



## Rozwój badań nad klonowaniem somatycznym kóz

Maria Skrzyszowska, Marcin Samiec

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

### Development of the studies on somatic cell cloning in goats

#### Summary

Domestic goat as a species with a relatively great biodiversity of dairy breeds, which possess high genetic merit and yield of milk production, can be a valuable tool for embryo gene engineering. This involves the generation of transgenic specimens, providing with xenogeneic (human) recombinant proteins (i.e. biopharmaceuticals), not only by the standard zygote intrapronuclear microinjection of gene constructs, but above all with the use of somatic cell cloning technology.

#### Key words:

goat, somatic cell cloning, nuclear transfer, transgenesis.

### 1. Wstęp

Metoda klonowania somatycznego techniką transplantacji jąder komórkowych, wykorzystywana jest w badaniach biotechnologicznych prowadzonych na wielu gatunkach ssaków, w tym także na gatunkach zwierząt gospodarskich. Atrakcyjność tej techniki w odniesieniu do zwierząt gospodarskich wynika z rysujących się możliwości użycia jej do multiplikacji osobników o wybitnych, wysokoodziedzicznych cechach wartości hodowlanej (genetycznej) i użytkowej, co z kolei mogłoby przyczynić się do skrócenia odstępu międzypokoleniowego i przyspieszenia tempa osiągnięcia postępu hodowlanego. Jednakże, realizacja tego kierunku badań możliwa jest obecnie tylko w bardzo ograniczonej skali, z powodu wysokich kosztów procedury klonowania,

#### Adres do korespondencji

Maria Skrzyszowska,  
Dział Biotechnologii  
Rozrodu Zwierząt,  
Instytut Zootechniki,  
32-083 Balice k. Krakowa;  
e-mail:  
mskrzysz@izoo.krakow.pl

przy wciąż, relatywnie niskiej skuteczności metody. Upowszechnienie tej technologii możliwe będzie dopiero po osiągnięciu wysokiej i stabilnej, tzn. gwarantującej powtarzalność wyników, efektywności. Największe jednak oczekiwania związane z praktyczną aplikacją techniki klonowania somatycznego, dotyczą możliwości wykorzystania jej do produkcji zwierząt transgenicznych, cennych ze względu na produkt ekspresji zmodyfikowanych genów, alternatywnie w stosunku do standardowej techniki uzyskiwania transgenicznych zwierząt na drodze mikroiniekcji egzogennych konstrukcji genetycznych do jednego z przedjądrzy zygot. Klonowanie somatyczne może być także sposobem multiplikacji już wyprodukowanych osobników transgenicznych (1-4).

## **2. Znaczenie gatunkowospecyficzných cech kozy dla genetycznej inżynierii embrionalnej**

Koza (*Capra hircus* L.) jako gatunek o dużej bioróżnorodności ras wykazujących stosunkowo wysoką wydajność mleczną może być dobrym obiektem dla transgenicznej produkcji rekombinowanych ludzkich białek terapeutycznych. Znaczna efektywność produkcji oczyszczonych (podlegających procesowi puryfikacji) obcogatunkowych biopreparatów przez kozy ułatwiłaby zatem ich stopniowe uzdatnianie w przemyśle farmaceutycznym. Innymi wymiernymi korzyściami uzyskiwania zmodyfikowanych genetycznie kóz klonalnych, cennych ze względu na ksenogeniczny produkt ukierunkowanej na gruczoł mlekowy ekspresji egzogennej DNA są: stosunkowo krótki odstęp międzypokoleniowy dający możliwość przyspieszania tempa osiągania postępu genetycznego w zakresie hodowli tzw. maciorek i kozłów-założycieli rodzicielskich linii transgenicznych (ang. *founder animals*), a także niska podatność ras kóz należących do mlecznego typu użytkowego na infekcje patologicznymi prionami (Prp<sup>Sc</sup>) wywołującymi chorobę *scrapie* (trzęsawkę) u owiec (5). Transgeniczne kozy mogłyby być optymalnymi bioreaktorami również z innego, agroekonomicznego powodu. W porównaniu z chowem krów transgenicznych, zwierzęta te można łatwiej hodować, szybciej kierować ich naturalnym i wspomaganym metodami biotechnologicznymi rozrodem, a ich utrzymanie jest znacznie tańsze niż dużych przeżuwaczy. Posiadają one bowiem dość duże w stosunku do rozmiarów ich ciała wymiona o przewodzie tkanki gruczołowej nad włóknistą tkanką mięsową (parenchymalną), co już genetycznie predestynuje ten gatunek małych przeżuwaczy do wysokiego potencjału produkcyjnego siary i mleka. Konsekwencją tych anatomiczno-fizjologicznych zalet kóz może być także wysoka wydajność stada transgenicznych maciorek w zakresie syntezy i sekrecji rekombinowanych białek terapeutycznych przez komórki pęcherzyków mlekotwórczych, wytwarzających wydzielinę o zmodyfikowanym genetycznie składzie jakościowym i ilościowym.

Pierwsze transgeniczne kozłeta klonalne uzyskano po transplatacji zarodków zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych, transfekowanych *in vitro* sto-



sunkowo prostymi konstrukcjami genowymi nie zawierającymi genomowych sekwencji regionów kodujących transgeny struktury, lecz złożonymi jedynie z segmentów eksonowych genów kodujących markerowe białka selekcyjne, np. fosfo-transferazę glicerolową/kinazę fosfoglicerolową neomycyny (PGKneo), warunkującą oporność na genetycynę (G418) i/lub reporterowe białko intensywnej zieleni fluorescencyjnej meduzy *Aequorea victoria* (Egip., ang. *enhanced green fluorescent protein*). W doświadczeniach Zou i wsp. (6) przeprowadzonych nad klonowaniem somatycznym kóz z wykorzystaniem hodowanych *in vitro* fibroblastów płodowych, transfekowanych przy użyciu konstruktów genetycznych zawierającego jedynie gen oporności na pochodną neomycyny (neo<sup>r</sup>) wyprodukowano 5 zmodyfikowanych genetycznie kozłat. Z kolei, Keefer i wsp. (3) oraz Baldassarre i wsp. (7,8) zastosowali do zabiegu transfekcji (lipofekcji) *in vitro* fibroblastów płodowych bardziej złożoną plazmidową konstrukcję genową (CEeGFP) zawierającą: 1) rozbudowaną sekwencję genomową tzw. ludzkiego wariantu genu białka eGFP pod kontrolą promotora ludzkiego czynnika elongacji łańcucha polinukleotydowego-1 $\alpha$  (ang. *human elongation factor-1 $\alpha$* ) oraz regulatorowej sekwencji regionu wzmacniającego inicjację transkrypcji mRNA cytomegalowirusa (ang. *cytomegalovirus enhancer*), a także 2) markerowy gen selekcyjny neomycyny sprzężony z ekspresyjnym wektorem kierunkowym wyizolowanym z genomu wirusa SV-40 (ang. *simian virus-40*). Po transplantacji zarodków zrekonstruowanych z jąder tak transformowanych genetycznie komórek somatycznych uzyskano jedną maciorkę klonalną z potwierdzoną molekularnie i fenotypowo ekspresją reporterowego transgenu eGFP.

