

Dziedziczenie mitochondrialnego DNA i epigenetyczne przeprogramowanie telomerów chromosomów w klonowaniu somatycznym ssaków*

Marcin Samiec , Maria Skrzyszowska 

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

Spektrum możliwości biotechnologicznych klonowania somatycznego ssaków

Technologia klonowania somatycznego reprezentuje jedną z metod genetycznej/genomowej inżynierii embrionalnej, która w przeciwieństwie do transgenezy zwierząt obejmuje mikromanipulacje dotyczące już nie pojedynczych genów DNA jądrowego, lecz całego genomu jądrowego i/lub mitochondrialnego zarówno interfazowych komórek somatycznych – dawców jąder, jak i żeńskich komórek płciowych (dojrzałych *in vitro* lub *in vivo* oocytów, których cykl mejotyczny został zablokowany w stadium metafazy II), stanowiących źródło biorców dla egzogennej informacji genetycznej. Spośród wszystkich technik klonowania ssaków – klonowanie somatyczne umożliwia uzyskiwanie najbardziej liczebnych klonów, czyli grup identycznych genetycznie osobników. W klonowaniu somatycznym ssaków dostęp do komórek-dawców jąder jest praktycznie nieograniczony. Próbkę tkanek pobierane drogą biopsji od osobników dorosłych lub płodów składają

się z setek tysięcy komórek, które dodatkowo można namnażać w warunkach hodowli *in vitro*. Ponadto, w przypadku klonowania określonych osobników dorosłych biopsję tkanek można przeprowadzać wielokrotnie, uzyskując za każdym razem identyczne klony (Samiec i Skrzyszowska, 2011 a,b; Liu i in., 2012, 2016; Gao i in., 2018).

Klonowanie ssaków metodą transplantacji jąder komórek somatycznych do enukleowanych oocytów (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*), omijając drogę rozrodu płciowego stwarza możliwość uzyskiwania monogenetycznego potomstwa, wywodzącego się nie tylko z wyselekcjonowanych pod względem wybitnych cech wartości hodowlanej (genetycznej) i użytkowej dorosłych zwierząt, lecz również ze zmodyfikowanych genetycznie, tj. transgenicznych osobników. W ciągu ostatnich dwudziestu trzech lat na drodze wewnątrz- lub międzygatunkowego klonowania somatycznego uzyskano dość liczne transgeniczne i nietransgeniczne potomstwo: – nie tylko u różnych gatunków lub międzygatunkowych niepłodnych mieszańców (bastardów) zwierząt udomowionych, takich jak:

- 1) bydło (Forsberg i in., 2002; Green i in., 2007; Hoshino i in., 2009; Liu i in., 2013; Luo i in., 2015);
- 2) kozy (Keefer i in., 2002; Lan i in., 2006; Meng i in., 2013; Zhou i in., 2013; Feng i in., 2015);
- 3) owce (McCreath i in., 2000; Loi i in.,

*Prezentowana praca naukowa 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”.

- 2002; Deng i in., 2013; Zhang i in., 2013);
- 4) świnie (Onishi i in., 2000; Lee i in., 2005 b; Watanabe i in., 2005; Brunetti i in., 2008; Deng i in., 2011; Richter i in., 2012; Kurome i in., 2013; Li i in., 2013; Ju i in., 2015; Lu i in., 2015; Ozawa i in., 2015; Ma i in., 2016; Kwon i in., 2017);
 - 5) koniowate – konie domowe (Galli i in., 2003; Lagutina i in., 2005; Hinrichs i in., 2006, 2007; Olivera i in., 2018) oraz muły (Woods i in., 2003);
 - 6) bawoły domowe (bawoły wodne) – chińskie bawoły błotne (Shi i in., 2007; Lu i in., 2018) oraz indyjskie bawoły rzeczne (Yang i in., 2010);
 - 7) wielbłądy jednogarbne – dromedary/dromadery (Wani i in., 2010; Wani i Hong, 2018);
 - 8) wielbłądy dwugarbne – baktriany (Wani i in., 2017);
 - 9) koty domowe (Shin i in., 2002; Choi i in., 2007; Yin i in., 2005, 2008 a,b);
 - 10) psy domowe (Lee i in., 2005 a; Jang i in., 2007, 2008 a,b; Hong i in., 2009; Hossein i in., 2009);
 - 11) tchórzofretki (Li i in., 2006 b);
 - 12) króliki (Chesné i in., 2002; Skrzyszowska i in., 2006 a; Li i in., 2006 a, 2009; Meng i in., 2009);
 - 13) myszy (Ono i in., 2001; Wakayama i in., 1998, 2008; Mizutani i in., 2015; Tanabe i in., 2017);
 - 14) szczury (Zhou i in., 2003),
– lecz także u kilku gatunków zagrożonych lub niezagrażonych wyginieniem ssaków wolnożyjących, takich jak:
 - 15) gaur (Lanza i in., 2000 a);
 - 16) muflon (Loi i in., 2001);
 - 17) europejski jeleni szlachetny/czerwony (Berg i in., 2007);
 - 18) banteng azjatycki/jawajski (Sansinena i in., 2005);
 - 19) afrykański dziki kot nubijski (Gómez i in., 2004);
 - 20) arabski pustynny kot piaskowy (Gómez i in., 2008);
 - 21) euroazjatycki wilk szary (Kim i in., 2007; Oh i in., 2008);
 - 22) kojot preriowy (Hwang i in., 2013);
 - 23) makak jawajski (makak krabożerny/długogoniasty) – małpa wąskonosna z rodziny koczkodanowatych, czyli makakowatych (Liu i in., 2018),
– a nawet u wymarłego podgatunku koziorożca hiszpańskiego/iberyjskiego:
 - 24) koziorożca pirenejskiego (dzika koza górską – bucardo) (Folch i in., 2009).

Zależność epigenetycznego przeprogramowania jąder komórek somatycznych oraz intergenomowej komunikacji między DNA jądrowym i mitochondrialnym w zarodkach klonalnych od metod rekonstrukcji enukleowanych oocytów

Rekonstrukcja enukleowanego oocytu (cytoplastu/ooplastu) polega na wprowadzeniu w miejsce usuniętego materiału genetycznego genomu jądrowego komórki somatycznej. W klonowaniu ssaków stosowane są różne metody rekonstrukcji oocytów (tab. 1). Do powszechnie wykorzystywanych należy procedura niechirurgicznego transferu jądra komórkowego w oparciu o fuzję cytoplastu z komórką somatyczną, indukowaną impulsem/impulsami elektrycznymi (Niemann i in., 2002; Kurome i in., 2003; Martinez-Diaz i in., 2010; Li i in., 2013; Samiec i in., 2015) (tab. 1). Alternatywną techniką rekonstrukcji jest procedura mikrochirurgiczna obejmująca iniekcję całych komórek somatycznych (Lee i in., 2003 b; Jiang i in., 2004 b) lub karioplastów (Kawano i in., 2004; Watanabe i in., 2005; Hinrichs i in., 2006; Samiec i Skrzyszowska, 2014; Mizutani i in., 2015) bezpośrednio do cytoplazmy wyjądrzonych oocytów (tab. 1). Karioplast stanowi żywą, obłonioną strukturę powstałą wskutek mechanicznie indukowanej lizy całej komórki somatycznej i zawierającą interfazowe jądro komórkowe lub chromosomy metafazowe, które otoczone są cienką warstwą resztkowej cytoplazmy wokółjądrowej (perinuklearnej) określanej mianem perikarionu (Onishi i in., 2000; Samiec, 2005 a;

Samiec i Skrzyszowska, 2005 a; 2014; 2018 a).

Rekonstrukcja ooplastów, niezależnie od zastosowanej metody, prowadzi do połączenia oraz wymieszania (hybrydyzacji) środowisk cytoplazmatycznych ooplastu i komórki somatycznej lub karioplastu. Konsekwencją tego jest utworzenie klonalnej hybrydy jądrowo-cytoplazmatycznej/jądrowo-ooplazmatycznej (tj. cybrydy klonalnej). Ta hybrydowa komórka, powstała w wyniku hybrydyzacji mikrośrodowisk cytoplazmatycznych komórek, pochodzących z dwóch różnych linii rozwojowych: gametogenicznej (germinalnej/płciowej) oraz somatogenicznej (somatycznej) jest określana mianem zrekonstruowanego lub zrekonstruowanego oocyty bądź cybrydowej zygoty klonalnej. Właściwa koordynacja stanu cytofizjologicznego komórek somatycznych lub wyizolowanych z nich karioplastów oraz stanu cytofizjologicznego ooplastów w momencie rekonstrukcji cybryd klonalnych jest skutkiem hybrydyzacji środowisk cytoplazmatycznych komórek-dawców jąder w fazie G0 cyklu mitotycznego oraz enukleowanych oocytów-biorców jąder w stadium metafazy II podziału mejotycznego (MII). Analogicznie do sztucznie zablokowanego w stadium G0 cyklu mitotycznego somatycznych komórek-dawców jąder (charakteryzujących się „uśpioną” aktywnością transkrypcyjną, zahamowanym wzrostem proliferacyjnym i spowolnionym metabolizmem wszystkich organelli) cykl podziałowy (mejotyczny) oocytów-biorców jąder podlega również przejściowemu zahamowaniu w następstwie osiągnięcia dojrzałości jądrowo-ooplazmatycznej w stadium MII, w którym mają miejsce procesy zaawansowanej supresji transkrypcyjnej DNA genomowego (Lacham-Kaplan i in., 2000; Onishi i in., 2000; Galli i in., 2002; Kurome i in., 2003).

Technika rekonstrukcji enukleowanych oocytów może w dużym stopniu wpływać na molekularne mechanizmy rearanżacji chromaty ny jądrowej komórek somatycznych, które obejmują zarówno jej strukturalne przemodelowanie, jak i epigenetyczne przeprogramowanie genomowego DNA (Lee i in., 2003 b; Kawano i in.,

2004; Samiec i Skrzyszowska, 2005 a,b, 2013; Skrzyszowska i in., 2006 b; Martinez-Diaz i in., 2010). Połączenie środowisk cytoplazmatycznych dwóch komórek znajdujących się w różnych stadiach cyklu podziałowego powoduje bowiem zakłócenie mechanizmów kontrolujących przebieg cyklu i możliwość pojawienia się nieprawidłowości w dalszym rozwoju cybrydowej zygoty klonalnej. Jednakże, odpowiedni dobór stanów cytofizjologicznych komórek somatycznych/karioplastów oraz ooplastów w momencie rekonstrukcji cybryd klonalnych prowadzi z jednej strony do ograniczenia niestabilności genomu, czyli do zmniejszenia jego podatności na mutacje. Z drugiej strony przyczynia się do zredukowania stopnia asynchronii w interakcjach jądrowo-cytoplazmatycznych i obniżenia częstotliwości nieprawidłowych epigenomowo-zależnych rearanżacji egzogennej chromaty ny jądrowej (Wilmut i in., 2002; Dean i in., 2003; Kang i in., 2003; Beaujean i in., 2004; Samiec i in., 2013 a,b; Opiela i in., 2017).

W przeciwieństwie do elektrofuzji, mikroiniekcja karioplastu pozwala na selektywne usunięcie dużej części cytoplazmy komórki-dawcy egzogennej jądra, umożliwiając w ten sposób względne rozrzedzenie składników resztek cytoplazmy komórki somatycznej w cytozoluowym mikrośrodowisku ooplastu i wczesnej zygoty. Bezpośrednim tego skutkiem jest uniknięcie niekorzystnego wpływu komponentów cytoplazmatycznych komórki somatycznej na przemodelowanie i przeprogramowanie transferowanego jądra komórki somatycznej, a w konsekwencji na rozwój zrekonstruowanego zarodka. W przypadku transplantacji jąder stosunkowo małych komórek somatycznych (np. komórki wzgórka jajonośnego lub ściennej warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych, głodzone komórki fibroblastyczne) jest preferowana metoda dooplazmatycznej iniekcji karioplastów lub całych komórek-dawców jąder (Wakayama i in., 1998; Cheong i in., 2000; Roh i Hwang i in., 2002; Kurome i in., 2003; Lee i in., 2003 b; Jiang i in., 2004 b; Kawano i in., 2004; Samiec i Skrzyszowska,

2013). Odnotowano bowiem relatywnie wyższy potencjał rozwojowy *in vitro* zarodków świni, zrekonstruowanych techniką mikroiniekcji karioplastów lub całych komórek somatycznych w stosunku do zarodków klonalnych uzyskanych na drodze elektrofuzji (Lee i in., 2003 b; Samiec i Skrzyszowska, 2005 a; Watanabe i in., 2005). Mała średnica wymienionych wyżej typów komórek somatycznych jest przyczyną znacznego ograniczenia powierzchni ich kontaktu z plazmolemmą enukleowanych oocytów (oolemmą), co w konsekwencji prowadzi do obniżenia odsetka zfuzjowanych kompleksów komórek-dawców jąder i ooplastów. Z kolei, bezpośrednia iniekcja karioplastów lub całych komórek somatycznych o małej średnicy do cytoplazmy wyjądrzonych oocytów pozwala na uniknięcie problemów technicznych (wynikających z niezapewnienia ścisłej adhezji błon plazmatycznych), które w największym stopniu ograniczają efektywność elektrofuzji komórek-dawców jąder z cytoplasmami (Roh i Hwang, 2002; Lee i in., 2003 b; Jiang i in., 2004 b; Kawano i in., 2004).

Metoda bezpośredniej mikroiniekcji jąder komórek somatycznych do cytoplazmy enukleowanych oocytów ma jeszcze tę zaletę, że jest najbardziej „czysta” ze wszystkich innych metod transplantacji jąder, gdyż nie wymaga stosowania jakichkolwiek przekazników fizykochemicznych, powodujących często działania niepożądane, które skutkują obniżeniem potencjału rozwojowego *in vitro* klonalnych zarodków ssaków. W przeciwieństwie do techniki elektrofuzji komórek, w której wszystkie komponenty komórki-dawcy (zarówno jądrowe, jak i cytoplazmatyczne – organelle i elementy cytoszkieletu) stają się integralną częścią oocyty, w przypadku mikrochirurgicznego transferu jąder, jak wspomniano wcześniej, plazmolemma i ogromna większość materiału cytoplazmatycznego komórki-dawcy jądra jest przecież odrzucana po lizie komórki. Dlatego też, tylko śladowe ilości tzw. cytoplazmy resztkowej w postaci wąskiego rąbka obłonionej protoplazmy wokół jądra komórkowego są wprowadzane w formie niewielkiego karioplastu do enukleowa-

nego oocyty. Ma to istotne znaczenie w niektórych badaniach dotyczących interakcji jądrowo-cytoplazmatycznych w klonalnych cybrydach ssaków (Roh i Hwang, 2002; Kawano i in., 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2005 a,b; Watanabe i in., 2005; Hinrichs i in., 2006; Wakayama i in., 2008; Mizutani i in., 2015).

