

Wykorzystanie nowych i standardowych inhibitorów deacetylaz histonów do epigenetycznej transformacji komórek-dawców jąder w klonowaniu somatycznym świń*

Marcin Samiec, Maria Skrzyszowska

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa; marcin.samiec@izoo.krakow.pl

Wstęp

Przed- i poimplantacyjne zdolności rozwojowe zarodków świni, uzyskiwanych technikami klonowania somatycznego są w znacznym stopniu ograniczone ich niską jakością morfologiczną, która jest mierzona całkowitą liczbą blastomerów bądź stosunkiem ilościowym komórek węzła zarodkowego (embrioblastu) do komórek trofoektodermalnych (Samiec, 2004; Bonk i in., 2007, 2008; Whitworth i Prather, 2010; Zhao i in., 2010 a). Wydaje się, że jedną z głównych przyczyn niskiej kondycji strukturalno-funkcjonalnej zarodków klonalnych świni jest niepełne lub nieprawidłowe przemodelowanie architektoniczne, a także epigenetyczne przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej genomu jąder komórek somatycznych w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów, a następnie w cytoplazmie blastomerów dzielących się zarodków (Samiec i Skrzyszowska, 2005; Reik, 2007; Cervera i in., 2009; Prather i in., 2009; Yamanaka i in., 2009).

Czynnikiem, determinującym zarówno potencjał rozwojowy, jak i jakość zarodków klonalnych świni jest stopień zaawansowania epigenetycznych modyfikacji jądrowego DNA komórek somatycznych – dawców jąder w warunkach ich długotrwałej hodowli *in vitro*. Stoso-

wane na szeroką skalę metody synchronizacji cyklu mitotycznego hodowanych komórek-dawców jąder w fazach G0/G1 lub G1/G0, takie jak: głodzenie lub zahamowanie kontaktowe ich aktywności proliferacyjnej, mogą mieć niekorzystny wpływ na epigenomowo-zależny profil aktywności transkrypcyjnej genów jądrowego i mitochondrialnego DNA poprzez drastyczne osłabienie poziomu tkankowo-specyficznej ekspresji genomu (Campbell i Alberio, 2003; Samiec, 2005; Skrzyszowska i in., 2006; Narbonne i in., 2012). Obniżenie aktywności transkrypcyjnej genomowego DNA może być spowodowane gwałtownym wzrostem częstotliwości takich zmian w pamięci epigenetycznej komórki, jak procesy metylacji reszt cytozyny DNA oraz procesy deacetylacji i metylacji reszt lizyny, a także procesy demetylacji reszt argininy histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej (Eilertsen i in., 2007; Yang i in., 2007 a; Wang i in., 2011 a,b; Rodriguez-Osorio i in., 2012). Jednakże, te szkodliwe dla funkcji fizjologicznych i przeżywalności komórek transformacje biochemiczne genomu jądrowego, które są indukowane w warunkach hodowli *in vitro*, można zahamować, a nawet odwrócić ich przebieg w kierunku wzrostu poziomu ekspresji genów, korzystnego dla aktywności metabolicznej i proliferacyjnej komórek.

*Prezentowana praca uzyskała wsparcie finansowe z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (umowa nr INNOMED/I/17/NCBR/2014) ze środków Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Jednym ze sposobów odwrócenia zaawansowanych zmian we wzorcu kowalencyjnych modyfikacji epigenetycznych jąder komórek somatycznych, które obejmują gwałtowną metylację DNA lub spadek poziomu acetylacji białek histonowych, wydaje się ich ekspozycja na działanie syntetycznych analogów endogennych związków odwracalnie hamujących aktywność deacetylaz histonów (HDACs; ang. *histone deacetylases*). Wśród najbardziej skutecznych sztucznych modyfikatorów epigenetycznych należy wymienić zarówno standardowe inhibitory HDACs, takie jak trichostatyna A (TSA), jak i ich nowych przedstawicieli, tj. skryptaid lub kwas walproinowy (VPA) (Li i in., 2008; Costa-Borges i in., 2010; Zhao i in., 2010 b; Kim i in., 2011; Xu i in., 2013).

Dlatego też, w ramach realizacji niniejszych badań wdrożono do praktycznej realizacji metody egzogennej transformacji profilu pamięci epigenetycznej jąder komórek somatycznych, hodowanych *ex vivo*, wprowadzonych do cytoplazmy dojrzałych *in vitro* enukleowanych oocytów, a następnie ulegających przeprogramowaniu aktywności transkrypcyjnej w przedimplantacyjnych zarodkach klonalnych świń. Do epigenetycznej transformacji komórek-dawców jąder zastosowano związki z grupy syntetycznych modulatorów procesów epigenetycznych modyfikacji kowalencyjnych białek histonowych rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej, tj. deacetylacji/acetylacji reszt lizyny histonów H3 i H4. Do związków tych należą wspomniane wcześniej niespecyficzne (nieselektywne) inhibitory deacetylaz histonowych, m.in. skryptaid czy trichostatyna A. Egzogenne modulacje epigenetyczne komórek somatycznych – dawców jąder w procedurze klonowania mogą wpływać na ułatwienie złożonych procesów strukturalnego przemodelowania chromatyny oraz epigenetycznego przeprogramowania genomu jądrowego w przedimplantacyjnej fazie rozwoju klonalnych zarodków świń. Scenariusz prawidłowego i pełnego przeprogramowania profilu pamięci epigenetycznej jąder komórek somatycznych w zarodkach klonalnych może zostać bowiem zrealizowany przez zwiększenie częstości pasywnej demetylacji reszt cytozyny DNA oraz osłabienie natężenia deacetylacji i metylacji reszt lizyny i podwyższenie poziomu metylacji reszt argininy histonów chromatyny komórek-dawców jąder

oraz zarodków, które uprzednio poddano egzogennym modyfikacjom epigenetycznym (Armstrong i in., 2006; Corry i in., 2009; Shi i Wu, 2009; Diao i in., 2013; Kumar i in., 2013).

Główny kierunek badań stanowiło określenie wpływu nowych lub standardowych modulatorów epigenetycznych z rodziny deacetylaz histonowych, tj. odpowiednio: skryptaidu i trichostatyny A, na pozaustrojowy potencjał rozwojowy oraz jakość klonalnych zarodków świń. W tym kontekście prowadzono badania, zmierzające do opracowania efektywnych strategii epigenetycznej transformacji hodowanych *in vitro* komórek-dawców jąder w klonowaniu somatycznym świń. Z tej przyczyny oceniano przeżywalność epigenetycznie modulowanych komórek fibroblastycznych w zależności od zastosowania różnych niespecyficznych inhibitorów deacetylaz histonów (HDACs), tzn. starej generacji (trichostatyna A; TSA) oraz nowej generacji (skryptaid). Obydwa przedstawiciele wyżej wymienionej klasy/rodziny inhibitorów HDACs stanowią amfifilowe pochodne kwasu hydroksyaminowego. TSA jest naturalnym metabolitem komórkowym (antybiotyk o działaniu przeciwrzybiczym – mykostatyk/antymykotyk), wyizolowanym ze szczepu promieniowców *Streptomyces sp.* i wykazuje wyższą aktywność cytotoksyczną niż skryptaid. W związku z tym, aby uzyskać maksymalną efektywność modyfikacji epigenetycznych w komórkach somatycznych, przy możliwie najniższym poziomie degeneracyjnych zmian komórek, musi być on stosowany w niższych stężeniach molowych (Wee i in., 2007; Wu i in., 2008; Lee i in., 2010; Bo i in., 2011). Skryptaid (syntetyczny analog kwasu hydroksyaminowego) charakteryzuje się natomiast słabszymi właściwościami cytotoksycznymi niż TSA, wskutek czego jego stosowanie jest wymagane w wyższych dawkach stężeniowych w celu osiągnięcia potencjalnie najwyższej wydajności modulacji epigenetycznych komórek, przy jednocześnie wysoko istotnym zmniejszeniu jego negatywnego oddziaływania na komórki (Van Thuan i in., 2009; Zhao i in., 2009, 2010 b; Wang i in., 2011 b; Wen i in., 2014).