Transgeniczne zwierzęta ze zdiagnozowanym przyżyciowo wysokim profilem aktywności transkrypcyjnej obcogatunkowego genu mogą być następnie multiplikowane techniką klonowania somatycznego. Ma to szczególne uzasadnienie w przypadku gdy pozyskiwane z tych zwierząt biofarmaceutyki mogą znaleźć powszechne zastosowanie w terapii u ludzi cierpiących na szereg nieuleczalnych chorób jednogennych. W momencie uzyskania przez transgeniczne biopreparaty odpowiednich certyfikatów dopuszczających je do aplikacji u ludzi, somatyczne klonowanie zmodyfikowanych genetycznie osobników pozwoli, przynajmniej teoretycznie, na utrzymanie homogenności takich leków ekstrahowanych z fizjologicznych wydzielin i wydaliny (mleko, mocz) kolejnych generacji sklonowanych zwierząt. Technologia taką wykorzystano z powodzeniem w amerykańskiej firmie biotechnologicznej Genzyme Transgenic Corporation, po wyprodukowaniu transgenicznych kóz z potwierdzoną w mleku ekspresją allelu ludzkiej antytrombiny III, standardową metodą mikroiniekcji konstruktów cDNA wyposażonych w promotor kierunkowy koziej  $\beta$ -kazeiny (1,9). W przeprowadzonych eksperymentach, z płodów uzyskanych w wyniku krycia nietransgenicznych macierek zmodyfikowanym genetycznie kozłem-założycielem transgenicznego rodu zwierząt, z ukierunkowaną na gruczoł mlekowy aktywnością transkrypcyjną genu ludzkiej antytrombiny III, wyprowadzono linie transformowanych genetycznie komórek fibroblastycznych. Linie klonalne tych komórek posłużyły jako źródło dawców jąder w procedurze klonowania somatycznego, któ-



rej efektem było wyprodukowanie łącznie 8 transgenicznych maciorek (1,9). Kolejnym przykładem wykorzystania techniki klonowania somatycznego do powielania populacji osobników transgenicznych są wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Cheng'a i wsp. (4). W tym przypadku do rekonstrukcji enukleowanych oocytów użyto hodowane *in vitro* komórki linii klonalnych, wyprowadzonych z transgenicznej kozy będącej nosicielem ogólnoustrojowej ekspresji genu rekombinowanej ludzkiej erytropoetyny (rhEPO). Po przeszczepieniu sklonowanych zarodków do dróg rodnych pseudociężarnych maciorek-biorczyń, urodziły się 2 zmodyfikowane genetycznie koźłeta, z potwierdzonym molekularnie oraz fenotypowo wysokim profilem aktywności transkrypcyjnej transgenu kodującego ksenogeniczne białko rhEPO.

Chociaż efektywność klonowania somatycznego kóz mierzona odsetkiem urodzonych koźląt jest wciąż stosunkowo niska i z reguły nie przekracza średnio 10% w stosunku do liczby zarodków transplantowanych do dróg rodnych maciorek-biorczyń oraz 5% w stosunku do liczby zrekonstruowanych oocytów, to problematyka związana z tą techniką wspomaganego rozrodu zwierząt wzbudza ciągle rosnące zainteresowanie jako metodą alternatywną do standardowej techniki mikroiniekcji transgenów. Wydajność tej ostatniej bowiem wyraża się bardzo niskim stopniem prawidłowej integracji obcych genów w genomie urodzonych maciorek-założycielek linii transgenicznych (średnio 1,7% w stosunku do liczby zygot przeszczepianych do matek zastępczych; [10,11]). Natomiast technologia transplantacji jąder transfekowanych *in vitro* komórek somatycznych zwiększa istotnie prawdopodobieństwo uzyskiwania niemozaikowego potomstwa transgenicznego, posiadającego wbudowany egzogenny konstrukt genowy również w linii pierwotnych komórek płciowych. Takie niechimerowe pod względem transformacji genetycznej komórki gametogeniczne i somatyczne osobniki zachowują pełną zdolność do przekazywania fenotypowo i molekularnie zdiagnozowanej ekspresji transgenu na komórki gruczołu mlekowego kolejnej generacji urodzonych koźląt. Doskonałym tego przykładem mogą być wyniki badań Baguisi'ego i wsp. (1). Detekcja wysokiego poziomu ekspresji genu kodującego rekombinowaną ludzką antytrombinę III w komórkach wymion trzech maciorek klonalnych uzyskanych z zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów transgenicznych płodów wyrażała się również w postaci niezwykle wysokiej fenotypowej wartości tej zmodyfikowanej genetycznie cechy w pobranych próbkach mleka. W okresie 33 dni zainicjowanej już w wieku 2 miesięcy laktacji wydajność mleczna tych maciorek osiągnęła wartość około 160 mL, a koncentracja ludzkiej antytrombiny III w pobranym mleku wyniosła aż 5,8 g/L (20,5 U/mL aktywności enzymatycznej oczyszczonego biopreparatu) w 5 dniu oraz 3,7 g/L (14,6 U/mL aktywności) w 9 dniu laktacji. Przy tak dużym poziomie stężenia rekombinowanych białek terapeutycznych w mleku, wielkostadne fermi transgenicznych kóz mogą dostarczyć nawet do 300 kg wyekstrahowanego (puryfikowanego) produktu biofarmaceutycznego w skali całego roku (12). Sprzężenie technologii klonowania somatycznego z hormonalną indukcją wczesnej laktacji u niedojrzałych płciowo maciorek transgenicznych umożliwi znaczne skrócenie czasu uzyskiwania pro-



duktu ekspresji transgenu, nawet do 8-9 miesięcy od momentu transfekcji linii komórkowych do momentu jego sekrecji w mleku (1,13). Objętość pozyskiwanych w ten sposób próbek mleka jest nie tylko wystarczająca do prawidłowego oszacowania wielkości produkcji rekombinowanych białek, ale nawet przy stosunkowo niskim poziomie ekspresji transgenu, wyrażanym w mg/mL mleka pozwala na wielokrotne przeprowadzanie klinicznych testów aktywności hormonalnej lub enzymatycznej wytwarzanych biopreparatów.

### 3. Techniczne i molekularne aspekty klonowania somatycznego kóz

#### 3.1. Fenotyp komórek somatycznych-dawców jąder

Fenotyp oraz stadium cyklu komórkowego komórek somatycznych są czynnikami, które w dużym stopniu, wpływają na efektywność klonowania kóz. U kóz, stosunkowo niewiele typów komórek-dawców jąder poddano testom, w kierunku największej przydatności pod kątem uzyskiwania somatycznych klonów. Do roku 2000 niewiele też było wiadomo o charakterze procesów epigenetycznego przemodelowania i przeprogramowania somatycznego genomu jądrowego oraz mitochondrialnego w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów, a następnie po aktywacji w blastomerach przedimplantacyjnych zarodków klonalnych kozy. W badaniach nad klonowaniem somatycznym kóz przetestowano w ciągu ostatnich kilku lat, jako dawców jąder, komórki pochodzące z kilku rodzajów tkanek pobranych zarówno od płodów, jak i od zwierząt dorosłych obojga płci będących w różnym wieku. Do chwili obecnej uzyskano łącznie 52 sklonowane koźlęta po transplantacji jąder hodowanych *in vitro* (transgenicznych lub nietransgenicznych): płodowych komórek fibroblastycznych (1,3,6-9,13,14), fibroblastów tkanki skórnej dojrzałych osobników (2,4), komórek ściennej warstwy ziarnistej antralnych pęcherzyków jajnikowych (4,7,13-15), oraz komórek wzgórka jajonośnego (7,14,16). Na szczególną uwagę zasługuje fakt wykorzystania komórek endokrynnych przedniego płata (części gruczołowej) przysadki mózgowej dojrzałych płciowo osobników płci męskiej, czyli pituicytów, jako źródła dawców jąder, w procedurze klonowania somatycznego kóz (17). Ten szczególny typ komórek sekrecyjnych, syntetyzujących tzw. hormony tropowe, dotychczas nie był stosowany w technice transplantacji jąder somatycznych u innych gatunków zwierząt gospodarskich i laboratoryjnych. Postuluje się jednak, że sztuczna (egzogenna) kontrola aktywności metabolicznej oraz sekrecyjnej systemu endokrynnego wszystkich płatów przysadki mózgowej u zwierząt gospodarskich mogłaby być możliwa do uzyskania poprzez genetyczną modyfikację (transfekcję) pituicytów na poziomie hodowli *in vitro*. Z kolei, wykorzystanie transformowanych genetycznie komórek gruczołowych przysadki mózgowej, wykazujących indukowaną ekspresję rekombinowanych ludzkich białek/polipeptydów hormonalnych, do uzyskiwania ssaków techniką