Podstawowym paradygmatem leżącym u podstaw klonowania somatycznego ssaków jest teza naukowa, według której jądro komórki-dawcy musi zostać całkowicie przeprogramowane epigenetycznie przez specyficzne czynniki pochodzenia oocytarnego w taki sposób, aby mogło pokierować rozwojem cybrydowej zygoty klonalnej do końca ciąży. Znaczna część białkowych czynników nukleoplazmatycznych (kariolimfatycznych) oraz cytozolowych komórki somatycznej, które są bezpośrednio lub pośrednio zaangażowane w molekularne mechanizmy regulujące zarówno profil epigenetyczny jej DNA genomowego, jak i stopień jej strukturalno-funkcjonalnego zróżnicowania, jest związana z chromatyną jądrową. Natomiast, skład jakościowy i ilościowy oraz wzajemne proporcje tych czynników wewnątrz komórki somatycznej ulegają zmianom wraz z postępującym stanem cytodyferencjacji. Jeśli cała komórka-dawca jądra zostanie zfuzjowana z wyjądrzonym oocytem, wtedy te specyficzne czynniki pochodzenia somatogenicznego są także transferowane do cytoplazmy oocyty-biorcy. W związku z tym mogą one blokować zdolność endogennych czynników oocytarnych do właściwego przemodelowania i przeprogramowania profilu epigenetycznego, znamiennego dla obcopolodnego (allogenicznego) jądra terminalnie zróżnicowanej komórki somatycznej, w kierunku epigenetycznego statusu charakterystycznego dla jądra totipotentnej komórki zarodkowej, jaką stanowi zygota (Cezar i in., 2003; Lee i in., 2003 a,b; 2005 b; Shi i in., 2003; Seki i in., 2005; Jin i in., 2018). Wywodzące się z komórki-dawcy jądra egzogenne czynniki nukleoplazmatyczne i cytoplazmatyczne, które są odpowiedzialne za modulację epigenetycznego statusu DNA genomowego, zostają inkorporo-

wane wspólnie z własnymi białkami oraz transkryptami matczynymi, tj. cząsteczkami mRNA oocyty do przemodelowanego jądra komórki somatycznej (pseudoprzedjadrza) po jego uformowaniu w następstwie sztucznej aktywacji zarodkowego programu rozwojowego zrekonstruowanego oocyty, czyli cybrydowej zygoty klonalnej (Campbell i Alberio, 2003; Bang i in., 2013; Gao i in., 2018). Z kolei, nadmiar tych obcych (somatogenicznych) czynników modulujących profil epigenetyczny genomu jądrowego komórki-dawcy, jaki może zostać odnotowany w cytoplazmie oocyty zrekonstruowanego w wyniku elektrofuzji ooplastu z komórką somatyczną, może spowodować znaczne obniżenie koncentracji i aktywności endogennych czynników epigenetycznych oocyty wskutek wzajemnego ich wymieszania oraz antagonistycznego charakteru oddziaływania w hybrydowym środowisku cytoplazmatycznym zygoty klonalnej. Tym samym, może to skutkować zmniejszeniem prawdopodobieństwa pełnego przeprogramowania epigenetycznie uwarunkowanej aktywności transkrypcyjnej jądra komórki somatycznej w rozwijającym się zarodku klonalnym (Rybouchkin i in., 2006; Samiec i Skrzyszowska, 2013; Nashun i in., 2015; Saini i Selokar, 2018).

Głównym celem procedury dooplazmatycznej mikroiniekcji jąder komórek somatycznych jest uniknięcie wszystkich, uprzednio wspomnianych problemów związanych z procesami o podłożu epigenetycznym i molekularnym. Wprowadzenie praktycznie tylko samego jądra komórki-dawcy do cytoplazmy enukleowanego oocyty wielokrotnie zwiększa prawdopodobieństwo właściwego oddziaływania specyficznych czynników cytozolowych oocyty na procesy epigenetycznego przemodelowania chromatyny jądrowej i przeprogramowania DNA genomowego, ponieważ jedynym źródłem egzogennych białek enzymatycznych i regulatorowych jest w tym przypadku tylko nukleoplazma transplutowanego karioplastu. Znikome ilości perinuklearnej (wokółjądrowej) cytoplazmy, obecnej w karioplaście w postaci tzw. perikarionu, pozostają

stają przypuszczalnie bez większego wpływu na dalszy rozwój cybrydowych zygot klonalnych. Ponadto, zredukowanie objętości obc pochodnej cytoplazmy somatogenicznej, transplutowanej w postaci karioplastu do mikrośrodowiska cytozolowego ooplastu, pozwala albo na całkowite uniknięcie albo na znaczne ograniczenie możliwości hybrydyzacji heteroplazmatycznych źródeł DNA mitochondrialnego (mtDNA) oraz mRNA (w tym także policistronowego mRNA mitochondrialnego), pochodzących z somatycznej komórki-dawcy jądrowego materiału genetycznego oraz z enukleowanego oocyty, tj. cytoplastu-biorcy. Brak zanieczyszczeń w postaci somatogenicznego mtDNA w środowisku cytoplazmatycznym zrekonstruowanego oocyty, czyli brak tzw. heteroplazmii mtDNA prowadzi jednocześnie do obniżenia częstości występowania zaburzeń w epigenetycznym przeprogramowaniu DNA jądrowego i DNA mitochondrialnego (w następstwie hipermetylacji lub nadmiernej demetylacji reszt cytozyny DNA). Wszelkie zakłócenia dynamicznej homeostazy epigenetycznych modyfikacji genomowego DNA komórek somatycznych mogą bowiem wynikać z asynchronicznego przebiegu architektonicznego i epigenetycznego przemodelowania chromatyny jądrowej, tj. z nieskoordynowanej deacetylacji/acetylacji jej białek histonowych oraz z podwyższenia poziomu represji nukleosomowej (Gao i in., 2018; Jin i in., 2018; Saini i Selokar, 2018). Wymienione wyżej zakłócenia mogą być także efektem asynchronicznych zmian w konfiguracji przestrzennej regulatorowej pętli D „nagich”, kolistych cząsteczek mtDNA pochodzenia oocytnego oraz somatogenicznego, a w konsekwencji mogą być one efektem zaburzeń w intergenomowej komunikacji między DNA jądrowym a DNA mitochondrialnym, jakie mają miejsce w zrekonstruowanych oocytach i w rozwijających się z nich zarodkach klonalnych (Campbell i Alberio, 2003; Samiec, 2005 a,b; Srirattana i in., 2011; Narbonne i in., 2012).

Utrzymanie prawidłowego schematu metylacji DNA genomowego oraz acetylacji białek histonowych rdzenia nukleosomowego chromatyny

jądrowej we wszystkich potomnych blastomerach przedimplantacyjnych zarodków klonalnych, rozwijających się z oocytów zrekonstruowanych wskutek docytoplazmatycznej mikroiniekcji karioplastów, sprzyja również zachowaniu w nienaruszonej postaci mechanizmów odpowiedzialnych za imprinting genomu rodzicielskiego (ekspresję uniparentalną/monoalleliczną). To z kolei rzutuje na bezbłędną rearanżację egzogennej chromatyny oraz przeprogramowanie jądrowego i mitochondrialnego aparatu genetycznego, a nawet – w skrajnych przypadkach częściowego przemodelowania struktur chromatynowych – umożliwia uniknięcie zahamowania aktywności transkrypcyjnej przeważającej części genomu zarodkowego we wczesnych etapach embriogenezy (Mann i in., 2003, 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2005 b; Seki i in., 2005; Jin i in., 2018).

Innym podejściem do tego zagadnienia mogłaby być mikroiniekcja tylko samych chromosomów metafazowych komórki-dawcy zamiast całej komórki somatycznej lub całego jądra komórki somatycznej (z nienaruszoną integralnością otoczki jądrowej) do enukleowanego oocytu MII. Wydaje się, że taka strategia powinna zapobiec transferowi przeważającej większości specyficznych czynników komórki-dawcy (cytozolowych i nukleoplazmatycznych), co może mieć wpływ na przemodelowanie i przeprogramowanie jądra. W przeciwieństwie bowiem do mikroiniekcji kompletnych jąder interfazowych komórek-dawców, w wyniku mikrochirurgicznego transferu samych płytek metafazowych powstałe w aktywowanych oocytach w procesie przemodelowania rzekome przedjądrza zakumulowałyby w macierzy (matriks) jądrowej tylko endogenne białka ooplazmatyczne w formie związanej z chromatyną. Epigenetyczne przeprogramowanie somatogenicznego genomu komórki-dawcy wskutek

pełnej synchronizacji faz cyklu mitotycznego karioplastów oraz cyklu mejotycznego ooplastów znajdujących się w stadiach metafazy przebiegałoby bez żadnych zaburzeń. Technika bezpośredniej mikroiniekcji chromosomów metafazowych ostatecznie pozwoliłaby zatem na całkowite wyeliminowanie negatywnych skutków oddziaływania na wprowadzony materiał genetyczny nadmiaru egzogennej (heteroplazmatycznych) czynników białkowych, zakłócających wymianę oraz współdziałanie między epigenetycznymi czynnikami jądrowymi i cytozolowymi czynnikami pochodzenia oocytnego (Ono i in., 2001; Lai i in., 2001, 2002; Samiec i Skrzyszowska, 2005 a,b, 2013).

Kolejną zaletą metody mikroiniekcji jest zapobieganie naruszeniu specyficznej dynamicznej równowagi całej kaskady procesów katalizowanych przez różne enzymy regulujące przejście z mejotycznej do mitotycznej kontroli cyklu komórkowego zrekonstruowanych oocytów, a także umożliwienie prawidłowego funkcjonowania rozmaitych białek regulatorowych (z grupy stymulatorów i inhibitorów) w dzielących się zarodkach klonalnych.

Transplantacja jąder interfazowych lub płytek metafazowych metodą chirurgiczną ma jeszcze jedną zasadniczą przewagę nad techniką elektrofuzji komórek. Pozwala ona także uniknąć szkodliwego wpływu nie tylko nadmiaru czynników białkowych, często o antagonistycznym działaniu, lecz także niedoboru czynników białkowych reagujących synergistycznie – w następstwie połączenia i wymieszania (hybrydyzacji) dwóch różnych środowisk cytoplazmatycznych komórki-dawcy jądra oraz ooplastu i w konsekwencji powstania cybrydowej zygoty klonalnej (Samiec, 2005 a; Samiec i Skrzyszowska, 2005 a,b; Seki i in., 2005).

Tabela 1. Syntetyczna charakterystyka porównawcza metod rekonstrukcji enukleowanych oocytów ssaków na poziomie biotechnicznym i cytologicznym, molekularnym oraz epigenetycznym
Table 1. A concise comparative characterization of the methods used for reconstruction of enucleated mammalian oocytes at the biotechnical, cytological, molecular and epigenetic levels

<p>Metoda rekonstrukcji enukleowanych oocytów w stadium MII <i>Method for reconstruction of enucleated MII-stage oocytes</i></p>	<p>Charakterystyka na poziomie biotechnicznym i cytologicznym <i>Characterization at the biotechnical and cytological levels</i></p>	<p>Charakterystyka na poziomie molekularnym <i>Characterization at the molecular level</i></p>	<p>Charakterystyka na poziomie epigenetycznym <i>Characterization at the epigenetic level</i></p>
<p>Elektrofuzja kompleksów ooplast-komórka somatyczna <i>Electrofusion of ooplast-somatic cell couples</i></p>	<p>Stosunkowo niski stopień inwazyjności metody: - ingerencja generowanego pola elektrostatycznego w ultrastrukturę i funkcje oolemy komórek-biorców jąder oraz plazmolemy komórek-dawców jąder poprzez: • przejściowe formowanie w ich dwuwarstwie fosfolipidowej mikroporów (mikrokanalów) ułatwiających fuzję ooplastów i komórek somatycznych oraz będących drogą biernego transportu dokomórkowego jonów wapnia w przypadku jednoczesnej fuzji i aktywacji elektrycznej (F/A) rekonstruowanych oocytów <i>Relatively low invasiveness of the method:</i> - the generated electrostatic field interferes with ultrastructure and functions of the oolemma of nuclear recipient cells and the plasmalemma of nuclear donor cells through: • transient formation in the plasma membrane phospholipid bilayer of micropores (microchannels) that facilitate fusion of ooplast-somatic cell complexes and are the pathway for passive intracellular transport of calcium ions under the conditions of simultaneous fusion and electrical activation (F/A) of reconstituted oocytes</p>	<p>Relatywnie wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia w uzyskanych cybrydach klonalnych: - zjawiska komórkowej heteroplazmii mtDNA - zaburzeń w interakcjach jądro-cytoplazmatycznych - zaburzeń w intergenomowej komunikacji między allogenicznym DNA jądrowym i cząsteczkami mtDNA komórek somatycznych a cząsteczkami mtDNA pochodzenia ooplazmatycznego <i>Relatively high probability of the occurrence in the obtained clonal cybrids of:</i> - cellular mtDNA heteroplasmy - abnormal nuclear-cytoplasmic interactions - abnormal intergenomic communication between allogenic nuclear DNA, somatic cell-inherited mtDNA molecules and mtDNA molecules of ooplasmic origin</p>	<p>Stosunkowo wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia zaburzeń w: - strukturalnym i epigenetycznym przemodelowaniu chromatyny jądrowej - epigenetycznym przeprogramowaniu aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego, w tym rearanżacji telomerów chromosomów komórek somatycznych w zrekonstruowanych oocytach oraz w rozwijających się w wyniku ich aktywacji zarodkach klonalnych <i>Relatively high probability of the occurrence of abnormalities in:</i> - structural and epigenetic remodeling of nuclear chromatin - epigenetic reprogramming of transcriptional activity of the nuclear genome, including rearrangement of telomeres of somatic cell chromosomes and in the reconstructed oocytes and in cloned embryos that develop as a result of their activation</p>

<p>Doooplazmatyczna mikroiniekcja <i>Intraooplasmic microinjection of whole somatic cells</i></p>	<p>Wysoki stopień inwazyjności metody: - ingerencja w ultrastrukturę plazmolemmy, membrano- i cytoskieletu enukleowanych oocytów poprzez: • bezpośredni transfer mikrochirurgiczny i zdeponowanie w ich ooplazmie komórek somatycznych o małej średnicy i nienaruszonej integralności błony plazmatycznej <i>High invasiveness of the method:</i> - <i>interferes with the ultrastructure of the plasmalemma, membrane- and cytoskeleton of enucleated oocytes through:</i> • <i>direct microsurgical transfer and deposition in their ooplasm of tiny (small-diameter) somatic cells displaying intact integrity of the plasma membrane</i></p>	<p>Relatywnie wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia w uzyskanych cybrzydach klonalnych: - zjawiska komórkowej heteroplazmii mtDNA - zaburzeń w interakcjach jądrowo-cytoplazmatycznych - zaburzeń w intergenomowej komunikacji między allogenicznym DNA jądrowym i cząsteczkami mtDNA komórek somatycznych a cząsteczkami mtDNA pochodzenia ooplazmatycznego <i>Relatively high probability of the occurrence in the obtained clonal cybrids of:</i> - <i>cellular mtDNA heteroplasmy</i> - <i>abnormal nuclear-cytoplasmic interactions</i> - <i>abnormal intergenomic communication between allogenic nuclear DNA, somatic cell-inherited mtDNA molecules and mtDNA molecules of ooplasmic origin</i></p>	<p>Stosunkowo wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia zaburzeń w: - strukturalnym i epigenetycznym przemodelowaniu chromatyny jądrowej - epigenetycznym przeprogramowaniu aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego, w tym rearanżacji telomerów chromosomów komórek somatycznych w zrekonstruowanych oocytach oraz w rozwijających się klonalnych <i>Relatively high probability of the occurrence of abnormalities in:</i> - <i>structural and epigenetic remodeling of nuclear chromatin</i> - <i>epigenetic reprogramming of transcriptional activity of the nuclear genome, including rearrangement of telomeres of somatic cell chromosomes in the reconstructed oocytes and in cloned embryos that develop as a result of their activation</i></p>
--	--	--	--

