

AUTOREFERAT – Marta Czernik

Załącznik 1 - (jęz. polski)

1. *Imię i nazwisko:*

MARTA CZERNIK

2. *Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.*

2017 Italian National Scientific Qualification for **Associate Professor** of Veterinary Anatomy and Physiology (07/H1), Italian Ministry of Education;

2015 **doktor nauk weterynaryjnych**; “Development of lyophilization procedure for long-term storage of somatic cells and gametes”, Laboratorium Embriologii Eksperymentalnej Faculty of Veterinary Medicine, University of Teramo, Teramo, Italy, Włochy;

2012 **doktor nauk medycznych**; w dyscyplinie Biologia Medyczna; “Rola wirusa antygenu T w procesie nowotworowym na przykładzie ludzkiego glioblastoma” Wydział Lekarski Uniwersytetu Jagiellońskiego na podstawie wyników uzyskanych w Department of Neuroscience, Centre for Neurovirology, Temple University, Filadelfia, USA;

2004 **magister biologii**; Laboratorium Biologii komórki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska.

3. *Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.*

2017 - do dziś umowa o dzieło, Zakład Embriologii Doświadczalnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, Polska, w ramach realizacji projektu SONATA 11 (2016/21/d/ NZ3/0210) (Prof. Jacek A. Modliński);

2007 - do dziś Researcher, Faculty of Veterinary Medicine, University of Teramo, Teramo, Italy, Włochy (Prof. Pasqualino Loi);

2013 – 2014 Postdoctoral Research Fellow, RIKEN, Bioresource Engineering Division, Tsukuba, Japonia (Dr Atsuo Ogura);

2004 – 2007 Research Scholar w Department of Neuroscience, Centre for Neurovirology,
Temple University, Filadelfia, USA (Prof. Kamel Khalili).

4. *Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)*

a) *tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:*

Opracowanie nowej metody przeprogramowania jądrowego komórek somatycznych przed transferem jądrowym

b) *publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego*

1. Czernik M, Anzalone DA, Palazesse L, Oikawa M, Loi P (2019). Somatic Cell Nuclear Transfer: Failures, Successes and the Challenges Ahead. *Int. J. Dev. Biol.* 63: 123 - 130.

IF₂₀₁₈=2,4 (5 years IF=2,110); MNiSzW=25; cytowania=0; Q2; percentile: 6/17; 61%: Embryology

2. Palazzese L, Czernik M, Iuso D, Toschi P, Loi P (2018). Nuclear quiescence and histone hyper-acetylation jointly improve protamine-mediated nuclear remodeling in sheep fibroblasts. *Plos One*. Mar 15;13(3): e0193954

IF_{2017/2018}=2,766 (5 years IF=3,352); MNiSzW=40; Q1; cytowania=0; percentile: 16/177; 91%: General Agricultural and Biological Sciences

3. Czernik M, Iuso D, Toschi P, Khochbin S, Loi P (2016). Remodelling somatic nuclei via exogenous expression of protamine 1 to create spermatid-like structures for somatic nuclear transfer. *Nat Protoc*. Nov;11(11):2170-2188.

IF₂₀₁₆=10,032 (5 years IF=15,269); MniSzW=50; cytowania=2; Q1; percentile: 5/187; 97%: General Biochemistry, Genetics and Molecular Biology

4. Loi P, Iuso D, Czernik M, Ogura A (2016). A New, Dynamic Era for Somatic Cell Nuclear Transfer?. *Trends Biotechnol*. Oct;34(10):791-797.

IF₂₀₁₆=11,126 (5 years IF=14,635); MniSzW=45; cytowania=27; Q1; percentile: 5/246, 98%: Biotechnology



5. Iuso D*, Czernik M*, Toschi P, Fidanza A, Zacchini F, Feil R, Curtet S, Buchou T, Shiota H, Khochbin S, Ptak GE, Loi P (2015). Exogenous Expression of Human Protamine 1 (hPrm1) Remodels Fibroblast Nuclei into Spermatid-like Structures. *Cell Rep.* Dec 1;13(9):1765-71. *pierwszy autor /równy wkład.

IF₂₀₁₅= 7,87 (5 years IF=8,7); MniSzW=40; cytowania=12; Q1; percentile: 9/187; 95%: General Biochemistry, Genetics and Molecular Biology

6. PATENT: Loi P, Iuso D, Czernik M, Zacchini F, Ptak G, Khochbin S, Fidanza A (2015). Improved method for reconstructing a non-human animal embryo. (Unia Europejska and Israel) WO2015/162170 or PCT/EP2015/058701, przyznany przez European Patent Office.

Łączna punktacja MNiSzW = 200;

Łączny IF = 34,194;

Łączna liczba cytowań (bez autocytowań) = 41.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Opracowanie nowej metody przeprogramowania jądrowego komórek somatycznych przed transferem jądrowym

STRESZCZENIE

Badania nad klonowaniem somatycznym, ze względu na jego wszechstronne zastosowanie w biomedycynie, biofarmacji, a także w hodowli zwierząt gospodarskich i produkcji zwierząt transgenicznych są intensywnie prowadzone od kilkadziesiąt lat (Czernik i wsp., 2019; Loi i wsp., 2016; praca 1, praca 4). Jednak, do dnia dzisiejszego, metoda ta ma bardzo niską wydajność, nieprzekraczającą 5% u zwierząt laboratoryjnych (Ogura i wsp. 2013) i 1% u zwierząt gospodarskich (Loi i wsp., 2016; praca 4). Ponadto, wiele zwierząt uzyskanych w wyniku klonowania somatycznego wykazuje liczne wady rozwojowe i często umiera wkrótce lub zaraz po urodzeniu (Loi i wsp., 2006; Palmieri i wsp., 2008; 2007).

Przyczyną niskiej wydajności procesu klonowania somatycznego jest, jak się powszechnie uważa, nieprawidłowe przeprogramowanie jądra komórki somatycznej, głównie skutkiem nierozpoznawalnej przez oocyt budowy egzogenego jądra komórkowego.

Prezentowanym osiągnięciem habilitacyjnym jest nowa, całkowicie oryginalna i bardzo obiecująca metoda przemodelowania jądra komórki somatycznej, która upodabnia jądro

somatyczne do jądra plemnika, co znacząco wpłynęło na poprawę wydajności procesu klonowania somatycznego.

WSTĘP

Klonowanie ssaków metodą transferu jądra komórki somatycznej do pozbawionego własnego materiału genetycznego oocytu, potocznie zwane klonowaniem somatycznym [ang. *Somatic Cell Nuclear Transfer* (SCNT)], po raz pierwszy zostało zaproponowane przez Hansa Spemanna w 1938 roku (*Spemann, 1938*). Przedstawił on, projekt eksperymentu, który zakładał usunięcie jądra komórkowego z niezapłodnionej komórki jajowej, a następnie wszczepienie w jego miejsce jądra pobranego z komórki rozwiniętego już zarodka. Tym samym, jak uważał, można by empirycznie sprawdzić, czy w tak zmienionych warunkach może dojść do pełnego rozwoju organizmu. I chociaż wówczas przeprowadzenie takiego postępowania nie było jeszcze możliwe, to Spemann z pewnością wskazał właściwy kierunek, który – jak się miało okazać – doprowadził w konsekwencji do rozwoju technik klonowania organizmów żywych.

Ten "fantastyczny eksperyment" - jak sam twórca go nazwał, byłby potwierdzeniem tego, że wszystkie komórki dorosłego organizmu mają ten sam genom, jak również geny odpowiedzialne za totipotencję są obecne w zróżnicowanych komórkach przez całe jego życie. Teoria ta została potwierdzona w praktyce 14 lat później przez Briggsa i Kinga, którzy opracowali technikę transplantacji jąder komórkowych do komórek jajowych (*Brigg i King, 1952*). Przeszczepili jądra z blastomerów żaby (w stadium blastuli) do oocytów pozbawionych własnego jądra, co doprowadziło do powstania normalnych zarodków. Było to pierwsze udane przeszczepienie jądra w przypadku organizmów wielokomórkowych i dowód na to, że mogą być one przeprogramowane i mogą wrócić do stanu zygotycznego.

