

## Rodzaje czynników aktywujących zrekonstruowane oocyty 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 – Strategie sztucznej aktywacji oocytów świni zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych

Protokół sztucznej aktywacji oocytów zrekonstruowanych technikami klonowania somatycznego, stanowiących somato-gametogeniczne hybrydy jądrowo-cytoplazmatyczne (tzw. cybrydy klonalne lub cybrydowe zygoty klonalne) obejmuje nie tylko rodzaj czynnika aktywującego, ale także moment jego zastosowania w stosunku do etapu rekonstrukcji enukleowanych oocytów, czyli ooplastów (cytoplastów). Właściwy moment do zainicjowania aktywacji zrekonstruowanych oocytów może zależeć zarówno od czasu wymaganego do progresji cyklu mejozytycznego ze stadium diktiotenu profazy I (stadium pęcherzyka zarodkowego – GV; ang. *germinal vesicle*) do stadium metafazy II (MII) i uzyskania jądrowej oraz cytoplazmatycznej dojrzałości, jak i od czasu pojawienia się pierwszych sygnałów starzenia się oocytu. Dojrzewanie cytoplazmatyczne oocytu, które towarzyszy procesowi jego dojrzewania mejozytycznego (jądrowego), dotyczy m.in. zmian właściwości, wielkości i gęstości kanałów wapniowych w cyternach i kanalikach siateczki śródplazmatycznej gładkiej (tj. retikulum endoplazmatycznego

agranularnego – ER<sub>ag</sub>; ang. *agranular endoplasmic reticulum*), koniecznych do wywołania oscylacyjnych fal przyrostu wewnątrzcytozolowego stężenia jonów wapnia w odpowiedzi na zadziałanie bodźca indukującego aktywację. Czynnikiem aktywującym (aktywator) powoduje uwalnianie jonów wapniowych albo bezpośrednio z depozytów wewnątrzocytarnych, albo ich dokomórkowy transport ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Optymalnym wzorcem sztucznej aktywacji byłby wzorec zbliżony do naturalnej aktywacji oocytu, inicjowanej przez penetrujący plemnik podczas zapłodnienia, który indukuje kaskadę procesów odpowiedzialnych za uwalnianie do ooplazmy wolnych jonów wapnia w postaci serii pulsacyjnych wyrzutów (De Sousa i in., 2002; Zhu i in., 2002).

W klonowaniu somatycznym świń wykorzystywane są różne protokoły egzogennej stymulacji zarodkowego programu rozwojowego hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych. Różnice między poszczególnymi systemami aktywacyjnymi dotyczą przede wszystkim odstępu czasowego między momentem rekonstrukcji enukleowanego oocytu a momentem zainicjowania sztucznej aktywacji zrekonstruowanego oocytu. Powszechnie stosowaną strategią aktywacyjną jest protokół jednoczesnej fuzji i aktywacji (F/A) zrekonstruowanych oocytów. W niniejszym protokole te same impulsy elektryczne, które indukują fuzję komórki somatycznej z bezjądrzastym ooplastem, stanowią czynnikiem aktywującym zrekonstruowane oocyty (Dai i in., 2002; Lai i in., 2002; Lee i in., 2003 b, 2016; Hwang i in., 2015; Hua i in., 2016; Huang i in., 2016).

---

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

Tabela 1. Biochemiczne i biofizyczne mechanizmy transdukcji sygnału wapniowego, indukowanej w wyniku sztucznej stymulacji zarodkowego programu rozwojowego oocytów świni, zrekonstruowanych techniką transplantacji jąder komórek somatycznych (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*) oraz poddanych działaniu różnych aktywatorów

Table 1. The biochemical and biophysical mechanisms underlying calcium signal transduction induced through artificial stimulation of embryonic developmental program of porcine oocytes reconstructed by somatic cell nuclear transfer (SCNT) and exposed to different activators

Rodzaje czynników aktywujących	Geneza i charakter przyrostu cytoplazmatycznej koncentracji jonów $Ca^{2+}$
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Fizyczne:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• impulsy elektryczne (impulsy prądu stałego)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• aktywacja oocytów wyłącznie w obecności kationów wapnia w środowisku zewnątrzkomórkowym (w medium do elektroporacji błon plazmatycznych), których pojemnościowy napływ do cytoplazmy stymuluje uwalnianie wolnych jonów <math>Ca^{2+}</math> z depozytów wewnątrzkomórkowych (tj. cystern i kanalików siateczki śródplazmatycznej gładkiej – ER<sub>ag</sub>)</li> <li>• jedynie w wyniku multiplikacji impulsów prądu stałego profil przyrostu cytoplazmatycznego stężenia wolnych kationów wapnia nie odbiega od wzorca fizjologicznego (w procesie monospermicznego zapłodnienia dojrzałego mejotycznie oocytu), przyjmującego pulsacyjny (tj. oscylacyjny) sposób uwalniania kationów wapniowych z ER<sub>ag</sub></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Chemiczne (syntetyczne):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• antybiotyki jonoforowe (jonomycyna wapnia, jonofor <math>Ca^{2+}</math> A23187, czyli kalcymycyna)</li> <li>• alkohol etylowy</li> <li>• timerosal (tiomersal) i ditiotreitól</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mobilizacja wewnątrz-, a następnie zewnątrzkomórkowych źródeł jonów <math>Ca^{2+}</math></li> <li>• logarytmiczny wzorec przyrostu stężenia wolnych jonów <math>Ca^{2+}</math> w ooplazmie, różniący się od wzorca fizjologicznego</li> <li>• indukuje pojedynczy, gwałtowny wzrost poziomu jonów <math>Ca^{2+}</math> w ooplazmie zarówno w wyniku dokomórkowego napływu kationów wapnia ze środowiska pozakomórkowego (pożywka hodowlana), jak i w wyniku uwolnienia jonów <math>Ca^{2+}</math> z ER<sub>ag</sub></li> <li>• profil przyrostu cytoplazmatycznego stężenia wolnych kationów wapnia odbiega od wzorca fizjologicznego</li> <li>• timerosal - odczynnik utleniający grupy tiolowe receptorów 1,4,5-<i>tris</i>fosforanu <i>myo</i>-inozytolu (InsP<sub>3</sub>), stanowiących integralną część InsP<sub>3</sub>-zależnych kanałów wapniowych; odpowiedzialny za generowanie długiej serii falowych wyrzutów jonów <math>Ca^{2+}</math> z ER<sub>ag</sub> (tzw. oscylacji wapniowych), zbliżonej do fizjologicznego wzorca przyrostu stężenia wolnych kationów wapnia w ooplazmie</li> <li>• ditiotreitól - disulfhydrylowy odczynnik redukujący mostki disiarczkowe białek receptorowych InsP<sub>3</sub>, odpowiedzialnych za uwalnianie jonów <math>Ca^{2+}</math></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Biologiczne (biochemiczne lub pseudofizjologiczne):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• ekstrakty cytozolowe plemników lub homogenaty izolowanych białek, bądź ich transkryptów – rozpuszczalna forma izoenzymu PLC-<math>\xi</math> lub transkryptów tego białka (mRNA lub cRNA enzymu PLC-<math>\xi</math>)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• oscylacyjny sposób uwalniania wolnych jonów <math>Ca^{2+}</math> z magazynów wewnątrzkomórkowych, najbardziej przypominający fizjologiczny wzorec przyrostu kationów wapnia w ooplazmie</li> </ul>

Alternatywny system ektopowej stymulacji cybryd klonalnych stanowi protokół post-aktywacji, czyli aktywacji opóźnionej kilka godzin (od 1 do 4 godzin) w stosunku do fuzji kompleksów enukleowany oocyt-komórka somatyczna (Kawakami i in., 2003; Lee i in., 2003 a; Kawano i in., 2004; Kim i in., 2016). Podczas gdy w protokole równoczesnej F/A rekonstruowanych oocytów sztucznym aktywatorem są wyłącznie czynniki fizyczne, takie jak: impulsy prądu stałego (Cheong i in., 2002; Park i in., 2002; Im i in., 2004; Lee i in., 2005; Samiec i in., 2015) (tab. 1), w protokole post-aktywacji stosowane są różne rodzaje bodźców aktywujących. Jednym z nich są czynniki fizyczne w postaci impulsów elektrycznych (Kurome i in., 2003; Hölker i in., 2005; Tomii i in., 2005; Kim i in., 2016) (tab. 1). Kolejną grupę stanowią aktywatory chemiczne (tab. 1), do których są zaliczane: (1) antybiotyki jonoforowe, np. jonomycyna wapnia lub kalcymycyna, czyli jonofor  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 (Cheong i in., 2000; Yin i in., 2002; Hyun i in., 2003 a; Samiec i in., 2003; García-Mengual i in., 2008; Samiec i Skrzyszowska, 2012) lub (2) tiopochodne odczynniki organiczne z grupy syntetycznych analogów związków tiofenolowych oraz związków dimerkaptanowych (ditiolowych lub disulfhydrylowych), tj. odpowiednio: timerosal (tiomersal) i ditiotreitól (Tao i in., 1999 a,b, 2000; Hao i in., 2006; Im i in., 2006; Yuan i in., 2014).

Intensywnie prowadzone badania nad udoskonaleniem metod sztucznej aktywacji cybryd klonalnych świń polegają głównie na optymalizacji parametrów technicznych generowanego pola elektrostatycznego (natężenie, czas trwania impulsów, liczba impulsów i odstęp czasowy między nimi) (De Sousa i in., 2002; Park i in., 2002; Kurome i in., 2003) lub też coraz częściej na łączeniu właściwego bodźca aktywującego (impulsów prądu stałego, jonomycyny wapnia lub kalcymycyny) ze związkami odwracalnie blokującymi aktywność cyklino-zależnych kinaz białkowych (CDKs; ang. *cyclin-dependent protein kinases*) z grupy niespecyficznych lub specyficznych inhibitorów kompetycyjnych CDKs, takich jak: 6-dimetyloaminopuryna (6-DMAP) (Betthausen i in., 2000; Boquest i in., 2002; Roh i Hwang, 2002; Hyun i in., 2003 a; Hölker i in., 2005; García-Mengual i in., 2008; Kim i in., 2016) lub *R*-roskowityna (*R*-RSCV) (Samiec

i Skrzyszowska, 2012) bądź butyrylolakton I (BTRL-I) (Dinnyes i in., 1999; Yin i in., 2002), czy niespecyficznymi związkami hamującymi translację (w tym resyntezę cykliny B, podjednostki regulatorowej czynnika dojrzewania mejozy – MPF; ang. *meiosis/maturation-promoting factor*), np. cykloheksimidem (CHXM) (Cheong i in., 2000; Martinez Diaz i in., 2002; Lee i in., 2003 a; Samiec i in., 2003; Skrzyszowska i in., 2008; Hua i in., 2016).

### Aktywacja fizyczna zrekonstruowanych oocytów z wykorzystaniem impulsów elektrycznych

Aktywacja zrekonstruowanych oocytów świń metodą elektroporacji, określanej także elektroporabilizacją, wywołuje okresowe (odwracalne) zmiany ultrastrukturalne w błonie plazmatycznej, które prowadzą do przzerwania ciągłości warstw fosfolipidowych i powstawania w jej obrębie mikroporów bądź mikrokanalów, będących drogą dokońrkowego transportu egzogennych jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , obecnych w roztworze dielektryku (Didion i in., 1990; Ozil i Huneau, 2001; Huang i in., 2016) (tab. 1). Średnica i liczba tych mikroporów zależy nie tylko od długości trwania impulsów prądu stałego, lecz także od ich liczby oraz natężenia pola elektrycznego. Tzw. pojemnościowy napływ kationów wapnia do cytoplazmy elektrostymulowanych cybryd klonalnych o przejściowo zwiększonej przepuszczalności oolemy jest wynikiem pozytywnego gradientu stężeń jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz wysokiej przenikalności dielektrycznej kationów wapnia. Innymi słowy, elektroaktywacja jest możliwa tylko w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w środowisku zewnątrzkomórkowym. Mimo że pochodzenie kationów wapniowych podczas aktywacji elektrycznej jest, jak się powszechnie uważa, zewnątrzkomórkowe, to sugeruje się, że elektroporacja oolemy może także stymulować uwalnianie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z magazynów wewnątrzkomórkowych (Dinnyes i in., 1999; Putney i McKay, 1999; Macháty i in., 2002 b). Potwierdzeniem tego są badania przeprowadzone na oocytach królika, których nie udało się aktywować, gdy elektroporacja miała miejsce w obecności kationów litu (jony  $\text{Li}^+$  są powszechnie znane jako inhibitor przemian prowadzących do powstania *myo*-inozytolo-1,4,5-*tris*fosforanu –  $\text{InsP}_3$ )

(Ozil, 1990, 1998). Ten niepodważalny dowód naukowy może z kolei wskazywać na hipotezę, według założeń której napływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do ooplazmy inicjuje stymulację szlaku transdukcji sygnału wapniowego na etapie hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-*bis*fosforanu ( $\text{PIP}_2$ ) lub nawet wcześniej – w momencie aktywacji fosfoinozytydazy C typu  $\beta$  lub  $\gamma$  ( $\text{PLC-}\beta/\text{PLC-}\gamma$ ) przez aktywne izoformy białka  $\text{G}_p/\text{G}_q$  lub kinazy tyrozynowej. Nie wykluczone również, że ścieżka przenoszenia wewnątrzkomórkowych sygnałów wapniowych, prowadząca do odblokowania programu rozwojowego cybryd klonalnych, rozpoczyna się przez pobudzenie wewnątrzblonowych (cytoplazmatycznych) domen receptorów powierzchniowych, sprzężonych z białkiem wiążącym nukleotydy guaninowe lub kinazą tyrozynową.