<p>Doooplazmatyczna mikroiniekcja karyoplastów <i>Intraooplasmic microinjection of karyoplasts</i></p>	<p>Najwyższy stopień inwazyjności metody: - ingerencja w ultrastrukturę plazmolemmy, membrano- i cytoszkieletu komórek-dawców jąder poprzez: • wywołanie mechanicznie indukowanej cytolizy w celu wyizolowania z nich karyoplastów - ingerencja w ultrastrukturę plazmolemmy, membrano- i cytoszkieletu enukleowanych oocytów poprzez: • bezpośredni transfer mikrochirurgiczny i zdeponowanie w ich ooplazmie karyoplastów <i>The highest invasiveness of the method:</i> - <i>interferes with the ultrastructure of the plasmalemma, membrane- and cytoskeleton of nuclear donor cells through:</i> • <i>their mechanically induced cytolysis to isolate karyoplasts</i> - <i>interferes with the ultrastructure of the plasmalemma, membrane- and cytoskeleton of enucleated oocytes through:</i> • <i>direct microsurgical transfer and deposition in their ooplasm of karyoplasts</i></p>	<p>Relatywnie niskie prawdopodobieństwo wystąpienia w uzyskanych cybrydach klonalnych: - Zjawiska komórkowej heteroplazmii mtDNA - zaburzeń w interakcjach jądrowo-cytoplazmatycznych - zaburzeń w intergenomowej komunikacji między allogenicznym DNA jądrowym i cząsteczkami mtDNA komórek somatycznych a cząsteczkami mtDNA pochodzenia ooplazmatycznego <i>Relatively low probability of the occurrence in the obtained clonal cybrids of:</i> - <i>cellular mtDNA heteroplasmies</i> - <i>abnormal nuclear-cytoplasmic interactions</i> - <i>abnormal intergenomic communication between allogeneic nuclear DNA, somatic cell-inherited mtDNA molecules and mtDNA molecules of ooplasmic origin</i></p>	<p>Stosunkowo niskie prawdopodobieństwo wystąpienia zaburzeń w: - strukturalnym i epigenetycznym przeodelowaniu chromatyny jądrowej - epigenetycznym przeprogramowaniu aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego, w tym rearanzacji telomerów chromosomów komórek somatycznych w zrekonstruowanych oocytach oraz w rozwijających się w wyniku ich aktywacji zarodkach klonalnych <i>Relatively low probability of the occurrence of abnormalities in:</i> - <i>structural and epigenetic remodeling of nuclear chromatin</i> - <i>epigenetic reprogramming of transcriptional activity of the nuclear genome, including rearrangement of telomeres in somatic cell chromosomes in the reconstructed oocytes and in cloned embryos that develop as a result of their activation</i></p>
--	---	---	--

Dziedziczenie genomu mitochondrialnego oraz intergenomowa komunikacja między DNA mitochondrialnym a DNA jądrowym w rozwoju zarodków klonalnych

Wzrost kompetencji cytoplazmy oocytów do strukturalnego przemodelowania oraz epigenetycznego przeprogramowania jądrowego i mitochondrialnego genomu komórek somatycznych w przed- i poimplantacyjnych zarodkach klonalnych jest niezwykle istotny, biorąc pod uwagę cytofizjologiczne i biofizyczne ograniczenia możliwości adaptacyjnych cybrydowych zygot klonalnych powstałych w wyniku hybrydyzacji mikrośrodków cytoplazmatycznych komórek, pochodzących z dwóch różnych linii rozwojowych: gametogenicznej oraz somatogenicznej (Lorthongpanich i in., 2010; Esteves i in., 2011; Kungulovski i Jeltsch, 2016). Epigenetyczne przemodelowanie/przeprogramowanie somatogenicznego aparatu jądrowego jest zatem rezultatem wzajemnego oddziaływania czynników zakumulowanych w nukleoplazmie i przyłączonych do chromatyny, skonfigurowanej w płytkę metafazową w następstwie odpowiedniej rearanżacji struktury przestrzennej i represji nukleosomowej, z czynnikami białkowymi cytoplazmy enukleowanego oocyty/ooplastu MII (Eilertsen i in., 2007; Whitworth i Prather, 2010; Mason i in., 2012; Gao i in., 2018). Wynika z tego, że te kluczowe dla klonowania somatycznego procesy nie są bezpośrednim efektem podporządkowania się allogenicznego materiału genetycznego warunkom cytofizjologicznym ooplastu MII. Dlatego też, jądra komórek somatycznych mają tendencję do minimalizowania stopnia manifestacji własnego programu rozwojowego po wprowadzeniu do obcej cytoplazmy. Niski udział realizacji somatogenicznego programu genetycznego w rozwoju przedimplantacyjnym zarodków klonalnych w dużym stopniu jest przejawem zachowania przez egzogeny aparat jądrowy kompetencji do łatwego dostosowania się do programu mejotycznej, a następnie mitotycznej kontroli punktów restrykcyjnych cyklu komórkowego, narzuconego mu przez środowisko cytozolowe zrekonstruowa-

nych zygot (Armstrong i in., 2006; Corry i in., 2009; Prather i in., 2009). Najprawdopodobniej jednak, zdolności transplantowanych jąder do pełnego pokierowania przed- i poimplantacyjnym rozwojem zarodków, a następnie płodów klonalnych są wypadkową prawidłowego przebiegu scenariusza molekularnych mechanizmów, towarzyszących zarówno przemodelowaniu konfiguracji przestrzennej chromatyny jądrowej, jak i transkrypcyjnemu przeprogramowaniu genomu komórek somatycznych (Reik, 2007; Yang i in., 2007; Buganim i in., 2013; Saini i Selokar, 2018). Dopiero właściwa rearanżacja egzogenego aparatu genetycznego indukuje uruchomienie programu aktywnego oddziaływania genomowego DNA komórki-dawcy na cytoplazmę oraz cząsteczki DNA mitochondrialnego pochodzenia, zarówno oocytarnego (matczyngo), jak i heteroplazmatycznego (somatogenicznego) w poszczególnych komórkach potomnych (blastomerach) zarodków klonalnych, stanowiących z cytologicznego punktu widzenia hybrydy jądrowo-cytoplazmatyczne, tj. cybrydy (Narbonne i in., 2012; Rodriguez-Osorio i in., 2012).

Mitochondria są półautonomicznymi organellami, posiadającymi własny materiał genetyczny w formie dwuniciowych (heliksowo zwiniętych) kolistych cząsteczek DNA (mtDNA) o długości około 16 300 do 16 500 par zasad (pz). W mitochondrialnym DNA zakodowana jest informacja o strukturze 13 białek, 22 cząsteczek tRNA oraz 2 cząsteczek rRNA. W biogenezę i funkcje cytofizjologiczne mitochondriów jest zaangażowanych aż 95% białek, będących produktami cytoplazmatycznego systemu translacji kodowanego przez DNA jądrowy (Bowles i in., 2007; Lagutina i in., 2010). Łączna pula kopii genomu mitochondrialnego w typowej komórce somatycznej ssaka wynosi w przybliżeniu $2-5 \times 10^3$, podczas gdy liczba cząsteczek mtDNA w dojrzałym oocycie (w stadium metafazy II podziału mejotycznego) sięga poziomu $1,6 \times 10^5$ u myszy, $2,5 \times 10^5$ u bydła, $3-5 \times 10^5$ u świni oraz $3-8 \times 10^5$ u człowieka. Średnia liczba mitochondriów w komórce somatycznej

oscyluje w granicach 1×10^3 , a jedno organellum jest rezerwuarem od 1 do 10 cząsteczek mtDNA. Z kolei, pojedyncze mitochondrium w dojrzałym mejotycznie oocycie zawiera od 1 do 2 kopii genomu mitochondrialnego, co potwierdza, że liczebność wewnątrzocytarnej populacji tych organelli jest z reguły równoważna z całkowitą pulą cząsteczek mtDNA niezapłodnionej komórki jajowej ssaka (Samiec, 2005 a; Hiendleder, 2007; Takeda, 2013).

W procedurze klonowania somatycznego mitochondria komórek-dawców jąder są transplantowane wraz z jądrowym aparatem genetycznym do cytoplazmy enukleowanych oocytów-biorców (rekonstrukcja ooplastów; tab. 1). Rekonstrukcja enukleowanych oocytów, zarówno na drodze fuzji kompleksów ooplast-komórka somatyczna, indukowanej w polu elektrostatycznym, jak i na drodze doooplazmatycznej iniekcji całych komórek somatycznych lub wyizolowanych z nich karioplastów (tab. 1) prowadzi do połączenia oraz wymieszania (hybrydyzacji) środowisk cytoplazmatycznych ooplastu i komórki somatycznej lub karioplastu. Z uwagi na fakt, że karioplast jest żywą, obłonioną strukturą uzyskaną na skutek mechanicznie indukowanej lizy całej komórki somatycznej oraz zawiera interfazowe jądro komórkowe lub chromosomy metafazowe otoczone cienką warstwą resztkowej cytoplazmy wokółjądrowej (tzw. perikarionem), po wprowadzeniu do ooplastu ów perikarion może być również źródłem mitochondriów (genomu mitochondrialnego) pochodzenia heteroplazmatycznego. Dlatego też, zrekonstruowany zarodek klonalny, będący z cytologicznego punktu widzenia hybrydą cytoplazmatyczną (cybrydą), jest nośnikiem genomu mitochondrialnego pochodzenia zarówno oocytarnego, jak i egzogenego (wprowadzonego z komórką-dawcą jądra) (Samiec i Skrzyszowska, 2005 a,b; Burgstaller i in., 2007; Hua i in., 2012). W przypadku sklonowanych zwierząt mitochondria są dziedziczone pierwotnie wraz z materiałem ooplazmatycznym. Z kolei, mitochondria pochodzące z komórek-dawców jąder ulegają prawdopodobnie podczas

kilku pierwszych podziałów mitotycznych brudkowania gwałtownej eliminacji z cytoplazmy komórek zarodkowych w stadium anafazy, która jest zależna w dużym stopniu od poliubikwitynizacji odpowiednich substratów białkowych. Dlatego też, obecność somatogenicznego genomu mitochondrialnego w komórkach blastocyst klonalnych jest trudna do wykrycia technikami inżynierii genetycznej (Samiec, 2005 b; Hiendleder, 2007). Molekularny mechanizm jednorodzieńskiego (uniparentalnego) dziedziczenia pozajądrowej informacji genetycznej w dzielących się cybrydowych zygotach klonalnych jest zatem regulowany za pośrednictwem biodegradacji wyznakowanych uprzednio przez ubikwitynę białek mitochondrialnych (w tym rybonukleoprotein) oraz nukleolizy pozbawionych histonów i białek niehistonowych cząsteczek mtDNA. Proces proteolitycznego rozpadu mitochondriów pochodzenia heteroplazmatycznego (allogenicznego) jest katalizowany przez złożony system proteasomalny hybrydowych blastomerów o stałej sedimentacji rzędu 26 jednostek Svedberga (tj. proteasom 26S). Mechanizm nukleolitycznej biodestrukcji wszystkich kopii genomu mitochondrialnego komórki somatycznej jest natomiast uwarunkowany prawidłowym stanem czynnościowym wewnątrzkomórkowego cyklu lizosomalnego, sprzężonego z reakcją egzocytozy pęcherzyków endosomalnych. Efektem końcowym tej reakcji jest usunięcie z komórek zarodkowych allogenicznych (obcopolodnych) frakcji mtDNA, uprzednio poddanego internukleosomowej fragmentacji na krótkie odcinki oligonukleotydowe. Zachodzący w przedimplantacyjnej fazie rozwoju proces selektywnej segregacji genomu mitochondrialnego komórek-dawców jąder, który jest pośrednio indukowany przez – ulegający heterodimeryzacji z kinazą cyklinozależną cdc20 oraz będący integralną częścią wielopodjednostkowego układu enzymatycznego ligazy ubikwitynowej – kompleks inicjujący anafazę/cyklosom (APC/C; ang. *anaphase-promoting complex/cyclosome*), prowadzi stopniowo do powstania komórkowej homoplazmii mtDNA w zrekonstytu-

tuowanych zarodkach. Jedynie w sporadycznych przypadkach trwała hybrydyzacja obc pochodnych kopii mtDNA, czyli tzw. komórkowa heteroplazmia mtDNA, która wynikała z synergizmu/komplementarności w intergenomowej komunikacji między cząsteczkami mtDNA, odziedziczonymi zarówno z cytoplazmą komórek-dawców jąder, jak i z ooplazmą komórek-biorców jąder, była możliwa do zidentyfikowania w pre- i postnatalnym okresie rozwoju osobników klonalnych (Bowles i in., 2007; Yan i in., 2010, 2011).

Istnieje kilka gatunkowo-specyficznych czynników epigenetycznych obecnych w cytoplazmie oocyty, które mogą prowadzić do niekompatybilnego wzorca interakcji jądro-cytoplazmatycznych, albo bezpośrednio po transplantacji jądra komórki-dawcy, albo w późniejszych stadiach rozwoju zarodków klonalnych (Hiendleder i in., 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2014). Z kolei, ten potencjalny brak koordynacji we wzajemnych oddziaływaniach czynników jądrowych i cytozolowych hybrydowych zygot klonalnych jest prawdopodobnie jednym z powodów ograniczonego potencjału praktycznych możliwości aplikacyjnych technologii klonowania somatycznego. Wykazano, że cząsteczki mtDNA pochodzenia matczyne, zakumulowane w mitochondrialnych rezerwuarach cytozolu oocyty-biorcy jądra, odgrywają istotną rolę w asynchronicznym charakterze interakcji jądro-cytoplazmatycznych. Asynchronia ta obejmuje zarówno niekompatybilne zmiany epigenetycznych modyfikacji somatogenicznego genomu jądrowego komórki-dawcy, kierującego programem rozwojowym zrekonstruowanej cybrydy klonalnej, jak i brak synergistycznego przebiegu molekularnych mechanizmów regulatorowych, zaangażowanych w punkty restrykcyjne kariokinezy i cytokinezy. Te punkty kontrolne anafazowej segregacji chromosomów pochodzenia somatogenicznego oraz asymetrycznego podziału telofazowego komórkowej hybrydy jądro-ooplazmatycznej (cybrydy klonalnej), który jest związany z procesem wyrzucenia do przestrzeni okołozóltkowej tzw. rzekomego ciała kierunkowego (pseudopolocy-

tu), są łącznie odpowiedzialne za skoordynowane przejście z pseudomejotycznej do mitotycznej kontroli cyklu podziałowego po sztucznej aktywacji oocyty zrekonstruowanego z jądra komórki somatycznej (Lagutina i in., 2010; Srirattana i in., 2011).

