

## WPLYW SYSTEMÓW DOJRZEWANIA *IN VITRO* OOCYTÓW ŚWINI NA ROZWÓJ ZARODKÓW UZYSKIWANYCH TECHNIKĄ KLONOWANIA SOMATYCZNEGO\*

Marcin Samiec, Maria Skrzyszowska

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

*Celem przeprowadzonych badań było opracowanie optymalnych metod mejotycznego dojrzewania in vitro (IVM) oocytów oraz strategii indukowalnej modyfikacji epigenomowej zarówno oocytów-biorców jąder, jak i komórek-dawców jąder w procedurze klonowania świń. Enukleowane, dojrzałe mejotycznie oocyty loszek lub loch były rekonstruowane z jąder komórkowych transformowanych epigenetycznie fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów (grupa I) lub dorosłych osobników (grupa II). Transformacja epigenetyczna hodowanych komórek fibroblastycznych przeprowadzana była za pośrednictwem trichostatyny A (TSA), która należy do rodziny niespecyficznych lub nieselektywnych blokerów aktywności deacetylaz histonów. W zależności od zastosowanego systemu IVM oceniano potencjał rozwojowy zarodków klonalnych w oparciu o odsetek moruli i blastocyst uzyskanych w warunkach hodowli in vitro. W grupach IA oraz IIA do pozaustrojowego dojrzewania oocytów użyto TSA. Z kolei w grupach IB oraz IIB procedura dojrzewania in vitro oocytów obejmowała ich preinkubację w pożywce uzupełnionej roskowityną (RSCV), która jest specyficznym/selektywnym inhibitorem kinaz cyklino-zależnych i odwracalnym blokerem cyklu mejotycznego w stadium diktiotenu profazy I. Natomiast w grupach IC oraz IIC nie wykorzystano RSCV bądź TSA w strategii IVM oocytów. W grupach IA oraz IIA do stadium moruli i blastocysty rozwinęło się odpowiednio 45/68 (66,2%) i 27/68 (39,7%) oraz 36/69 (52,2%) i 20/69 (29,0%) zrekonstruowanych zarodków. W grupach IB oraz IIB stadium moruli i blastocysty osiągnęło odpowiednio 26/60 (43,3%) i 17/60 (28,3%) oraz 20/62 (32,3%) i 9/62 (14,5%) zarodków. Z kolei w grupach IC oraz IIC udział moruli i blastocyst w populacji hodowanych in vitro zarodków klonalnych utrzymywał się na poziomie odpowiednio 24/56 (42,9%) i 15/56 (26,8%) oraz 19/58 (32,8%) i 10/58 (17,2%). Podsumowując, pozaustrojowe dojrzewanie oocytów świni z użyciem TSA skutkowało znacznie wyższymi kompetencjami rozwojowymi i jakością zarodków klonalnych niż IVM oocytów poddawanych preinkubacji w obecności RSCV oraz IVM oocytów bez wykorzystania RSCV lub TSA.*

W procedurze klonowania somatycznego świń jedno ze źródeł biorców egzogennych jąder komórkowych stanowią dojrzałe *in vivo* (owulowane) oocyty. Są one pozyskiwane z jajowodów stymulowanych hormonalnie samic-dawczyń (Boquest i in., 2002; Lee i in., 2003). Kolejnym źródłem komórek-biorców allogenicznego

---

\*Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ze środków na naukę w latach 2009–2011 jako działalność statutowa w ramach tematu nr 3342.1.

genomu jądrowego są oocyty pozyskiwane poubojowo z jajników loch lub loszek, a wtedy osiągają one dojrzałość jądro-cytoplazmatyczną, a także epigenomową w warunkach hodowli *in vitro* (Hyun i in., 2003; Hölker i in., 2005). Znamioną cechą dojrzałych *in vivo* lub *in vitro* oocytów jest przejściowe zatrzymanie się cyklu komórkowego w stadium metafazy II (MII) podziału mejotycznego.

Morfologiczna i biochemiczna kondycja zarodków klonalnych świni, a w konsekwencji ich zdolności rozwojowe w znacznym stopniu uwarunkowane są wysoką jakością oocytów wykorzystanych w procedurze klonowania, charakteryzującą się pełną synchronią dojrzałości mejotycznej (jądrowej), epigenomowej i cytoplazmatycznej. Warunkiem niezbędnym do synchronizacji procesów dojrzewania jądrowego, epigenomowego oraz cytoplazmatycznego w oocytach-biorcach jąder komórek somatycznych, których cykl mejotyczny ulega progresji *ex vivo* od momentu ich poubojowego wyizolowania z pęcherzyków jajnikowych loszek lub loch, jest zastosowanie kilkustopniowych metod hodowli *in vitro* oocytów. Metody te obejmują długotrwałą (najczęściej 22-godzinną) preinkubację oocytów w pożywce hodowlanej z dodatkiem specyficznych związków blokujących odwracalnie aktywność kinaz cyklicznych, których przedstawicielem jest roskowityna (RSCV; Coy i in., 2005; Schoevers i in., 2005). Roskowityna jako inhibitor nadrzędnej kinazy białkowej p34<sup>cdc2</sup>, regulującej przebieg cyklu mejotycznego, powoduje przejściowe zatrzymanie mejozy w stadium dikiotenu profazy I podziału redukcyjnego, w celu wydłużenia czasu niezbędnego do uruchomienia molekularnych mechanizmów dojrzewania cytoplazmatycznego i w konsekwencji do nabycia kompetencji mejotycznej przez oocyty, czyli zdolności do wznowienia i ukończenia cyklu mejotycznego. Po okresie preinkubacji oocytów w obecności roskowityny rozpoczyna się proces właściwego dojrzewania jądro-cytoplazmatycznego w warunkach dwustopniowej hodowli *in vitro* ze zmiennym udziałem różnych związków regulatorowych cyklu mejotycznego, w tym m.in. liofilizowanych hormonów gonadotropowych, egzogennych analogów cyklicznych nukleotydów czy polipeptydowych czynników wzrostowych (Le Beux i in., 2003; Coy i in., 2005; Kawakami i in., 2005).