Celem naukowym przeprowadzonych badań było opracowanie optymalnych metod indukowalnej modyfikacji epigenetycznej hodowanych *in vitro* komórek-dawców jąder, wykorzystanych do uzyskiwania zarodków świń przy

zastosowaniu techniki klonowania somatycznego. Celem praktycznym badań było z kolei zwiększenie kompetencji rozwojowych *in vitro* klonalnych zarodków świni oraz podwyższenie ich jakości w następstwie epigenetycznych modulacji aktywności transkrypcyjnej komórek somatycznych, użytych do mikrochirurgicznego zabiegu rekonstrukcji enukleowanych oocytów.

Materiał i metody

Hodowla *in vitro* i modulacja epigenomowa komórek fibroblastycznych, stanowiących źródło dawców jąder w klonowaniu somatycznym świń

W ramach zrealizowanych badań zostało wyprowadzonych 8 linii klonalnych (szczepów komórkowych) fibroblastów, pochodzących z biopłatów układu skórno-powłokowego czterech płodów oraz czterech dojrzałych płciowo osobników (trzech loszek i jednego knura). Konfluentne linie klonalne hodowanych *in vitro* komórek fibroblastycznych były pasażowane (podwojenie populacji). Uzyskane subpopulacje komórkowe były wysiewane w naczynkach hodowlanych, wypełnionych podstawową pożywką Eagle'a w modyfikacji Dulbecco (DMEM; ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Pożywka DMEM była wzbogacona dodatkiem 10% surowicy płodów bydłych (FBS), 5 ng mL⁻¹ rekombinowanego zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów człowieka (rh-bFGF), 2 mM L⁻¹ mieszaniny aminokwasów endogennych (NEAA), 2 mM L⁻¹ L-glutaminy (L-Gln), 0,36 mM L⁻¹ pirogronianu sodu oraz 1% mieszaniny antybiotyków i mykostatyków (AAS). 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, były inkubowane przez 24 godziny w pożywce, uzupełnionej dodatkiem

jednego z dwóch syntetycznych analogów endogennych inhibitorów deacetylaz białek histonowych chromatyny jądrowej (HDACs) – 50 nM L⁻¹ trichostatyny A (TSA; [R-(E,E)]-7-[4-(dimetylamino)fenylo]-N-hydroksy-4,6-dimetylo-7-oxy-2,4-heptadienoamid) lub 350 nM L⁻¹ skryptaidu (hydroksyamid kwasu 6-(1,3-dioksy-1H,3H-benzo[de]izokwinolin-2-yl)-heksanowego). Do klonowania somatycznego były użyte transformowane epigenetycznie (za pośrednictwem TSA lub skryptaidu) komórki-dawcy jąder (podgrupy eksperymentalne) lub nietransformowane epigenetycznie komórki-dawcy jąder (podgrupa kontrolna), pochodzące z wcześniej, tj. minimum jednokrotnie do maksimum pięciokrotnie pasażowanych linii klonalnych. Na potrzeby klonowania poszczególne subpopulacje komórkowe fibroblastów były intensywnie przemywane pożywką, pozbawioną modulatorów epigenetycznych (TSA lub skryptaidu), trypsynizowane i wirowane w celu uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek.

Dojrzewanie mejotyczne *in vitro* i selekcja oocytów-biorców jąder komórek fibroblastycznych na potrzeby klonowania somatycznego świń

Źródłem oocytów były jajniki loszek i loch uzyskiwane w lokalnej rzeźni. Niedojrzałe oocyty świni były pozyskiwane metodą aspiracji z antralnych pęcherzyków jajnikowych o średnicy 2–6 mm. Wyselekcjonowane do dojrzewania *in vitro* (IVM) oocyty w stadium pęcherzyka zarodkowego (diktiotenu profazy I podziału mejotycznego) były hodowane w grupach liczących 50–60 sztuk, w 500 μL pożywki TCM 199 (ang. *Tissue Culture Medium 199*), uzupełnionej 10% surowicy płodów bydłych (FBS), 10% płynu wyizolowanego z antralnych pęcherzyków jajnikowych świni (pFF), 5 ng mL⁻¹ rekombinowanego zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów człowieka (rh-bFGF), 10 ng mL⁻¹ rekombinowanego epidermalnego czynnika wzrostowego człowieka (rhEGF), 0,6 mM L⁻¹ L-cysteiny (L-Cys), 1 mM L⁻¹ cyklicznego dibutyryloadenozynomonofosforanu (dwumaślan cAMP/bukladezyna; db-cAMP) oraz 0,1 IU mL⁻¹ ludzkiej gonadotropiny menopauzalnej (hMG) i 5 mIU mL⁻¹ hormonu folikulo tropowego świni (pFSH). Po około 20–21 godzinach inkubacji oocyty były przenoszone do tej samej pożywki hodowlanej, lecz pozbawionej

db-cAMP oraz hMG i pFSH. W tych warunkach fizykochemicznych oocyty były hodowane *ex vivo* przez kolejne 23–24 godziny aż do czasu osiągnięcia dojrzałości jądrowej i cytoplazmatycznej. Dojrzałe *in vitro* oocyty z wyraźnie wyodrębnionymi ciałkami kierunkowymi I rzędu i jednolicie granulowaną cytoplazmą, nie wykazującą zmian nekrotycznych lub apoptotycznych, służyły jako biorcy dla jąder komórek fibroblastycznych w klonowaniu somatycznym świń.

Uzyskiwanie klonalnych zarodków świni oraz cytologiczna ocena ich jakości

Uwolnione z komórek wzgórka jajonośnego oocyty świni były enukleowane przy zastosowaniu metody mikrochirurgicznej, wspomaganą chemicznie (z użyciem demekolcyny, a następnie cytochalazyny B). E nukleowane oocyty (ooplasty) były rekonstruowane z jąder komórkowych modulowanych lub niemodulowanych epigenetycznie fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów lub dorosłych osobników. Do sztucznej aktywacji rekonstruowanych oocytów był zastosowany protokół jednoczesnej fuzji i aktywacji fizycznej (elektrycznej). W protokole tym impulsy prądu stałego, które indukowały fuzję kompleksów ooplast-komórka somatyczna, były równocześnie bodźcami inicjującymi aktywację zrekonstruowanych oocytów (hybryd jądrowo-cytoplazmatycznym/cybybryd klonalnych). Elektroporacja błon plazmatycznych enukleowanych oocytów oraz komórek fibroblastycznych była przeprowadzana w izotonicznym roztworze dielektryku o podwyższonym do 1 mM L⁻¹ stężeniu kationów wapnia (CaCl₂), z użyciem dwóch generowanych bezpośrednio po sobie impulsów prądu stałego o natężeniu pola elektrostatycznego 1,2 kV cm⁻¹ i czasie trwania 60 μs każdy.

Uzyskane, w następstwie sztucznej aktywacji, cybybrydowe zygoty klonalne były hodowane *in vitro* przez 144–168 godzin do osiągnięcia stadiów moruli/blastocysty. Do hodowli *ex vivo* zarodków wykorzystano system sekwencyjny, który był złożony z 96-godzinnej inkubacji cybybryd klonalnych w pożywce NCSU-23 (ang. *North Carolina State University-23*), uzupełnionej 0,4% frakcji V albuminy surowicy bydlęcej (BSA-V) oraz mieszaniną aminokwasów endo- i egzogennych (1% NEAA i 2% EAA), a następnie z ich 48–72-godzinnej inkubacji

w pożywce NCSU-23/BSA-V+NEAA+EAA, wzbogaconej dodatkiem 10% FBS. Potencjał rozwojowy zarodków klonalnych był oceniany w oparciu o aktywność podziałową oraz odsetek morul i blastocyst, uzyskanych w warunkach hodowli pozaustrojowej. Zarodki w stadium blastocysty były poddawane przyżyciowej ocenie ilościowej jakości morfologicznej/cytologicznej na podstawie całkowitej liczby komórek (barwienie nieróżnicowe komórek wężła zarodkowego i trofoblastu z użyciem fluorochromu Hoechst 33342, czyli *bisbenzimidu*).

Wyniki i ich omówienie

Określenie wpływu standardowych i nowych inhibitorów deacetylaz histonów (trichostatyny A i skryptaidu) na przeżywalność hodowanych *in vitro* komórek fibroblastycznych

Nie odnotowano negatywnego (cytotoksycznego i cytostatycznego/antymitogennego) wpływu syntetycznych analogów endogennych inhibitorów HDACs starej i nowej generacji, tj. odpowiednio: 50 nM L⁻¹ trichostatyny A (TSA) oraz 350 nM L⁻¹ skryptaidu, na tempo metabolizmu i potencjał proliferacyjny hodowanych *in vitro* obu rodzajów komórek fibroblastycznych (fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów oraz dorosłych osobników).