Częstotliwość oraz amplituda falowych wyrzutów endogennych jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , nakładających się na rozprzestrzeniające się w całej objętości cytoplazmy rekonstruowanego oocytu serie cyklicznych wahań w koncentracji egzogennych kationów wapnia, zależy prawdopodobnie nie tylko od zagęszczenia porów powstałych na określonej jednostce powierzchni ( $10 \mu\text{m}^2$ ) oolemmy, lecz także od stopnia zaawansowania zmian potencjału elektrostatycznego w strukturze przestrzennej plazmolemmy oraz wielkości powierzchni ekwipotencjalnej pola elektrostatycznego, którego wektor linii sił przechodzi przez różne przedziały cytozolowe sferycznej figury oocytu umieszczonej między elektrodami komory do elektroporacji. Na wielkość wymienionych wcześniej parametrów fizycznych wewnątrzocytarnych oscylacji wapniowych wpływają również: koncentracja jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  w zewnątrzkomórkowym środowisku dielektrycznym oocytu, liczba i długość trwania impulsów prądu stałego, odstęp czasowy między nimi, wysokość natężenia pola elektrycznego, a nawet typ (model) techniczny użytego do elektroaktywacji generatora impulsów (tzw. elektromanipulatora komórkowego) oraz rodzaj zastosowanego dielektryku (medium do elektroporacji/elektropermeabilizacji błon ooplazmatycznych). W tym ostatnim przypadku o różnym stopniu wrażliwości i podatności zrekonstruowanych oocytów świni na określone parametry elektroimpulsacji może decydować także wielkość pojemności i przenikalności dielektrycznej wykorzystanego medium, uzależniona głównie od jego składu

jakościowego i ilościowego oraz osmolarności (Liu i Moor, 1997; Fissore i in., 1999). Obecnie najczęściej stosowanymi rodzajami dielektryków (izolatorów elektrycznych) w elektroporacji cybryd klonalnych świni są niskoprzewodzące, izotoniczne roztwory polihydroksylowych alkoholi (heksytoli), takich jak: mannitol (Polejaeva i in., 2000; Yin i in., 2002; Hyun i in., 2003 a; Tomii i in., 2005; Hwang i in., 2015; Lee i in., 2016) bądź sorbitol (Betthausen i in., 2000; Hölker i in., 2005) oraz roztwory cukrów (wielowodorotlenowych aldehydoalkoholi/aldoz lub ketonoalkoholi/ketoz, najczęściej glukozy lub sacharozy), takie jak np. pożywka Zimmermana (Miyoshi i in., 2001, 2002). Roztwory tych dielektryków są uzupełniane chlorkiem wapnia ( $\text{CaCl}_2$ ) (Yin i in., 2002; Hyun i in., 2003 b; Samiec i Skrzyszowska, 2012, 2014; Samiec i in., 2003, 2015) lub octanem wapnia ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ ) (Betthausen i in., 2000; Miyoshi i in., 2002), siarczanem magnezu ( $\text{MgSO}_4$ ) (Polejaeva i in., 2000; Boquest i in., 2002; Kurome i in., 2003; Kawano i in., 2004; Hua i in., 2016; Kim i in., 2016) lub chlorkiem magnezu ( $\text{MgCl}_2$ ) (Lai i in., 2001; Park i in., 2002; Hyun i in., 2003 b; Yuan i in., 2014) albo octanem magnezu ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ ) (Betthausen i in., 2000; Miyoshi i in., 2002; Hölker i in., 2005), czyli związkami stanowiącymi źródło kationów metali dwuwartościowych. Ponadto, wspomniane wyżej roztwory izolatorów elektrycznych są uzupełniane wolną od kwasów tłuszczowych frakcją albuminy surowicy bydlęcej (FAF-BSA; ang. *fatty acid-free bovine serum albumin*) (Onishi i in., 2000; Lai i in., 2001; Koo i in., 2004; Hölker i in., 2005) lub jej syntetycznym substytutem, alkoholem poliwinylowym (PVA; ang. *polyvinyl alcohol*) (Boquest i in., 2002; Yin i in., 2002; Kawakami i in., 2003; Kurome i in., 2003) bądź organicznym buforem, kwasem N-2-hydrokso-etylopiperazyno-N'-2-etanosulfonowym (HEPES,  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ; ang. *N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid*) (Park i in., 2002; Hyun i in., 2003 a,b; Koo i in., 2004; Yuan i in., 2014). Warto dodać, że dwustopniowa post-inkubacja elektroaktywowanych cybryd klonalnych najpierw w roztworze dielektryku, a następnie we właściwej pożywce hodowlanej uzupełnionej cytochalazyną B znacznie ułatwia i przyspiesza zasklepianie porów przejściowo powstałych w plazmolemmie w wyniku działania impulsów elektrycznych. Duża inwazyj-

ność samej techniki mikrochirurgicznej enukleacji oocytów, powiększona dodatkowo przez multiplikację impulsów prądu stałego w procedurze jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej zrekonstruowanych oocytów może doprowadzić do wzrostu stopnia trwałych uszkodzeń plazmolemy i membranoszkieletu zarodków klonalnych świń. Jest to dodatkowy czynnik, który może przyczyniać się do obniżenia przeżywalności zrekonstruowanych hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych.

Efektywność klonowania somatycznego świń, mierzona odsetkiem uzyskanych morul oraz blastocyst w stosunku do liczby przeprowadzonych pomyślnie zabiegów transplantacji jąder komórkowych wzrasta wskutek wykorzystania systemu wielokrotnych impulsów elektrycznych w celu aktywacji zrekonstruowanych oocytów. Z doświadczeń De Sousa i in. (2002) oraz Zhu i in. (2002) wynika, że wyższy potencjał rozwojowy *in vitro* zarodków świń zrekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych (ok. 7,0% blastocyst) uzyskano po zastosowaniu aktywacji indukowanej wielokrotnymi impulsami elektrycznymi przy równoczesnym obniżeniu natężenia pola elektrycznego i czasu trwania impulsów prądu stałego. Hipoteza zaproponowana przez wymienionych wyżej autorów zakłada, że kombinacja multiplikacji krótszych impulsów elektrycznych i niższej siły pola elektrycznego może powodować mniejsze uszkodzenia plazmolemy cybryd klonalnych w porównaniu z aplikacją pojedynczego, ale dłuższego impulsu przy wyższym natężeniu pola elektrostatycznego. Pojedyncze impulsy prądu stałego prowadzą do jednorazowej mobilizacji wewnątrzkomórkowych rezerwuarów wapniowych. Multiplikacja impulsów elektrycznych pozwala natomiast na generowanie długiej serii oscylacyjnych wyrzutów jonów  $Ca^{2+}$ , podwyższających wielokrotnie stężenie tych kationów w ooplazmie (Fissore i in., 1999; Ozil i Huneau, 2001). Protokół oparty na zwielokrotnieniu impulsacji elektrycznej upodabnia sztuczną aktywację cybryd klonalnych świń do naturalnej aktywacji spowodowanej penetracją oocytu przez plemnik. Ekspozycja hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych na nagłe zmiany siły jonowej w roztworze dielektryku znacznie utrudnia dokładne zarejestrowanie częstotliwości oraz amplitudy falowych wyrzutów jonów  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów. Nie ulega jednak wątpliwości, że oba

wyżej wspomniane parametry fizyczne cyklicznych wyrzutów wapnia zależą od długości trwania impulsów prądu stałego, ich liczby, odstępu czasowego między nimi, natężenia pola elektrycznego, a nawet stężenia egzogennych jonów  $Ca^{2+}$  w medium do elektroaktywacji. Sun i in. (1992) wykazali, że podstawowy poziom cytozolowej koncentracji wolnych kationów wapnia w oocytach świń waha się w granicach około 20–100 nM/L (stan homeostazy stężeniowej jonów  $Ca^{2+}$ ). Po zmultiplikowanej elektroimpulsacji (podobnie jak i doooplazmatycznej mikroiniekcji zbuforowanego roztworu chlorku wapnia) wzrasta on do poziomu rzędu około 4 mM/L, znacznie przewyższającego stężenie tego jonu charakterystyczne dla oocytów w trakcie zapłodnienia (Macháty i in., 1996, 1997 a, 1999), lecz z powodu silnych właściwości buforujących cytoplazmy oocytów świń, zwiększonych jeszcze w wyniku fuzji z komórką-dawcą jądra, rzeczywisty stan koncentracji wapnia ulega szybkim przemianom i jest trudny do określenia. Przypuszcza się jednak, że ten mechanizm gwałtownego przyrostu wapnia oraz poziomu pH w ooplazmie jest równie szybko hamowany przy udziale zależnych od jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  ATPaz napełniających zwrótnie wewnątrzocytarne depozyty wapniowe i wypompowujących nadmiar kationów wapnia do środowiska zewnątrzkomórkowego (Macháty i in., 2002 a). Dzięki swoistej nadwrażliwości oocytów świń na nagłe zmiany jonowej równowagi osmotycznej cytoplazmy w wyniku zwielokrotnionej elektroporacji koncentracja wolnych kationów wapniowych w ooplazmie jest szybko redukowana z cytotoksycznego poziomu 4 mM/L do około 600 nM/L. Podobny przyrost stężenia jonów  $Ca^{2+}$  jest indukowany w oocytach świń w warunkach zapłodnienia monospermicznego lub jednokrotnej elektrostymulacji (Sun i in., 1992; Macháty i in., 2000, 2002 b).

W badaniach własnych zaobserwowano, że duplikacja impulsów elektrycznych w procedurze jednoczesnej fuzji i aktywacji dojrzałych *in vitro* oocytów świń zrekonstruowanych z jąder komórkowych transgenicznych fibroblastów płodowych była pozytywnie skorelowana z ich wyższą zdolnością rozwojową do stadium moruli i blastocysty (Skrzyszowska i in., 2008). Aplikacja dwóch 60-μsekundowych impulsów prądu stałego o natężeniu pola elektrostatycznego 1,2

kV/cm, generowanych bezpośrednio po sobie doprowadziła do uzyskania po 6–7-dniowej hodowli *in vitro* około 60,0% morul oraz 30,5% blastocyst (Skrzyszowska i in., 2008).

### **Aktywacja chemiczna zrekonstruowanych oocytów z wykorzystaniem jonomycyny wapnia i 6-dimetyloaminopuryny lub cykloheksimidu**

Inkubacja zrekonstruowanych oocytów świni w roztworze jonomycyny wapnia (tab. 1) generuje wydłużony logarytmiczny przyrost wewnątrzkomórkowej koncentracji kationów wapnia, co znacznie odróżnia tę strategię sztucznej aktywacji od fizjologicznego wzorca zmian stężenia wapnia w cytoplazmie oocytów, obserwowanego w czasie zapłodnienia monospermicznego. W przypadku ekspozycji cybrydowych zygot klonalnych świni na działanie jonomycyny, źródło wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  obecnych w ooplazmie jest prawdopodobnie zarówno pochodzenia endogennego, jak i zewnątrzkomórkowego. Mechanizm stymulacji zrekonstruowanych oocytów świni do dalszego rozwoju polega na indukowaniu dwufazowych zmian w cytoplazmatycznej koncentracji jonów wapnia. Zamiast bezpośredniego oddziaływania na ultrastrukturę plazmolemy i inicjowania w ten sposób przezłonowego transportu jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , jonomycyna w pierwszej kolejności mobilizuje wewnątrzocytarne depozyty wapniowe w cysternach retikulum endoplazmatycznego agranularnego, co z kolei na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego pobudza transport bierny nośnikowy (tj. dyfuzję ułatwioną) egzogennych kationów wapnia do cytoplazmy zrekonstruowanych oocytów świni (Prather i in., 1999; Morgan i Jacob, 1994).

Jonomycyna wapnia (tab. 1) stanowi jedną z biochemicznych odmian, tj. stereoizomerycznych biopolimerów antybiotyku jonoforowego  $\text{Ca}^{2+}$ , wyekstrahowanego z promieniowca *Streptomyces globatus*. Jonomycyna jest lipofilnym (amfitropowym) oraz niefluorescencyjnym kationitem transportującym jony metali dwuwartościowych, który charakteryzuje się wysokim stopniem selektywności dla kationów wapnia i magnezu, a w szczególności wysoką wartością jonowymiennej pojemności chelatowania w stosunku do jonów  $\text{Ca}^{2+}$  o niskiej energii hydratacji. Oprócz wysokiego powinowactwa

do jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , jonomycyna posiada również zdolność transportowania, tj. kataforezy wspomaganej jonów wodoru (protonów  $\text{H}^+$  lub kationów hydroniowych/oksoniowych  $\text{H}_3\text{O}^+$ ). Jako związek heterocykliczny jonomycyna wapnia transferuje w środku cząsteczki pojedynczy kation metalu, wiążący się koordynacyjnie z kilkoma atomami tlenu (sześcioma lub ośmioma) grup karbonylowych, karboksylowych i innych, otaczającymi centralną, pustą przestrzeń. Natomiast, zewnętrzna część cząsteczki jonomycyny ma charakter hydrofobowego płaszcza. Można zatem wysunąć hipotezę zakładającą, że jonoforowy antybiotyk nośnikowy, jakim jest jonomycyna, po przedostaniu się przez hydrofobową barierę dimolekularnej warstwy fosfolipidowej plazmolemy rekonstruowanego oocytu świni migruje z dużą prędkością w kierunku polarnych (hydrofilowych) reszt aminokwasów siarkowych (cysteiny, metioniny, tryptofanu) receptorów 1,4,5-*tris*fosforanu *myo*-inozytoli, będących integralną częścią kanałów wapniowych w błonach siateczki śródplazmatycznej bezziałistej. Następnie, jonomycyna usuwa wodę hydratacyjną z polarnego obszaru grup tiolowych ( $-\text{SH}$ ) receptorów  $\text{InsP}_3$ -zależnych kanałów uwalniania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz indukuje stopniową dehydrogenację (a tym samym utlenianie) grup sulfhydrylowych receptorów  $\text{InsP}_3$  do mostków disiarczkowych ( $-\text{S}-\text{S}-$ ) przez progresywne wiązanie kationów wodorowych w wyniku ich chelatowania z ułożonymi centralnie atomami tlenu. Z kolei, oksydacja grup tiolowych receptorów *myo*-inozytoli-1,4,5-*tris*fosforanu do mostków disulfidowych indukuje gwałtowne zmiany konformacji przestrzennej tych białek, prowadzące do otwarcia kanałów wapniowych w rezerwuarach  $\text{ER}_{\text{ag}}$  cybrydowych zygot klonalnych (Morgan i Jacob, 1994; Wang i in., 1998 a,b). Jonomycyna pozwala zatem na sztuczne generowanie wydłużonej fali wyrzutów jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cybrydach klonalnych już na poziomie uwalniania kationów wapnia z magazynów wewnątrzocytarnych, z całkowitym pominięciem wszystkich wcześniejszych etapów (ścieżek) transdukcji sygnału wapniowego. Molekularny mechanizm powstawania pojedynczej kaskady wylewów kationów wapnia stymuluje odblokowanie (reaktywację) cząsteczek jonomycyny. Antybiotykowy kationit uwalnia protony  $\text{H}^+/\text{H}_3\text{O}^+$  do ooplazmy, a następnie przemieszcza się aktywnie w kierunku