Udowodniono ponadto, że obecność mitochondrialnego aparatu genetycznego pochodzenia oocyty wpływa także na proces implantacji zarodków klonalnych w *endometrium* macicy samic-biorczyń. Z tego też względu w przypadku występowania zjawiska mitochondrialnej heteroplazmii komórkowej w zrekonstruowanych hybrydach jądro-cytoplazmatycznych nie można wykluczyć niekorzystnego efektu oddziaływania heterogenicznych źródeł cząsteczek mtDNA na przedimplantacyjny rozwój zarodków klonalnych (Hiendleder i in., 2004; Burgstaller i in., 2007; Hua i in., 2012). Dlatego też, uzyskiwanie zarodków, płodów i potomstwa klonalnego z dokładnie określonym profilem poszczególnych sekwencji nukleotydowych w odcinkach regulatorowych lub kodujących genomu jądrowego i/lub mitochondrialnego może mieć niezwykle istotne znaczenie w eksperymentach nad rozdziałem efektów oddziaływania genetycznych i/lub epigenetycznych komponentów jądrowych i cytoplazmatycznych, jak również wewnątrzmacicznego środowiska samic-biorczyń na rozwój zarodkowy, płodowy oraz postnatalny osobników klonalnych (Bowles i in., 2007; Hiendleder, 2007; Liu i in., 2012).

W hybrydowym środowisku cytoplazmatycznym zygot klonalnych stwierdza się zatem współistnienie genetycznie odmiennych frakcji mitochondrialnego DNA pochodzenia matczyne (oocyty) oraz somatogenicznego, czyli wywodzącego się z cytoplazmy allogenicznych komórek somatycznych. Ten pozajądrowy (mitochondrialny) aparat genetyczny klonalnych hybryd jądro-ooplazmatycznych zawiera wprawdzie niewielką (ok. 0,01%) część informacji dziedzicznej komórki, lecz ta mtDNA-zależna informacja genetyczna różni się całkowicie od informacji zakodowanej w sekwencji nukleotydów DNA jądrowego, stanowiącego aż 99,99%

genomu komórki. W tym aspekcie transplantacja jąder obcopolodnych komórek somatycznych do enukleowanych oocytów-biorców (w sytuacji, gdy komórki-dawcy jąder i oocyty wywodzą się od różnych genetycznie osobników tego samego gatunku zwierząt) prowadzi do powstania hybrid jądrowo-cytoplazmatycznych, które posiadają heterogeniczne kopie mtDNA. Z uwagi na fakt, że z takich heteroplazmatycznych cybryd klonalnych rozwijają się zarodki charakteryzujące się komórkową heteroplazmią mtDNA, może to prowadzić do pozornej identyczności/zgodności genotypowej i fenotypowej uzyskiwanego w wyniku klonowania potomstwa (tylko w stosunku do cech uwarunkowanych dziedziczeniem zależnym od genomu jądrowego). Takie potomstwo klonalne cechuje bowiem pewien stopień zmienności/niezgodności w odniesieniu do cech fenotypowych, uwarunkowanych dziedziczeniem cytoplazmatycznym (pozajądrowym), które jest zależne od genotypu mitochondrialnego, określanego mianem mitotypu (Burgstaller i in., 2007; Yan i in., 2011; Takeda, 2013; Samiec i Skrzyszowska, 2014).

„Idealny” klon można uzyskać tylko w sytuacji, gdy jądra autogenicznych (własnopochodnych) komórek somatycznych zostaną wprowadzone do enukleowanych oocytów-biorców, a zatem wówczas, gdy komórki-dawcy jąder i oocyty wywodzą się od identycznych genetycznie osobników danego gatunku ssaków, czyli od osobników jednopłciowych (żeńskich). Należy podkreślić, że jedynie ze zrekonstruowanych w ten sposób oocytów, które posiadają homogeniczne frakcje cząsteczek mtDNA, można otrzymać całkowicie homoplazmatyczne cybrydowe zygoty klonalne. W wyniku sztucznej aktywacji takich hybrid jądrowo-cytoplazmatycznych rozwijają się z nich zarodki klonalne, charakteryzujące się komórkową homoplazmią mtDNA. Skutkuje to oczywiście pełną identycznością/zgodnością genotypową i fenotypową uzyskiwanych w wyniku klonowania somatycznego płodów i urodzonego potomstwa. W związku z tym jedynie w przypadku samic klonalnych mitotyp wykazuje homogeny wzorzec sekwencji kodujących i regulato-

rowych we wszystkich kopiach mtDNA komórek linii somatogenicznej i płciowej, przy założeniu, że podczas rozwoju osobniczego genom mitochondrialny nie będzie podlegał spontanicznym lub indukowanym przy udziale reaktywnych form tlenu mutacjom punktowym (Samiec, 2005 a,b; Galli i in., 2003; Yan i in., 2010; Liu i in., 2012).

Wśród powodów dywersyfikacji (zróżnicowania) genetycznego między osobnikami klonalnymi (klonami somatycznymi) a osobnikami klonowanymi (dawcami komórek somatycznych do zabiegu klonowania) należy zatem zdecydowanie wymienić wpływ dziedziczenia mitochondrialnego (pozajądrowego/pozachromosomowego) oraz wpływ środowiska wewnątrzmacicznego samic-biorczyń zarodków klonalnych. Pozajądrowe dziedziczenie materiału genetycznego wynika z mikrochirurgicznego, losowego wprowadzenia kopii obcego mtDNA wraz z cytoplazmą komórki-dawcy jądra do środowiska cytoplazmatycznego oocytu-biorcy. Wymieszanie cząsteczek genomu mitochondrialnego pochodzenia matczynego (oocytarnego) oraz pochodzenia somatogenicznego, tj. zjawisko heteroplazmii mtDNA, prowadzi bowiem do międzyosobniczego zróżnicowania w obrębie mitotypu, czego efektem jest wewnątrzpopulacyjna i międzypopulacyjna zmienność genotypowa i fenotypowa, zależna od genomu mitochondrialnego (Bowles i in., 2007; Lagutina i in., 2010; Srirattana i in., 2011; Hua i in., 2012). Do różnic fenotypowych między osobnikami klonalnymi a osobnikami klonowanymi przyczyniają się także odmienne uwarunkowania morfologiczne, anatomotopograficzne, histologiczne, fizjologiczne, endokrynologiczne, embriotroficzne i immunologiczne związane z układem rozrodczym matek zastępczych. Ponadto, obserwuje się często przełożyskowy (transplacentarny) przeciek mitochondriów leukocytarnych i erytroblastycznych z krwiobiegu matek zastępczych do krwiobiegu płodów klonalnych. Ten rodzaj chimeryzmu leukocytarno-erytroblastycznego, wynikający ze zjawiska heteroplazmii mtDNA w komórkach krwi obwodowej oraz z mozaicyzmu genetycznego w obrębie

subpopulacji jądrzastych komórek szeregu hematopoetycznego (krwiotwórczego), może mieć również pewien wpływ na różnice w mitotypie potomstwa klonalnego (Hiendleder i in., 2004; Burgstaller i in., 2007).

Epigenetyczne przeprogramowanie telomerów w chromosomach odziedziczonych z jąder komórek somatycznych w rozwoju zarodków, płodów i potomstwa klonalnego

Jednym z warunków *sine qua non* przeprogramowania epigenetycznej pamięci komórkowej somatogenicznego genomu jądrowego (nDNA; ang. *nuclear DNA*) w rozwoju ontogenetycznym (osobniczym) ssaków uzyskiwanych na drodze klonowania somatycznego (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*) jest strukturalno-funkcjonalna rearanżacja chromatyny jądrowej, która jest związana z konformacyjnymi zmianami długości terminalnych odcinków chromosomów, czyli telomerów (Shiels i in., 1999; Tian i in., 2000; 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 aktywnością enzymu telomerazy (Xu i Yang, 2001; Cui i in., 2003; Jiang i in., 2004 a; Liu i in., 2016). Niewyjaśnionym dotychczas problemem pozostaje „epigenetyczny wiek” sklonowanych zwierząt, który jest skorelowany, jak się wydaje, z długością terminalnych odcinków DNA określanych mianem telomerów (Miyashita i in., 2002; Kishigami i in., 2008; Le i in., 2014). Telomery stanowią struktury deoksyrybonukleoproteinowe, których zadaniem jest niezbędna do zajścia nie tylko wolnej od mutacji replikacyjnej rundy DNA genomowego, lecz także kariokinetycznego rozdziału/segregacji chromosomów, stabilizacja struktury oraz konformacji chromatyny jądrowej w okresie podziałowym cyklu mitotycznego komórki (Bekaert i in., 2004; Schaetzlein i Rudolph, 2005; Kong i in., 2014). Replikacja linearnego DNA eukariotycznej chromatyny jądrowej napotyka na problem polegający na tym, że koniec 5' nici opóźnionej nie może ulec replikacji z powo-

du braku miejsca dla startera RNA inicjującego replikację. Odcinek starterowy RNA syntetyzowany jest na matrycy opóźnionej nici DNA przez tzw. prymazę, czyli polimerazę RNA, której rolę pełni polimeraza DNA α . Powoduje to niebezpieczeństwo, że chromosomy komórek somatycznych będą ulegały skróceniu z każdą rundą replikacyjną, a tym samym będą traciły informację genetyczną. W komórkach somatycznych ssaków klasyczna izoforma α polimerazy DNA nie posiada zdolności do replikacji semikonserwatywnej (półzachowawczej) końca 5' syntetyzowanego we fragmentach łańcucha DNA opóźnionego replikacyjnie w stosunku do końca 3' kopiowanej w sposób ciągły nici wiodącej (Betts i in., 2006; Gomes i in., 2011). W konsekwencji, w każdym cyklu podziałowym komórki nieodtworzone telomerowe sekwencje DNA ulegają sukcesywnej utracie. Z tego też względu, długość telomerów stanowi rodzaj swoistego „fizjologicznego zegara mitotycznego” komórki. Skracanie regionów telomerowych chromosomów jest skorelowane pozytywnie z liczbą podziałów komórkowych, a gdy długość telomerów osiąga krytyczny punkt restrykcyjny/kontrolny w aktywnej kariokinetycznie komórce somatycznej, sygnalizuje to zaprogramowany epigenetycznie w strukturze/konfiguracji przestrzennej i funkcjach telomerów moment utraty stabilności chromatyny jądrowej oraz uruchomienie w komórce procesu tzw. starzenia replikacyjnego (Lanza i in., 2000 b; Kühholzer-Cabot i Brem, 2002; Kishigami i in., 2008). Do charakterystycznych cech komórek, które ulegają progresywnemu starzeniu replikacyjnemu należy zaliczyć znaczne zwiększenie średnicy i silnie spłaszczony kształt spowodowany drastycznym wzrostem objętości ich cytozolu. Te wszystkie wyżej wspomniane transformacje epigenetyczne, genetyczne, cytofizjologiczne, morfologiczne oraz ultrastrukturalne, jakie zachodzą w starzejących się komórkach, prowadzą w pierwszej kolejności do gwałtownego osłabienia tempa wewnątrzkomórkowych procesów anabolicznych oraz do szybkiego spowolnienia kinetyki ich podziałów mitotycznych, a w dal-

szym etapie – do nieodwracalnego zahamowania ich aktywności metabolicznej oraz proliferacyjnej. W następstwie jednego podwojenia populacji hodowanych *in vitro* komórek fibroblastycznych tkanki skórnej dorosłych osobników ssaków – długość telomerów ulega skróceniu o około 48 par nukleotydów DNA jądrowego (Xu i Yang, 2001; Jeon i in., 2005; Le i in., 2014).

Telomeraza jest rybonukleoproteinowym kompleksem enzymatycznym, który wykazuje pełną aktywność odwrotnej transkryptazy RNA oraz integrazy DNA tylko w komórkach płciowych i zarodkowych, częściową – w somatycznych komórkach płodowych (ulegających tkanekowo-swoistej cytodyferencjacji), natomiast w komórkach somatycznych dorosłych osobników następuje całkowity zanik aktywności biokatalitycznej tego enzymu (Cui i in., 2003; Jiang i in., 2004 a; Betts i in., 2006; Dang-Nguyen i in., 2012). Funkcją telomerazy jest odtwarzanie, na drodze odwrotnej transkrypcji własnej matrycy RNA, pierwotnej długości telomerów DNA poprzez syntezę *de novo* (reduplikację) utraconych – w wyniku podziału mitotycznego lub mejotycznego komórek płciowych lub mitotycznych cykli blastomerów w okresie bruzdkowania zarodków – powtarzających się tandemowo, niekodujących telomerowych sekwencji DNA (5'-TTAGGG-3'). W ostatniej fazie replikacji półzachowawczej DNA koniec 3' nici wiodącej wystaje poza koniec 5' nici opóźnionej. Telomeraza zawiera cząsteczkę RNA, która jest częściowo komplementarna do tandemowo powtarzającej się krótkiej sekwencji 5'-TTAGGG-3', występującej na końcu 3' nici wiodącej, dlatego też wydłuża nią wiodącą telomerowego regionu DNA używając RNA jako matrycy. Następnie, enzym odłącza się i wiąże z nowym końcem telomerowym wydłużając nią wiodącą. Proces wydłużania może zachodzić setki razy zanim telomeraza ostatecznie oddysocjuje. Wydłużona, odtworzona nią wiodąca służy następnie jako matryca do replikacji końca 5' nici opóźnionej, katalizowanej przez polimerazę DNA α . Te dwa procesy, w czasie których końce 5' DNA ulegają skróceniu podczas podstawowej re-

plikacji semikonserwatywnej i wydłużeniu wskutek aktywności telomerazy, są wzajemnie zrównoważone, dzięki czemu całkowita długość chromosomów pozostaje w przybliżeniu taka sama (Betts i in., 2001; Jeon i in., 2005; Dang-Nguyen i in., 2012; Kong i in., 2014). Z kolei, brak aktywności telomerazy w komórkach somatycznych, stanowiących źródło dawców jąder w procedurze klonowania, a także ściśle ograniczona czasowo i przestrzennie długość sekwencji telomerowych DNA jądrowego są epigenomowo-uwarunkowanymi czynnikami limitującymi żywotność, tempo proliferacji oraz liczbę cykli podziałowych określonej komórki przed osiągnięciem przez nią krytycznego momentu maksymalnego skrócenia telomerów, który jest jednocześnie kontrolnym punktem mitotycznym, sygnalizującym rozpoczęcie i nieodwracalność procesu replikacyjnego starzenia komórki (Kühholzer-Cabot i Brem, 2002; Bekaert i in., 2004; Le i in., 2014).