Drugi kierunek optymalizacji warunków pozaustrojowego dojrzewania mejotycznego oocytów-biorców jąder komórkowych dotyczy wykorzystania w hodowli *in vitro* niedojrzałych oocytów związków z grupy syntetycznych modulatorów procesów epigenetycznych modyfikacji kowalencyjnych DNA genomowego oraz białek histonowych rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. Procesy te obejmują odpowiednio metylację/demetylację reszt cytozyny DNA oraz deacetylację/acetylację reszt lizyny i/lub argininy histonów H3 i H4 (Kishigami i in., 2006; Bui i in., 2007). Do związków wywołujących wyżej wspomniane transformacje epigenomowe należą: 1. trichostatyna A, będąca niespecyficznym inhibitorem deacetylaz histonowych (HDACs; ang. histone deacetylases) oraz 2. 5-aza-2'-deoksycytydyna, będąca nieselektywnym inhibitorem metylotransferaz DNA (DNMTs; DNA methyltransferases). Wykazano, że wykorzystanie tych modulatorów epigenetycznego przemodelowania/przeprogramowania chromatyny jądrowej hodowanych *in vitro* oocytów może mieć korzystny wpływ na osiągnięcie przez nie stanu koordynacji między mejotyczną dojrzałością epigenomową a dojrzałością jądro-cytoplazmatyczną (Rybouchkin i in., 2006; Yang i in., 2007 a).

Osiągnięcie stanu dojrzałości epigenomowej jest związane z uzyskaniem przez oocyt właściwego stopnia zaawansowania epigenetycznych modyfikacji kowalencyjnych DNA genomowego (tj. metylacji/demetylacji reszt cytozyny) oraz białek histonowych rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej (tj. deacetylacji/acetylacji reszt lizyny i argininy). Epigenetyczne przemodelowanie konfiguracji przestrzennej oraz przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej chromatyny jądrowej dojrzałych mejotycznie oocytów jest również ściśle skoordynowane z zakończeniem procesów regulujących zjawisko rodzicielskiego piętna genomowego (matczynego imprintingu gametycznego). Jedynie po wprowadzeniu do dojrzałego epigenetycznie, enukleowanego oocytu-biorcy (ooplastu) w stadium MII cyklu mejotycznego, silnie skondensowana chromatyna somatycznej komórki-dawcy jądra w stadium G0/G1 cyklu mitotycznego, z wyraźnymi symptomami represji nukleosomowej wielu regionów DNA genomowego, prawidłowo reaguje na sygnały biochemiczne płynące z jego środowiska cytoplazmatycznego. Sygnały te obejmują inhibicję aktywności enzymatycznej izoform 1o i 3a/b metylotransferaz DNA (DNMTs 1o i 3a/b) oraz deacetylaz histonów rdzenia nukleosomowego H3 i H4 (HDACs), a także wzrost aktywności biokatalitycznej acetylaz białek histonowych H3 i H4 (HATs; ang. histone acetyltransferases/acetylases). Umożliwiają one pełne przeprogramowanie pamięci epigenetycznej egzogenego jądra komórkowego (Beaujean i in., 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2005; Rybouchkin i in., 2006; Bui i in., 2007).

Stopień zaawansowania epigenetycznych modyfikacji DNA genomowego, a także histonów chromatyny jądrowej za pośrednictwem endogennych metylotransferaz DNA oraz deacetylaz histonów można modulować egzogennymi inhibitorami tych enzymów podczas dojrzewania *in vitro* (IVM; ang. *in vitro* maturation) oocytów. Ponadto, zastosowanie sztucznych modulatorów epigenomowo-uwarunkowanej ekspresji genów, takich jak trichostatyna A (TSA) prowadzi – poprzez niespecyficzne/nieselektywne blokowanie aktywności deacetylaz histonów – do zahamowania represji transkrypcyjnej DNA genomowego hodowanych *ex vivo* oocytów, stanowiących źródło komórek-biorców jąder w technologii klonowania somatycznego ssaków.

W niniejszej pracy optymalizowano warunki pozaustrojowego dojrzewania mejotycznego diktietenowych oocytów loch lub loszek, w celu zwiększenia stopnia synchronizacji między dojrzałością jądrową, cytoplazmatyczną oraz epigenomową oocytów w stadium MII, stanowiących źródło biorców dla egzogennych jąder komórkowych w procedurze klonowania somatycznego. Ponadto, celem tej pracy było opracowanie optymalnych metod egzogennej modulacji epigenetycznej zarówno hodowanych *in vitro* oocytów-biorców jąder, jak i komórek-dawców jąder w klonowaniu świń.

## Material i metody

### Pozyskiwanie i dojrzewanie mejotyczne *in vitro* oocytów-biorców egzogennych jąder komórkowych

Źródłem oocytów były jajniki loszek i loch uzyskiwane w lokalnej rzeźni. Niedojrzałe oocyty świni [w stadium pęcherzyka zarodkowego (GV; ang. germinal vesicle),

czyli diktiotenu profazy I podziału mejotycznego] pozyskiwane były metodą aspiracji z antralnych pęcherzyków jajnikowych o średnicy 2–6 mm. W doświadczeniach testowane były trzy systemy dojrzewania *in vitro* (IVM) diktiotenowych oocytów. W każdym systemie oocyty hodowane były w grupach liczących 50–60 sztuk, w 500  $\mu\text{L}$  zbuforowanej 25,07  $\text{mM L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  pożywki NCSU-23 (ang. North Carolina State University-23) lub w 500  $\mu\text{L}$  zbuforowanej 25  $\text{mM L}^{-1}$  kwasu N-2-hydroksyetylopiperazyjno-N'-2-etanosulfonowego (HEPES) i 26,18  $\text{mM L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  pożywki TCM 199 (ang. Tissue Culture Medium 199, Gibco BRL, Life Technologies Inc., USA). Pożywka do IVM nawarstwiona była lekkim olejem mineralnym (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA). Hodowla oocytów przeprowadzana była w inkubatorze o ściśle określonych warunkach termiczno-atmosferycznych (39°C, 5%  $\text{CO}_2$  w powietrzu, maksymalna wilgotność względna).

