 2008. Somatic cell nuclear transfer: infinite reproduction of a unique diploid genome. *Exp. Cell Res.*, 314 (9): 1945–1950.
- Klymiuk, N., Aigner, B., Brem, G., Wolf, E., 2010. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol. Reprod. Dev.*, 77 (3): 209–221.
- Kolber-Simonds, D., Lai, L., Watt, S.R., Denaro, M., Arn, S., Augenstein, M.L., Betthausen, J., Carter, D.B., Greenstein, J.L., Hao, Y., Im, G.S., Liu, Z., Mell, G.D., Murphy, C.N., Park, K.W., Rieke, A., Ryan, D.J., Sachs, D.H., Forsberg, E.J., Prather, R.S., Hawley, R.J., 2004. Production of α -1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (19): 7335–7340.
- Koo, D.B., Kang, Y.K., Choi, Y.H., Park, J.S., Kim, H.N., Oh, K.B., Son, D.S., Park, H., Lee, K.K., Han, Y.M., 2002. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol. Reprod.*, 67 (2): 487–492.
- Koo, D.B., Kang, Y.K., Park, J.S., Park, J.K., Chang, W.K., Lee, K.K., Han, Y.M., 2004. A paucity of structural integrity in cloned porcine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 62 (5): 779–789.
- Kourmouli, N., Jeppesen, P., Mahadevhaiah, S., Burgoyne, P., Wu, R., Gilbert, D.M., Bongiorno, S., Prantera, G., Fanti, L., Pimpinelli, S., Shi, W., Fundele, R., Singh, P.B., 2004. Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J. Cell Sci.*, 117 (12): 2491–2501.
- Kratz, C.P., Edelman, D.C., Wang, Y., Meltzer, P.S., Greene, M.H., 2014. Genetic and epigenetic analysis of monozygotic twins discordant for testicular cancer. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.*, 5 (3): 135–139.
- Küçükali, C.İ., Kürtüncü, M., Çoban, A., Çebi, M., Tüzün, E., 2015. Epigenetics of multiple sclerosis: an updated review. *Neuromolecular Med.*, 17 (2): 83–96.

- Kühholzer-Cabot, B., Brem, G., 2002. Aging of animals produced by somatic cell nuclear transfer. *Exp. Gerontol.*, 37 (12): 1317–1323.
- Kumar, B.M., Jin, H.F., Kim, J.G., Ock, S.A., Hong, Y., Balasubramanian, S., Choe, S.Y., Rho, G.J., 2007. Differential gene expression patterns in porcine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts and mesenchymal stem cells. *Dev. Dyn.*, 236 (2): 435–446.
- Kumar, B.M., Maeng, G.H., Lee, Y.M., Lee, J.H., Jeon, B.G., Ock, S.A., Kang, T., Rho, G.J., 2013. Epigenetic modification of fetal fibroblasts improves developmental competency and gene expression in porcine cloned embryos. *Vet. Res. Commun.*, 37 (1): 19–28.
- Kungulovski, G., Jeltsch, A., 2016. Epigenome editing: state of the art, concepts, and perspectives. *Trends Genet.*, 32 (2): 101–113.
- Kurome, M., Fujimura, T., Murakami, H., Takahagi, Y., Wako, N., Ochiai, T., Miyazaki, K., Nagashima, H., 2003. Comparison of electro-fusion and intracytoplasmic nuclear injection methods in pig cloning. *Cloning Stem Cells*, 5 (4): 367–378.
- Kurome, M., Hisatomi, H., Matsumoto, S., Tomii, R., Ueno, S., Hiruma, K., Saito, H., Nakamura, K., Okumura, K., Matsumoto, M., Kaji, Y., Endo, F., Nagashima, H., 2008. Production efficiency and telomere length of the cloned pigs following serial somatic cell nuclear transfer. *J. Reprod. Dev.*, 54 (4): 254–258.
- Kurome, M., Geistlinger, L., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Klymiuk, N., Wuensch, A., Richter, A., Baehr, A., Kraehe, K., Burkhardt, K., Flisikowski, K., Flisikowska, T., Merkl, C., Landmann, M., Durkovic, M., Tschukes, A., Kraner, S., Schindelbauer, D., Petri, T., Kind, A., Nagashima, H., Schnieke, A., Zimmer, R., Wolf, E., 2013. Factors influencing the efficiency of generating genetically engineered pigs by nuclear transfer: multi-factorial analysis of a large data set. *BMC Biotechnol.*, 13: 43.
- Lacham-Kaplan, O., Diamente, M., Pushett, D., Lewis, I., Trounson, A., 2000. Developmental competence of nuclear transfer cow oocytes after direct injection of fetal fibroblast nuclei. *Cloning*, 2 (2): 55–62.
- Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Colleoni, S., Ponderato, N., Turini, P., Crotti, G., Galli, C., 2005. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction*, 130 (4): 559–567.
- Lagutina, I., Fulka, H., Brevini, T.A., Antonini, S., Brunetti, D., Colleoni, S., Gandolfi, F., Lazzari, G., Fulka, J. Jr., Galli, C., 2010. Development, embryonic genome activity and mitochondrial characteristics of bovine-pig interfamily nuclear transfer embryos. *Reproduction*, 140 (2): 273–285.
- Lagutina, I., Zakhartchenko, V., Fulka, H., Colleoni, S., Wolf, E., Fulka, J. Jr., Lazzari, G., Galli, C., 2011. Formation of nucleoli in interspecies nuclear transfer embryos derived from bovine, porcine, and rabbit oocytes and nuclear donor cells of various species. *Reproduction*, 141 (4): 453–465.

- Lai, L., Tao, T., Macháty, Z., Kühholzer, B., Sun, Q.Y., Park, K.W., Day, B.N., Prather, R.S., 2001. Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblasts as donors. *Biol. Reprod.*, 65 (5): 1558–1564.
- Lai, L., Park, K.W., Cheong, H.T., Kühholzer, B., Samuel, M., Bonk, A., Im, G.S., Rieke, A., Day, B.N., Murphy, C.N., Carter, D.B., Prather, R.S., 2002. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 62 (3): 300–306.
- Lan, G.C., Chang, Z.L., Luo, M.J., Jiang, Y.L., Han, D., Wu, Y.G., Han, Z.B., Ma, S.F., Tan, J.H., 2006. Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 73 (7): 834–840.
- Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Diaz, F., Moraes, C.T., Farin, P.W., Farin, C.E., Hammer, C.J., West, M.D., Damiani, P., 2000a. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*, 2 (2): 79–90.
- Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Blackwell, C., Cristofalo, V.J., Francis, M.K., Baerlocher, G.M., Mak, J., Schertzer, M., Chavez, E.A., Sawyer, N., Lansdorp, P.M., West, M.D., 2000b. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*, 288 (5466): 665–669.
- Lardenoije, R., Iatrou, A., Kenis, G., Kompotis, K., Steinbusch, H.W., Mastroeni, D., Coleman, P., Lemere, C.A., Hof, P.R., van den Hove, D.L., Rutten, B.P., 2015. The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.*, 131: 21–64.
- Lee, J., Inoue, K., Ono, R., Ogonuki, N., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., Ogura, A., Ishino, F., 2003a. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*, 129 (8): 1807–1817.
- 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., 2003b. Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. *Theriogenology*, 59 (9): 1949–1957.
- 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., 2003c. Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol. Reprod.*, 69 (3): 995–1001.
- 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., 2005a. Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Theriogenology*, 63 (4): 973–991.

- Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Shamim, M.H., Kim, J.J., Kang, S.K., Schatten, G., Hwang, W.S., 2005b. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 436 (7051): 641.
- Lee, H.S., Yu, X.F., Bang, J.I., Cho, S.J., Deb, G.K., Kim, B.W., Kong, I.K., 2010. Enhanced histone acetylation in somatic cells induced by a histone deacetylase inhibitor improved inter-generic cloned leopard cat blastocysts. *Theriogenology*, 74 (8): 1439–1449.
- Lee, T., Sachdev, P., 2014. The contributions of twin studies to the understanding of brain ageing and neurocognitive disorders. *Curr. Opin. Psychiatry*, 27 (2): 122–127.
- Lee, S., Jin, J.X., Khoirinaya, C., Kim, G.A., Lee, B.C., 2016. Lanosterol influences cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro* and improves preimplantation development of cloned embryos. *Theriogenology*, 85 (4): 575–584.
- Li, L., Connelly, M.C., Wetmore, C., Curran, T., Morgan, J.I., 2003. Mouse embryos cloned from brain tumors. *Cancer Res.*, 63 (11): 2733–2736.
- Li, Z., Sun, X., Chen, J., Liu, X. Wisely, S.M., Zhou, Q., Renard, J.P., Leno, G.H., Engelhardt, J.F., 2006a. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev. Biol.*, 293 (2): 439–448.
- Li, S., Chen, X., Fang, Z., Shi, J., Sheng, H.Z., 2006b. Rabbits generated from fibroblasts through nuclear transfer. *Reproduction*, 131 (6): 1085–1090.
- Li, J., Svarcova, O., Vиллемoes, K., Kragh, P.M., Schmidt, M., Bøgh, I.B., Zhang, Y., Du, Y., Lin, L., Purup, S., Xue, Q., Bolund, L., Yang, H., Maddox-Hyttel, P., Vajta, G., 2008. High *in vitro* development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology*, 70 (5): 800–808.
- Li, S., Guo, Y., Shi, J., Yin, C., Xing, F., Xu, L., Zhang, C., Liu, T., Li, Y., Li, H., Du, L., Chen, X., 2009. Transgene expression of enhanced green fluorescent protein in cloned rabbits generated from *in vitro*-transfected adult fibroblasts. *Transgenic Res.*, 18 (2): 227–235.
- Li, C., Zhao, S., Zhang, N., Zhang, S., Hou, Y., 2013a. Differences of DNA methylation profiles between monozygotic twins' blood samples. *Mol. Biol. Rep.*, 40 (9): 5275–5280.
- Li, Z., He, X., Chen, L., Shi, J., Zhou, R., Xu, W., Liu, D., Wu, Z., 2013b. Bone marrow mesenchymal stem cells are an attractive donor cell type for production of cloned pigs as well as genetically modified cloned pigs by somatic cell nuclear transfer. *Cell. Reprogram.*, 15 (5): 459–470.
- Li, X., Xiao, B., Chen, X.S., 2016. DNA methylation: a new player in multiple sclerosis. *Mol. Neurobiol.*, artykuł opublikowany online: 17 czerwca 2016, w druku, pp. 1–11, DOI: 10.1007/s12035-016-9966-3.
- Liu, H., Kim, J.M., Aoki F., 2004. Regulation of histone H3 lysine 9 methylation in oocytes and early preimplantation embryos. *Development*, 131 (10): 2269–2280.

- Liu, L., Liu, Y., Gao, F., Song, G., Wen, J., Guan, J., Yin, Y., Ma, X., Tang, B., Li, Z., 2012. Embryonic development and gene expression of porcine SCNT embryos treated with sodium butyrate. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, 318 (3): 224–234.
- Liu, X., Wang, Y., Guo, W., Chang, B., Liu, J., Guo, Z., Quan, F., Zhang, Y., 2013. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat. Commun.*, 4: 2565.
- Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J.Jr., Cappai, P., Clinton, M., 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using *post-mortem* somatic cells. *Nat. Biotechnol.*, 19 (10): 962–964.
- Loi, P., Clinton, M., Barboni, B., Fulka, J.Jr., Cappai, P., Feil, R., Moor, R.M., Ptak, G., 2002. Nuclei of nonviable ovine somatic cells develop into lambs after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.*, 67 (1): 126–132.
- Loi, P., Iuso, D., Czernik, M., Ogura, A., 2016. A new, dynamic era for somatic cell nuclear transfer? *Trends Biotechnol.*, 34 (10): 791–797.
- Lorincz, M.C., Schubeler, D., Hutchinson, S.R., Dickerson, D.R., Groudine, M., 2002. DNA methylation density influences the stability of an epigenetic imprint and Dnmt3a/b-independent *de novo* methylation. *Mol. Cell. Biol.*, 22 (21): 7572–7580.
- Lorthongpanich, C., Solter, D., Lim, C.Y., 2010. Nuclear reprogramming in zygotes. *Int. J. Dev. Biol.*, 54 (11-12): 1631–1640.
- Lu, D., Liu, S., Shang, S., Wu, F., Wen, X., Li, Z., Li, Y., Hu, X., Zhao, Y., Li, Q., Li, N., 2015. Production of transgenic-cloned pigs expressing large quantities of recombinant human lysozyme in milk. *PLoS One*, 10 (5): e0123551.
- Lucifero, D., Mertineit, C., Clarke, H.J., Bestor, T.H., Trasler, J.M., 2002. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics*, 79 (4): 530–538.
- Lucifero, D., Chaillet, J.R., Trasler, J.M., 2004. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum. Reprod.*, 10 (1): 3–18.
- Luo, Y., Wang, Y., Liu, J., Lan, H., Shao, M., Yu, Y., Quan, F., Zhang, Y., 2015. Production of transgenic cattle highly expressing human serum albumin in milk by phiC31 integrase-mediated gene delivery. *Transgenic Res.*, 24 (5): 875–883.
- Ma, J., Li, Q., Li, Y., Wen, X., Li, Z., Zhang, Z., Zhang, J., Yu, Z., Li, N., 2016. Expression of recombinant human α -lactalbumin in milk of transgenic cloned pigs is sufficient to enhance intestinal growth and weight gain of suckling piglets. *Gene*, 584 (1): 7–16.
- Maes, T., Mascaró, C., Ortega, A., Lunardi, S., Ciceri, F., Somervaille, T.C., Buesa, C., 2015. KDM1 histone lysine demethylases as targets for treatments of oncological and neurodegenerative disease. *Epigenomics*, 7 (4): 609–626.