klonowania somatycznego, otwiera zupełnie nowe możliwości aplikacyjne do produkcji transgenicznych bioreaktorów zwierzęcych, dostarczających w ekstraktach (homogenatach) cytozolowych komórek pituicytarnych lub w osoczu krwi obcogatunkowe hormony tropowe, niezbędne w terapii wielu chorób monogenowych człowieka, wywołujących wrodzone wady rozwojowe o podłożu endokrynologicznym. W rezultacie transplantacji zarodków, rekonstruowanych z jąder komórkowych pituicytów, do dróg rodnych hormonalnie zsynchronizowanych matek zastępczych, urodził się koziołek klonalny. Na podstawie wyników tych eksperymentów potwierdza się, że w sklonowanych zarodkach przedimplantacyjnych kozy możliwe jest pełne epigenetyczne przemodelowanie i przeprogramowanie genomu jądrowego oraz mitochondrialnego nawet tak bardzo zróżnicowanych komórek somatycznych jak pituicyty. Szczególnie duża aktywność metaboliczna komórek części gruczołowej przysadki mózgowej jest związana z intensywną syntezą i sekrecją hormonów tropowych przez pituicyty, co skorelowane jest z bardzo szerokim i wysoce tkankospecyficznym profilem ekspresji genów. Z kolei zwiększenie natężenia aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek endokrynnych przedniego płata przysadki zależy w dużym stopniu od obniżenia częstotliwości epigenetycznych modyfikacji, obejmujących zarówno demetylację reszt cytozyny w obrębie paliandromowych sekwencji nukleotydowych DNA jak i hiperacetylację histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. Wydaje się, że spadek supresji transkrypcyjnej regionów eksonowych wielu komórkospecyficznych genów DNA genomowego pituicytów, jak i zmniejszenie stopnia represji nukleosomowej chromatyny jądrowej powinny ułatwić proces epigenetycznej rearanżacji wzorca metylacji wysepek/dinukleotydów CpG (5'-cytydino-3'-monofosforilo-5'-ganozyny-3') oraz acetylacji i metylacji reszt lizyny białek histonowych (H4 oraz H3) do epigenetycznego statusu DNA jądrowego totipotencyjnych komórek zarodkowych pochodzenia klonalnego. Jednakże, niewłaściwy schemat przeprogramowania epigenetycznego dziedziczenia oraz nieprawidłowe usunięcie (tzw. wymazanie/wyzerowanie) somatycznego piętna genomowego (imprintingu gametycznego), warunkującego ekspresję uniparentalną genów kodujących podstawowe dla wczesnego rozwoju ontogenetycznego białka, jakie miały miejsce w blastomerach przedimplantacyjnych zarodków kozich, doprowadziły do wystąpienia zaawansowanych subletalnych defektów anatomiczno-histologicznych, które ujawniły się dopiero w okresie postnatalnym u koziołka klonalnego. Na skutek tych wad rozwojowych osobnik ten padł w szesnastym dniu po urodzeniu (17).

Na obecnym etapie badań nie wiadomo jednak, czy różnice w kompetencjach rozwojowych cybrydowych zygot klonalnych kozy rekonstruowanych techniką transplantacji jąder różnych typów komórek somatycznych do enukleowanych oocytów wynikają z różnej podatności ich genomu jądrowego oraz mitochondrialnego na epigenetyczne przemodelowanie i przeprogramowanie w blastomerach przedimplantacyjnych zarodków, czy też odgrywają tu rolę jakieś inne czynniki, takie jak np. techniczne niedoskonałości stosowanych obecnie metod enukleacji, rekonstrukcji, a także sztucznej aktywacji oocytów kozich.



### 3.2. Synchronizacja faz cyklu mitotycznego komórek-dawców jąder

Z przeprowadzonych badań nad klonowaniem somatycznym kóz wynika, że do rekonstrukcji enukleowanych oocytów wykorzystuje się najczęściej jądra komórek-dawców, których cykl mitotyczny został zsynchronizowany sztucznie (z udziałem czynników egzogennych) lub fizjologicznie w fazach G1/G0, G1, lub G2/M. Jednym z najczęściej stosowanych systemów koordynacji faz cyklu podziałowego hodowanych *in vitro* komórek somatycznych kóz jest deprywacja troficzna, czyli głodzenie subkonfluentnych populacji fibroblastów płodowych, fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników lub komórek ściennej warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych. Długość okresu hodowli linii klonalnych komórek-dawców jąder w restrykcyjnych warunkach troficznych (w pożywce o zredukowanym z 10 do 0,5% stężeniu surowicy płodów bydłych/FBS; ang. *fetal bovine serum*) wynosi od 3 do 8 dni (3,6-9, 14,18). W doświadczeniach Zou i wsp. (16), do transplantacji egzogennych jąder somatycznych wykorzystywano komórki wzgórka jajonośnego, pochodzące z aktywnie dzielących się (subkonfluentnych) linii klonalnych, hodowanych *in vitro* w pożywce o pełnym składzie jakościowym i ilościowym polipeptydowych czynników wzrostowych, mitogennych oraz troficznych (10% FBS). Z kolei, w drugiej grupie eksperymentów przeprowadzonych przez Zou i wsp. (16), enukleowane oocyty rekonstruowano z jąder nie poddawanych hodowli *in vitro* komórek wzgórka jajonośnego, które były wyizolowane z ekspandujących (zmucyfikowanych) kompleksów komórek pęcherzykowych, otaczających dojrzałe oocyty w stadium metafazy II podziału mejotycznego. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że ponad 90% subpopulacji komórek pęcherzykowych pochodzących z dojrzałych *in vivo* lub *in vitro* kompleksów *cumulus oophorus-corona radiata*-oocyt znajduje się w fazie G0/G1 cyklu mitotycznego (19-21).

Innym źródłem komórek-dawców jąder w procedurze klonowania somatycznego kóz były hodowane *in vitro* (transfekowane) fibroblasty płodowe, w których koordynacja faz cyklu podziałowego w stadium G2/M była indukowana chemicznie poprzez ich długotrwałą (17-godziną) inkubację w pożywce z dodatkiem inhibitora polimerizacji mikrotubuli wrzeczona kariokinetycznego – nokodazolu (6). Synchroniczna indukcja fazy G2/M, inicjowana za pośrednictwem odwracalnego blokera anafazowej segregacji chromosomów skonfigurowanych w płytkę metafazową wrzeczona mitotycznego, spowodowała wzrost odsetka komórek somatycznych, których cykl podziałowy został przejściowo zahamowany na granicy tych dwóch stadiów (ok. 40%) w porównaniu do udziału komórek w fazach G2/M w subkonfluentnych populacjach komórek o wysokiej aktywności proliferacyjnej (ok. 20%). Ponadto, w przeprowadzonej analizie cytometrycznej rozkładu faz cyklu mitotycznego w transgenicznym liniach komórek fibroblastycznych, poddawanych 3-dniowej deprywacji troficznej lub inhibicji kontaktowej migracji i proliferacyjnego wzrostu w warunkach pełnej konfluencji nie wykazano różnic w odsetku subpopulacji komórek, których cykl podziałowy był zsynchronizowany w fazach G0/G1 (odpowiednio, 75% vs. 72%



komórek; [6]). Z kolei, Behboodi i wsp. (2) zastosowali unikatowy system dwustopniowej (sekwencyjnej) koordynacji faz cyklu mitotycznego komórek, najpierw na granicy stadiów G1/G0, a następnie G0/G1. Pierwszy etap tej metody obejmował 4-dniowe głodzenie fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników transgeniczných w pożywce o ograniczonej do 0,5% koncentracji FBS, w celu inicjacji synchronicznej indukcji stadium G0. Natomiast, w drugim etapie, 3-10-godzinna stymulacja troficzna komórek mitogenami pochodzącymi z surowicy płodów bydłych o podwyższonym do 10% stężeniu, spowodowała odblokowanie/wznowienie ich cyklu mitotycznego, zahamowanego w tzw. fazie uśpienia (represji metabolicznej i transkrypcyjnej; ang. *quiescence state*) oraz skoordynowaną progresję cyklu do stadium G1 okresu interfazowego.