Inaczej mówiąc, przeżywalność i kinetyka podziałów komórkowych w obrębie klonalnych linii fibroblastów, które poddawano TSA- lub skryptaido-zależnej modulacji epigenetycznej, nie ulegały obniżeniu w stosunku do wskaźników fizjologicznej żywotności i aktywności mitotycznej niemodulowanych epigenetycznie szczepów komórkowych.

Wydatność procesu pozaustrojowego dojrzewania mejotycznego oocytów

Efektywność dojrzewania mejotycznego oocytów w warunkach sekwencyjnej, dwustopniowej hodowli *in vitro*, która była złożona z etapu I (20-godzinna inkubacja oocytów w pożywce uzupełnionej dodatkiem inhibitora procesu rozpadu otoczki jądrowej pęcherzyka zarodkowego – db-cAMP oraz liofilizatów hormonalnych – hMG i pFSH) oraz z etapu II (22–24-godzinna inkubacja oocytów w pożywce nie zawierającej db-cAMP oraz hMG i pFSH), wyno-

siła 96,9% (248 dojrzałych oocytów w stosunku do 256 hodowanych).

Ocena kompetencji rozwojowych *in vitro* i jakości klonalnych zarodków świni, zrekonstruowanych z jąder komórkowych epigenetycznie modulowanych oraz niemodulowanych fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów lub dorosłych osobników

W tabelach 1 i 2 przedstawiono wyniki, dotyczące pozaustrojowych zdolności rozwojowych oraz jakości klonalnych zarodków świni, zrekonstruowanych z jąder dwóch typów epigenetycznie transformowanych komórek fibroblastycznych (fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów i dorosłych osobników) w zależności od zastosowania nieselektywnych inhibitorów deacetylaz histonów (HDACs) nowej i starej generacji, tj. odpowiednio: skryptaidu i trichostatyny A (TSA). Podgrupy kontrolne stanowiły zarodki, zrekonstruowane z jąder komórkowych niemodulowanych epigenetycznie fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów lub dorosłych osobników.

Wyniki przeprowadzonych badań jednoznacznie wskazują, że potencjał rozwojowy *in vitro* i jakość zarodków, zrekonstruowanych z jąder fibroblastów układu skórno-powłokowego płodów lub dorosłych osobników, które zostały poddane skryptaido-zależnej modulacji epigenetycznej aktywności transkrypcyjnej genomowego DNA (odpowiednio: podgrupy IA i IIA), ulegają znaczącemu podwyższeniu w stosunku do potencjału rozwojowego i jakości zarodków, zrekonstruowanych z jąder komórek fibroblastycznych, podlegających TSA-zależnej transformacji epigenomowej (podgrupy IB i IIB) oraz w stosunku do potencjału rozwojowego i jakości zarodków, zrekonstruowanych z jąder komórkowych niemodulowanych epigenetycznie fibroblastów (podgrupy kontrolne IC i IIC). Potwierdza to statystycznie istotny wzrost zarówno odsetka dzielących się zarodków (87,9% *versus* 73,2%; 75,4% *versus* 63,5%), jak i odsetka morul (65,5% *versus* 51,8%; 54,4% *versus* 42,3%) oraz blastocyst (41,4% *versus* 28,6%; 31,6% *versus* 17,3%), a także wzrost średniej liczby komórek blastocyst (38,8 *versus* 27,6; 32,4 *versus* 23,3) w podgrupach IA i IIA klonalnych zygot, uzyskanych w wyniku elektroaktywacji oocytów, do cytoplazmy których wprowadzono

genomowy DNA transformowanych epigenetycznie przy użyciu skryptaidu komórek fibroblastycznych, pochodzących z tkanki skórno-powłokowej płodów lub dorosłych osobników, w porównaniu z podgrupami IB i IIB klonalnych zygot, uzyskanych w następstwie elektroaktywacji oocytów, zrekonstruowanych z jąder komórek fibroblastycznych o aktywności transkrypcyjnej, modyfikowanej epigenetycznie za pośrednictwem TSA. Odnotowano ponadto, że odsetek dzielących się zarodków (87,9% *versus* 59,7%; 75,4% *versus* 47,9%), odsetek morul (65,5% *versus* 40,3%; 54,4% *versus* 29,6%) i blastocyst (41,4% *versus* 16,4%; 31,6% *versus* 8,5%) oraz średnia liczba komórek w blastocystach (38,8 *versus* 19,3; 32,4 *versus* 17,6) były istotnie wyższe w doświadczalnych podgrupach IA oraz IIA klonalnych zygot, zrekonstruowanych z jąder komórkowych fibroblastów, poddanych skryptaido-zależnej transformacji epigenomowej niż w kontrolnych podgrupach IC oraz IIC zygot, zrekonstruowanych z jąder niemodulowanych epigenetycznie komórek fibroblastycznych.

Podobną, statystycznie istotną, tendencję wzrostową w odsetkach dzielących się zarodków (73,2% *versus* 59,7%; 63,5% *versus* 47,9%), uzyskach morul (51,8% *versus* 40,3%; 42,3% *versus* 29,6%) i blastocyst (28,6% *versus* 16,4%; 17,3% *versus* 8,5%) oraz w średnich liczbach komórek w blastocystach (27,6 *versus* 19,3; 23,3 *versus* 17,6) zaobserwowano wśród pochodzących z eksperymentalnych podgrup IB oraz IIB klonalnych zygot, zrekonstruowanych z jąder komórek fibroblastycznych, które zostały epigenetycznie zmodyfikowane przy wykorzystaniu TSA, w odniesieniu do pochodzących z kontrolnych podgrup IC oraz IIC zygot, zrekonstruowanych z jąder komórkowych fibroblastów nie podlegających modulacji epigenomowej.

Potencjał rozwojowy oraz jakość klonalnych zarodków świni są w dużej mierze uwarunkowane stopniem zaawansowania epigenetycznych modyfikacji DNA jądrowego komórek somatycznych, poddawanych długotrwałej hodowli *in vitro*.

Modulacja profilu pamięci epigenetycznej (tj. schematu metylacji DNA oraz acetylacji histonów) w hodowanych *ex vivo* komórkach somatycznych – dawcach jąder może bowiem zależeć od indukcji nukleosomowej supresji

transkrypcyjnej przez różne warunki hodowli *in vitro* (np. inhibicję kontaktową w stanie pełnej konfluencji lub głodzenie komórek) (Cezar i in., 2003; Beaujean i in., 2004; Wee i in., 2007).

Tabela 1. Wpływ epigenetycznych modulatorów z grupy egzogennych inhibitorów HDACs nowej i starej generacji na potencjał rozwojowy *in vitro* oraz jakość klonalnych zarodków świni, zrekonstruowanych z jąder komórkowych fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów

*Table 1. Effect of epigenetic modulators originating from the group of exogenous HDAC inhibitors of new and old generation on the *in vitro* developmental potential and quality of porcine cloned embryos reconstructed with the cell nuclei of fibroblasts derived from foetal dermo-integumentary tissue*

Strategia epigenetycznej modulacji komórek-dawców jąder <i>Strategy applied to epigenetic modulation of nuclear donor cells</i>	Liczba rekonstruowanych oocytów <i>Number of reconstituted oocytes (n)</i>	Liczba (odsetek)* hodowanych zarodków klonalnych <i>Number of cultured cloned embryos (%)*</i>	Liczba (odsetek)* dzielących się zarodków <i>Number of cleaved embryos (%)*</i>	Liczba (odsetek)* morul <i>Number of morulae (%)*</i>	Liczba (odsetek)* blastocyst <i>Number of blastocysts (%)*</i>	Średnia (\bar{x})** i maksymalna liczba komórek w blastocystach <i>Mean (\bar{x})** and maximum cell number in blastocysts (n)</i>
+ Skryptaido-zależna (podgrupa IA) <i>Scriptaid-dependent (subgroup IA)</i>	62	58/62 (93,5) a	51/58 (87,9) A	38/58 (65,5) A	24/58 (41,4) A	\bar{x} = 38,8 B max = 44,0 (n = 24)
+ TSA-zależna (podgrupa IB) <i>TSA-dependent (subgroup IB)</i>	63	56/63 (88,9) a	41/56 (73,2) B	29/56 (51,8) B	16/56 (28,6) B	\bar{x} = 27,6 D max = 33,0 (n = 16)
- Podgrupa kontrolna (IC) <i>Control subgroup (IC)</i>	76	67/76 (88,2) a	40/67 (59,7) C	27/67 (40,3) D	11/67 (16,4) D	\bar{x} = 19,3 C max = 26,0 (n = 11)

a,a – Jednakowe wskaźniki (małe litery alfabetu) przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają brak statystycznie istotnych różnic między poszczególnymi podgrupami zarodków klonalnych z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $P > 0,05$.