- Malki, K., Koritskaya, E., Harris, F., Bryson, K., Herbster, M., Tosto, M.G., 2016. Epigenetic differences in monozygotic twins discordant for major depressive disorder. *Transl. Psychiatry*, 6 (6): e839.
- Mann, M.R.W., Bartolomei, M.S., 2002. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol.*, 3 (2): reviews1003.1–reviews1003.4.
- Mann, M.R.W., Chung, Y.G., Nolen, L.D., Verona, R.I., Latham, K.E., Bartolomei, M.S., 2003. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 69 (3): 902–914.
- Mann, M.R.W., Lee, S.S., Doherty, A.S., Verona, R.I., Nolen, L.D., Schultz, R.M., Bartolomei, M.S., 2004. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development*, 131 (15): 3727–3735.
- Martinez-Diaz, M.A., Che, L., Albornoz, M., Seneda, M.M., Collis, D., Coutinho, A.R., El-Beirouthi, N., Laurin, D., Zhao, X., Bordignon, V., 2010. Pre- and postimplantation development of swine-cloned embryos derived from fibroblasts and bone marrow cells after inhibition of histone deacetylases. *Cell. Reprogram.*, 12 (1): 85–94.
- Mason, K., Liu, Z., Aguirre-Lavin, T., Beaujean, N., 2012. Chromatin and epigenetic modifications during early mammalian development. *Anim. Reprod. Sci.*, 134 (1-2): 45–55.
- Matoba, S., Liu, Y., Lu, F., Iwabuchi, K.A., Shen, L., Inoue, A., Zhang, Y., 2014. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell*, 159 (4): 884–895.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., Haaf, T., 2000. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403 (6769): 501–502.
- McCreath, K.J., Howcroft, J., Campbell, K.H.S., Colman, A., Schnieke, A.E., Kind, A.J., 2000. Production of gene targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 405 (6790): 1066–1069.
- Meng, Q., Polgar, Z., Liu, J., Dinnyes, A., 2009. Live birth of somatic cell-cloned rabbits following trichostatin A treatment and cotransfer of parthenogenetic embryos. *Cloning Stem Cells*, 11 (1): 203–208.
- Meng, L., Wan, Y., Sun, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Song, Y., Wang, F., 2013. Generation of five human lactoferrin transgenic cloned goats using fibroblast cells and their methylation status of putative differential methylation regions of IGF2R and H19 imprinted genes. *PLoS One*, 8 (10): e77798.
- Miyashita, N., Shiga, K., Yonai, M., Kaneyama, K., Kobayashi, S., Kojima, T., Goto, Y., Kishi, M., Aso, H., Suzuki, T., Sakaguchi, M., Nagai, T., 2002. Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol. Reprod.*, 66 (6): 1649–1655.
- Miyoshi, K., Saeki, K., Sato, E., 2000. Improvement in development of porcine embryos reconstituted with cells from blastocyst-derived cell lines and

- enucleated oocytes by optimization of reconstruction methods. *Cloning*, 2 (4): 175–184.
- Miyoshi, K., Rzucidlo, J., Pratt, S.L., Stice, S.L., 2002. Utility of rapidly matured oocytes as recipients for production of cloned embryos from somatic cells in the pig. *Biol. Reprod.*, 67 (2): 540–545.
- Miyoshi, K., Yuki, Y., Yoshida, M., 2005. Optimization of Ca²⁺ concentrations in fusion and activation media for production of cloned embryos from miniature pig somatic cells. *J. Reprod. Dev.*, 51 (6): 699–706.
- Mizutani, E., Oikawa, M., Kassai, H., Inoue, K., Shiura, H., Hirasawa, R., Kamimura, S., Matoba, S., Ogonuki, N., Nagatomo, H., Abe, K., Wakayama, T., Aiba, A., Ogura, A., 2015. Generation of cloned mice from adult neurons by direct nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 92 (3): 81, 1–11.
- Moreira, P.N., Robl, J.M., Collas, P., 2003. Architectural defects in pronuclei of mouse nuclear transplant embryos. *J. Cell Sci.*, 116 (18): 3713–3720.
- Nagashima, T., Maruyama, T., Furuya, M., Kajitani, T., Uchida, H., Masuda, H., Ono, M., Arase, T., Ozato, K., Yoshimura, Y., 2007. Histone acetylation and subcellular localization of chromosomal protein BRD4 during mouse oocyte meiosis and mitosis. *Mol. Hum. Reprod.*, 13 (3): 141–148.
- Narayan P.J., Lill C., Faull R., Curtis M.A., Dragunow M., 2015. Increased acetyl and total histone levels in post-mortem Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Dis.*, 74: 281–294.
- Narbonne, P., Miyamoto, K., Gurdon, J.B., 2012. Reprogramming and development in nuclear transfer embryos and in interspecific systems. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 22 (5): 450–458.
- Nashun, B., Hill, P.W., Hajkova, P., 2015. Reprogramming of cell fate: epigenetic memory and the erasure of memories past. *EMBO J.*, 34 (10): 1296–1308.
- Neven, K.Y., Piola, M., Angelici, L., Cortini, F., Fenoglio, C., Galimberti, D., Pesatori, A.C., Scarpini, E., Bollati, V., 2016. Repetitive element hypermethylation in multiple sclerosis patients. *BMC Genet.*, 17 (1): 84.
- Ngun T.C., Vilain E., 2014. The biological basis of human sexual orientation: is there a role for epigenetics? *Adv. Genet.*, 86: 167–184.
- Niemann, H., Wrenzycki, C., Lucas-Hahn, A., Brambrink, T., Kues, W.A., Carnwath, J.W., 2002. Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning Stem Cells*, 4 (1): 29–38.
- Niemann, H., 2016. Epigenetic reprogramming in mammalian species after SCNT-based cloning. *Theriogenology*, 86 (1): 80–90.
- Ning, S.F., Li, Q.Y., Liang, M.M., Yang, X.G., Xu, H.Y., Lu, Y.Q., Lu, S.S., Lu, K.H., 2013. Methylation characteristics and developmental potential of Guangxi Bama minipig (*Sus scrofa domestica*) cloned embryos from donor cells treated with trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Zygote*, 21 (2): 178–186.
- Nottle, M.B., Beebe, L.F., Harrison, S.J., McIlpatrick, S.M., Ashman, R.J., O'Connell, P.J., Salvaris, E.J., Fiscicaro, N., Pommey, S., Cowan, P.J., d'Apice,

- A.J., 2007. Production of homozygous α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation*, 14 (4): 339–344.
- Novak, S., Paradis, F., Savard, C., Tremblay, K., Sirard, M.A., 2004. Identification of porcine oocyte proteins that are associated with somatic cell nuclei after co-incubation. *Biol. Reprod.*, 71 (4), 1279–1289.
- Obata, Y., Kono, T., 2002. Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J. Biol. Chem.*, 277 (7): 5285–5289.
- Ogawa, H., Ono, Y., Shimosawa, N., Sotomaru, Y., Katsuzawa, Y., Hiura, H., Ito, M., Kono, T., 2003. Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. *Reproduction*, 126 (4): 549–557.
- Oh, H.J., Kim, M.K., Jang, G., Kim, H.J., Hong, S.G., Park, J.E., Park, K., Park, C., Sohn, S.H., Kim, D.Y., Shin, N.S., Lee, B.C., 2008. Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. *Theriogenology*, 70 (4): 638–647.
- Ollikainen, M., Craig, J.M., 2011. Epigenetic discordance at imprinting control regions in twins. *Epigenomics*, 3 (3): 295–306.
- Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H., Perry, A.C.F., 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289 (5482): 1188–1190.
- Ono, Y., Shimosawa, N., Ito, M., Kono, T., 2001. Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 64 (1): 44–50.
- Oropeza, M., Petersen, B., Carnwath, J.W., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Hassel, P., Herrmann, D., Barg-Kues, B., Holler, S., Queisser, A.L., Schwinzer, R., Hinkel, R., Kupatt, C., Niemann, H., 2009. Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli. *Xenotransplantation*, 16 (6): 522–534.
- Ozawa, M., Himaki, T., Ookutsu, S., Mizobe, Y., Ogawa, J., Miyoshi, K., Yabuki, A., Fan, J., Yoshida, M., 2015. Production of cloned miniature pigs expressing high levels of human apolipoprotein(a) in plasma. *PLoS One* 10 (7): e0132155.
- Paoloni-Giacobino, A., Chaillet, J.R., 2004. Genomic imprinting and assisted reproduction. *Reprod. Health*, 1 (1): 6.
- Park, K.Y., Sellars, E.A., Grinberg, A., Huang, S.P., Pfeifer, K., 2004a. The *H19* differentially methylated region marks the parental origin of a heterologous locus without gametic DNA methylation. *Mol. Cell. Biol.*, 24 (9): 3588–3595.
- Park, M.R., Cho, S.K., Park, J.Y., Lee, S.Y., Choi, Y.J., Kwon, D.N., Son, W.J., Seo, H.G., Kim, J.H., 2004b. Detection of rare Leydig cell hypoplasia in somatic cell cloned male piglets. *Zygote*, 12 (4): 305–313.
- Park, M.R., Cho, S.K., Lee, S.Y., Choi, Y.J., Park, J.Y., Kwon, D.N., Son, W.J., Paik, S.S., Kim, T., Han, Y.M., Kim, J.H., 2005. A rare and often unrecog-