wewnętrznej (skierowanej do cytoplazmy) powierzchni plazmolemy zrekonstruowanego oocytu świni i wytwarza w błonie komórkowej poprzeczne mikrokanaly, do których przenikają jony  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  z zewnątrzkomórkowego środowiska dielektrycznego cybrydy klonalnej, by w wyniku dyfuzji wspomaganą przedostać się na drugą stronę oolemy. Sama jonomycyna formująca mikrotunel, aby funkcjonować, nie musi przemieszczać się w błonie plazmatycznej. Przypuszcza się, że kanaly jonoforowe mają budowę heliksu z grupami polarnymi znajdującymi się na jego wewnętrznej powierzchni oraz grupami hydrofobowymi zwróconymi na zewnątrz mikrotunelu – w stronę podwójnej warstwy lipidowej plazmolemy zrekonstruowanego oocytu poddawanego sztucznej aktywacji. Heliksoidalny stereoizomer jonomycyny wapnia zastępuje w obrębie kanałów błonowych klonalnej hybrydy jądrowo-cytoplazmatycznej świni wodę hydratacyjną egzogennych kationów wapnia i magnezu. Kationit ten, posiadając wysoką wartość objętościowej pojemności (zdolności) wymiennej, współzawodniczy z dipolami wody o wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  przez chelatowanie ich z ułożonymi centralnie atomami tlenu. Powierzchniowo rozmieszczone łańcuchy hydrofobowe jonomycyny sprawiają, że kompleks jononik kanałowy staje się rozpuszczalny w lipidowej warstwie oolemy. Maksymalna szybkość nieselektywnego transportu kationów dwuwartościowych przez pojedynczy mikrokanal jonoforowy może wynosić nawet około  $2 \times 10^7$  jonów  $\text{Ca}^{2+}$  na sekundę. System dwustopniowej transdukcji sygnałów jonowych, sztucznie wspomaganą biochemicznym (allosterycznym) oddziaływaniem jonomycyny na receptory  $\text{InsP}_3$  oraz na plazmolemmę znacznie przyspiesza aktywację programu rozwojowego cybrydowych zygot klonalnych świń. Ponadto, biorąc pod uwagę delikatną ultrastrukturę cytoszkieletu i membranoszkieletu oraz ograniczone możliwości adaptacyjne oocytów świń w stosunku do sztucznych bodźców aktywujących, jest to system o niewielkim stopniu inwazyjności parametrów fizykochemicznych indukowanych w cytoplazmie oscylacji wapniowych (Morgan i Jacob, 1994; Susko-Parrish i in., 1994; Wang i in., 1999).

Jonomycyna, podobnie jak i kalcymycyna, czyli jonofor  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 (o mniejszej od jonomycyny aktywności jonoforetycznej dla ka-

tionów wapniowych) (tab. 1) należą do stosunkowo słabych bodźców aktywujących zrekonstruowane oocyty świni. Dlatego też, ich stosowanie zalecane jest w połączeniu z niespecyficznymi lub specyficznymi inhibitorami izosterycznymi aktywności serynowo-treoninowych kinaz cyklino-zależnych, takimi jak, odpowiednio: 6-dimetyloaminopuryna (6-DMAP) (Bethausser i in., 2000; Boquest i in., 2002; Yin i in., 2002; Hyun i in., 2003 a; García-Mengual i in., 2008) lub *R*-roskowityna (*R*-RSCV) (Samiec i Skrzyszowska, 2012) bądź rzadziej butyrylakton I (BTRL-I) (Yin i in., 2002) (inhibitory kompetycyjne kinaz  $\text{CDK1/p34}^{\text{cdc}2}$ , stanowiących podjednostki katalityczne heterodimerowego czynnika białkowego MPF). Często procedurą chemicznej aktywacji w klonowaniu somatycznym świń jest kombinacja ekspozycji cybryd klonalnych na działanie jonomycyny lub jonoforu wapnia A23187 z późniejszą ich inkubacją w obecności antybiotyków blokujących proces syntezy białek (translacji), np. cykloheksimidu (CHXM) (Cheong i in., 2000; Samiec i in., 2003; Skrzyszowska i in., 2008).

Istnieją dowody na to, że molekularny mechanizm sztucznej aktywacji oocytów świń jest procesem wielostopniowym, a kilka ostatnich jego etapów przebiega bez udziału jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Docelowy kierunek przebiegu aktywacji oocytów, indukowanej jonomycyną i 6-DMAP lub jonomycyną i CHXM, jest zgodny ze ścieżką transdukcji sygnału zainicjowanego przyrostem wewnątrzkomórkowego poziomu kationów wapnia, jednak ostatnie etapy tego procesu pozostają już tylko pod kontrolą 6-DMAP lub CHXM, których aktywność jest niezależna od obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytozolu oocytów (Susko-Parrish i in., 1994; Nussbaum i Prather, 1995). Loi i in. (1998), a także Macháty i in. (1997 a, 1999) wykazali, że pojedynczy wyrzut  $\text{Ca}^{2+}$  generowany przez jonomycynę lub etanol w zrekonstruowanych oocytach owcy lub świń powoduje gwałtowny spadek aktywności kinazy MPF, lecz po kilku (6–8) godzinach od momentu zadziałania tych bodźców aktywujących miało miejsce przywrócenie takiej koncentracji czynnika MPF, jaka występowała w ooplazmie przed aktywacją oraz konsekwentne zatrzymanie cyklu komórkowego oocytu. Przywrócenie aktywności MPF było wynikiem resyntezy cykliny B, podjednostki regulacyjnej czynnika dojrzewania me-

jotycznego, która jest głównym celem biodegradacji katalizowanej przy udziale zależnej od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny kinazy białkowej typu II (CaM-PK-II) (Lorca i in., 1991; Fan i in., 2003; Ito i in., 2004 a; Madgwick i in., 2005). Wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Loi i in. (1998) oraz Macháty i in. (1997 a, 1999) jednoznacznie wskazują, że do pełnej aktywacji oocytów wymagane jest trwałe i odwracalne obniżenie poziomu MPF. Badania nad wewnątrzkomórkowym metabolizmem cykliny B w cybrydach klonalnych świni powinny dostarczyć także ważnych informacji o molekularnym mechanizmie działania czynnika cytostatycznego (CSF; ang. *cytostatic factor*). Po wprowadzeniu jądra komórki somatycznej do enukleowanego oocytu MII, degradacja cykliny B zachodzi pomimo obecności aktywnego czynnika cytostatycznego w cytozolu. Proteolitycznej degradacji cykliny B w hybrydowym środowisku cytoplazmatycznym zrekonstruowanych oocytów towarzyszy jej ciągła synteza, co umożliwia utrzymanie aktywności kinazy MPF na stałym poziomie. Wydaje się, że po sztucznej aktywacji cybrydowych zygot klonalnych świni za pośrednictwem jonomycyny lub jonoforu wapnia A23187 zachodzi krótkotrwała stymulacja kaskadowego procesu gwałtownej degradacji cykliny B, którego tempo znacznie przewyższa poziom syntezy tego białka, dzięki czemu dochodzi do przejściowej inaktywacji MPF (Ito i in., 2004 b; Knott i in., 2006). Rolą czynnika CSF byłoby zatem spowolnienie bądź osłabienie degradacji cykliny B, pozwalające zachować dynamiczną równowagę między jej syntezą a biodegradacją. Być może CSF, przeciwdziałając proteolitycznemu rozkładowi cykliny B bezpośrednio zapobiega inaktywacji MPF. Jednakże, jednym z głównych zjawisk uniemożliwiających utrzymanie wysokiego stężenia MPF w cytoplazmie po sztucznej stymulacji aktywacyjnej cybryd klonalnych jest obniżenie aktywności czynnika cytostatycznego (Ito i in., 2004 b; Takakura i in., 2005). Przypuszcza się, że zanik aktywności CSF w pobudzonych cybrydach klonalnych następuje stopniowo. Materiałem dowodowym bezpośrednio wspierającym tę teorię są wyniki doświadczeń, które miały na celu określenie tempa zaniku aktywności cytostatycznej w sztucznie zaktywowanych oocytach żaby szponiastej (*Xenopus laevis*) przez fuzję oocytów w różnym czasie po ich stymula-

cji z blastomerami w okresie podziałowym mitozy (w fazie M), wyizolowanymi z bruzdkujących zarodków (Watanabe i in., 1991). Stosując ten test, udało się wykazać, że jeszcze ponad godzinę po aktywacji ooplazma może spowodować zablokowanie podziału mitotycznego w hybrydowej komórce zarodkowej. Na tej podstawie można przypuszczać, że spadek aktywności cytostatycznej w zaktywowanych oocytach świni jest pozytywnie skorelowany z progresywnym zanikiem serynowo-treoninowej kinazy białkowej  $\text{p39}^{\text{Mos}}$ , niezależnie od poziomu koncentracji aktywnej formy MPF. Wydaje się więc możliwe, że aktywność czynnika CSF w cybrydach klonalnych zanika stopniowo po ich aktywacji. Z kolei, obecność aktywnego białka  $\text{p39}^{\text{Mos}}$  oraz aktywnego kompleksu białkowego  $\text{p34}^{\text{cdc2}}$ -cyklina A, stanowiącego prawdopodobnie serynowo-treoninową kinazę MAP, czyli kinazę aktywowaną przez miogeny, określaną także często kinazą o aktywności regulowanej przez sygnały zewnątrzkomórkowe (MAPK/ERK; ang. *mitogen-activated protein kinase/extracellular-regulated kinase*), jest związana z ciągłą obecnością CSF w ooplazmie.

W oocytach świni, podobnie jak i myszy, w reakcji na sztuczną stymulację ich programu rozwojowego inicjacja inaktywacji MPF, mierzona stopniem defosforylacji kinazy histonu H1, następuje w ciągu około 15 minut po zadziałaniu bodźca aktywującego, a istotne obniżenie poziomu aktywnego czynnika MPF i kinazy histonu H1 jest obserwowane już w pierwszej godzinie po stymulacji chemicznej lub elektrycznej (Leal i Liu, 1998; Kikuchi i in., 2002). Natomiast, intensywność fosforylacji (tj. aktywność) kinazy MAP utrzymuje się na wysokim poziomie aż godzinę po sztucznym pobudzeniu programu rozwojowego oocytu. Spadek stężenia aktywnej formy kinazy MAP rozpoczyna się między 1. a 2. godziną po inaktywacji MPF i trwa przez 8 godzin od chwili indukcji aktywacji. Równocześnie wykrywana jest jeszcze stosunkowo wysoka koncentracja kinazy  $\text{p39}^{\text{Mos}}$  (Green i in., 1999; Tatemoto i Muto, 2001). Oznacza to, że degradacja białkowego produktu ekspresji protoonkogenu *c-mos* nie jest konieczna do zaniku aktywności MPF. Inaktywacja czynnika cytostatycznego, rozumianego jako aktywność kinazy  $\text{p39}^{\text{Mos}}$  i dwóch izoform kinazy MAP/ERK o masie cząsteczkowej, odpowied-



nio: 44 kDa oraz 42 kDa (p44-ERK1 oraz p42-ERK2), określanych również rzadziej jako p44<sup>MAPK1</sup> oraz p42<sup>MAPK2</sup>, nie jest więc niezbędna do inaktywacji MPF. Być może, rola tego czynnika polega, jak już wspomniano, na opóźnieniu (utrudnieniu) degradacji cykliny B w trakcie trwania blokady metafazowej II podziału mejotycznego, której towarzyszy ciągła synteza tego białka (Sun i in., 2002; Takakura i in., 2005). Natomiast, aktywacja hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych indukowałaby zachwianie tej subtelnej równowagi poprzez gwałtowne uruchomienie szlaku biodegradacji cyklin. Ponadto uważa się, że wysoki poziom aktywności MAPK jest niezbędny do emisji dodatkowych struktur parapolocytarnych i przejścia cybryd klonalnych z cyklu pseudomejotycznego do mitotycznej interfazy I cyklu podziałowego bruzdkowania. Z kolei, wzrost stopnia defosforylacji reszt tyrozyny oraz seryny i treoniny (inaktywacji) kinazy MAP jest zsynchronizowany w czasie z inicjacją formowania pseudoprzedjądrzy przez cybrydy klonalne świń (8–12 godzin po sztucznej aktywacji) (Lai i in., 2001; Cheong i in., 2002; Ito i Shimada, 2005).

Można zatem zaproponować hipotezę, że wykorzystanie zjawiska wspomaganej jonoforezy w chemicznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów świńi powoduje opóźnienie mechanizmu gradacji spadkowej aktywności czynnika CSF. Wydaje się, że inaktywacja CSF w cybrydach klonalnych świńi mogłaby zachodzić dwustopniowo w odpowiedzi na działanie jonomycyny lub jonoforu wapnia A23187. Najpierw przejściowo inaktywowany byłby efektor (moderator) kinazy MAP – kinaza MAPK/ERK (MAPKK/MEK; ang. *MAPK/ERK kinase*), a dopiero później następowałaby stopniowa degradacja nadrzędnej fosfotransferazy z rodziny kinaz kinazy MAPK/ERK (MAPKKKs/MEKKs; ang. *MAPK/ERK kinase kinases*), czyli fosfotransferazy p39<sup>Mos</sup> i w trzeciej kolejności – inaktywacja substratu kinazy MEK, czyli MAPK (Ohashi i in., 2003). Zanim miałyby miejsce inicjacja stopniowanej inhibicji aktywności CSF w cybrydowych zygotach klonalnych aktywowanych kationitami doszłoby już w nich do resyntezy cykliny B i zahamowania cyklu mejotycznego w tzw. bloku metafazowym III (stadium MIII) pod wpływem spowolnienia procesu degradacji kinazy p39<sup>Mos</sup>. Z kolei, w wyniku opóźnienia

inaktywacji MAP kinazy (defosforylacji ERK1/2, a następnie rozpadu cykliny A), spowodowanego zanikiem mechanizmu transdukcji sygnału jonowego, zapoczątkowanego działaniem jonoforów wapnia, szybkość (kinetyka) reakcji ponownej syntezy cykliny B wyrównałaby się z tempem jej proteolitycznej degradacji (Haccard i in., 1993).