A,B; A,C; A,D; B,C – Niejednakowe wskaźniki (duże litery alfabetu) przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie bardzo wysoko istotne różnice między podgrupami z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $P \leq 0,001$.

B,D; C,D – Niejednakowe wskaźniki (duże litery alfabetu) przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie wysoko istotne różnice między podgrupami z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $0,001 < P \leq 0,01$.

* Test χ^2 ; ** Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) przy wykorzystaniu testu *t*-Studenta.

a,a – Identical indicators (small letters) next to values within columns denote the lack of statistically significant differences between cloned embryo subgroups with random error probability of $P > 0.05$.

A,B; A,C; A,D; B,C – Different indicators (capital letters) next to values within columns denote very highly significant differences between subgroups with random error probability of $P \leq 0.001$.

B,D; C,D – Different indicators (capital letters) next to values within columns denote highly significant differences between subgroups with random error probability of $0.001 < P \leq 0.01$.

* χ^2 test; ** One-way analysis of variance (ANOVA) using Student's *t*-test.

Tabela 2. Wpływ epigenetycznych modulatorów z grupy egzogennych inhibitorów HDACs nowej i starej generacji na potencjał rozwojowy *in vitro* oraz jakość klonalnych zarodków świni, zrekonstruowanych z jąder komórkowych fibroblastów tkanki skórno-powłokowej dorosłych osobników
 Table 2. Effect of epigenetic modulators originating from the group of exogenous HDAC inhibitors of new and old generation on the *in vitro* developmental potential and quality of porcine cloned embryos reconstructed with the cell nuclei of fibroblasts derived from adult dermo-integumentary tissue

Strategia epigenetycznej modulacji komórek-dawców jąder <i>Strategy applied to epigenetic modulation of nuclear donor cells</i>	Liczba rekonstruowanych oocytów <i>Number of reconstituted oocytes (n)</i>	Liczba (odsetek)* hodowanych zarodków klonalnych <i>Number of cultured cloned embryos (%)*</i>	Liczba (odsetek)* dzielących się zarodków <i>Number of cleaved embryos (%)*</i>	Liczba (odsetek)* morul <i>Number of morulae (%)*</i>	Liczba (odsetek)* blastocyst <i>Number of blastocysts (%)*</i>	Średnia (\bar{x})** i maksymalna liczba komórek w blastocystach <i>Mean (\bar{x})** and maximum cell number in blastocysts (n)</i>
+ Skryptaido-zależna (podgrupa IIA) <i>Scriptaid-dependent (subgroup IIA)</i>	63	57/63 (90,5) a	43/57 (75,4) A	31/57 (54,4) A	18/57 (31,6) A	$\bar{x} = 32,4$ A max = 36,0 (n = 18)
+ TSA-zależna (podgrupa IIB) <i>TSA-dependent (subgroup IIB)</i>	60	52/60 (86,7) a	33/52 (63,5) B	22/52 (42,3) B	9/52 (17,3) aC	$\bar{x} = 23,3$ aB max = 29,0 (n = 9)
- Podgrupa kontrolna (IIC) <i>Control subgroup (IIC)</i>	84	71/84 (84,5) a	34/71 (47,9) C	21/71 (29,6) C	6/71 (8,5) bD	$\bar{x} = 17,6$ bD max = 22,0 (n = 6)

a,b – Niejednakowe wskaźniki (małe litery alfabetu) przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie istotne różnice między poszczególnymi podgrupami zarodków klonalnych z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $0,01 < P \leq 0,05$.

A,B – Niejednakowe wskaźniki (duże litery alfabetu) przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie wysoko istotne różnice między podgrupami z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $0,001 < P \leq 0,01$.

A,C; A,D; B,C – Niejednakowe wskaźniki (duże litery alfabetu) przy wartościach umieszczonych w obrębie kolumn oznaczają statystycznie bardzo wysoko istotne różnice między podgrupami z prawdopodobieństwem popełnienia błędu losowego $P \leq 0,001$.

* Test χ^2 ; ** Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) przy wykorzystaniu testu *t*-Studenta.

a,b – Different indicators (small letters) next to values within columns denote statistically significant differences between cloned embryo subgroups with random error probability of $0,01 < P \leq 0,05$.

A,B – Different indicators (capital letters) next to values within columns denote highly significant differences between subgroups with random error probability of $0,001 < P \leq 0,01$.

A,C; A,D; B,C – Different indicators (capital letters) next to values within columns denote very highly significant differences between subgroups with random error probability of $P \leq 0,001$.

* χ^2 test; ** One-way analysis of variance (ANOVA) using Student's *t*-test.

Synchronizacja cyklu podziałowego komórek-dawców jąder w fazach G1/G0 lub G0/G1 odgrywa znaczącą rolę w prawidłowym przeprogramowaniu profilu pamięci epigenetycznej egzogenego jądra w środowisku cytoplazmatycznym oocyty-biorcy (Campbell i Alberio, 2003; Skrzyszowska i in., 2006). Wprowadzenie komórki somatycznej w stan spoczynkowy, jakim jest faza G0, przy wykorzystaniu różnych metod synchronizacji cyklu komórkowego powoduje „wyciszenie” jej genów wskutek zahamowania ich aktywności transkrypcyjnej.

Supresja, tj. uśpienie (ang. *quiescence*) potencjału proliferacyjnego komórek-dawców oraz represja transkrypcyjna i metaboliczna ich genomu jądrowego mogą być spowodowane czynnikami zadanymi eksperymentalnie lub występować naturalnie po osiągnięciu przez komórkę stanu pełnego zróżnicowania.

Silnie skondensowana chromatyna jądrowa z wyraźnymi symptomami represji nukleosomowej wielu regionów DNA genomowego po wprowadzeniu do oocyty-biorcy, poddanego następnie sztucznej aktywacji zarodkowego programu rozwojowego, prawidłowo reaguje na sygnały biochemiczne, płynące z jego środowiska cytoplazmatycznego, tzn. na inhibicję aktywności enzymatycznej metylotransferaz DNA (DNMT 1 oraz 3a/b) oraz wzrost aktywności biokatalitycznej acetylaz histonów rdzenia nukleosomowego H3 i H4. Umożliwia to pełne przeprogramowanie pamięci epigenetycznej egzogenego jądra somatogenicznego, ulegającego kolejnym podziałom kariokinetycznym w przedimplantacyjnych zarodkach klonalnych świń i innych gatunków ssaków (Kang i in., 2001 a; Dean i in., 2003; Beaujean i in., 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2005).