- nized cerebromeningitis and hemodynamic disorder: A major cause of sudden death in somatic cell cloned piglets. *Proteomics*, 5 (7): 1928–1939.
- Park, S.J., Park, H.J., Koo, O.J., Choi, W.J., Moon, J.H., Kwon, D.K., Kang, J.T., Kim, S., Choi, J.Y., Jang, G., Lee, B.C., 2012. Oxamflatin improves developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.*, 14 (5), 398–406.
- Pfister-Genskow, M., Myers, C., Childs, L.A., Lacson, J.C., Patterson, T., Betthausen, J.M., Goueleke, P.J., Koppang, R.W., Lange, G., Fisher, P., Watt, S.R., Forsberg, E.J., Zheng, Y., Leno, G.H., Schultz, R.M., Liu, B., Chetia, C., Yang, X., Hoeschele, I., Eilertsen, K.J., 2005. Identification of differentially expressed genes in individual bovine preimplantation embryos produced by nuclear transfer: improper reprogramming of genes required for development. *Biol. Reprod.*, 72 (3): 546–555.
- Phelps, C.J., Ball, S.F., Vaught, T.D., Vance, A.M., Mendicino, M., Monahan, J.A., Walters, A.H., Wells, K.D., Dandro, A.S., Ramsoondar, J.J., Cooper, D.K., Ayares, D.L., 2009. Production and characterization of transgenic pigs expressing porcine CTLA4-Ig. *Xenotransplantation*, 16 (6): 477–485.
- Pihlstrøm, L., Berge, V., Rengmark, A., Toft, M., 2015. Parkinson's disease correlates with promoter methylation in the α -synuclein gene. *Mov. Disord.*, 30 (4): 577–580.
- Prather, R.S., Ross, J.W., Isom, S.C., Green, J.A., 2009. Transcriptional, posttranscriptional and epigenetic control of porcine oocyte maturation and embryogenesis. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 66: 165–176.
- Qureshi, I.A., Mehler, M.F., 2011. Advances in epigenetics and epigenomics for neurodegenerative diseases. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 11 (5): 464–473.
- Rajasekhar, V.K., Begemann, M., 2007. Concise review: roles of Polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem Cells*, 25 (10): 2498–2510.
- Ramsoondar, J.J., Macháty, Z., Costa, C., Williams, B.L., Fodor, W.L., Bondioli, K.R., 2003. Production of α 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human α 1,2-fucosyltransferase. *Biol. Reprod.*, 69 (2): 437–445.
- Ramsoondar, J., Vaught, T., Ball, S., Mendicino, M., Monahan, J., Jobst, P., Vance, A., Duncan, J., Wells, K., Ayares, D., 2009. Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation*, 16 (3): 164–180.
- Reik, W., Santos, F., Dean, W., 2003a. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology*, 59 (1): 21–32.
- Reik, W., Santos, F., Mitsuya, K., Morgan, H., Dean, W., 2003b. Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 358 (1436): 1403–1409.
- Reik, W., 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447 (7143): 425–432.

- Renard, J.P., Zhou, Q., LeBourhis, D., Chavatte-Palmer, P., Hue, I., Heyman, Y., Vignon, X., 2002. Nuclear transfer technologies: between successes and doubts. *Theriogenology*, 57 (1): 203–222.
- Rice, W.R., Friberg, U., Gavrillets, S., 2012. Homosexuality as a consequence of epigenetically canalized sexual development. *Q. Rev. Biol.*, 87 (4): 343–368.
- Rice, W.R., Friberg, U., Gavrillets, S., 2013. Homosexuality via canalized sexual development: a testing protocol for a new epigenetic model. *Bioessays*, 35 (9): 764–770.
- Richter, A., Kurome, M., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Klymiuk, N., Nagashima, H., Wolf, E., Wuensch, A., 2012. Potential of primary kidney cells for somatic cell nuclear transfer mediated transgenesis in pig. *BMC Biotechnol.*, 12: 84.
- Riedel, S.S., Neff, T., Bernt, K.M., 2015. Histone profiles in cancer. *Pharmacol. Ther.*, 154: 87–109.
- Rodriguez-Osorio, N., Urrego, R., Cibelli, J.B., Eilertsen, K., Memili, E., 2012. Reprogramming mammalian somatic cells. *Theriogenology*, 78 (9): 1869–1886.
- Roh, S., Hwang, W.S., 2002. *In vitro* development of porcine parthenogenetic and cloned embryos: comparison of oocyte-activating techniques, various culture systems and nuclear transfer methods. *Reprod. Fertil. Dev.*, 14 (1-2): 93–99.
- Roifman, M., Choufani, S., Turinsky, A.L., Drewlo, S., Keating, S., Brudno, M., Kingdom, J., Weksberg, R., 2016. Genome-wide placental DNA methylation analysis of severely growth-discordant monozygotic twins reveals novel epigenetic targets for intrauterine growth restriction. *Clin. Epigenetics*, 8: 70.
- Roos, L., Spector, T.D., Bell, C.G., 2014. Using epigenomic studies in monozygotic twins to improve our understanding of cancer. *Epigenomics*, 6 (3): 299–309.
- Roos, L., van Dongen, J., Bell, C.G., Burri, A., Deloukas, P., Boomsma, D.I., Spector, T.D., Bell, J.T., 2016. Integrative DNA methylome analysis of pan-cancer biomarkers in cancer discordant monozygotic twin-pairs. *Clin. Epigenetics*, 8: 7.
- Ruddock, N.T., Wilson, K.J., Cooney, M.A., Korfiatis, N.A., Tecirlioglu, R.T., French, A.J., 2004. Analysis of imprinted messenger RNA expression during bovine preimplantation development. *Biol. Reprod.*, 70 (4): 1131–1135.
- Rybouchkin, A., Kato, Y., Tsunoda, Y., 2006. Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 74 (6): 1083–1089.
- Samiec, M., 2005a. The role of mitochondrial genome (mtDNA) in somatic and embryo cloning of mammals. A review. *J. Anim. Feed Sci.*, 14 (2): 213–233.