Przypuszcza się, że osłabienie natężenia sygnałów wapniowych w kilka (4–5) godzin od momentu zadziałania bodźca aktywującego przyspiesza po wyrzuceniu figur parapolocytarnych bezpośrednie wejście cybrydowych zygot klonalnych w fazę MIII cyklu pseudomejotycznego i zahamowanie formowania pseudoprzedjądrzy, analogicznie jak w przypadku interkinezy oocytów, czyli bezpośredniego przejścia z jednej fazy M do następnej. Częstotliwość występowania tego zjawiska, określanego mianem rzekomej interkinezy znacznie wzrasta w przypadku przedwczesnej aktywacji chemicznej hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych zrekonstruowanych z oocytów wykazujących szybkie tempo dojrzewania mejotycznego *in vitro*, w których w stadium późnej prometafazy lub wczesnej metafazy II został zainicjowany proces wyrzucania ciała kierunkowego I rzędu, co potwierdza słabo widoczny „zarys” odcinającego się polocyty. Dlatego też, w klonowaniu somatycznym świń, a także innych gatunków zwierząt gospodarskich, preferowane są takie procedury aktywacji chemicznej, których molekularny mechanizm polega na sprzężeniu przejściowego obniżenia stężenia MPF indukowanego wyrzutem jonów wapnia z depozytów wewnątrzocytarnych zdługo trwałą inhibicją czynnika MPF i fosfotransferazy MAP (jednego z głównych enzymów warunkujących aktywność CSF) (Ohashi i in., 2003). Odwracalna inaktywacja egzogenna obu tych kinaz cyklino-zależnych jest inicjowana i utrzymywana albo na skutek stabilnego zablokowania translacji, a tym samym resyntezy cykliny B i cykliny A, w przypadku inkubacji zygot klonalnych w roztworze cykloheksimidu albo na skutek hamowania współzawodniczego (inhibicji kompetycyjnej) aktywności fosforylaz białkowych z rodziny CDKs (na zasadzie współzawodnictwa z ATP), w przypadku inkubacji zrekonstruowanych oocytów w obecności analogu puromycyny, 6-DMAP (Moos i in., 1995; Nussbaum i Prather, 1995; Leal i Liu, 1998).

Zastosowanie niespecyficznych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych w dwustopniowej aktywacji chemicznej cybryd klonalnych świni indukuje także szereg innych korzystnych zmian biochemicznych i ultrastrukturalnych w ich hybrydowym środowisku cytoplazmatycznym. Zahamowanie aktywności kinaz z rodziny CDK w cytozolu zrekonstruowanych oocytów świni prowadzi bezpośrednio lub pośrednio do zablokowania aktywności innych kinaz białkowych, m.in. kinazy łańcuchów lekkich miozyny (MLCK; ang. *myosin light chain kinase*) (Green i in., 1999) lub kinaz białkowych C oraz A (PKC oraz PKA; ang. *protein kinases C and A*) (Ito i in., 2003).

Udowodniono bowiem, że w szlakach transdukcji sygnału wapniowego w cytoplazmie oocytów ssaków fosforylacja substratu kinazy MLCK jest katalizowana przez zależne od kalmoduliny cząsteczki kinaz łańcuchów lekkich miozyny oraz kinaz białkowych C. Z kolei, centrum aktywne fosfotransferazy MLCK jest również fosforylowane przez kinazy białkowe PKC oraz PKA (Sun i in., 1997). Lorca i in. (1991) wykazali natomiast, że oligopeptyd MLCK (791–814), który stanowi domenę inhibitorową z kinazy łańcuchów lekkich miozyny, obejmującą sekwencję reszt aminoacylowych 791–814 jednej z podjednostek białkowych enzymu MLCK, posiada zdolność odwracalnego, konkurencyjnego hamowania aktywności kalmoduliny i pośrednio CaM-PK-II, a w konsekwencji zapobiega degradacji cyklin B przy udziale jonów  $Ca^{2+}$  (Markoulaki i in., 2003; Knott i in., 2006). Z tego też powodu, region inhibitorowy MLCK (791–814) jest określany jako kompetycyjnie wiążący kalmodulinę pseudosubstrat, czyli bloker izosteryczny zależnej od  $Ca^{2+}$ -kalmoduliny kinazy białkowej typu II (Blumenthal i in., 1985; Fan i in., 2003; Ito i in., 2004 a). Dlatego, inaktywacja kinaz MLCK, PKC oraz PKA, wzbudzona efektem oddziaływania 6-DMAP doprowadza do gwałtownej destrukcji cyklin i wznowienia zahamowanego dotąd w metafazie II podziału mejotycznego (wyrównawczego) oocytów świni w następstwie szybkiego obniżenia się koncentracji MPF w cytoplazmie (Ito i in., 2004 b; Madgwick i in., 2005; Takakura i in., 2005). Ponadto, 6-dimetyloaminopuryna indukuje w zrekonstruowanych oocytach przejściowy rozpad aparatu mikrotubularnego wrzeciona ka-

riokinetycznego w wyniku zahamowania reakcji fosforylacji licznych białek towarzyszących mikrotubulom (MAP; ang. *microtubule-associated proteins*) za pośrednictwem kinazy aktywowanej przez mitogeny (MAPK), należącej do rodziny kinaz CDK (Loi i in., 1998; Susko-Parrish i in., 1994; Sun i in., 2002). Inhibicja kinazy MAP jest bezpośrednią przyczyną zablokowania kariokinezy w zrekonstruowanych oocytach świni, co prowadzi również do zmian w organizacji sieci mikrofilamentów aktynowych cytoszkieletu. Wszystkie te procesy zainicjowane przez 6-dimetyloaminopurynę w cybrydach klonalnych zapobiegają wyrzucaniu dodatkowych struktur parapolocytarnych do przestrzeni okołoołtkowej i formowaniu haploidalnych jąder interfazowych, nazywanych mikropseudopredjadrzami (Hyun i in., 2003 a; Ito i in., 2003; Kurome i in., 2003). Z kolei, zachowanie diploidalnego statusu ( $2n=38$  chromosomów) przez rzekome przedjadrza w cybrydowych zygotach zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych w fazach G0/G1 cyklu mitotycznego jest warunkiem koniecznym do utrzymania przez nie wysokiego potencjału rozwojowego do stadium blastocysty (Boquest i in., 2002; Cheong i in., 2002; Ito i Shimada, 2005).

#### **Aktywacja chemiczna zrekonstruowanych oocytów z wykorzystaniem etanolu**

Kolejnym czynnikiem aktywującym, stosowanym niezmiernie rzadko w klonowaniu somatycznym świń, jest alkohol etylowy (tab. 1). Przyczyny tak małego zainteresowania tym aktywatorem chemicznym są różnorakie. Po pierwsze, ekspozycja zrekonstruowanych oocytów świni na działanie 7% etanolu przez 5–7 minut indukuje tylko pojedynczy przyrost wewnątrzkomórkowej koncentracji jonów  $Ca^{2+}$ , w niewielkim stopniu przypominający zmiany stężenia wapnia obserwowane w czasie zapłodnienia oocytów (Didion i in., 1990; Shiina i in., 1993; Fissore i in., 1999; Macháty i in., 1999). Po drugie, mimo że etanol stymuluje w cybrydowych zygotach klonalnych świni szlak sygnałowy prowadzący do powstania  $InsP_3$ , to generuje tylko częściowo wyrzut kationów  $Ca^{2+}$  z rezerwuarów wewnątrzocytarnych, a wydłużona, 10-minutowa inkubacja oocytów przy wyższym stężeniu procentowym (ok. 10%) etanolu hamuje

receptory  $\text{InsP}_3$ , odpowiedzialne za otwieranie kanałów wapniowych (Ilyin i Parker, 1992; Macháty i in., 1999; Prather i in., 1999). Po trzecie, ogromna większość jonów wapnia, które zostały zgromadzone w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów świni, poddawanych działaniu alkoholu etylowego pochodzi z egzogennych źródeł wapnia zakumulowanych w pożywce hodowlanej (Shiina i in., 1993; Fissore i in., 1999; Macháty i in., 1999).

Pomimo opisanych powyżej niektórych niekorzystnych skutków oddziaływania etanolu na oocyty świni, znacznie odbiegającego od mechanizmu naturalnej aktywacji spowodowanej wniknięciem plemnika do ooplazmy, Uhma i in. (2000) zdecydowali się na wybór właśnie takiego czynnika aktywującego dalszy program rozwojowy oocytów zrekonstruowanych techniką docytoplazmatycznej mikroiniekcji karioplazm, wyizolowanych z komórek wzgórka jajonośnego.

Zastosowany w doświadczeniach pod kierunkiem Uhma i in. (2000) system 2-godzinnej pre-inkubacji cybryd klonalnych świń w pożywce NCSU-23 (ang. *North Carolina State University-23*) o niskiej sile jonowej, a następnie 5-minutowej post-aktywacji z wykorzystaniem 7% etanolu doprowadził do uzyskania w warunkach *in vitro* około 5,5% blastocyst.

W porównaniu z rezultatami badań własnych (Skrzyszowska i in., 2008), badań przeprowadzonych przez Boquesta i in. (2002) oraz Hyuna i in. (2003 a), w których do zabiegu klonowania somatycznego świń wykorzystano inne chemiczne czynniki aktywujące (jonomycyna wapnia oraz CHXM lub 6-DMAP) oocyty zrekonstruowane z jąder fibroblastów płodowych, jest to znacznie słabszy wynik (5,5% vs. 12%–23%). Jednak, nieznaną są bezpośrednio przyczyny spadku potencjału rozwojowego *in vitro* cybrydowych zygot klonalnych świń, które były aktywowane alkoholem etylowym.

Wydaje się, że kompetencje rozwojowe zarodków zrekonstruowanych z jąder komórek pęcherzykowych mogły zostać znacznie obniżone przez połączenie w badaniach Uhma i in. (2000) strategii aktywacji chemicznej hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych z ich wydłużoną aż do 5 godzin post-inkubacją w obecności cytochalazyny B o bardzo wysokiej koncentracji (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pożywki hodowlanej).

## Aktywacja chemiczna zrekonstruowanych oocytów z wykorzystaniem timerosalu i ditio-treitolu

Jedynym czynnikiem aktywującym, który indukuje długą serię repetytywnych wyrzutów jonów  $\text{Ca}^{2+}$  o charakterze falowym w dojrzałych mejotycznie oocytach świni, jest timerosal (tab. 1), określane również często tiomersalem lub mertiolem według alternatywnej, zwyczajowej (tradycyjnej) nomenklatury chemicznej. Timerosal, czyli etylortęciotiosalicylan sodu ( $\text{C}_9\text{H}_9\text{HgSNa}$ ) jest analogiem rtęciowo-siarkowym kwasu *o*-hydroksybenzoesowego (2-hydroksyfenylomrówkowego;  $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COOH}$ ) lub pochodną związków tiofenolowych (*o*-merkaptobenzoesanów), syntetyzowaną z chlorku etylortęciowego ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$ ) i kwasu tiosalicylowego (*o*-merkaptobenzoesowego;  $\text{C}_7\text{H}_2\text{O}_2\text{SNa}$ ). Dlatego też, zgodnie z zasadami systematycznego nazewnictwa chemicznego, timerosal definiowany jest także powszechnie mianem soli sodowej kwasu 2-etylorięciomerktobenzoesowego lub soli sodowej rtęcio-([*o*-karboksyfenyl]tio)etylu. W przeciwieństwie do wszystkich innych bodźców fizykochemicznych, stymulujących tylko pojedynczy przyrost kationów wapnia w cytoplazmie partenogenetycznie aktywowanych oocytów MII lub cybryd klonalnych, timerosal generuje oscylacyjne zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia kationów wapnia, najbardziej przypominające mechanizm aktywacji naturalnej, spowodowanej penetracją oocytu świni przez plemnik (Cheek i in., 1993; Macháty i in., 1997 b, 1999; Tao i in., 2000).

Timerosal (tab. 1) jako czynnik utleniający, tj. indukujący dehydrogenację grup sulfhydrylowych (tiolowych lub merkaptanowych) receptorów *myo*-inozytolo-1,4,5-*tris*fosforanu, stanowiących integralną część  $\text{InsP}_3$ -zależnych kanałów wapniowych, jest zdolny do wielokrotnej mobilizacji wewnątrzkomórkowych depozytów kationów wapnia w cybrydach klonalnych świń. Dziesięciominutowa inkubacja hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych w pożywce uzupełnionej 200  $\mu\text{M}/\text{L}$  timerosalu (Tao i in., 1999 a,b; Hao i in., 2006; Im i in., 2006; Yuan i in., 2014) okazała się optymalną strategią aktywacji. Wynurzenie się pierwszej fali przyrostu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w ooplazmie następowało w ciągu 5,5 min od chwili rozpoczęcia ekspozycji oocytów na działanie timerosalu, a liczba pulsacyjnych wyrzu-

tów wapnia wahała się od dwóch do sześciu. Pierwsza kaskadowa fala wylewu kationów wapnia do ooplazmy wykazywała największą amplitudę wychyleń od równowagi stężeniowej  $\text{Ca}^{2+}$ . Kolejne oscylacje wapniowe charakteryzowały się stopniowym obniżaniem się amplitudy oraz częstotliwości ich występowania. Po 30–45 minutach od rozpoczęcia aktywacji zrekonstruowanych oocytów świni obserwowano całkowity zanik oscylacji w cytoplazmie.

Poza korzystnym efektem oddziaływania na cybrydy klonalne świni timerosal wykazuje jednak niewielkie właściwości cytotoksyczne, gdyż utlenia również grupy tiolowe ( $-\text{SH}$ ) tubuliny do wewnątrzcząsteczkowych mostków disulfidowych (wiązań disiarczkowych;  $-\text{S}-\text{S}-$ ) w następstwie reakcji dehydrogenacji. Hamuje on przez to polimeryzację mikrotubuli kinetochorowych i biegunowych oraz doprowadza do częściowej degradacji wrzeciona kariokinetycznego, a także pozostałych elementów cytoskieletu mikrotubularnego zrekonstruowanych oocytów (m.in. centrów organizujących cytoplazmatyczną sieć mikrotubuli o konformacji dicentriolarnej astrosfery centrosomów lub tetracentriolarnej astrosfery diplosomów). Dlatego też, w procedurach post-aktywacji cybrydowych zygot klonalnych zaleca się stosowanie timerosalu w kombinacji z 1,4-ditiotreitolom (Tao i in., 1999 a,b, 2000; Hao i in., 2006; Im i in., 2006; Yuan i in., 2014) (tab. 1).