**System I (IVM-I)**, określane jako jednostopniowy, obejmował 42–44-godzinną inkubację oocytów w pożywce uzupełnionej 4  $\text{mg mL}^{-1}$  frakcji V albuminy surowicy bydłowej (BSA-V; ang. bovine serum albumin – fraction V, Sigma-Aldrich), 0,1  $\text{IU mL}^{-1}$  ludzkiej gonadotropiny menopauzalnej (hMG; ang. human menopausal gonadotropin, Sigma-Aldrich) lub mieszaniną 10  $\text{IU mL}^{-1}$  gonadotropiny kosmówkowej źrebnych kłaczy (eCG/PMSG; ang. equine chorionic gonadotropin/pregnant mare serum gonadotropin, Sigma-Aldrich) i 10  $\text{IU mL}^{-1}$  ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG; ang. human chorionic gonadotropin, Sigma-Aldrich). Ponadto, pożywka hodowlana wzbogacona była dodatkiem 10% płynu wyizolowanego z antralnych pęcherzyków jajnikowych świni (pFF; ang. porcine follicular fluid), 0,6  $\text{mM L}^{-1}$  L-cysteiny (Sigma-Aldrich) oraz 10  $\text{ng mL}^{-1}$  rekombinowanego epidermalnego czynnika wzrostowego człowieka (rhEGF; ang. recombinant human epidermal growth factor, Sigma-Aldrich).

**System II (preRSCV-IVM-II)** określane był jako sekwencyjny, dwustopniowy z zastosowaniem roskowityny (RSCV), która jest przedstawicielem rodziny specyficznych/selektywnych inhibitorów kinazy białkowej p34<sup>cdc2</sup>, stanowiącej podjednostkę katalityczną czynnika dojrzewania mejotycznego (MPF; ang. maturation/meiosis-promoting factor). W systemie tym, wyselekcjonowane do hodowli oocyty poddawane były 22-godzinnej preinkubacji w pożywce z dodatkiem 50  $\mu\text{M L}^{-1}$  enancjomeru (stereoizomeru optycznego) R roskowityny (R-RSCV, Sigma-Aldrich). W kolejnym etapie, oocyty podlegały właściwemu dojrzewaniu mejotycznemu poprzez 42–44-godzinną inkubację w medium hodowlanym uzupełnionym 4  $\text{mg mL}^{-1}$  BSA-V, 0,1  $\text{IU mL}^{-1}$  hMG lub mieszaniną 10  $\text{IU mL}^{-1}$  eCG/PMSG i 10  $\text{IU mL}^{-1}$  hCG, a także 10% pFF, 0,6  $\text{mM L}^{-1}$  L-cysteiny oraz 10  $\text{ng mL}^{-1}$  rhEGF.

**System III (IVM-III/TSA)** zdefiniowany był jako sekwencyjny, dwustopniowy z zastosowaniem trichostatyny A (TSA), która należy do grupy syntetycznych analogów endogennych inhibitorów deacetylaz białek histonowych chromatyny jądrowej (HDACs). Ten niespecyficzny/nieselektywny inhibitor HDACs pośrednio hamuje także procesy metylacji DNA jądrowego katalizowane przez DNMTs. W systemie IVM-III/TSA oocyty umieszczane były w pożywce hodowlanej uzupełnionej 4  $\text{mg mL}^{-1}$  BSA-V, 0,1  $\text{IU mL}^{-1}$  hMG lub mieszaniną 10  $\text{IU mL}^{-1}$  eCG/PMSG i 10  $\text{IU mL}^{-1}$  hCG, a także 10% pFF, 0,6  $\text{mM L}^{-1}$  L-cysteiny oraz 10  $\text{ng mL}^{-1}$  rhEGF. Po około 20 godzinach oocyty były przenoszone do tej samej pożywki, lecz dodat-

kowo wzbogaconej  $80 \text{ nM L}^{-1}$  TSA (Sigma-Aldrich). W tych warunkach fizykochemicznych oocyty były hodowane *in vitro* przez kolejne 22–24 godziny, aż do czasu osiągnięcia dojrzałości jądrowej i cytoplazmatycznej.

Po hodowli we wszystkich trzech systemach IVM, dojrzałe *in vitro* oocyty z wyraźnie wyodrębnionymi ciałkami kierunkowymi I rzędu i jednolicie granulowaną cytoplazmą, nie wykazującą zmian degeneracyjnych (nekrotycznych lub apoptotycznych), stanowiły źródło biorców dla jąder komórek somatycznych.

### **Egzogenna (TSA-zależna) modyfikacja epigenomowa hodowanych *in vitro* fibroblastycznych komórek-dawców jąder**

Konfluentne linie klonalne fibroblastów układu skórno-powłokowego płodów lub dorosłych osobników (loch lub knurów) były pasażowane (podwojenie populacji). Uzyskane subpopulacje (szczepy) komórkowe były wysiewane w naczynkach hodowlanych wypełnionych podstawową pożywką Eagle'a w modyfikacji Dulbecco (DMEM/EMEM; ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Dulbecco's Minimum Essential Medium lub Eagle's Minimum Essential Medium, Gibco Invitrogen Co., UK). Pożywka DMEM/EMEM wzbogacona była dodatkiem 10% surowicy płodów bydłych (FBS; ang. foetal bovine serum, Sigma-Aldrich),  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  rekombinowanego zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów człowieka (rh-bFGF; ang. recombinant human basic fibroblast growth factor, Sigma-Aldrich) i  $2 \text{ mM L}^{-1}$  mieszaniny aminokwasów endogennych (NEAA; ang. non-essential amino acids, Sigma-Aldrich). Ponadto, uzupełniona ona była  $2 \text{ mM L}^{-1}$  L-glutaminy (Sigma-Aldrich),  $0,36 \text{ mM L}^{-1}$  pirogronianu sodu (Sigma-Aldrich) oraz 1% mieszaniny antybiotyków i mykostatyków (AAS; ang. antibiotic-antimycotic solution). W wyniku pokrycia gęstą, pojedynczą warstwą całej dostępnej powierzchni dna butelki hodowlanej, przylegające ściśle zarówno do siebie, jak i do substratu komórki fibroblastyczne podlegały inhibicji kontaktowej migracji i proliferacyjnego wzrostu przez 24–72 godziny. W tych warunkach cykl mitotyczny fibroblastów był sztucznie synchronizowany w fazach G1/G0. Przed wykorzystaniem jako źródła dawców jąder w procedurze klonowania, linie komórek fibroblastycznych, które poddawano zahamowaniu kontaktowemu podziałów mitotycznych po osiągnięciu stanu pełnej konfluencji, inkubowane były przez 24 godziny w pożywce uzupełnionej  $50 \text{ nM L}^{-1}$  trichostatyny A (TSA). Do klonowania somatycznego użyte były transformowane epigenetycznie (za pośrednictwem TSA) komórki pochodzące z wczesnych pasaży (2–6). Na potrzeby klonowania, poszczególne subpopulacje komórkowe fibroblastów były intensywnie przemywane świeżą pożywką pozbawioną modulatora epigenetycznego TSA, trypsynizowane i wirowane, w celu uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek.