- Samiec, M., 2005b. The effect of mitochondrial genome on architectural remodeling and epigenetic reprogramming of donor cell nuclei in mammalian nuclear transfer-derived embryos. *J. Anim. Feed Sci.*, 14 (3): 393–422.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., 2005a. Microsurgical nuclear transfer by intraooplasmic karyoplast injection as an alternative embryo reconstruction method in somatic cloning of pigs and other mammal species; application value of the method and its technical advantages: a review. *Czech J. Anim Sci.*, 50 (6): 235–242.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., 2005b. Molecular conditions of the cell nucleus remodelling/reprogramming process and nuclear-transferred embryo development in the intraooplasmic karyoplast injection technique: a review. *Czech J. Anim. Sci.*, 50 (5): 185–195.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., 2011a. Transgenic mammalian species, generated by somatic cell cloning, in biomedicine, biopharmaceutical industry and human nutrition/dietetics – recent achievements. *Pol. J. Vet. Sci.*, 14 (2): 317–328.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., 2011b. The possibilities of practical application of transgenic mammalian species generated by somatic cell cloning in pharmacology, veterinary medicine and xenotransplantation. *Pol. J. Vet. Sci.*, 14 (2): 329–340.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., 2012. High developmental capability of porcine cloned embryos following trichostatin A-dependent epigenomic transformation during *in vitro* maturation of oocytes pre-exposed to *R*-roscovitine. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 30 (4): 383–393.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., 2013. Assessment of *in vitro* developmental capacity of porcine nuclear-transferred embryos reconstituted with cumulus oophorus cells undergoing vital diagnostics for apoptosis detection. *Ann. Anim. Sci.*, 13 (3): 513–529.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., Opiela, J., 2013a. Creation of cloned pig embryos using contact-inhibited or serum-starved fibroblast cells analysed *in vitro* for apoptosis occurrence. *Ann. Anim. Sci.*, 13 (2): 275–293.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., Bochenek, M., 2013b. *In vitro* development of porcine nuclear-transferred embryos derived from fibroblast cells analysed cytometrically for apoptosis incidence and accuracy of cell cycle synchronization at the G0/G1 stages. *Ann. Anim. Sci.* 13 (4): 735–752.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., 2014. Biological transcomplementary activation as a novel and effective strategy applied to the generation of porcine somatic cell cloned embryos. *Reprod. Biol.*, 14 (2): 128–139.
- Samiec, M., Opiela, J., Lipiński, D., Romanek, J. 2015. Trichostatin A-mediated epigenetic transformation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells biases the *in vitro* developmental capability, quality, and pluripotency extent of porcine cloned embryos. *Biomed Res. Int.*, 2015: 814686, 13 pp.

- Sangalli, J.R., Chiaratti, M.R., De Bem, T.H., de Araújo, R.R., Bressan, F.F., Sampaio, R.V., Perecin, F., Smith, L.C., King, W.A., Meirelles, F.V., 2014. Development to term of cloned cattle derived from donor cells treated with valproic acid. *PLoS One* 9 (6): e101022.
- Sansinena, M.J., Hylan, D., Hebert, K., Denniston, R.S., Godke, R.A., 2005. Banteng (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer. *Theriogenology*, 63 (4): 1081–1091.
- Santos, F., Hendrich, B., Reik, W., Dean, W., 2002. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev. Biol.*, 241 (1): 172–182.
- Santos, F., Zakhartchenko, V., Stojkovic, M., Peters, A., Jenuwein, T., Wolf, E., Reik, W., Dean, W., 2003. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr. Biol.*, 13 (13): 1116–1121.
- Santos, F., Dean, W., 2004. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction*, 127 (6): 643–651.
- Sarmiento, O.F., Digilio, L.C., Wang, Y., Perlin, J., Herr, J.C., Allis, C.D., Coonrod, S.A., 2004. Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development. *J. Cell Sci.*, 117 (Pt 19): 4449–4459.
- Schaetzlein, S., Rudolph, K.L., 2005. Telomere length regulation during cloning, embryogenesis and ageing. *Reprod. Fertil. Dev.*, 17 (1-2): 85–96.
- Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., Matsui, Y., 2005. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev. Biol.*, 278 (2): 440–458.
- Shi, W., Zakhartchenko, V., Wolf, E., 2003a. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation*, 71 (2): 91–113.
- Shi, W., Hoefflich, A., Flaswinkel, H., Stojkovic, M., Wolf, E., Zakhartchenko, V., 2003b. Induction of a senescent-like phenotype does not confer the ability of bovine immortal cells to support the development of nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.*, 69 (1): 301–309.
- Shi, W., Dirim, F., Wolf, E., Zakhartchenko, V., Haaf, T., 2004. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in *in vivo* fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. *Biol. Reprod.*, 71 (1): 340–347.
- Shi, D., Lu, F., Wei, Y., Cui, K., Yang, S., Wei, J., Liu, Q., 2007. Buffaloes (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol. Reprod.*, 77 (2): 285–291.
- Shi, L., Wu, J., 2009. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 7: 59.
- Shiels, P.G., Kind, A.J., Campbell, K.H.S., Waddington, D., Wilmut, I., Colman, A., Schnieke, A.E., 1999. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature*, 399 (6734): 316–317.

- Shimamura, M., Sato, N., Morishita, R., 2011. Experimental and clinical application of plasmid DNA in the field of central nervous diseases. *Curr. Gene Ther.*, 11 (6): 491–500.
- Shimatsu, Y., Yamada, K., Horii, W., Hirakata, A., Sakamoto, Y., Waki, S., Sano, J., Saitoh, T., Sahara, H., Shimizu, A., Yazawa, H., Sachs, D.H., Nunoya, T., 2013. Production of cloned NIBS (Nippon Institute for Biological Science) and α -1,3-galactosyltransferase knockout MGH miniature pigs by somatic cell nuclear transfer using the NIBS breed as surrogates. *Xenotransplantation*, 20 (3): 157–164.
- Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, I., Buck, S., Murphy, K., Westhusin, M., 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 415 (6874): 859.
- Simonsson, S., Gurdon, J., 2004. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat. Cell Biol.*, 6 (10): 984–990.
- Singh, S.M., Murphy, B., O'Reilly, R., 2002. Epigenetic contributors to the discordance of monozygotic twins. *Clin. Genet.*, 62 (2): 97–103.
- Skrzyszowska, M., Smoraż, Z., Słomski, R., Kańska-Książkiewicz, L., Kalak, R., Michalak, E., Wielgus, K., Lehmann, J., Lipiński, D., Szalata, M., Pławski, A., Samiec, M., Jura, J., Gajda, B., Ryńska, B., Pieńkowski, M., 2006a. Generation of transgenic rabbits by the novel technique of chimeric somatic cell cloning. *Biol. Reprod.*, 74 (6): 1114–1120.
- Skrzyszowska, M., Karasiewicz, J., Bednarczyk, M., Samiec, M., Smoraż, Z., Waś, B., Guskiewicz, A., Korwin-Kossakowski, M., Górniewska, M., Szablisty, E., Modliński, J.A., Łakota, P., Wawrzyńska, M., Sechman, A., Wojtyśiak, D., Hrabia, A., Mika, M., Lisowski, M., Czekalski, P., Rząsa, J., Kapkowska, E., 2006b. Generation of cloned and chimeric embryos/offspring using the new methods of animal biotechnology. *Reprod. Biol.*, 6 (Suppl. 1): 119–135.
- Skrzyszowska, M., Samiec, M., Słomski, R., Lipiński, D., Mały, E., 2008. Development of porcine transgenic nuclear-transferred embryos derived from fibroblast cells transfected by the novel technique of nucleofection or standard lipofection. *Theriogenology*, 70 (2): 248–259.
- Smith, L.C., Suzuki, J. Jr., Goff, A.K., Fillion, F., Therrien, J., Murphy, B.D., Kohan-Ghadr, H.R., Lefebvre, R., Brisville, A.C., Buczinski, S., Fecteau, G., Percin, F., Meirelles, F.V., 2012. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod. Domest. Anim.*, 47 (Suppl. 4): 107–114.
- Song, Y., Hai, T., Wang, Y., Guo, R., Li, W., Wang, L., Zhou, Q., 2014. Epigenetic reprogramming, gene expression and *in vitro* development of porcine SCNT embryos are significantly improved by a histone deacetylase inhibitor – *m*-carboxycinnamic acid bishydroxamide (CBHA). *Protein Cell*, 5 (5): 382–393.
- Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Tasai, M., Tagami, T., Nirasawa, K., Nagai, T., Kanai, Y., Parnpai, R., Takeda, K., 2011. Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from

- swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. *Anim. Sci. J.*, 82 (2): 236–243.
- Srivastava, M., Frolova, E., Rottinghaus, B., Boe, S.P., Grinberg, A., Lee, E., Love, P.E., Pfeifer, K., 2003. Imprint control element-mediated secondary methylation imprints at the *Igf2/H19* locus. *J. Biol. Chem.*, 278 (8): 5977–5983.
- Su, J., Wang, Y., Li, Y., Li, R., Li, Q., Wu, Y., Quan, F., Liu, J., Guo, Z., Zhang, Y., 2011. Oxamflatin significantly improves nuclear reprogramming, blastocyst quality, and *in vitro* development of bovine SCNT embryos. *PLoS One* 6 (8): e23805.
- Tani, T., Kato, Y., Tsunoda, Y., 2001. Direct exposure of chromosomes to non-activated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol. Reprod.*, 64 (1): 324–330.
- Tani, T., Kato, Y., Tsunoda, Y., 2003. Reprogramming of bovine somatic cell nuclei is not directly regulated by maturation promoting factor or mitogen-activated protein kinase activity. *Biol. Reprod.*, 69 (6): 1890–1894.
- Taudt, A., Colomé-Tatché, M., Johannes, F., 2016. Genetic sources of population epigenomic variation. *Nat. Rev. Genet.*, 17 (6): 319–332.
- Thall, A.D., Malý, P., Lowe, J.B., 1995. Oocyte Gal α 1,3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse. *J. Biol. Chem.*, 270 (37): 21437–21440.
- Tian, X.C., Xu, J., Yang, X., 2000. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat. Genet.*, 26 (3): 272–273.
- Tomii, R., Kurome, M., Ochiai, T., Wako, N., Ueda, H., Hirakawa, K., Kano, K., Nagashima, H., 2005. Production of cloned pigs by nuclear transfer of preadipocytes established from adult mature adipocytes. *Cloning Stem Cells*, 7 (4): 279–288.
- Tremolizzo, L., Rodriguez-Menendez, V., Conti, E., Zoia, C.P., Cavaletti, G., Ferrarese, C., 2014. Novel therapeutic targets in neuropsychiatric disorders: the neuroepigenome. *Curr. Pharm. Des.*, 20 (11): 1831–1839.
- Valor, L.M., 2015. Epigenetic-based therapies in the preclinical and clinical treatment of Huntington's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 67: 45–48.
- Van Thuan, N., Bui, H.T., Kim, J.H., Hikichi, T., Wakayama, S., Kishigami, S., Mizutani, E., Wakayama, T., 2009. The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction*, 138 (2): 309–317.
- Vignon, X., Zhou, Q., Renard, J.P., 2002. Chromatin as a regulative architecture of the early developmental functions of mammalian embryos after fertilization or nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 4 (4): 363–377.
- Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson K.R., Yanagimachi R., 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394 (6691): 369–374.
- Wakayama, S., Ohta, H., Hikichi, T., Mizutani, E., Iwaki, T., Kanagawa, O., Wakayama, T., 2008. Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20°C for 16 years. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105 (45): 17318–17322.

- Walker, R.M., Christoforou, A.N., McCartney, D.L., Morris, S.W., Kennedy, N.A., Morten, P., Anderson, S.M., Torrance, H.S., Macdonald, A., Sussmann, J.E., Whalley, H.C., Blackwood, D.H., McIntosh, A.M., Porteous, D.J., Evans, K.L., 2016. DNA methylation in a Scottish family multiply affected by bipolar disorder and major depressive disorder. *Clin. Epigenetics*, 8: 5.
- Wang, Y., Su, J., Wang, L., Xu, W., Quan, F., Liu, J., Zhang, Y., 2011a. The effects of 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on gene expression and DNA methylation status in cloned bovine blastocysts. *Cell. Reprogram.*, 13 (4): 297–306.
- Wang, L.J., Zhang, H., Wang, Y.S., Xu, W.B., Xiong, X.R., Li, Y.Y., Su, J.M., Hua, S., Zhang, Y., 2011b. Scriptaid improves *in vitro* development and nuclear reprogramming of somatic cell nuclear transfer bovine embryos. *Cell. Reprogram.*, 13 (5): 431–439.
- Wang, Y., Zhao, S., Bai, L., Fan, J., Liu, E., 2013. Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. *Biomed Res. Int.*, 2013: 580463, 9 pp.
- Wang, F., Fischhaber, P.L., Guo, C., Tang, T.S., 2014. Epigenetic modifications as novel therapeutic targets for Huntington's disease. *Epigenomics*, 6 (3): 287–297.
- Wani, N.A., Wernery, U., Hassan, F.A., Wernery, R., Skidmore, J.A., 2010. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 82 (2): 373–379.
- Watanabe, S., Iwamoto, M., Suzuki, S.I., Fuchimoto, D., Honma, D., Nagai, T., Hashimoto, M., Yazaki, S., Sato, M., Onishi, A., 2005. A novel method for the production of transgenic cloned pigs: electroporation-mediated gene transfer to non-cultured cells and subsequent selection with puromycin. *Biol. Reprod.*, 72 (2): 309–315.
- Wee, G., Shim, J.J., Koo, D.B., Chae, J.I., Lee, K.K., Han, Y.M., 2007. Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction*, 134 (6): 781–787.
- Wen, B.Q., Li, J., Li, J.J., Tian, S.J., Sun, S.C., Qi, X., Cai, W.T., Chang, Q.L., 2014. The histone deacetylase inhibitor Scriptaid improves *in vitro* developmental competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. *Theriogenology*, 81 (2): 332–339.
- Whitworth, K.M., Prather, R.S., 2010. Somatic cell nuclear transfer efficiency: How can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? *Mol. Reprod. Dev.*, 77 (12): 1001–1015.
- Wilmut, I., Beaujean, N., de Sousa, P.A., Dinnyes, A., King, T.J., Paterson, L.A., Wells, D.N., Young, L.E., 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 419 (6907): 583–586.
- Wong, C.C., Meaburn, E.L., Ronald, A., Price, T.S., Jeffries, A.R., Schalkwyk, L.C., Plomin, R., Mill, J., 2014. Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Mol. Psychiatry*, 19 (4): 495–503.

