

Epigenetyczne przeprogramowanie genomu jądrowego w zarodkach ssaków uzyskanych techniką klonowania somatycznego*

Marcin Samiec, Maria Skrzyszowska

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

Molekularne podłoże epigenetycznego prze-modelowania konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej komórek somatycznych w rozwoju zarodków klonalnych

Nie ustalono dotąd jednoznacznej definicji określającej przeprogramowanie jąder komórkowych w oocytach ssaków zrekonstruowanych techniką klonowania somatycznego, a następnie w rozwijających się z nich zarodkach klonalnych, można jednak przyjąć, że proces ten, a przynajmniej jego wstępny etap – strukturalne (morfologiczne/architektoniczne) przemodelowanie obejmuje wszystkie zmiany konformacyjne i cytobiochemiczne, jakim podlegają jądra komórek somatycznych znajdujących się w interfazowym okresie cyklu mitotycznego po ich wprowadzeniu do enukleowanych oocytów (ooplastów), których cykl mejotyczny został fizjologicznie zablokowany w stadium metafazy II podziału mejotycznego (MII). Te zmiany konfiguracyjne prowadzą w następstwie sztucznej aktywacji

zrekonstruowanych oocytów do upodobnienia się tych jąder pod względem strukturalno-funkcyjnym do przedjądrzy zygoty (Bonk i in., 2007; Whitworth i Prather, 2010; Esteves i in., 2011; Sepulveda-Rincon i in., 2016). Jądro komórki somatycznej wprowadzone do dojrzałego *in vitro* lub *in vivo* wyjądrzonego oocytu w momencie jego rekonstrukcji, niezależnie od tego, czy zostało dostarczone na drodze fuzji komórkowej czy mikroiniekcji, podlega swoistym procesom transformacji ultrastrukturalnej oraz konwersji molekularnej, które są analogiczne do tych, jakie zachodziłyby we własnym aparacie jądrowym oocytu (Reik i in., 2003 a; Shi i in., 2003 a; Yamanaka i in., 2009; Lorthongpanich i in., 2010). Pomimo usunięcia materiału genetycznego oocytu MII, wysoko receptywna ooplazma zachowuje właściwości narzucające wprowadzonemu jądru taki stan, jaki miałyby jej własne jądro w tym samym momencie cyklu mejotycznego. Dlatego też, zjawisko morfologicznej adaptacji chromatyny mitotycznej do warunków cytofizjologicznych panujących w mikrośrodkowisku ooplazmatycznym jest zależne od podporządkowania się genomu komórki somatycznej oddziaływaniu białkowych czynników regulatorowych w poszczególnych punktach kontrolnych/restrykcyjnych II podziału mejotycznego oocytu (Shi i in., 2004; Campbell i Alberio, 2003; Iurlaro i in., 2017). To zjawisko swoistego naśladowania, tj. mimetyzmu procesów molekularnych, towarzyszących naturalnemu przebiegowi cyklu mejotycznego jest określane jako przejście DNA genomowego komórki-dawcy jądra z mitotycznej do pseudomejotycznej kontroli jego aktywności transkrypcyjnej i metabolicznej (Corry

*Prezentowana praca naukowa 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: „MED-PIG”. Ponadto, niniejsza praca uzyskała wsparcie finansowe z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (umowa nr BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016) w ramach strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG jako projekt badawczy pt.: „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju”. Akronim: „BIODIFF”.

i in., 2009; Zhao i in., 2010). W sytuacji, gdy do nieaktywowanych wyjądrzonych oocytów MII wprowadzi się jakiegokolwiek jądra interfazowe, to – pod wpływem wysokiego stężenia czynnika dojrzewania mejotycznego (MPF; ang. *maturation/meiosis promoting factor*) i stabilizującego go czynnika cytotatycznego (CSF; ang. *cytostatic factor*) – dochodzi w nich bardzo szybko do zaniku otoczki jądrowej (NEBD; ang. *nuclear envelope breakdown*) oraz dyspersji jąder. W kolejnym etapie ma miejsce kondensacja chromatyny i wyróżnicowanie się chromosomów, które zostają zakotwiczone centromerami do mikrotubuli kinetochorowych płytki metafazowej uformowanej w obrębie wrzeciona kariokinetycznego (Liu i in., 2004; Eilertsen i in., 2007). Ten ostatni proces nosi nazwę spiralizacji *de novo*, respiralizacji lub przedwczesnej spiralizacji (kondensacji) chromosomów bądź chromatyny interfazowej komórki-dawcy jądra (PCS oraz PCC; ang. *premature chromosome spiralization/premature chromosome (chromatin) condensation*) (Reik i in., 2003 b; Pfister-Genskow i in., 2005; Anckaert i Fair, 2015). Nomenklatura ta wynika z faktu odróżnienia tego procesu od zmian konfiguracji przestrzennej obejmujących zaawansowaną heterochromatynizację genomu i spiralizację chromosomów potomnych (niehomologicznych) podczas fizjologicznej metafazy II podziału mejotycznego, tzn. zachodzącej we właściwym momencie cyklu komórkowego (po przekroczeniu interkinetycznego punktu kontrolnego/restrykcyjnego MI/MII) (Kourmouli i in., 2004; Deshmukh i in., 2011; Ma i in., 2015).

W środowisku cytoplazmatycznym oocytu-biorcy egzogenna chromatyna pochodzenia somatogenicznego podlega nie tylko oddziaływaniu enzymatycznych czynników warunkujących charakter jej konformacyjnych rearanżacji w sposób ściśle związany z przebiegiem cyklu mejotycznego (Bonk i in., 2008; Wang i in., 2011 a; Jullien i in., 2017). Czynniki te stanowią: MPF i CSF w stadium metafazy II (tj. przed sztuczną aktywacją zrekonstruowanego oocyta, tj. cybrydy klonalnej) oraz kompleks białkowy ligazy ubikwitynowej inicjujący anafazę podziału wyrównawczego (AII), czyli cyklosom (APC/C; ang. *anaphase-promoting complex/cyclosome*) po przekroczeniu punktu kontrolnego wrzeciona ka-

riokinetycznego metafaza II/anafaza II (MII/AII) w następstwie aktywacji programu rozwojowego cybrydy klonalnej. Przed sztuczną aktywacją cybryd klonalnych wprowadzona do ooplazmy chromatyna komórki-dawcy jądra podlega także oddziaływaniu białkowych czynników regulujących epigenetycznie poziom jej aktywności transkrypcyjnej. Są nimi: 1) ooplazmatyczne metylotransferazy/metylazy DNA (DNMTs; ang. *DNA methyltransferases/methylases*), m.in. izoenzymy DNMT1o i DNMT3a/3b; 2) białka wiążące się ze zmetylowanymi dinukleotydami, tzw. wysepkami konfiguracyjnymi CpG (5'-cytydino-3'-monofosforylo-5'-guanozyny-3'), czyli minisekwencjami paliandromowymi ^{Me}CpG DNA genomowego (MeCPs; ang. *methyl-CpG-binding proteins*) oraz 3) inhibitory acetylotransferaz/acetylaz histonów H3/H4 (iHATs; ang. *histone acetyltransferase/acetylase inhibitors*). Do tej grupy czynników należą również: 4) deacetylazy białek histonowych (HDACs; ang. *histone deacetylases*); 5) metylotransferazy histonów (HMTs; ang. *histone methyltransferases*) i 6) inhibitory demetylaz/deiminaz histonów (iHDMs; ang. *histone demethylase/deiminase inhibitors*). Konsekwencją oddziaływania tej złożonej grupy endogennych modulatorów epigenetycznych są procesy deacetylacji histonów, którym towarzyszą pozytywnie z nimi skorelowane procesy metylacji DNA oraz metylacji białek histonowych. Pośrednim skutkiem wyżej wspomnianych modyfikacji epigenomowych jest silna kondensacja chromatyny i represja transkrypcyjna genomu somatogenicznego w cytoplazmie nieaktywowanych ooplastów MII (Rybouchkin i in., 2006; Bui i in., 2007; Rodriguez-Osorio i in., 2012; Buganim i in., 2013). Z kolei, w zrekonstruowanych oocytach, które poddano sztucznej aktywacji, chromatyna komórki-dawcy jądra podlega oddziaływaniu odmiennych czynników regulatorowych profilu epigenetycznego DNA genomowego. Wśród nich należy wymienić: 1) ooplazmatyczne i/lub nukleoplazmatyczne (kariolimfatyczne) inhibitory kompetycyjne metylotransferaz/metylaz DNA (iDNMTs; ang. *DNA methyltransferase/methylase inhibitors*), m.in. blokery izosteryczne izoenzymów DNMT1o i DNMT3a/3b; 2) represory aktywności białek wiążących się ze zmetylowanymi dinukleotydami, tzw. wysepkami konfiguracyj-

nyimi CpG (5'-cytydino-3'-monofosforylo-5'-guanozyny-3'), czyli minisekwencjami palindromowymi^{Me}CpG DNA genomowego (iMeCPs; ang. *methyl-CpG-binding protein inhibitors*) oraz 3) acetylotransferazy/acetylazy histonów H3/H4 (HATs; ang. *histone acetyltransferases/acetylases*). Ponadto, czynniki te są reprezentowane przez: 4) inhibitory izosteryczne deacetylaz białek histonowych (iHDACs; ang. *histone deacetylase inhibitors*); 5) białka supresorowe metylotransferaz histonów (iHMTs; ang. *histone methyltransferase inhibitors*) oraz 6) demetylazy/deiminazy histonów (HDMs; ang. *histone demethylases/deiminases*) i 7) złożone kompleksy białkowe o aktywności enzymatycznej ATPaz, odpowiedzialne za architektoniczną (konformacyjną) rearanżację chromatyny jądrowej (ChRs; ang. *chromatin remodeling complexes*). W następstwie oddziaływania tej całej kaskady regulatorów pamięci epigenetycznej somatogenicznych jąder komórkowych w aktywowanej ooplazmie cybryd klonalnych mają miejsce procesy acetylacji histonów, które są pozytywnie skorelowane z procesami demetylacji DNA oraz demetylacji histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. Terminalnym efektem tych wszystkich post-aktywacyjnych modyfikacji epigenetycznych jest dekondensacja chromatyny jądrowej i aktywacja transkrypcyjna genomu komórek somatycznych w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów poddanych sztucznej stymulacji zarodkowego programu rozwojowego (Armstrong i in., 2006; Corry i in., 2009; Zhao i in., 2010).