Z dotychczasowych eksperymentów nad klonowaniem świń wynika, że źródłem komórek somatycznych, najbardziej podatnych na epigenetyczne przeprogramowanie jądrowego i mitochondrialnego genomu w zrekonstruowanych zarodkach, są fibroblasty płodowe, a także fibroblasty tkanki skórnej dorosłych osobników, których cykl mitotyczny został zsynchronizowany *in vitro* w stadiach G1/G0 lub G0/G1 w wyniku ich hodowli do stanu pełnej konfluencji lub głodzenia (Park i in., 2002; Hyun i in., 2003 a,b; Lee i in., 2003 a,b). Po osiągnięciu 100% konfluencji, komórki somatyczne podlegają zaha-

mowaniu kontaktowemu podziałów mitotycznych wskutek opanowania całej dostępnej powierzchni naczynka hodowlanego, tj. substratu. Jest to stan, w którym gęstość komórek limituje ich migrację i proliferacyjny wzrost (Onishi i in., 2000; Betthausen i in., 2000; Polejaeva i in., 2000). Alternatywny system synchronizacji faz cyklu podziałowego, jakim jest głodzenie, określane również mianem deprywacji troficznej komórek-dawców jąder, polega na gwałtownym i długotrwałym obniżeniu (z 10% do 0,5%) stężenia surowicy płodów bydłęcych (FBS; ang. *foetal bovine serum*) w pożywce hodowlanej, tj. głównego źródła mitogenów, polipeptydowych czynników wzrostowych oraz czynników odżywczych (budulcowych i energetycznych) (Ramsoondar i in., 2003; Kawano i in., 2004). Z kolei, takie warunki hodowli *in vitro* mogą powodować drastyczny przyrost stopnia metylacji reszt cytozyny genomowego DNA oraz niekontrolowane zwiększenie stopnia deacetylacji reszt lizyny histonów chromatyny jądrowej w komórkach somatycznych. Może to być przyczyną znacznych odchyień od prawidłowego wzorca ekspresji, kluczowych zarówno dla rozwoju przed- jak i poimplantacyjnego klonalnych zarodków świń, genów na skutek ograniczonej demetylacji DNA i wzmożonej hypoacetylacji histonów rdzenia nukleosomowego oraz wynikającej z tego represji transkrypcyjnej przeważającej części somatogenicznego genomu jądrowego (Kang i in., 2001 b; Cezar i in., 2003). Jednakże, zachowanie prawidłowego wzorca metylacji DNA i acetylacji/metylacji histonów podczas hodowli *in vitro* komórek-dawców jąder jest jednym z czynników, niezbędnych do skutecznego epigenetycznego przeprogramowania transplantowanego genomowego DNA (Onishi i in., 2000; Kang i in., 2001 b; Cezar i in., 2003; Shi i in., 2003 a; Enright i in., 2005). W celu pełnego przeprogramowania jądra dawcy w zrekonstruowanym zarodku, cały wzorzec metylacji DNA (tkankowo-specyficzny) wysoko zróżnicowanych komórek linii somatycznej musi zostać cofnięty do początkowego (totipotentnego) statusu rozwojowego jądra zygoty na drodze demetylacji reszt cytozyny (Dean i in., 2003; Hiendleder i in., 2004; Wang i in., 2007). Ten tkankowo-specyficzny stopień zróżnicowania komórkowego (cytodyferencjacji) może być uwarunkowany zmiennością we wzorcu ekspre-

sji genów w komórkach o różnym fenotypie i specjalizacji strukturalno-funkcjonalnej, wynikającą z różnic we frekwencjach represji transkrypcyjnej oraz aktywności transkrypcyjnej genomowego DNA poszczególnych typów komórek somatycznych.

A zatem, stosowane na szeroką skalę metody synchronizacji cyklu mitotycznego hodowanych komórek-dawców jąder w fazach G0/G1 lub G1/G0, takie jak: głodzenie (deprywacja troficzna) lub zahamowanie kontaktowe ich aktywności proliferacyjnej, mogą mieć niekorzystny wpływ na epigenomowo-zależny profil aktywności transkrypcyjnej genów jądrowego i mitochondrialnego DNA poprzez drastyczne osłabienie poziomu tkankowo-specyficznego ekspresji genomu (Enright i in., 2003; Yang i in., 2007 b). Obniżenie aktywności transkrypcyjnej genomowego DNA może być bowiem spowodowane gwałtownym wzrostem częstotliwości takich zmian w pamięci epigenetycznej komórki, jak procesy metylacji reszt cytozyny DNA oraz procesy deacetylacji i metylacji reszt lizyny, a także procesy demetylacji reszt argininy histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. Jednakże, te szkodliwe dla funkcji fizjologicznych i przeżywalności komórek transformacje biochemiczne genomu jądrowego, które są indukowane w warunkach hodowli *in vitro*, można zahamować, a nawet odwrócić ich przebieg w kierunku wzrostu poziomu ekspresji genów, korzystnego dla aktywności metabolicznej i proliferacyjnej komórek (Shi i in., 2003 b; Enright i in., 2005). Jednym ze sposobów odwrócenia zaawansowanych zmian we wzorcu kowalencyjnych modyfikacji epigenetycznych jąder komórek somatycznych, które obejmują gwałtowną metylację DNA lub spadek poziomu acetylacji białek histonowych, wydaje się ich ekspozycja na działanie syntetycznych analogów endogennych związków odwracalnie hamujących aktywność metylotransferaz DNA (DNMTs) oraz deacetylaz histonów (HDACs). Do pierwszej grupy sztucznych modyfikatorów epigenetycznych należą: 1) 5-aza-2'-deoksycytydyna (decytabina; 5-aza-dC) (Enright i in., 2003, 2005; Ding i in., 2008; Wang i in., 2011 a; Ning i in., 2013) i 2) S-adenozylohomocysteina (SAH) (Jeon i in., 2008). Z kolei, druga grupa obejmuje: 1) trichostatynę A (TSA; N-arylowa/N-fenylowa pochodna kwasu hydroksyamino-

go/hydroksamowego) (Enright i in., 2003; Kishigami i in., 2006; Wee i in., 2007; Lee i in., 2010; Bo i in., 2011; Samiec i in., 2015); 2) butanian/maślan sodu (NaBu) (Yang i in., 2007 c; Das i in., 2010; Liu i in., 2012; Kumar i in., 2013) oraz 3) bishydroksyamid kwasu m-karboksycynaminowego (CBHA) (Dai i in., 2010; Song i in., 2014). Spośród inhibitorów HDACs o relatywnie niższych właściwościach cytotoksycznych lub embriotoksycznych należy wskazać: 4) kwas walproinowy (VPA, ang. *valproic acid*; kwas 2-propylopentanowy/kwas 2-propyłowalerianowy) lub walproinian sodu (SV, ang. *sodium valproate*; 2-propylopentanian sodu/2-propyłowalerian sodu) (Costa-Borges i in., 2010; Kim i in., 2011; Sangalli i in., 2014); 5) oksamflatynę (aromatyczna/N-fenylowa pochodna sulfonoamidu kwasu hydroksamowego) (Su i in., 2011; Park i in., 2012), a także 6) nowatorski analog, tj. syntetyczną, amfifilową pochodną kwasu hydroksamowego – skryptaid (ang. *scriptaid*; hydroksyamid kwasu 6-(1,3-dioksy-1*H*,3*H*-benzo[de]izokwinolin-2-yl)-heksanowego) (Van Thuan i in., 2009; Zhao i in., 2009, 2010 b; Xu i in., 2013; Wen i in., 2014). Wyniki badań własnych (Samiec i Skrzyszowska, 2011 a,b, 2012, 2013 a,b, 2014 a,b; Samiec i in., 2015), a także innych autorów (Enright i in., 2003; Wee i in., 2007; Zhao i in., 2009, 2010 a,b) sugerują, że zastosowanie skryptaidu lub trichostatyny A do egzogennej modulacji epigenomowej hodowanych *in vitro* fibroblastycznych komórek-dawców jąder, dojrzewających *in vitro* oocytów-biorców jąder lub zarodków klonalnych może mieć pozytywny wpływ na złożone procesy strukturalnego przemodelowania chromatyny jądrowej oraz epigenetycznego przeprogramowania genomowego DNA w przedimplantacyjnej fazie rozwoju zarodków klonalnych. Scenariusz prawidłowego i pełnego przeprogramowania profilu pamięci epigenetycznej jąder somatogenicznych w komórkach zarodków klonalnych świni i innych gatunków ssaków może bowiem zostać zrealizowany jedynie przez zwiększenie częstości pasywnej demetylacji reszt cytozyny DNA oraz osłabienie natężenia deacetylacji i metylacji reszt lizyny, a także nasilenie stopnia metylacji reszt argininy histonów chromatyny komórek-dawców jąder i zarodków, które uprzednio poddano egzogennym modyfikacjom epigenomowym (Yang i in., 2007 b,c;

Zhang i in., 2007; Shi i in., 2008; Cervera i in., 2009; Yamanaka i in., 2009). Pośrednim wskaźnikiem właściwego przebiegu procesu epigenetycznego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej jąder komórek somatycznych w zarodkach klonalnych świni jest ich wysoki przedimplantacyjny potencjał rozwojowy (Cervera i in., 2009; Yamanaka i in., 2009; Zhao i in., 2009, 2010 a; Martinez-Diaz i in., 2010).

