



Przebieżnictwo sygnału wapniowego w zrekonstruowanych oocytach i klonalnych zarodkach ssaków w warunkach sztucznej aktywacji

Marcin Samiec

Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki
– Państwowy Instytut Badawczy, Balice k. Krakowa

Calcium signal transduction in reconstructed oocytes and somatic cell nuclear transfer embryos of mammals in the conditions of artificial activation

Summary

One of the most important factors that affect the developmental competences of mammalian somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos is artificial activation of reconstructed oocytes (clonal cybrids). However, calcium signal transduction in a cytosol of such oocytes that has been initiated incorrectly by physical or chemical activating factors (electric pulses or specific ionophore antibiotics) can stimulate not only the development of cloned embryos. It can also induce apoptotic cell death following considerable elevation in intracellular calcium concentration and thereby excitotoxicity of Ca^{2+} ions. Therefore, the basic objective of this paper is to present the current knowledge on the mechanisms regulating biochemical and biophysical proapoptotic changes within SCNT embryo which were triggered by the process of excitotoxic calcium signal transmission resulting from an improper artificial activation of clonal cybrid.

Adres do korespondencji

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

Key words:

SCNT, reconstructed oocyte, activation, apoptosis, calcium cation, $InsP_3$, ryanodin, ionotropic receptor, calcium-release channel, CaBP.

1. Wstęp

Wydajność klonowania somatycznego ssaków pozostaje wciąż na niskim poziomie. U świń efektywność techniki klonowania metodą transplantacji jąder komórek somatycznych do enukle-

owanych oocytów (SCNT; ang. *Somatic Cell Nuclear Transfer*), mierzona odsetkiem uzyskanych blastocyst w stosunku do liczby zrekonstruowanych zarodków zaklasyfikowanych do hodowli pozaustrojowej, utrzymuje się w granicach 10-30%. Jest ona w niewielkim stopniu niższa niż skuteczność procedur zapłodnienia *in vitro* (IVF, ang. *In Vitro Fertilization*) u tego gatunku, która oceniana jest na podstawie odsetka zarodków rozwijających się do stadium blastocysty w warunkach *ex vivo*. Ta ostatnia waha się bowiem w przedziale od 15 do 35%. Efektywność metod SCNT i IVF u świni domowej jest w znacznym stopniu ograniczona przez stosunkowo wysoką częstość występowania symptomów śmierci apoptotycznej w komórkach hodowanych *in vitro* zarodków.

Uruchomienie molekularnego scenariusza apoptozy w hodowanych *in vitro* zarodkach świni i innych gatunków ssaków jest podstawowym elementem mechanizmu regulatorowego przedimplantacyjnej fazy embriogenezy oraz śmiertelności zarodków w stadium blastocysty (1,2). Zapoczątkowanie zmian proapoptotycznych w blastomerach zarodków wywiera istotny wpływ na obniżenie zarówno ich jakości, jak i przedimplantacyjnego potencjału rozwojowego. Niemniej jednak kondycja strukturalno-funkcjonalna blastocyst rozwijających się z zapłodnionych *in vivo* oocytów, która wyrażana jest jakością morfologiczną, ocenianą na bazie całkowitej liczby komórek, oraz jakością biochemiczną, ocenianą na podstawie detekcji zmian apoptotycznych w komórkach wężła zarodkowego (ICM, ang. *Inner Cell Mass*) i/lub trofoblastu, jest znacznie wyższa niż w przypadku blastocyst uzyskiwanych na drodze klonowania somatycznego lub pozaustrojowego zapłodnienia oocytów.

Jedną z głównych przyczyn uruchomienia szlaku sygnałowego apoptozy w zarodkach uzyskiwanych techniką klonowania somatycznego może stanowić zastosowanie nieodpowiednich procedur sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów (tj. cybryd klonalnych). Procedury takie generują bowiem często drastyczne naruszenie homeostazy wapniowej (izokalcemii) oocytu zrekonstruowanego z jądra komórki somatycznej. W następstwie wszelkich odchyień od oscylacyjnego sposobu wynurzania się fal przyrostu stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie zaktywowanej cybrydy klonalnej indukowana jest tzw. hiperkalcemiczna śmierć apoptotyczna w komórkach rozwijającego się z niej zarodka. Określenie wpływu aktywacji zrekonstruowanych oocytów prowokowanej egzogennymi czynnikami o zróżnicowanym stopniu inwazyjności parametrów fizykochemicznych na inicjację biochemicznych i biofizycznych symptomów proapoptotycznych w komórkach zarodków klonalnych ssaków może mieć zatem decydujące znaczenie dla prawidłowości oceny kompetencji rozwojowych tych zarodków zarówno w przed-, jak i poimplantacyjnej fazie embriogenezy, a następnie fetogenezy. Dlatego też ocena zdolności aktywujących zastosowanych induktorów oscylacji wapniowych w zrekonstruowanych oocytach powinna być weryfikowana na bazie określenia stopnia progresji genetycznie zaprogramowanego scenariusza apoptozy w komórkach zarodków klonalnych, rozwijających się w warunkach hodowli *in vitro*.

W badaniach przeprowadzonych przez Hao i wsp. (3) udowodniono, że natężenie/częstość procesu zaprogramowanej genetycznie śmierci, która była diagnozo-

wana na podstawie detekcji mono- i/lub oligonukleosomowej fragmentacji DNA jądrowego techniką TUNEL (ang. *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick-end Labeling*), wzrasta w komórkach wężła zarodkowego i trofoblastu blastocyst świni wraz z wydłużeniem czasu hodowli *in vitro* zarodków klonalnych zrekonstruowanych z jąder konfluentnych fibroblastów tkanki skórnej ucha prosięcia. Pierwsze symptomy późnoapoptotycznego trawienia nukleolitycznego DNA genomowego są diagnozowane w komórkach blastocyst klonalnych uzyskanych w 6. dniu hodowli *in vitro*, a nasilenie tego procesu jest obserwowane od 6. do 8. dnia hodowli pozaustrojowej. Zwiększenie frekwencji objawów fragmentacji genomu jądrowego, które towarzyszą późnym fazom samobójczej śmierci fizjologicznej komórek w blastocystach klonalnych ssaków, może być spowodowane zaburzeniami w stopniu ploidalności komórek zarodkowych, uzależnionymi od metod sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów. Te ostatnie są wynikiem mutacji genomowych, czyli liczbowych aberracji chromosomowych typu euploidii i/lub aneuploidii w blastomerach zarodków klonalnych. Nukleoliza DNA w komórkach blastocyst klonalnych może być także indukowana wskutek wystąpienia i akumulacji błędów w strukturalnym przemodelowaniu chromatyny jądrowej oraz w funkcjonalnym przeprogramowaniu epigenetycznie uwarunkowanej aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego w przedimplantacyjnej fazie rozwoju zarodkowego. Wady te określane są łącznie mianem mutacji epigenomowych. Stopień zaawansowania procesu późnoapoptotycznej fragmentacji mono- oraz oligonukleosomowej DNA genomowego w komórkach blastocyst klonalnych może być również pozytywnie skorelowany z częstotliwością występowania nieprawidłowych interakcji jądrowo-cytoplazmatycznych w zrekonstruowanych oocytach świni, poddanych sztucznej aktywacji fizycznej i/lub chemicznej. Wzorzec akompatybilnej komunikacji między genomem jądrowym a genomem mitochondrialnym, uzależniony od stopnia współwystępowania (hybrydyzacji) heteroplazmatycznych kopii mtDNA (pochodzenia matczynego oraz somatycznego) w blastomerach przedimplantacyjnych zarodków klonalnych, może także przyczyniać się do nasilenia objawów śmierci apoptotycznej komórek ICM oraz trofoektodermy blastocyst na poziomie genetycznym, biochemicznym oraz ultrastrukturalnym i morfologicznym (3-6).