Dziesięć lat później, John Gurdon ostatecznie udowodnił, że jądra zróżnicowanych komórek zachowują swoją totipotencję przez całe życie, i że podczas różnicowania komórek nie następuje utrata genów, tylko zmienia się ich ekspresja (*Gurdon i wsp., 1958*). Potwierdził to doświadczeniem przeprowadzonym u żaby (*Xenopus laevis*). Pobrał on jądro z komórki nabłonka jelita kijanki i przeszczepił go do oocytu pozbawionego własnego jądra (dezaktywowanego lampą UV). Ze zrekonstruowanego oocytu rozwinęła się prawidłowa kijanka (*Gurdon i wsp., 1958*). Te, i dalsze badania Sir Johna Gurдона nad przeprogramowaniem jąder komórkowych nagrodzone zostały w 2012 r. Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny.

Jednak przez wiele lat klonowanie metodą transferu jąder komórkowych było - zwłaszcza w odniesieniu do ssaków - „niszą” badań podstawowych. W przypadku ssaków, główną przeszkodą był brak technik umożliwiających zarówno usunięcie jądra z komórki jajowej (bardzo małej i delikatnej w porównaniu do komórek jajowych płazów), jak i wprowadzenie do niej egzogennego jądra. Problemy te zostały pokonane w Zakładzie Embriologii Uniwersytetu Warszawskiego, w którym przeprowadzone zostały pierwsze udane próby mikromanipulacji na komórkach jajowych ssaków (mysz). Wykazano, że możliwe jest zarówno mikrochirurgiczne usunięcie jąder z zygoty (*Modliński, 1975*), jak i mikrochirurgiczne wprowadzenie do komórki jajowej obcych jąder zarodkowych (*Modliński, 1978; 1981*). W Zakładzie Embriologii UW opisano także, po raz pierwszy, zachowanie jąder komórek somatycznych (tymocytów) w cytoplazmie aktywowanych i nieaktywowanych oocytów (*Czołowska i wsp., 1984*), jak również opracowano stosowaną dziś powszechnie metodę fuzji komórek zarodkowych przy użyciu pola elektrycznego (*Kubiak i Tarkowski, 1985*).

Problemy związane z procedurami enukleacji komórki jajowej oraz transferu egzogennych jąder komórkowych powodowały, że próby klonowania metodą transferu jąder [ang. *nuclear transfer* (NT)] było rzadko stosowane. Dopiero sklonowanie, tą metodą, pierwszego ssaka i odkrycie w tej technice potencjału w bezpłciowym namnażaniu zwierząt (w tym zwierząt gospodarskich) spowodowało *de novo* wzrost zainteresowania tematyką klonowania ssaków. Pierwsze klony ssaków uzyskano w 1986 r. w wyniku przeniesienia jąder z blastomerów zarodków 8- i 16-komórkowych do bez jądrowych „połówek” oocytów owczych (*Willadsen, 1986*). Optymalizacja procedury NT poprzez synchronizację cyklu komórkowego oocytu (cytoplast) z cyklem komórki – dawcy jądra (*Smith i wsp., 1988; Smith i Wilmut, 1989*) umożliwiła uzyskanie w Instytucie Roslin urodzonych jagniąt po przeniesieniu do pozbawionego własnego materiału genetycznego oocytu jąder komórek w fazie G0 pochodzących z hodowanych *in vitro* tarczki zarodkowych (*Campbell i wsp., 1996a*), linii komórek pochodzenia zarodkowego (*Campbell i wsp., 1996*) a następnie zróżnicowanych komórek somatycznej pochodzących zarówno z płodów, jak i z dorosłego osobnika (*Wilmut i wsp., 1997*). W tym ostatnim przypadku wprowadzenie jądra zróżnicowanej komórki pozyskanej z gruczołu mlekowego dorosłego osobnika do pozbawionego własnego materiału genetycznego oocytu, pozwoliło na uzyskanie pierwszego ssaka uzyskanego w wyniku klonowania somatycznego - owcy Dolly (*Dolly, the Lamb*) (*Wilmut i wsp., 1997*).

Dzięki tym badaniom, klonowanie somatyczne bardzo szybko stało się przedmiotem powszechnego zainteresowania, gdyż odkryto w nim potencjalnie, bardzo szerokie spektrum jego zastosowań. Klonowanie metodą SCNT może być wykorzystane do efektywnej produkcji zwierząt transgenicznych (*Galli i wsp., 2003*), zwiększenia liczby osobników zwierząt gospodarskich o szczególnie cennych genotypach (w tym m.in. osobników z wrodzoną odpornością na brucelluzę), a także ratowania ginących ras zwierząt gospodarskich (*Wells i wsp., 2004*) oraz dzikich gatunków ssaków zagrożonych wyginięciem (*Loi i wsp., 2001; Loi i wsp., 2011; Loi i wsp., 2014; Saragusty i wsp., 2016*), a nawet restytucji wymarłych już gatunków (*Folch i wsp., 2009*).

Ponadto, klonowanie somatyczne stwarza ogromne możliwości praktyczne dla biomedycyny i biofarmacji. W połączeniu z transgenezą umożliwia uzyskiwanie i powielanie zwierząt transgenicznych produkujących cenne białka terapeutyczne (*Schnieke i wsp., 1997; Baguishi i wsp., 1999*), a także zwierząt będących modelami chorób występujących u człowieka, jak również umożliwia uzyskiwanie transgenicznych zwierząt (przede wszystkim świń), których tkanki i narządy mogłyby być wykorzystywane do ksenotransplantacji u człowieka [szczegółowe omówienie w: *Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji* (Red.: Z. Smorąg, R. Słomski, L. Cierpka), OWN Poznań, 2013)].

Do dnia dzisiejszego, metodą SCNT pomyślnie sklonowano 23 gatunki owadów, ryb, płazów i ssaków (14 gatunków). SCNT stanowi więc rzeczywiście uniwersalne narzędzie pozwalające na bezpłciowe namnażanie zwierząt o potencjalnie bardzo ważnych i szerokich możliwościach jego zastosowania.

Możliwości te są jednak – jak na razie – bardzo ograniczone ze względu na niską wydajność procesu klonowania somatycznego mierzonego liczbą urodzonych, zdrowych zwierząt w stosunku do liczby rekonstruowanych oocytów (0.2-5%) (*Ogura i wsp., 2013*). Mimo licznych badań nad ulepszeniem metody klonowania somatycznego (*Inoue i wsp., 2010; Iuso, Czernik i wsp., 2013; Matoba i wsp., 2014; Matoba i wsp., 2018*) jego wydajność nie wzrosła od ponad 20 lat, od momentu narodzin owcy Dolly (*Wilmut i wsp., 1997*). U zwierząt hodowlanych tylko niewielka liczba zwierząt (1-5%) uzyskanych w wyniku klonowania somatycznego rozwija się w normalne potomstwo (*Wilmut i wsp., 2015*). Przykładowo, uzyskanie owcy Dolly wymagało przeprowadzenia 277 transferów jądrowych i fuzji, z czego rozwinęło się tylko 29 rekonstruowanych zarodków i po ich przeniesieniu do 13 matek zastępczych tylko jedna ciąża zakończyła się prawidłowym porodem. Ponadto, większość klonowanych zwierząt umiera we wczesnym etapie rozwoju płodowego lub rodzi

się z wieloma anomaliami, co powoduje ich śmierć wkrótce po porodzie (*Hill i wsp., 1999; 2000; Wolf, 2001; Ogonuki i wsp., 2002*).

Stan wiedzy na temat klonowania somatycznego zwierząt (głównie gospodarskich) zatrzymał się w „martwym” punkcie i od lat żadne znaczące ulepszenia poprawiające w istotny sposób jego efektywność nie zostały zaproponowane.

Powszechnie uważa się, co jest dokładnie udokumentowane, że jedną z głównych przyczyn niskiej wydajności klonowania somatycznego oraz śmierci klonowanych zwierząt jest nieprawidłowe przeprogramowanie jądra komórki somatycznej (*Czernik i wsp., 2019; Loi i wsp., 2016; praca 1 i 4*).