- Wong, C.C., Parsons, M.J., Lester, K.J., Burrage, J., Eley, T.C., Mill, J., Dempster, E.L., Gregory, A.M., 2015. Epigenome-wide DNA methylation analysis of monozygotic twins discordant for diurnal preference. *Twin Res. Hum. Genet.*, 18 (6): 662–669.
- Woods, G.L., White, K.L., Vanderwall, D.K., Li, G.P., Aston, K.I., Bunch, T.D., Meerdo, L.N., Pate, B.J., 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, 301 (5636): 1063.
- Wrenzycki, C., Lucas-Hahn, A., Herrmann, D., Lemme, E., Korsawe, K., Niemann, H., 2002. *In vitro* production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol. Reprod.* 66 (1): 127–134.
- Wrenzycki, C., Niemann, H., 2003. Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of *in-vitro* production and somatic nuclear transfer. *Reprod. Biomed. Online*, 7 (6): 649–656.
- Wu, X., Li, Y., Li, G.P., Yang, D., Yue, Y., Wang, L., Li, K., Xin, P., Bou, S., Yu, H., 2008. Trichostatin A improved epigenetic modifications of transfected cells but did not improve subsequent cloned embryo development. *Anim. Biotechnol.*, 19 (4): 211–224.
- Xiong, X., Lan, D., Li, J., Zhong, J., Zi, X., Ma, L., Wang, Y., 2013. Zebularine and scriptaid significantly improve epigenetic reprogramming of yak fibroblasts and cloning efficiency. *Cell. Reprogram.*, 15 (4): 293–300.
- Xu, J., Yang, X., 2001. Telomerase activity in early bovine embryos derived from parthenogenetic activation and nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 64 (3): 770–774.
- Xu, W., Li, Z., Yu, B., He, X., Shi, J., Zhou, R., Liu, D., Wu, Z., 2013. Effects of *DNMT1* and *HDAC* inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during porcine somatic cell nuclear transfer. *PLoS One* 8 (5): e64705.
- Yamanaka, K., Sugimura, S., Wakai, T., Kawahara, M., Sato, E., 2009. Acetylation level of histone H3 in early embryonic stages affects subsequent development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *J. Reprod. Dev.*, 55 (6): 638–644.
- Yamazaki, Y., Mellissa, R., Mann, M.R.W., Lee, S.S., Marh, J., McCarrey, J.R., Yanagimachi, R., Bartolomei, M.S., 2003. Reprogramming of primordial germ cells begins before migration into the genital ridge, making these cells inadequate donors for reproductive cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (21): 12207–12212.
- Yan, Z.H., Zhou, Y.Y., Fu, J., Jiao, F., Zhao, L.W., Guan, P.F., Huang, S.Z., Zeng, Y.T., Zeng, F., 2010. Donor-host mitochondrial compatibility improves efficiency of bovine somatic cell nuclear transfer. *BMC Dev. Biol.*, 10: 31.
- Yan, H., Yan, Z., Ma, Q., Jiao, F., Huang, S., Zeng, F., Zeng, Y., 2011. Association between mitochondrial DNA haplotype compatibility and increased efficiency of bovine interspecies cloning. *J. Genet. Genomics*, 38 (1): 21–28.
- Yan, H., Tian, S., Slager, S.L., Sun, Z., Ordog, T., 2016. Genome-wide epigenetic studies in human disease: a primer on -omic technologies. *Am. J.*

- Epidemiol., 183 (2): 96–109.
- Yang, X., Smith, S.L., Tian, X.C., Lewin, H.A., Renard, J.P., Wakayama, T., 2007. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.*, 39 (3): 295–302.
- Yin, X.J., Lee, H.S., Lee, Y.H., Seo, Y.I., Jeon, S.J., Choi, E.G., Cho, S.J., Cho, S.G., Min, W., Kang, S.K., Hwang, W.S., Kong, I.K., 2005. Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction*, 129 (2): 245–249.
- Yin, X.J., Lee, H.S., Yu, X.F., Kim, L.H., Shin, H.D., Cho, S.J., Choi, E.G., Kong, I.K., 2008a. Production of second-generation cloned cats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 69 (8): 1001–1006.
- Yin, X.J., Lee, H.S., Yu, X.F., Choi, E., Koo, B.C., Kwon, M.S., Lee, Y.S., Cho, S.J., Jin, G.Z., Kim, L.H., Shin, H.D., Kim, T., Kim, N.H., Kong, I.K., 2008b. Generation of cloned transgenic cats expressing red fluorescence protein. *Biol. Reprod.*, 78 (3): 425–431.
- Young, L.E., Schnieke, A.E., McCreath, K.J., Wieckowski, S., Konfortova, G., Fernandes, K., Ptak, G., Kind, A.J., Wilmut, I., Loi, P., Feil, R., 2003. Conservation of *IGF2-H19* and *IGF2R* imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech. Dev.*, 120 (12): 1433–1442.
- Yu, C.C., Furukawa, M., Kobayashi, K., Shikishima, C., Cha, P.C., Sese, J., Sugawara, H., Iwamoto, K., Kato, T., Ando, J., Toda, T., 2012. Genome-wide DNA methylation and gene expression analyses of monozygotic twins discordant for intelligence levels. *PLoS One*, 7 (10): e47081.
- Zhang, P., Liu, P., Dou, H., Chen, L., Chen, L., Lin, L., Tan, P., Vajta, G., Gao, J., Du, Y., Ma, R.Z., 2013. Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 fatty acids. *PLoS One*, 8 (2): e55941.
- Zhao, J., Ross, J.W., Hao, Y., Spate L.D., Walters, E.M., Samuel, M.S., Rieke, A., Murphy, C.N., Prather, R.S., 2009. Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 81 (3): 525–530.
- Zhao, J., Whyte, J., Prather, R.S., 2010a. Effect of epigenetic regulation during swine embryogenesis and on cloning by nuclear transfer. *Cell Tissue Res.*, 341 (1): 13–21.
- Zhao, J., Hao, Y., Ross, J.W., Spate, L.D., Walters, E.M., Samuel, M.S., Rieke, A., Murphy, C.N., Prather, R.S., 2010b. Histone deacetylase inhibitors improve *in vitro* and *in vivo* developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell. Reprogram.*, 12 (1): 75–83.
- Zhou, Q., Renard, J.P., Le Friec, G., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A., Cozzi, J., 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, 302 (5648): 1179.
- Zhou, Z.R., Zhong, B.S., Jia, R.X., Wan, Y.J., Zhang, Y.L., Fan, Y.X., Wang, L.Z., You, J.H., Wang, Z.Y., Wang, F., 2013. Production of myostatin-targeted goat by nuclear transfer from cultured adult somatic cells. *Theriogenology*, 79 (2): 225–233.

Dr hab. Marcin Samiec

Dr hab. Marcin Samiec ukończył w 2002 r. Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt Akademii Rolniczej w Krakowie (specjalność: biologia rozrodu zwierząt). Pracę magisterską, obronioną z wyróżnieniem, pt.: „Wykorzystanie komórek wzgórnka jajonośnego w klonowaniu somatycznym świń” wykonał w Zakładzie Fizjologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego (IZ PIB) w Balicach. Zdobyła ona I nagrodę (w kategorii Genetyka zwierząt) w konkursie na najlepszą pracę magisterską w Polsce w latach 2002–2003, organizowanym przez Polskie Towarzystwo Zootechniczne. Badania zrealizowane w ramach jego pracy magisterskiej doprowadziły do uzyskania w 2002 r. pierwszych w Polsce klonalnych blastocyst świni po zastosowaniu standardowej techniki klonowania somatycznego. W latach 2002–2006 odbył studia doktoranckie w IZ PIB. Stopień doktora nauk rolniczych Rada Naukowa IZ PIB nadała mu w 2007 r. na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Wpływ aktywacji oocytów rekonstruowanych z jąder komórek somatycznych na procesy apoptozy w zarodkach klonalnych świń”. W 2014 r. uzyskał stopień dr. hab. n. roln. w dyscyplinie zootechnika (specjalność: rozród zwierząt), na podstawie oceny ogólnego dorobku naukowo-badawczego, kolokwium habilitacyjnego i przedłożonej rozprawy habilitacyjnej pt.: „Rozwój *in vitro* nietransgenicznych i transgenicznych zarodków klonalnych świń w zależności od przyjętej strategii aktywacji oocytów”. W Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt IZ PIB jest zatrudniony od 2006 r.