W doświadczeniach Hao i wsp. (3) pozytywne w reakcji TUNEL zmiany późnoapoptotyczne DNA genomowego wykryto w 100,0% uzyskanych blastocyst klonalnych rozwijających się z zarodków świni zrekonstruowanych z jąder postnatalnych fibroblastów tkanki skórnej. Podobnie, 100-procentowy odsetek późnoapoptotycznych blastocyst klonalnych wykazano w analizie TUNEL w przypadku zarodków bydła zrekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych lub fibroblastów skóry ucha dojrzałej somatycznie i rozplodowo krowy (5). W badaniach przeprowadzonych przez Hao i wsp. (3) oraz Jang'a i wsp. (5), do zabiegu klonowania somatycznego świń oraz bydła mogły zostać wyselekcjonowane wczesnoapoptotyczne komórki fibroblastyczne o prawidłowym wyglądzie morfologicznym, w których jednak zainicjowane zostały już zmiany biochemiczne i biofizyczne, m.in. takie jak translokacja

reszt fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej monowarstwy matrycy lipidowej plazmolemy lub postępujące zwiększenie przepuszczalności błony plazmatycznej dla niektórych związków drobnocząsteczkowych na skutek formowania się w dwuwarstwie lipidowej mikrokanalów/mikroporów bez utraty integralności plazmolemy. Te zjawiska i procesy o podłożu molekularnym mogą nie znajdować jeszcze odzwierciedlenia w stopniu zaawansowania destrukcyjnych zmian strukturalnych, czyli innymi słowy nie pokrywają się jeszcze z transformacjami obrazu morfologicznego komórki somatycznej. Z kolei, transdukcja sygnałów apoptotycznych z komórek-dawców egzogennej informacji genetycznej do cytoplazmy oocytów pozbawionych własnego genomu jądrowego mogła doprowadzić do indukcji i/lub progresji molekularnego scenariusza apoptozy również w hodowanych *in vitro* zarodkach klonalnych rozwijających się ze zrekonstruowanych oocytów, które poddawane były działaniu różnych czynników aktywujących. W dalszej perspektywie czasowej, efektem zainicjowania zmian proapoptotycznych w przedimplantacyjnych zarodkach rozwijających się z cybryd klonalnych zrekonstruowanych z jąder wczesnoapoptotycznych komórek somatycznych mógł być wzrost odsetka blastocyst, których komórki wykazują wykrywalne w wyniku reakcji TUNEL symptomy późnej fazy destrukcyjnej apoptozy, do poziomu 100%. Ponadto w badaniach Jang'a i wsp. (5) udowodniono, że indeks komórek późnoapoptotycznych, pozytywnych w reakcji TUNEL, istotnie wzrasta w blastocystach bydła rozwijających się z hodowanych zarodków klonalnych, zrekonstruowanych z jąder starzejących się replikacyjnie fibroblastów płodowych lub fibroblastów skóry dorosłego osobnika, które poddawano procedurze głodzenia po długoterminowej hodowli *in vitro*, obejmującej od 52 do 56 podwojeń populacji. Wydaje się, że poddawane długotrwałej hodowli *in vitro* komórki-dawcy jąder podlegają procesowi starzenia replikacyjnego, indukowanego postępującym skracaniem się długości telomerów oraz są znacznie bardziej podatne na mutacje genowe i chromosomowe niż komórki pochodzące z wczesnych pasaży. Ponadto w komórkach fibroblastycznych, które przeszły wiele cykli podziałowych, akumulowane są liczne zaburzenia w epigenetycznych modyfikacjach DNA genomowego (tzw. mutacje epigenomowe), obejmujące zaawansowane zmiany w stopniu metylacji reszt cytozyny DNA oraz zwiększenie częstości procesów deacetylacji reszt lizyny i argininy histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. Mutacje genomowe, nieprawidłowe dziedziczenie pamięci epigenetycznej oraz stopniowa redukcja końcowych odcinków chromosomów mogą łącznie prowadzić do uruchomienia w hodowanych komórkach somatycznych, stanowiących źródło dawców jąder w procedurze klonowania, molekularnego scenariusza apoptozy. Ponieważ biochemiczne czy biofizyczne zmiany wczesnoapoptotyczne nie były monitorowane przed selekcją komórek fibroblastycznych do zabiegu rekonstrukcji enukleowanych oocytów, wysoce prawdopodobnym zjawiskiem mogła być transmisja sygnałów apoptotycznych z cytozolu lub nukleoplazmy komórek-dawców jąder do ooplastów. Nie można zatem wyeliminować możliwości wpływu długotrwałej hodowli *in vitro* komórek fibroblastycznych na obniżenie żywotności oraz kondycji strukturalno-funk-

cyjonalnej bydlęcych blastocyst klonalnych poprzez wzrost wartości indeksu pozytywnych w reakcji TUNEL jąder komórek późnoapoptotycznych, w których doszło do zaawansowanej fragmentacji chromatyny do małowzrostkowych odcinków genomu odpowiadających długości mononukleosomowego DNA (180-200 pz) lub jego wielokrotności (5).

2. Fizjologiczny wzorzec aktywacji oocytów ssaków

2.1. Biochemiczne i biofizyczne aspekty mechanizmu wewnątrzkomórkowego przekazywania wapniowego sygnału aktywującego oocyt w procesie zapłodnienia

Podstawowym elementem transdukcji sygnału stymulującego dojrzały oocyt do wznowienia przejściowo zablokowanej w metafazie II (MII) mejozy i uruchomienia zarodkowego programu rozwojowego są oscylacyjne zmiany stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie $[Ca^{2+}]_c$, indukowane przez plemnik podczas zapłodnienia. Mobilizacja wewnątrzkomórkowych rezerwuarów wapniowych (głównie w retikulum endoplazmatycznym gładkim – ER_{ag}, ang. *Agranular Endoplasmic Reticulum*) oocytów generuje serię powtarzalnych wyrzutów kationów wapnia, które przyjmują charakter szybkich, krótkotrwałych oscylacji o niskiej częstotliwości i wysokiej amplitudzie odchylenia od jonowej równowagi (homeostazy) stężeniowej w cytozolowej gospodarce kalcemicznej $h-[Ca^{2+}]_c$. Łączny czas trwania tych cyklicznych wahań w przyroście $[Ca^{2+}]_c$ oocytów świń i bydła wynosi około 2-3 godzin (7,8), a w oocytach myszy i królików – około 3-4 godzin (8-10). Gwałtowne wynurzanie się kolejnych fal przyrostu $[Ca^{2+}]_c$ następuje w oocytach świń i bydła z częstotliwością co 8 do 25 minut (11,12). Pulsacyjne uwalnianie jonów wapnia z depozytów wewnątrzkomórkowych chroni oocyt przed toksycznym wpływem podwyższonego poziomu Ca^{2+} , utrzymującego się w ooplazmie przez dłuższy czas (8).

2.2. Molekularne uwarunkowania transdukcji sygnału wapniowego w zapłodnionych oocytach

W jednej z hipotez zakłada się, że aktywacja oocytu w czasie zapłodnienia zachodzi za pośrednictwem glikoprotein błony komórkowej główki plemnika, które spełniają rolę ligandów (agonistów) łączących się z receptorami powierzchniowymi oolemy sprzężonymi z białkami G, czyli białkami wiążącymi nukleotydy guaninowe z grupy guanozyno-5'-trifosforanów (GTP, ang. *Guanosine-5'-Triphosphate*), lub z receptorami przezbłonowymi oocytu o aktywności kinazy tyrozynowej (PTK, ang. *Protein Tyrosine Kinase*). Białka G lub receptorowe kinazy tyrozynowe biorą udział

w przekazywaniu i transformacji egzogenego sygnału aktywującego na kaskadę enzymatyczną, zapoczątkowaną przez izoformy β i γ fosfolipazy, czyli fosfoinozydylazy rodziny/typu C (PLC- β /PLC- γ , ang. *Phospholipase C Type- β / γ Isoforms*). Enzym ten katalizuje rozkład hydrolytyczny fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP₂, ang. *Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate*), zakotwiczonego w wewnętrznej (cytoplazmatycznej) warstwie błony komórkowej oocytu, do *myo*-inozytolo-1,4,5-trisfosforanu (InsP₃, ang. *Myo-Inositol-1,4,5-Trisphosphate*) oraz 1,2-diacylglicerolu (DAG, ang. *Diacylglycerol*). 1,4,5-trisfosforan *myo*-inozytolo jest wtórnym przekaźnikiem sygnału aktywującego, odpowiedzialnym za otwarcie kanałów wapniowych poprzez InsP₃-zależne receptory (InsP₃R, ang. *Myo-Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptor*) w błonach retikulum endoplazmatycznego gładkiego. Uwolnione kationy wapnia wiążą się preferencyjnie z kalmoduliną, która z kolei reguluje aktywność wielu enzymów m.in. fosfataz, kinaz białkowych A i C (PKA, PKC, ang. *Protein Kinase A/C*) czy zależnej od Ca²⁺ i kalmoduliny kinazy białkowej typu II (CaM-PK-II, ang. *Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II*), a także zlokalizowanej w oolemmie ATPazy zależnej od Ca²⁺-kalmoduliny i jonów Mg²⁺ (13,14). Wzrost koncentracji jonów Ca²⁺ w ooplazmie i stymulacja aktywności biokatalitycznej kinazy CaM-PK-II prowadzi do nasilenia biodegradacji cykliny B, podjednostki regulatorowej czynnika dojrzewania mejotycznego (MPF, ang. *Meiosis/Maturation-Promoting Factor*). Konsekwencją tego jest gwałtowny spadek stężenia i aktywności czynnika MPF oraz stopniowa inaktywacja czynnościowa kaskady enzymatycznej kinaz regulowanych przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ERKs/MAPKs, ang. *Extracellular Signal-Regulated Kinases/Mitogen-Activated Protein Kinases*), warunkujących wielofunkcyjną aktywność czynnika cytotatycznego (CSF, ang. *Cytostatic Factor*). Dochodzi do wznowienia i ukończenia mejozy zahamowanej w stadium MII. Po wyrzuceniu II ciała kierunkowego (II ck) w stadium telofazy II (TII) następuje przejście z mejotycznej do mitotycznej kontroli cyklu komórkowego bruzdkowania, despiralizacja chromosomów matczynych oraz niezależna dekondensacja chromatyny plemnika, odtworzenie otoczek jądrowych i uformowanie interfazowych jąder komórkowych – przedjądzy zygoty (żeńskie i męskie) (15).