Przeprogramowanie jądrowe ma na celu modyfikację aktywności genów w jądrze komórkowym, pozwalającym na "cofnięcie" komórki do wcześniejszego etapu rozwoju. W przypadku klonowania somatycznego jest to cofnięcie do stanu jąder (przedjądrzy) zygoty. Proces ten polega na modyfikacji epigenomu powstałego podczas różnicowania komórki. "Wyczyszczenie" tych zmian, czyli przeprogramowanie sprawia, że jądro znów zaczyna działać tak, jak w początkowym etapie rozwoju, czyli w zygocie, a także w macierzystych komórkach zarodkowych [ang. *embryonic stem cells (ESC)*]. W klonowanych zarodkach utrzymanie się epigenetycznych zmian w genomie komórki somatycznej sprawia, że kluczowe geny rozwojowe są niedostępne dla transkrypcji, co prowadzi do nieprawidłowej ekspresji genów i nieprawidłowego rozwoju zarodka, i co za tym idzie płodu.

Gameta męska (plemnik) jest idealną komórką do transferu jądrowego. Przeprogramowanie plemników - których nukleoproteina jest zbudowana głównie z protamin, perfekcyjnie i ciasno upakowanych wokół DNA - zachodzi w oocytach z prawie 100-procentową wydajnością (*Samans i wsp. 2014*). Zaraz po fuzji plemnika z oocytem, genom męskiej komórki rozrodczej „ujawnia swoją totipotencję”. **Plemnik jest jedyną komórką w pełni rozpoznawaną przez oocyt.** Bezpośrednim dowodem na to jest rozmnażanie płciowe wszystkich zwierząt, zaś dowodem pośrednim setki tysięcy klonowanych zarodków, których rozwój (najczęściej zaburzony) niezaprzeczalnie dowodzi, że organizacja jądrowa komórki somatycznej jest bardzo rzadko „resetowana” przez komórkę jajową.

Chromatyna komórek somatycznych jest zbudowana głównie z białek histonowych podczas gdy nukleoproteiną komórki plemnikowej jest głównie protamina. Jej rola w przeprogramowaniu jądrowym (które występuje ze ~ 100% skutecznością w procesie zapłodnienia) nie jest znana, ale może ona – jak sądzę - znacząco wpływać na ten proces.

To, że plemnik jest jedyną komórką rozpoznawalną przez oocyty, było podstawą sformułowania hipotezy badawczej, której weryfikacja i uzyskane wyniki stały się głównym **osiągnięciem habilitacyjnym**. Hipoteza ta zakładała, że strategia przeprogramowania jądrowego będzie skuteczna, gdy transferowane jądro komórki będzie naśladować wewnątrzjądrową architekturę plemnika.

Zatem, przemodelowanie jądra komórki somatycznej w kierunku upodabniającym go do jądra komórki plemnikowej może znacząco ułatwić przeprogramowanie jądrowe, a co za tym idzie, zwiększyć wydajność klonowania somatycznego.

Przebudowa jądra w dojrzewającym plemniku jest skomplikowanym, kilkietapowym procesem, który zachodzi w haploidalnej fazie spermatogenezy - podczas przemiany okrągłych, a następnie wydłużonych spermatyd w plemniki. Proces ten obejmuje kilka istotnych etapów począwszy od translacji specyficznych mRNAs i akumulacji wariantów jądrowych histonów we wczesnym procesie powstawania spermatogonii (*Govin i wsp., 2013*). Wstępem do zamiany somatycznych histonów przez protaminy jest rozluźnienie struktury nukleosomu, poprzedzone acetylacją histonu H4 (*Meistrich i wsp., 1999*) oraz ubikwitynacją histonów H2B i H3 (*Jason i wsp., 2002*)

Łączenie wariantów histonów do DNA wiąże się z destabilizacją nukleosomów (*Rathke i wsp., 2014*). Późniejsze, post-translacyjne modyfikacje histonów umożliwiają przyłączenia białek przejściowych [ang. *Transition proteins (TP)*], co następuje w chromatynie okrągłych spermatyd. Około 90% histonów zostaje zastąpionych przez białka przejściowe, z których najlepiej są scharakteryzowane TPI (około 50%) i TPII (około 40%). Wraz z oddysocjowaniem większości histonów, pojawieniem się białek TP, zanikiem struktury nukleosomów i elongacją okrągłych spermatyd, w spermatydach ustaje aktywność transkrypcyjna. Zahamowanie transkrypcji może być związane z przyłączeniem się białek TP do niezmetylowanych wysp CpG, występujących w aktywnie transkrybowanych genach.

Następnie, w wydłużonych spermatydach następuje fosforylacja TPII, co wiąże się z dekondensacją DNA, ułatwiającą przyłączenie się protamin (*Meistrich i wsp., 2003*), jako ostatnim etapem spermatogenezy. Przyłączenie się protamin do DNA związane jest z bardzo silną kondensacją chromatyny (*Shabazian i wsp., 2007*). U większości ssaków są obecne dwa typy protamin: protamina 1 (Prm1) występująca u prawie wszystkich ssaków (*Queralt i wsp. 1995*) oraz protamina 2 (Prm2), obecna u człowieka i u kilku innych gatunków (*Pirhonen i wsp., 1990*). Ilość Prm2 w chromatynie plemników jest gatunkowo różna: 67% u człowieka,

43% u chomika, 34% u myszy (*Bench i wsp., 1996*). Ludzka hPrm1 zbudowana jest z 57 aminokwasów i wykazuje około 50% homologii do Prm2 (*McKay i wsp., 1986*).

Różnicowanie haploidalnych okrągłych spermatyd w dojrzałe plemniki pociąga za sobą prawdopodobnie najbardziej drastyczną przebudowę jądrową której może doświadczać komórka. Za tym, że proces jest wyjątkowo skomplikowany przemawia fakt, że prowadzone od wielu lat badania nad odtworzeniem procesy spermatogenezy w warunkach *in vitro* nie przyniosły istotnych rezultatów, za wyjątkiem kilku prac, w których próbowano odtworzyć pewne etapy spermatogenezy poprzez hodowlę *in vitro* eksplantów tkanek pobranych z jąder (Sato i wsp., 2011, 2013, Sanjo i wsp. 2018, Kim i wsp., 2015, Reda i wsp. 2016). Sato w wraz z współpracownikami hodował w warunkach *in vitro* eksplanty tkanek pobranych z niedojrzałych jąder mysich. Po 2 miesiącach hodowli, obecne w niedojrzałych jądrach spermatogonalne komórki macierzyste zróżnicowały się w dojrzałe komórki plemnikowe. Następnie plemniki te zostały wstrzyknięte bezpośrednio do oocytu [ang. *intracytoplasm sperm injection (ICSI)*] co doprowadziło do powstania zdrowego i płodnego potomstwa (Sato i wsp. 2011). Podobne doświadczenia, wykorzystujące technikę hodowli narządów pozyskanych z niedojrzałych jąder zostały przedstawione w modelu szczura (Reda i wsp., 2016) i bydła (Kim i wsp., 2015). Wykazano również również możliwość odtworzenia (w pewnym stopniu) procesu spermatogenezy w warunkach *in vitro* wykorzystując tkanki jądrowe pozyskane od dorosłych zwierząt (*Sanjo i wsp., 2018*). Niestety, w przypadku hodowli tkanek pobranych z jąder dorosłych myszy nie udało się osiągnąć „końcowego produktu” jakim jest plemnik co jest dużym ograniczeniem zaproponowanej metody (*Sanjo i wsp., 2018*).

Jak wspomniano, jedyną obecnie metodą, która pozwala w warunkach *in vitro* odtworzyć pewne etapy spermatogenezy jest hodowla *in vitro* eksplantów tkanek, jednak mankamentem metody hodowli narządowej - jeśli nawet udało się odtworzyć pełny proces spermatogenezy- jest brak możliwości śledzenia poszczególnych etapów przemodelowania jądra plemnika (Sato i wsp., 2015).