1,4-ditiotreitol lub 1,4-ditio-DL-treitol (DTT; odczynnik/reagent Clelanda) (tab. 1) stanowi małowcząsteczkowy, disulfhydrylowy związek z grupy tioglikozydów o strukturze chemicznej podwójnego tiolu (merkaptanu), określane według ogólnej nomenklatury systematycznej jako treo-2,3-dihydroksybutano-1,4-ditiol, treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiolobutan lub treo-1,4-dimerkapt-2,3-butanodiol [ $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ ;  $(\text{C}_2\text{H}_2\text{OHS})_2$ ]. Może on występować w postaci tzw. chiralnego reagentu Clelanda, tj. pojedynczego enancjomeru (stereoizomeru optycznie czynnego) albo szeregu D (konfiguracja *R*) o skrótowej nazwie D-DTT – D-treo-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diolu [(2*R*,3*R*)-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diolu], czyli D-treo-1,4-dimerkapt-2,3-butanodiolu [(2*R*,3*R*)-1,4-dimerkapt-2,3-butanodiolu] albo szeregu L (konfiguracja *S*) o skrótowej nazwie L-DTT – L-treo-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diolu [(2*S*,3*S*)-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diolu], czyli L-treo-1,4-

dimerkapt-2,3-butanodiolu [(2*S*,3*S*)-1,4-dimerkapt-2,3-butanodiolu]. Z kolei, drugą formą DTT, definiowaną jako racemiczny reagent Clelanda, jest mieszanina racemiczna dwóch enancjomerów zarówno szeregu D, jak i L, tj. DL-treo-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diol, czyli DL-treo-1,4-dimerkapt-2,3-butanodiol (DL-DTT) (Cheek i in., 1993; Macháty i in., 1997 b). DTT jest związkiem chiralnym, a nazwa ditiotreitol wywodzi się od czterowęglowego cukru (aldotetrozy) – treozy [(2*R*,3*S*)-2,3,4-trihydroksybutanal;  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$ ], posiadającego odpowiadającą DTT konfigurację przestrzenną. Epimerycznym analogiem (diastereoizomerem) ditiotreitola jest inny tioglikozyd z grupy reagentów Clelanda – 1,4-ditioerytrol, czyli erytro-1,4-dimerkapt-2,3-butanodiol lub erytro-2,3-dihydroksy-1,4-butanodiol (DTE;  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ ). Odpowiada on konformacją erytrozie [(2*R*,3*R*)-2,3,4-trihydroksybutanalowi;  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$ ], epimerze treozy, różniące się od niej stereoizomeryczną konfiguracją (położeniem podstawników) przy jednym asymetrycznym atomie węgla.

Role ditiotreitola (tab. 1) jest redukcja (hydrogenacja) mostków disiarczkowych (disulfidów) tubuliny oraz białek receptorowych specyficznych dla  $\text{InsP}_3$  lub rianodyny, które są odpowiedzialne za cykliczne uwalnianie wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z rezerwuarów ooplazmatycznych. Ze względu na antagonistyczne właściwości w stosunku do timerosalu, DTT redukując wiązania disulfidowe wyżej wspomnianych białek sam przybiera formę pierścieniową typu heterocyklicznego w wyniku utworzenia wewnątrzcząsteczkowego mostku  $-\text{S}-\text{S}-$ , który jest efektem reakcji jego utlenienia (oksydacji) poprzez dehydrogenację dwóch grup sulfhydrylowych. Dlatego też, jest on zdolny do regeneracji ultrastruktury wrzeciona podziałowego oraz inhibicji oscylacji wapniowych w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów świni (Macháty i in., 1997 b; Prather i in., 1999; Tao i in. 2000).

Procedura dwustopniowej post-aktywacji cybryd klonalnych świni z wykorzystaniem kombinacji timerosalu i DTT posiada również szereg różnych wad, które w wielu przypadkach wykluczają możliwość jej praktycznej aplikacji. Jednakże, Tao i in. (1999 a,b) zdecydowali się na zastosowanie tego systemu aktywacji w swoim protokole eksperymentalnym. Strategia 10-minutowej inkubacji hybryd jądrowo-cytopla-

zmatycznych świń w obecności 200  $\mu$ M/L timerosalu, a następnie poddawania ich działaniu 8 mM/L ditiotretolu w czasie 30 minut doprowadziła do uzyskania w warunkach pozaustrojowych około 41% kompaktnych morul oraz 3,7% blastocyst (Tao i in., 1999 b). W porównaniu do rezultatów badań przeprowadzonych przez Tao i in. (1999 b), w eksperymentach własnych oocyty świń zrekonstruowane z jąder transfekowanych fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników i aktywowane za pomocą innych czynników chemicznych (jonomycyny wapnia i cykloheksimidu) wykazywały ponad trzykrotnie wyższe kompetencje rozwojowe *in vitro* do stadium moruli i blastocysty (3,7% vs. 14,0%) (Skrzysowska i in., 2008). W doświadczeniach przeprowadzonych przez Kühholzera i in. (2000) nie udało się zweryfikować powtarzalności wyników otrzymanych przez Tao i in. (1999 b). Potencjał rozwojowy do stadium moruli i blastocysty wśród cybrydowych zygot klonalnych zrekonstruowanych z dojrzałych *in vitro* oocytów, które aktywowano za pomocą timerosalu i ditiotretolu, uległ drastycznemu obniżeniu w warunkach hodowli *in vitro* do poziomu, odpowiednio: 2,2% oraz 1,1%. Przyczyną tak znacznego ograniczenia kompetencji rozwojowych cybryd klonalnych świń poddawanych działaniu timerosalu oraz DTT może być ich wysoka podatność na wyrzucanie dodatkowych struktur parapolocytarnych i wtórna haploidyzacja ich genomu jądrowego pod wpływem silnych sygnałów jonowych, dostarczanych przez te tio pochodne, organiczne czynniki aktywujące. Macháty i in. (1997 b) wykazali bowiem, że aż 73,3% oocytów świń wyrzucało ciała kierunkowe II rzędu po sztucznej aktywacji timerosalem i DTT.

#### **Transkomplementarna aktywacja biologiczna zrekonstruowanych oocytów z wykorzystaniem białkowych czynników oscylogennych, zakumulowanych w cytoplazmie i podbłonowym cytoszkielecie zygot**

Ciekawym rozwiązaniem, pozwalającym na przynajmniej częściowe ominięcie potrzeby stosowania protokołów sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów świń, okazało się zaadaptowanie bardzo wyrafinowanej techniki dwustopniowej transplantacji jąder komórko-

wych, po raz pierwszy wykorzystanej w klonowaniu zarodkowym myszy (Kwon i Kono, 1996), do badań nad klonowaniem somatycznym świń (Polejaeva i in., 2000). W pierwszym etapie tego podwójnego cyklu klonowania, połączonego z wymianą przedjądrzy, metodą elektrofuzji wprowadzano jądra hodowanych *in vitro* komórek ściennej warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych do enukleowanych oocytów. Dwa, generowane bezpośrednio po sobie 60- $\mu$ sekundowe impulsy prądu stałego o natężeniu pola elektrostatycznego rzędu 1,5 kV/cm okazały się nie tylko właściwym czynnikiem fuzjogennym dla ooplastów i komórek somatycznych, lecz także czynnikiem aktywującym rekonstruowane hybrydy jądrowo-cytoplazmatyczne I rzędu. Następnie, cybrydy klonalne I stopnia poddawano dodatkowej elektrostymulacji, składającej się z dwóch kolejno następujących po sobie 60- $\mu$ sekundowych impulsów prądu stałego o sile pola elektrycznego 1,2 kV/cm. W drugim etapie tej skomplikowanej strategii z cybrydowych zygot klonalnych I rzędu przygotowywano karioplasty zawierające rzekome przedjądrza i transferowano je techniką elektrofuzji do uprzednio enukleowanych zygot świń, rozwijających się z zapłodnionych *in vivo* oocytów. Zrekonstruowane zarodki II stopnia bezpośrednio transplantowano do jajowodów hormonalnie zsynchronizowanych loch. Taka technika seryjnego klonowania świń umożliwiła wyeliminowanie szkodliwych efektów ubocznych sztucznej aktywacji fizycznej lub chemicznej przynajmniej w drugim etapie transplantacji egzogennych jąder komórkowych, w którym wykorzystano zapłodnione komórki jajowe. Uważa się ponadto, że osiągnięta tą drogą sekwencyjna ekspozycja wprowadzonego jądra komórki somatycznej, najpierw na czynniki białkowe obecne w cytoplazmie oocytu (ooplazmie), a następnie na czynniki zakumulowane w cytoplazmie zygoty, może przyczynić się do pełniejszego przeprogramowania epigenetycznego DNA genomowego zrekonstruowanego zarodka II generacji. Mechanizm fizjologicznej aktywacji, polegający na wielokrotnym wynurzaniu się oscylacyjnych fal przyrostu wewnątrzkomórkowej koncentracji kationów wapnia, jaki został uruchomiony po wnikięciu plemnika do dojrzałych *in vivo* oocytów świń (zapłodnienie monospermiczne), doprowadził do powstania zygot sta-

nowiących źródło cytoplasmów w drugim cyklu transplantacji konformacyjnie przemodelowanych jąder komórkowych (pseudopredjadry), a w dalszej konsekwencji do pełnego rozwoju rekonstruowanych zarodków II generacji po ich przeszczepieniu do dróg rodnych biorecipientów (Polejaeva i in., 2000).

Wykorzystanie zygot jako źródła biorecipientów jąder komórkowych II rzędu w procedurze re-klonowania połączonej z wymianą przedjadry okazało się bardzo korzystnym rozwiązaniem. Mikrośrodowisko cytoplazmatyczne lub cytoszkielet podbłonowej (suboplazmatycznej) strefy kortykalnej zapłodnionych komórek jajowych są bowiem bogate w szereg rozpuszczalnych czynników białkowych, wchłoniętych wraz z cytozolem i jądrami plemników po fuzji błon plazmatycznych gamet lub nierozpuszczalnych, plemnikowych czynników podbłonowych (niecytozolowych), ulegających inkorporacji (internalizacji) do struktury membranoszkieletu oocytów. Wysokie stężenie endogennych białek plemników w cytoplazmie lub mikrofilamentowym szkielecie błonowym enukleowanych zygot może znacznie ułatwiać strukturalne przemodelowanie i epigenetyczne przeprogramowanie jąder komórek somatycznych w przedimplantacyjnych zarodkach klonalnych. Te specyficzne białka plemnikowe związane z nukleoplazmą lub materiałem wokółjądrowym (cytoplazmą perinuklearną), a także z cytoszkieletem podbłonowym wykazują zdolność do generowania wielokrotnych cykli opróżnień wewnątrzkomórkowych rezerwuarów wapniowych w oocytach. Repetytywne wynurzanie się falowych wyrzutów hiperkalcemicznych w ooplazmie stanowi końcowy etap molekularnego mechanizmu wtórnego przekąźnictwa  $Ca^{2+}$ -zależnych sygnałów aktywujących genetycznie uwarunkowany program rozwoju zarodkowego (Swann i Lai, 1997; Kimura i in., 1998). Falowy (pulsacyjny) charakter docytozolowych wylewów jonów  $Ca^{2+}$  z cystern i kanalików siateczki śródplazmatycznej gładkiej jest utrzymywany przez cały I cykl podziałowy zygoty aż do momentu rozpoczęcia okresu interfazowego przez zarodki myszy w stadium 2-blastomerowym. Oscylacje wapniowe, trwające przez tak długi okres czasu (12 do 24 godzin od momentu zapłodnienia komórki jajowej), mogą być wywoływane tylko i wyłącznie za pośrednictwem tzw. oscylogennych czynników białko-

wych wprowadzanych wraz z cytozolem perinuklearnym i kariolimfą jądrową lub cytoszkieletem podbłonowym plemnika do ooplazmy bądź membranoszkieletu oocytarnego. Białka te ulegają proteasomowej (zależnej od ubikwityny) degradacji dopiero po ukończeniu interfazy II cyklu mitotycznego bruzdkowania zarodków (Kono i in., 1995; Zernicka-Goetz i in., 1995; Jellerette i in., 2000, 2004; Marangos i in., 2003).

### **Transkomplementarna aktywacja pseudofizjologiczna zrekonstruowanych oocytów z wykorzystaniem białkowych czynników oscylogennych pochodzenia plemnikowego**

Na obecnym etapie badań z zakresu klonowania somatycznego świń i innych gatunków ssaków prowadzone są intensywne próby nad opracowaniem alternatywnej, w stosunku do metod aktywacji fizycznej i chemicznej rekonstruowanych oocytów, strategii aktywacji biologicznej (transkomplementarnej) z wykorzystaniem ekstraktów cytozolo-kariolimfatycznych, wyizolowanych z plemników, które są potencjalnym źródłem czynników białkowych spełniających rolę induktorów oscylacji wapniowych (tab. 1). Dwukrotna mikroiniekcja odpowiednio zbuforowanych ksenogenicznych ekstraktów (homogenatów) cytozolowych i nukleoplazmatycznych plemników knura do cytoplazmy rekonstruowanych oocytów była inicjowała w cybrydowych zygotach klonalnych serią repetytywnych wyrzutów jonów  $Ca^{2+}$ , niemal idealnie naśladującą wzorzec fizjologicznej aktywacji obserwowanej w czasie zapłodnienia oocytów krwi lub dojrzalej płciowo jałowki (Knott i in., 2002).