Problem skracania się telomerów i replikacyjnego starzenia się komórek somatycznych zaobserwowano w chromosomach owcy Dolly, pierwszego sklonowanego ssaka (Shiels i in., 1999; Wilmut i in., 2002). Okazało się bowiem, że telomery w chromosomach klonalnej maciorki Dolly (w wieku 3 lat) były znacznie krótsze od długości telomerów w chromosomach osobników pochodzących z grupy kontrolnej (będących w tym samym wieku i urodzonych wskutek naturalnego rozrodu). Ponadto, długość telomerów w chromosomach Dolly była zbliżona do długości telomerów w chromosomach komórek 6-letniej owcy, wykorzystanej jako dawca komórek somatycznych w procedurze klonowania. W momencie przeprowadzania molekularnej analizy telomerów Dolly miała zatem 3 lata, a jej wiek epigenetyczny odpowiadał rzeczywistemu wiekowi 9-letniej owcy (komórki somatyczne Dolly były o 6 lat starsze epigenetycznie niż ona sama). Urodzona 5 lipca 1996 r. Dolly przeżyła nieco ponad 6,5 roku i została poddana eutanazji w dniu 14 lutego 2003 r. z powodu zdiagnozowania u niej złośliwego nowotworu płuc *Jaagsiekte* (owczego gruczolakoraka płuc). Czynnikiem etiologicznym

tej przewlekłej, zakaźnej i śmiertelnej choroby nowotworowej płuc u owiec jest retrowirus JSRV (ang. *Jaagsiekte sheep retrovirus*), odpowiadający za onkogeną transformację komórek nabłonka oskrzeli, tj. pneumocytów typu II oraz oskrzelikowych komórek maczugowatych. Z jednej strony, do 2000 r. Dolly urodziła łącznie 6 jagniąt (w tym bliźnięta i trojaczki), a więc zachowała zdrowie reprodukcyjne oraz charakteryzowała się wysoką płodnością i plennością, czyli jej zdolności rozrodcze po osiągnięciu dojrzałości płciowej i hodowlanej (rozplodowej) nie były upośledzone. Z drugiej jednak strony, w 2001 r. w tylnych kończynach pięcioletniej wówczas Dolly wykryto pierwsze objawy przewlekłej choroby zwyrodnieniowej stawów (osteoartrzy) o podłożu autoimmunologicznym, jaką jest reumatoidalne zapalenie stawów, czyli artretyzm. Warto podkreślić, że schorzenie to występuje stosunkowo często u owiec różnych ras, jednak zwykle nie pojawia się u osobników młodszych niż dziesięcioletnie. Powstają zatem dwa następujące pytania: Czyżby zamiast oczekiwanych 12–15 lat (tyle wynosi bowiem przeciętna długość życia owiec rasy *Finn Dorset*, której przedstawicielem była maciorka-dawca komórki somatycznej w procedurze klonowania) Dolly żyła o około 6 do 9 lat krócej? Czyżby wykazywała ona szybko postępujące symptomy – będącego następstwem klonowania somatycznego – przedwczesnego, anatomicznego i fizjologicznego starzenia się całego organizmu lub tylko niektórych jego części, tkanek oraz narządów? Rezultaty doświadczeń ukierunkowanych na określenie „wieku telomerowego” owcy Dolly świadczyłyby o tym, że zwierzę sklonowane w wyniku transplantacji do enukleowanego oocyta jądra komórki somatycznej (pochodzącej od dorosłego osobnika) jest obciążone epigenetycznie, a w konsekwencji także genetycznie wiekiem dawcy somatogenicznego DNA genomowego, czyli w chwili urodzenia epigenetycznie/genetycznie jest już znacznie starsze niż w czasie rzeczywistym (Shiels i in., 1999; Cui i in., 2003). Jednakże, te informacje dotyczące owiec klonalnych nie znalazły odzwierciedlenia w badaniach

nad chromosomami wyizolowanymi z komórek somatycznych pochodzących od bydła klonalnego. Z badań Lanzy i in. (2000 b), przeprowadzonych na chromosomach cieląt klonalnych, które zostały uzyskane na skutek rekonstrukcji enukleowanych oocytów z jąder komórek fibroblastycznych wywodzących się z długotrwałych hodowli *in vitro*, wynikało, że telomery tych młodocianych osobników mają długość przekraczającą nawet nieznacznie długość telomerów w chromosomach zwierząt kontrolnych, mimo że chromosomy komórek-dawców jąder były niemal całkowicie pozbawione telomerów. Analizy te potwierdziły, że końcowe odcinki chromosomów są skutecznie resyntetyzowane w blastomerach bydlęcych zarodków klonalnych przy udziale wysoko aktywnych telomeraz. Podobnie, eksperymenty Tian i in. (2000) wykazały, że długość telomerów w chromosomach 4 żyjących (ok. 15,4 kpz) oraz 6 padłych osobników (ok. 15,9 kpz) spośród 10 urodzonych cieląt klonalnych (uzyskanych z zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów tkanki skórno-powłokowej ucha lub z jąder komórek wzgórka jajonośnego, wyizolowanych z antralnych pęcherzyków jajnikowych 13-letniej krowy) nie tylko nie różniła się znacząco od długości telomerów charakterystycznej dla chromosomów zwierząt kontrolnych (ok. 14,7 kpz), lecz także istotnie przewyższała (o ok. 3–3,5 kpz) długość telomerów w chromosomach starzejącej się krowy (ok. 12,4 kpz), która była dawczynią komórek somatycznych użytych do zabiegu klonowania. Kato i in. (2000) udowodnili natomiast, że u bydła klonalnego do skracania długości telomerów dochodzi tylko w tych tkankach, jakie odpowiadają tkankom, z których bioptatów wyprawiono hodowle pierwotne, a z nich linie/szczepy komórek somatycznych stanowiących źródło dawców jąder wykorzystanych w procedurze klonowania.

Długość telomerów w chromosomach komórek pochodzących z linii klonalnych wyprawionych z bioptatów tkanki skórnej, pobranych zarówno od 4 sklonowanych świń transgenicznych (wykazujących ekspresję eGFP) uzy-

skanych z zarodków zrekonstruowanych z jąder transfekowanych fibroblastów płodowych, jak i od 2 transgenicznych świń uzyskanych z zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów skóry nowo narodzonych świń, była ekwiwalentna z długością telomerów w chromosomach komórek dermalnych, wywodzących się od osobników kontrolnych w tym samym wieku i uzyskanych w wyniku rozrodu naturalnego. Z kolei, dwa osobniki klonalne, które padły w okresie 3 do 7 dni po urodzeniu, miały końcowe odcinki chromosomów takiej samej długości jak telomery w chromosomach płodów w III trymestrze ciąży (Jiang i in., 2004 a). Analiza terminalnych fragmentów restrykcyjnych (TRF assay; ang. *terminal restriction fragment assay*) w genomowym DNA komórek pochodzących z biopłatów różnych organów/tkanek płodów klonalnych (gonady, serce, wątroba, płuca, nerki i skóra) potwierdziła, że długość telomerów w chromosomach pozostaje na jednakowym poziomie we wszystkich liniach komórkowych powstających w wyniku cytotyferencji przebiegającej w całym okresie fetogenezy. Powodem tego okazuje się być wysoka efektywność odtwarzania pierwotnej długości końcowych odcinków chromosomów za pośrednictwem aktywnej izoformy enzymu telomerazy w interfazowym cyklu replikacyjnym DNA jądrowego w różnicujących się i zasiedlających nowe nisze tkankowe komórkach somatycznych, które są zaangażowane w wieloetapowe procesy histo- i organogenezy. W okresie postnatalnym telomery ulegają natomiast stopniowemu skracaniu wraz z każdym kolejnym podziałem mitotycznym komórek somatycznych, a redukcja długości telomerów przebiega w sposób tkankowo-specyficzny. Świadczy to o zahamowaniu aktywności biokatalitycznej telomerazy w zróżnicowanych liniach komórek somatycznych, wyprowadzonych z eksplantów tkanki skórnej oraz różnych narządów wewnętrznych pobranych od loszek i knurków zarówno przed, jak i po osiągnięciu dojrzałości płciowej (Jiang i in., 2004 a; Jeon i in., 2005; Kurome i in., 2008; Kong i in., 2014).

Podsumowanie

Klonowanie metodą transplantacji jąder komórek somatycznych do enukleowanych oocytów w stadium MII (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*) jest obecnie wykorzystywane w technologiach wspomaganego rozrodu (ARTs; ang. *assisted reproductive technologies*) wielu gatunków ssaków, w tym różnych gatunków zwierząt gospodarskich. Wykorzystanie tej technologii w embriologii eksperymentalnej oraz w molekularnej genetyce populacji ma ważne znaczenie dla hodowli zwierząt gospodarskich.

Klonowanie jako metoda rozrodu aseksualnego ma związek m.in. z możliwością produkcji i/lub multiplikacji monogenetycznego i jednopłciowego potomstwa o wysokiej wartości hodowlanej i użytkowej, którego identyczność genotypowa i fenotypowa z progenitorowym dawcą transkrypcyjnego aparatu jądrowego i mitochondrialnego komórki somatycznej dotyczy jedynie DNA genomowego. Osobniki, które są uzyskiwane na drodze klonowania somatycznego, różnią się bowiem pod względem cech fenotypowych, uwarunkowanych losową segregacją matczyngo/oocytarnego oraz somatogenicznego genomu mitochondrialnego (mtDNA) w następstwie cytoplazmatycznego (pozajądrowego) dziedziczenia materiału genetycznego (Samiec, 2005 a,b; Hua i in., 2012; Takeda, 2013). Niemniej jednak, szczególnie wysoka wartość aplikacyjna technologii klonowania somatycznego jest związana z możliwością uzyskiwania identycznych genotypowo i fenotypowo zwierząt transgenicznych, czyli zwierząt o transformowanych genomach jądrowych, cennych ze względu na produkt ekspresji zmodyfikowanych genów (Lee i in., 2005 b; Samiec i Skrzyszowska, 2011 a, 2018 b; Ma i in., 2016). Wydajność syntezy rekombinowanych białek transgenicznych przez transformowane genetycznie osobniki klonalne wydaje się być zależna w pewnym stopniu od wpływu heteroplazmatycznych źródeł genotypu mitochondrialnego (tzw. mitotypu) na profil aktywności transkrypcyjnej zmodyfikowanych genów DNA jądrowego, a zależność ta może mieć charakter

korelacji negatywnej o wysokim współczynniku odziedziczalności oraz powtarzalności regresywnej danej cechy ilościowej i jakościowej, wynikającej z transgenizacji stada hodowlanego (Samiec, 2005 b; Hiendleder, 2007; Liu i in., 2012). Niezwykle istotnym dla produkcji/powielania osobników klonalnych, będących założycielami linii zwierząt transgenicznych (ang. *clonal founder animals*), jest zatem problem generowania potomstwa identycznego również w zakresie genomu mitochondrialnego, czyli będącego nośnikami jedynie homoplazmatycznych kopii mtDNA, pochodzących albo z oocytów-biorców, albo z somatycznych komórek-dawców zmodyfikowanych genetycznie jąder. Nie bez znaczenia pozostaje bowiem wpływ dziedziczenia pozajądrowej informacji genetycznej, zakumulowanej w mitochondrialnych rezerwuarach komórek zarówno linii somatycznej (somatogenicznej), jak i germinalnej (gametogenicznej) na aktywność transkrypcyjną *loci* takich cech ilościowych (ang. *quantitative trait loci*; QTL), jak np. niektóre cechy reprodukcyjne, m.in. plenność czy płodność, a także cechy użytkowe/produkcyjne, m.in. związane z mięsnością (powierzchnia oka polędwicy czy zawartość tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej, tkanki łącznej śródmięśniowej i międzymięśniowej oraz tkanki tłuszczowej w poszczególnych wyrębach tuszy lub półtuszy) lub z wydajnością mleczną (pojemność syntezy, sekrecji i eejkcji mleka w skali jednego dnia, jak również w całym okresie laktacji) klonalnych osobników transgenicznych (Samiec, 2005 a; Liu i in., 2012; Takeda, 2013; Samiec i Skrzyszowska, 2011 a; 2018 a,b). Genetyczne uwarunkowania cech plenności czy płodności od heteroplazmatycznego lub homoplazmatycznego wzorca segregacji genomu mitochondrialnego mogą z kolei wpływać na procesy międzypokoleniowej transmisji transgenów w liniach komórek płciowych kolejnych generacji sklonowanych zwierząt z transformowanym genotypem jądrowym. Natomiast, genetyczna korelacja negatywna lub pozytywna między dziedziczonymi wraz z DNA genomowym cechami determinującymi wydajność

mleczną lub wydajność rzeźną transgenicznych zwierząt klonalnych a profilem aktywności transkrypcyjnej genów DNA mitochondrialnego może być odpowiedzialna z jednej strony za zróżnicowany poziom tkankowo-specyficznej lub organo-specyficznej ekspresji (tj. stopień zahamowania lub uaktywnienia supresji transkrypcyjnej) obcogatunkowych konstrukcji genowych. Z drugiej strony, wspomniana wcześniej korelacja ujemna lub dodatnia może również rzutować na schemat/profil ekspresji ksenogenicznych konstrukcji genowych, czyli transgenów w poszczególnych komórkach, tkankach i organach zmodyfikowanych genetycznie osobników klonalnych. Ten schemat aktywności transkrypcyjnej zintegrowanych z genomem jądrowym transgenów może przyjmować charakter homogeny lub heterogeny, czyli może skutkować indukcją lub też brakiem występowania transgenicznego mozaicyzmu/chimeryzmu u zwierząt klonalnych (Hiendleder i in., 2004; Hiendleder, 2007; Samiec i Skrzyszowska, 2011 a,b). Obcogatunkowe, ekspresyjne konstrukcje genowe, jakie ulegają inkorporacji do genomowego DNA komórek zlokalizowanych w poszczególnych tkankach i narządach transgenicznych osobników klonalnych, mogą kodować np. takie rekombinowane białka terapeutyczne, których synteza i sekrecja (egzo- lub endokryna) jest ukierunkowana na komórki wydzielnicze gruczołu mlekowego lub tkankę mięśniową gładką i poprzecznie prążkowaną wchodzącą w skład wszystkich organów, układów i części ciała u zwierząt gospodarskich (Tessanne i in., 2012; Wang i in., 2013; Ju i in., 2015; Lu i in., 2016; Guo i in., 2017).

Intergenomowa komunikacja między DNA mitochondrialnym a transgenem trwale zintegrowanym z DNA jądrowym może być także powodem różnic w efektywności transgenezy, indukującej ukierunkowaną mutagenezę, tj. monoalleliczną delecję lub insercyjną inaktywację (unieczynnienie) genu kodującego miostatynę – specyficzne dla komórek tkanki mięśniowej białko hormonalne, hamujące na drodze regulacji parakrynniej przyrost (hipertrofię i hiperplą-

zję) mięśni szkieletowych i gładkich (Zhou i in., 2013; Proudfoot i in., 2015). Obecność znoкаутованого pojedynczego allelu lub dwóch alleli genu miostatyny lub obecność trwale wyciszonej posttranskrypcyjnie pojedynczej kopii lub dwóch kopii mRNA kodowanych przez gen miostatyny u heterozygotycznych bądź homozygotycznych transgenicznych osobników klonalnych była mięsnego skutkuje zwiększeniem mięsności krów i buhajów, wynikającym z hipertrofii i hiperplazji nie tylko tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej, lecz także tkanki mięśniowej gładkiej (Tessanne i in., 2012; Zhou i in., 2013).