Z cytometrycznych analiz cyklu komórkowego fibroblastów pochodzenia skórnego poddawanych 4-dniowej hodowli *in vitro* w restrykcyjnych warunkach troficznych, a następnie mitogennej oraz energetycznej stymulacji aktywności proliferacyjnej i metabolicznej wynika, że 94% subpopulacji komórek znajdowało się w stadium G0/G1, 1,5% komórek – w fazie S, a 4% – w stadiach G2/M cyklu mitotycznego (2). Udział frakcji komórek w fazach G0/G1 oraz innych stadiach cyklu podziałowego w całkowitej puli komórek analizowanych populacji nie ulegał istotnym zmianom w zależności od zmiany funkcji czasu, a zatem wydłużania okresu hiperaktywacji troficznej (od 0 do 10 godzin). Ponadto, rozkład faz cyklu mitotycznego subkonfluentnych linii komórek fibroblastycznych kóz o wysokiej aktywności podziałowej nie różnił się istotnie w porównaniu do głodzonych linii klonalnych komórek (odpowiednio, 89% komórek w stadiach G0/G1, 4% – w fazie S, oraz 6,5% – w stadiach G2/M). Ponieważ fluorescencyjna diagnostyka cyklu komórkowego przy wykorzystaniu cytometru przepływowego nie pozwala na odróżnienie subpopulacji komórek w stadium G1 od frakcji komórek o zahamowanej aktywności kariokinetycznej i transkrypcyjnej (w fazie G0), niezbędne było zastosowanie analiz molekularnych (*Northern blotting*) do oszacowania względnej koncentracji cząsteczek informacyjnego RNA (mRNA) cykliny D1, którego ekspresja (aktywność translacyjna) jest charakterystyczna dla fazy G1, a represja – dla stanu spoczynkowego (stadium G0). Określenie relatywnego poziomu stężenia transkryptów cykliny D1 za pośrednictwem analizy *Northern blotting* przy jednoczesnym (komplementarnym) zastosowaniu metod cytometrii przepływowej umożliwiło dopiero diagnostykę różnicową (segregację) subpopulacji komórek w fazie G1 oraz w fazie G0 (2,22).

Cykliny typu D ( $D_{1-3}$ ) stanowią ważne ogniwo regulacji cyklu komórkowego w okresie interfazowym. Stymulacja troficzna głodzonych, subkonfluentnych linii klonalnych komórek somatycznych indukuje wznowienie podziałów mitotycznych poprzez zahamowanie supresji transkrypcyjnej i wzrost tempa metabolizmu komórek w fazie G0 i ponowne rozpoczęcie fazy G1, której towarzyszy inicjacja biosyntezy cyklin klasy D oraz cykliny E. Białka te wiążą się preferencyjnie z cząsteczkami kinaz cyklicznych, odpowiednio CDK 4, CDK 6 oraz CDK 2 (ang. *cyclin-dependent kinases 4, 6 and 2*) w heterodimeryczne kompleksy holoenzymatyczne, złożone z podjed-



nostek regulatorowych oraz podjednostek katalitycznych (23-25). Ich aktywność jest z kolei wymagana do formowania i funkcjonowania tzw. czynników prereplikacyjnych, np. czynnika zezwalającego na replikację DNA (RLF, ang. *replication licensing factor*), a także czynników inicjujących fazę S (SPF, ang. *S-phase promoting factor*). Dlatego też wykazano, że poziom syntezy cyklin typu D jest ważnym cytobiochemicznym wskaźnikiem limitującym wejście aktywnie proliferujących komórek w fazę S, a tym samym krytycznym elementem czynnej regulacji interfazowych punktów kontrolnych/restrykcyjnych cyklu mitotycznego. Stąd wynika bezpośrednio fakt, że aktywność kinaz związanych kowalencyjnie z cząsteczkami cykliny D1 nie jest wykrywana w cytoplazmie komórek, których cykl mitotyczny nie osiągnął jeszcze środkowej fazy stadium G1 okresu międzypodziałowego (23,25). Funkcja regulatorowa cykliny D1 w aktywności katalitycznej serynowo-treoninowych kinaz CDK4/6 jest uruchamiana dopiero po przekroczeniu krytycznego centralnego punktu stadium G1, a następnie wzrasta stopniowo w miarę progresji cyklu komórkowego ze środkowej do późnej fazy G1, osiągając maksimum w momencie przejścia okresu interfazowego ze stadium G1 do stadium półzachowawczej (semikonserwatywnej) autoreplikacji DNA. Dlatego też, indukcja ekspresji transkryptów cykliny D1 poprzedza proces nabywania przez białkowe produkty tego systemu translacji mRNA cech wysokiego powinowactwa oraz zdolności tworzenia kompleksów enzymatycznych z kinazami grupy CDK 4/6 w przedziale czasowym przypadającym na okres od środkowej do późnej fazy G1. Natomiast detekcja aktywności katalitycznej heterodimerów białkowych złożonych z cyklin D/E oraz kinaz cyklino-zależnych 4/6/2 nie jest cytofizjologicznym wyznacznikiem przejścia cyklu komórkowego z fazy G0 do G1, lecz funkcjonalnym indykatorem środkowego i późnego stadium fazy G1 oraz progresji okresu międzypodziałowego do punktu granicznego stadiów G1/S (24,25).

W celu uzyskania stosunkowo homogenicznej subpopulacji fibroblastów o zwiększonym do maksimum udziale komórek w fazie G1 cyklu mitotycznego, niezbędne było wydłużenie okresu stymulacji mitogenno-energetycznej komórek uprzednio poddawanych głodzeniu do około 10 godzin. Wysoki stopień sekwencyjnej synchronizacji faz cyklu komórkowego transgenicznych fibroblastów pochodzenia skórniego w stadium G1 został potwierdzony przez zdiagnozowanie techniką *Northern blotting* znacznej koncentracji cząsteczek mRNA cykliny D1 w komórkach 10-godzinie inkubowanych w obecności 10% FBS w porównaniu do znikomego (śladowego) stężenia transkryptów cykliny D1 w cytoplazmie fibroblastów hodowanych 4 dni w restrykcyjnych warunkach troficznych przed zainicjowaniem hiperstymulacji odżywczej przez zwiększenie poziomu surowicy. Przypuszcza się, że detekcja jedynie niewielkiego profilu ekspresji cząsteczek mRNA cykliny D1 w komórkach głodzonych linii klonalnych może wynikać z niskiego stopnia heterogeniczności analizowanych fibroblastów, związanego z obecnością małego odsetka komórek we wczesnej fazie S (autoreplikacji DNA), w których jeszcze nie doszło do całkowitej biodegradacji (nukleolizy) transkryptów cykliny D1 i/lub niewielkiego udziału frakcji komórek w fazie G1 cyklu mitotycznego (2,22).