### **Technika klonowania somatycznego**

#### ***Enukleacja mikrochirurgiczna oocytów wspomagana chemicznie***

Uwolnione z komórek wzgórka jajonośnego, dojrzałe *in vitro* oocyty inkubowane były przez 1 godzinę w pozbawionej jonów  $\text{Ca}^{2+}$  pożywce TC-199/HEPES (Gibco BRL). Ta ostatnia uzupełniona była mieszaniną  $0,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  demekolcyny (DMCC, Sigma-Aldrich) oraz  $0,05 \text{ M L}^{-1}$  sacharozy (Sigma-Aldrich). Następnie oocyty z wyraźnie widocznym w przestrzeni okołozółtkowej stożkowatym uwypukleniem

plazmolemmy (w pobliżu I ciała kierunkowego) przenoszone były do pożywki z dodatkiem  $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  cytochalazyny B (CB, Sigma-Aldrich). Niewielki fragment cytoplazmy oocyty (zawierający płytkę metafazową wrzeczona II podziału mejotycznego) usuwany był wraz z polocytem I rzędu za pomocą pipety enukleacyjnej.

### **Rekonstrukcja enukleowanych oocytów**

Wyjądrowane oocyty świni rekonstruowane były przy wykorzystaniu techniki fuzji indukowanej impulsami prądu stałego (elektrofuzji). Wyselekcjonowane, pojedyncze komórki fibroblastyczne wprowadzane były mikrochirurgicznie do przestrzeni okołozółtkowej wyjądrowanych oocytów. Kompleksy ooplast-komórka somatyczna umieszczane były w komorze do elektroporacji wypełnionej roztworem izotonicznego dielektryku, który stanowił  $0,3 \text{ M D-mannitol}$  (Sigma-Aldrich). Roztwór ten uzupełniony był  $1,0 \text{ mM L}^{-1} \text{ CaCl}_2$  (Sigma-Aldrich),  $0,1 \text{ mM L}^{-1} \text{ MgSO}_4$  (Sigma-Aldrich) i  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  wolnej od kwasów tłuszczowych frakcji albuminy surowicy bydłowej (FAF-BSA, Sigma-Aldrich). Fuzja kompleksów komórkowych indukowana była generowanymi bezpośrednio po sobie 2 impulsami prądu stałego o natężeniu pola elektrostatycznego  $1,2 \text{ kV cm}^{-1}$  i czasie trwania  $60 \mu\text{sek}$ . każdy.

### **Sztuczna aktywacja zrekonstruowanych oocytów**

Do stymulacji programu rozwojowego zrekonstruowanych oocytów zastosowany był protokół jednoczesnej fuzji i aktywacji fizycznej. W systemie tym impulsy elektryczne, indukujące fuzję kompleksów cytoplast-komórka somatyczna, stanowiły równocześnie bodźce inicjujące aktywację zrekonstruowanych oocytów. Elektroporacja błon cytoplazmatycznych hybryd klonalnych indukowana była przy użyciu dwóch generowanych bezpośrednio po sobie impulsów prądu stałego o natężeniu pola elektrostatycznego  $1,2 \text{ kV cm}^{-1}$  i czasie trwania  $60 \mu\text{sek}$ . każdy. Zabieg przeprowadzany był w roztworze izotonicznego dielektryku o podwyższonym do  $1 \text{ mM L}^{-1}$  stężeniu jonów  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **Hodowla *in vitro* zarodków klonalnych**

Sztucznie aktywowane cybrydy klonalne uzyskane w wyniku rekonstrukcji oocytów z jąder fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów lub dorosłych osobników hodowane były w  $50\text{-}\mu\text{L}$  kroplach pożywki NCSU-23 z dodatkiem  $0,4\%$  BSA-V, w temperaturze  $39^\circ\text{C}$ , w atmosferze  $5\% \text{ CO}_2$  i  $100\% \text{ H}_2\text{O(g)}$  w powietrzu. Po 3–4-dniowej inkubacji, zarodki przenoszone były do pożywki uzupełnionej  $10\%$  FBS. Zarodki hodowane były przez 6–7 dni do osiągnięcia stadium moruli/blastocysty. Po wybarwieniu fluorochromem Hoechst 33342 (bisbenzimidem, Sigma-Aldrich) o stężeniu  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  pożywki NCSU-23 z dodatkiem  $10\%$  FBS, blastocysty klonalne poddawane były cytobiochemicznej ocenie jakości morfologicznej. Przeprowadzana ona była w oparciu o całkowitą liczbę komórek, tj. sumaryczną liczbę komórek wężła zarodkowego oraz komórek trofoblastycznych w zarodkach.

### **Analiza statystyczna**

W celu porównania liczby dojrzałych mejotycznie oocytów, liczby zarodków klonalnych zaklasyfikowanych do hodowli *in vitro* w oparciu o ocenę zabiegu fuzji

kompleksów ooplast-komórka somatyczna, liczby dzielących się zarodków, liczby zarodków w stadium moruli oraz blastocysty między różnymi grupami hybryd jądroowo-ooplazmatycznych (cybryd klonalnych), zastosowano procedurę analityczną przy użyciu testu niezależności zmiennych losowych (cech)  $\chi^2$ . Grupy doświadczalne utworzono w zależności od badanego czynnika, który stanowiła metoda dojrzewania *ex vivo* oocytów-biorców jąder z wykorzystaniem pożywek hodowlanych o zróżnicowanej suplementacji (tj. o zróżnicowanym składzie jakościowym).

Natomiast w celu porównania średniej liczby komórek w blastocystach między różnymi grupami cybryd klonalnych świni, zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) przy wykorzystaniu testu *t*-Studenta dla grup niezależnych, czyli dla zmiennych niepowiązanych. Grupy eksperymentalne utworzono w zależności od badanego czynnika, czyli metody pozaustrojowego dojrzewania mejotycznego oocytów w odmiennych warunkach mikrośrodowiska hodowlanego (różnice w składzie jakościowym pożywek wynikające z odmiennych suplementów).