Potencjalnymi kandydatami do grupy tzw. transkomplementarnych, plemnikowych białek cytozolowych o wysokim stopniu rozpuszczalności, które biorą bezpośredni lub pośredni udział w generowaniu i biochemicznej regulacji długotrwałej kaskady wylewów jonów  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie oocytów, a następnie zygot i komórek wczesnych zarodków 2-blastomerowych, są m.in.: (1) specyficzna dla komórek spermatogenicznych izoforma fosfolipazy C, tj. izoenzym PLC $\zeta$  (PLC-zeta) o masie molekularnej 74 kDa (Cox i in., 2002; Saunders i in., 2002; Nomikos i in., 2005; Yoneda i in., 2006; Samiec i Skrzyszowska, 2014); (2) białko indukujące oscylacje kationów wapnia określane oscylliną lub oscyl-

logenem (o masie cząsteczkowej 33 kDa), wykazujące prawdopodobnie aktywność izomerazy lub deaminazy glukozoamino-6-fosforanowej (GNPI lub GNPD), która katalizuje konwersję glukozoamino-6-fosforanu (GNP) do fruktozo-6-fosforanu i  $\text{NH}_{3(\text{aq})}$  ( $\text{NH}_4^+$ ) z jednoczesnymi reakcjami izomeryzacji (tautomeryzacji) aldehydo-wo-keetonowej oraz aminacji/deaminacji (Parrington i in., 1996; Swann i Lai, 1997; Fissore i in., 1998; Wu i in., 2001); (3) receptor powierzchniowy Kit, będący produktem ekspresji protoonkogenu *c-kit* o mimetycznej aktywności kinazy tyrozynowej receptorów transbłonowych oocytu (Sette i in., 1998) oraz (4) białko perinuklearne, zwane też białkiem wokółjądrowej macierzy cytoplazmatycznej (Kimura i in., 1998). Z kolei, do plemnikowych, nierozpuszczalnych białek podbłonowych (niecytozolowych), które kandydują do roli czynników oscylogennych w cyklicznych wahaniach falowych wewnątrzocytarnej koncentracji wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , należą termostabilne izoformy czynnika białkowego izolowanego z macierzy podbłonowej (membranoszkieletu) segmentu równikowego główki plemnika o masie 30–120 kDa – SOAF (ang. *sperm-borne oocyte activating factor*) (Kimura i in., 1998; Perry i in., 1999, 2000; Ogonuki i in., 2001). Zweryfikowanie tej procedury pseudofizjologicznej aktywacji transkomplementarnej (transcytozolowej lub transnukleoplazmatycznej) zrekonstruowanych oocytów w klonowaniu somatycznym świń pozostaje zapewne już tylko kwestią czasu, bowiem może się ona okazać przełomowym rozwiązaniem, znacznie zwiększającym efektywność sztucznej stymulacji programu rozwojowego cybrydowych zygot klonalnych.

### **Wpływ cytochalazyny B na efektywność aktywacji oocytów świńi zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych**

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że szereg czynników aktywujących, a w szczególności zmnożona elektrostymulacja, indukuje proces uwalniania do przestrzeni okołozótkowej przez zrekonstruowane oocyty świńi, podobnie jak i mysie, dodatkowych struktur przypominających ciała kierunkowe, nazywanych pseudopolocytami lub rzekomymi ciałkami kierunkowymi (Cha i in., 1997; Miyoshi i in., 2000,

2002; Hwang i in., 2015; Hua i in., 2016; Huang i in., 2016; Kim i in., 2016).

Wysoka wrażliwość oocytów świńi na wszelkie sygnały jonowe, dostarczane przez sztuczne aktywatory, niezależnie od stopnia inwazyjności ich parametrów fizykochemicznych obniża z pewnością próg tolerancji cybrydowych zygot klonalnych na wielkość natężenia sygnałów jonowych, dostarczanych przez egzogenne bodźce stymulujące inicjację programu rozwojowego zrekonstruowanych zarodków oraz czyni je komórkami bardziej podatnymi na wyrzucanie struktur parapolocytarnych II rzędu w porównaniu z oocytami innych gatunków zwierząt gospodarskich (bydło, owce, kozy). Dlatego też, w przypadku rekonstrukcji oocytów świńi z jąder komórek w fazach G0/G1 zaleca się łączenie protokołów aktywacji z post-aktywacyjną inkubacją cybryd klonalnych w pożywce zawierającej 5–7,5  $\mu\text{g/mL}$  cytochalazyny B (CB) przez co najmniej 2 godziny (Onishi i in., 2000; De Sousa i in., 2002; Miyoshi i in., 2002; Lee i in., 2016). Jest to uzasadnione tym, że cytochalazyna B jako inhibitor polimeryzacji mikrofilamentów aktywnych, będących głównym składnikiem cytoszkieletu i membranoszkieletu oocytu, hamuje jego szczątkową (poronną) cytokinezę biegunową, a więc zapobiega uwolnieniu do przestrzeni okołozótkowej pseudopolocytu. Wynikiem tego jest zachowanie normalnego diploidalnego statusu ( $2n=38$  chromosomów) przez upodabniające się do przedjądrzy zapłodnionych komórek jajowych (zygot) pod względem morfologicznym i cytofizjologicznym interfazowe jądra somatogeniczne, które uległy konfiguracyjnemu (architektonicznemu) przemodowaniu w środowisku cytoplazmatycznym zrekonstruowanych oocytów i z tego powodu są określane mianem struktur parapronuklearnych, rzekomych przedjądrzy lub pseudopredjądrzy. Prawidłowa ploidia genomu jądrowego, decydująca w dużym stopniu o wysokim potencjale rozwojowym zarodków klonalnych świńi zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych, których cykl mitotyczny został zsynchronizowany *in vitro* na granicy stadiów G0/G1 lub G2/M, zależy więc nie tylko od odpowiedniej koordynacji faz cyklu podziałowego komórek-dawców jąder oraz oocytów MII, lecz także od stopnia progresji lub regresji procesu emisji (wyrzucenia) II ciała kierunkowego w wyniku wznowie-

nia cyklu pseudomejotycznego uzyskanych cybryd klonalnych. Wyróżnicowane, w następstwie przedwczesnej kondensacji presyntetycznej lub postsyntetycznej chromatyny jądrowej komórek-dawców w stadiach G0/G1 lub G2/M, chromosomy każdej z 19 homologicznych par płytki metafazowej, składają się, odpowiednio: z pojedynczych chromatyd niesiostrzanych lub z podwójnych chromatyd siostrzanych, czyli posiadają diploidalną (2C) lub tetraploidalną (4C) liczbę cząsteczek DNA. Gdyby proces uwolnienia dodatkowej struktury parapolocytarnej został zainicjowany w wyniku sztucznej aktywacji oocyty, wówczas prawidłowa ploidia byłaby zachowana tylko w przypadku cybryd klonalnych, posiadających przemodelowane jądra komórkowe, które zostały przeszczepione w fazach G2/M. Połowa cząsteczek DNA (2C) zostałaby usunięta wraz z wyrzuconym pod osłonkę przejrzystą oocyty rzekomym ciałkiem kierunkowym, a druga połowa zostałaby zachowana w formie zrearranzowanej chromatyny formującej pseudopredjędrze, a następnie po ponownej replikacji osiągnęłaby przed I podziałem bruzdkowania powtórnie poziom tetraploidalny (4C). Natomiast, w przypadku niewyrzucenia polocyty II rzędu prawidłowa ploidia cybrydowej zygoty klonalnej byłaby tylko wtedy utrzymana, gdyby do ooplastu MII zostało wprowadzone jądro komórki w fazach G0/G1 (posiadające 2C DNA). Transfer jąder komórek somatycznych w stadiach G0/G1 wymaga zatem z reguły kombinacji systemu aktywacji zrekonstruowanych oocytów (zwłaszcza metodą elektroimpulsacji) z ich post-inkubacją w obecności cytochalazyny B.

Znakomitą egzemplifikacją powyższych rozważań jest wykorzystanie procedury połączenia opóźnionej w stosunku do momentu rekonstrukcji stymulacji elektrycznej hybryd jądrocytoplazmatycznych z ich 3-godziną post-inkubacją w pożywce z dodatkiem 5 µg/mL CB przez Tomii i in. (2005). Badacze ci, w warunkach hodowli *in vitro* uzyskali 12,3% blastocyst klonalnych o średniej liczbie komórek sięgającej poziomu 54 – w wyniku transplantacji jąder płodowych komórek fibroblastycznych do enukleowanych oocytów (ooplastów) świni. Natomiast, po transplantacji jąder w fazach G2/M potrzeba stosowania protokołu post-aktywacji sprzężonego z traktowaniem oocytów cytochalazyną B została wyeliminowana na rzecz sygnałów ak-

tywacyjnych wzmocnionych przez podwyższenie stężenia odpowiednich aktywatorów chemicznych lub wydłużenie czasu ich oddziaływania na oocyty bądź przez znaczne zwiększenie natężenia impulsów prądu stałego lub prolongowanie czasu ich trwania (Lai i in., 2001; Ono i in., 2001). Ponadto, wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Miyoshi i in. (2000) wskazują, że oocyty rekonstruowane z jąder hodowanych komórek zarodkowych, wyprowadzonych z węzłów zarodkowych wylęgłych blastocyst świni, inkubowane po aktywacji w pożywce uzupełnionej 7,5 µg/mL cytochalazyny B, wykazywały znacznie wyższe kompetencje rozwojowe do stadium blastocysty niż cybrydy klonalne nie poddawane działaniu CB. Postaktywacyjna inkubacja sklonowanych zarodków w obecności CB przez 0–1 godzinę okazała się zbyt krótka, aby zapobiec wyrzuceniu dodatkowych struktur parapolocytarnych, dlatego też ponad 80% zygot charakteryzowało się obecnością jednego pseudopredjędrza i jednego ciałka kierunkowego. Sugeruje to, że w tak krótkim okresie czasu CB nie jest w stanie spowodować całkowitej depolimeryzacji większości mikrofilamentów aktynowych oocyty, co uniemożliwia skuteczne zablokowanie poronnej cytokinezy biegunowej i indukuje uwolnienie pseudopolocyty do przestrzeni okołozółtkowej sklonowanego zarodka. Z kolei, wydłużenie czasu ekspozycji na działanie cytochalazyny B do 2–4 godzin przyczyniło się do powiększenia populacji zarodków z dwoma pseudopredjędrzami i brakiem dodatkowych ciałek kierunkowych do poziomu 58–67%. To ostatnie zjawisko tłumaczy się tym, że efektywne oddziaływanie CB polega na zahamowaniu cytokinezy bez jakiegokolwiek negatywnego wpływu na przebieg kariokinezy, czego efektem jest powstanie dikariotycznej (dwujądrowej) interfazowej zygoty. Uzupełnieniem wymienionych rezultatów była obserwacja wpływu CB na dalszy rozwój zarodkowy zrekonstruowanych oocytów. Okazało się bowiem, że odsetek zarodków, które rozwinęły się do stadium blastocysty po 7 dniach hodowli *in vitro*, był istotnie wyższy po 2-godzinnym traktowaniu cybrydowych zygot klonalnych cytochalazyną B (23%) niż w grupie kontrolnej (5%). Sugerując się tymi wynikami, w badaniach własnych zastosowano także kompleksową metodę dwustopniowej aktywacji fizykochemicznej zrekonstruowanych



oocytów świń i ich post-inkubacji w obecności CB przez 1,5–2 godziny, gdyż źródłem komórek-dawców jąder były w tym przypadku hodowane *in vitro* do stanu pełnej konfluencji fibroblasty płodowe lub fibroblasty tkanki skórnej ucha dorosłych osobników, których cykl mitotyczny był poddawany sztucznej synchronizacji w fazach G1/G0 poprzez inhibicję kontaktową ich migracji i proliferacyjnego wzrostu (Skrzyszowska i in., 2008).

Interesującym aspektem sztucznej aktywacji hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych w klonowaniu somatycznym świń jest także brak zdolności wyrzucania pseudopolocytów lub wykazywanie jedynie bardzo ograniczonej zdolności do szczątkowej cytokinezy biegunowej przez oocyty świńi elektroaktywowane w momencie ich rekonstrukcji (Uhm i in., 2000; Verma i in., 2000; Lai i in., 2002; Kurome i in., 2003). Procedura jednoczesnej fuzji i aktywacji rekonstruowanych oocytów w polu elektrostatycznym uniemożliwia bowiem zajęcie w przeważającym odsetku uzyskanych cybryd klonalnych zjawiska przedwczesnej kondensacji interfazowej chromatyny (PCC; ang. *premature chromatin condensation*) jąder komórek somatycznych w mikrośrodku ooplazmatycznym z obniżonym poziomem MPF, przed uformowaniem pseudopredjądrzy. Ponieważ przedwczesne wyróżnicowanie (spiralizacja) chromosomów w cybrydach klonalnych jest warunkiem wstępnym i koniecznym do uwolnienia dodatkowych struktur, przypominających ciała kierunkowe, w zrekonstruowanych oocytach nie dochodzi do ukończenia II podziału pseudomejotycznego i tzw. szczątkowej (śladowej) cytokinezy, lecz wchodzi one bezpośrednio w interfazę I cyklu mitotycznego bruzdkowania.

W tym ostatnim przypadku nie zachodzi zatem konieczność post-inkubacji cybryd klonalnych świńi zrekonstruowanych z jąder komórek w fazach G0/G1 w pożywce z dodatkiem cytochalazyny B (Kühholzer i in., 2001; Park i in., 2001 a,b, 2002; Dai i in., 2002). Dlatego też, w badaniach własnych protokołów post-aktywacyjnej inkubacji hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych świńi zastosowano jedynie w następstwie sekwencyjnej aktywacji fizykochemicznej zrekonstruowanych oocytów, a nie w przypadku aktywacji rekonstruowanych oocytów inicjowanej w momencie ich fuzji

z komórkami fibroblastycznymi (Skrzyszowska i in., 2008).

### Podsumowanie

Optymalnym wzorcem sztucznej aktywacji byłyby wzorzec zbliżony do naturalnej aktywacji oocytu loszki lub lochy, inicjowanej przez penetrujący plemnik knura podczas zapłodnienia, który indukuje kaskadę procesów odpowiedzialnych za uwalnianie do ooplazmy wolnych jonów wapnia w postaci serii pulsacyjnych wyrzutów. Na obecnym etapie badań wydaje się, że wymagania te spełniają jedynie takie aktywatory, jak timerosal (tiomersal) w kombinacji z ditiotreitolem, jednakże tylko w odniesieniu do niektórych gatunków ssaków (świnia, mysz) (Cheek i in., 1993; Macháty i in., 1997 b; Tao i in., 2000; Im i in., 2006; Yuan i in., 2014).