Nowa metoda przebudowy jądra komórki somatycznej w jądro komórki plemnikowej w warunkach *in vitro*, zaproponowana jako osiągnięcie habilitacyjne, oferuje możliwość monitorowania, w czasie rzeczywistym dynamiki przemiany jądrowej.

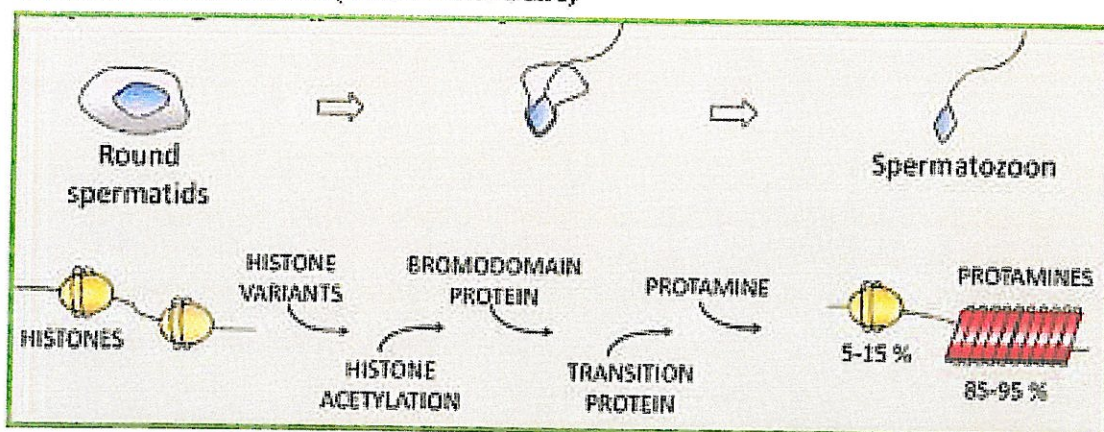
WYNIKI

W ramach projektu, w którym uczestniczyłam pracując na Uniwersytecie w Teramo we Włoszech, podjęłam próbę odtworzenia procesu spermatogenezy w komórkach somatycznych używając owczych fibroblastów jako modelu doświadczalnego. Rozpoczęłam od bardzo prostego eksperymentu, a mianowicie stopniowej ekspresji białek odpowiedzialnych za przemodelowanie jądra plemnika w procesie spermatogenezy (BRDT, TPI, TP II i protamina 1). Najpierw, fibroblasty zostały transfekowane plazmidem kodującym białko BRDT, należące do rodziny białek posiadających bromodomeny, które rozpoznają i wiążą się do acetylowanych histonów biorąc udział w kondensacji i przebudowie chromatyny. Dodatkowo białko BRDT połączone było z białkiem fluorescencyjnym [ang. *green fluorescent protein (GFP)*], co umożliwiło jego łatwą lokalizację i śledzenie w czasie rzeczywistym. Ponadto, przez 16 godzin komórki inkubowane były w pożywce z trichostatyną A (100 nM TSA), która jest inhibitorem deacetylaz histonów (HDACs; ang. *histone deacetylases*) w celu acetylacji białek histonowych. Następnie, 24 godziny później, te same komórki zostały transfekowane białkami przejściowymi (TPI i TPII). Jednak komórki wykazujące ekspresję białka BRDT-GFP nie pobierały wektorów TPI ani TP II i wykazywały oznaki degeneracji, najprawdopodobniej skutkiem acetylacji BRDT, która spowodowała częściową kondensację chromatyny. Kondensacja chromatyny mogła, z kolei, spowodować wyłączenie transkrypcji genów i zablokowanie aktywności komórkowej.

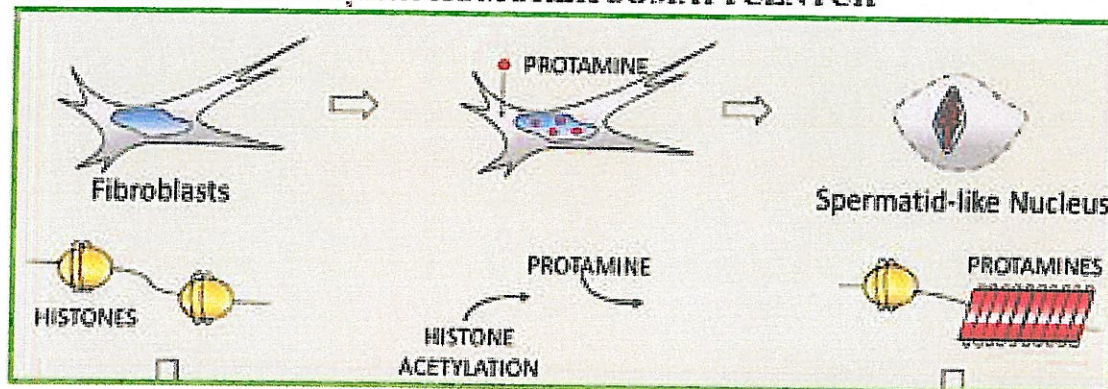
Kolejną próbą były doświadczenia, w których fibroblasty owcze transfekowano wszystkimi 4 wektorami w tym samym czasie. Następnie, transfekowane komórki były monitorowane co 24 godziny przez 7 dni, jednak żadne zmiany fenotypowe nie zostały zaobserwowane. Jak wspomniano powyżej, proces spermatogenezy jest skomplikowanym i bardzo mało poznany procesem i odstępy czasowe wymian kolejnych białek: BRDT z histonami, histonów z TP i TP z protaminą nie są znane.

Jednak u niektórych gatunków ryb, ptaków i bezkręgowców (np. u mątwy zwyczajnej, *Sepia officinalis*) proces spermatogenezy jest dużo bardziej uproszczony i histony w okrągłych spermatydach są zastępowane bezpośrednio białkami podobnymi do białek protamin (*Martinez-Soler i wsp., 2007*). Opierając się na tych obserwacjach podjęłam próbę bezpośredniej ekspresji białka protaminy 1 (Prm1) w jądrach komórek somatycznych (Ryc. 1).

SPERMATOGENEZA (POST-MEJOZA)



PROTAMINIZACJA JĄDER KOMÓREK SOMATYCZNYCH



Ryc. 1. Schemat protaminizacji jąder komórek somatycznych (Iuso i Czernik et al., 2015; praca 5)

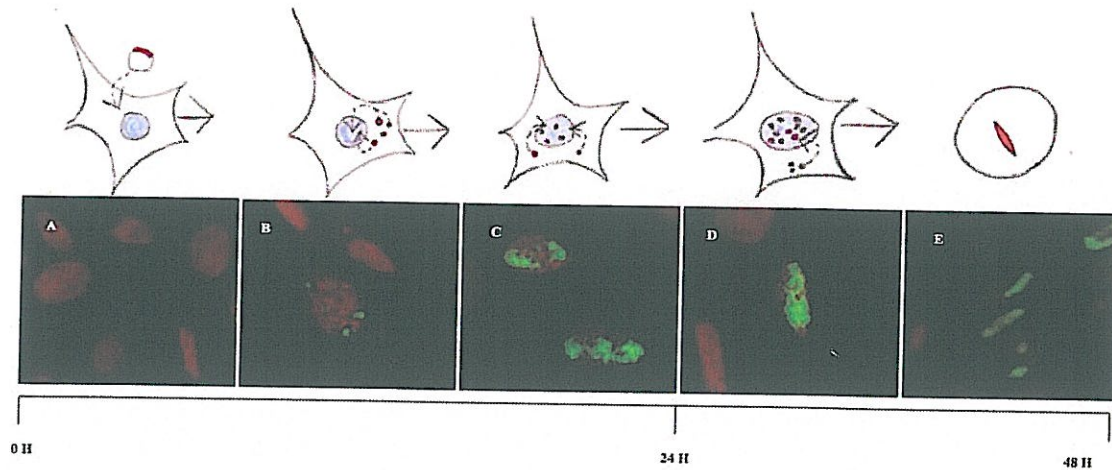
Zdecydowałam na wykorzystanie w moich doświadczeniach tylko białka protaminy 1 (Prm1), które połączone było z białkiem fluorescencyjnym GFP lub RFP [ang. *red fluorescent protein* – (RFP)] co umożliwiała jego łatwą lokalizację i śledzenie w czasie rzeczywistym. Wybranie do doświadczeń tylko Prm1, wynikało z tego, że: po pierwsze moim modelem eksperymentalnym były owcze fibroblasty, a plemniki tryka zawierają tylko Prm1; po drugie, Prm1 jest syntetyzowane w ostatecznej formie i nie wymaga dodatkowych modyfikacji posttranskrypcyjnych (de Mateo i wsp., 2011).