Na podstawie najnowszych wyników badań nad wyjaśnieniem mechanizmu transdukcji sygnału wapniowego w oocytach ssaków poddanych zapłodnieniu *in vitro* dowodzi się, że poza ścieżkami sygnalizacji jonowej indukowanymi za pośrednictwem fosfodiesteraz pochodzenia endogenego (wewnątrzocytarnego), tj. z udziałem izoenzymów podtypu β lub γ fosfolipaz z rodziny C (PLC- β lub PLC- γ) (16), istnieje również alternatywny system przekazywania sygnału wapniowego uruchamiany przez czynniki enzymatyczne pochodzenia egzogenego, tzn. plemnikowego (17,18). Stymulacja tej ostatniej ścieżki sygnalizacji jonowej w oocytach w stadium MII odbywa się na drodze reakcji hydrolytycznego rozkładu wiązań fosfodiesterowych w glicerofosfolipidach inozytoloowych oolemmy. Jest ona katalizowana przez specyficzne izoformy ζ (zeta) fosfolipaz typu C (PLC- ζ), pochodzące z zewnątrzkomórkowych domen powierzchniowych, formowanych głównie przez białka glikoproteinowe błony komórkowej (segmentu równikowego w obrębie czapeczki tylnej) główki plemni-

ków. Cząsteczki enzymu PLC- ζ wprowadzane są zatem do wewnątrzkomórkowej, tj. cytozolowej, warstwy oolemy zapładnianego oocytu w następstwie fuzji błon plazmatycznych gamety męskiej i żeńskiej (19). Na tej podstawie można wnioskować, że mikrośrodowisko cytoplazmatyczne lub cytoskielet strefy korykalnej zapłodnionej komórki jajowej są bogate w szereg rozpuszczalnych czynników białkowych wchłoniętych wraz z cytozolem i jądrem plemnika lub nierozpuszczalnych, plemnikowych czynników podbłonowych (niecytozolowych), ulegających inkorporacji (internalizacji) do struktury membranoszkieletu oocytu.

3. Systemy sztucznej aktywacji oocytów ssaków zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych

W klonowaniu ssaków metodą SCNT wykorzystywane są różne strategie aktywacji zrekonstruowanych oocytów stanowiących z cytologicznego punktu widzenia somato-gametogeniczne hybrydy jądrowo-cytoplazmatyczne (tzw. rekonstruowane cybrydy klonalne lub cybrydowe zygoty klonalne). Protokół sztucznej aktywacji oocytów w procedurze SCNT dotyczy nie tylko rodzaju czynnika aktywującego, ale także momentu jego zastosowania w stosunku do etapu rekonstrukcji enukleowanych oocytów, czyli ooplastów (cytoplastów). Czynnikiem aktywującym powoduje uwalnianie kationów wapniowych, albo bezpośrednio z depozytów wewnątrzocytarnych, albo dokomórkowy transport jonów Ca^{2+} ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Sztuczne aktywatory stymulują transbłonowe domeny receptorowe kinazy tyrozynowej lub cząsteczki receptorów powierzchniowych sprzężonych z białkami G. Białka te z kolei biorą udział w przekazywaniu i transformacji egzogenego (jonowego lub cząsteczkowego) sygnału aktywującego na kaskadę enzymatyczną, zapoczątkowaną przez fosfolipazę C podtypu γ lub β (20).

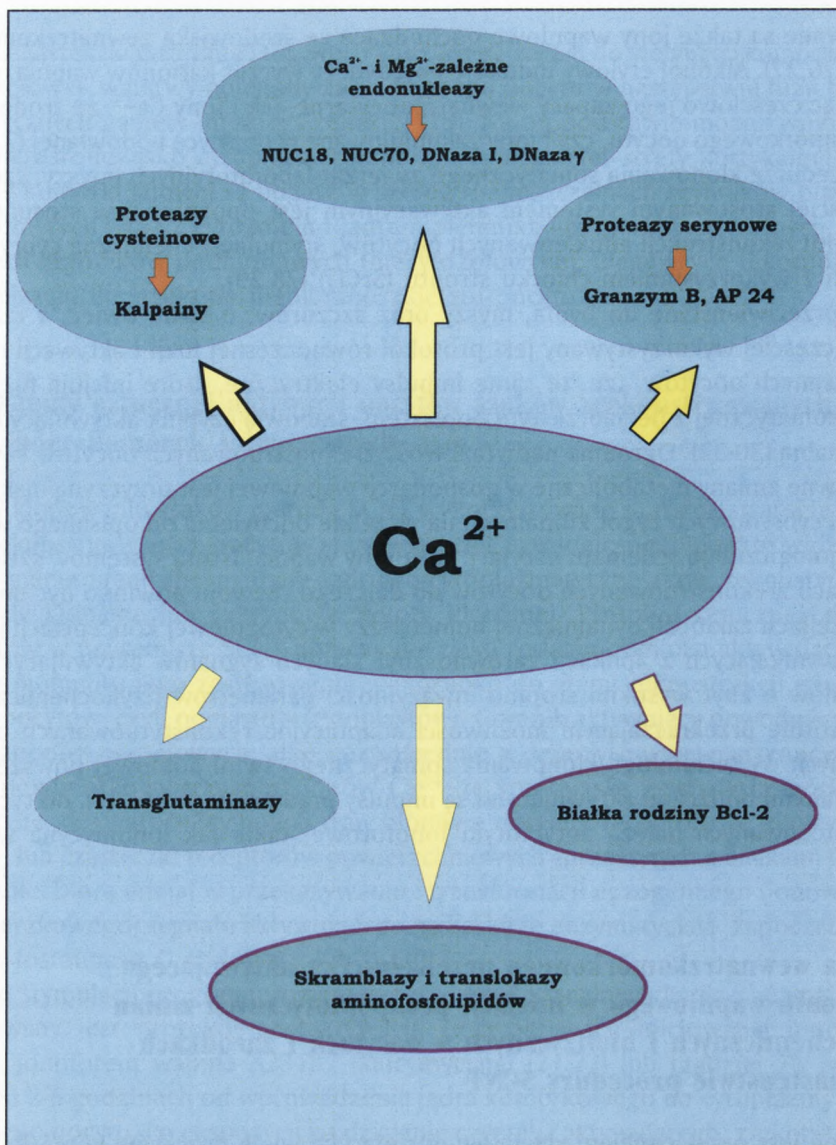
Do stymulacji programu rozwojowego cybryd klonalnych bydła i kóz najczęściej stosowany jest protokół postaktywacji, czyli aktywacji inicjowanej jonomycyną Ca^{2+} , jonoforem wapnia A23187 (kalcymycyną) (21,22) lub rzadziej 7% etanolem (23) po 2-6 godzinach od wprowadzenia jądra komórkowego do cytoplazmy enukleowanego oocytu. Po ekspozycji na działanie czynnika aktywującego, zrekonstruowane oocyty poddawane są kilkugodzinnej inkubacji w obecności niespecyficznego inhibitora kinaz cyklino-zależnych (CDKs, ang. *Cyclin-Dependent Kinases*), np. 6-dimetyloaminopuryny (6-DMAP, ang. *6-dimethylaminopurine*) lub odwracalnego supresora/represora syntezy białek, np. cykloheksimidu (CHXM, ang. *Cycloheximide*). Jonomycyna jako antybiotyk jonoforowy, mający zdolność indukowania transportu biernego nośnikowego (dyfuzji ułatwionej) i swoistej wymiany kationów jednowartościowych (H^+) oraz dwuwartościowych (Ca^{2+} i Mg^{2+}), mobilizuje w zrekonstruowanych oocytach bydła (24) i owiec (25) wyłącznie wewnątrzkomórkowe depozyty wapniowe, zakumulowane w cysternach siateczki śródplazmatycznej gładkiej. W przypadku oocytów świni, oprócz uruchamiania rezerwuarów wewnątrzkomórkowych, wyko-

rzystywane są także jony wapniowe pochodzące ze środowiska zewnątrzkomórkowego (26,27). Alkohol etylowy indukuje pojedynczy wyrzut kationów wapnia, wykorzystując częściowo jego zapasy wewnątrzocytarne, jak i jony Ca^{2+} ze środowiska pozakomórkowego oocytu, czyli jony zakumulowane w pożywce hodowlanej (7,8,23). W procedurze klonowania somatycznego zwierząt laboratoryjnych (myszy, szczury) najczęściej stosowanym systemem aktywacyjnym jest opóźniona, w stosunku do momentu rekonstrukcji enukleowanych oocytów, stymulacja chemiczna cybryd klonalnych z wykorzystaniem chlorku strontu (SrCl_2) (28,29).