Ostatnio, badania nad sztuczną aktywacją cybryd klonalnych świńi w znacznym zakresie koncentrują się na sprzężeniu procedur indukujących wielokrotną mobilizację wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych, które obejmują zmultiplikowaną elektrostymulację lub przedłużenie czasu inkubacji rekonstruowanych oocytów w roztworach o podwyższonym (z poziomu 5  $\mu\text{M/L}$  do 7,5  $\mu\text{M/L}$  lub 15  $\mu\text{M/L}$ ) stężeniu takich antybiotyków jonoforowych, jak jonomycyna wapnia, z systemami długotrwałej (kilkugodzinnej) supresji aktywności cyklinozależnych kinaz białkowych, m.in. czynnika MPF oraz kinazy MAP (Prather i in., 1999; Miyoshi i in., 2003; García-Mengual i in., 2008; Skrzyszowska i in., 2008; Samiec i Skrzyszowska, 2012; Kim i in., 2016). Prawdopodobnie, półtora- lub trzykrotny przyrost koncentracji jonomycyny w pożywce hodowlanej indukuje już nie pojedynczą falę przyrostu wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w ooplazmie, lecz całą serię repetytywnych, logarytmicznych wyrzutów kationów wapnia, przypominającą w większym stopniu fizjologiczny mechanizm uwalniania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z magazynów wewnątrzkomórkowych oocytu w następstwie jego zapłodnienia.

Naśladowanie procesu naturalnej aktywacji w warunkach półtora- lub trzykrotnego podwyższenia stężenia jonomycyny wapnia z 5  $\mu\text{M/L}$  do 7,5  $\mu\text{M/L}$  lub 15  $\mu\text{M/L}$  spowodowane jest także gwałtownym wzbudzeniem wielokrotnych cykli opróżnień rezerwuarów wapniowych w zrekonstruowanych oocytach. Z jed-

nej strony, umożliwia to trans-dukcję dostatecznie silnego sygnału jonowego, stymulującego szybkie uruchomienie programu rozwojowego cybryd klonalnych, z drugiej natomiast, chroni cybrydową komórkę przed szkodliwymi efektami cytotoksycznymi, związanymi z utrzy-

mującym się przez dłuższy czas wysokim poziomem kationów wapnia w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów (Betthauser i in., 2000; Yin i in., 2002; Hyun i in., 2003 a; Samiec i in., 2003; Skrzyszowska i in., 2008; Samiec i Skrzyszowska, 2012).

### Literatura

- Betthauser 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.
- Blumenthal D.K., Takio K., Edelman A.M., Charbonneau H., Titani K., Walsh K.A., Krebs E.G. (1985). Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin light chain kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3187–3191.
- 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.
- Cha S.K., Kim N.H., Lee S.M., Baik C.S., Lee H.T., Chung K.S. (1997). Effect of cytochalasin B and cycloheximide on the activation rate, chromosome constituent and *in vitro* development of porcine oocytes following parthenogenetic stimulation. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9: 441–446.
- Cheek T.R., McGuinness O.M., Vincent C., Moreton R.B., Berridge M.J., Johnson M.H. (1993). Fertilisation and thimerosal stimulate similar calcium spiking patterns in mouse oocytes but by separate mechanisms. *Development*, 119: 179–189.
- Cheong H.T., Ikeda K., Martinez Diaz M.A., Katagiri S., Takahashi Y. (2000). Development of reconstituted pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 12: 15–20.
- Cheong H.T., Park K.W., Im G.S., Lai L., Sun Q.Y., Day B.N., Prather R.S. (2002). Effect of elevated Ca<sup>2+</sup> concentration in fusion/activation medium on the fusion and development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 61: 488–492.
- Cox L.J., Larman M.G., Saunders C.M., Hashimoto K., Swann K., Lai F.A. (2002). Sperm phospholipase C $\zeta$  from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction*, 124: 611–623.
- Dai Y., Vaught T.D., Boone J., Chen S.-H., Phelps C.J., Ball S., Monahan J.A., Jobst P.M., McCreath K.J., Lamborn A.E., Cowell-Lucero J.L., Wells K.D., Colman A., Polejaeva I.A., Ayares D.L. (2002). Targeted disruption of the  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.*, 20: 251–255.
- De Sousa P., Dobrinsky J.R., Zhu J., Archibald A.L., Ainslie A., Bosma W., Bowering J., Bracken J., Ferrier P.M., Fletcher J., Gasparrini B., Harkness L., Johnston P., Ritchie M., Ritchie W.A., Travers A., Albertini D., Dinnyes A., King T.J., Wilmut I. (2002). Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol. Reprod.*, 66: 642–650.
- Didion B.A., Martin M.J., Markert C.L. (1990). Parthenogenetic activation of mouse and pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 33: 1165–1175.
- Dinnyes A., Hirao Y., Nagai T. (1999). Parthenogenetic activation of porcine oocytes by electric pulse and/or butyrolactone I treatment. *Cloning*, 1: 209–216.
- Fan H.Y., Huo L.J., Meng X.Q., Zhong Z.S., Hou Y., Chen D.Y., Sun Q.Y. (2003). Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes. *Biol. Reprod.*, 69: 1552–1564.
- Fissore R.A., Gordo A., Wu H. (1998). Activation of development in mammals: is there a role for a sperm cytosolic factor? *Theriogenology*, 49: 43–52.
- Fissore R.A., Long C.R., Duncan R.P., Robl J.M. (1999). Initiation and organization of events during the first cell cycle in mammals: applications in cloning. *Cloning*, 1: 89–100.
- García-Mengual E., Alfonso J., Salvador I., Duque C.C., Silvestre M.A. (2008). Oocyte activation procedures and influence of serum on porcine oocyte maturation and subsequent parthenogenetic and nuclear transfer embryo development. *Zygote*, 16: 279–284.
- Green K.M., Kim J.H., Wang W.H., Day B.N., Prather R.S. (1999). Effect of myosin light chain kinase, protein kinase A, and protein kinase C inhibition on porcine oocyte activation. *Biol. Reprod.*, 61: 111–119.
- Haccard O., Sarcevic B., Lewellyn A., Hartley R., Roy L., Izumi T., Erikson E., Maller J.L. (1993). Induction of

- metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science*, 262: 1262–1265.
- Hao Y.H., Yong H.Y., Murphy C.N., Wax D., Samuel M., Rieke A., Lai L., Liu Z., Durtschi D.C., Welbern V.R., Price E.M., McAllister R.M., Turk J.R., Laughlin M.H., Prather R.S., Rucker E.B. (2006). Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets. *Transgenic Res.*, 15: 739–750.
- 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.
- Hua Z., Xu G., Liu X., Bi Y., Xiao H., Hua W., Li L., Zhang L., Ren H., Zheng X. (2016). Impact of different sources of donor cells upon the nuclear transfer efficiency in Chinese indigenous Meishan pig. *Pol. J. Vet. Sci.*, 19: 205–212.
- Huang J., Zhang H., Yao J., Qin G., Wang F., Wang X., Luo A., Zheng Q., Cao C., Zhao J. (2016). BIX-01294 increases pig cloning efficiency by improving epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Reproduction*, 151: 39–49.
- Hwang I.S., Kwon D.J., Oh K.B., Ock S.A., Chung H.J., Cho I.C., Lee J.W., Im G.S., Hwang S. (2015). Production of cloned Korean native pig by somatic cell nuclear transfer. *Dev. Reprod.*, 19: 79–84.
- 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 a). Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol. Reprod.*, 69: 1060–1068.
- 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 b). Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. *Theriogenology*, 59: 1641–1649.
- Ilyin V., Parker I. (1992). Effects of alcohols on responses evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.*, 448: 339–354.
- Im G.S., Lai L., Liu Z., Hao Y., Wax D., Bonk A., Prather R.S. (2004). *In vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology*, 61: 1125–1135.
- Im G.S., Seo J.S., Hwang I.S., Kim D.H., Kim S.W., Yang B.C., Yang B.S., Lai L., Prather R.S. (2006). Development and apoptosis of pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with different combination of chemicals. *Mol. Reprod. Dev.*, 73: 1094–1101.
- Ito J., Shimada M., Terada T. (2003). Effect of protein kinase C activator on mitogen-activated protein kinase and p34<sup>cdc2</sup> kinase activity during parthenogenetic activation of porcine oocytes by calcium ionophore. *Biol. Reprod.*, 69: 1675–1682.
- Ito J., Shimada M. (2005). Timing of MAP kinase inactivation effects on emission of polar body in porcine oocytes activated by Ca<sup>2+</sup> ionophore. *Mol. Reprod. Dev.*, 70: 64–69.
- Ito J., Kawano N., Hirabayashi M., Shimada M. (2004 a). The role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on the inactivation of MAP kinase and p34<sup>cdc2</sup> kinase during fertilization and activation in pig oocytes. *Reproduction*, 128: 409–415.
- Ito J., Shimada M., Terada T. (2004 b). Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor suppresses cyclin B1 synthesis and reactivation of p34<sup>cdc2</sup> kinase, which improves pronuclear formation rate in matured porcine oocytes activated by Ca<sup>2+</sup> ionophore. *Biol. Reprod.*, 70: 797–804.
- Jellerette T., He C.L., Wu H., Parys J.B., Fissore R.A. (2000). Down-regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in mouse eggs following fertilization or parthenogenetic activation. *Dev. Biol.*, 223: 238–250.
- Jellerette T., Kurokawa M., Lee B., Malcuit C., Yoon S.Y., Smyth J., Vermassen E., De Smedt H., Parys J.B., Fissore R.A. (2004). Cell cycle-coupled [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in mouse zygotes and function of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-1. *Dev. Biol.*, 274: 94–109.
- Kawakami M., Tani T., Yabuuchi A., Kobayashi T., Murakami H., Fujimura T., Kato Y., Tsunoda Y. (2003). Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. *Cloning Stem Cells*, 5: 379–387.
- 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.
- Kikuchi K., Naito K., Noguchi J., Kaneko H., Tojo H. (2002). Maturation/M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured *in vitro*. *Cloning Stem Cells*, 4: 211–222.
- Kim E., Zheng Z., Jeon Y., Jin Y.X., Hwang S.U., Cai L., Lee C.K., Kim N.H., Hyun S.H. (2016). An improved system for generation of diploid cloned porcine embryos using induced pluripotent stem cells synchronized to metaphase. *PLoS One*, 11: e0160289.
- Kimura Y., Yanagimachi S., Bortkiewicz H., Perry A.C.F., Yanagimachi H. (1998). Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol. Reprod.*, 58: 1407–1415.
- Knott J.G., Poothapillai K., Wu H., He C.L., Fissore R. (2002). Porcine sperm factor supports activation and de-

- velopment of bovine nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.*, 66: 1095–1103.
- Knott J.G., Gardner A.J., Madgwick S., Jones K.T., Williams C.J., Schultz R.M. (2006). Calmodulin-dependent protein kinase II triggers mouse egg activation and embryo development in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *Dev. Biol.*, 296: 388–395.
- Kono T., Carroll J., Swann K., Whittingham D.G. (1995). Nuclei from fertilized mouse embryos have calcium-releasing activity. *Development*, 121: 1123–1128.
- Koo D.B., Kang Y.K., Park J.S., Park J.K., Chang W.K., Lee K.K., Han Y.M. (2004). A paucity of structural integrity in cloned porcine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 62: 779–789.
- Kühholzer B., Tao T., Machaty Z., Hawley R.J., Greenstein J.L., Day B.N., Prather R.S. (2000). Production of transgenic porcine blastocysts by nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.*, 56: 145–148.
- Kühholzer B., Hawley R.J., Lai L., Kolber-Simonds D., Prather R.S. (2001). Clonal lines of transgenic fibroblast cells derived from the same fetus result in different development when used for nuclear transfer in pigs. *Biol. Reprod.*, 64: 1695–1698.
- Kurome M., Fujimura T., Murakami H., Takahagi Y., Wako N., Ochiai T., Miyazaki K., Nagashima H. (2003). Comparison of electro-fusion and intracytoplasmic nuclear injection methods in pig cloning. *Cloning Stem Cells*, 5: 367–378.
- Kwon O.Y., Kono T. (1996). Production of identical sextuplet mice by transferring metaphase nuclei from four-cell embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 13010–13013.
- Lai L., Tao T., Machaty Z., Kühholzer B., Sun Q.Y., Park K.W., Day B.N., Prather R.S. (2001). Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblasts as donors. *Biol. Reprod.*, 65: 1558–1564.
- Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.W., Cheong H.T., Greenstein J.L., Im G.S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Hawley R.J., Prather R.S. (2002). Production of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 295: 1089–1092.
- Leal C.L., Liu L. (1998). Differential effects of kinase inhibitor and electrical stimulus on activation and histone H1 kinase activity in pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 52: 51–61.
- 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 a). Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol. Reprod.*, 69: 995–1001.
- 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 b). Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. *Theriogenology*, 59: 1949–1957.
- Lee G.S., Kim H.S., Hyun S.H., Lee S.H., Jeon H.Y., Nam D.H., Jeong Y.W., Kim S., Kim J.H., Han J.Y., Ahn C., Kang S.K., Lee B.C., Hwang W.S. (2005). Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Theriogenology*, 63: 973–991.
- Lee S., Jin J.X., Khoirinaya C., Kim G.A., Lee B.C. (2016). Lanosterol influences cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro* and improves preimplantation development of cloned embryos. *Theriogenology*, 85: 575–584.
- Liu L., Moor R.M. (1997). Factors affecting electrical activation of porcine oocytes matured *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 48: 67–80.
- Loi P., Ledda S., Fulka J. Jr., Cappai P., Moor R.M. (1998). Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol. Reprod.*, 58: 1177–1187.
- Lorca T., Galas S., Fesquet D., Devault A., Cavadore J.C., Doree M. (1991). Degradation of the proto-oncogene product p39<sup>mos</sup> is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase: requirement for a  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin dependent event. *EMBO J.*, 10: 2087–2093.
- Macháty Z., Funahashi H., Mayes M.A., Day B.N., Prather R.S. (1996). Effects of injecting calcium chloride into *in vitro*-matured porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 54: 316–322.
- Macháty Z., Funahashi H., Day B.N., Prather R.S. (1997 a). Developmental changes in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release mechanisms in porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 56: 921–930.
- Macháty Z., Wang W.H., Day B.N., Prather R.S. (1997 b). Complete activation of porcine oocytes induced by the sulfhydryl reagent, thimerosal. *Biol. Reprod.*, 57: 1123–1127.
- Macháty Z., Rickords L.F., Prather R.S. (1999). Parthenogenetic activation of porcine oocytes after nuclear transfer. *Cloning*, 1: 101–109.
- Macháty Z., Bonk A.J., Kühholzer B., Prather R.S. (2000). Porcine oocyte activation induced by a cytosolic sperm factor. *Mol. Reprod. Dev.*, 57: 290–295.
- Macháty Z., Ramsoondar J.J., Bonk A.J., Prather R.S., Bondioli K.R. (2002 a).  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 67: 1133–1139.
- Macháty Z., Ramsoondar J.J., Bonk A.J., Bondioli K.R., Prather R.S. (2002 b). Capacitative calcium entry mechanism in porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 66: 667–674.