## Wyniki

Wyniki dotyczące wpływu różnych warunków hodowli *in vitro* (system **IVM-I** – bez użycia roskowityny lub trichostatyny A, system **preRSCV-IVM-II** – z wykorzystaniem roskowityny oraz system **IVM-III/TSA** – z wykorzystaniem trichostatyny A) na efektywność jądroowo-cytoplazmatycznego dojrzewania oocytów świni – biorców jąder komórek somatycznych w procedurze klonowania przedstawiono w tabeli 1. Z kolei tabele 2 i 3 przedstawiają wyniki dotyczące potencjału rozwojowego *in vitro* i jakości klonalnych zarodków świni zrekonstruowanych z jąder dwóch typów epigenetycznie modulowanych komórek fibroblastycznych (fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów lub dorosłych osobników), w zależności od zastosowania trzech systemów pozaustrojowego dojrzewania mejotycznego oocytów (**IVM-I**, **preRSCV-IVM-II** oraz **IVM-III/TSA**).

Tabela 1. Efektywność dojrzewania mejotycznego oocytów świni w różnych warunkach hodowli *in vitro*  
Table 1. Efficiency of meiotic maturation of pig oocytes under different *in vitro* culture conditions

System IVM IVM system	Liczba (szt.) hodowanych oocytów No. of oocytes cultured	Liczba (szt.) dojrzałych oocytów-biorców (%) No. of mature oocytes (%)
IVM-I	152	128/152 (84,2%) a
preRSCV-IVM-II	155	133/155 (85,8%) a
IVM-III/TSA	163	154/163 (94,5%) b

a, b – przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami doświadczalnymi, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego  $0,01 < P \leq 0,05$ .

a, b – values within columns denote statistically significant differences between the experimental groups, with a random error probability of  $0,01 < P \leq 0,05$ .

Tabela 2. Wpływ różnych systemów mejotycznego dojrzewania *ex vivo* oocytów na kompetencje rozwojowe *in vitro* i jakości zarodków klonalnych zrekonstruowanych z jąder komórkowych epigenetycznie transformowanych fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów

Table 2. Effect of different systems of meiotic oocyte maturation *ex vivo* on developmental competence *in vitro* and quality of cloned embryos reconstructed from nuclei of epigenetically transformed cutaneous tissue fibroblasts of fetuses

System IVM oocytów Oocyte IVM system	Liczba (szt.) zrekonstruowanych oocytów No. of reconstructed oocytes	Liczba (szt.) hodowanych zarodków klonalnych (%) No. of embryos cultured (%)	Liczba (szt.) dzielących się zarodków (%) No. of embryos cleaved (%)	Liczba moruli (%) No. of morulae (%)	Liczba blastocyst (%) No. of blastocysts (%)	Średnia ( $\bar{x}$ ) i maksymalna (max) liczba komórek w blastocystach (n) Mean ( $\bar{x}$ ) and maximum (max) number of cells in blastocysts (n)
IVM-I	64	56/64 (87,5) a	43/56 (76,8) aB	24/56 (42,9) aB	15/56 (26,8%) aC	$\bar{x}$ = 25,8 a max = 29,0 (n = 15)
preRSCV-IVM-II	66	60/66 (90,9) a	48/60 (80,0) aB	26/60 (43,3) aB	17/60 (28,3) aC	$\bar{x}$ = 26,3 a max = 30,0 (n = 17)
IVM-III/TSA	77	68/77 (88,3) a	64/68 (94,1) A	45/68 (66,2) A	27/68 (39,7) D	$\bar{x}$ = 30,2 b max = 35,0 (n = 27)

a, b – przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami doświadczalnymi, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego  $0,01 < P \leq 0,05$ .

A, B – oznaczają statystycznie bardzo wysoko istotne różnice między grupami, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego  $0,01 < P \leq 0,001$ .

C, D – oznaczają statystycznie wysoko istotne różnice między grupami, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego  $P \leq 0,01$ .

a, b – next to values within columns denote statistically significant differences between the experimental groups, with a random error probability of  $0,01 < P \leq 0,05$ .

A, B – denote highly significant differences between the groups, with a random error probability of  $0,01 < P \leq 0,001$ .

C, D – denote highly significant differences between the groups, with a random error probability of  $P \leq 0,01$ .



Tabela 3. Wpływ różnych systemów mejjotycznego dojrzewania *ex vivo* oocytów na kompetencje rozwojowe *in vitro* i jakość zarodków klonalnych zrekonstruowanych z jąder komarkowych epigenetycznie transformowanych fibroblastów tkanki skórno-powłokowej dorosłych osobnikówTable 3. Effect of different systems of meiotic oocyte maturation *ex vivo* on developmental competence *in vitro* and quality of cloned embryos reconstructed from nuclei of epigenetically transformed cutaneous tissue fibroblasts of adults

System IVM oocytów Oocyte IVM system	Liczba (szt.) zrekonstruowanych oocytów No. of reconstructed oocytes	Liczba (szt.) hodowanych zarodków (%) No. of embryos cultured (%)	Liczba dzielących się zarodków (%) No. of cleaved embryos (%)	Liczba morul (%) No. of morulae (%)	Liczba blastocyst (%) No. of blastocysts (%)	Średnia ( $\bar{x}$ ) i maksymalna (max) liczba komórek w blastocystach (n) Mean ( $\bar{x}$ ) and maximum (max) number of cells in blastocysts (n)
IVM-I	64	58/64 (90,6) a	36/58 (62,1) aB	19/58 (32,8) aB	10/58 (17,2) aC	$\bar{x}$ = 25,4a max = 28,0 (n = 10)
preRSCV-IVM-II	67	62/67 (92,5) a	41/62 (66,1) aB	20/62 (32,3) aB	9/62 (14,5) aB	$\bar{x}$ = 25,9a max = 29,0 (n = 9)
IVM-III/TSA	77	69/77 (89,6) a	56/69 (81,2) A	36/69 (52,2) A	20/69 (29,0) A	$\bar{x}$ = 29,1b max = 33,0 (n = 20)

a, b – przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami doświadczalnymi, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego  $0,01 < P \leq 0,05$ .

A, B – oznaczają statystycznie bardzo wysoko istotne różnice między grupami, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego  $0,01 < P \leq 0,001$ .

a, c – oznaczają statystycznie wysoko istotne różnice między grupami, z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego  $P \leq 0,01$ .

a, b – next to values within columns denote statistically significant differences between the experimental groups, with a random error probability of  $0,01 < P \leq 0,05$ .