W przeciwieństwie do bydła, myszy oraz szczurów, u świń, owiec, a rzadziej u kóz, częściej wykorzystywany jest protokół równoczesnej fuzji i aktywacji rekonstruowanych oocytów, tzn. te same impulsy elektryczne, które inicjują fuzję komórki somatycznej z bezjądrzastym ooplastem, stanowią czynnik aktywujący cybrydę klonalną (30-32). Ogromna nadwrażliwość zrekonstruowanych oocytów świni na gwałtowne zmiany metaboliczne w gospodarce wapniowej jest przyczyną niskiej tolerancji cybrydowych zygot klonalnych na wszelkie odchylenia od opisanego wcześniej fizjologicznego schematu oscylacji kationów wapnia. Istotą systemów sztucznej stymulacji zrekonstruowanych oocytów do dalszego rozwoju powinno być uniknięcie wszelkich zakłóceń dynamicznej homeostazy w cytozolowej koncentracji jonów Ca^{2+} , wynikających z aplikacji zarówno zbyt słabych sygnałów aktywujących, jak i sygnałów o zbyt wysokim stopniu inwazyjności parametrów fizykochemicznych, wielokrotnie przekraczającym możliwości adaptacyjne rekonstruowanych cybryd klonalnych. W technologii klonowania somatycznego świni domowej powszechnie stosowanymi bodźcami aktywującymi są impulsy prądu stałego (33,34), do tych rzadziej stosowanych należą antybiotyki jonoforowe, takie jak jonomycyna wapnia (35,36).

4. Rola wewnątrzkomórkowego przeżytnictwa aktywującego sygnału wapniowego w inicjacji proapoptotycznych zmian biochemicznych i biofizycznych w oocytach i zarodkach w następstwie procedury SCNT

Wapń jest przeżytnikiem sygnałów inicjujących wiele procesów komórkowych. W warunkach patologicznych może również indukować apoptozę, czyli samobójczą śmierć fizjologiczną komórki. Proapoptotyczne działanie jonów Ca^{2+} ma bezpośredni związek z występowaniem w komórkach zarodkowych Ca^{2+} -zależnych enzymów w błonie plazmatycznej, cytozolu, jądrze oraz w mitochondriach (37,38) (rys. 1). W komórkach apoptotycznych obserwowany jest wyciek wapnia z siateczki śródplazmatycznej, czyli retikulum endoplazmatycznego (ER, ang. *Endoplasmic Reticulum*) oraz wzrost jego zawartości w cytozolu i mitochondriach (39,40). Wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia wywiera istotny wpływ na zmiany aktywności proteaz cysteinowych, m.in. kalpain, proteaz serynowych, m.in. granzymu B, apoptotycznej



Rys. 1. Kationy wapnia w roli czynników regulujących aktywność białek pro- i antyapoptotycznych (szczegółowe objaśnienia w tekście).

proteazy o masie cząsteczkowej 24kDa (AP24, ang. *24 kDa Apoptotic Protease*), a także endonukleaz zależnych od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (NUC18, NUC70, DNaza I, DNaza γ , (41). Transglutaminazy to grupa enzymów, których aktywność również zależy od jonów Ca^{2+} . Enzymy te katalizują posttranslacyjne włączanie się amin do łańcuchów polipeptydowych oraz powodują sieciowanie białek. Istnieje przypuszczenie, że

transglutaminazy biorą udział w stabilizacji struktury komórki apoptotycznej oraz powstających z niej ciałek apoptotycznych (42). W mitochondriach jony Ca^{2+} stymulują produkcję reaktywnych form tlenu, przyspieszają depolaryzację oraz otwarcie megakanałów. W błonie mitochondrialnej procesy z udziałem wapnia regulowane są przez pro- i antyapoptotyczne białka rodziny Bcl-2 (ang. *B-cell Leukemia/Lymphoma-2*), których nazwa pochodzi od produktu ekspresji protoonkogenu *bcl-2*, pierwotnie wykrytego w białaczkach i chłoniakach wywodzących się z limfocytów B (43). Z kolei w błonie plazmatycznej jony Ca^{2+} uczestniczą w regulacji asymetrii fosfolipidów, są aktywatorami skramblazy oraz inhibitorami translokazy aminofosfolipidów (44). W wyniku zmian zachodzących w blastomerach z udziałem wapnia dochodzi do uwolnienia z mitochondriów proapoptotycznych białek, aktywacji kaspaz, fragmentacji DNA, zmiany asymetrii fosfatydyloseryny i apoptotycznej śmierci części komórek w hodowanych *in vitro* zarodkach klonalnych (45).

Nieprawidłowo zainicjowany przez sztuczne aktywatory, takie jak impulsy elektryczne (30,32) lub specyficzne antybiotyki jonoforowe (21,27,35), mechanizm transdukcji sygnału wapniowego w cytozolu oocytów ssaków zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych może na skutek niekontrolowanego przyrostu wewnątrzkomórkowego stężenia kationów wapnia nie tylko stymulować program rozwojowy zarodków klonalnych. Może on także w skrajnych przypadkach powodować uruchomienie systemu wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału apoptotycznego (np. w wyniku ekscytotoksyczności jonów Ca^{2+} , tj. toksyczności wywołanej przekroczeniem fizjologicznego progu oporności lub niewrażliwości komórki na nieprawidłowe parametry fizykochemiczne przyrostu cytoplazmatycznej koncentracji kationów wapnia) (3-6). Transmisja tego sygnału może nie posiadać charakteru falowej (oscylacyjnej) kaskady wyrzutów wapniowych, w przeciwieństwie do pulsacyjnych docytoplazmatycznych wylewów jonów Ca^{2+} z depozytów ER_{ag} , indukowanych w czasie fizjologicznej aktywacji oocytu będącego w bloku metafazowym II. podziału mejotycznego. Wykres funkcji przyrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych kationów wapnia w fazie wykonawczej apoptozy ma bowiem najczęściej przebieg ciągły w postaci krzywej logarytmicznej (46). Z kolei utrzymujący się przez dłuższy czas podwyższony próg koncentracji jonów Ca^{2+} w cytozolu klonalnych hybrid jądro-cytoplazmatycznych, indukujący zjawisko komórkowej ekscytotoksyczności kalcemicznej, może prowadzić do przekroczenia kontrolnego punktu nieodwracalności przez zapoczątkowany w komórkach zarodkowych proces apoptozy (47).

Fizjologiczny poziom stężenia jonów wapniowych w cytoplazmie zrekonstruowanego oocytu wynosi około 10^{-7} M/L, a po jego aktywacji wzrasta przejściowo do 10^{-5} - 10^{-6} M/L. Koncentracja taka może być utrzymywana w cytozolu przez cały pierwszy cykl mitotyczny bruzdkowania zygoty klonalnej aż do osiągnięcia okresu interfazowego przez zarodki w stadium 2-blastomerowym (14). Jednakże, jeżeli ten gwałtowny przyrost całkowitego stężenia wolnych kationów wapnia w cytoplazmie $[\text{Ca}^{2+}]_c$ komórki zachowuje jednakowy poziom we wszystkich przedziałach wewnątrzkomórkowych wskutek braku cyklicznych zmian w amplitudzie i częstotliwości falo-