Z kolei, w przeciwieństwie do fibroblastów poddawanych deprywacji troficznej, komórki subkonfluentnych (nie głodzonych), aktywnie dzielących się populacji, posiadały podobnie jak komórki stymulowane kariokinetycznie po okresie kilkudniowej hodowli *in vitro* w obecności 0,5% FBS, bardzo wysoki poziom ekspresji transkryptów cykliny D1 w cytoplazmie. Na podstawie wyników uzyskanych z przeprowadzonej analizy *Northern blotting* wskazuje się jednoznacznie, że inicjacja aktywności transkrypcyjnej genów kodujących cyklinę D1 ma miejsce przed osiągnięciem środkowej fazy stadium G1 przez komórki poddawane mitogennie wspomaganą inhibicji represji migracji i proliferacyjnego wzrostu po okresie przejściowego głodzenia, które indukuje wyciszenie (ang. *silencing*) ekspresji genomu jądrowego. Spowodowane wznowieniem, odwracalnie zablokowanego w stadium G0 cyklu mitotycznego, wejście głodzonych komórek w fazę G1 (presyntetyczną) następowało w ciągu 5 godzin od zapoczątkowania stymulacji hipertroficznej komórek, co potwierdzał stopniowy (powolny) przyrost koncentracji mRNA cykliny D1, który ulega translacji po przejściu okresu międzypodziałowego z fazy uśpiania (stanu spoczynkowego) do fazy G1. Poziom stężenia, a tym samym profil ekspresji (aktywności translacyjnej) transkryptów cykliny D1 w cytozolu, znacznie wzrastał między 5 a 10 godziną od momentu indukcji mitogennie wspomaganą stymulacji tempa migracji oraz częstotliwości proliferacji komórek. Zgodnie z interpretacją opisanych wyników analizy *Northern blotting* głodzonych, a następnie stymulowanych troficznie fibroblastów można stwierdzić, że przeważająca większość zdiagnozowanej (odsortowanej) cytometrycznie subpopulacji komórek w fazach G0/G1 posiada cykl mitotyczny faktycznie zsynchronizowany w początkowym stadium fazy G1, czyli niemal zaraz po przekroczeniu przez okres interfazowy punktu granicznego między stanem represji metabolicznej i transkrypcyjnej (G0) a stadium presyntetycznym (G1; [2,22,24]).

Kolejnym efektywnym sposobem synchronizacji faz cyklu mitotycznego hodowanych *in vitro* komórek somatycznych, stosowanym na potrzeby klonowania kóz, jest tzw. synergistyczne zahamowanie (czyli współinhibicja) proliferacyjnego wzrostu subkonfluentnych populacji komórek w stadium G0/G1 za pośrednictwem ich sekwencyjnej (dwustopniowej) inkubacji w pożywce o drastycznie obniżonej koncentracji surowicy płodów bydłych, a następnie w pożywce o pełnym składzie mitogenów i czynników troficznych, lecz uzupełnionej dodatkiem olomucyny (26). Olomucyna jest biosyntetycznym analogiem puryny, który posiada zdolność niespecyficznego blokowania aktywności enzymatycznej kinaz cyklino-zależnych (CDKs) poprzez, wynikające z właściwości hamowania współzawodniczego (inhibicji kompetycyjnej), silne powinowactwo do kinaz cyklin klasy/typu A, B oraz E. W badaniach *in vitro* wykazano bowiem, że skuteczność przejściowego hamowania przez olomucynę aktywności biokatalitycznej heterodimerycznych kompleksów białkowych CDK1/cyklina B, p33CDK2/cyklina A oraz p33CDK2/cyklina E utrzymuje się na podobnym poziomie. Dlatego też, cykl mitotyczny aktywnie dzielących się komórek somatycznych, inkubowanych w obecności olomucyny, może być odwracalnie zatrzymany albo na granicy faz G1/S, bądź G2/M, w zależności od stopnia progresji wzrostu



proliferacyjnego, wynikającego również ze stosunku procentowego komórek znajdujących się w okresie interfazowym do komórek w okresie podziałowym cyklu komórkowego (27,28). W badaniach przeprowadzonych przez Yu i wsp. (26), kombinacja 2-dniowej deprywacji troficzej (głodzenia) fibroblastów tkanki skórnej ucha i ich 9-godzinnej inkubacji w pożywce z dodatkiem 100  $\mu\text{M/L}$  olomucyny doprowadziła do koordynacji faz cyklu mitotycznego w stanie spoczynkowym (G0) oraz w stadium presyntetycznym (G1) w 85,5% hodowanych *in vitro* komórek. Jednocześnie zastosowana metoda synchronizacji cyklu podziałowego fibroblastów pochodzenia skórniego nie powodowała istotnego wzrostu subpopulacji komórek apoptotycznych. Odsetek komórek wykazujących morfologiczne i biochemiczne symptomy śmierci apoptotycznej okazał się bowiem stosunkowo niski (około 4% analizowanych fibroblastów).

### 3.3. Źródło komórek-biorców egzogennych jąder somatycznych

W procedurze klonowania somatycznego kóz, biorcą egzogennych jąder komórkowych są zarówno dojrzałe *in vivo* (owulowane) oocyty pozyskiwane z jajowodów stymulowanych hormonalnie samic-dawczyń (1,2), jak i oocyty osiągające dojrzałość jądro-cytoplazmatyczną, a także epigenomową w warunkach hodowli *in vitro* (3,9,14,17).

W badaniach Baguisi'ego i wsp. (1), którzy jako pierwsi uzyskali sklonowane koźleta, do doświadczeń użyte były oocyty dojrzałe *in vivo* (postowulacyjne). Jednakże, tylko w jednej z grup eksperymentalnych, do zabiegu klonowania wykorzystane były oocyty z całkowicie wyrzuconym do przestrzeni okołoołtkowej ciałkiem kierunkowym I rzędu, których cykl mejotyczny został zablokowany w stadium Metafazy II (Met II). Strukturalno-funkcyjnym wyznacznikiem dojrzałości jądrowej oocytów w stadium Met II jest stopień zaawansowania procesu wyrzucenia I ciałka kierunkowego do przestrzeni okołoołtkowej. Proces wyrzucenia polocyту I rzędu pod osłonkę przejrzystą jest efektem tzw. szczątkowej/poronnej lub biegunowej cytokinezy oocytu, która prowadzi do powstania obłonionej struktury komórkowej, zawierającej poronne wrzeciono kariokinetyczne oraz perikarion, czyli cienką warstwę ściśle przylegającej do zespołu silnie skondensowanych chromosomów tzw. resztkowej cytoplazmy oocytu. W kolejnych doświadczeniach, Baguisi i wsp. (1) wykorzystali oocyty dojrzałe *in vivo*, poddane sztucznej aktywacji (protokół preaktywacji) w warunkach 2-4-godzinnej inkubacji w niezdefiniowanej chemicznie pożywce hodowlanej o wysokiej sile jonowej, która była generowana dodatkiem kationów wapnia. W procedurze enukleacji i transplantacji jąder komórek somatycznych (protokół jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej) użyte były zatem oocyty, które wznowiły proces mejozy i osiągnęły stadium telofazy II, czego kryterium morfologicznym była obecność częściowo odcinającego się z podbłonowej strefy korykalnej cytoplazmy polocyту II rzędu. Natomiast, jeśli proces wyrzucania II ciałka kie-