A, B – denote highly significant differences between the groups, with a random error probability of  $0,01 < P \leq 0,001$ .

A, C – denote highly significant differences between the groups, with a random error probability of  $P \leq 0,01$ .

## Omówienie wyników

Wyniki przeprowadzonych badań jednoznacznie wskazują na poprawę wydajności klonowania świń poprzez wzrost potencjału rozwojowego *in vitro* zarodków klonalnych zrekonstruowanych z epigenomowo-dojrzałych oocytów o wysokiej jakości oraz z jąder fibroblastów układu skórno-powłokowego płodów lub dorosłych osobników, które poddane zostały epigenetycznym modulacjom aktywności transkrypcyjnej w warunkach hodowli *ex vivo*. Do hodowli *ex vivo* oocytów wykorzystano *R*-roskowitynę z grupy specyficznych inhibitorów kompetycyjnych kinaz cyklicznych zależnych oraz trichostatynę A z grupy niespecyficznych inhibitorów izosterycznych deacetylaz histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej, w celu synchronizacji procesów dojrzewania jądrowego, cytoplazmatycznego i epigenomowego. W pracy tej przeprowadzono analizę porównawczą trzech systemów IVM oocytów, stanowiących źródło komórek-biorców jąder w procedurze klonowania. W zależności od zastosowania różnych strategii hodowli *in vitro* oocytów, obejmujących odmienne warianty suplementacji pożywek do dojrzewania, oceniano zarówno efektywność systemów IVM, którą mierzono odsetkiem oocytów osiągających stan dojrzałości jądro-cytoplazmatycznej w stadium MII, jak i przedimplantacyjne zdolności rozwojowe oraz jakość morfologiczną zarodków klonalnych świń.

W dostępnej literaturze z zakresu klonowania somatycznego świń stwierdzono brak prac, w których porównywany jest potencjał rozwojowy *in vitro* zarodków zrekonstruowanych z oocytów uzyskujących dojrzałość mejotyczną w warunkach inkubacji w pożywkach hodowlanych o zróżnicowanym składzie jakościowym. Według naszej wiedzy, po raz pierwszy w badaniach nad klonowaniem świń oraz innych gatunków ssaków wykorzystano trichostatynę A do sztucznej modyfikacji epigenetycznej komórkowej pamięci o stopniu aktywności transkrypcyjnej genomu oocytów-biorców jąder komórek somatycznych. Bezpośrednia, ektopowa transformacja epigenetycznych modyfikacji białek histonowych chromatyny jądrowej (tj. poziomu acetylacji reszt lizyny i argininy histonów H3 i H4 rdzenia nukleosomowego) oraz pośrednia transformacja modyfikacji kowalencyjnych DNA jądrowego (tj. poziomu metylacji reszt cytozyny) doprowadziła prawdopodobnie do zmniejszenia stopnia asynchronii między dojrzałością epigenomową a dojrzałością jądro-cytoplazmatyczną oocytów-biorców jąder. Z kolei pełna lub maksymalnie zbliżona do pełnej synchronizacja procesów dojrzewania epigenomowego oraz mejotycznego i cytoplazmatycznego oocytów mogła przyczynić się do podwyższenia przedimplantacyjnych kompetencji rozwojowych oraz jakości zarodków klonalnych świń wskutek zwiększenia zdolności do przeprogramowania ekspresji genów jąder komórek somatycznych po ich transplatacji do epigenetycznie dojrzałej ooplazmy-biorcy. Stwierdzono bowiem, że efektywność dojrzewania *in vitro* oocytów świń była znacznie wyższa w systemach hodowli z zastosowaniem trichostatyny A niż w systemach hodowli z zastosowaniem *R*-roskowityny lub w pożywce pozbawionej odwracalnych blokerów cyklu mejotycznego lub niespecyficznych represorów modyfikacji epigenetycznych białek histonowych oraz DNA jądrowego (tab. 1). Ponadto, wyższy potencjał rozwojowy i jakość zarodków klonalnych świń odnotowano w wyniku zastosowania do dojrzewania *in vitro* oocytów trichostatyny A niż w przypadku zastosowania roskowityny, a także

w przypadku niezastosowania jakiegokolwiek z wymienionych represorów modyfikacji epigenetycznych białek histonowych i DNA jądrowego lub blokerów cyklu mejotycznego (tab. 2 i 3).

Jednakże, trichostatyna A została użyta nie tylko do epigenetycznej transformacji komórkowej pamięci oocytów świni o profilu aktywności transkrypcyjnej DNA genomowego, lecz także do sztucznej modulacji epigenomowo-uwarunkowanej ekspresji genów w hodowanych *in vitro* komórkach fibroblastycznych, stanowiących źródło dawców jąder w zabiegach rekonstrukcji enukleowanych oocytów metodą klonowania somatycznego. Jednym ze sposobów odwrócenia zaawansowanych zmian we wzorcu kowalencyjnych modyfikacji epigenetycznych jąder hodowanych 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 enzymów DNMTs oraz HDACs. Do pierwszej grupy sztucznych modyfikatorów epigenetycznych należy 5-aza-2'-deoksytydyna (5-aza-dC), a do drugiej – trichostatyna A (TSA) oraz butanian/maślan sodu (NaBu) (Enright i in., 2005; Kishigami i in., 2006; Wee i in., 2007; Yang i in., 2007 b). Wyniki badań własnych, a także badań innych autorów (Enright i in., 2003; Wee i in., 2007) sugerują, że zastosowanie trichostatyny A do egzogennej modulacji epigenomowej hodowanych *in vitro* fibroblastycznych komórek-dawców jąder może mieć pozytywny wpływ na złożone procesy strukturalnego przemodelowania chromatyny jądrowej oraz epigenetycznego przeprogramowania DNA genomowego w przedimplantacyjnej fazie rozwoju zarodków klonalnych. 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 reszt lizyny i argininy histonów chromatyny komórek-dawców jąder, które uprzednio poddano egzogennym modyfikacjom epigenomowym (Yang i in., 2007 a; Zhang i in., 2007; Shi i in., 2008). Pośrednim wskaźnikiem właściwego przebiegu procesu epigenetycznego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej jąder komórek somatycznych w zarodkach klonalnych jest ich wysoki przedimplantacyjny potencjał rozwojowy. W eksperymentach własnych, najwyższą aktywnością podziałową, a także odsetkiem morul i blastocyst charakteryzowały się zarodki klonalne pochodzące z modulowanych epigenetycznie, dojrzałych *in vitro* oocytów, które zrekonstruowane były z jąder komórek fibroblastycznych poddanych także transformacji epigenomowej. Niemniej jednak, kompetencje jąder komórkowych epigenetycznie transformowanych fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów do pokierowania rozwojem *in vitro* zarodków klonalnych świni do stadium moruli oraz blastocysty były wyższe niż kompetencje jąder fibroblastów tkanki skórno-powłokowej dorosłych osobników, niezależnie od zastosowanych do dojrzewania *ex vivo* oocytów blokerów cyklu mejotycznego lub represorów modyfikacji kowalencyjnych białek histonowych oraz DNA jądrowego (tj., odpowiednio deacetylacji oraz metylacji).