Wystawienie „nagiej” oraz silnie skondensowanej – w wyniku zaniku/rozpadu otoczki jądrowej (NEBD) i przedwczesnej kondensacji (PCC) – chromatyny, jak również związanych z chromatyną białek jądrowych na długotrwałe działanie czynników ooplazmatycznych, determinujących epigenetycznie zależny profil ekspresji lub supresji transkrypcyjnej genów, jest warunkiem koniecznym do tego, aby zaszło pełne przemodelowanie i przeprogramowanie jąder komórek somatycznych, a w konsekwencji prawidłowy rozwój zrekonstruowanych oocytów (Dean i in., 2003; Shi i in., 2003 a). Przemodelowanie konformacji wprowadzonych jąder nie jest zjawiskiem jednorazowym, lecz ciągiem przemian zachodzących podczas kolejnych podziałów mitotycznych w okresie

brudzkowania zarodków. Z tego względu, dodatkowa runda procesów NEBD i PCC, jakiej podlegają jądra somatogeniczne w cytoplazmie enukleowanych oocytów MII, może mieć korzystny wpływ na ich przemodelowanie. Z wydłużeniem czasu ekspozycji transferowanych jąder somatogenicznych na działanie czynników ooplazmatycznych wzrasta stopień zaawansowania strukturalno-funkcjonalnych modyfikacji chromatyny jądrowej, co z kolei wpływa na prawidłowy przebieg złożonych i wielofazowych przemian, jakim podlegają jądra w odpowiedzi na zewnętrzny sygnał aktywacyjny (Campbell i Alberio, 2003; Beaujean i in., 2004; Whitworth i Prather, 2010). W standardowym modelu postaktywacji uzyskane cybrydy klonalne są pobudzane do rozwoju zarodkowego z jedno- lub kilkugodzinnym opóźnieniem czasowym w stosunku do momentu rekonstrukcji enukleowanego oocytu, czyli przeprowadzenia mikrochirurgicznego zabiegu transplantacji jądra komórkowego do ooplastu. Po sztucznej aktywacji zrekonstruowanego oocytu wokół zdekondensowanej chromatyny powstaje nowa otoczka jądrowa, a odtworzone jądro interfazowe rozpoczyna program przemodelowania konfiguracji przestrzennej zgodnie z przebiegiem cyklu komórkowego aktywowanego oocytu. Pierwszą oznaką architektonicznego przemodelowania jądra jest jego wzrost (pęcznienie; ang. *nuclear swelling*; NS) w cytoplazmie komórki-biorcy. Znaczny wzrost objętości jądra jest obserwowany w zrekonstruowanych oocytach świni. Rozpulchnienie uformowanych po ukończonym podziale pseudomejotycznym jąder interfazowych jest procesem kilkustopniowym i w końcu prowadzi do osiągnięcia przez nie rozmiarów zbliżonych do rozmiarów przedjądzy fizjologicznych. Dlatego też jądra, które zostały odtworzone w okresie międzypodziałowym w następstwie sztucznej aktywacji cybryd klonalnych, określa się bardzo często mianem rzekomych przedjądzy lub pseudopredjądzy (Narbonne i in., 2012; Sepulveda-Rincon i in., 2016). Stanowią one strukturalno-funkcjonalny ekwiwalent właściwych przedjądzy, które powstają w warunkach fizjologicznych po zapłodnieniu oocytu (Sarmiento i in., 2004; Bang i in., 2013). Prawidłowe ich uformowanie jest kluczowym czynnikiem wskazującym z jednej strony na pełną i szybką odpowiedź oocytu na sygnały jonowe dostarczane przez sztuczne aktywatory,

a z drugiej – na wysoką efektywność zastosowanej po rekonstrukcji enukleowanego oocytu procedury aktywacji. Zwiększenie średnicy jądra interfazowego jest spowodowane prawdopodobnie przemieszczaniem się pewnych białek ooplazmatycznych do kariolimfy, a także późniejszą wymianą białek pomiędzy cytoplazmą komórki-biorcy a nukleoplazmą wprowadzonego jądra. Białka te należą głównie do grupy modulatorów epigenetycznych oraz czynników regulatorowych cyklu pseudomejotycznego i mitotycznego (Novak i in., 2004; Lorthongpanich i in., 2010). Ważną rolę w procesie przemodelowania i przeprogramowania jądrowego odgrywa wymiana czynników zaangażowanych w regulację zarówno struktury chromatyny, jak i tkankowo-specyficznej ekspresji genów na czynniki pochodzenia oocytarnego. Czynniki te mogą pokierować zmianami konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej, zgodnie z aktualnymi wymaganiami zrekonstruowanego oocyta i zarodka. Wydłużona ekspozycja chromatyny komórki somatycznej-dawcy jądra na działanie białek strukturalnych i enzymatycznych oocyta-biorcy jest konieczna do prawidłowego zainicjowania procesu przeprogramowania genomu przed momentem aktywacji programu rozwojowego cybrydowej zygoty klonalnej. W oocytach zrekonstruowanych z interfazowych jąder somatogenicznych w fazach G0 i G1 cyklu komórkowego indukowane są albo procesy rozpadu otoczki jądrowej – NEBD oraz przedwczesnej kondensacji chromatyny – PCC, a następnie proces objętościowego wzrostu/pęcznienia odtworzonych jąder interfazowych – NS (przy wyborze protokołu postaktywacji lub protokołu jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej), albo tylko proces pęcznienia pierwotnie uformowanych (tj. odziedziczonych wraz z cytoplazmą i innymi organellami komórek somatycznych) jąder interfazowych – NS (przy wyborze protokołu preaktywacji lub protokołu jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej). W przypadku protokołu preaktywacji wprowadzenie interfazowego jądra do enukleowanego oocyta, w którym było już obecne jądro obłonione, nie powoduje żadnych zmian morfologicznych transferowanego jądra, a najwyżej jego pęcznienie (Santos i Dean, 2004; Rodriguez-Osorio i in., 2012).

Okres, w którym zachodzą procesy za-

niku otoczki jądrowej (NEBD) oraz przedwczesnej kondensacji chromatyny (PCC) i /lub proces pęcznienia uformowanych *de novo* bądź już istniejących jąder interfazowych (NS), dotyczy zaistnienia czynników białkowych, związanych z chromatyną jądrową białkami pochodzenia ooplazmatycznego, a DNA genomowy jest epigenetycznie modyfikowany w celu pełnego przemodelowania i przeprogramowania, niezbędnego do utrzymania rozwoju ontogenetycznego zarodka do końca ciąży (Campbell i Alberio, 2003; Beaujean i in., 2004; Shi i Wu, 2009).

Cofnięcie transkrypcyjnego „zegara biologicznego” genomu komórek somatycznych, które utraciły już swoją totipotencję lub pluripotencję w procesie cytodyferencjacji, do statusu jądra zygoty musi obejmować nie tylko strukturalne (architektoniczne/morfologiczne) przemodelowanie chromatyny jądrowej, lecz także epigenetyczne przeprogramowanie (tj. odróżnicowanie molekularne) genomu w celu pełnego przywrócenia zarodkowego wzorca ekspresji genów (Reik, 2007; Prather i in., 2009). Strukturalne przemodelowanie wprowadzonych jąder dotyczy zatem przebiegających w obrębie somatogenicznej chromatyny przemian tautomerycznych jej konformacji przestrzennej, które są określane łącznie mianem konstytucyjno-metabolicznej rearanżacji jądrowego aparatu genetycznego (Shi i in., 2003 a,b; Reik i in., 2003 b; Selokar i in., 2015). Z kolei, epigenetyczne przemodelowanie chromatyny jądrowej jest związane z intensywnymi modyfikacjami kowalencyjnymi reszt lizyny i argininy białek histonowych (głównie H3 i H4) jej rdzenia nukleosomowego. Przed sztuczną aktywacją zrekonstruowanego oocyta mają miejsce zaawansowane procesy metylacji/deacetylacji reszt lizyny histonów H3 i H4 oraz procesy demetylacji reszt argininy tych histonów, czego efektem jest przedwczesna kondensacja chromatyny jądrowej, czyli przedwczesna heterochromatynizacja genomu komórki somatycznej. Po aktywacji zrekonstruowanego oocyta zachodzą natomiast procesy odwrotne do wyżej wspomnianych, takie jak: demetylacja/acetylacja reszt lizyny oraz metylacja reszt argininy białek histonowych, którym towarzyszy dekondukcja *de novo* chromatyny somatogenicznej, tzn. ponowna euchromatynizacja genomu jądrowego komórki-dawcy (Liu i in.,

2004; Eilertsen i in., 2007; Bang i in., 2013). Wadliwe przemodelowanie konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej komórek somatycznych w potomnych blastomerach bruzdkujących zarodków klonalnych może być zatem uwarunkowane nieprawidłowymi zmianami konformacyjnymi i epigenetycznymi, powstałymi w czasie przedwczesnej kondensacji chromosomów w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów. Zmiany te wydają się być głównym powodem różnic w zdolności do odtwarzania interfazowej postaci chromatyny jądrowej (tj. formowania pseudo-przedjądrzy) przez cybrydowe zygoty klonalne. Ponadto, mogą one mieć wpływ na błędne modyfikacje kowalencyjne białek histonowych konstytutywnej heterochromatyny jądrowej (głównie w regionie pericentromerowym chromosomów) w kolejnych stadiach rozwoju przed- i poimplantacyjnego zarodków oraz płodów klonalnych. To z kolei może zahamować przeprogramowanie wielu genów pochodzenia somatogenicznego, kluczowych dla poszczególnych faz embrioi fetogenezy, w wyniku indukcji nukleosomowej supresji transkrypcyjnej w różnicujących się komórkach zarodkowych i płodowych (Seki i in., 2005; Lorthongpanich i in., 2010; Zhao i in., 2010).

Molekularne podłoże epigenetycznego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek somatycznych w rozwoju zarodków klonalnych

Przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej DNA jądrowego komórek somatycznych dotyczy zmian epigenomowych, które przebiegają dwustopniowo w pre- i postimplantacyjnej fazie rozwoju zarodków klonalnych (Shi i Wu, 2009; Masala i in., 2017). Informacja epigenetyczna, w odróżnieniu od informacji genetycznej zapisanej w sekwencji nukleotydów DNA (tj. jego strukturze I-rzędowej), jest zakodowana w strukturze i funkcjach kowalencyjnych modyfikacji DNA oraz białek histonowych. Najważniejsze z tych modyfikacji są wynikiem procesów metylacji reszt cytozyny łańcucha polinukleotydowego podwójnej α -helisy DNA jądrowego (w obrębie dinukleotydów/wysp CpG, czyli 5'-cytydino-3'-monofosforylo-5'-guanozyny-3') oraz procesów metylacji i acetylacji reszt lizyny bądź procesów metylacji reszt argininy histonów H3 oraz H4

rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej (Reik i in., 2003 a,b; Shi i in., 2004; Iurlaro i in., 2017). Wymienione wyżej procesy mogą mieć charakter globalny i obejmować w sposób ciągły znaczną część genomu jądrowego lub mogą być ograniczone do pewnych specyficznych sekwencji di-, tri- i oligonukleotydowych DNA (zarówno eksonów, intronów, sekwencji niepowtarzalnych/unikatowych, jak i sekwencji powtarzających się tandemowo lub w sposób rozproszony w całym genomie). Mogą one ograniczać się także do krótkich sekwencji reszt aminoacylowych w łańcuchach polipeptydowych białek histonowych lub do niektórych struktur przestrzennych chromatyny jądrowej. Analiza jakościowa i ilościowa tych modyfikacji jest przedmiotem badań nowej gałęzi genetyki molekularnej określanej mianem epigenomiki. Profil pamięci epigenetycznej zależy zatem z jednej strony od częstotliwości metylacji DNA/histonów i stopnia acetylacji białek histonowych, a z drugiej – od wzajemnych korelacji między tymi dwoma rodzajami modyfikacji kowalencyjnych genomu. Ponadto, profil ten jest uwarunkowany stosunkiem ilościowym globalnych lub sekwencyjnie-specyficznych miejsc metylacji DNA do miejsc metylacji i deacetylacji histonów lub jego odwrotnością, tj. proporcją miejsc demetylacji DNA do miejsc demetylacji i acetylacji histonów (Shi i in., 2003 a; Simonsson i Gurdon, 2004; Anckaert i Fair, 2015).