wych wyrzutów wapniowych, przekroczona zostaje granica wewnątrzkomórkowej tolerancji na podwyższoną koncentrację wapnia, a tym samym utracona zostaje oporność zygoty klonalnej na toksyczność wolnych jonów Ca^{2+} (48). Wówczas maksymalny próg ogólnej wartości $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nie stanowi już wypadkowej oscylacyjnych wahań cząstkowych poziomów przyrostu koncentracji jonów Ca^{2+} w całej objętości cytozolu cybrydy klonalnej. Taki ciągły, logarytmiczny charakter przyrostu cytozolowej koncentracji kationów wapnia w czasie sztucznej aktywacji zrekonstruowanego oocytu może być wynikiem niekontrolowanego opróżnienia magazynów wewnątrzkomórkowych, bądź pojemnościowego napływu jonów Ca^{2+} ze środowiska zewnątrzkomórkowego (medium do elektroporacji błon cytoplazmatycznych), gdzie poziom jego stężenia może dochodzić nawet do 10^{-3} M/L. Generowane w wyniku sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów transcytozolowe oscylacje wapniowe o tzw. nadprogowych parametrach biofizycznych, które wielokrotnie przekraczają możliwości adaptacyjne cybrydowych zygot klonalnych, mogą także być przyczyną uruchomienia wewnątrzkomórkowego systemu sygnalizacji proapoptotycznej i równoczesnego zahamowania szlaków transdukcji sygnałów antyapoptotycznych (49). Nieprawidłowe parametry oscylacyjnego sposobu opróżniania magazynów wapnia zlokalizowanych w cysternach i kanalikach retikulum endoplazmatycznego gładkiego (agranularnego) obejmują: 1) zbyt dużą liczbę i zbyt długi czas trwania pojedynczych fal przyrostu cytozolowej koncentracji wapnia oraz 2) amplitudę poszczególnych wyrzutów jonów Ca^{2+} , determinującą zbyt wysoki poziom wychYLENIA od położenia równowagi stężeniowej $h\text{-}[\text{Ca}^{2+}]_c$. Nieprawidłowości te dotyczą także 3) znacznie wyższej od dopuszczalnej częstotliwości docytoplazmatycznych wylewów Ca^{2+} i 4) znacznie dłuższego łącznego czasu ich trwania. Mogą one inicjować skutek wzajemnej interferencji zależną od jonów wapniowych śmierć komórek dzielących się zarodków klonalnych. Każdy z tych parametrów może też indywidualnie indukować ścieżkę transmisji sygnału apoptotycznego z aktywowanych cybryd klonalnych do komórek zarodkowych (39,50).

5. Znaczenie wewnątrzkomórkowych depozytów wapniowych i białek wiążących jony Ca^{2+} dla procesów transdukcji proapoptotycznego sygnału hiperkalcemicznego w cybrydach klonalnych

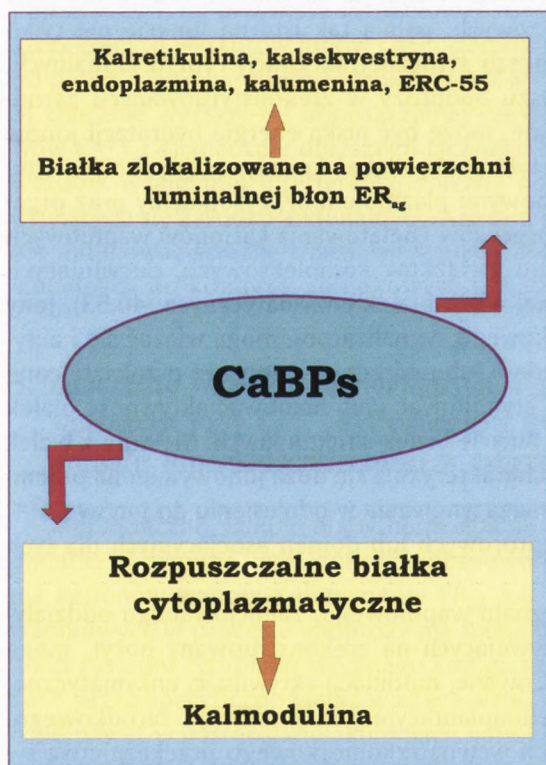
Metaboliczne zaburzenia w homeostazie stężeniowej wewnątrzocytarnej gospodarki wapniowej (tzw. izokalcemii) spowodowane brakiem pulsacyjnego uwalniania kationów wapnia z depozytów ER_{ag} lub nadprogowymi parametrami oscylacji wapniowych w procesie apoptozy nie mogą być cofnięte poprzez osłabienie wydajności systemu cytoplazmatycznego kompleksowania (chelatowania) wolnych jonów Ca^{2+} przez specyficzne białka wiążące wapń. Zakłócenia te nie mogą zostać odwrócone nawet w następstwie akumulacji kationów wapniowych w cysternach i kanalikach siateczki śródplazmatycznej gładkiej i ziarnistej, w matriks mitochondrialnej

oraz nukleoplazmie jądra komórkowego (40). Najistotniejszą rolę w pozytywnej regulacji cytozolowej pojemności buforowej oocytu oraz w inhibicji proapoptotycznego i cytostaticznego oddziaływania niezwiązanej stechiometrycznie, zjonizowanej formy wapnia na komórki zarodkowe, pełni, jak się wydaje, proces magazynowania jonów Ca^{2+} w retikulum endoplazmatycznym agranularnym oraz w mitochondriach (41,51). Całkowite stężenie wapnia w obu tych organellach osiąga wartość rzędu 10^{-2} - 10^{-3} M/L, przy czym jego koncentracja w formie wolnej, tj. nieschelatowanej przez białka adaptorowe, zakotwiczone w wewnętrznej warstwie błonowej cystern siateczki śródplazmatycznej, jest przynajmniej 1000-krotnie niższa (52).

Postępujące zjawisko ekscytotoksyczności systemu wtórnego przeżytnictwa sygnalu wapniowego indukuje lawinową aktywację szeregu białek enzymatycznych, regulujących przebieg śmierci apoptotycznej w komórkach dzielących się zarodków klonalnych. Pojawia się zatem pytanie, czy różnice w biofizycznym sposobie uwalniania jonów Ca^{2+} z wrażliwych na InsP_3 rezerwuarów wewnątrzkomórkowych oocytu lub w tzw. pojemnościowym dooocytarnym napływie Ca^{2+} (tj. zależnym od stopnia opróżnienia depozytów tego kationu zlokalizowanych w ER) są jedynymi czynnikami decydującymi albo o realizacji genetycznie zapisanego programu aktywującego prawidłowy rozwój zarodkowy, albo o stymulacji szlaku sygnalowego apoptozy? Jeżeli odpowiedź na to pytanie byłaby pozytywna, to warto dociec, jakie właściwości fizykochemiczne kationów wapniowych sprawiają, że to właśnie one, a nie jony innych metali dwu- lub jednowartościowych, pełnią tak istotną funkcję nie tylko w mechanizmach regulatorowych procesu sztucznej aktywacji cybrzyd klonalnych, lecz także w molekularnym scenariuszu apoptozy w zrekonstruowanych zarodkach? Główną przyczyną, jak się wydaje, może być niska energia hydratacji jonów Ca^{2+} oraz zdolność tych kationów do tworzenia wiązań koordynacyjnych z różnymi składnikami białkowymi lub fosfolipidowymi plazmolemy, cytoplazmy oraz organelli komórkowych. Z kolei efektem procesów chelatowania kationów wapniowych jest przejściowe powstawanie szeregu związków kompleksowych, decydujących o zmianach aktywności biokatalitycznej wielu białek enzymatycznych (40,53). Jony wapnia, pełniąc rolę wewnątrzkomórkowego sygnalizatora, mogą wiązać się i aktywować enzymy komórkowe bezpośrednio lub pośrednio – poprzez przekształcone konformacyjnie białka wiążące wapń, stymulować i/lub hamować aktywność białek enzymatycznych, a także modyfikować funkcje białek strukturalnych. Niektóre z białek adaptorowych kationów wapniowych charakteryzują się dużą jonowymienną pojemnością chelatowania lub pojemnością magazynowania w odniesieniu do jonów Ca^{2+} , ponieważ posiadają kilka miejsc receptorowych lub domen asocjacyjnych dla tych nieorganicznych ligandów (53).

Różnice w szlakach transdukcji sygnalu wapniowego, zainicjowanego oddziaływaniem egzogennych czynników aktywujących na zrekonstruowany oocyt, mogą znajdować odzwierciedlenie w zróżnicowanej modulacji aktywności enzymatycznej białek niezbędnych do regulacji przedimplantacyjnej fazy rozwoju zarodkowego. Odzwierciedleniem różnic w procesach wewnątrzkomórkowego przeżytnictwa sy-

gnału kalcemicznego może być także negatywna lub pozytywna regulacja, tj. inhibicja lub stymulacja aktywności biokatalitycznej enzymów odpowiedzialnych za rozpoczęcie i progresję procesu apoptozy w komórkach zarodków klonalnych (54,55). Dynamiczna równowaga w wewnątrzkomórkowym stężeniu kationów wapniowych (izokalcemia), w poddanych sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytach oraz w rozwijających się zarodkach klonalnych, jest wynikiem synergistycznych interakcji między: 1) zlokalizowanymi w błonie cytoplazmatycznej oraz błonach ER_{ag} kanałami transportującymi jony Ca²⁺, 2) zależnymi od Ca²⁺-kalmoduliny i Mg²⁺ ATPazami wapniowymi w plazmolemme lub zależnymi od jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ ATPazami wapniowymi w błonach retikulum endoplazmatycznego gładkiego oraz 3) białkami wiążącymi wapń (CaBPs, ang. *Calcium-Binding Proteins*) (rys. 2). Z kolei zakłócenia w prawidłowym współdziałaniu tych trzech głównych strukturalno-funkcjonalnych elementów systemu regulującego wewnątrzkomórkową koncentrację wapnia w formie wolnej (zjonizowanej) oraz związanej (niezjonizowanej) mogą być spowodowane mechanizmem transdukcji ekscytotoksycznego sygnału wapniowego w procesie apoptozy, wywołanym oddziaływaniem czynnika aktywującego na cybrydę klonalną (55). Przedziałowość (kompartamentacja) wewnątrzkomórkowa oocytu lub komórek zarodkowych, podobnie jak w pobudliwych i niepobudliwych komórkach somatycz-