Podsumowanie

Epigenetyczna transformacja, podlegających inhibicji kontaktowej fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów oraz dorosłych osobników świni, przy użyciu 50 nM L⁻¹ trichostatyny A (TSA) lub 350 nM L⁻¹ skryptaidu, nie powodowała obniżenia przeżywalności i potencjału proliferacyjnego hodowanych *in vitro* komórek w stosunku do aktywności metabolicznej i kinetyki podziałów mitotycznych niemodulowanych epigenetycznie szczepów komórkowych.

Zdolności jąder komórkowych epigenetycznie transformowanych fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów do pokierowania pozaustrojowym rozwojem klonalnych zarodków świni były wyższe niż zdolności jąder fibroblastów tkanki skórno-powłokowej dorosłych osobników, niezależnie od rodzaju zastosowanych inhibitorów deacetylaz histonów (HDACs).

Ponadto, modulacja epigenetyczna, zarówno fibroblastów tkanki skórno-powłokowej płodów, jak i fibroblastów tkanki skórno-

powłokowej dorosłych osobników za pośrednictwem skryptaidu (inhibitor HDACs nowej generacji) skutkowała istotnie wyższym potencjałem rozwojowym *in vitro* zarodków klonalnych niż modulacja epigenetyczna komórek fibroblastycznych za pośrednictwem TSA (inhibitor HDACs starej generacji).

Kompetencje genomu jądrowego transformowanych epigenetycznie (przy użyciu skryptaidu lub TSA) komórek fibroblastycznych do pokierowania rozwojem *ex vivo* klonalnych zarodków świni do stadiów moruli i blastocysty były istotnie wyższe niż kompetencje genomu jądrowego niemodulowanych epigenetycznie komórek fibroblastycznych, bez względu na ich pochodzenie/rodowód oraz cytologiczny wiek ontogenetyczny.

Z kolei, ilościowa analiza cytochemiczna klonalnych blastocyst świni przy użyciu *bis*-benzimidu (fluorochromu Hoechst 33342) wykazała znacznie wyższą jakość morfologiczną zarodków, zrekonstruowanych z jąder komórek fibroblastycznych, poddanych skryptaido-zależnej transformacji epigenetycznej, nie tylko w porównaniu z jakością zarodków zrekonstruowanych z jąder komórkowych fibroblastów, podlegających TSA-zależnej transformacji epigenetycznej, lecz także w porównaniu z jakością zarodków zrekonstruowanych z jąder niemodulowanych epigenetycznie fibroblastów, niezależnie od ich rodowodu oraz cytologicznego stadium rozwoju osobniczego (ontogenezy).

Literatura

Armstrong L., Lako M., Dean W., Stojkovic M. (2006). Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells*, 24: 805–814.

Beaujean N., Taylor J., Gardner J. Wilmot 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.

Betthausen J., Forsberg E., Augenstein M., Childs L., Eilertsen K., Enos J., Forsythe T., Golueke P., Jurgella G., Koppang R., Lesmeister T., Mallon K., Mell G., Misica P., Pace M., Pfister-Genskow M., Strelchenko N., Voelker G., Watt S., Thompson S., Bishop M. (2000). Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat. Biotechnol.*, 18: 1055–1059.

Bo F., Di L., Qing-Chang F., Liang R., Hong M., Liang W., Zhen-Hua G., Zhong-Qiu L. (2011). Effect of trichostatin A on transfected donor cells and subsequent development of porcine cloned embryos. *Zygote*, 19: 237–243.

Bonk A.J., Cheong H.T., Li R., Lai L., Hao Y., Liu Z., Samuel M., Ferguson E.A., Whitworth K.M., Murphy C.N., Antoniou E., Prather R.S. (2007). Correlation of developmental differences of nuclear transfer embryos cells to the methylation profiles of nuclear transfer donor cells in swine. *Epigenetics*, 2: 179–186.

Bonk A.J., Li R., Lai L., Hao Y., Liu Z., Samuel M., Ferguson E.A., Whitworth K.M., Murphy C.N., Antoniou E., Prather R.S. (2008). Aberrant DNA

- methylation in porcine *in vitro*-, parthenogenetic-, and somatic cell nuclear transfer-produced blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.*, 75: 250–264.
- Campbell K.H.S., Alberio R. (2003). Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reproduction*, 61 (Suppl.): 477–494.
- Cervera R.P., Martí-Gutiérrez N., Escorihuela E., Moreno R., Stojkovic M. (2009). Trichostatin A affects histone acetylation and gene expression in porcine somatic cell nucleus transfer embryos. *Theriogenology*, 72: 1097–1110.
- Cezar G.G., Bartolomei M.S., Forsberg E.J., First N.L., Bishop M.D., Eilertsen K.J. (2003). Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.*, 68: 1009–1014.
- Corry G.N., Tanasijevic B., Barry E.R., Krueger W., Rasmussen T.P. (2009). Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation development. *Birth Defects Res. C Embryo Today*, 87: 297–313.
- Costa-Borges N., Santaló J., Ibáñez E. (2010). Comparison between the effects of valproic acid and trichostatin A on the *in vitro* development, blastocyst quality, and full-term development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.*, 12: 437–446.
- Dai X., Hao J., Hou X.J., Hai T., Fan Y., Yu Y., Jouneau A., Wang L., Zhou Q. (2010). Somatic nucleus reprogramming is significantly improved by *m*-carboxycinnamic acid *b*ishydroxamide, a histone deacetylase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 285: 31002–31010.
- Das Z.C., Gupta M.K., Uhm S.J., Lee H.T. (2010). Increasing histone acetylation of cloned embryos, but not donor cells, by sodium butyrate improves their *in vitro* development in pigs. *Cell. Reprogram.*, 12: 95–104.
- Dean W., Santos F., Reik W. (2003). Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 14: 93–100.
- Diao Y.F., Naruse K.J., Han R.X., Li X.X., Oqani R.K., Lin T., Jin D.I. (2013). Treatment of fetal fibroblasts with DNA methylation inhibitors and/or histone deacetylase inhibitors improves the development of porcine nuclear transfer-derived embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 141: 164–171.
- Ding X., Wang Y., Zhang D., Wang Y., Guo Z., Zhang Y. (2008). Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology*, 70: 622–630.
- Eilertsen K.J., Power R.A., Harkins L.L., Misica P. (2007). Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, 98: 129–146.
- Enright B.P., Kubota C., Yang X., Tian X.C. (2003). Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.*, 69: 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.
- Hiendleder S., Mund C., Reichenbach H.D., Wenigerkind H., Brem G., Zakhartchenko V., Lyko F., Wolf E. (2004). Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by *in vitro* techniques. *Biol. Reprod.*, 71: 217–223.
- 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 a). Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. *Theriogenology*, 59: 1641–1649.
- Hyun S., Lee G., Kim D., Kim H., Lee S., Nam D., Jeong Y., Kim S., Yeom S., Kang S., Han J., Lee B., Hwang W. (2003 b). Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol. Reprod.*, 69: 1060–1068.
- Jeon B.G., Coppola G., Perrault S.D., Rho G.J., Betts D.H., King W.A. (2008). S-adenosylhomocysteine treatment of adult female fibroblasts alters X-chromosome inactivation and improves *in vitro* embryo development after somatic cell nuclear transfer. *Reproduction*, 135: 815–828.
- Kang Y.K., Koo D.B., Park J.S., Choi Y.H., Kim H.N., Chang W.K., Lee K.K., Han Y.M. (2001 a). Typical demethylation events in cloned pig embryos. Clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome. *J. Biol. Chem.*, 276: 39980–39984.
- Kang Y.K., Koo D.B., Park J.S., Choi Y.H., Chung A.S., Lee K.K., Han Y.M. (2001 b). Aberrant

- methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat. Genet.*, 28: 173–177.
- Kawano K., Kato Y., Tsunoda Y. (2004). Comparison of *in vitro* development of porcine nuclear-transferred oocytes receiving fetal somatic cells by injection and fusion methods. *Cloning Stem Cells*, 6: 67–72.
- Kim Y.J., Ahn K.S., Kim M., Shim H. (2011). Comparison of potency between histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on enhancing *in vitro* development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 47: 283–289.
- 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.
- Kumar B.M., Maeng G.H., Lee Y.M., Lee J.H., Jeon B.G., Ock S.A., Kang T., Rho G.J. (2013). Epigenetic modification of fetal fibroblasts improves developmental competency and gene expression in porcine cloned embryos. *Vet. Res. Commun.*, 37: 19–28.
- 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 a). Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. *Theriogenology*, 59: 1949–1957.
- Lee J.W., Wu S.C., Tian X.C., Barber M., Hoagland T., Riesen J., Lee K.H., Tu C.F., Cheng W.T.K., Yang X. (2003 b). Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol. Reprod.*, 69: 995–1001.
- Lee H.S., Yu X.F., Bang J.I., Cho S.J., Deb G.K., Kim B.W., Kong I.K. (2010). Enhanced histone acetylation in somatic cells induced by a histone deacetylase inhibitor improved inter-generic cloned leopard cat blastocysts. *Theriogenology*, 74: 1439–1449.
- Li J., Svarcova O., Villemoes K., Kragh P.M., Schmidt M., Bøgh I.B., Zhang Y., Du Y., Lin L., Purup S., Xue Q., Bolund L., Yang H., Maddox-Hyttel P., Vajta G. (2008). High *in vitro* development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology*, 70: 800–808.
- Liu L., Liu Y., Gao F., Song G., Wen J., Guan J., Yin Y., Ma X., Tang B., Li Z. (2012). Embryonic development and gene expression of porcine SCNT embryos treated with sodium butyrate. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, 318: 224–234.
- Martinez-Diaz M.A., Che L., Alborno M., Seneda M.M., Collis D., Coutinho A.R., El-Beirouthi N., Laurin D., Zhao X., Bordignon V. (2010). Pre- and postimplantation development of swine-cloned embryos derived from fibroblasts and bone marrow cells after inhibition of histone deacetylases. *Cell. Reprogram.*, 12: 85–94.
- Narbonne P., Miyamoto K., Gurdon J.B. (2012). Reprogramming and development in nuclear transfer embryos and in interspecific systems. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 22: 450–458.
- Ning S.F., Li Q.Y., Liang M.M., Yang X.G., Xu H.Y., Lu Y.Q., Lu S.S., Lu K.H. (2013). Methylation characteristics and developmental potential of Guangxi Bama minipig (*Sus scrofa domestica*) cloned embryos from donor cells treated with trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Zygote*, 21: 178–186.
- Onishi A., Iwamoto M., Akita T., Mikawa S., Takeda K., Awata T., Hanada H., Perry A.C.F. (2000). Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289: 1188–1190.
- 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.
- Park S.J., Park H.J., Koo O.J., Choi W.J., Moon J.H., Kwon D.K., Kang J.T., Kim S., Choi J.Y., Jang G., Lee B.C. (2012). Oxamflatin improves developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.*, 14: 398–406.
- Polejaeva J.A., Chen S.H., Vaught T.D., Page R.L., Mullins J., Ball S., Dai Y., Boone J., Walker S., Ayares D.L., Colman A., Campbell K.H.S. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407: 86–90.
- Prather R.S., Ross J.W., Isom S.C., Green J.A. (2009). Transcriptional, post-transcriptional and epigenetic control of porcine oocyte maturation and embryogenesis. *Soc. Reprod. Fertil., Suppl.*, 66: 165–176.
- Ramsoondar J.J., Machaty Z., Costa C., Williams B.L., Fodor W.L., Bondioli K.R. (2003). Production

- of α 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human α 1,2-fucosyltransferase. *Biol. Reprod.*, 69: 437–445.
- Reik W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447: 425–432.
- Rodriguez-Osorio N., Urrego R., Cibelli J.B., Eilertsen K., Memili E. (2012). Reprogramming mammalian somatic cells. *Theriogenology*, 78: 1869–1886.
- Samiec M. (2004). Development of pig cloning studies: past, present and future. *J. Anim. Feed Sci.*, 13: 211–238.
- Samiec M. (2005). The effect of mitochondrial genome on architectural remodeling and epigenetic reprogramming of donor cell nuclei in mammalian nuclear transfer-derived embryos. *J. Anim. Feed Sci.*, 14: 393–422.
- 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: a review. *Czech J. Anim. Sci.*, 50: 185–195.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2011 a). *In vitro* development of nuclear-transferred pig embryos following use of trichostatin A for epigenetic transformation of both recipient oocytes and nuclear donor somatic cells. *Reprod. Domest. Anim.*, 46 (Suppl. 3); *Proc. 15th Annual Conf. European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR)*, 15–17.09.2011, Belek-Antalya (Turkey), p. 146.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2011 b). Wpływ systemów dojrzewania *in vitro* oocytów świni na rozwój zarodków uzyskiwanych techniką klonowania somatycznego. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 38, 1: 45–59.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2012). High developmental capability of porcine cloned embryos following trichostatin A-dependent epigenomic transformation during *in vitro* maturation of oocytes pre-exposed to Roscovitine. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 30: 383–393.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2013 a). Evaluation of the *in vitro* developmental potential of porcine cloned embryos created using nuclear donor fibroblast cells undergoing scriptaid-dependent epigenomic transformation. *Proc. 29th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association (A.E.T.E.)*; 6–7.09. 2013, Istanbul (Turkey), p. 204.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2013 b). Scriptaid-induced epigenetic modulation of adult dermal fibroblast cells before their use for somatic cell nuclear transfer in pigs. *Proc. 5th Central European Congress of Life Sciences “EUROBIOTECH 2013”*; Leading Area: White and Green Biotechnology; Panel: Green Biotechnology; Session 9: Animal Biotechnology in Biomedicine; 8–11.10.2013, Cracow (Poland), p. 142.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2014 a). Scriptaid-mediated epigenomic modulation of *in vitro* cultured nuclear recipient oocytes biases the efficiencies of both their meiotic maturation and somatic cell cloning in pigs. *Proc. 30th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association (A.E.T.E.)*; 12–13.09.2014, Dresden (Germany), p. 166.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2014 b). Zastosowanie skryptaido-zależnej transformacji epigenetycznej fibroblastów płodowych – dawców jąder komórkowych oraz dojrzewających *in vitro* oocytów-biorców jąder w klonowaniu somatycznym świń. *Mat. VII Zjazdu Towarzystwa Biologii Rozrodu; Sesja nr 5: Biotechniki i biotechnologia w rozrodzie*, 11–13.09.2014, Toruń, s. 157.
- Samiec M., Opiela J., Lipiński D., Romanek J. (2015). Trichostatin A-mediated epigenetic transformation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells biases the *in vitro* developmental capability, quality, and pluripotency extent of porcine cloned embryos. *Biomed Res. Int. (formerly titled: J. Biomed. Biotechnol.)*, 2015: Article ID 814686, 13 pp.
- Sangalli J.R., Chiaratti M.R., De Bem T.H., de Araújo R.R., Bressan F.F., Sampaio R.V., Percin F., Smith L.C., King W.A., Meirelles F.V. (2014). Development to term of cloned cattle derived from donor cells treated with valproic acid. *PLoS One*, 9: Article ID e101022, 10 pp.
- Shi W., Zakhartchenko V., Wolf E. (2003 a). Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation*, 71: 91–113.
- Shi W., Hoefflich A., Flaswinkel H., Stojkovic M., Wolf E., Zakhartchenko V. (2003 b). Induction of a senescent-like phenotype does not confer the ability of bovine immortal cells to support the development of nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.*, 69: 301–309.
- 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.
- Shi L., Wu J. (2009). Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. *Re-*

prod. Biol. Endocrinol., 7: Article ID 59, 11 pp.

Skrzyszowska M., Karasiewicz J., Bednarczyk M., Samiec M., Smorąg Z., Waś B., Guskiewicz A., Korwin-Kossakowski M., Górniewska M., Szablisty E., Modliński J.A., Łakota P., Wawrzyńska M., Sechman A., Wojtysiak D., Hrabia A., Mika M., Lisowski M., Czekalski P., Rząsa J., Kapkowska E. (2006). Generation of cloned and chimeric embryos/offspring using the new methods of animal biotechnology. *Reprod. Biol.*, 6 (Suppl. 1): 119–135.