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

Prawidłowy przebieg procesów epigenetycznej kontroli aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego zarodków klonalnych jest w dużym stopniu skorelowany dodatnio z inhibicją represji nukleosomowej DNA przez zależne od ATP wielopodjednostkowe białka z rodziny *brahma*, np. BRG1 oraz BRM, które są homologiczne z czynnikami białkowymi drożdży *Saccharomyces cere-*

visiae z grupy SWI2/SNF2 (ang. *switch of mating type/sucrose non-fermenting*). Te kompleksy białkowe są zaangażowane w przebudowę chromatyny somatogenicznej (zmiany w topologii DNA) najpierw w mikrośrodkowisku cytoplazmatycznym oocytybiorcy jądra, a następnie w cytozolu blastomerów zarodków znajdujących się w kolejnych stadiach rozwoju przedimplantacyjnego (Andreu-Vieyra i Matzuk, 2007; Rajasekhar i Begemann, 2007; Lee i in., 2010; Buganim i in., 2013).

Zarówno informacja zapisana w trójkowym kodzie genetycznym DNA, jak i tzw. pamięć epigenetyczna są dziedziczne, a zaburzenia ich dziedziczenia, czyli mutacje genetyczne (genowe) oraz mutacje epigenetyczne (epimutacje) są skutkiem nieprawidłowego lub niepełnego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego w przed- i poimplantacyjnej fazie rozwoju zarodkowego (Dindot i in., 2004; Kim i in., 2004; Lepikhov i in., 2008; Kungulovski i Jeltsch, 2016).

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

(Costa-Borges i in., 2010; Liao i in., 2015).

Drugi etap epigenetycznego prze-programowania aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek somatycznych rozpoczyna się w stadium późnej blastocysty, ulegającej procesowi gastrulacji. Etap ten cechuje fala intensywnej metylacji *de novo* reszt cytozyny DNA w wyróżnicowanych z embrioblastu (ICM; ang. *inner cell mass*) komórkach zasiedlających epiblast (ektoderme pierwotną) oraz hipoblast (endoderme pierwotną). Procesom remetylacji reszt cytozyny DNA w obrębie dinukleotydów CpG towarzyszy deacetylacja i metylacja *de novo* reszt lizyny, a także demetylacja *de novo* reszt argininy histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. W komórkach linii somatogenicznej, wywodzących się z epiblastu (komórki ektoderm i mezodermi zarodkowej) oraz z hipoblastu (komórki endodermi zarodkowej) jest realizowany molekularny scenariusz przebiegający w oparciu o inicjację ścieżki ilościowego powtórzenia (rekapitulacji) ogólnego schematu/profilu metylacji reszt cytozyny genomowego DNA komórek-dawców jąder. Jednakże, ścieżka remetylacji DNA jądrowego jest finalizowana poprzez zaszyfrowanie i utrwalenie kompletnie nowego kodu epigenetycznego (metylomu) wskutek postępującej cytodyferencji, czyli różnicowania komórek somatycznych w ramach embrionalnej histogenezy. W komórkach pozazarodkowych, pochodzących z linii komórek trofoblastycznych jest natomiast utrzymywany stan hipometylacji genomu jądrowego komórek-dawców (Dean i in., 2003; Reik i in., 2003 a; Sepulveda-Rincon i in., 2016).

Modyfikacje epigenomowe prowadzą do skoordynowanych zmian w stopniu ekspresji poszczególnych genów w kolejnych stadiach przed- i poimplantacyjnego rozwoju zarodków klonalnych. Zmiany w aktywności transkrypcyjnej genów odbywają się na skutek represji/supresji nukleosomowej (wyciszenie aktywności transkrypcyjnej, ang. *gene silencing*), indukowanej hipermetylacją DNA i reszt lizyny histonów, demetylacją reszt argininy histonów oraz hipocetylacją reszt lizyny histonów chromatyny jądrowej. Mogą one także odbywać się na skutek stymulacji, czyli wzmocnienia ich aktywności transkrypcyjnej (ang. *gene expression enhancing*), której towarzyszy demetylacja reszt cyto-

zyny DNA i reszt lizyny histonów, hipermetylacja reszt argininowych histonów oraz hiperacetylacja reszt lizyny histonów H3 i H4 (Seki i in., 2005; Pfister-Genskow i in., 2005; Koike i in., 2016).

Molekularne podłoże epigenetycznego przeprogramowania rodzicielskiego piętna genomowego komórek somatycznych w rozwoju zarodków klonalnych

Istotnym mechanizmem molekularnym epigenetycznego przeprogramowania DNA jądrowego jest także wymazanie („wyzerowanie”) zjawiska genomowego imprintingu rodzicielskiego (piętnowania gametycznego), warunkującego ekspresję jednorodzielską (uniparentalną), czyli monoalleliczną niektórych genów, np. genów osi somatotropowej, które są odpowiedzialne za regulację procesów proliferacyjnego i metabolicznego wzrostu komórek, tkanek, organów i ciała rozwijających się płodów i urodzonego potomstwa klonalnego (Lee i in., 2003; Srivastava i in., 2003; Shi i Wu, 2009; Jullien i in., 2017). Do epigenetycznie napiętnowanych genów osi somatotropowej należą: 1) zlokalizowany w chromosomie 17 myszy i w chromosomie 6 człowieka gen receptora insulinopodobnego czynnika wzrostowego typu 2 (*Igf2r*); 2) zlokalizowany w chromosomie 7 myszy i w chromosomie 11 człowieka gen niekodującego transkryptu mRNA specyficznego dla wątroby płodowej (*H19*) oraz 3) zlokalizowany w chromosomie 7 myszy i w chromosomie 11 człowieka gen insulinopodobnego czynnika wzrostowego typu 2 (*Igf2*) (Park i in., 2004; Paoloni-Giacobino i Chaillet, 2004; Smith i in., 2012; Hossain i in., 2014).

Wymazywanie markerów charakterystycznych dla rodzicielskiego imprintingu genomowego polega na stopniowym (ale ograniczonym jakościowo i ilościowo) usuwaniu metylacji piętnującej allele wybranych genów pochodzenia ojcowskiego (np. genów *Igf2r* i *H19*, które ulegają ekspresji z genomu matczynego) lub usuwaniu metylacji piętnującej allele genów pochodzenia matczynego (np. genu *Igf2*, który jest ekspresjonowany z genomu ojcowskiego) (Dindot i in., 2004; Fernandez-Gonzales i in., 2004; Masala i in., 2017). W kolejnych stadiach rozwoju przedimplantacyjnego klonalnych zarodków ssaków proces ten dotyczy tylko niewielkiej redukcji

liczby zmetylowanych wysp CpG (minisekwencji paliandromowych ^{Me}CpG) genomu jądrowego w obrębie międzygenowych regionów kontrolnych piętnowania (ICR; ang. *imprinting control regions*), zwanych również centrami piętnowania lub regionami/domenami o zróżnicowanej metylacji (ang. *differentially methylated regions/domains*; DMR/DMD) (Mann i in., 2004; Eilertsen i in., 2007; Rodriguez-Osorio i in., 2012; Iurlaro i in., 2017). Dlatego też, epigenetyczna pamięć komórkowa o tym, w jaki sposób geny DNA jądrowego były pierwotnie wyznakowane w kierunku ekspresji jednorodzielskiej, zostaje w przeważającej większości zachowana, czyli z reguły wzorzec ogólnej metylacji piętnującej ojcowski i matczynej genom jądrowy, pochodzący z komórek somatycznych, jest utrzymany w rozwijających się przedimplantacyjnych zarodkach klonalnych. Z uwagi na fakt, że aparat transkrypcyjny bruzdkujących zarodków klonalnych wydaje się być niewrażliwy na zależny od piętnowania genomowego ogólny stopień metylacji dinukleotydów CpG, warunkuje to i tak bialleliczną (dwurodzielską) ekspresję genów zarodkowych (Ogawa i in., 2003; Zhang i in., 2014; Prokopuk i in., 2017).

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

w odtworzonej z nich chromatynie interfazowej (Allegrucci i in., 2005; Nashun i in., 2015; Sepulveda-Rincon i in., 2016).

Obserwowane często w rozwoju zarodków i płodów uzyskiwanych na drodze technologii wspomaganego rozrodu zwierząt (klonowanie somatyczne, zapłodnienie *in vitro*) zaburzenia, które występują podczas przeprogramowania epigenetycznych markerów determinujących piętno gametyczne w obrębie genu *Igf2r* oraz w obrębie zespołu genów *H19-Igf2*, są przyczyną np. biallelicznej supresji transkrypcyjnej genu *Igf2r* i/lub genu *H19*, albo biallelicznej nadekspresji genu *Igf2*. Epimutacje, takie jak: 1) nadmierna metylacja reszt cytozyny DNA i hipoacetylacja histonów chromatyny w obrębie matczyńskich alleli genów *Igf2r* i/lub *H19* oraz 2) nadmierna demetylacja reszt cytozyny DNA i hiperacetylacja histonów chromatyny w obrębie matczyńskiego allelu genu *Igf2*, leżą łącznie u podstaw ujawnienia się i rozwoju fenotypowych cech charakterystycznych dla syndromów nadmiernej masy okołourodzeniowej potomstwa (ang. *Large Offspring Syndrome*; LOS) oraz przerostu (hiperplazji i hipertrofii komórek) łożyska (ang. *Large Placenta Syndrome*; LPS) (Mann i in., 2004; Fernandez-Gonzales i in., 2004; Jafarpour i in., 2017).

Sztuczna synchronizacja cyklu mitotycznego i modulacja profilu pamięci epigenetycznej komórek-dawców jąder oraz oddziaływanie tych metod na przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej genomu w zarodkach klonalnych

Potencjał rozwojowy klonalnych zarodków ssaków jest w znacznej mierze uwarunkowany stopniem zaawansowania epigenetycznych modyfikacji DNA jądrowego komórek somatycznych, poddawanych długotrwałej hodowli *in vitro*. Modulacja profilu pamięci epigenetycznej (tj. schematu metylacji DNA oraz acetylacji histonów) w hodowanych *ex vivo* komórkach somatycznych-dawcach jąder może bowiem zależeć od indukcji nukleosomowej supresji transkrypcyjnej przez różne warunki hodowli *in vitro* (np. inhibicję kontaktową w stanie pełnej konfluencji lub głodzenie komórek) (Costa-Borges i in., 2010; Kim i in., 2011; Kungulovski i Jeltsch, 2016).