Rys. 2. Ekspresja różnych rodzajów białek wiążących (chelatujących) jony wapnia (CaBPs), określanych także białkami sensorowymi lub adaptorowymi wapnia w wewnętrznej monowarstwie fosfolipidowej błon siateczki śródplazmatycznej gładkiej oraz w cytoplazmie oocytów i komórek zarodków ssaków (szczegółowe objaśnienia w tekście).

nych, jest przyczyną sekwestracji, tj. czasoprzestrzennego odizolowania kationów wapniowych od mikrośrodowiska cytoplazmatycznego. Efektem tego jest powstanie oddzielnych rezerwuarów wapnia w trzech głównych organellach komórkowych – jądrze komórkowym, mitochondriach oraz siateczce śródplazmatycznej gładkiej i w mniejszym stopniu szorstkiej (56). Jony wapnia we wnętrzu błon retikulum endoplazmatycznego agranularnego wiążą się z białkami, które charakteryzują się małym powinowactwem do tego kationu i posiadają wiele miejsc chelatujących Ca^{2+} (rys. 2). Jednym z głównych białek adaptorowych wapnia w ER_{ag} oocytów jest kalretikulina. W konfiguracji przestrzennej tego białka można wydzielić dwie domeny asocjacyjne dla jonów Ca^{2+} , z których jedna wykazuje dużą jonowymienną pojemność magazynowania, ponieważ wiąże odwracalnie około 25 moli Ca^{2+} na 1 mol białka (57). Do innych białek z grupy CaBPs, które są zakotwiczone w wewnętrznej monowarstwie błon cystern i kanalików siateczki śródplazmatycznej gładkiej i ziarnistej oocytów i komórek zarodków przedimplantacyjnych należą prawdopodobnie m.in. kalsekwestryna, endoplazmina, kalumenina oraz tzw. kompleks białkowy retikulum endoplazmatycznego o masie molekularnej 55 kDa (ERC-55 , ang. *Endoplasmic Reticulum Complex-55 kDa*). Spośród tych białek, szczególną rolę w przejściowym chelatowaniu kationów wapniowych odgrywa kalsekwestryna – białko o masie cząsteczkowej około 40 kDa, którego pojemność wiązania wapnia dochodzi aż do wartości wahającej się w przedziale od 40 do 50 moli Ca^{2+} na 1 mol białka, przy stałej dysocjacji K_D rzędu 10^{-3} M/L (48,58) (rys. 2).

6. Ogniwa modulacji aktywności InsP_3 -zależnych i rianodyno-zależnych kanałów wapniowych w mechanizmie regulatorowym gospodarki kalcemicznej w apoptotycznych komórkach zarodków klonalnych

Istnieje przypuszczenie, że egzogenne jony wapniowe, wpływające do cytoplazmy zrekonstruowanego oocytu albo przez okresowo powstające w oolemmie mikropory w wyniku jej elektropermeabilizacji, albo za pośrednictwem jonomycyny wapnia lub jonoforu wapnia A23187 (kalcymycyny), pobudzają pośrednio aktywność dwóch typów kanałów uwalniających jony Ca^{2+} z ER. Kanały te posiadają strukturę homotetrameryczną, tzn. są zbudowane z czterech jednakowych podjednostek białkowych ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4$) o masie molekularnej rzędu ok. 300-450 kDa. Ich otwarcie jest zależne od związania przez specyficzne receptory albo *myo*-inozytolo-1,4,5-*trifosforanu* (InsP_3), albo rianodyny (15,59). Wykazano, że takie fizykochemiczne parametry funkcyjne zarówno InsP_3 -, jak i rianodyno-zależnych kanałów wapniowych oocytu jak: 1) czas otwarcia kanału; 2) zmiany konformacyjne kanału dotyczące m.in. wielkości (objętości) utworzonego światła kanału spowodowane modyfikacjami allosterycznymi w obrębie podjednostek białkowych jego receptora jonotropowego; 3) częstotliwość oraz amplituda generowanych uwalnianiem wapnia oscylacji; 4) kinetyka aktywacji oraz inaktywacji kanału (14,60) są uwarunkowa-

ne wieloma czynnikami. Do najważniejszych z nich należą: 1) całkowite stężenie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie; 2) szybkość tworzenia przez kationy wapniowe wiązań koordynacyjnych z tzw. jonotropowymi miejscami mikroreceptorowymi białkowych podjednostek regulatorowych kanału oraz 3) wielkość całkowitej energii aktywacji generowanej w wyniku chelatowania jonów Ca^{2+} przez wszystkie podjednostki kanału (61). Stopień aktywności obejmujący dwukierunkowe adaptacyjne zmiany regulacyjne jonotropowych receptorów InsP_3 (InsP_3R) lub receptorów rianodiny (RyR, ang. *Ryanodine Receptor*), będących integralną częścią dwóch różnych typów kanałów wapniowych oocytu jest regulowany poziomem koncentracji jonów Ca^{2+} w cytozolu na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego, przy czym ich inaktywacja zachodzi już przy stosunkowo niskich stężeniach tego kationu (62). Otwarcie InsP_3 - i rianodyno-zależnych kanałów jonowych następuje prawdopodobnie w momencie, gdy wartość wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych kationów wapnia $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spada poniżej minimalnego poziomu 0,1 $\mu\text{M/L}$. Aktywacja czynnościowa jonotropowych funkcji transportowych obu rodzajów tych kanałów wapniowych zachodzi w następstwie reakcji synergistycznego uwrażliwiania (sensytyzacji) ich białek receptorowych (InsP_3R lub RyR). Ta ostatnia jest spowodowana intensyfikacją maksymalnej odpowiedzi na przyłączenie się do tych jonotropowych receptorów ligandów z grupy agonistów – *myo*-inozytolo-1,4,5-*trifosforanu* lub rianodiny (15,63). Natomiast zamknięcie tych kanałów, czyli osłabienie reaktywności (wrażliwości) ich receptorów pomimo związania agonistów (tzw. desensytyzacja) ma miejsce z chwilą przekroczenia przez $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wartości około 20 $\mu\text{M/L}$ (64). Jony Mg^{2+} hamują aktywność obu typów kanałów wapniowych poprzez współzawodnictwo z jonami Ca^{2+} . Stymulujący wpływ na przepuszczalność zarówno kanałów InsP_3 -zależnych, jak i rianodyno-zależnych dla kationów wapniowych mają nukleotydy adeninowe oraz cykliczna ADP-ryboza (65).

6.1. Białka kontrolujące reaktywność jonotropowych receptorów *myo*-inozytolo-1,4,5-*trifosforanu* oraz receptorów rianodynowych w cyklu uwrażliwiania i odwrażliwiania InsP_3R lub RyR

Istotnymi procesami modulującymi funkcjonowanie receptorów 1,4,5-*trifosforanu myo*-inozytolu oraz rianodiny są fosforylacja oraz defosforylacja. Te reakcje biochemiczne katalizowane są odpowiednio przez fosfotransferazy białkowe takie jak: 1) kinaza zależna od cAMP (PKA); 2) kinaza zależna od 1,2-diacylglicerolu (DAG) i jonów Ca^{2+} (PKC); 3) zależna od Ca^{2+} -kalmoduliny kinaza typu II (CaM-PK-II) i 4) kinaza tyrozynowa (PTK) oraz białkowe fosfatazy serynowo-treoninowe takie m.in. jak: 1) PP1 (ang. *Protein Phosphatase 1*) czy 2) PP2A (ang. *Protein Phosphatase 2A*). Stan aktywacji receptorów InsP_3R lub RyR zależy od względnego stosunku ilościowego tych kinaz i fosfataz białkowych oraz dynamicznej równowagi utrzymującej się między tymi enzymami (66). Ta homeostaza dotycząca zarówno poziomu stężę-

nia, jak i aktywności biokatalitycznej wymienionych kinaz i fosfataz białkowych ulega poważnym zakłóceniom, a także stopniowej deregulacji narastającej w kolejnych stadiach przedimplantacyjnego rozwoju zarodków klonalnych, których komórki wykazują objawy tzw. hiperkalcemicznej śmierci apoptotycznej. Ten rodzaj samobójczej śmierci komórek zarodkowych zainicjowany zostaje z reguły w wyniku transmisji ekscytotoksycznego sygnału wapniowego ze środowiska cytoplazmatycznego zrekonstruowanych oocytów, poddanych nieodpowiednim procedurom sztucznej aktywacji (67). Często jednak nie ma pewności, czy obserwowany efekt stymulacji czynnościowej kanałów wapniowych jest konsekwencją bezpośredniej fosforylacji ich receptorów, czy też wynikiem działania kinaz białkowych na inne białka pośredniczące (68).