runkowego nie został zainicjowany kilkugodzinną hodowlą *in vitro* oocytów w pożywce wzbogaconej jonami  $\text{Ca}^{2+}$ , preaktywacja oocytów Met II była indukowana w wyniku ich 5-minutowej inkubacji w tej samej pożywce, lecz uzupełnionej dodatkowo 7% etanolem. Kolejnym etapem tej sekwencyjnej (kilkustopniowej) egzogennej prestymulacji komórek-biorców jąder była 3-godzinna hodowla oocytów w wolnym od alkoholu etylowego medium, w celu progresji podziału wyrównawczego (ekwacyjnego) cyklu mejotycznego z punktu kontrolnego towarzyszącego anafazowej segregacji chromatyd siostrzanych aż do inicjacji tzw. biegunowej (szczątkowej/poronnej) cytokinezy. W następstwie tego ostatniego procesu, będącego zarazem weryfikacją efektywności sztucznej aktywacji oocyty widoczny był w mikroskopie odwróconym zarys częściowo/półowicznie odcinającego się polocyty II rzędu, zawierającego poronne wrzeciono kariokinetyczne. Efektem tych doświadczeń było uzyskanie jednego sklonowanego koźlęcia z zarodka zrekonstruowanego z użyciem cytoplastu pochodzącego z nieaktywowanego oocyty w stadium metafazy II podziału mejotycznego oraz dwóch koźląt z oocytów preaktywowanych w wyniku kilkugodzinnej inkubacji w pożywce o wysokiej energii jonizacji spowodowanej obecnością kationów wapniowych (1).

Drugim źródłem komórek-biorców egzogennych jąder somatycznych w klonowaniu kóz, powszechnie stosowanym także u innych gatunków ssaków, są oocyty dojrzałe *in vitro*. Do dojrzewania mejotycznego oocyty pozyskiwane są z jajników stymulowanych lub niestymulowanych hormonalnie samic-dawczyń, przy wykorzystaniu metod poubojowych, lub niechirurgicznej techniki przyżyciowej LOPU (wspomaganej laparoskopowo metody aspiracji płynu pęcherzykowego z antralnych pęcherzyków jajnikowych, dokonywanej przez powłoki brzuszne; ang. *laparoscopic ovum pick-up* [7-9,14,18]), umożliwiającej wielokrotne pozyskiwanie oocytów od jednej kozy-dawczyni. Szeroka zatem dostępność tego materiału biologicznego, a także wysoka skuteczność technologii pozaustrojowego dojrzewania mejotycznego (właściwy skład ilościowy i jakościowy stosowanych pożywek oraz zoptymalizowane warunki hodowli *in vitro*) decydują o tym, że jest to szczególnie atrakcyjne źródło oocytów-biorców wykorzystywanych na potrzeby klonowania somatycznego.

### 3.4. Typy rekonstrukcji enukleowanych oocytów

Rekonstrukcja oocytów polega na zastąpieniu ich własnego genomu jądrowego (chromosomów metafazowych), genomowym DNA komórki somatycznej. U kóz, podobnie jak u innych gatunków ssaków, rekonstrukcja przeprowadzana jest najczęściej na drodze fuzji cytoplastu (wyjądrzonego oocyty) z komórką somatyczną (1,7-9,14), a czynnikiem indukującym fuzję są impulsy elektryczne (elektrofuzja). Alternatywna metoda rekonstrukcji, oparta na dooplazmatycznej mikroiniekcji karioplastu komórki somatycznej (piezoelektrycznej lub manualnej) stosowana była dotychczas jedynie przez Zou i wsp. (16), a także Skrzyszowską i wsp. (dane nie



opublikowane). W obu przypadkach dawcą jąder były komórki pęcherzykowe pochodzące z ekspandujących (zmucyfikowanych) warstw komórek wzgórka jajonośnego, otaczających dojrzałe oocyty kozy. Technika rekonstrukcji enukleowanych oocytów może w dużym stopniu wpływać na molekularne mechanizmy rearanżacji chromatyny jądrowej, obejmujące zarówno epigenetyczne przemodelowanie i prze-programowanie genomu jądrowego oraz mitochondrialnego, jak i funkcjonalne interakcje między jądrowym a cytoplazmatycznym (pozajądrowym) systemem ekspresji genów oraz syntezy białek.

### 3.5. Rodzaje czynników indukujących sztuczną aktywację rekonstruowanych oocytów

W klonowaniu somatycznym kóz stosowane są trzy następujące układy doświadczalne dotyczące odstępów czasowych między rekonstrukcją enukleowanych oocytów a sztuczną aktywacją rekonstruowanych hybryd jądrowo-ooplazmatycznych: 1) jądra komórek w fazach G1/G0 wprowadza się do enukleowanych, preaktywowanych oocytów w stadium telofazy II podziału mejotycznego i równocześnie aktywuje się uzyskane cybrydy klonalne (protokół jednoczesnej fuzji/aktywacji elektrycznej; [1]); 2) jądra komórek somatycznych w fazach G1/G0 cyklu mitotycznego transplantuje się do enukleowanych, nieaktywowanych oocytów w stadium metafazy II podziału mejotycznego (Met II) i jednocześnie aktywuje się rekonstruowane hybrydy cytoplazmatyczne (protokół jednoczesnej fuzji/aktywacji elektrycznej; [1,4] lub protokół jednoczesnej elektrofuzji i aktywacji fizykochemicznej; [2,29, Skrzyżowska i wsp., dane nie opublikowane]); lub też 3) wprowadza się jądra komórek zsynchronizowanych w stadiach G1, G1/G0 albo G2/M do ooplastów Met II, które aktywowane są od 1 do 2-3 godzin po transplantacji jąder somatycznych (protokół dwustopniowej postaktywacji chemicznej; [3,7-9,14,18,29]).

Procedura sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów, jak się wydaje, jest jednym z czynników, które w dużym stopniu decydują o pre- i postimplantacyjnych kompetencjach rozwojowych kozich zarodków klonalnych. W technologii klonowania somatycznego kóz najczęściej stosowanymi bodźcami aktywującymi są czynniki fizyczne, takie jak impulsy prądu stałego (1,2), albo czynniki chemiczne, takie jak 7% alkohol etylowy (1,18,29) lub antybiotyki jonoforowe, np. jonomycyna wapnia (3,7-9,14,18,30). Prowadzone obecnie intensywne badania nad udoskonaleniem metod sztucznej aktywacji kozich cybryd klonalnych polegają głównie na optymalizacji parametrów technicznych pola elektrycznego (natężenie pola elektrostatycznego, czas trwania impulsów elektrycznych, liczba impulsów i odstęp czasowy między nimi; [1,2]) lub też, coraz częściej, na łączeniu bodźca aktywującego (najczęściej jonomycyny; [3,9,14], rzadziej impulsów elektrycznych lub etanolu; [1,2,18]) ze związkami odwracalnie blokującymi aktywność cyklino-zależnych kinaz białkowych (niespecyficznymi inhibitorami kompetycyjnymi CDKs; ang. *cyclin-dependent protein*



kinases), takimi jak 6-dimetyloaminopuryna (6-DMAP; [2,3, 9,14,18,30]), czy związkami bezpośrednio hamującymi anafazową resyntezę cykliny B, będącej podjednostką regulatorową czynnika dojrzewania mejotycznego (MPF, ang. *maturation/meiosis/M-phase promoting factor*), np. cykloheksymidem (CHXM, [7,8,29]) i/lub inhibitorami polimeryzacji mikrofilamentów aktynowych cytoszkieletu, np. cytochalazyną B (CB, [1,7,8,14,18,30]).