Synchronizacja cyklu podziałowego komórek-dawców jąder w fazach G0/G1 odgrywa

znaczącą rolę w prawidłowym przeprogramowaniu profilu pamięci epigenetycznej egzogenego jądra w środowisku cytoplazmatycznym oocytu-biorcy (Yang i in., 2007; Rodriguez-Osorio i in., 2012). Wprowadzenie komórki somatycznej w stan spoczynkowy, jakim jest faza G0, przy wykorzystaniu różnych metod synchronizacji cyklu komórkowego, powoduje „wyciszenie” jej genów wskutek zahamowania ich aktywności transkrypcyjnej. Supresja, tj. uśpienie (ang. *quiescence*) potencjału proliferacyjnego komórek-dawców oraz represja transkrypcyjna i metaboliczna ich genomu jądrowego mogą być spowodowane czynnikami zadanymi eksperymentalnie lub występować naturalnie po osiągnięciu przez komórkę stanu pełnego zróżnicowania. Silnie skondensowana chromatyna jądrowa z wyraźnymi symptomami represji nukleosomowej wielu regionów DNA genomowego po wprowadzeniu do oocytu-biorcy prawidłowo reaguje na sygnały biochemiczne płynące z jego środowiska cytoplazmatycznego, tzn. na inhibicję aktywności enzymatycznej metylotransferaz DNA (DNMT1 oraz DNMT3a/b) oraz wzrost aktywności biokatalitycznej acetylaz histonów rdzenia nukleosomowego H3 i H4, co umożliwia pełne przeprogramowanie pamięci epigenetycznej egzogenego jądra (Eilertsen i in., 2007; Liao i in., 2015; Huang i in., 2016). Z dotychczasowych eksperymentów nad klonowaniem ssaków wynika, że źródłem komórek somatycznych, najbardziej podatnych na epigenetyczne przeprogramowanie genomu jądrowego i mitochondrialnego w zrekonstruowanych zarodkach, są fibroblasty płodowe, a także fibroblasty tkanki skórnej dorosłych osobników, których cykl mitotyczny został zsynchronizowany *in vitro* w stadiach G1/G0 lub G0/G1 w wyniku ich hodowli do stanu pełnej konfluencji lub głodzenia (Skrzyszowska i in., 2008; Kurome i in., 2013; Samiec i in., 2013 a,b). Po osiągnięciu 100% konfluencji komórki somatyczne podlegają zahamowaniu kontaktowemu (inhibicji kontaktowej) podziałów mitotycznych w wyniku opanowania całej dostępnej powierzchni naczynka hodowlanego, tj. substratu. Jest to stan, w którym gęstość komórek limituje ich migrację i proliferacyjny wzrost (Brunetti i in., 2008; Samiec i Skrzyszowska, 2014; Samiec i in., 2015). Alternatywny system synchronizacji

faz cyklu podziałowego, jakim jest głodzenie, określane również mianem deprywacji troficznej komórek-dawców jąder, polega na gwałtownym i długotrwałym obniżeniu (z 10% do 0,5%) stężenia surowicy płodów bydłęcych (FBS; ang. *foetal bovine serum*) w pożywce hodowlanej, tj. głównego źródła mitogenów, polipeptydowych czynników wzrostowych oraz czynników odżywczych (budulcowych i energetycznych) (Kawano i in., 2004; Lagutina i in., 2010, 2011). Z kolei, takie warunki hodowli *in vitro* mogą powodować drastyczny przyrost stopnia metylacji reszt cytozyny genomowego DNA oraz niekontrolowane zwiększenie stopnia deacetylacji reszt lizyny histonów chromatyny jądrowej w komórkach somatycznych. Może to być przyczyną znaczących odchyłeń od prawidłowego wzorca ekspresji, kluczowych dla przed- i poimplantacyjnego rozwoju zarodków klonalnych, genów na skutek ograniczonej demetylacji DNA, a także hipoacetylacji histonów rdzenia nukleosomowego oraz wynikającej z tego represji transkrypcyjnej przeważającej części somatogenicznego genomu jądrowego (Campbell i Alberio, 2003; Esteves i in., 2011; Mason i in., 2012). Jednakże, zachowanie prawidłowego wzorca metylacji DNA i acetylacji histonów podczas hodowli *in vitro* komórek-dawców jąder jest jednym z czynników niezbędnych do skutecznego epigenetycznego przeprogramowania transplowanego DNA genomowego (Enright i in., 2005; Yamanaka i in., 2009; Anckaert i Fair, 2015). W celu pełnego przeprogramowania jądra dawcy w zrekonstruowanym zarodku cały wzorzec metylacji DNA (tkankowo-specyficzny) wysoko zróżnicowanych komórek linii somatogenicznej musi zostać cofnięty do początkowego (totipotentnego) statusu rozwojowego jądra zygoty na drodze demetylacji reszt cytozyny (Kishigami i in., 2006; Deshmukh i in., 2011; Narbonne i in., 2012; Saini i in., 2014). Ten tkankowo-specyficzny stopień zróżnicowania komórkowego (cytodyferencjacji) może być uwarunkowany zmiennością we wzorcu ekspresji genów w komórkach o różnym fenotypie i specjalizacji strukturalno-funkcjonalnej, wynikającą z różnic we frekwencjach represji transkrypcyjnej oraz aktywności transkrypcyjnej DNA genomowego poszczególnych typów komórek somatycznych (Armstrong i in., 2006; Nashun i in., 2015; Jin i in., 2017 a,b).

Utrzymanie właściwego schematu metylacji genomu jądrowego podczas hodowli *in vitro* komórek somatycznych sprzyja również zachowaniu w nienaruszonej postaci mechanizmów odpowiedzialnych za imprinting genomu rodzicielskiego (Bonk i in., 2007, 2008; Martinez-Diaz i in., 2010; Buganim i in., 2013). To z kolei rzutuje na prawidłowe i pełne przeprogramowanie epigenetycznie uwarunkowanej aktywności transkrypcyjnej jąder komórek somatycznych w klonalnych zarodkach ssaków. Przez wiele lat termin „imprinting gametyczny” czy „rodzicielskie piętno genomowe” był używany w odniesieniu do ekspresji alleli określonego genu tylko z jednego genomu rodzicielskiego (tj. ekspresji uniparentalnej bądź monoallelicznej). Istotnym procesem związanym z ekspresją uniparentalną jest wymazanie specyficznego wzorca wyznakowania genu (tzw. kodu epigenetycznego determinującego imprinting gametyczny lub profilu metylacji piętnującej) w następnym pokoleniu (Corry i in., 2009; Wen i in., 2014; Jafarpour i in., 2017). W komórkach somatycznych potomstwa przejawia się wówczas potencjalna zdolność do ekspresji alleli określonego genu, pochodzących od obojga rodziców, czyli zdolność do ekspresji biallelicznej (dwurodzicielskiej). Jeżeli jednak ulegający ekspresji jednorodzielskiej, tj. eksprymowany uniparentalnie gen jest przekazywany od rodzica jednej płci do potomstwa o płci przeciwnej – wzór jego ekspresji musi zostać odwrócony w linii płciowej potomka. „Zerowanie” rodzicielskiego piętna metylacji genów następuje również podczas ich przekazywania między tą samą płcią, ale w tym przypadku przywracany jest taki sam rodzaj znakowania genu. Identyczny przebieg procesu eliminacji rodzicielskiego piętna gametycznego, a następnie jego rekapitulacji ma miejsce w następstwie dziedziczenia epigenetycznie wyznakowanych genów przez potomstwo uzyskiwane w wyniku klonowania metodą transplatacji jąder komórek somatycznych do enukleowanych oocytów (Whitworth i Prather, 2010; Fisher i Fisher, 2011; Xie i in., 2016). Dlatego też, epigenomowa pamięć komórkowa o tym, w jaki sposób geny DNA jądrowego były pierwotnie napiętnowane w kierunku ekspresji monoallelicznej, zostaje w całości przywrócona w różnicujących się komórkach linii trofoekto-

dermalnej oraz embrioblastycznej (epi- i hipoblastycznej) poimplantacyjnych zarodków, a także w różnicujących się komórkach linii gametogenicznej w zawiązkach gonad oraz komórkach linii somatogenicznej w poszczególnych tkankach, organach i częściach ciała płodów i urodzonego potomstwa klonalnego (Beaujean i in., 2004; Bowles i in., 2007; Prokopuk i in., 2017). Z tego wynika, że wzorzec ogólnej metylacji warunkującej uniparentalną aktywność transkrypcyjną i translacyjną DNA genomowego komórek-dawców jąder w klonowaniu somatycznym jest ustanawiany *de novo* w rozwoju ontogenetycznym osobników klonalnych. Wymazywanie epigenetycznych kodów odpowiedzialnych za piętno rodzicielskie zachodzi zatem w każdym pokoleniu, ale zawsze w jednym z alleli zostaje odwrócony jego pierwotny imprinting. Ogranicza to listę epigenetycznych mechanizmów modyfikujących, które mogłyby być odpowiedzialne za zjawisko piętnowania rodzicielskiego (Mann i in., 2004; Paoloni-Giacobino i Chaillet, 2004; Sepulveda-Rincon i in., 2016).

Stosowane na szeroką skalę metody synchronizacji cyklu mitotycznego hodowanych komórek-dawców jąder w fazach G0/G1 lub G1/G0, takie jak: deprivacja troficzna lub zahamowanie kontaktowe ich aktywności proliferacyjnej, mogą mieć zatem niekorzystny wpływ na epigenomowo-zależny profil aktywności transkrypcyjnej genów DNA jądrowego i mitochondrialnego poprzez drastyczne osłabienie poziomu tkankowo-specyficznej ekspresji genomu (Yang i in., 2007; Wu i in., 2008; Prather i in., 2009; Mallol i in., 2014, 2016). Obniżenie aktywności transkrypcyjnej DNA genomowego może być bowiem spowodowane gwałtownym wzrostem częstotliwości takich zmian w pamięci epigenetycznej komórki, jak: 1) procesy metylacji reszt cytozyny DNA oraz 2) procesy deacetylacji reszt lizyny histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. Jednakże, te szkodliwe dla funkcji fizjologicznych i przeżywalności komórek transformacje biochemiczne genomu jądrowego, które są indukowane w warunkach hodowli *in vitro*, można zahamować, a nawet odwrócić ich przebieg w kierunku wzrostu natężenia ekspresji genów, korzystnego dla aktywności metabolicznej i proliferacyjnej komórek (Enright i in., 2005; Cervera i in., 2009; Lee i in.,

2010; Song i in., 2014; Hörmanseder i in., 2017).