Postępująca aktywacja fosfotransferaz białkowych prowadzi stopniowo do nasilenia funkcji homotetramerycznych receptorów InsP_3R lub RyR poprzez fosforylację grup aminoacylowych tyrozyny i seryny specyficznych domen w obrębie poszczególnych podjednostek białkowych. Następstwem tego jest zwiększenie prawdopodobieństwa otwarcia kanału wapniowego oraz zmniejszenie blokady kanału przez kompetycyjne w stosunku do kationów wapnia jony magnezowe (69). Z kolei, aktywacja fosfataz białkowych wywołuje efekty przeciwne do aktywacji kinaz, czyli inhibicję aktywności receptorów obu typów kanałów jonowych. Wyraża się ona poprzez skrócenie czasu i zmniejszenie prawdopodobieństwa otwarcia kanałów oraz nasilenie desensytyzacji receptorów (59). Dotychczas udowodniono, że miejsca katalizowanej przez kinazę PKA fosforylacji podjednostek receptorów InsP_3 oraz rianodyny są defosforylowane przez fosfatazę białkową 1 (PP1). Związanie głównego białka adaptorowego wapnia – kalmoduliny (rys. 2) przez specyficzne domeny asocjacyjne receptorów połączonych z układem efektorowym kanałów jonowych powoduje również spadek prawdopodobieństwa otwarcia się kanałów na skutek osłabienia odpowiedzi receptorowej. Spadek reaktywności, czyli stopnia uwrażliwienia (sensytyzacji) receptorów stanowiących integralną część kanałów InsP_3 - i rianodyno-zależnych zostaje wywołany zmniejszeniem się liczby i gęstości białek receptorowych InsP_3R oraz RyR w zewnętrznej monowarstwie błon ER_{ag} w aktywowanych cybrydach klonalnych (70). Jest to jeden z obronnych mechanizmów molekularnych, które są uruchamiane w komórkach zarodków klonalnych, jeśli transmisja sygnału wapniowego, aktywującego zrekonstruowany oocyt miała charakter ekscytotoksyczności stężeniowej jonów Ca^{2+} zarówno pochodzenia zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowego (47,71). Wzrastające stężenie wolnych kationów wapniowych w cytozolu sztucznie aktywowanych cybryd klonalnych jest bezpośrednio odpowiedzialne za podwyższenie aktywności katalitycznej wielu serynowo-treoninowych kinaz białkowych, m.in. PKC oraz CaM-PK-II w komórkach dzielących się zarodków (66,72). Wykazano również pośredni wpływ jonów Ca^{2+} na stymulację aktywności innej serynowo-treoninowej fosfotransferazy – kinazy PKA – poprzez przeprowadzaną z udziałem zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny kinazy typu II fosforylację enzymu cyklazy adenylanowej (AC, ang. *Adenylyl Cyclase*). Ten ostatni katalizuje z kolei konwersję adenozy-

no-5'-trifosforanu (ATP, ang. *Adenosine 5'-Triphosphate*) do cyklicznego 3',5'-adenozynomonofosforanu (cAMP, ang. *Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate*) (73). Zarówno kinaza PKC jak i kinaza PKA mogą zwiększać przepuszczalność kanałów wapniowych w błonach siateczki śródplazmatycznej gładkiej poprzez fosforylacyjną stymulację wrażliwości ich receptorów InsP_3R lub RyR (65,74,75).

7. Podsumowanie

Brak skutecznych metod aktywacji zrekonstruowanych oocytów w klonowaniu somatycznym ssaków dotychczas znacznie ograniczał potencjał rozwojowy *in vitro* klonalnych zarodków, stąd poszukiwania nowych, alternatywnych układów doświadczalnych, których istotą było wykorzystanie całkowicie odmiennych źródeł czynników aktywujących, albo modyfikacja parametrów fizykochemicznych procedur stosowanych powszechnie już wcześniej. Obecnie trwają intensywne badania nad opracowaniem takich systemów sztucznej aktywacji cybrydowych zygot klonalnych, których mechanizm oddziaływania naśladowałby niemal całkowicie lub przynajmniej w przeważającej części fizjologiczny wzorzec przyrostu wewnątrzkomórkowej koncentracji kationów wapnia $[\text{Ca}^{2+}]_i$, obserwowany podczas zapłodnienia oocytów ssaków. Takie strategie egzogennej stymulacji programu rozwojowego zrekonstruowanych oocytów przyczyniłyby się także do obniżenia odsetka zarodków wykazujących objawy śmierci apoptotycznej komórek oraz poprawy jakości zarodków w warunkach hodowli *in vitro*. Dlatego też dokładne poznanie biochemicznych i biofizycznych mechanizmów złożonego systemu regulatorowego wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału wapniowego w warunkach sztucznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów różnych gatunków ssaków jest, jak się wydaje, niezbędne w celu wyjaśnienia molekularnego podłoża szlaków inicjowania i progresji procesu apoptozy w komórkach przedimplantacyjnych zarodków klonalnych. Z kolei, wykazanie ścisłych zależności pomiędzy poszczególnymi metodami fizycznej lub chemicznej aktywacji a zwiększoną podatnością cybryd klonalnych na proces hiperkalcemicznej śmierci apoptotycznej może mieć istotne znaczenie dla wskazania czynników zapobiegających niskiej wydajności klonowania somatycznego, ocenianej na podstawie kompetencji rozwojowych *ex vivo* zarodków do osiągnięcia stadium blastocysty.

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ze środków na naukę w latach 2009-2012 jako projekt badawczy własny nr N N311 315936.

Literatura

1. Hao Y., Lai L., Mao J., Im G. S., Bonk A., Prather R. S., (2004), *Biol. Reprod.*, 70, 1644-1649.
2. Gjørret J. O., Wengle J., Maddox-Hyttel P., King W. A., (2005), *Reprod. Domest. Anim.*, 40, 210-216.
3. Hao Y., Lai L., Mao J., Im G. S., Bonk A., Prather R. S., (2003), *Biol. Reprod.*, 69, 501-507.

4. Fahrudin M., Otoi T., Karja N. W. K., Mori M., Murakami M., Suzuki T., (2002), *Reproduction*, 124, 813-819.
5. Jang G., Park E. S., Cho J. K., Bhuiyan M. M., Lee B. C., Kang S. K., Hwang W. S., (2004), *Theriogenology*, 62, 512-521.
6. Liu S. Z., Yao L. J., Jiang M. X., Lei Z. L., Zhang L. S., Zhang Y. L., Sun Q. Y., Zheng Y. L., Song X. F., Chen D. Y., (2005), *Reproduction*, 130, 359-366.
7. Machaty Z., Rickords L. F., Prather R. S., (1999), *Cloning*, 1, 101-109.
8. Fissore R. A., Long C. R., Duncan R. P., Robl J. M., (1999), *Cloning*, 1, 89-100.
9. Day M. L., McGuinness O. M., Berridge M. J., Johnson M. H., (2000), *Cell Calcium*, 28, 47-54.
10. Ozil J.-P., Huneau D., (2001), *Development*, 128, 917-928.
11. Sun F. Z., Hoyland J., Huang X., Mason W., Moor R. M., (1992), *Development*, 115, 947-956.
12. Fissore R. A., Gordo A., Wu H., (1998), *Theriogenology*, 49, 43-52.
13. He C. L., Damiani P., Parys J. B., Fissore R. A., (1997), *Biol. Reprod.*, 57, 1245-1255.
14. Jellerette T., Kurokawa M., Lee B., Malcuit C., Yoon S. Y., Smyth J., Vermassen E., de Smedt H., Parys J. B., Fissore R. A., (2004), *Dev. Biol.*, 274, 94-109.
15. He C. L., Damiani P., Ducibella T., Takahashi M., Tanzawa K., Parys J. B., Fissore R. A., (1999), *Biol. Reprod.*, 61, 935-943.
16. Jones K. T., Cruttwell C., Parrington J., Swann K., (1998), *FEBS (The Federation of European Biochemical Societies) Lett.*, 437, 297-300.
17. Carroll D. J., Albay D. T., Terasaki M., Jaffe L. A., Foltz K. R., (1999), *Dev. Biol.*, 206, 232-247.
18. Rogers N. T., Hobson E., Pickering S., Lai F. A., Braude P., Swann K., (2004), *Reproduction*, 128, 697-702.
19. Yoneda A., Kashima M., Yoshida S., Terada K., Nakagawa S., Sakamoto A., Hayakawa K., Suzuki K., Ueda J., Watanabe T., (2006), *Reproduction*, 132, 393-401.
20. Kim J. H., Machaty Z., Cabot R. A., Han Y. M., Do H. J., Prather R. S., (1998), *Biol. Reprod.*, 59, 655-660.
21. 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), *Biol. Reprod.*, 67, 327-333.
22. 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), *Biol. Reprod.*, 66, 199-203.
23. Kubota C., Yamakuchi H., Todoroki J., Mizoshita K., Tabara N., Barber M., Yang X., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 990-995.
24. Wells D. N., Misica P. M., Tervit H. R., (1999), *Biol. Reprod.*, 60, 996-1005.
25. Loi P., Ledda S., Fulka J. Jr., Cappai P., Moor R. M., (1998), *Biol. Reprod.*, 58, 1177-1187.
26. Prather R. S., Tao T., Machaty Z., (1999), *Theriogenology*, 51, 487-498.
27. Boquest A. C., Grupen C. G., Harrison S. J., McIlpatrick S. M., Ashman R. J., d'Apice A. J. F., Nottle M. B., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1283-1287.
28. Wakayama T., Perry A. C. F., Zuccotti M., Johnson K. R., Yanagimachi R., (1998), *Nature*, 394, 369-374.
29. Hirabayashi M., Kato M., Takeuchi A., Ishikawa A., Hochi S., (2003), *J. Reprod. Dev.*, 49, 121-126.
30. Baguisi A., Behboodi E., Melican D. T., Pollock J. S., Destrempes M. M., Cammuso C., Williams J. L., Nims S. D., Porter C. A., Midura P., Palacios M. J., Ayres S. L., Denniston R. S., Hayes M. L., Ziomek C. A., Meade H. M., Godke R. A., Gavin W. G., Overstrom E. W., Echelard Y., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 456-461.
31. Dai Y., Vaught T. D., Boone J., Chen S.-H., Phelps C. J., Ball S., Monahan J. F., Jobst P. M., McCreath K. J., Lamborn A. E., Cowell-Lucero J. L., Wells K. D., Colman A., Polejaeva I. A., Ayares D. L., (2002), *Nat. Biotechnol.*, 20, 251-255.
32. Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. S., (1997), *Nature*, 385, 810-813.
33. Onishi A., Iwamoto M., Akita T., Mikawa S., Takeda K., Awata T., Hanada H., Perry A. C. F., (2000), *Science*, 289, 1188-1190.