- Madgwick S., Lévassieur M., Jones K.T. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase II, and not protein kinase C, is sufficient for triggering cell-cycle resumption in mammalian eggs. *J. Cell. Sci.*, 118: 3849–3859.
- Marangos P., FitzHarris G., Carroll J. (2003).  $Ca^{2+}$  oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development*, 130: 1461–1472.
- Markoulaki S., Matson S., Abbott A.L., Ducibella T. (2003). Oscillatory CaMKII activity in mouse egg activation. *Dev. Biol.*, 258: 464–474.
- Martinez Diaz M.A., Ikeda K., Takahashi Y. (2002). Effects of cycloheximide treatment and interval between fusion and activation on *in vitro* development of pig nuclear transfer embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 14: 191–197.
- Miyoshi K., Saeki K., Sato E. (2000). Improvement in development of porcine embryos reconstituted with cells from blastocyst-derived cell lines and enucleated oocytes by optimization of reconstruction methods. *Cloning*, 2: 175–184.
- Miyoshi K., Rzucidło S.J., Gibbons J.R., Arat S., Stice S.L. (2001). Development of porcine embryos reconstituted with somatic cells and enucleated metaphase I and II oocytes matured in a protein-free medium. *BMC Dev. Biol.*, 1, 12.
- Miyoshi K., Rzucidło J., Pratt S.L., Stice S.L. (2002). Utility of rapidly matured oocytes as recipients for production of cloned embryos from somatic cells in the pig. *Biol. Reprod.*, 67: 540–545.
- Miyoshi K., Rzucidło S.J., Pratt S.L., Stice S.L. (2003). Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol. Reprod.*, 68: 1079–1086.
- Moos J., Kopf G.S., Schultz R.M. (1995). Cycloheximide-induced activation of mouse eggs: effects on *cdc2/cyclin B* and MAP kinase activities. *J. Cell Sci.*, 109: 739–748.
- Morgan A., Jacob R. (1994). Jonomycin enhances  $Ca^{2+}$  influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem. J.*, 300: 655–672.
- Nomikos M., Blayney L.M., Larman M.G., Campbell K., Rossbach A., Saunders C.M., Swann K., Lai F.A. (2005). Role of phospholipase C- $\zeta$  domains in  $Ca^{2+}$ -dependent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and cytoplasmic  $Ca^{2+}$  oscillations. *J. Biol. Chem.*, 280: 31011–31018.
- Nussbaum D.J., Prather R.S. (1995). Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. *Mol. Reprod. Dev.*, 41: 70–75.
- Ogonuki N., Sankai T., Yagami K., Shikano T., Oda S., Miyazaki S., Ogura A. (2001). Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation. *Biol. Reprod.*, 65: 351–357.
- Ohashi S., Naito K., Sugiura K., Iwamori N., Goto S., Naruoka H., Tojo H. (2003). Analyses of mitogen-activated protein kinase function in the maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 68: 604–609.
- 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.
- Ono Y., Shimosawa N., Ito M., Kono T. (2001). Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 64: 44–50.
- Ozil J.P. (1990). The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*, 109: 117–127.
- Ozil J.P. (1998). Role of calcium oscillations in mammalian egg activation: experimental approach. *Biophys. Chem.*, 72: 141–152.
- Ozil J.P., Huneau D. (2001). Activation of rabbit oocytes: the impact of the  $Ca^{2+}$  signal regime on development. *Development*, 128: 917–928.
- Park K.W., Cheong H.T., Lai L., Im G.S., Kühholzer B., Bonk A., Samuel M., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Prather R.S. (2001 a). Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim. Biotechnol.*, 12: 173–181.
- Park K.W., Kühholzer B., Lai L., Macháty Z., Sun Q.Y., Day B.N., Prather R.S. (2001 b). Development and expression of the green fluorescent protein in porcine embryos derived from nuclear transfer of transgenic granulosa-derived cells. *Anim. Reprod. Sci.*, 68: 111–120.
- 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.
- Parrington J., Swann K., Shevchenko V.I., Sesay A.K., Lai F.A. (1996). Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*, 379: 364–368.
- Perry A.C.F., Wakayama T., Yanagimachi R. (1999). A novel trans-complementation assay suggests full mammalian oocyte activation is coordinately initiated by multiple, submembrane sperm components. *Biol. Reprod.*, 60: 747–755.
- Perry A.C.F., Wakayama T., Cooke I.M., Yanagimachi R. (2000). Mammalian oocyte activation by the synergis-

- tic action of discrete sperm head components: induction of calcium transients and involvement of proteolysis. *Dev. Biol.*, 217: 386–393.
- 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., Tao T., Macháty Z. (1999). Development of the techniques for nuclear transfer in pigs. *Theriogenology*, 51: 487–498.
- Putney J.W. Jr., McKay R.R. (1999). Capacitative calcium entry channels. *Bioessays*, 21: 38–46.
- Roh S., Hwang W.S. (2002). *In vitro* development of porcine parthenogenetic and cloned embryos: comparison of oocyte-activating techniques, various culture systems and nuclear transfer methods. *Reprod. Fertil. Dev.*, 14: 93–99.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2012). Roscovitine is a novel agent that can be used for the activation of porcine oocytes reconstructed with adult cutaneous or fetal fibroblast cell nuclei. *Theriogenology*, 78: 1855–1867.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2014). Biological transcomplementary activation as a novel and effective strategy applied to the generation of porcine somatic cell cloned embryos. *Reprod. Biol.*, 14: 128–139.
- Samiec M., Skrzyszowska M., Smorąg Z. (2003). Effect of activation treatments on the *in vitro* developmental potential of porcine nuclear transfer embryos. *Czech J. Anim. Sci.* 48: 499–507.
- 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 pages.
- Saunders C.M., Larman M.G., Parrington J., Cox L.J., Royle J., Blayney L.M., Swann K., Lai F.A. (2002). PLC $\zeta$ : a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129: 3533–3544.
- Sette C., Bevilacqua A., Geremia R., Rossi P. (1998). Involvement of phospholipase C $\gamma$ 1 in mouse egg activation induced by a truncated form of the c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *J. Cell Biol.*, 142: 1063–1074.
- Shiina Y., Kaneda M., Matsuyama K., Tanaka K., Hiroi M., Doi K. (1993). Role of extracellular Ca<sup>2+</sup> on the intracellular Ca<sup>2+</sup> changes in fertilized and activated mouse oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 97: 143–150.
- Skrzyszowska M., Samiec M., Słomski R., Lipiński D., Mały E. (2008). Development of porcine transgenic nuclear-transferred embryos derived from fibroblast cells transfected by the novel technique of nucleofection or standard lipofection. *Theriogenology*, 70: 248–259.
- Sun F.Z., Hoyland J., Huang X., Mason W., Moor R.M. (1992). A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development*, 115: 947–956.
- Sun Q.Y., Wang W.H., Hosoe M., Taniguchi T., Chen D.Y., Shioya Y. (1997). Activation of protein kinase C induces cortical granule exocytosis in a calcium-independent manner, but not resumption of cell cycle in porcine oocytes. *Dev. Growth Differ.*, 39: 523–529.
- Sun Q.Y., Wu G.M., Lai L., Bonk A., Cabot R., Park K.W., Day B.N., Prather R.S., Schatten H. (2002). Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 66: 580–588.
- Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Northey D.L., Schutzkus V., First N.L. (1994). Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev. Biol.*, 166: 729–739.
- Swann K., Lai F.A. (1997). A novel signaling mechanism for generating Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization in mammals. *Bioessays*, 19: 371–378.
- Takakura I., Naito K., Iwamori N., Yamashita M., Kume S., Tojo H. (2005). Inhibition of mitogen activated protein kinase activity induces parthenogenetic activation and increases cyclin B accumulation during porcine oocyte maturation. *J. Reprod. Dev.*, 51: 617–626.
- Tao T., Boquest A.C., Macháty Z., Petersen A.L., Day B.N., Prather R.S. (1999 a). Development of pig embryos by nuclear transfer of cultured fibroblast cells. *Cloning*, 1: 55–62.
- Tao T., Macháty Z., Boquest A.C., Day B.N., Prather R.S. (1999 b). Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into *in vitro* matured oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 56: 133–141.
- Tao T., Macháty Z., Abeydeera L.R., Day B.N., Prather R.S. (2000). Optimisation of porcine oocyte activation following nuclear transfer. *Zygote*, 8: 69–77.
- Tatemoto H., Muto N. (2001). Mitogen-activated protein kinase regulates normal transition from metaphase to interphase following parthenogenetic activation in porcine oocytes. *Zygote*, 6: 15–23.
- Tomii R., Kurom M., Ochiai T., Wako N., Ueda H., Hirakawa K., Kano K., Nagashima H. (2005). Production of

- cloned pigs by nuclear transfer of preadipocytes established from adult mature adipocytes. *Cloning Stem Cells*, 7: 279–288.
- Uhm S.J., Chung H.M., Kim C., Shim H., Kim N.H., Lee H.T., Chung K.S. (2000). *In vitro* development of porcine enucleated oocytes reconstructed by the transfer of porcine fetal fibroblasts and cumulus cells. *The-riogenology*, 54: 559–570.
- Verma P.J., Du Z.T., Crocker L., Faast R., Grupen Ch.G., McIlpatrick S.M., Ashman R.J., Lyons I.G., Nottle M.B. (2000). *In vitro* development of porcine nuclear transfer embryos constructed using fetal fibroblasts. *Mol. Reprod. Dev.*, 57: 262–269.
- Wang W.H., Abeydeera L.R., Prather R.S., Day B.N. (1998 a). Functional analysis of activation of porcine oocytes by spermatozoa, calcium ionophore and electric pulse. *Mol. Reprod. Dev.*, 51: 346–353.
- Wang W.H., Macháty Z., Abeydeera L.R., Prather R.S., Day B.N. (1998 b). Parthenogenetic activation of pig oocytes with calcium ionophore and the block to sperm penetration after activation. *Biol. Reprod.*, 58: 1357–1366.
- Wang W.H., Macháty Z., Ruddock N., Abeydeera L.R., Boquest A.C., Prather R.S., Day B.N. (1999). Activation of porcine oocytes with calcium ionophore: effects of extracellular calcium. *Mol. Reprod. Dev.*, 53: 99–107.
- Watanabe N., Hunt T., Ikawa Y., Sagata N. (1991). Independent inactivation of MPF and cytosolic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*, 352: 247–248.
- Wu H., Smyth J., Luzzi V., Fukami K., Takenawa T., Black S.L., Allbritton N.L., Fissore R.A. (2001). Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. *Biol. Reprod.*, 64: 1338–1349.
- Yin X.J., Tani T., Yonemura I., Kawakami M., Miyamoto K., Hasegawa R., Kato Y., Tsunoda Y. (2002). Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol. Reprod.* 67: 442–446.
- Yoneda A., Kashima M., Yoshida S., Terada K., Nakagawa S., Sakamoto A., Hayakawa K., Suzuki K., Ueda J., Watanabe T. (2006). Molecular cloning, testicular postnatal expression, and oocyte-activating potential of porcine phospholipase C $\xi$ . *Reproduction*, 132: 393–401.
- Yuan Y., Lee K., Park K.W., Spate L.D., Prather R.S., Wells K.D., Roberts R.M. (2014). Cell cycle synchronization of leukemia inhibitory factor (LIF)-dependent porcine-induced pluripotent stem cells and the generation of cloned embryos. *Cell Cycle*, 13: 1265–1276.
- Zernicka-Goetz M., Ciemerych M.A., Kubiak J.Z., Tarkowski A.K., Maro B. (1995). Cytostatic factor inactivation is induced by a calcium-dependent mechanism present until the second cell cycle in fertilized but not in parthenogenetically activated mouse eggs. *J. Cell Sci.*, 108: 469–474.
- Zhu J., Telfer E.E., Fletcher J., Springbett A., Dobrinsky J.R., De Sousa P.A., Wilmut I. (2002). Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 66: 635–641.

## THE TYPES OF AGENTS USED FOR ARTIFICIAL ACTIVATION OF RECONSTRUCTED OOCYTES IN THE SOMATIC CELL CLONING OF PIGS

### Summary

Artificial activation of porcine somatic cell nuclear-transferred oocytes turns out to be an extremely important factor that influences their ability not only to resume and terminate the meiosis but also to enter the phase of preimplantation embryo development. Physical agents, such as electric pulses, or chemical agents, such as specific ionophore antibiotics (e.g., calcium ionomycin, Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 also known as calcimycin) or thimerosal in combination with dithiothreitol, are commonly used stimuli activating pig oocytes reconstructed by somatic cell nuclear transfer (SCNT). The current intensive studies on improving the activation methods of porcine nuclear-cytoplasmic hybrids (i.e., clonal cybrids) are chiefly aimed at optimizing the technical parameters of electric field involving strength, duration of DC pulses, number of pulses and time interval between them. Alternatively, and more often, these investigations are focused on combining application of the activating stimulus (most frequently calcium ionomycin or DC pulses) with utilizing either such agents as 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), *R*-roscovitine (*R*-RSCV) and butyrolactone I (BTRL-I) that non-specifically or specifically block the activity of cyclin-dependent protein kinases (CDKs) or agents that reversibly inhibit protein synthesis. Here an example is cycloheximide (CHXM) that suppresses the re-translation of cyclin B following resumption of oocyte meiosis from metaphase II stage-related arrest.