Zarówno w badaniach własnych, jak i w doświadczeniach przeprowadzonych przez Lee i in. (2003) zaobserwowano podobną zależność między fenotypem/rodowodem komórek-dawców jąder wykorzystanych w procedurze klonowania so-

matycznego świń a przedimplantacyjnymi zdolnościami rozwojowymi do stadium blastocysty zarodków klonalnych uzyskanych techniką równoczesnej fuzji i aktywacji rekonstruowanych oocytów. W obu przypadkach stwierdzono niższy odsetek blastocyst klonalnych rozwijających się z zarodków zrekonstruowanych z dojrzałych *in vitro* enukleowanych oocytów oraz z jąder komórek fibroblastycznych tkanki skórnej ucha dorosłych osobników w porównaniu do zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych. W badaniach przeprowadzonych przez Lee i in. (2003) potencjał rozwojowy do stadium blastocysty zarodków klonalnych świni zrekonstruowanych z jąder głodzonych fibroblastów skórnych niedojrzałych płciowo loszek był dwukrotnie niższy niż zarodków zrekonstruowanych z jąder głodzonych fibroblastów płodowych (ok. 8% vs. 16%). Podobna tendencja utrzymywała się w eksperymentach własnych, a potencjał rozwojowy do stadium blastocysty wahał się w granicach 15–29% oraz 27–40%, odpowiednio, w przypadku zarodków klonalnych zrekonstruowanych z genomu jądrowego konfluentnych i transformowanych epigenetycznie fibroblastów tkanki skórnej dojrzałych płciowo loch lub knurów oraz zarodków zrekonstruowanych z genomu jądrowego płodowych komórek fibroblastycznych (tab. 2 i 3). Istotnie niższy w porównaniu do badań własnych odsetek uzyskanych w doświadczeniach przeprowadzonych przez Lee i in. (2003) blastocyst rozwijających się z cybrydowych zygot klonalnych zrekonstruowanych z jąder fibroblastów skóry dorosłych osobników lub fibroblastów płodowych może wynikać z faktu niezastosowania TSA-zależnej transformacji epigenetycznej hodowanych komórek-dawców jąder. Do znacznych różnic w potencjale rozwojowym zarodków klonalnych między badaniami Lee i in. (2003) a eksperymentami własnymi mogło przyczynić się także wykorzystanie innej metody synchronizacji cyklu mitotycznego hodowanych *in vitro* komórek-dawców jąder w fazach G0/G1 lub G1/G0 (deprywacja troficzna vs. inhibicja kontaktowa migracji i proliferacyjnego wzrostu komórek w warunkach pełnej konfluencji). Kolejnym powodem niższych niż w badaniach własnych kompetencji rozwojowych *in vitro* zarodków klonalnych mogą być odmienne parametry fizyko-techniczne impulsów elektrycznych użytych do protokołu jednoczesnej fuzji i aktywacji rekonstruowanych oocytów ( $1 \times 200 \text{ V/mm} \times 50 \text{ } \mu\text{sek.}$  vs.  $2 \times 120 \text{ V/mm} \times 60 \text{ } \mu\text{sek.}$ ).

W przeciwieństwie do wyników badań własnych oraz badań Lee i in. (2003), w eksperymentach przeprowadzonych przez Parka i in. (2002) nie stwierdzono istotnych różnic w zdolnościach rozwojowych *in vitro* do stadium blastocysty między zarodkami klonalnymi świni zrekonstruowanymi z jąder głodzonych fibroblastów tkanki skórnej ucha 4-dniowych prosiąt a zarodkami zrekonstruowanymi z jąder głodzonych fibroblastów płodowych (ok. 10,0% vs. 9,5%). Jednakże brak statystycznie istotnych różnic w odsetku blastocyst rozwijających się z obu typów zarodków klonalnych może być spowodowany inną niż zastosowana w badaniach własnych długością trwania impulsów prądu stałego, które były generowane w celu indukcji jednoczesnej fuzji i aktywacji rekonstruowanych oocytów ( $2 \times 1,2 \text{ kV/cm} \times 30 \text{ } \mu\text{sek.}$  vs.  $2 \times 1,2 \text{ kV/cm} \times 60 \text{ } \mu\text{sek.}$ ). Inną tego przyczyną mogą być także odnotowane między eksperymentami różnice w wieku zwierząt, od których pobrano biopaty tkankowe małżowiny usznej (osobniki w okresie neonatalnym rozwoju ontogenetycznego oraz dojrzałe płciowo i/lub rozplodowo/somatycznie osobniki żeńskie lub męskie).

Podsumowując, w oparciu o uzyskane wyniki badań własnych stwierdzono istotny wpływ zróżnicowanej suplementacji pożywek do pozaustrojowego dojrzewania oocytów świni na zdolności rozwojowe *in vitro* oraz morfologiczną jakość klonalnych zarodków zrekonstruowanych z jąder transformowanych epigenetycznie komórek fibroblastycznych. Ponadto, sugeruje się, że wykorzystanie trichostatyny A do modulacji komórkowej pamięci epigenetycznej dojrzewających *ex vivo* oocytów może zwiększać częstotliwość synchronizacji oraz przyspieszać tempo/kinetykę procesów dojrzewania epigenomowego oraz dojrzewania jądro-cytoplazmatycznego hodowanych *in vitro* oocytów-biorców jąder komórek somatycznych w procedurze klonowania świń. Zarodki klonalne świni, które rozwijały się z oocytów dojrzewających *ex vivo* w obecności trichostatyny A, wykazywały stosunkowo wysoki przedimplantacyjny potencjał rozwojowy. Niemniej jednak, niezbędne jest prowadzenie dalszych, szczegółowych badań w tym zakresie w celu potwierdzenia, czy zastosowane systemy IVM oocytów świni z użyciem *R*-rozkowityny lub trichostatyny A mogą doprowadzić do uzyskania potomstwa klonalnego w wyniku transferu do samic-biorczyń zarodków zrekonstruowanych z jąder dwóch typów komórek fibroblastycznych, poddanych epigenetycznym modyfikacjom w warunkach hodowli *in vitro*.