### 3.6. Hodowla *in vitro* oraz transplantacja zarodków klonalnych do pseudo-ciężarnych maciorek-biorczyń

Z dotychczasowych badań wynika, że zarodki kozie uzyskiwane techniką klonowania somatycznego poddawane są różnym systemom hodowli *in vitro*. Najczęściej stosowaną metodą pozaustrojowej hodowli cybrydowych zygot klonalnych jest krótkotrwała (od 12 do 48 godzin) inkubacja zarodków w 25-, 35- lub 50-μlitrowych kroplach pożywek o różnym składzie jakościowym i ilościowym takich jak: 1) TC-199 (ang. *Tissue Culture Medium-199*) z dodatkiem 10% surowicy płodów bydłych (FBS; [1,2]); 2) G1.2 uzupełniona 8 mg/mL albuminy surowicy bydłej (BSA, ang. *bovine serum albumin*; [3,7-9,14]); 3) syntetyczny płyn jajowodowy (SOFaa, ang. *synthetic oviductal fluid*) o zmodyfikowanym składzie ilościowym/sile jonowej (o niskiej zawartości anionów ortofosforanowych  $PO_4^{3-}/HPO_4^{2-}$ ; [3]), często uzupełniany 10% FBS (30); oraz 4) pożywka B2 (ang. *Upgraded B2 INRA Medium*; [18,29-31]). Obok metod krótkotrwałej inkubacji stosowana jest także długotrwała (9-dniowa) hodowla kozich zarodków klonalnych do stadium blastocysty, w chemicznie zdefiniowanych pożywkach (17). Powszechnie wykorzystywanym systemem hodowli *in vitro* jest również kilkudniowa (od 2 do 9 dni) współinkubacja sklonowanych zarodków kozy z komórkami nabłonka jajowodowego (1,2,29) lub z komórkami nerki pawiana zielonego (VERO, ang. *Verro cells*; [18,30]), tworzącymi warstwę odżywczą w pożywce z dodatkiem od 2,5 do 5% FBS. Alternatywnym systemem hodowli rekonstruowanych hybryd cytoplazmatycznych kozy jest ich 5-6-dniowa inkubacja w podwiązanych jajowodach hormonalnie zsynchronizowanych maciorek-biorczyń pośrednich do stadium moruli/blastocysty (2,4).

Hodowane *in vitro* lub *in vivo* kozie zarodki klonalne (w stadium 1-8 blastomerów lub moruli/blastocysty) transferowane są chirurgicznie (z zastosowaniem laparotomii) lub niechirurgicznie (laparoskopowo) do jajowodów lub rogów macicy pseudo-ciężarnych maciorek-biorczyń ostatecznych. Do dróg rodnych jednej matki zastępczej przeszczepianych jest od 4 do 15 zarodków w stadium 1-16 komórek lub od 2 do 5 zarodków w stadium kompaktnej moruli/blastocysty.



#### 4. Badania nad klonowaniem somatycznym kóz prowadzone w Instytucie Zootechniki

W Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki w Balicach prowadzone są badania nad klonowaniem somatycznym zwierząt gospodarskich, w tym również nad klonowaniem kóz. W procedurze klonowania tego gatunku, jako źródło komórek-dawców jąder, wykorzystywane są płodowe komórki fibroblastyczne jak i fibroblasty tkanki skórnej transgenicznych i nietransgenicznych osobników dorosłych, a także komórki wzgórka jajonośnego (29,31). Natomiast, biorąc egzogennych jąder komórkowych są dojrzałe *in vitro* oocyty kozie, enukleowane technikami mikrochirurgicznymi, standardową lub wspomaganą chemicznie. Technika enukleacji wspomaganej chemicznie jest obecnie preferowana z powodu ograniczenia objętości usuwanej mechanicznie wraz z chromosomami matecznymi ooplazmy, a tym samym niewielkiego stopnia inwazyjności w ultrastrukturę cytoszkieletu oocytu. Umożliwia ona bowiem precyzyjną eliminację (aspirację) wraz z ciałkiem kierunkowym I rzędu, jedynie „stożka” ooplazmatycznego, uwypuklającego się na powierzchni plazmolemy, po 1-godzinnej inkubacji oocytów w pożywce z dodatkiem kolcemidu/demekolcyny (inhibitor polimeryzacji mikrotubuli wrzeczona karyokinetycznego) oraz sacharozy (osmotycznie czynny disacharyd indukujący wzrost objętości przestrzeni okołozółtkowej). Dlatego też, wyraźnie widoczne w przestrzeni okołozółtkowej oocytu stożkowate uwypuklenie, powstałe na skutek zmian napięcia powierzchniowego błony cytoplazmatycznej, a także wzrostu mechanicznych naprężeń oraz siły motorycznej mikrofilamentów membranoszkieletu, zawiera silnie skondensowaną masę chromosomów skonfigurowanych w małą płytkę metafazową. Zmniejszenie wielkości płytki metafazowej oocytów indukowane jest w wyniku zaburzeń dynamicznej równowagi między polimeryzacją a depolimeryzacją włókien cytoszkieletu mikrotubularnego. Skrócenie długości włókien kinetochorowych i biegunowych wrzeczona mejotycznego na skutek nasilenia depolimeryzacji mikrotubuli, spowodowanej działaniem kolcemidu, ułatwia z kolei przemieszczenie (alokację) całego zespołu chromosomów do powstałego „wzgórka” cytoplazmatycznego. Na szczególną uwagę zasługuje także fakt, że metoda enukleacji mikrochirurgicznej wspomaganej chemicznie ma jeszcze jedną przewagę nad standardową eliminacją chromosomów matecznych. Nie wymaga ona bowiem fluorescencyjnej weryfikacji na skutek wzbudzenia wiązką światła ultrafioletowego (UV) biochemiluminescencji generowanej za pośrednictwem barwnika wiążącego się z usuwanym genomem jądrowym oocytów oraz poronnym wrzeczionem podziałowym ciałek kierunkowych (fluorochrom Hoechst 33342). U wielu gatunków ssaków (świnia, królik, mysz) udowodniono bowiem szkodliwy wpływ zarówno tego barwnika, jak i promieniowania UV wzbudzającego emisję fotonów z kowalencyjnych wiązań fluorochrom-DNA oocytów na przedimplantacyjne kompetencje rozwojowe oraz jakość morfologiczną zarodków klonalnych rekonstruowanych z ooplastów uzyskiwanych na drodze enukleacji mikrochirurgicznej standardowej. Rekonstrukcja wyjądrzo-



nych oocytów kozich dokonywana jest przede wszystkim na drodze elektrofuzji kompleksów cytoplasm-komórka somatyczna (gdy źródłem dawców jąder są hodowane *in vitro*/konfluentne fibroblasty płodowe lub fibroblasty tkanki skórnej dorosłych osobników), ale także metodą dooplazmatycznej iniekcji karioplastów wyizolowanych z komórek somatycznych (gdy źródłem dawców jąder są komórki wzgórka jajonośnego, pochodzące z dojrzałych *in vitro* kompleksów oocyt-corona radiata-cumulus oophorus). Rekonstruowane cybrydy klonalne po 2-godzinnej inkubacji w medium B2 poddawane są dwustopniowej aktywacji chemicznej (protokół postaktywacji) przy wykorzystaniu jonomycyny oraz 6-dimetyloaminopuryny (6-DMAP) lub cykloheksymidu (CHXM). Po krótkotrwałej (18-72 godzin) hodowli *in vitro*, zarodki klonalne przenoszone są do dróg rodnych zsynchronizowanych kóz-biorczyń.

W badaniach ultrasonograficznych maciurek-biorczyń w 40-45. dniu po transplantacji zarodków klonalnych potwierdzono postimplantacyjny rozwój zarodków klonalnych u 5 biorczyń. Jednakże, u czterech z nich stwierdzono obecność pęcherzy płodowych z objawami wczesnej resorpcji. Eksperymenty z zakresu klonowania somatycznego kóz, które mają na celu zwiększenie postimplantacyjnego potencjału rozwojowego zarodków i płodów klonalnych, są nadal intensywnie prowadzone.