Jednym ze sposobów odwrócenia zaawansowanych zmian we wzorcu kowalencyjnych modyfikacji epigenetycznych jąder komórek somatycznych, które obejmują gwałtowną metylację DNA lub spadek poziomu acetylacji białek histonowych, wydaje się ekspozycja hodowanych *in vitro* komórek-dawców jąder, dojrzewających *in vitro* oocytów-biorców jąder i/lub zarodków klonalnych na działanie syntetycznych analogów endogennych związków odwracalnie hamujących aktywność DNMTs oraz HDACs (ryc. 1) (Ding i in., 2008; Martinez-Diaz i in., 2010; Bo i in., 2011; Ning i in., 2013; Sangalli i in., 2014; Huang i in., 2016; Opiela i in., 2017). Do pierwszej grupy sztucznych modyfikatorów epigenetycznych należą: 1) 5-aza-2'-deoksycytydina (5-aza-dC; decytabina) (Enright i in., 2005; Wang i in., 2011 a; Ning i in., 2013; Huan i in., 2014, 2015 a,b); 2) zebularyna (nukleozydowy analog cytydyny) (Diao i in., 2013; Xiong i in., 2013) i 3) *S*-adenozylhomocysteina (SAH) (Jeon i in., 2008). Druga grupa z kolei obejmuje: 1) trichostatynę A (TSA; *N*-arylowa/*N*-fenylowa pochodna kwasu hydroksamowego) (Wee i in., 2007; Li i in., 2008; Saini i in., 2014; Samiec i Skrzyszowska, 2012; Huan i in., 2014, 2015 a,b; Samiec i in., 2015; Opiela i in., 2017); 2) butanian/masłan sodu (NaBu) (Das i in., 2010; Liu i in., 2012; Kumar i in., 2013) oraz 3) *bis*hydroksyamid kwasu *m*-karboksycynaminowego (CBHA) (Dai i in., 2010; Song i in., 2014). Spośród inhibitorów HDACs nowej generacji, o relatywnie niższych właściwościach cytotoksycznych lub embriotoksycznych należy wskazać: 4) kwas walproinowy (VPA, ang. *valproic acid*; kwas 2-propylopentanowy/kwas 2-propylowalerianowy) lub walproinian sodu (SV, ang. *sodium valproate*; 2-propylopentanian sodu/2-propylowalerian sodu) (Costa-Borges i in., 2010; Kim i in., 2011; Mallol i in., 2014; Sangalli i in., 2014), a także 5) analog, tj. syntetyczną, amfifilową pochodną kwasu hydroksyaminowego – skryptaid (SCPT, ang. *scriptaid*; hydroksyamid kwasu 6-(1,3-dioksy-1*H*,3*H*-benzo[de]jizokwinolin-2-yl)-heksanowego) (Van Thuan i in., 2009; Wang i in., 2011 b; Xu i in., 2013; Wen i in., 2014; Liang i in., 2015; Samiec i in., 2016) oraz 6) oksamflatynę (aromatyczna/*N*-fenylowa pochodna sulfonoamidu kwasu hydroksamowego) (Park

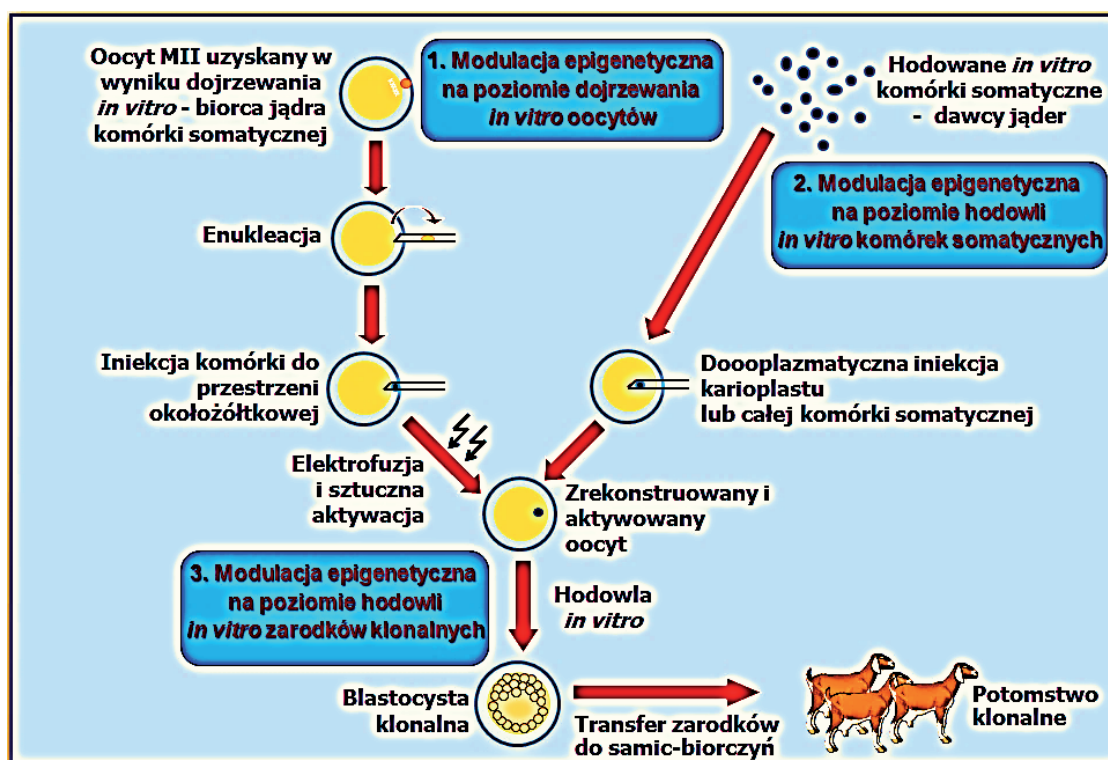
i in., 2012; Hou i in., 2014; Mao i in., 2015).

Wyniki wielu badań sugerują, że zastosowanie niespecyficzných/nieselektywných inhibitorów DNMTs bądź HDACs (iDNMTs/iHDACs) do egzogennej modulacji epigenomowej hodowanych *in vitro* somatycznych komórek-dawców jąder, dojrzewających *in vitro* oocytów-biorców jąder i/lub zarodków klonalnych (ryc. 1) może mieć pozytywny wpływ na złożone procesy strukturalnego przemodelowania chromatyny jądrowej oraz epigenetycznego przeprogramowania DNA genomowego w przedimplantacyjnej fazie rozwoju zarodków klonalnych różnych gatunków ssaków (Jeon i in., 2008; Samiec i Skrzyszowska, 2012; Huan i in., 2013; Cao i in., 2017; Qiu i in., 2017).

Scenariusz prawidłowego i pełnego przeprogramowania profilu pamięci epigenetycznej

jąder somatogenicznych w komórkach zarodków klonalnych może zostać bowiem zrealizowany jedynie przez zwiększenie częstotliwości pasywnej demetylacji reszt cytozyny DNA oraz osłabienie natężenia deacetylacji (tj. wzmożoną hiperacetylację) reszt lizyny histonów chromatyny komórek-dawców jąder i zarodków, które uprzednio poddano egzogennym modyfikacjom epigenomowym (Xu i in., 2013; Gonzales-Cope i in., 2016; Jin i in., 2013, 2016, 2017 a,b).

Pośrednim wskaźnikiem właściwego przebiegu procesu epigenetycznego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej jąder komórek somatycznych w zarodkach klonalnych jest ich wysoki przedimplantacyjny potencjał rozwojowy i/lub poprawa ich jakości morfologicznej i cytobiochemicznej (Diao i in., 2013; Hou i in., 2014; Samiec i in., 2015; Opiela i in., 2017).



Ryc. 1. Modułacja epigenetyczna (transformacja epigenomowa) hodowanych *in vitro* komórek-dawców jąder, dojrzewających *in vitro* oocytów-biorców jąder oraz zarodków kozy uzyskanych techniką klonowania somatycznego
 Fig. 1. Epigenetic modulation (epigenomic transformation) of *in vitro* cultured nuclear donor cells, *in vitro* maturing nuclear recipient oocytes, and goat embryos produced by somatic cell cloning

Podsumowanie

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

Czynnikiem determinującym, zarówno potencjał rozwojowy, jak i jakość klonalnych zarodków ssaków jest stopień zaawansowania epigenetycznych modyfikacji genomowego DNA somatycznych komórek-dawców jąder w warunkach ich długotrwałej hodowli *in vitro*. Powszechnie stosowane metody synchronizacji cyklu mitotycznego hodowanych komórek somatycznych w fazach G0/G1 lub G1/G0, takie jak: głodzenie lub inhibicja kontaktowa ich aktywności podziałowej, mogą prowadzić do znacznego wyciszenia tkankowo-specyficznej ekspresji genów DNA jądrowego i mitochondrialnego (Samiec i in., 2013 a,b; Kungulovski i Jeltsch, 2016).

Oslabienie aktywności transkrypcyjnej genomu komórek somatycznych może być wynikiem drastycznego wzrostu natężenia kowalencyjnych modyfikacji w ich profilu epigenetycznym. Do najistotniejszych z tych modyfikacji należy zaliczyć hipermetylację reszt cytozyny DNA oraz hipoacetylację reszt lizyny histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej (Rybouchkin i in., 2006; Wee i in., 2007; Nashun i in., 2015). Niemniej jednak, te negatywne w skutkach nasilone zmiany epigenetyczne w wielu regionach genomowego DNA hodowanych *in vitro* komórek-dawców jąder można powstrzymać poprzez ich sztuczną modulację epigenomową, efek-

tem której wydaje się być stosunkowo trwałe przywrócenie dynamicznej równowagi biochemicznej w poziomie metylacji DNA oraz acetylacji białek histonowych (Armstrong i in., 2006; Eilertsen i in., 2007; Zhao i in., 2010). Taka ektopowa modulacja epigenomowo-zależnego profilu aktywności transkrypcyjnej genów DNA jądrowego w komórkach somatycznych może być skutecznie przeprowadzana za pośrednictwem syntetycznych analogów endogennych związków odwracalnie hamujących aktywność HDACs (Martinez-Diaz i in., 2010; Su i in., 2011; Song i in., 2014). Wśród najbardziej znanych sztucznych modulatorów epigenetycznych należy wymienić zarówno standardowe inhibitory HDACs, np. trichostatynę A (TSA), jak i ich nowych przedstawicieli, tj. skryptaid (SCPT) lub kwas walproinowy/walproinian sodu (VPA/SV) (Wang i in., 2011 a,b; Sangalli i in., 2014; Wen i in., 2014; Samiec i in., 2015).