34. 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), *Theriogenology*, 63, 973-991.
35. Samiec M., Skrzyszowska M., Smorąg Z., (2003), *Czech J. Anim. Sci.*, 48, 499-507.
36. Hyun S., Lee G., Kim D., Kim H., Lee S., Nam D., Jeong Y., Kim S., Yeom S., Kang S., Han J., Lee B., Hwang W., (2003), *Biol. Reprod.*, 69, 1060-1068.
37. Acton B. M., Jurisicova A., Jurisica I., Casper R. F., (2004), *Mol. Hum. Reprod.*, 10, 23-32.
38. Metcalfe A. D., Hunter H. R., Bloor D. J., Lieberman B. A., Picton H. M., Leese H. J., Kimber S. J., Brison D. R., (2004), *Mol. Reprod. Dev.*, 68, 35-50.
39. Oakes S. A., Scorrano L., Opferman J. T., Bassik M. C., Nishino M., Pozzan T., Korsmeyer S. J., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 105-110.
40. Grebinyk D. M., Griniuk I. I., Matyshevskaia O. P., (2005), *Ukr. Biokhim. Zh.*, 77, 76-81.
41. Goetz J. G., Nabi I. R., (2006), *Biochem. Soc. Trans.*, 34, 370-373.
42. Fesus L., Madi A., Balathy Z., Nemes Z., Szondy Z., (1996), *Experientia*, 52, 942-949.
43. Nouraini S., Six E., Matsuyama S., Krajewski S., Reed J. C., (2000), *Mol. Cell Biol.*, 20, 1604-1615.
44. Frasch S. C., Henson P. M., Nagaosa K., Fessler M. B., Borregaard N., Bratton D. L., (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 17625-17633.
45. Fadeel B., Gleiss B., Hogstrand K., Chandra J., Wiedmer T., Sims P. J., Henter J. I., Orrenius S., Samali A., (1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, 504-511.
46. Szlufcik K., Missiaen L., Parys J. B., Callewaert G., de Smedt H., (2006a), *Biol. Cell*, 98, 1-14.
47. Szlufcik K., Bultynck G., Callewaert G., Missiaen L., Parys J. B., de Smedt H., (2006b), *Cell Calcium*, 39, 325-336.
48. Pinton P., Rizzuto R., (2006), *Cell Death Differ.*, 13, 1409-1418.
49. Annis M. G., Yethon J. A., Leber B., Andrews D. W., (2004), *Biochim. Biophys. Acta*, 1644, 115-123.
50. Jellerette T., Melican D., Butler R., Nims S., Ziomek C., Fissore R., Gavin W., (2006), *Theriogenology*, 65, 1575-1586.
51. Arnaudeau S., Kelley W. L., Walsh J. V. Jr., Demaurex N., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 29430-29439.
52. Malli R., Frieden M., Trenker M., Graier W. F., (2005), *J. Biol. Chem.*, 280, 12114-12122.
53. Grebinyk D. M., Koval' T. V., Matyshevskaia O. P., (2004), *Ukr. Biokhim. Zh.*, 76, 63-69.
54. Hajnoczky G., Csordas G., Das S., Garcia-Perez C., Saotome M., Sinha Roy S., Yi M., (2006), *Cell Calcium*, 40, 553-560.
55. Malli R., Frieden M., Osibow K., Zoratti C., Mayer M., Demaurex N., Graier W. F., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 44769-44779.
56. Hajnoczky G., Csordas G., Yi M., (2002), *Cell Calcium*, 32, 363-377.
57. Arnaudeau S., Frieden M., Nakamura K., Castelbou C., Michalak M., Demaurex N., (2002), *J. Biol. Chem.*, 277, 46696-46705.
58. Ferrari D., Pinton P., Szabadkai G., Chami M., Campanella M., Pozzan T., Rizzuto R., (2002), *Cell Calcium*, 32, 413-420.
59. Malcuit C., Knott J. G., He C., Wainwright T., Parys J. B., Robl J. M., Fissore R. A., (2005), *Biol. Reprod.*, 73, 2-13.
60. Tateishi Y., Hattori M., Nakayama T., Iwai M., Bannai H., Nakamura T., Michikawa T., Inoue T., Mikoshiba K., (2005), *J. Biol. Chem.*, 280, 6816-6822.
61. Boehning D., van Rossum D. B., Patterson R. L., Snyder S. H., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 1466-1471.
62. Boehning D., Patterson R. L., Snyder S. H., (2004), *Cell Cycle*, 3, 252-254.
63. Pacher P., Thomas A. P., Hajnoczky G., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 2380-2385.
64. Alzayady K. J., Wojcikiewicz R. J., (2005), *Biochem. J.*, 392, 601-606.
65. Mendes C. C., Gomes D. A., Thompson M., Souto N. C., Goes T. S., Goes A. M., Rodrigues M. A., Gomez M. V., Nathanson M. H., Leite M. F., (2005), *J. Biol. Chem.*, 280, 40892-40900.
66. Nosyreva E., Miyakawa T., Wang Z., Glouchankova L., Mizushima A., Iino M., Bezprozvanny I., (2002), *Biochem. J.*, 365, 659-667.
67. Uchida K., Miyauchi H., Furuichi T., Michikawa T., Mikoshiba K., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 16551-16560.

68. Varnai P., Balla A., Hunyady L., Balla T., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 7859-7864.
69. Bultynck G., Rossi D., Callewaert G., Missiaen L., Sorrentino V., Parys J. B., de Smedt H., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 47715-47724.
70. Ando H., Mizutani A., Kiefer H., Tsuzurugi D., Michikawa T., Mikoshiba K., (2006), *Mol. Cell*, 22, 795-806.
71. Nakayama T., Hattori M., Uchida K., Nakamura T., Tateishi Y., Bannai H., Iwai M., Michikawa T., Inoue T., Mikoshiba K., (2004), *Biochem J.*, 377, 299-307.
72. Knott J. G., Gardner A. J., Madgwick S., Jones K. T., Williams C. J., Schultz R. M., (2006), *Dev. Biol.*, 296, 388-395.
73. Chakravarthy B., Morley P., Whitfield J., (1999), *Trends Neurosci.*, 22, 12-16.
74. Fan H. Y., Huo L. J., Meng X. Q., Zhong Z. S., Hou Y., Chen D. Y., Sun Q. Y., (2003), *Biol. Reprod.*, 69, 1552-1564.
75. Markoulaki S., Matson S., Ducibella T., (2004), *Dev. Biol.*, 272, 15-25.