Jak protaminizacja wpływa na kształt jąder komórek somatycznych

Po transfekcji komórek somatycznych (owczych fibroblastów) wektorem ludzkiej Prm1, wykazałam, że ekspresja jedynie Prm1 przemienia okrągłe jądro komórki somatycznej w jądro przypominające kształtem jądro spermatydy tryka (Ryc. 2E). Proces ten był bardzo szybki i zwykle kończył się w przeciągu 48 godzin (Ryc. 2; Iuso, Czernik i wsp., 2015; praca 5). Poniżej, na Ryc. 2 przedstawiono schematycznie (górny panel, Ryc. 2) i stopniową

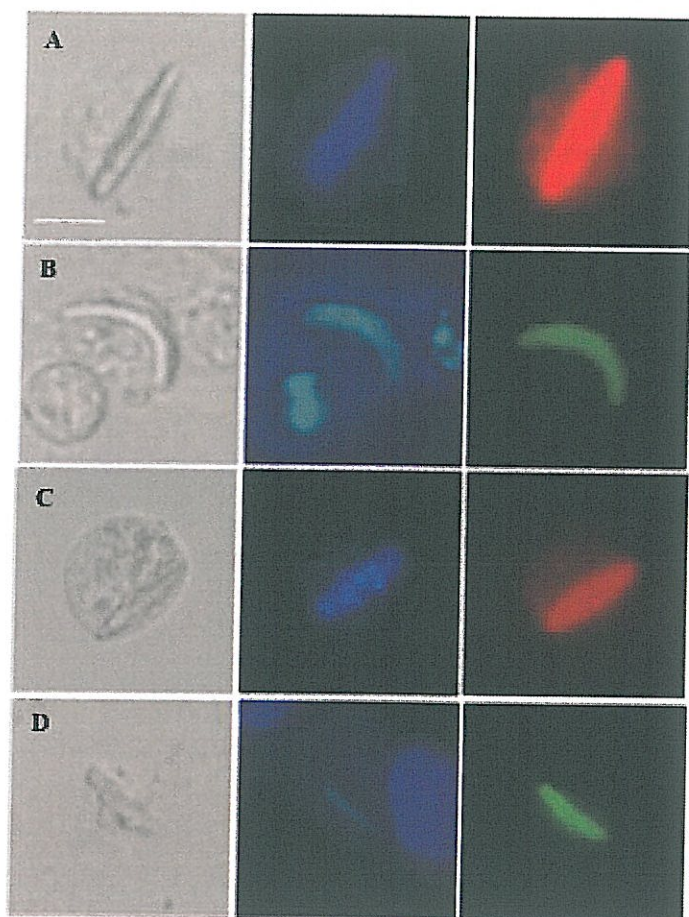
HC

inkorporację Prm1 do jądra komórki somatycznej i jego przemodelowanie w warunkach *in vitro* (Ryc. 2A-E).



Ryc. 2. Stopniowa ekspresja Prm1 w jądrach komórek somatycznych. (A) jądro somatyczne przed protaminacją, (B) jądro somatyczne po 4 godzinach od protaminowania; (C) ogniska protaminowe w jądrze somatycznym po 24 godzinach od protaminizacji; (D) 40 godzin po protaminizacji; E - całkowicie protaminowane jądro somatyczne 48 godzin po transfekcji. Panel góry przedstawia schematycznie wbudowanie protaminy do jądra komórki somatycznego. Panel dolny: zielony – ekspresja Prm1-GFP w jądrze komórki somatyczne; czerwony - jądro barwione jodkiem propidyny (PI) (Czernik i wsp., 2016, praca 3)

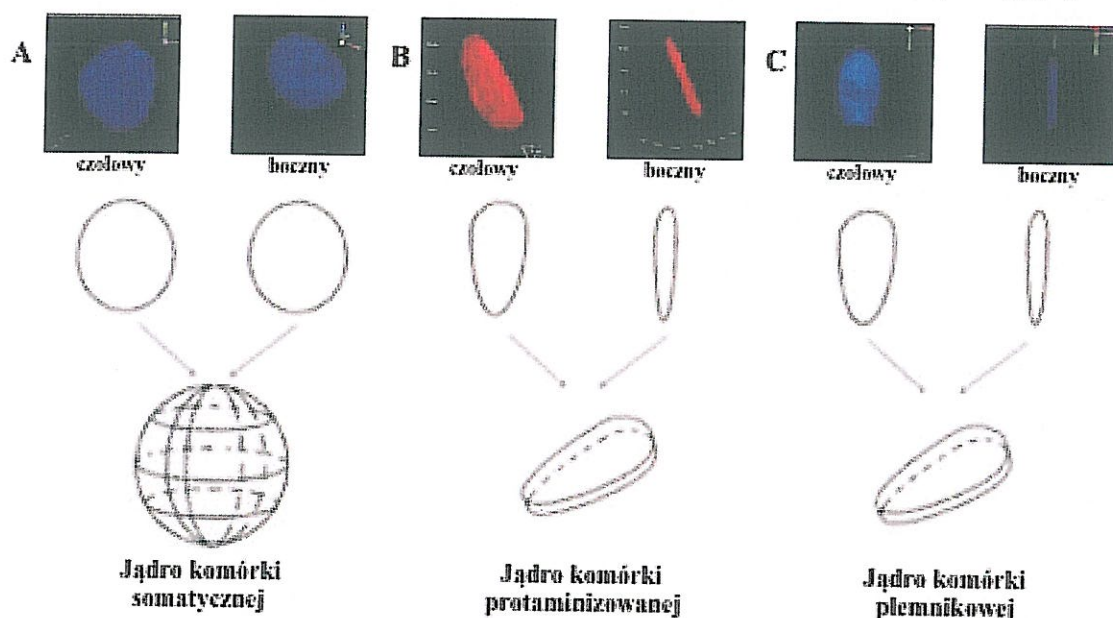
Pierwszą obserwacją było, że protamina przekształca interfazowe jądro somatyczne w jądro o wydłużonym kształcie do złudzenia przypominające kształtem jądro plemnika (Ryc. 2E). Eksperyment ten został powtórzony kilkadziesiąt razy i okazał się wysoce powtarzalny (Iuso, Czernik i wsp., 2015; praca 5). Monitorując proces w czasie rzeczywistym (*time-lapse*) zaobserwowaliśmy, że protaminizacja jądra somatycznego rozpoczyna się od kilku (3 – 4) punktów ogniskowych w jądrze, ok. 4 godzin od transfekcji (Ryc. 2B). Z upływem czasu punkty te rozpraszają się po całym jądrze (ok. 16-24 godzin od transfekcji) (Ryc. 2C). Końcowym wynikiem (około 48 godzin od protaminizacji) była radykalna przebudowa jądra somatycznego w jądro o wydłużonej, spłaszczonej strukturze do złudzenia przypominające jądro komórki plemnikowej (Ryc. 2D, E). Wyniki te zostały potwierdzone zarówno w modelu owczym (Ryc. 3A, B) jak i mysim (używając mysich fibroblastów, pozyskanych od dorosłego osobnika) (Ryc. 3C, D) przy użyciu ludzkiej (Ryc. 3A, C) i mysiej (Ryc. 3B, D) protaminy 1.



Ryc. 3. Protaminizowane mysie i owcze komórki somatyczne. W pełni protaminizowane jądra fibroblastów owczych (A, B) i mysich (C, D) poprzez ludzką (A, C) lub mysią (B, D) *Prm1*. Zielone: komórki somatyczne wykazujące ekspresję mysiej *Prm1-GFP*; czerwone: komórki somatyczne wykazujące ekspresję ludzkiej *Prm1-RFP*; niebieski: jądra komórek somatycznych wybarwione barwnikiem jądrowym Hoechst. Skala: 5 μm (Czernik i wsp., 2016; praca 3).