## 5. Podsumowanie

Bodźcem do rozwoju badań nad klonowaniem somatycznym kóz, szczególnie w ostatnich latach, jest przede wszystkim możliwość praktycznego zastosowania tej techniki do produkcji transgenicznych kozłat przy wykorzystaniu transfekowanych *in vitro* komórek-dawców jąder oraz do multiplikacji uzyskanych już transformowanych genetycznie maciurek i kozłów, ze względu na ważne implikacje w biomedycynie, a także farmacji (1,4,7,8,14).

Praca wykonana w ramach tematu statutowego nr 3306.1.

## Literatura

1. Baguisi A., Behboodi E., Melican D. T., Pollock J. S., Destrepes M. M., Cammuso C., Williams J. L., Nims S. D., Porter C. A., Midura P., Palacios M. J., Ayres S. L., Denniston R. S., Hayes M. L., Ziomek C. A., Meade H. M., Godke R. A., Gavin W. G., Overstrom E. W., Echelard Y., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 456-461.
2. Behboodi E., Memili E., Melican D. T., Destrepes M. M., Overton S. A., Williams J. L., Flanagan P. A., Butler R. E., Liem H., Chen L. H., Meade H. M., Gavin W. G., Echelard Y., (2004), *Transgenic Res.*, 13, 215-224.
3. Keefer C. L., Baldassarre H., Keyston R., Wang B., Bhatia B., Bilodeau A. S., Zhou J. F., Leduc M., Downey B. R., Lazaris A., Karatzas C. N., (2001), *Biol. Reprod.*, 64, 849-856.



4. Cheng Y., Wang Y. G., Luo J. P., Shen Y., Yang Y. F., Ju H. M., Zou X. G., Xu S., Lao W. D., Du M., (2002), *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 18(1), 79-83.
5. Meade H. M., Echelard Y., Ziomek C. A., Young M. W., Harvey M., Cole E. S., Groet S., Smith T. E., Curling J. M., (1998), *Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals*, in: *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression*, Eds. J. M. Fernandez, J. P. Hoeffler, San Diego: Academic Press, 399-427.
6. Zou X., Wang Y., Cheng Y., Yang Y., Ju H., Tang H., Shen Y., Mu Z., Xu S., Du M., (2002), *Mol. Reprod. Dev.*, 61(2), 164-172.
7. Baldassarre H., Wang B., Kafidi N., Keefer C., Lazaris A., Karatzas C. N., (2002), *Theriogenology*, 57, 275-284.
8. Baldassarre H., Keefer C., Wang B., Lazaris A., Karatzas C. N., (2003a), *Cloning Stem Cells*, 5(4), 279-285.
9. Reggio B. C., James A. N., Green H. L., Gavin W. G., Behboodi E., Echelard Y., Godke R. A., (2001), *Biol. Reprod.*, 65, 1528-1533.
10. Ebert K. M., Schindler J. E. S., (1993), *Theriogenology*, 39, 121-135.
11. Baldassarre H., Wang B., Kafidi N., Gauthier M., Neveu N., Lapointe J., Sneek L., Leduc M., Duguay F., Zhou J. F., Lazaris A., Karatzas C. N., (2003b), *Theriogenology*, 59, 831-839.
12. Clark A. J., (1998), *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 3, 337-350.
13. Baldassarre H., Wang B., Pierson J., Neveu N., Sneek L., Lapointe J., Cote F., Kafidi N., Keefer C. L., Lazaris A., Karatzas C. N., (2004), *Cloning Stem Cells*, 6(1), 25-29.
14. Keefer C. L., Keyston R., Lazaris A., Bhatia B., Begin I., Bilodeau A. S., Zhou F. J., Kafidi N., Wang B., Baldassarre H., Karatzas C. N., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 199-203.
15. Keefer C. L., Keyston R., Bhatia B., Lazaris A., Begin I., Kafidi N., Bilodeau A., Wang B., Tao T., Laurin D., Zhou J. F., Downey B. R., Baldassarre H., Karatzas C. N., (2000), *Proceedings of the 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction – University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, July 15-18*, *Biol. Reprod.*, 62 (Suppl. 1), 192 (Abstr. 218).
16. Zou X., Cheng Y., Wang Y., Luo J., Zhang Q., Zhang X., Yang Y., Ju H., Shen Y., Lao W., Xu S., Du M., (2001), *Cloning*, 3(1), 31-37.
17. Ohkoshi K., Takahashi S., Koyama S., Akagi S., Adachi N., Furusawa T., Fujimoto J., Takeda K., Kubo M., Izaike Y., Takunaga T., (2003), *Cloning Stem Cells*, 5(2), 109-115.
18. Apimeteetumrong M., Thuangsanthia A., Leingcharoen N., Yiengvisavakul V., Harintharanon A., Kunavongkrit A., Sumretprasong J., Vignon X., Techakumphu M., (2004), *J. Vet. Med. Sci.*, 66(12), 1529-1534.
19. Schuetz, A.W., Whittingham, D.G., Snowden, R., (1996), *Reprod. Fertil. Dev.*, 8, 935–943.
20. Wakayama T., Perry A. C. F., Zuccotti M., Johnson K. R., Yanagimachi R., (1998), *Nature*, 394, 369-374.
21. Ogura A., Inoue K., Ogonuki N., Noguchi A., Takano K., Nagano R., Suzuki O., Lee J., Ishino F., Matsuda J., (2000), *Biol. Reprod.*, 62, 1579-1584.
22. Memili E., Behboodi E., Overton S. A., Kenney A. M., O'Coin M., Zahedi A., Rowitch D. H., Echelard Y., (2004), *Cloning Stem Cells*, 6(2), 58-66.
23. Matsushime H., Roussel M. F., Ashmun R. A., Sherr C. J., (1991), *Cell*, 65, 701-713.
24. Meyerson M., Harlow E., (1994), *Mol. Cell Biol.*, 14, 2077-2086.
25. Sherr C. J., Roberts J. M., (1995), *Genes Dev.*, 9, 1149-1163.
26. Yu Y. S., Sun X. S., Jiang H. N., Han Y., Zhao C. B., Tan J. H., (2003), *Theriogenology*, 59, 1277-1289.
27. Abracham R. T., Acquarone M., Andersen A., Asensi A., Belle R., Berger F., Bergounioux C., Brunn G., Buquet-Fagot C., Fagot D., Glab N., Goudcau H., Goudcau M., Guerrier P., Houghton P., Hendriks H., Kjoareg B., Lippai M., Marie D., Maro B., Meijer L., Mester L., Mulner-Lorillon O., Poulet S. A., Schierenberg E., Schutte B., Vaulot D., Verlhac M. H., (1995), *Biol. Cell*, 83, 105-120.
28. Schutte B., Nieland L., van Engeland M., Henfling M. E. R., Meijer L., Ramaekers F. C. S., (1997), *Exp. Cell Res.*, 236, 4-15.
29. Skrzyszowska M., Smoraż Z., Kańska L., Ryńska B., Kania G., Gajda B., Karetta W., Jurkiewicz J., (2001), *Materiały Konferencyjne II Zjazdu Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR)*, s. 55-56.



30. Chesné P., Perreau C., Lavergne Y., Poulin N., Baril G., Capo D., Bouttier A., Rougheol C., Cognié Y., Vignon X., Mermillod P., Heyman Y., (2003), Proceedings of the 19<sup>th</sup> Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association (A.E.T.E.) – Rostock, (September 12-13), 144.
31. Skrzyszowska M., Kątska-Książkiewicz L., Ryńska B., Gajda B., Smorąg Z., Kareta W., (2003), Materiały Konferencyjne II Kongresu Biotechnologii (Łódź), 148.