Song Y., Hai T., Wang Y., Guo R., Li W., Wang L., Zhou Q. (2014). Epigenetic reprogramming, gene expression and *in vitro* development of porcine SCNT embryos are significantly improved by a histone deacetylase inhibitor – *m*-carboxycinnamic acid bishydroxamide (CBHA). *Protein Cell*, 5: 382–393.

Su J., Wang Y., Li Y., Li R., Li Q., Wu Y., Quan F., Liu J., Guo Z., Zhang Y. (2011). Oxamflatin significantly improves nuclear reprogramming, blastocyst quality, and *in vitro* development of bovine SCNT embryos. *PLoS One*, 6: Article ID e23805, 14 pp.

Van Thuan N., Bui H.T., Kim J.H., Hikichi T., Wakayama S., Kishigami S., Mizutani E., Wakayama T. (2009). The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction*, 138: 309–317.

Wang F., Kou Z., Zhang Y., Gao S. (2007). Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 77: 1007–1016.

Wang Y., Su J., Wang L., Xu W., Quan F., Liu J., Zhang Y. (2011 a). The effects of 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on gene expression and DNA methylation status in cloned bovine blastocysts. *Cell. Reprogram.*, 13: 297–306.

Wang L.J., Zhang H., Wang Y.S., Xu W.B., Xiong X.R., Li Y.Y., Su J.M., Hua S., Zhang Y. (2011 b). Scriptaid improves *in vitro* development and nuclear reprogramming of somatic cell nuclear transfer bovine embryos. *Cell. Reprogram.*, 13: 431–439.

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.

Wen B.Q., Li J., Li J.J., Tian S.J., Sun S.C., Qi X., Cai W.T., Chang Q.L. (2014). The histone deacetylase

inhibitor Scriptaid improves *in vitro* developmental competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. *Theriogenology*, 81: 332–339.

Whitworth K.M., Prather R.S. (2010). Somatic cell nuclear transfer efficiency: How can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? *Mol. Reprod. Dev.*, 77: 1001–1015.

Wu X., Li Y., Li G.P., Yang D., Yue Y., Wang L., Li K., Xin P., Bou S., Yu H. (2008). Trichostatin A improved epigenetic modifications of transfected cells but did not improve subsequent cloned embryo development. *Anim. Biotechnol.*, 19: 211–224.

Xu W., Li Z., Yu B., He X., Shi J., Zhou R., Liu D., Wu Z. (2013). Effects of *DNMT1* and *HDAC* inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during porcine somatic cell nuclear transfer. *PLoS One*, 8: Article ID e64705, 13 pp.

Yamanaka K., Sugimura S., Wakai T., Kawahara M., Sato E. (2009). Acetylation level of histone H3 in early embryonic stages affects subsequent development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *J. Reprod. Dev.*, 55: 638–644.

Yang X., Smith S.L., Tian X.C., Lewin H.A., Renard J.P., Wakayama T. (2007 a). Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.*, 39: 295–302.

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.

Yang F., Hao R., Kessler B., Brem G., Wolf E., Zakhartchenko V. (2007 c). Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation. *Reproduction*, 133: 219–230.

Zhang Y., Li J., Villemoes 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 Cells*, 9: 357–363.

Zhao J., Ross J.W., Hao Y., Spate L.D., Walters E.M., Samuel M.S., Rieke A., Murphy C.N., Prather R.S. (2009). Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 81: 525–530.

Zhao J., Whyte J., Prather R.S. (2010 a). Effect of

epigenetic regulation during swine embryogenesis and on cloning by nuclear transfer. *Cell Tissue Res.*, 341: 13–21.

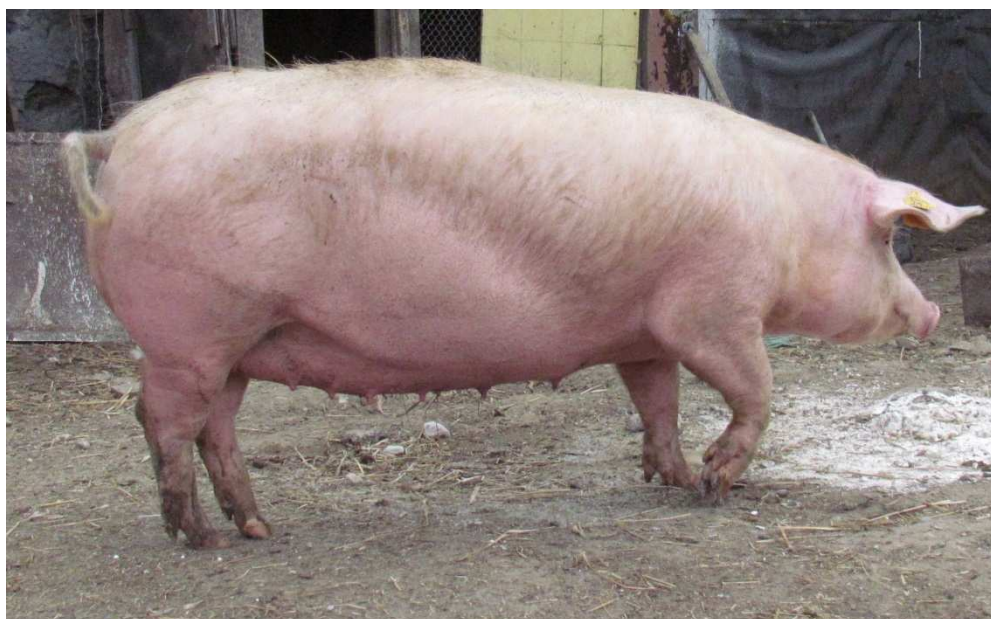
Zhao J., Hao Y., Ross J.W., Spate L.D., Walters

E.M., Samuel M.S., Rieke A., Murphy C.N., Prather R.S. (2010 b). Histone deacetylase inhibitors improve *in vitro* and *in vivo* developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell. Reprogram.*, 12: 75–83.

THE USE OF THE NOVEL AND STANDARD HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS FOR EPIGENETIC TRANSFORMATION OF NUCLEAR DONOR CELLS IN THE SOMATIC CELL CLONING OF PIGS

Summary

The current study aimed to develop the optimal strategies of epigenomic modulation of nuclear donor cells for the purposes of improving the *ex vivo* developmental capability of porcine embryos generated by somatic cell cloning. Enucleated metaphase II-stage oocytes were reconstituted with the cell nuclei of either foetal fibroblast cells (group I) or adult cutaneous fibroblast cells (group II) that had been epigenetically transformed by treatment with histone deacetylase (HDAC) inhibitors of new generation (scriptaid; subgroups IA and IIA) or old generation (trichostatin A/TSA; subgroups IB and IIB). In contrast, the subgroups IC and IIC encompassed the lack of HDAC inhibitor-mediated epigenomic modulation of *in vitro* cultured fibroblast cells that were subsequently used for reconstruction of enucleated oocytes by somatic cell nuclear transfer (SCNT). Depending on the approaches applied to epigenetic transformation of either type of nuclear donor fibroblast cells, the *in vitro* developmental capacities of cloned embryos to reach the morula and blastocyst stages were assessed. In subgroups IA, IB and IC, the frequencies of nuclear-transferred (NT) embryos that developed to morula and blastocyst stages were 38/58 (65.5%) and 24/58 (41.4%) or 29/56 (51.8%) and 16/56 (28.6%) or 27/67 (40.3%) and 11/67 (16.4%), respectively. In turn, subgroups IIA, IIB and IIC yielded rates of the morula and blastocyst formation at the levels of 31/57 (54.4%) and 18/57 (31.6%) or 22/52 (42.3%) and 9/52 (17.3%) or 21/71 (29.6%) and 6/71 (8.5%), respectively. Summing up, irrespective of the type of HDAC inhibitors used (scriptaid or TSA), the abilities of cell nuclei originating from epigenetically transformed foetal fibroblasts to direct the extracorporeal development of cloned pig embryos were higher than those of cell nuclei descended from epigenomically modulated adult cutaneous fibroblasts. Furthermore, scriptaid-dependent epigenomic modulation of both foetal fibroblast cells and adult cutaneous fibroblast cells resulted in the significant enhancement of *in vitro* developmental potential of porcine NT embryos not only as compared to the strategy of TSA-mediated epigenetic transformation, but also as compared to the lack of any epigenomic modification treatment of nuclear donor fibroblast cells.



Fot. M. Szyndler-Nędza