Ponadto, zaobserwowaliśmy, że komórki całkowicie sprotaminizowane tj. ok. 40-48 godzin po transfekcji, odrywają się od płytki hodowlanej (nie rosną w monowarstwie) i unoszą się w pożywce hodowlanej. Dodatkowo zjawisko to powiązane było z zablokowaniem aktywności transkrypcyjnej (Czernik i wsp., 2016; praca 3). Należy podkreślić, że podobne zjawisko – zablokowania aktywności transkrypcyjnej - obserwowane jest w dojrzałych komórkach plemnikowych, w warunkach *in vivo*.

Kolejnym dowodem na to, że zaproponowana metoda upodabnia jądro komórki somatyczne do komórek plemnikowych jest ich struktura (Ryc. 4). Jak zostało przedstawione na Ryc. 4., protaminizowane jądra komórek somatycznych z widoku bocznego i czołowego (Ryc. 4B) wyglądają identycznie jak jądra komórek plemnikowych (Ryc. 4C) i nie przypominają w żadnym stopniu jądra komórek somatycznych (Ryc. 4A).

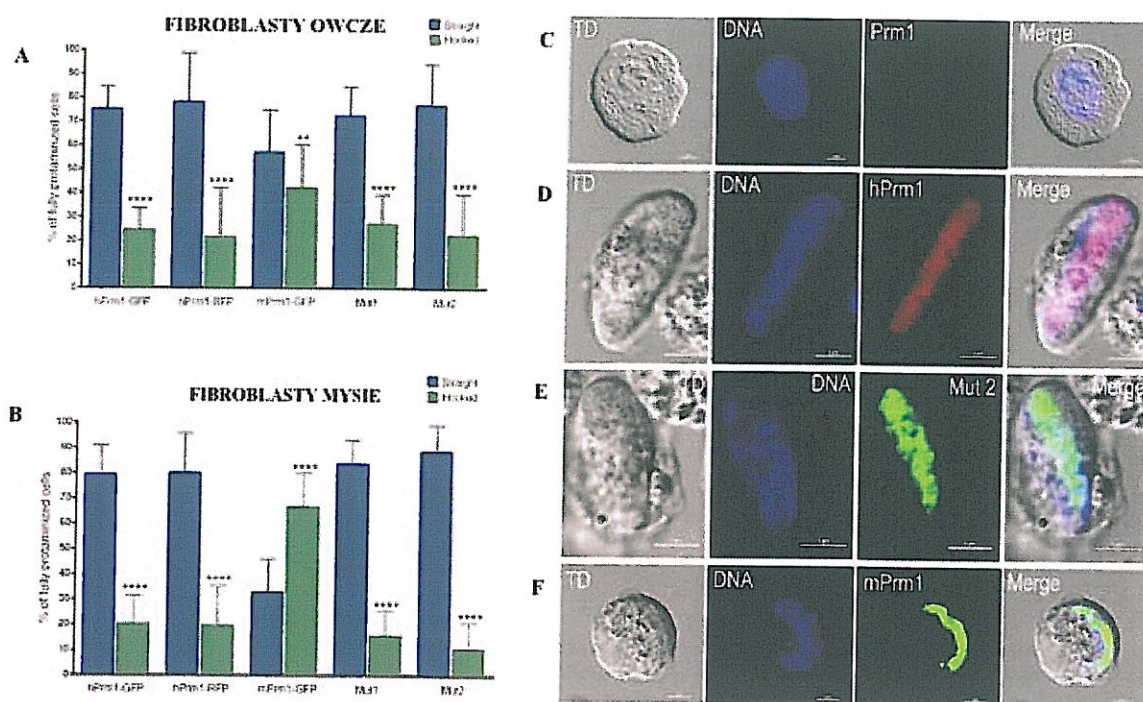


Ryc. 4. Kształt jądra komórki somatycznej (A), protaminizowanej (B) i plemnikowej (C) w widoku bocznym i czołowym (Czernik i wsp., 2016; praca 3).

Ponadto, zaobserwowaliśmy, że ludzka hPrm1 przemodeluje jądro komórki somatycznej w prosty kształt (Ryc. 3AC; Ryc. 5D), natomiast mysia mPrm1 „nadaje” mu kształt haczykowaty (Ryc. 3B; Ryc. 5F). Oba kształty jąder naśladują kształt jąder komórek plemnikowych myszy i człowieka. Wiadomo, że sekwencja mysiej protaminy posiada o 3 cysteiny więcej niż ludzka. Postawiliśmy więc hipotezę, że za kształt jądra plemników poszczególnych gatunków zwierząt może być odpowiedzialna ilość i lokalizacja cystein i dodatkowo łączenie dwusiarczkowe (S-S) wewnątrz protaminy. W tym celu zmutowaliśmy plazmid mysiej protaminy, w których stopniowo zastępowaliśmy cysteinę z mysiego genu Prm1, począwszy od tej umieszczonej w pozycji 15 (cysteina została zastąpiona tyrozyną – Prm1-Mut1) i następnie w pozycji 29 (cysteina została zastąpiona seryną, Prm1-Mut2), co stopniowo upodabniało ją w strukturze do protaminy ludzkiej. Następnie, doświadczenia przeprowadzone przez Flavię Muccini, której byłam promotorem pracy magisterskiej, sprawdziły, jak ta zmiana wpływa na przebudowę jądrową owczych i mysich fibroblastów (Ryc. 5A i B). Otrzymaliśmy bardzo interesujące wyniki, które stały się podstawą pracy magisterskiej pt. *“Does Protamine 1 (Prm1) sequence define the species-specific shape of spermatozoa nuclei. An in vitro study using mutated Prm1 vectors in somatic cells”*, pokazujące, że cysteina w pozycji 29 jest odpowiedzialna, za haczykowaty kształt jądra w mysich plemnikach, a jej brak powoduje prosty kształt jądra w ludzkich plemnikach. Wyniki

pokazują, że za kształt ten najprawdopodobniej odpowiedzialne są cysteina w pozycji 29, jak również wiązania dwusiarczkowe wewnątrz- i między protaminami.

Wprawdzie wyniki tych badań nie wchodzą w skład osiągnięcia jednak ściśle bezpośrednio się z nim wiążą i dlatego zamieściłam je dodatkowo w autoreferacie (zostały one wysłane do czasopisma *Nature Communication* i praca jest w trakcie oceny recenzentów (Czernik et al., (2019). *Protamine sequence determines species-specific nuclear shape in a simplified in vitro model of nuclear remodelling*. *Nat. Commun.* submitted).



Ryc. 5. Przebudowa jądra komórki somatycznej pod wpływem protaminy. Wykres przedstawia procent prostych (niebieskie kolumny) i haczykowatych (zielone kolumny) jąder w owczych (A) i mysich (B) fibroblastach transfekowanych Prm 1 i zmutowana Prm1-Mut1 i Prm1-Mut 2 (***) oznacza $P < 0,05$, **** oznacza $P < 0,0001$). (C – F) 2-wymiarowa struktura komórek somatycznych; (C) jądro kontrolnej komórki somatycznej (nie transfekowanej), (D) jądro komórki somatycznej wykazujące ekspresję ludzkiej protaminy 1 (hPrm1), (E) i zmutowanej Prm1 (Mut 2), (F) haczykowate jądro somatyczne wykazujące ekspresję mysiej Prm1 (mPrm1). (C – F) jasne pole (lewe zdjęcia); niebieskie - jądro barwione Hoechst 33342, czerwone - hPrm1; zielony - Mut2 na zdjęciu (E) lub mPrm1 na zdjęciu (F).

Zaproponowany przeze mnie proces protaminizacji jest procesem bardzo łatwym, szybkim i wydajnym. Może być z łatwością powtórzony w każdym laboratorium biologii komórki lub embriologii. Procedura została bardzo dokładnie, ze wszystkimi szczegółami

opisana i opublikowana w czasopiśmie *Nature Protocols* (Czernik i wsp., 2016; praca 3), co umożliwia bardzo precyzyjne odtworzenie tego procesu.