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

Literatura

- Allegrucci C., Thurston A., Lucas E., Young L. (2005). Epigenetics and the germline. *Reproduction*, 129: 137–149.
- Anckaert E., Fair T. (2015). DNA methylation reprogramming during oogenesis and interference by reproductive technologies: Studies in mouse and bovine models. *Reprod. Fertil. Dev.*, 27: 739–754.
- Andreu-Vieyra C., Matzuk M.M. (2007). Epigenetic modifications by Trithorax group proteins during early embryogenesis: do members of Trx-G function as maternal effect genes? *Reprod. Biomed. Online*, 14: 201–207.
- Armstrong L.M., Lako W., Dean W., Stojkovic M. (2006). Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells*, 24: 805–814.
- Bang J.I., Yoo J.G., Park M.R., Shin T.S., Cho B.W., Lee H.G., Kim B.W., Kang T.Y., Kong I.K., Kim J.H., Cho S.K. (2013). The effects of artificial activation timing on the development of SCNT-derived embryos and newborn piglets. *Reprod. Biol.*, 13: 127–132.
- Beaujean N., Taylor J., Gardner J., Wilmut I., Meehan R., Young L. (2004). Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 71: 185–193.
- Bo F., Di L., Qing-chang F., Liang R., Hong M., Liang W., Zhen-hua G., Zhong-qiu L. (2011). Effect of trichostatin A on transfected donor cells and subsequent development of porcine cloned embryos. *Zygote*, 19 (3): 237–243.
- Bonk A.J., Cheong H.T., Li R., Lai L., Hao Y., Liu Z., Samuel M., Ferguson E.A., Whitworth K.M., Murphy C.N., Antoniou E., Prather R.S. (2007). Correlation of developmental differences of nuclear transfer embryos cells to the methylation profiles of nuclear transfer donor cells in swine. *Epigenetics*, 2: 179–186.
- Bonk A.J., Li R., Lai L., Hao Y., Liu Z., Samuel M., Ferguson E.A., Whitworth K.M., Murphy C.N., Antoniou E., Prather R.S. (2008). Aberrant DNA methylation in porcine *in vitro*-, parthenogenetic-, and somatic cell nuclear transfer-produced blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.*, 75: 250–264.
- Bowles E.J., Campbell K.H., St. John J.C. (2007). Nuclear transfer: preservation of a nuclear genome at the expense of its associated mtDNA genome(s). *Curr. Top. Dev. Biol.*, 77: 251–290.
- Brunetti D., Perota A., Lagutina I., Colleoni S., Duchi R., Calabrese F., Seveso M., Cozzi E., Lazzari G., Lucchini F., Galli C. (2008). Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned pigs derived from *in vitro* transfected adult fibroblasts. *Cloning Stem Cells*, 10: 409–419.
- Buganim Y., Faddah D.A., Jaenisch R. (2013). Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat. Rev. Genet.*, 14: 427–439.
- Bui H.T., Van Thuan N., Kishigami S., Wakayama S., Hikichi T., Ohta H., Mizutani E., Yamaoka E., Wakayama T., Miyano T. (2007). Regulation of chromatin and chromosome morphology by histone H3 modifications in pig oocytes. *Reproduction*, 133: 371–382.
- Campbell K.H., Alberio R. (2003). Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reprod.*, Suppl., 61: 477–494.
- Cao Z., Hong R., Ding B., Zuo X., Li H., Ding J., Li Y., Huang W., Zhang Y. (2017). TSA and BIX-01294 induced normal DNA and histone methylation and increased protein expression in porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *PLoS One*, 12: e0169092.
- Cervera R.P., Martí-Gutiérrez N., Escorihuela E., Moreno R., Stojkovic M. (2009). Trichostatin A affects histone acetylation and gene expression in porcine somatic cell nucleus transfer embryos. *Theriogenology*, 72: 1097–1110.
- Corry G.N., Tanasijevic B., Barry E.R., Krueger W., Rasmussen T.P. (2009). Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation development. *Birth Defects Res. C Embryo Today*, 87: 297–313.
- Costa-Borges N., Santaló J., Ibáñez E. (2010). Comparison between the effects of valproic acid and trichostatin A on the *in vitro* development, blastocyst quality, and full-term development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.*, 12: 437–446.
- Cui W., Wylie D., Aslam S., Dinnyes A., King T., Wilmut I., Clark A.J. (2003). Telomerase-immortalized sheep fibroblasts can be reprogrammed by nuclear transfer to undergo early development. *Biol. Reprod.*, 69: 15–21.
- Dai X., Hao J., Hou X.J., Hai T., Fan Y., Yu Y., Jouneau A., Wang L., Zhou Q. (2010). Somatic nucleus reprogramming is significantly improved by *m*-carboxycinnamic acid bishydroxamide, a histone deacetylase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 285: 31002–31010.
- Das Z.C., Gupta M.K., Uhm S.J., Lee H.T. (2010). Increasing histone acetylation of cloned embryos, but not donor cells, by sodium butyrate improves their *in vitro* development in pigs. *Cell. Reprogram.*, 12: 95–104.
- Dean W., Santos F., Reik W. (2003). Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 14: 93–100.

- Deshmukh R.S., Østrup O., Østrup E., Vejlsted M., Niemann H., Lucas-Hahn A., Petersen B., Li J., Callesen H., Hyttel P. (2011). DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed *in vivo* and produced by *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. *Epigenetics*, 6: 177–187.
- Diao Y.F., Naruse K.J., Han R.X., Li X.X., Oqani R.K., Lin T., Jin D.I. (2013). Treatment of fetal fibroblasts with DNA methylation inhibitors and/or histone deacetylase inhibitors improves the development of porcine nuclear transfer-derived embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 141: 164–171.
- Dindot S.V., Farin P.W., Farin C.E., Romano J., Walker S., Long C., Piedrahita J.A. (2004). Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived *Bos gaurus/Bos taurus* hybrid fetuses. *Biol. Reprod.*, 71: 470–478.
- Ding X., Wang Y., Zhang D., Wang Y., Guo Z., Zhang Y. (2008). Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology*, 70: 622–630.
- Eilertsen K.J., Power R.A., Harkins L.L., Misica P. (2007). Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, 98: 129–146.
- Enright B.P., Sung L.Y., Chang C.C., Yang X., Tian X.C. (2005). Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.*, 72: 944–948.
- Esteves T.C., Balbach S.T., Pfeiffer M.J., Araúzo-Bravo M.J., Klein D.C., Sinn M., Boiani M. (2011). Somatic cell nuclear reprogramming of mouse oocytes endures beyond reproductive decline. *Aging Cell*, 10: 80–95.
- Fernandez-Gonzales R., Moreira P., Bilbao A., Jimenez A., Perez-Crespo M., Ramirez M.A., De Fonseca F.R., Pintado B., Gutierrez-Adan A. (2004). Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 5880–5885.
- Fisher C.L., Fisher A.G. (2011). Chromatin states in pluripotent, differentiated, and reprogrammed cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 21: 140–146.
- Gomes N.M., Ryder O.A., Houck M.L., Charter S.J., Walker W., Forsyth N.R., Austad S.N., Venditti C., Pagel M., Shay J.W., Wright W.E. (2011). Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging Cell*, 10: 761–768.
- Gonzales-Cope M., Sidoli S., Bhanu N.V., Won K.J., Garcia B.A. (2016). Histone H4 acetylation and the epigenetic reader Brd4 are critical regulators of pluripotency in embryonic stem cells. *BMC Genomics*, 17: 95.
- Hörmanseder E., Simeone A., Allen G.E., Bradshaw C.R., Figlmüller M., Gurdon J., Jullien J. (2017). H3K4 methylation-dependent memory of somatic cell identity inhibits reprogramming and development of nuclear transfer embryos. *Cell Stem Cell*, 21: 135–143.e6.
- Hossain M.M., Tesfaye D., Salilew-Wondim D., Held E., Pröll M.J., Rings F., Kirfel G., Looft C., Tholen E., Uddin J., Schellander K., Hoelker M. (2014). Massive deregulation of miRNAs from nuclear reprogramming errors during trophoblast differentiation for placentogenesis in cloned pregnancy. *BMC Genomics*, 15: 43.
- Hou L., Ma F., Yang J., Riaz H., Wang Y., Wu W., Xia X., Ma Z., Zhou Y., Zhang L., Ying W., Xu D., Zuo B., Ren Z., Xiong Y. (2014). Effects of histone deacetylase inhibitor oxamflatin on *in vitro* porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.*, 16: 253–265.
- Huan Y.J., Zhu J., Xie B.T., Wang J.Y., Liu S.C., Zhou Y., Kong Q.R., He H.B., Liu Z.H. (2013). Treating cloned embryos, but not donor cells, with 5-aza-2'-deoxycytidine enhances the developmental competence of porcine cloned embryos. *J. Reprod. Dev.*, 59: 442–449.
- Huan Y.J., Zhu J., Wang H.M., Wu Z.F., Zhang J.G., Xie B.T., Li J.Y., Kong Q.R., Liu Z.H., He H.B. (2014). Epigenetic modification agents improve genomic methylation reprogramming in porcine cloned embryos. *J. Reprod. Dev.*, 60: 377–382.
- Huan Y., Wu Z., Zhang J., Zhu J., Liu Z., Song X. (2015 a). Epigenetic modification agents improve gene-specific methylation reprogramming in porcine cloned embryos. *PLoS One*, 10: e0129803.
- Huan Y., Wang H., Wu Z., Zhang J., Zhu J., Liu Z., He H. (2015 b). Epigenetic modification of cloned embryos improves *Nanog* reprogramming in pigs. *Cell. Reprogram.*, 17: 191–198.
- 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.
- Iurlaro M., von Meyenn F., Reik W. (2017). DNA methylation homeostasis in human and mouse development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 43: 101–109.