#### Piśmiennictwo

- 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: 185–193.
- 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: 1283–1287.
- 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: 371–382.
- Coy P., Romar R., Ruiz S., Canovas S., Gadea J., Vazquez F.G., Matas C. (2005). Birth of piglets after transferring of *in vitro*-produced embryos pre-matured with *R*-roscovitine. *Reproduction*, 129: 747–755.
- 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: 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: 944–948.
- Hölker M., Petersen B., Hassel P., Kues W.A., Lemme E., Lucas-Hahn A., Niemann H. (2005). Duration of *in vitro* maturation of recipient oocytes affects blastocyst development of cloned porcine embryos. *Cloning Stem Cells*, 7: 35–44.
- Hyun S.H., Lee G.S., Kim D.Y., Kim H.S., Lee S.H., Kim S., Lee E.S., Lim J.M., Kang S.K., Lee B.C., Hwang W.S. (2003). Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. *Theriogenology*, 59: 1641–1649.
- Kawakami M., Kato Y., Tsunoda Y. (2005). Maintenance of meiotic arrest and developmental potential of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 7: 167–177.
- 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: 183–189.

- Le Beux G., Richard F.J., Sirard M.A. (2003). Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. *Theriogenology*, 60: 1049–1058.
- Lee G.-S., Hyun S.-H., Kim H.-S., Kim D.-Y., Lee S.-H., Lim J.-M., Lee E.-S., Kang S.-K., Lee B.-C., Hwang W.-S. (2003). Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. *Theriogenology*, 59: 1949–1957.
- Park K.-W., Lai L., Cheong H.-T., Cabot R., Sun Q.-Y., Wu G., Rucker E.B., Durtschi D., Bonk A., Samuel M., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Prather R.S. (2002). Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol. Reprod.*, 66: 1001–1005.
- Rybouchkin A., Kato Y., Tsunoda Y. (2006). Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 74: 1083–1089.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2005). Molecular conditions of the cell nucleus remodelling/reprogramming process and nuclear-transferred embryo development in the intraooplasmic karyoplast injection technique. *Czech J. Anim. Sci.*, 50: 185–195.
- Schoevers E.J., Bevers M.M., Roelen B.A., Colenbrander B. (2005). Nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes are not synchronized by specific meiotic inhibition with roscovitine during *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 63: 1111–1130.
- Shi L.H., Ai J.S., Ouyang Y.C., Huang J.C., Lei Z.L., Wang Q., Yin S., Han Z.M., Sun Q.Y., Chen D.Y. (2008). Trichostatin A and nuclear reprogramming of cloned rabbit embryos. *J. Anim. Sci.*, 86: 1106–1113.
- 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: 781–787.
- Yang F., Hao R., Kessler B., Brem G., Wolf E., Zakhartchenko V. (2007 a). Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation. *Reproduction*, 133: 219–230.
- Yang J., Yang S., Beaujean N., Niu Y., He X., Xie Y., Tang X., Wang L., Zhou Q., Ji W. (2007 b). Epigenetic marks in cloned rhesus monkey embryos: comparison with counterparts produced *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 76: 36–42.
- Zhang Y., Li J., Vиллемoes K., Pedersen A.M., Purup S., Vajta G. (2007). An epigenetic modifier results in improved *in vitro* blastocyst production after somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Wells*, 9: 357–363.

Zatwierdzono do druku 21 VI 2011

MARCIN SAMIEC, MARIA SKRZYSZOWSKA

**Effect of different systems for *in vitro* maturation of porcine oocytes on development of embryos generated by somatic cell cloning**

SUMMARY

The present study was conducted in order to develop both the optimal methods for *ex vivo* oocyte meiotic maturation and the strategies of inducible epigenomic modification of nuclear recipient oocytes as well as nuclear donor cells for the purposes of somatic cell cloning of pigs. Enucleated, meiotically-matured gilt/sow oocytes were reconstituted with the cell nuclei of either foetal fibroblast cells (Group I) or adult cutaneous fibroblast cells (Group II), which had been previously epigenetically-transformed by trichostatin A (TSA). TSA is a member of the family that includes non-specific/non-selective blockers for the activity of histone deacetylases. Depending on the systems of *in vitro* maturation (IVM), the capabilities of cloned embryos to develop up to morula and blastocyst stages were examined on Days 6 to 7 under *in vitro* culture circumstances, respectively. The IVM systems involved the treatment of oocytes with

TSA (Groups IA and IIA). In turn, in Groups IB and IIB, the oocytes were pre-matured with roscovitine (RSCV), which is a specific/selective inhibitor of cyclin-dependent kinases and thereby reversible blocker of meiotic cell cycle at prophase I dictyotene stage. But, in Groups IC and IIC, immature oocytes were cultured in the medium lacking RSCV or TSA. In Groups IA and IIA, the frequencies of nuclear-transferred embryos that developed to the morula and blastocyst stages were 45/68 (66.2%) and 27/68 (39.7%) or 36/69 (52.2%) and 20/69 (29.0%), respectively. The morula and blastocyst formation rates yielded 26/60 (43.3%) and 17/60 (28.3%) or 20/62 (32.3%) and 9/62 (14.5%) in Groups IB or IIB, respectively. In turn, in Groups IC and IIC, the proportions of nuclear-transferred embryos that reached the morula and blastocyst stages were 24/56 (42.9%) and 15/56 (26.8%) or 19/58 (32.8%) and 10/58 (17.2%), respectively. In conclusion, the *in vitro* maturation of porcine oocytes in the culture medium enriched with TSA resulted both in the higher developmental competences and in the improved quality of cloned embryos as compared to the IVM of oocytes that had been pre-incubated with RSCV and to that in the medium depleted of RSCV and TSA.

Key words: pig, *in vitro* maturation, nuclear recipient oocyte, epigenomic maturity, epigenetic transformation/modulation, trichostatin A, roscovitine, cloned embryo