Sprawdzenie czy protamina wymienia białka histonów w jądrach komórek somatycznych.

Po morfologicznej ocenie protaminizowanych jąder komórek somatycznych, następnym krokiem było udowodnienie, że protamina łączy się z DNA tych komórek i zastępuje w nim białka histonów. W tym celu została przeprowadzona analiza CHIP-seq, która potwierdziła, skuteczne wiązanie się Prm1 do DNA (*Iuso, Czernik i wsp., 2015; praca 5*). Pokazaliśmy, że Prm1 efektywnie wiąże się do DNA jądra somatycznego w 42 miejscach na 10 z 27 chromosomach i następuje to już po 16 godzinach od transfekcji (*Iuso, Czernik i wsp., 2015; praca 5*).

Następnym krokiem było sprawdzenie czy protamina efektywnie zastępuje somatyczne histony. W tym celu komórki wykazujące stałą ekspresję histonu H2B stabilnie połączonym z zielonym białkiem fluorescencyjnym (GFP) transfekowane były Prm1-RFP. Zaobserwowaliśmy bardzo aktywną wymianę histonów na protaminę już 40 godzin po transfekcji komórek H2B-GFP. Żadna z całkowicie sprotaminizowanych komórek (ok. 48 godzin po transfekcji) nie wykazywały zielonej fluorescencji (*Iuso, Czernik i wsp., 2015, praca 5*).

Ponieważ naszym głównym założeniem było wykorzystanie protaminizowanych komórek w procesie klonowania somatycznego, sprawdziliśmy, czy protamina zastępuje w jądrze histon H3 trimetylowany na lizynie 9 (H3K9me3), który uznany jest za jedną z głównych barier epigenetycznych w przeprogramowaniu jądrowym na drodze klonowania somatycznego (*Matoba i wsp., 2014*). Wyniki pokazują, że Prm1 skutecznie usuwa z jądra komórek somatycznych histon H3K9me3. Jak zostało przez nas udowodnione, w całkowicie sprotaminizowanych jądrach komórek somatycznych nie stwierdzono obecności histonu H3K9me3 (*Iuso, Czernik i wsp., 2015; praca 5*).

Ten bardzo interesujący wynik, przemawia za tym, że sprotaminizowane jądra komórek somatycznych będą łatwiej przeprogramowane przez oocyt w procesie klonowania somatycznego. Dlatego też, następnym krokiem było sprawdzenie czy przemodelowane jądra komórek somatycznych są funkcjonalne, tj. lepiej/latwiej przeprogramowane przez cytoplazmę oocytu. W tym celu wykorzystaliśmy najlepszy, w tym przypadku, test biologiczny jakim jest metoda klonowania somatycznego: sprotaminizowane jądra owczych

komórek somatycznych (fibroblastów) prowadzane były do enukleowanych (pozbawionych własnego materiału genetycznego) oocytów owcy.

Sprawdzenie jak protaminizowane jądra komórek somatycznych wpływają na wydajność SCNT

W procesie klonowania somatycznego i weryfikacji funkcjonalności protaminizowanych komórek somatycznych został wykorzystany model owczy, na którym pracuję na Uniwersytecie Teramo od ponad 10 lat. Jak wspomniano we wstępie, proces klonowania somatycznego wykazuje bardzo niską wydajność na co ma wpływ nie tylko nieprawidłowe przeprogramowanie jądra komórki somatycznej, ale również inwazyjne i skomplikowane techniki mikromanipulacyjne. Od początku historii klonowania somatycznego, kładziony jest szczególny nacisk na udoskonalenie procedury SCNT, zwłaszcza pod kątem metodologicznym. Zwraca się szczególną uwagę na eliminowanie lub ograniczanie wszelkich czynników, które mogą negatywnie wpływać na jakość klonowanych zarodków (*Inoue i wsp., 2003; Ogura i wsp., 2013; Wakayama i wsp., 2013; Iuso, Czernik i wsp., 2013*).

W celu usunięcia jądrowego materiału (płytki metafazowej II podziału mejotycznego), oocyty owcze wybarwiane są barwnikiem jądrowym (Hoechst) i następnie naświetlane lampą UV co umożliwia jego precyzyjną lokalizację. Jednak ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe (UV), uszkadza mitochondrialny DNA, co za tym idzie negatywnie wpływa na rozwój klonowanych zarodków (*Gil i wsp., 2012*). Opierając się na moim doświadczeniu i własnych obserwacjach – jak również na obserwacjach innych autorów – opracowałam wraz z moimi współpracownikami nową metodę enukleacji oocytów owczych, w której wyeliminowaliśmy ekspozycję cytoplazmy oocytów na promieniowanie UV (*Iuso, Czernik i wsp. 2013*). W zaproponowanej metodzie oocyty nie były bezpośrednio narażone na światło UV. Prawidłowa enukleacja weryfikowana była obecnością wrzeczona II podziału mejotycznego w usuniętych fragmentach cytoplazmy (karioplastach). Opublikowane wyniki jednoznacznie wykazują na istotnie większe potencje rozwojowe rekonstruowanych zarodków (pozyskanych przez wprowadzenie do oocytu pozbawionego materiału genetycznego jąder fibroblastów owczych) do stadium blastocysty, jak również lepszą jakość morfologiczną zarodków, które nie były naświetlane lampą UV w porównaniu do zarodków kontrolnych – enukleowanych metoda tradycyjną (*Iuso, Czernik i wsp., 2013*). Na podstawie

ekspresja genu Xist została również wykryta u bydła (*Inoue i wsp., 2010*) i świni (*Yuan i wsp., 2014; Zeng i wsp., 2016*). Dodatkowo, u świń wykazano wzrost odsetka klonowanych zwierząt po transferze jąder komórek somatycznym z wyciszonym genem Xist (*Zeng i wsp., 2016; Ruan i wsp., 2018;*).

Mimo bardzo obiecujących wyników, regulacja ekspresji Xist jest mało popularną metodą wykorzystywana w klonowaniu somatycznym ze względu na jej czasochłonność i konieczność zastosowania bardzo zaawansowanych metod biologii molekularnej. Dodatkowo, kilka lat później zostało udowodnione, że metoda wyciszenia genu Xist poprzez interferencyjne RNA jest skuteczne tylko w zarodkach męskich (*Oikawa i wsp., 2013*) co jest dodatkowym ograniczeniem tej metody.

Kolejną barierą epigenetyczną, która została wykryta w komórkach - dawcach jąder użytych w procesie klonowania somatycznego jest metylacja histonów, która ogranicza właściwą transkrypcję genów po aktywacji genomu zygotycznego. Matoba i wsp., w pracy opublikowanej w czasopiśmie *Cell* w 2014 roku, zidentyfikowali histon H3k9me3, który uważany jest za jeden z głównych barierę epigenetyczną blokującą prawidłowe przeprogramowanie jądrowe w klonowanych zarodkach. Dodatkowo zaproponowali metodę manipulacji stopniem metylacji jąder komórek somatycznych poprzez wstrzyknięcie demetylazy lizyny histonowej (KDM4E) do zrekonstruowanych zarodków mysich w celu zwiększenia wydajności klonowania somatycznego (*Matoba i wsp., 2014*). Procedura ta znacząco wpłynęła na odsetek prawidłowo rozwijających się zarodków myszy obu płci (*Matoba i wsp., 2014*) jak również kilka lat później małp makaków (*Liu i wsp., 2018*). Ponadto, zostało udokumentowane, że wstrzyknięcie KDM4E do zrekonstruowanych zarodków bydłowych znacznie poprawia ich przedimplantacyjny rozwój (*Liu i wsp., 2018*). W modelu owczym pokazano, że komórki somatyczne traktowane rekombinowanym białkiem KDM4D i użyte jako dawcy jądra w procesie klonowania somatycznego znacząco poprawiają rozwój przedimplantacyjny klonowanych zarodków owiec (*Zhang i wsp., 2018*).