- Jafarpour F., Hosseini S.M., Ostadhosseini S., Abbasi H., Dalman A., Nasr-Esfahani M.H. (2017). Comparative dynamics of 5-methylcytosine reprogramming and TET family expression during preimplantation mammalian development in mouse and sheep. *Theriogenology*, 89: 86–96.
- Jeon H.Y., Hyun S.H., Lee G.S., Kim H.S., Kim S., Jeong Y.W., Kang S.K., Lee B.C., Han J.Y., Ahn C., Hwang W.S. (2005). The analysis of telomere length and telomerase activity in cloned pigs and cows. *Mol. Reprod. Dev.*, 71: 315–320.
- Jeon B.G., Coppola G., Perrault S.D., Rho G.J., Betts D.H., King W.A. (2008). *S*-adenosylhomocysteine treatment of adult female fibroblasts alters X-chromosome inactivation and improves *in vitro* embryo development after somatic cell nuclear transfer. *Reproduction*, 135: 815–828.
- Jiang L., Carter D.B., Xu J., Yang X., Prather R.S., Tian X.C. (2004). Telomere lengths in cloned transgenic pigs. *Biol. Reprod.*, 70: 1589–1593.
- Jin J.X., Li S., Gao Q.S., Hong Y., Jin L., Zhu H.Y., Yan C.G., Kang J.D., Yin X.J. (2013). Significant improvement of pig cloning efficiency by treatment with LBH589 after somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 80: 630–635.
- Jin L., Zhu H.Y., Guo Q., Li X.C., Zhang Y.C., Zhang G.L., Xing X.X., Xuan M.F., Luo Q.R., Yin X.J., Kang J.D. (2016). PCI-24781 can improve *in vitro* and *in vivo* developmental capacity of pig somatic cell nuclear transfer embryos. *Biotechnol. Lett.*, 38: 1433–1441.
- Jin L., Guo Q., Zhu H.Y., Xing X.X., Zhang G.L., Xuan M.F., Luo Q.R., Luo Z.B., Wang J.X., Yin X.J., Kang J.D. (2017 a). Quisinostat treatment improves histone acetylation and developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 84: 340–346.
- Jin J.X., Lee S., Taweechaipaisankul A., Kim G.A., Lee B.C. (2017 b). The HDAC inhibitor LAQ824 enhances epigenetic reprogramming and *in vitro* development of porcine SCNT embryos. *Cell Physiol. Biochem.*, 41: 1255–1266.
- Jullien J., Vodnala M., Pasque V., Oikawa M., Miyamoto K., Allen G., David S.A., Brochard V., Wang S., Bradshaw C., Koseki H., Sartorelli V., Beaujean N., Gurdon J. (2017). Gene resistance to transcriptional reprogramming following nuclear transfer is directly mediated by multiple chromatin-repressive pathways. *Mol. Cell*, 65: 873–884.e8.
- Kawano K., Kato Y., Tsunoda Y. (2004). Comparison of *in vitro* development of porcine nuclear-transferred oocytes receiving fetal somatic cells by injection and fusion methods. *Cloning Stem Cells*, 6: 67–72.
- Kim S.H., Kang Y.K., Koo D.B., Kang M.J., Moon S.J., Lee K.K., Han Y.M. (2004). Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 324: 58–63.
- Kim Y.J., Ahn K.S., Kim M., Shim H. (2011). Comparison of potency between histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on enhancing *in vitro* development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 47: 283–289.
- Kishigami S., Mizutani E., Ohta H., Hikichi T., Thuan N.V., Wakayama S., Bui H.T., Wakayama T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 340: 183–189.
- Koike T., Wakai T., Jincho Y., Sakashita A., Kobayashi H., Mizutani E., Wakayama S., Miura F., Ito T., Kono T. (2016). DNA methylation errors in cloned mouse sperm by germ line barrier evasion. *Biol. Reprod.*, 94: 128, 1–7.
- Kourmouli N., Jeppesen P., Mahadevhaiah S., Burgoyne P., Wu R., Gilbert D.M., Bongiorno S., Prantera G., Fanti L., Pimpinelli S., Shi W., Fundele R., Singh P.B. (2004). Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J. Cell Sci.*, 117: 2491–2501.
- Kumar B.M., Jin H.F., Kim J.G., Ock S.A., Hong Y., Balasubramanian S., Choe S.Y., Rho G.J. (2007). Differential gene expression patterns in porcine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts and mesenchymal stem cells. *Dev. Dyn.*, 236: 435–446.
- Kumar B.M., Maeng G.H., Lee Y.M., Lee J.H., Jeon B.G., Ock S.A., Kang T., Rho G.J. (2013). Epigenetic modification of fetal fibroblasts improves developmental competency and gene expression in porcine cloned embryos. *Vet. Res. Commun.*, 37: 19–28.
- Kungulovski G., Jeltsch A. (2016). Epigenome editing: state of the art, concepts, and perspectives. *Trends Genet.*, 32: 101–113.
- Kurome M., Hisatomi H., Matsumoto S., Tomii R., Ueno S., Hiruma K., Saito H., Nakamura K., Okumura K.,

- Matsumoto M., Kaji Y., Endo F., Nagashima H. (2008). Production efficiency and telomere length of the cloned pigs following serial somatic cell nuclear transfer. *J. Reprod. Dev.*, 54: 254–258.
- Kurome M., Geistlinger L., Kessler B., Zakhartchenko V., Klymiuk N., Wuensch A., Richter A., Baehr A., Kraehe K., Burkhardt K., Flisikoski K., Flisikowska T., Merkl C., Landmann M., Durkovic M., Tschukes A., Kraner S., Schindelhauer D., Petri T., Kind A., Nagashima H., Schnieke A., Zimmer R., Wolf E. (2013). Factors influencing the efficiency of generating genetically engineered pigs by nuclear transfer: multi-factorial analysis of a large data set. *BMC Biotechnol.*, 13: 43.
- Lagutina I., Fulka H., Brevini T.A., Antonini S., Brunetti D., Colleoni S., Gandolfi F., Lazzari G., Fulka J. Jr., Galli C. (2010). Development, embryonic genome activity and mitochondrial characteristics of bovine-pig inter-family nuclear transfer embryos. *Reproduction*, 140: 273–285.
- Lagutina I., Zakhartchenko V., Fulka H., Colleoni S., Wolf E., Fulka J. Jr., Lazzari G., Galli C. (2011). Formation of nucleoli in interspecies nuclear transfer embryos derived from bovine, porcine, and rabbit oocytes and nuclear donor cells of various species. *Reproduction*, 141: 453–465.
- Lee J., Inoue K., Ono R., Ogonuki N., Kohda T., Kaneko-Ishino T., Ogura A., Ishino F. (2002). Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*, 129: 1807–1817.
- Lee H.S., Yu X.F., Bang J.I., Cho S.J., Deb G.K., Kim B.W., Kong I.K. (2010). Enhanced histone acetylation in somatic cells induced by a histone deacetylase inhibitor improved inter-generic cloned leopard cat blastocysts. *Theriogenology*, 74: 1439–1449.
- Lepikhov K., Zakhartchenko V., Hao R., Yang F., Wrenzycki C., Niemann H., Wolf E., Walter J. (2008). Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. *Epigenetics Chromatin*, 1: 8, 11 pages.
- Li J., Svarcova O., Villemoes K., Kragh P.M., Schmidt M., Bøgh I.B., Zhang Y., Du Y., Lin L., Purup S., Xue Q., Bolund L., Yang H., Maddox-Hyttel P., Vajta G. (2008). High *in vitro* development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology*, 70: 800–808.
- Liang S., Zhao M.H., Choi J.W., Kim N.H., Cui X.S. (2015). Scriptaid treatment decreases DNA methyltransferase 1 expression by induction of microRNA-152 expression in porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *PLoS One*, 10: e0134567.
- Liao H.F., Mo C.F., Wu S.C., Cheng D.H., Yu C.Y., Chang K.W., Kao T.H., Lu C.W., Pinskaya M., Morillon A., Lin S.S., Cheng W.T., Bourc'his D., Bestor T., Sung L.Y., Lin S.P. (2015). Dnmt31-knockout donor cells improve somatic cell nuclear transfer reprogramming efficiency. *Reproduction*, 150: 245–256.
- Liu H., Kim J.M., Aoki F. (2004). Regulation of histone H3 lysine 9 methylation in oocytes and early preimplantation embryos. *Development*, 131: 2269–2280.
- Liu L., Liu Y., Gao F., Song G., Wen J., Guan J., Yin Y., Ma X., Tang B., Li Z. (2012). Embryonic development and gene expression of porcine SCNT embryos treated with sodium butyrate. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, 318: 224–234.
- Lorthongpanich C., Solter D., Lim C.Y. (2010). Nuclear reprogramming in zygotes. *Int. J. Dev. Biol.*, 54: 1631–1640.
- Ma P.J., Zhang H., Li R., Wang Y.S., Zhang Y., Hua S. (2015). P53-mediated repression of the reprogramming in cloned bovine embryos through direct interaction with HDAC1 and indirect interaction with DNMT3A. *Reprod. Domest. Anim.*, 50: 400–409.
- Mallol A., Santaló J., Ibáñez E. (2014). Psammaplin A improves development and quality of somatic cell nuclear transfer mouse embryos. *Cell. Reprogram.*, 16: 392–406.
- Mallol A., Piqué L., Santaló J., Ibáñez E. (2016). Morphokinetics of cloned mouse embryos treated with epigenetic drugs and blastocyst prediction. *Reproduction*, 151: 203–214.
- Mann M.R.W., Lee S.S., Doherty A.S., Verona R.I., Nolen L.D., Schultz R.M., Bartolomei M.S. (2004). Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development*, 131: 3727–3735.
- Mao J., Zhao M.T., Whitworth K.M., Spate L.D., Walters E.M., O’Gorman C., Lee K., Samuel M.S., Murphy C.N., Wells K., Rivera R.M., Prather R.S. (2015). Oxamflatin treatment enhances cloned porcine embryo development and nuclear reprogramming. *Cell. Reprogram.*, 17: 28–40.
- Martinez-Diaz M.A., Che L., Albornoz M., Seneda M.M., Collis D., Coutinho A.R., El-Beirouthi N., Laurin D., Zhao X., Bordignon V. (2010). Pre- and postimplantation development of swine-cloned embryos derived from

- fibroblasts and bone marrow cells after inhibition of histone deacetylases. *Cell. Reprogram.*, 12: 85–94.
- Masala L., Burrai G.P., Bellu E., Ariu F., Bogliolo L., Ledda S., Bebbere D. (2017). Methylation dynamics during folliculogenesis and early embryo development in sheep. *Reproduction*, 153: 605–619.
- Mason K., Liu Z., Aguirre-Lavin T., Beaujean N. (2012). Chromatin and epigenetic modifications during early mammalian development. *Anim. Reprod. Sci.*, 134: 45–55.
- Narbonne P., Miyamoto K., Gurdon J.B. (2012). Reprogramming and development in nuclear transfer embryos and in interspecific systems. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 22: 450–458.
- Nashun B., Hill P.W., Hajkova P. (2015). Reprogramming of cell fate: epigenetic memory and the erasure of memories past. *EMBO J.*, 34: 1296–1308.
- Ning S.F., Li Q.Y., Liang M.M., Yang X.G., Xu H.Y., Lu Y.Q., Lu S.S., Lu K.H. (2013). Methylation characteristics and developmental potential of Guangxi Bama minipig (*Sus scrofa domestica*) cloned embryos from donor cells treated with trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Zygote*, 21: 178–186.
- Novak S., Paradis F., Savard C., Tremblay K., Sirard M.A. (2004). Identification of porcine oocyte proteins that are associated with somatic cell nuclei after co-incubation. *Biol. Reprod.*, 71: 1279–1289.
- Ogawa H., Ono Y., Shimozawa N., Sotomaru Y., Katsuzawa Y., Hiura H., Ito M., Kono T. (2003). Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. *Reproduction*, 126: 549–557.
- Opiela J., Samiec M., Romanek J. (2017). *In vitro* development and cytological quality of inter-species (porcine→bovine) cloned embryos are affected by trichostatin A-dependent epigenomic modulation of adult mesenchymal stem cells. *Theriogenology*, 97: 27–33.
- Paoloni-Giacobino A., Chaillet J.R. (2004). Genomic imprinting and assisted reproduction. *Reprod. Health*, 1: 6.
- Park K.Y., Sellars E.A., Grinberg A., Huang S.P., Pfeifer K. (2004). The *H19* differentially methylated region marks the parental origin of a heterologous locus without gametic DNA methylation. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 3588–3595.
- Park S.J., Park H.J., Koo O.J., Choi W.J., Moon J.H., Kwon D.K., Kang J.T., Kim S., Choi J.Y., Jang G., Lee B.C. (2012). Oxamflatin improves developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.*, 14: 398–406.
- Pfister-Genskow M., Myers C., Childs L.A., Lacson J.C., Patterson T., Betthausen J.M., Goueleke P.J., Koppang R.W., Lange G., Fisher P., Watt S.R., Forsberg E.J., Zheng Y., Leno G.H., Schultz R.M., Liu B., Chetia C., Yang X., Hoeschele I., Eilertsen K.J. (2005). Identification of differentially expressed genes in individual bovine preimplantation embryos produced by nuclear transfer: improper reprogramming of genes required for development. *Biol. Reprod.*, 72: 546–555.
- Prather R.S., Ross J.W., Isom S.C., Green J.A. (2009). Transcriptional, posttranscriptional and epigenetic control of porcine oocyte maturation and embryogenesis. *Soc. Reprod. Fertil., Suppl.*, 66: 165–176.
- Prokopuk L., Stringer J.M., Hogg K., Elgass K.D., Western P.S. (2017). PRC2 is required for extensive reorganization of H3K27me3 during epigenetic reprogramming in mouse fetal germ cells. *Epigenetics Chromatin*, 10: 7.
- Qiu X., You H., Xiao X., Li N., Li Y. (2017). Effects of trichostatin A and PXD101 on the *in vitro* development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.*, 19: 1–9.
- Rajasekhar V.K., Begemann M. (2007). Concise review: roles of Polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem Cells*, 25: 2498–2510.
- Reik W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447: 425–432.
- Reik W., Santos F., Dean W. (2003 a). Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology*, 59: 21–32.
- Reik W., Santos F., Mitsuya K., Morgan H., Dean W. (2003 b). Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment? *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 358: 1403–1409.
- Rodriguez-Ororio N., Urrego R., Cibelli J.B., Eilertsen K., Memili E. (2012). Reprogramming mammalian somatic cells. *Theriogenology*, 78: 1869–1886.
- Rybouchkin A., Kato Y., Tsunoda Y. (2006). Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 74: 1083–1089.
- Saini M., Selokar N.L., Revey T., Singla S.K., Chauhan M.S., Palta P., Madan P. (2014). Trichostatin A alters the expression of cell cycle controlling genes and microRNAs in donor cells and subsequently improves the yield