Atrakcyjność powielania transgenicznych ssaków, w tym różnych gatunków zwierząt udomowionych – w następstwie klonowania techniką transplantacji jąder komórek somatycznych do enukleowanych oocytów (SCNT) – jest zdeterminowana możliwościami aplikacyjnymi hormonalnego lub enzymatycznego produktu ekspresji zmodyfikowanego genu. Od tego bowiem zależy przede wszystkim skala i zasięg prowadzonych badań. Mimo że pierwszym uzyskanym ssakiem klonalnym była owca, to znacznie większy zasięg miały prace badawcze ukierunkowane na klonowanie somatyczne innych gatunków zwierząt gospodarskich. Gruczoły mlekowe, czyli wymiona transgenicznych krów klonalnych (Yang i in., 2011; Liu i in., 2013; Luo i in., 2015; Lu i in., 2016; Wang i in., 2008, 2017), transgenicznych owiec klonalnych (Deng i in., 2013; Zhang i in., 2013) i transgenicznych kóz klonalnych (Meng i in., 2013; Feng i in., 2015) mogą bowiem stać się żywymi „fabrykami”, tj. bioreaktorami dostarczającymi mleko o zhumanizowanym bądź ułatwiającym jego trawienie składzie dietetycznym lub dostarczającymi w mleku ludzkie rekombinowane białka terapeutyczne (tzw. biofarmaceutyki lub nutraceutyki). Te ostatnie mogą znaleźć zastosowanie kliniczne w terapiach pacjentów cierpiących na choroby uwarunkowane genetycznie (Jang i in., 2006; Salamone i in., 2006; Monzani i in., 2013; Luo i in., 2015).

W porównaniu z innymi technologia-

mi wspomaganego rozrodu (ARTs) ssaków, a w szczególności zwierząt gospodarskich, wydajność klonowania somatycznego (SCNT) zwierząt udomowionych, mierzona odsetkiem urodzonego potomstwa w stosunku do liczby zrekonstruowanych oocytów, wciąż pozostaje na niskim poziomie i nie przekracza średnio 1 do 2%. Niemniej jednak, biotechnologiczne możliwości klonowania somatycznego różnych gatunków zwierząt gospodarskich wyprzedziły znacznie zrozumienie biologicznych uwarunkowań, a w szczególności aspektów molekularnych i epigenetycznych tej metody (Kong i in., 2014; Samiec i Skrzyszowska, 2018 a,b; Saini i Selokar, 2018). Mimo to podstawy biologiczne, jakie zostały stworzone w zakresie genomowej inżynierii zarodkowej zwierząt udomowionych, zwłaszcza w ciągu ostatnich dwudziestu trzech lat, umożliwiły opracowanie innowacyjnej technologii pozaustrojowej produkcji zarodków z wykorzystaniem procedury klonowania somatycznego, która może spełniać warunki dla jej zastosowania do realizacji celów laboratoryjnych lub w niektórych przypadkach tylko do realizacji ograniczonych celów praktycznych (Loi i in., 2016; Niemann, 2016; Jin i in., 2018). Dopiero zwiększenie efektywności klonowania somatycznego rozmaitych gatunków ssaków, w tym zwierząt gospodarskich co najmniej do poziomu efektywności adekwatnej z efektywnością zapłodnienia *in vitro* lub sztucznej inseminacji w ramach programu MOET (ang. *multiple ovulation and embryo transfer*) u bydła pozwoliłoby na wykorzystanie tej technologii wspomaganego rozrodu na większą skalę praktyczną. Jednakże, ze względu na stosunkowo wysoką częstość występowania letalnych lub subletalnych anomalii rozwojowych bądź defektów anatomiczno-histologicznych u płodów i potomstwa klonalnego zastosowanie klonowania somatycznego zwierząt gospodarskich na skalę przemysłową nie jest możliwe, przynajmniej na obecnym etapie zaawansowania badań prowadzonych z tego zakresu na świecie, w Europie i w Polsce.

Wydaje się jednak, że po przejściu – z fazy badań podstawowych do fazy badań stosowanych – techniki wewnątrz- i międzygatunkowego klonowania somatycznego ssaków, z uwagi na swoje potencjalne możliwości aplikacyjne dla rozwoju nauki i gospodarki w państwach członkowskich Unii Europejskiej poprzez jego wykorzystanie w rolnictwie i w dziedzinach badań interdyscyplinarnych, mogłyby przyczynić się do: 1) ochrony zasobów genetycznych i tworzenia rezerw genetycznych zagrożonych wyginięciem endemicznych ras zwierząt gospodarskich; 2) restytucji (odtworzenia) oraz multiplikacji subpopulacji ginących i rzadkich ras zachowawczych zwierząt udomowionych w celu zachowania bioróżnorodności oraz podwyższenia stopnia wewnątrzpopulacyjnej i międzyosobniczej zmienności genetycznej; oraz 3) „wskrzeszania do życia” i re-introdukcji do środowiska naturalnego wymarłych, wolnożyjących gatunków ssaków. Ponadto, upowszechnione już na skalę praktyczną badania z zakresu klonowa-

nia zwierząt udomowionych mogłyby posłużyć do osiągnięcia innych wymiernych korzyści, a wśród nich do: 4) poprawy wskaźników wartości hodowlanej (genetycznej) i użytkowej różnych ras zwierząt gospodarskich, w tym zwiększenia ich wydajności mlecznej, mięsnej i rozplodowej (plenności i płodności); jak również 5) przełożenia (translacji) wyników badań podstawowych na wdrożenia w dziedzinach nauk interdyscyplinarnych z zakresu tworzenia odzwierzęcych produktów biotechnologicznych (transgenicznych) dla przemysłu biofarmaceutycznego, nutraceutycznego i technologii żywności. Klasycznym tego przykładem może być trwała i wysoko odziedziczalna ukierunkowana modyfikacja genetyczna, czyli transgenizacja wymion udomowionych gatunków małych i dużych przeżuwaczy (tj. odpowiednio: owiec, kóz i bydła) oraz ich zastosowanie jako zwierzęcych bioreaktorów wytwarzających zhumanizowane mleko lub mleko zawierające ludzkie rekombinowane białka terapeutyczne.

Literatura

- 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 (4): 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 (2): 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 (1): 185–193.
- Bekaert S., Derradji H., Baatout S. (2004). Telomere biology in mammalian germ cells and during development. *Dev. Biol.*, 274 (1): 15–30.
- Berg D.K., Li C., Asher G., Wells D.N., Oback B. (2007). Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. *Biol. Reprod.*, 77 (3): 384–394.
- Betts D., Bordignon V., Hill J., Winger Q., Westhusin M., Smith L., King W. (2001). Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (3): 1077–1082.
- Betts D.H., Perrault S., Harrington L., King W.A. (2006). Quantitative analysis of telomerase activity and telomere length in domestic animal clones. *Methods Mol. Biol.*, 325: 149–180.
- 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 (4): 409–419.

- Buganim Y., Faddah D.A., Jaenisch R. (2013). Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat. Rev. Genet.*, 14 (6): 427–439.
- Burgstaller J.P., Schinogl P., Dinnyes A., Müller M., Steinborn R. (2007). Mitochondrial DNA heteroplasmy in ovine fetuses and sheep cloned by somatic cell nuclear transfer. *BMC Dev. Biol.*, 7: 141.
- Campbell K.H., Alberio R. (2003). Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reprod. Suppl.*, 61: 477–494.
- Cezar G.G., Bartolomei M.S., Forsberg E.J., First N.L., Bishop M.D., Eilertsen K.J. (2003). Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.*, 68 (3): 1009–1014.
- 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 (1–2): 15–20.
- Chesn  P., Adenot P.G., Viglietta C., Baratte M., Boulanger L., Renard J.P. (2002). Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.*, 20 (4): 366–369.
- Choi E.G., Yin X.J., Lee H.S., Kim L.H., Shin H.D., Kim N.H., Kong I.K. (2007). Reproductive fertility of cloned male cats derived from adult somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 9 (2): 281–290.
- 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 (4): 297–313.
- 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 (1): 15–21.
- Dang-Nguyen T.Q., Haraguchi S., Akagi S., Somfai T., Kaneda M., Watanabe S., Kikuchi K., Tajima A., Nagai T. (2012). Telomere elongation during morula-to-blastocyst transition in cloned porcine embryos. *Cell. Reprogram.*, 14 (6): 514–519.
- Dean W., Santos F., Reik W. (2003). Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 14 (1): 93–100.
- Deng W., Yang D., Zhao B., Ouyang Z., Song J., Fan N., Liu Z., Zhao Y., Wu Q., Nashun B., Tang J., Wu Z., Gu W., Lai L. (2011). Use of the 2A peptide for generation of multi-transgenic pigs through a single round of nuclear transfer. *PLoS One*, 6 (5): e19986.
- Deng S., Li G., Zhang J., Zhang X., Cui M., Guo Y., Liu G., Li G., Feng J., Lian Z. (2013). Transgenic cloned sheep overexpressing ovine toll-like receptor 4. *Theriogenology*, 80 (1): 50–57.
- 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 (1–2): 129–146.
- Esteves T.C., Balbach S.T., Pfeiffer M.J., Ara uzo-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 (1): 80–95.
- Feng X., Cao S., Wang H., Meng C., Li J., Jiang J., Qian Y., Su L., He Q., Zhang Q. (2015). Production of transgenic dairy goat expressing human α -lactalbumin by somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res.*, 24 (1): 73–85.
- Folch J., Cocero M.J., Chesn  P., Alabart J.L., Domínguez V., Cogni  Y., Roche A., Fernández-Arias A., Marti J.I., Sánchez P., Echegoyen E., Beckers J.F., Bonastre A.S., Vignon X. (2009). First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, 71 (6): 1026–1034.
- Forsberg E.J., Strelchenko N.S., Augenstein M.L., Betthausen J.M., Childs L.A., Eilertsen K.J., Enos J.M., Forsythe T.M., Golueke P.J., Koppang R.W., Lange G., Lesmeister T.L., Mallon K.S., Mell G.D., Misica P.M., Pace M.M., Pfister-Genskow M., Voelker G.R., Watt S.R., Bishop M.D. (2002). Production of cloned cattle from *in vitro* systems. *Biol. Reprod.*, 67 (1): 327–333.
- Galli C., Lagutina I., Vassiliev I., Duchi R., Lazzari G. (2002). Comparison of microinjection (piezo-electric) and cell fusion for nuclear transfer success with different cell types in cattle. *Cloning Stem Cells*, 4 (3): 189–196.
- Galli C., Lagutina I., Crotti G., Colleoni S., Turini P., Ponderato N., Duchi R., Lazzari G. (2003). Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 424 (6949): 635.
- Gao R., Wang C., Gao Y., Xiu W., Chen J., Kou X., Zhao Y., Liao Y., Bai D., Qiao Z., Yang L., Wang M., Zang R.,

- Liu X., Jia Y., Li Y., Zhang Y., Yin J., Wang H., Wan X., Liu W., Zhang Y., Gao S. (2018). Inhibition of aberrant DNA re-methylation improves post-implantation development of somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell Stem Cell*, 23 (3): 426–435.e5.
- 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 (5): 761–768.
- Gómez M.C., Pope C.E., Giraldo A., Lyons L.A., Harris R.F., King A.L., Cole A., Godke R.A., Dresser B.L. (2004). Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells*, 6 (3): 247–258.
- Gómez M.C., Pope C.E., Kutner R.H., Ricks D.M., Lyons L.A., Ruhe M., Dumas C., Lyons J., López M., Dresser B.L., Reiser J. (2008). Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning Stem Cells*, 10 (4): 469–483.
- Green A.L., Wells D.N., Oback B. (2007). Cattle cloned from increasingly differentiated muscle cells. *Biol. Reprod.*, 77 (3): 395–406.
- Guo Y., Li H., Wang Y., Yan X., Sheng X., Chang D., Qi X., Wang X., Liu Y., Li J., Ni H. (2017). Screening somatic cell nuclear transfer parameters for generation of transgenic cloned cattle with intragenomic integration of additional gene copies that encode bovine adipocyte-type fatty acid-binding protein (A-FABP). *Mol. Biol. Rep.*, 44 (1): 159–168.
- Hiendleder S. (2007). Mitochondrial DNA inheritance after SCNT. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 591: 103–116.
- Hiendleder S., Prella K., Brüggerhoff K., Reichenbach H.D., Wenigerkind H., Bebbere D., Stojkovic M., Müller S., Brem G., Zakhartchenko V., Wolf E. (2004). Nuclear-cytoplasmic interactions affect *in utero* developmental capacity, phenotype, and cellular metabolism of bovine nuclear transfer fetuses. *Biol. Reprod.*, 70 (4): 1196–1205.
- Hinrichs K., Choi Y.H., Love C.C., Chung Y.G., Varner D.D. (2006). Production of horse foals via direct injection of roscovitine-treated donor cells and activation by injection of sperm extract. *Reproduction*, 131 (6): 1063–1072.
- Hinrichs K., Choi Y.H., Varner D.D., Hartman D.L. (2007). Production of cloned horse foals using roscovitine-treated donor cells and activation with sperm extract and/or ionomycin. *Reproduction*, 134 (2): 319–325.
- Hong S.G., Jang G., Kim M.K., Oh H.J., Park J.E., Kang J.T., Koo O.J., Kim D.Y., Lee B.C. (2009). Dogs cloned from fetal fibroblasts by nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, 115 (1–4): 334–339.
- Hoshino Y., Hayashi N., Taniguchi S., Kobayashi N., Sakai K., Otani T., Iritani A., Saeki K. (2009). Resurrection of a bull by cloning from organs frozen without cryoprotectant in a –80°C freezer for a decade. *PLoS One*, 4 (1): e4142.
- Hossein M.S., Jeong Y.W., Park S.W., Kim J.J., Lee E., Ko K.H., Kim H.S., Kim Y.W., Hyun S.H., Shin T., Hawthorne L., Hwang W.S. (2009). Cloning Missy: obtaining multiple offspring of a specific canine genotype by somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 11 (1): 123–130.
- Hua S., Lu C., Song Y., Li R., Liu X., Quan F., Wang Y., Liu J., Su F., Zhang Y. (2012). High levels of mitochondrial heteroplasmy modify the development of ovine-bovine interspecies nuclear transferred embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 24 (3): 501–509.
- Hwang I., Jeong Y.W., Kim J.J., Lee H.J., Kang M., Park K.B., Park J.H., Kim Y.W., Kim W.T., Shin T., Hyun S.H., Jeong E.B., Hwang W.S. (2013). Successful cloning of coyotes through interspecies somatic cell nuclear transfer using domestic dog oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 25 (8): 1142–1148.
- Jang G., Bhuiyan M.M., Jeon H.Y., Ko K.H., Park H.J., Kim M.K., Kim J.J., Kang S.K., Lee B.C., Hwang W.S. (2006). An approach for producing transgenic cloned cows by nuclear transfer of cells transfected with human alpha 1-antitrypsin gene. *Theriogenology*, 65 (9): 1800–1812.
- Jang G., Kim M.K., Oh H.J., Hossein M.S., Fibrianto Y.H., Hong S.G., Park J.E., Kim J.J., Kim H.J., Kang S.K., Kim D.Y., Lee B.C. (2007). Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 67 (5): 941–947.