Dr hab. Marcin Samiec bierze aktywny udział w pracach z zakresu rozwoju zaawansowanych technologii wspomaganego rozrodu zwierząt gospodarskich i innowacyjnych technik genetycznej inżynierii embrionalnej, takich jak: wewnątrz- i międzygatunkowe klonowanie somatyczne oraz transgeneza świń, kóz, królików i koni, wnosząc do tych prac wiele samodzielnych twórczych inicjatyw. W efekcie własnych prac naukowo-badawczych z zakresu klonowania świń opracował oryginalną metodę sekwencyjnej aktywacji fizykochemicznej rekonstruowanych oocytów. Wyniki tych eksperymentów, w których *R*-roskowityna została po raz pierwszy wykorzystana w klonowaniu somatycznym ssaków do sztucznej aktywacji cybryd klonalnych świń, zostały opublikowane w 2012 r. w *Theriogenology*. Opracował również nową efektywną metodę pseudofizjologicznej (biologicznej) aktywacji transkomplementarnej zrekonstruowanych oocytów świni poprzez ich elektrofuzję z cytoplazmami wyizolowanymi z zygot królika. Skutkowała ona zwiększeniem potencjału rozwojowego *in vitro* oraz jakości transgenicznych i nietransgenicznych zarodków klonalnych świń (*Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2012; *Reproductive Biology*, 2014). Biologiczna aktywacja rekonstruowanych oocytów poprzez docytoplazmatyczną mikroiniekcję ekstraktów cytozolowo-nukleoplazmatycznych zygot, stosowana w klonowaniu somatycznym ssaków, w tym świń, jest przedmiotem patentu udzielonego w 2014 r. na rzecz IZ PIB przez Urząd Patentowy RP. Oryginalnym osiągnięciem badawczym dr. hab. Marcina Samca było wykorzystanie po raz pierwszy w świecie wysoko efektywnej metody nukleofekcji do transgenizacji *in vitro* komórek somatycznych – dawców

jąder, w celu uzyskiwania transgenicznych zarodków klonalnych świni, wykazujących 100% ekspresję transgenu reporterowego białka eGFP (*Theriogenology*, 2008). Badania prowadzone przy udziale dr. hab. Marcina Samca doprowadziły w 2005 r. do narodzin pierwszych w Polsce kóz klonalnych, uzyskanych w wyniku zastosowania standardowej techniki klonowania somatycznego. Dr hab. Marcin Samiec współuczestniczył ponadto w opracowaniu nowatorskiej metody chimero-owego klonowania somatycznego, efektem której było uzyskanie w 2003 r. po raz pierwszy na świecie transgenicznych królików (*Biology of Reproduction*, 2006). Za prace z zakresu rozwoju nowych metod, służących zwiększaniu efektywności uzyskiwania transgenicznych zarodków i potomstwa zwierząt gospodarskich (królik, świnia, koza) technikami klonowania somatycznego dr hab. Marcin Samiec został w 2009 r. uhonorowany główną nagrodą dla wybitnych młodych naukowców w Polsce w ramach VII edycji prestiżowego Konkursu, organizowanego przez Fundację „Pro Scientia et Vita” Członków Wydziału V Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAN. Ponadto, w 2011 r. został odznaczony Brązowym Krzyżem Zasługi. Ostatnio prace naukowo-badawcze dr. hab. Marcina Samca skupiają się na wykorzystaniu mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego jako dawców jąder w procedurze wewnątrzgatunkowego klonowania somatycznego (w układzie homologicznym świnia→świnia) oraz międzygatunkowego klonowania somatycznego (w układzie heterologicznym: świnia→bydło). Kolejnym kierunkiem badań dr. hab. Marcina Samca jest określenie wpływu indukowalnych modulacji epigenetycznych komórek-dawców jąder (komórek fibroblastycznych lub mezenchymalnych komórek macierzystych), a także dojrzewających *in vitro* oocytów-biorców jąder na przedimplantacyjne zdolności rozwojowe, jakość cytologiczną oraz stopień pluripotencji klonalnych zarodków świni (*Animal Science Papers and Reports*, 2012; *BioMed Research International*, 2015).

Dorobek publikacyjny dr. hab. Marcina Samca obejmuje 38 prac naukowych, opublikowanych w latach 2003–2016 w prestiżowych czasopismach zagranicznych lub krajowych (w większości z Listy Filadelfijskiej), a także 4 książkowe monografie naukowe, autorstwo lub współautorstwo 9 rozdziałów w podręcznikach naukowych (wieloautorskich monografiach naukowych) i 3 wniosków patentowych (w tym 2 patentów), zarejestrowanych w Urzędzie Patentowym RP. Dr hab. Marcin Samiec bierze aktywny udział w licznych międzynarodowych i krajowych konferencjach oraz sympozjach naukowych. Jest autorem lub współautorem 75 doniesień naukowych i 36 referatów, opublikowanych w materiałach konferencyjnych lub czasopismach z Listy Filadelfijskiej, a także autorem lub współautorem 29 publikacji w recenzowanych materiałach z międzynarodowych konferencji naukowych (czasopismach z Listy Filadelfijskiej), uwzględnionych w bazie *Web of Science*. Uzyskana przez dr. hab. Marcina Samca wartość indeksu Hirscha utrzymuje się na poziomie 10 (według bazy *Web of Science*; 2016 r.).

Prof. dr hab. Maria Skrzyszowska

Prof. dr hab. Maria Skrzyszowska zajmuje się problematyką wspomaganego rozrodu zwierząt laboratoryjnych i gospodarskich, w szczególności innowacyjnymi technikami inżynierii embrionalnej, takimi jak: klonowanie zarodkowe, klonowanie somatyczne, a także zapłodnienie oocytów ssaków metodą docytoplazmatycznej iniekcji plemników (ICSI). Znaczącym osiągnięciem badawczym prof. Marii Skrzyszowskiej było opracowanie oryginalnej metody bisekcji zarodków bydłęcych, która skutkowała radykalnym obniżeniem strat komórkowych, ponoszonych w trakcie mikrochirurgicznego zabiegu dzielenia zarodka. Efektem badań z tego zakresu było uzyskanie pierwszych w Polsce monogenetycznych bliźniąt u bydła, zarówno po standardowej, jak i zmodyfikowanej bisekcji zarodków. Warty podkreślenia dokonania były: uzyskanie pierwszych na świecie blastocyst kota domowego techniką klonowania somatycznego, a także uzyskanie pierwszych w Polsce klonalnych blastocyst konia. Do najbardziej spektakularnych osiągnięć prof. Marii Skrzyszowskiej należy opracowanie nowatorskiej metody chimerowego klonowania somatycznego królików, w której pojedynczy blastomer zarodka 2-komórkowego wykorzystano jako biorcę dla jądra transgenicznego fibroblastu tkanki skórnej. Uzyskane dwa genetycznie zmodyfikowane króliki (wykazujące ekspresję genu kodującego ludzki hormon wzrostu – hGH, ukierunkowaną na komórki gruczołów mlekowych) były pierwszymi ssakami na świecie, otrzymanymi przy zastosowaniu tej oryginalnej strategii klonowania chimerowego.

Innym ważnym osiągnięciem badawczym było uzyskanie pierwszych w Polsce kóz klonalnych. W badaniach prowadzonych przy udziale prof. Marii Skrzyszowskiej wykorzystano po raz pierwszy wysoko efektywną metodę nukleofekcji do transgenizacji *in vitro* komórek somatycznych, dawców jąder w procedurze klonowania świń. Na potrzeby klonowania somatycznego zwierząt gospodarskich, opracowano także nowatorską metodę pseudofizjologiczną, transkomplementarną do aktywacji zrekonstruowanych oocytów świni, która skutkowała poprawą jakości zarodków klonalnych. Kolejnym istotnym dokonaniem naukowym było uzyskanie pierwszych w Polsce homo- i heterozygotycznych transgenicznych blastocyst oraz płodów klonalnych świni ze zhumanizowanym układem immunologicznym.

Prof. dr hab. Maria Skrzyszowska posiada bogaty dorobek publikacyjny, obejmujący oryginalne prace twórcze i przeglądowe. Ponadto jest autorem lub współautorem rozdziałów do podręczników i licznych doniesień na konferencje międzynarodowe, a także współautorem 3 patentów międzynarodowych, 2 patentów krajowych i 1 wzoru użytkowego.