- and quality of cloned bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 82: 1036–1042.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2012). High developmental capability of porcine cloned embryos following trichostatin A-dependent epigenomic transformation during *in vitro* maturation of oocytes pre-exposed to R-roscovitine. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 30: 383–393.
- 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., Opiela J. (2013 a). Creation of cloned pig embryos using contact-inhibited or serum-starved fibroblast cells analysed *intra vitam* for apoptosis occurrence. *Ann. Anim. Sci.*, 13: 275–293.
- Samiec M., Skrzyszowska M., Bochenek M. (2013 b). *In vitro* development of porcine nuclear-transferred embryos derived from fibroblast cells analysed cytometrically for apoptosis incidence and accuracy of cell cycle synchronization at the G0/G1 stages. *Ann. Anim. Sci.*, 13: 735–752.
- Samiec M., Opiela J., Lipiński D., Romanek J. (2015). Trichostatin A-mediated epigenetic transformation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells biases the *in vitro* developmental capability, quality, and pluripotency extent of porcine cloned embryos. *Biomed. Res. Int.*, 2015: 814686, 13 pages.
- Samiec M., Skrzyszowska M., Wojtylak-Jurkiewicz E., Mielczarek E. (2016). Scriptaid is a novel agent that can be used for the epigenetic transformation of *in vitro* maturing pig oocytes providing the source of recipient cytoplasm for somatic cell nuclear transfer (SCNT). *Reprod. Domest. Anim.*, 51 (Suppl. 2): 136.
- Sangalli J.R., Chiaratti M.R., De Bem T.H., de Araújo R.R., Bressan F.F., Sampaio R.V., Perecin F., Smith L.C., King W.A., Meirelles F.V. (2014). Development to term of cloned cattle derived from donor cells treated with valproic acid. *PLoS One*, 9: e101022.
- Santos F., Dean W. (2004). Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction*, 127: 643–651.
- Sarmiento O.F., Digilio L.C., Wang Y., Perlin J., Herr J.C., Allis C.D., Coonrod S.A. (2004). Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development. *J. Cell Sci.*, 117: 4449–4459.
- Seki Y., Hayashi K., Itoh K., Mizugaki M., Saitou M., Matsui Y. (2005). Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev. Biol.*, 278: 440–458.
- Selokar N.L., Saini M., Agrawal H., Palta P., Chauhan M.S., Manik R., Singla S.K. (2015). Downregulation of DNA methyltransferase 1 in zona-free cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos by small interfering RNA improves *in vitro* development but does not alter DNA methylation level. *Cell. Reprogram.*, 17: 89–94.
- Sepulveda-Rincon L.P., Solanas Edel L., Serrano-Revuelta E., Ruddick L., Maalouf W.E., Beaujean N. (2016). Early epigenetic reprogramming in fertilized, cloned, and parthenogenetic embryos. *Theriogenology*, 86: 91–98.
- Shi L., Wu J. (2009). Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 7: 59.
- Shi W., Zakhartchenko V., Wolf E. (2003 a). Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation*, 71: 91–113.
- Shi W., Hoeflich A., Flaswinkel H., Stojkovic M., Wolf E., Zakhartchenko V. (2003 b). Induction of a senescent-like phenotype does not confer the ability of bovine immortal cells to support the development of nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.*, 69: 301–309.
- Shi W., Dirim F., Wolf E., Zakhartchenko V., Haaf T. (2004). Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in *in vivo* fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. *Biol. Reprod.*, 71: 340–347.
- Simonsson S., Gurdon J. (2004). DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat. Cell Biol.*, 6: 984–990.
- 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.
- Smith L.C., Suzuki J. Jr., Goff A.K., Filion F., Therrien J., Murphy B.D., Kohan-Ghadr H.R., Lefebvre R., Brisville A.C., Buczinski S., Fecteau G., Perecin F., Meirelles F.V. (2012). Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod. Domest. Anim.*, 47 (Suppl. 4): 107–114.
- Song Y., Hai T., Wang Y., Guo R., Li W., Wang L., Zhou Q. (2014). Epigenetic reprogramming, gene expression and *in vitro* development of porcine SCNT embryos are significantly improved by a histone deacetylase

- inhibitor – *m*-carboxycinnamic acid bishydroxamide (CBHA). *Protein Cell*, 5: 382–393.
- Srivastava M., Frolova E., Rottinghaus B., Boe S.P., Grinberg A., Lee E., Love P.E., Pfeifer K. (2003). Imprint control element-mediated secondary methylation imprints at the *Igf2/H19* locus. *J. Biol. Chem.*, 278: 5977–5983.
- Su J., Wang Y., Li Y., Li R., Li Q., Wu Y., Quan F., Liu J., Guo Z., Zhang Y. (2011). Oxamflatin significantly improves nuclear reprogramming, blastocyst quality, and *in vitro* development of bovine SCNT embryos. *PLoS One*, 6: e23805.
- Van Thuan N., Bui H.T., Kim J.H., Hikichi T., Wakayama S., Kishigami S., Mizutani E., Wakayama T. (2009). The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction*, 138: 309–317.
- Wang Y., Su J., Wang L., Xu W., Quan F., Liu J., Zhang Y. (2011 a). The effects of 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on gene expression and DNA methylation status in cloned bovine blastocysts. *Cell. Reprogram.*, 13: 297–306.
- Wang L.J., Zhang H., Wang Y.S., Xu W.B., Xiong X.R., Li Y.Y., Su J.M., Hua S., Zhang Y. (2011 b). Scriptaid improves *in vitro* development and nuclear reprogramming of somatic cell nuclear transfer bovine embryos. *Cell. Reprogram.*, 13: 431–439.
- Wee G., Shim J.J., Koo D.B., Chae J.I., Lee K.K., Han Y.M. (2007). Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction*, 134: 781–787.
- Wen B.Q., Li J., Li J.J., Tian S.J., Sun S.C., Qi X., Cai W.T., Chang Q.L. (2014). The histone deacetylase inhibitor Scriptaid improves *in vitro* developmental competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. *Theriogenology*, 81: 332–339.
- Whitworth K.M., Prather R.S. (2010). Somatic cell nuclear transfer efficiency: How can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? *Mol. Reprod. Dev.*, 77: 1001–1015.
- Wu X., Li Y., Li G.P., Yang D., Yue Y., Wang L., Li K., Xin P., Bou S., Yu H. (2008). Trichostatin A improved epigenetic modifications of transfected cells but did not improve subsequent cloned embryo development. *Anim. Biotechnol.*, 19: 211–224.
- Xie B., Zhang H., Wei R., Li Q., Weng X., Kong Q., Liu Z. (2016). Histone H3 lysine 27 trimethylation acts as an epigenetic barrier in porcine nuclear reprogramming. *Reproduction*, 151: 9–16.
- Xiong X., Lan D., Li J., Zhong J., Zi X., Ma L., Wang Y. (2013). Zebularine and scriptaid significantly improve epigenetic reprogramming of yak fibroblasts and cloning efficiency. *Cell. Reprogram.*, 15: 293–300.
- Xu W., Li Z., Yu B., He X., Shi J., Zhou R., Liu D., Wu Z. (2013). Effects of DNMT1 and HDAC inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during porcine somatic cell nuclear transfer. *PLoS One*, 8: e64705.
- Yamanaka K., Sugimura S., Wakai T., Kawahara M., Sato E. (2009). Acetylation level of histone H3 in early embryonic stages affects subsequent development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *J. Reprod. Dev.*, 55: 638–644.
- Yang X., Smith S.L., Tian X.C., Lewin H.A., Renard J.P., Wakayama T. (2007). Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.*, 39: 295–302.
- Zhang X., Wang D., Han Y., Duan F., Lv Q., Li Z. (2014). Altered imprinted gene expression and methylation patterns in mid-gestation aborted cloned porcine fetuses and placentas. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 31: 1511–1517.
- Zhao J., Hao Y., Ross J.W., Spate L.D., Walters E.M., Samuel M.S., Rieke A., Murphy C.N., Prather R.S. (2010). Histone deacetylase inhibitors improve *in vitro* and *in vivo* developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell. Reprogram.*, 12: 75–83.

Fot. K. Paleczny



EPIGENETIC REPROGRAMMING OF NUCLEAR GENOME IN MAMMALIAN EMBRYOS GENERATED BY SOMATIC CELL CLONING

Summary

At the present stage of investigations, biotechnological possibilities of the strategies applied to cloning of mammals by somatic cell nuclear transfer (SCNT) considerably exceeded the understanding of molecular mechanisms underlying epigenetic remodeling and reprogramming of donor cell genome in SCNT-derived oocytes, resultant embryos and foetuses. Therefore, it is beyond any doubt that, on the one hand, the processes of reprogramming of overall epigenetic and specific parental genomic imprinting memory of somatic cell-inherited nuclear DNA can be found to be one of the most important obstacles to achieving satisfactory efficiency of SCNT technology in different mammalian species. Nonetheless, on the other hand, it is reasonable that preimplantation cloned embryos are one of the most valuable tools for studies focused on the epigenetic remodeling/reprogramming extent of somatic cell nuclei and expression levels of imprinted genes descended from nuclear donor DNA. For this reason, to improve the efficiency of the current SCNT methods, more extensive research should be carried out to comprehensively explain all the molecular mechanisms underlying, and to recognize all the intrinsic biochemical factors determining epigenetic reprogramming that encompasses transcriptional activity and parental imprinting memory of donor cell genome during early embryo- and foetogenesis of mammalian cloned conceptuses.

Key words: mammalian embryos, somatic cell nuclear transfer, epigenetic reprogramming



Fot. K. Paleczny