- Jang G., Oh H.J., Kim M.K., Fibrianto Y.H., Hossein M.S., Kim H.J., Kim J.J., Hong S.G., Park J.E., Kang S.K., Lee B.C. (2008 a). Improvement of canine somatic cell nuclear transfer procedure. *Theriogenology*, 69 (2): 146–154.
- Jang G., Hong S.G., Oh H.J., Kim M.K., Park J.E., Kim H.J., Kim D.Y., Lee B.C. (2008 b). A cloned toy poodle produced from somatic cells derived from an aged female dog. *Theriogenology*, 69 (5): 556–563.
- 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 (3): 315–320.
- Jiang L., Carter D.B., Xu J., Yang X., Prather R.S., Tian X.C. (2004 a). Telomere lengths in cloned transgenic pigs. *Biol. Reprod.*, 70 (6): 1589–1593.
- Jiang M.X., Yang C.X., Zhang L.S., Zheng Y.L., Liu S.Z., Sun Q.Y., Chen D.Y. (2004 b). The effects of chemical enucleation combined with whole cell intracytoplasmic injection on panda-rabbit interspecies nuclear transfer. *Zygote*, 12 (4): 315–320.
- Jin L., Guo Q., Zhang G.L., Xing X.X., Xuan M.F., Luo Q.R., Luo Z.B., Wang J.X., Yin X.J., Kang J.D. (2018). The histone deacetylase inhibitor, CI994, improves nuclear reprogramming and *in vitro* developmental potential of cloned pig embryos. *Cell. Reprogram.*, 20 (3): 205–213.
- Ju H., Zhang J., Bai L., Mu Y., Du Y., Yang W., Li Y., Sheng A., Li K. (2015). The transgenic cloned pig population with integrated and controllable GH expression that has higher feed efficiency and meat production. *Sci. Rep.*, 5: 10152.
- Kang Y.K., Yeo S., Kim S.H., Koo D.B., Park J.S., Wee G., Han J.S., Oh K.B., Lee K.K., Han Y.M. (2003). Precise recapitulation of methylation change in early cloned embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 66 (1): 32–37.
- Kato Y., Tani T., Tsunoda Y. (2000). Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J. Reprod. Fertil.*, 120 (2): 231–237.
- 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 (2): 67–72.
- Keefer C.L., Keyston R., Lazaris A., Bhatia B., Begin I., Bilodeau A.S., Zhou F.J., Kafidi N., Wang B., Baldassarre H., Karatzas C.N. (2002). Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol. Reprod.*, 66 (1): 199–203.
- Kim M.K., Jang G., Oh H.J., Yuda F., Kim H.J., Hwang W.S., Hossein M.S., Kim J.J., Shin N.S., Kang S.K., Lee B.C. (2007). Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells*, 9 (1): 130–137.
- Kishigami S., Wakayama S., Hosoi Y., Iritani A., Wakayama T. (2008). Somatic cell nuclear transfer: infinite reproduction of a unique diploid genome. *Exp. Cell Res.*, 314 (9): 1945–1950.
- Kong Q., Ji G., Xie B., Li J., Mao J., Wang J., Liu S., Liu L., Liu Z. (2014). Telomere elongation facilitated by trichostatin A in cloned embryos and pigs by somatic cell nuclear transfer. *Stem Cell Rev.*, 10 (3): 399–407.
- Kungulovski G., Jeltsch A. (2016). Epigenome editing: state of the art, concepts, and perspectives. *Trends Genet.*, 32 (2): 101–113.
- 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 (4): 367–378.
- 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 (4): 254–258.
- Kurome M., Geistlinger L., Kessler B., Zakhartchenko V., Klymiuk N., Wuensch A., Richter A., Baehr A., Kraehe K., Burkhardt K., Flisikowski K., Flisikowska T., Merkl C., Landmann M., Durkovic M., Tschukes A., Kraner S., Schindelbauer 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.

- Kühholzer-Cabot B., Brem G. (2002). Aging of animals produced by somatic cell nuclear transfer. *Exp. Gerontol.*, 37 (12): 1317–1323.
- Kwon D.J., Kim D.H., Hwang I.S., Kim D.E., Kim H.J., Kim J.S., Lee K., Im G.S., Lee J.W., Hwang S. (2017). Generation of α -1,3-galactosyltransferase knocked-out transgenic cloned pigs with knocked-in five human genes. *Transgenic Res.*, 26 (1): 153–163.
- Lacham-Kaplan O., Diamente M., Pushett D., Lewis I., Trounson A. (2000). Developmental competence of nuclear transfer cow oocytes after direct injection of fetal fibroblast nuclei. *Cloning*, 2 (2): 55–62.
- Lagutina I., Lazzari G., Duchi R., Colleoni S., Ponderato N., Turini P., Crotti G., Galli C. (2005). Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction*, 130 (4): 559–567.
- 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 (2): 273–285.
- Lai L., Tao T., Macháty 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 (5): 1558–1564.
- Lai L., Park K.W., Cheong H.T., Kühholzer B., Samuel M., Bonk A., Im G.S., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Prather R.S. (2002). Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 62 (3): 300–306.
- Lan G.C., Chang Z.L., Luo M.J., Jiang Y.L., Han D., Wu Y.G., Han Z.B., Ma S.F., Tan J.H. (2006). Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 73 (7): 834–840.
- Lanza R.P., Cibelli J.B., Diaz F., Moraes C.T., Farin P.W., Farin C.E., Hammer C.J., West M.D., Damiani P. (2000 a). Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*, 2 (2): 79–90.
- Lanza R.P., Cibelli J.B., Blackwell C., Cristofalo V.J., Francis M.K., Baerlocher G.M., Mak J., Schertzer M., Chavez E.A., Sawyer N., Lansdorp P.M., West M.D. (2000 b). Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*, 288 (5466): 665–669.
- Le R., Kou Z., Jiang Y., Li M., Huang B., Liu W., Li H., Kou X., He W., Rudolph K.L., Ju Z., Gao S. (2014). Enhanced telomere rejuvenation in pluripotent cells reprogrammed via nuclear transfer relative to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 14 (1): 27–39.
- Lee J., Inoue K., Ono R., Ogonuki N., Kohda T., Kaneko-Ishino T., Ogura A., Ishino F. (2003 a). Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*, 129 (8): 1807–1817.
- Lee J.W., Wu S.C., Tian X.C., Barber M., Hoagland T., Riesen J., Lee K.H., Tu C.F., Cheng W.T.K., Yang X. (2003 b). Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol. Reprod.*, 69 (3): 995–1001.
- Lee B.C., Kim M.K., Jang G., Oh H.J., Yuda F., Kim H.J., Shamim M.H., Kim J.J., Kang S.K., Schatten G., Hwang W.S. (2005 a). Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 436 (7051): 641.
- 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 b). Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Theriogenology*, 63 (4): 973–991.
- Li S., Chen X., Fang Z., Shi J., Sheng H.Z. (2006 a). Rabbits generated from fibroblasts through nuclear transfer. *Reproduction*, 131 (6): 1085–1090.
- Li Z., Sun X., Chen J., Liu X. Wisely S.M., Zhou Q., Renard J.P., Leno G.H., Engelhardt J.F. (2006 b). Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev. Biol.*, 293 (2): 439–448.
- Li S., Guo Y., Shi J., Yin C., Xing F., Xu L., Zhang C., Liu T., Li Y., Li H., Du L., Chen X. (2009). Transgene

- expression of enhanced green fluorescent protein in cloned rabbits generated from *in vitro*-transfected adult fibroblasts. *Transgenic Res.*, 18 (2): 227–235.
- Li Z., He X., Chen L., Shi J., Zhou R., Xu W., Liu D., Wu Z. (2013). Bone marrow mesenchymal stem cells are an attractive donor cell type for production of cloned pigs as well as genetically modified cloned pigs by somatic cell nuclear transfer. *Cell. Reprogram.*, 15 (5): 459–470.
- Liu H.J., Xue J., Li K., Ying Z.Z., Zheng Z., Wang R. (2012). Improvement of the nuclear transfer efficiency by using the same genetic background of recipient oocytes as the somatic donor cells in goats. *Cell Biol. Int.*, 36 (6): 555–560.
- Liu X., Wang Y., Guo W., Chang B., Liu J., Guo Z., Quan F., Zhang Y. (2013). Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat. Commun.*, 4: 2565.
- Liu H.J., Peng H., Hu C.C., Li X.Y., Zhang J.L., Zheng Z., Zhang W.C. (2016). Effects of donor cells' sex on nuclear transfer efficiency and telomere lengths of cloned goats. *Reprod. Domest. Anim.*, 51 (5): 789–794.
- Loi P., Ptak G., Barboni B., Fulka J. Jr., Cappai P., Clinton M. (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using *post-mortem* somatic cells. *Nat. Biotechnol.*, 19 (10): 962–964.
- Loi P., Clinton M., Barboni B., Fulka J. Jr., Cappai P., Feil R., Moor R.M., Ptak G. (2002). Nuclei of nonviable ovine somatic cells develop into lambs after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.*, 67 (1): 126–132.
- Loi P., Iuso D., Czernik M., Ogura A. (2016). A new, dynamic era for somatic cell nuclear transfer? *Trends Biotechnol.*, 34 (10): 791–797.
- Lorthongpanich C., Solter D., Lim C.Y. (2010). Nuclear reprogramming in zygotes. *Int. J. Dev. Biol.*, 54 (11–12): 1631–1640.
- Lu D., Liu S., Shang S., Wu F., Wen X., Li Z., Li Y., Hu X., Zhao Y., Li Q., Li N. (2015). Production of transgenic-cloned pigs expressing large quantities of recombinant human lysozyme in milk. *PLoS One*, 10 (5): e0123551.
- Lu D., Liu S., Ding F., Wang H., Li J., Li L., Dai Y., Li N. (2016). Large-scale production of functional human lysozyme from marker-free transgenic cloned cows. *Sci. Rep.*, 6: 22947.
- Lu F., Luo C., Li N., Liu Q., Wei Y., Deng H., Wang X., Li X., Jiang J., Deng Y., Shi D. (2018). Efficient generation of transgenic buffaloes (*Bubalus bubalis*) by nuclear transfer of fetal fibroblasts expressing enhanced green fluorescent protein. *Sci. Rep.*, 8 (1): 6967.
- Luo Y., Wang Y., Liu J., Lan H., Shao M., Yu Y., Quan F., Zhang Y. (2015). Production of transgenic cattle highly expressing human serum albumin in milk by phiC31 integrase-mediated gene delivery. *Transgenic Res.*, 24 (5): 875–883.
- Liu Z., Cai Y., Wang Y., Nie Y., Zhang C., Xu Y., Zhang X., Lu Y., Wang Z., Poo M., Sun Q. (2018). Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 172 (4): 881–887.e7.
- Ma J., Li Q., Li Y., Wen X., Li Z., Zhang Z., Zhang J., Yu Z., Li N. (2016). Expression of recombinant human α -lactalbumin in milk of transgenic cloned pigs is sufficient to enhance intestinal growth and weight gain of suckling piglets. *Gene*, 584 (1): 7–16.
- Mann M.R.W., Chung Y.G., Nolen L.D., Verona R.I., Latham K.E., Bartolomei M.S. (2003). Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 69 (3): 902–914.
- 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 (15): 3727–3735.
- 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 (1): 85–94.
- Mason K., Liu Z., Aguirre-Lavin T., Beaujean N. (2012). Chromatin and epigenetic modifications during early

- mammalian development. *Anim. Reprod. Sci.*, 134 (1–2): 45–55.
- McCreath K.J., Howcroft J., Campbell K.H.S., Colman A., Schnieke A.E., Kind A.J. (2000). Production of gene targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 405 (6790): 1066–1069.
- Meng Q., Polgar Z., Liu J., Dinnyes A. (2009). Live birth of somatic cell-cloned rabbits following trichostatin A treatment and cotransfer of parthenogenetic embryos. *Cloning Stem Cells*, 11 (1): 203–208.
- Meng L., Wan Y., Sun Y., Zhang Y., Wang Z., Song Y., Wang F. (2013). Generation of five human lactoferrin transgenic cloned goats using fibroblast cells and their methylation status of putative differential methylation regions of IGF2R and H19 imprinted genes. *PLoS One*, 8 (10): e77798.
- Miyashita N., Shiga K., Yonai M., Kaneyama K., Kobayashi S., Kojima T., Goto Y., Kishi M., Aso H., Suzuki T., Sakaguchi M., Nagai T. (2002). Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol. Reprod.*, 66 (6): 1649–1655.
- Mizutani E., Oikawa M., Kassai H., Inoue K., Shiura H., Hirasawa R., Kamimura S., Matoba S., Ogonuki N., Nagatomo H., Abe K., Wakayama T., Aiba A., Ogura A. (2015). Generation of cloned mice from adult neurons by direct nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 92 (3): Article 81, pp. 1–11.
- Monzani P.S., Sangalli J.R., Bem T.H. de, Bressan F.F., Fantinato-Neto P., Pimentel J.R., Birgel-Junior E.H., Fontes A.M., Covas D.T., Meirelles F.V. (2013). Breeding of transgenic cattle for human coagulation factor IX by a combination of lentiviral system and cloning. *Genet. Mol. Res.*, 12 (3): 3675–3688.
- Narbonne P., Miyamoto K., Gurdon J.B. (2012). Reprogramming and development in nuclear transfer embryos and in interspecific systems. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 22 (5): 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 (10): 1296–1308.
- Niemann H. (2016). Epigenetic reprogramming in mammalian species after SCNT-based cloning. *Theriogenology* 86 (1): 80–90.
- Niemann H., Wrenzycki C., Lucas-Hahn A., Brambrink T., Kues W.A., Carnwath J.W. (2002). Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning Stem Cells*, 4 (1): 29–38.
- Oh H.J., Kim M.K., Jang G., Kim H.J., Hong S.G., Park J.E., Park K., Park C., Sohn S.H., Kim D.Y., Shin N.S., Lee B.C. (2008). Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. *Theriogenology*, 70 (4): 638–647.
- Olivera R., Moro L.N., Jordan R., Pallarols N., Guglielminetti A., Luzzani C., Miriuka S.G., Vichera G. (2018). Bone marrow mesenchymal stem cells as nuclear donors improve viability and health of cloned horses. *Stem Cells Cloning*, 11: 13–22.
- 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 (5482): 1188–1190.
- Ono Y., Shimozawa N., Ito M., Kono T. (2001). Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 64 (1): 44–50.
- 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.
- Ozawa M., Himaki T., Ookutsu S., Mizobe Y., Ogawa J., Miyoshi K., Yabuki A., Fan J., Yoshida M. (2015). Production of cloned miniature pigs expressing high levels of human apolipoprotein(a) in plasma. *PLoS One*, 10 (7): e0132155.
- 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.
- Proudfoot C., Carlson D.F., Huddart R., Long C.R., Pryor J.H., King T.J., Lillico S.G., Mileham A.J., McLaren

- D.G., Whitelaw C.B., Fahrenkrug S.C. (2015). Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res.*, 24 (1): 147–153.
- Reik W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447 (7143): 425–432.
- Richter A., Kurome M., Kessler B., Zakhartchenko V., Klymiuk N., Nagashima H., Wolf E., Wuensch A. (2012). Potential of primary kidney cells for somatic cell nuclear transfer mediated transgenesis in pig. *BMC Biotechnol.*, 12: 84.
- Rodriguez-Osorio N., Urrego R., Cibelli J.B., Eilertsen K., Memili E. (2012). Reprogramming mammalian somatic cells. *Theriogenology*, 78 (9): 1869–1886.
- 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 (1–2): 93–99.
- Rybouchkin A., Kato Y., Tsunoda Y. (2006). Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 74 (6): 1083–1089.
- Saini M., Selokar N.L. (2018). Approaches used to improve epigenetic reprogramming in buffalo cloned embryos. *Indian J. Med. Res.*, 148 (Suppl.): S115–S119.
- Salamone D., Baraňao L., Santos C., Bussmann L., Artuso J., Werning C., Prync A., Carbonetto C., Dabsys S., Munar C., Salaberry R., Berra G., Berra I., Fernández N., Papouchado M., Foti M., Judewicz N., Mujica I., Muñoz L., Alvarez S.F., González E., Zimmermann J., Criscuolo M., Melo C. (2006). High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J. Biotechnol.*, 124 (2): 469–472.
- Samiec M. (2005 a). The role of mitochondrial genome (mtDNA) in somatic and embryo cloning of mammals. A review. *J. Anim. Feed Sci.*, 14 (2): 213–233.
- Samiec M. (2005 b). The effect of mitochondrial genome on architectural remodeling and epigenetic reprogramming of donor cell nuclei in mammalian nuclear transfer-derived embryos. *J. Anim. Feed Sci.*, 14 (3): 393–422.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2005 a). Microsurgical nuclear transfer by intracapsular karyoplast injection as an alternative embryo reconstruction method in somatic cloning of pigs and other mammal species; application value of the method and its technical advantages: a review. *Czech J. Anim. Sci.*, 50 (6): 235–242.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2005 b). Molecular conditions of the cell nucleus remodelling/reprogramming process and nuclear-transferred embryo development in the intracapsular karyoplast injection technique: a review. *Czech J. Anim. Sci.*, 50 (5): 185–195.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2011 a). Transgenic mammalian species, generated by somatic cell cloning, in biomedicine, biopharmaceutical industry and human nutrition/dietetics – recent achievements. *Pol. J. Vet. Sci.*, 14 (2): 317–328.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2011 b). The possibilities of practical application of transgenic mammalian species generated by somatic cell cloning in pharmacology, veterinary medicine and xenotransplantation. *Pol. J. Vet. Sci.*, 14 (2): 329–340.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2013). Assessment of *in vitro* developmental capacity of porcine nuclear-transferred embryos reconstituted with cumulus oophorus cells undergoing vital diagnostics for apoptosis detection. *Ann. Anim. Sci.*, 13 (3): 513–529.
- 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 (2): 128–139.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2018 a). Intrinsic and extrinsic molecular determinants or modulators for epigenetic remodeling and reprogramming of somatic cell-derived genome in mammalian nuclear-transferred oocytes and resultant embryos. *Pol. J. Vet. Sci.*, 21 (1): 217–227.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2018 b). Can reprogramming of overall epigenetic memory and specific parental

- genomic imprinting memory within donor cell-inherited nuclear genome be a major hindrance for the somatic cell cloning of mammals? – a review. *Ann. Anim. Sci.*, 18 (3): 623–638.
- Samiec M., Skrzyszowska M., Bochenek M. (2013 a). *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 (4): 735–752.
- Samiec M., Skrzyszowska M., Opiela J. (2013 b). Creation of cloned pig embryos using contact-inhibited or serum-starved fibroblast cells analysed *intra vitam* for apoptosis occurrence. *Ann. Anim. Sci.*, 13 (2): 275–293.
- 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: Article ID 814686, 13 pages.
- Sansinena M.J., Hylan D., Hebert K., Denniston R.S., Godke R.A. (2005). Banteng (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer. *Theriogenology*, 63 (4): 1081–1091.
- Schaetzlein S., Rudolph K.L. (2005). Telomere length regulation during cloning, embryogenesis and ageing. *Reprod. Fertil. Dev.*, 17 (1–2): 85–96.
- 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 (2): 440–458.
- Shi W., Zakhartchenko V., Wolf E. (2003). Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation*, 71 (2): 91–113.
- Shi D., Lu F., Wei Y., Cui K., Yang S., Wei J., Liu Q. (2007). Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol. Reprod.*, 77 (2): 285–291.
- Shiels P.G., Kind A.J., Campbell K.H.S., Waddington D., Wilmut I., Colman A., Schnieke A.E. (1999). Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature*, 399 (6734): 316–317.
- Shin T., Kraemer D., Pryor J., Liu L., Rugila J., Howe I., Buck S., Murphy K., Westhusin M. (2002). A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 415 (6874): 859.
- Skrzyszowska M., Smorąg Z., Słomski R., Kątska-Książkiewicz L., Kalak R., Michalak E., Wielgus K., Lehmann J., Lipiński D., Szalata M., Pławski A., Samiec M., Jura J., Gajda B., Ryńska B., Pieńkowski M., (2006 a). Generation of transgenic rabbits by the novel technique of chimeric somatic cell cloning. *Biol. Reprod.*, 74 (6): 1114–1120.
- Skrzyszowska M., Karasiewicz J., Bednarczyk M., Samiec M., Smorąg Z., Waś B., Guskiewicz A., Korwin-Kossakowski M., Górniewska M., Szablisty E., Modliński J.A., Łakota P., Wawrzyńska M., Sechman A., Wojtysiak D., Hrabia A., Mika M., Lisowski M., Czekalski P., Rząsa J., Kapkowska E. (2006 b). Generation of cloned and chimeric embryos/offspring using the new methods of animal biotechnology. *Reprod. Biol.*, 6 (Suppl. 1): 119–135.
- Srirattana K., Matsukawa K., Akagi S., Tasai M., Tagami T., Nirasawa K., Nagai T., Kanai Y., Parnpai R., Takeda K. (2011). Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. *Anim. Sci. J.*, 82 (2): 236–243.
- Takeda K. (2013). Mitochondrial DNA transmission and confounding mitochondrial influences in cloned cattle and pigs. *Reprod. Med. Biol.*, 12 (2): 47–55.
- Tanabe Y., Kuwayama H., Wakayama S., Nagatomo H., Ooga M., Kamimura S., Kishigami S., Wakayama T. (2017). Production of cloned mice using oocytes derived from ICR-outbred strain. *Reproduction*, 154 (6): 859–866.
- Tessanne K., Golding M.C., Long C.R., Peoples M.D., Hannon G., Westhusin M.E. (2012). Production of transgenic calves expressing an shRNA targeting myostatin. *Mol. Reprod. Dev.*, 79 (3): 176–185.
- Tian X.C., Xu J., Yang X. (2000). Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat. Genet.*, 26 (3): 272–273.

- Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394 (6691): 369–374.
- Wakayama S., Ohta H., Hikichi T., Mizutani E., Iwaki T., Kanagawa O., Wakayama T. (2008). Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20°C for 16 years. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105 (45): 17318–17322.
- Wang J., Yang P., Tang B., Sun X., Zhang R., Guo C., Gong G., Liu Y., Li R., Zhang L., Dai Y., Li N. (2008). Expression and characterization of bioactive recombinant human α -lactalbumin in the milk of transgenic cloned cows. *J. Dairy Sci.*, 91 (12): 4466–4476.
- Wang Y., Zhao S., Bai L., Fan J., Liu E. (2013). Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. *Biomed Res. Int.*, 2013: Article ID 580463, 9 pages.
- Wang Y., Ding F., Wang T., Liu W., Lindquist S., Hernell O., Wang J., Li J., Li L., Zhao Y., Dai Y., Li N. (2017). Purification and characterization of recombinant human bile salt-stimulated lipase expressed in milk of transgenic cloned cows. *PLoS One*, 12 (5): e0176864.
- Wani N.A., Hong S.B. (2018). Source, treatment and type of nuclear donor cells influences *in vitro* and *in vivo* development of embryos cloned by somatic cell nuclear transfer in camel (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*, 106: 186–191.
- Wani N.A., Wernery U., Hassan F.A., Wernery R., Skidmore J.A. (2010). Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 82 (2): 373–379.
- Wani N.A., Vettical B.S., Hong S.B. (2017). First cloned Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) calf produced by interspecies somatic cell nuclear transfer: A step towards preserving the critically endangered wild Bactrian camels. *PLoS One*, 12 (5): e0177800.
- Watanabe S., Iwamoto M., Suzuki S.I., Fuchimoto D., Honma D., Nagai T., Hashimoto M., Yazaki S., Sato M., Onishi A. (2005). A novel method for the production of transgenic cloned pigs: electroporation-mediated gene transfer to non-cultured cells and subsequent selection with puromycin. *Biol. Reprod.*, 72 (2): 309–315.
- 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 (12): 1001–1015.
- Wilmot I., Beaujean N., de Sousa P.A., Dinnyes A., King T.J., Paterson L.A., Wells D.N., Young L.E. (2002). Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 419 (6907): 583–586.
- Woods G.L., White K.L., Vanderwall D.K., Li G.P., Aston K.I., Bunch T.D., Meerdo L.N., Pate B.J. (2003). A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, 301 (5636): 1063.
- Xu J., Yang X. (2001). Telomerase activity in early bovine embryos derived from parthenogenetic activation and nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 64 (3): 770–774.
- Yan Z.H., Zhou Y.Y., Fu J., Jiao F., Zhao L.W., Guan P.F., Huang S.Z., Zeng Y.T., Zeng F. (2010). Donor-host mitochondrial compatibility improves efficiency of bovine somatic cell nuclear transfer. *BMC Dev. Biol.*, 10: 31.
- Yan H., Yan Z., Ma Q., Jiao F., Huang S., Zeng F., Zeng Y. (2011). Association between mitochondrial DNA haplotype compatibility and increased efficiency of bovine intersubspecies cloning. *J. Genet. Genomics*, 38 (1): 21–28.
- 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 (3): 295–302.
- Yang B.Z., Yang C.Y., Li R.C., Qin G.S., Zhang X.F., Pang C.Y., Chen M.T., Huang F.X., Li Z., Zheng H.Y., Huang Y.J., Liang X.W. (2010). An inter-subspecies cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) obtained by transferring of cryopreserved embryos via somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Domest. Anim.*, 45 (5): e21–e25.
- Yang B., Wang J., Tang B., Liu Y., Guo C., Yang P., Yu T., Li R., Zhao J., Zhang L., Dai Y., Li N. (2011). Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle. *PLoS One*, 6 (3): e17593.
- Yin X.J., Lee H.S., Lee Y.H., Seo Y.I., Jeon S.J., Choi E.G., Cho S.J., Cho S.G., Min W., Kang S.K., Hwang W.S., Kong I.K. (2005). Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction*, 129 (2): 245–249.

- Yin X.J., Lee H.S., Yu X.F., Kim L.H., Shin H.D., Cho S.J., Choi E.G., Kong I.K. (2008 a). Production of second-generation cloned cats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 69 (8): 1001–1006.
- Yin X.J., Lee H.S., Yu X.F., Choi E., Koo B.C., Kwon M.S., Lee Y.S., Cho S.J., Jin G.Z., Kim L.H., Shin H.D., Kim T., Kim N.H., Kong I.K. (2008 b). Generation of cloned transgenic cats expressing red fluorescence protein. *Biol. Reprod.*, 78 (3): 425–431.
- Zhang P., Liu P., Dou H., Chen L., Chen L., Lin L., Tan P., Vajta G., Gao J., Du Y., Ma R.Z. (2013). Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 fatty acids. *PLoS One*, 8 (2): e55941.
- Zhou Q., Renard J.P., Le Friec G., Brochard V., Beaujean N., Cherifi Y., Fraichard A., Cozzi J. (2003). Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, 302 (5648): 1179.
- Zhou Z.R., Zhong B.S., Jia R.X., Wan Y.J., Zhang Y.L., Fan Y.X., Wang L.Z., You J.H., Wang Z.Y., Wang F., (2013). Production of myostatin-targeted goat by nuclear transfer from cultured adult somatic cells. *Theriogenology*, 79 (2): 225–233.

INHERITANCE OF MITOCHONDRIAL DNA AND EPIGENETIC REPROGRAMMING OF CHROMOSOME TELOMERES IN THE SOMATIC CELL CLONING OF MAMMALS

Summary

Taking into account the current state of the art in the cloning of mammalian species by somatic cell nuclear transfer (SCNT), which represents one of the most important assisted reproductive technologies (ARTs), the efficiency of somatic cell cloning appears to be still characterized by the relatively low rates of SCNT-derived offspring born in relation to the numbers of enucleated oocytes reconstructed with somatic cell nuclei. The efficiency of somatic cell cloning in different species of domesticated and free-living animals is dependent, to the highest extent, on epigenetic reprogrammability of nuclear donor cell-inherited genome before and after artificial activation of reconstructed oocytes as well as following initiation and progression of preimplantation development of resultant SCNT-derived embryos. The capability of somatic cell nuclei to be reprogrammed both in a cytoplasm of nuclear-transferred oocytes, and in descendant blastomeres of developing cloned embryos turns out to be largely affected by heritability of mitochondrial genome fractions stemming from reconstruction of enucleated oocytes with donor cell nuclei. High incidence of mitochondrial DNA (mtDNA) heteroplasmy that results from increased heritability of mitochondria originating from nuclear donor cells can bring about the impairments in the intergenomic communication between mtDNA and nuclear DNA (nDNA) molecules during preimplantation development of cloned embryos. These impairments can contribute to aberrant epigenetic reprogramming of somatic cell-inherited genomic DNA in mammalian nuclear-transferred embryos. Diminished reprogrammability of nuclear genome transcriptional activity in the blastomeres of SCNT-derived embryos can also be triggered by aberrant epigenetic rearrangements within terminal ends of nuclear donor cell-descended chromosomes. For that reason, failures in epigenetic reprogramming of somatic cell chromosomes can lead to enhanced abrasion of telomeres, which expedites the processes of epigenomic and replicative senescence in the cells constituting tissues and organs of cloned fetuses and progeny. As a consequence, SCNT-derived conceptuses and offspring undergo accelerated anatomo-histological and physiological ageing. Therefore, this research paper sought to overview current knowledge that allows deciphering the molecular mechanisms underlying not only interactions between nuclear and mitochondrial compartments in cloned embryos, but also incorrect epigenetic reprogrammability of telomeres within somatic cell-inherited chromosomes. The latter gives rise to chromosomal telomere attrition and intracellular epigenomic senescence in the tissues and organs of cloned fetuses and progeny. Elucidating all these mechanisms will be helpful to solve the problems arising from unsatisfactory SCNT efficiency and opens up new possibilities for common application of mammalian cloning technology in transgenic research aimed at the fields of biopharmacology and biomedicine.

Key words: somatic cell nuclear transfer (SCNT), mammalian cloned embryo, mitochondrial genome (mtDNA), nuclear genome (nDNA), intergenomic communication, epigenetic reprogramming, telomere