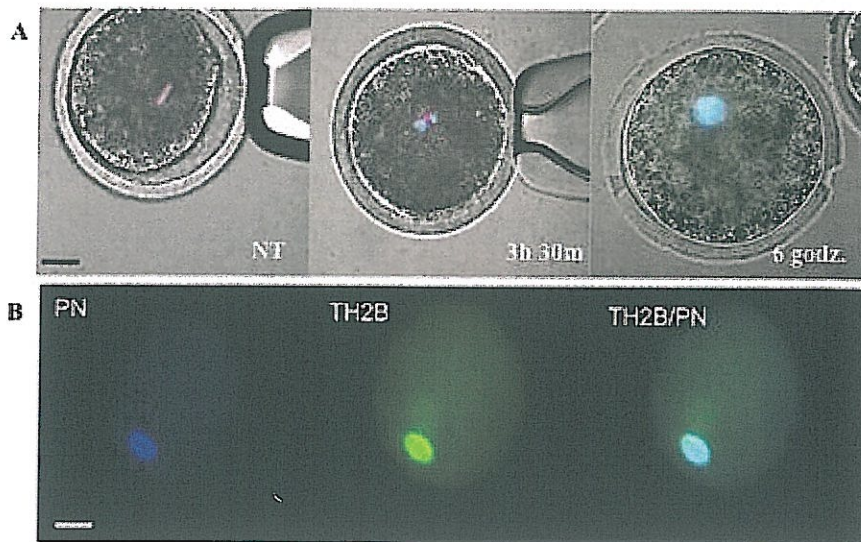
Wszystkie te metody udoskonalające metodę klonowania somatycznego u ssaków, ich wady, zalety i problematyka z nimi związana zostały dokładnie opisane i poddane analizie krytycznej w moich pracach przeglądowych (*Czernik i wsp., 2019; Loi i wsp., 2016; praca 1 i 4*) wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego.

Jak już wyżej wspomniano, dotychczasowe badania nad czynnikami ograniczającymi efektywność klonowania somatycznego związane są głównie z zastosowaniem bardzo skomplikowanych metod biologii molekularnej. Metody te są jednak efektywne głównie w modelu mysim, w którym wskaźnik efektywności klonowania ocenia się jako najwyższy. Do

tej pory nikt nie zaproponował metody klonowania somatycznego, która byłaby metodą uniwersalną, łatwą i dostępną nawet dla mniej zaawansowanych w badaniach molekularnych jednostek badawczych zajmujących się somatycznym klonowaniem ssaków i problematyką przeprogramowania komórek.

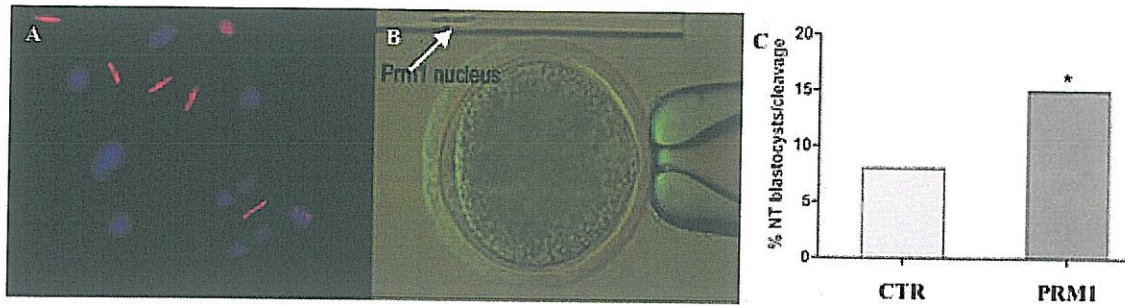
Metoda zaproponowana przeze mnie jako osiągnięcie habilitacyjne, jest prostą metodą, dostępną dla każdego laboratorium. Dodatkowo, jest ona skuteczna i bardzo obiecująca w klonowaniu zwierząt gospodarskich (zastosowany w badaniach model owczy) i co najważniejsze, podąża „drogą Natury” i nie wymaga żadnych modyfikacji genetycznych DNA, co ma miejsce we wcześniej zaprezentowanych metodach.

W opracowanej przeze mnie, nowej metodzie przeprogramowania jądrowego na drodze klonowania somatycznego, która w pewnym stopniu „oszukuje” oocyt, jako dawczynię jądra użyte były protaminizowane jądra komórki somatycznej – upodobnione do jądra plemnika (Ryc. 2E; Ryc. 7A, B). Po 6 godzinach od wprowadzenia protaminizowanych do oocytów enukleowanych opracowana przez nas metodą (patrz wyżej) zaobserwowaliśmy duże „pseudoprzedjądrza”, porównywalnej wielkości do tych, które były obecne w zarodkach kontrolnych (*Iuso, Czernik i wsp., 2015; praca 5*). W tym samym czasie, protamina stopniowo zanikała z „pseudoprzedjądrzy” zrekonstruowanych oocytów (28 zygot z 36 analizowanych) i była zastępowana przez wariant histonu specyficznego dla oocytu - TH2B (Ryc. 6B), który odgrywa kluczową rolę w prawidłowym przeprogramowaniu jądrowym (*Montellier i wsp., 2013; Shinagawa i wsp., 2014*).



Ryc. 6. Odtworzenie nukleosomowej organizacji jądra oocytu po transferze protaminizowanego jądra komórki somatycznej (A) Stopniowe zanikanie Prm1 podczas tworzenia się przedjądrza po przeniesieniu jądra komórki protaminizowanej (NT). Czerwone - Prm1-RFP, niebieski – jądro; (B) Inkorporacja TH2B w przedjądrzu (PN) po transferze protaminizowanego jądra do komórki jajowej. Przedjądrze (PN, niebieski), TH2B (zielony), Merge (TH2B / PN). Scal bars 20 μm.

Rekonstruowane zarodki hodowane były w warunkach *in vitro* i monitorowane co 24 przez 7 dni w celu weryfikacji stopnia rozwoju. Ponieważ zaproponowany proces klonowania somatycznego jest bardzo zbliżony do procesu zachodzącego podczas zapłodnienia *in vitro*, pozytywnie on wpłynął na odsetek zarodków rozwijających się do stadium blastocysty, który wzrósł z 4% (blastocysty pozyskane poprzez wprowadzenie nie protaminizowanego jądra) do 14% (Ryc. 7C). Jest to ogromne osiągnięcie, gdyż nikt wcześniej nie zaproponował efektywniejszej metody klonowania somatycznego u zwierząt hodowlanych (model owczy). Dodatkowo blastocysty otrzymane drogą klonowania poprzez wprowadzenie jądra komórek protaminizowanych (Ryc. 7A) pod kątem morfologicznym, nie różniły się, pod kątem morfologicznym, od blastocyst kontrolnych uzyskanych drogą zapłodnienia *in vitro* [ang. *in vitro fertilized* – (IVF)] (Ryc. 7D; Iuso, Czernik i wsp., 2015; praca 5). Ma to istotne znaczenie dla prawidłowego rozwoju poimplantacyjnego płodów rozwijających się z rekonstruowanych tą metodą zarodków. Te unikatowe wyniki, które opierają się na wykorzystaniu komórek somatycznych z radykalnie zreorganizowaną chromatyną, w której białka histonów zostały zastąpione protaminą, zapewniają bardzo obiecującą poprawę wydajności somatycznego klonowania ssaków.



D - TABELA 1

GRUPY	CALKOWITA LICZBA KOMÓREK	LICZBA KOMÓREK (ICM/TE)	LICZBA CHROMOSOMÓW
IVF	80.25±13.28	0.39±0.11	70% (28/40)
NT - komórki Prm1	82.00±15.64	0.40±0.07	72% (31/43)

Ryc. 7. Transfer protaminizowanego jądra komórki somatycznej do pozbawionego materiału genetycznego oocyta owczego. (A) zdjęcie przedstawia protaminizowane komórki somatyczne użyte do klonowania somatycznego, (B) przykładowa komórka protaminizowana użyta w procesie SCNT, (C) wykres przedstawia procent SCNT-Prm1 (Prm1) i SCNT-CTR (CTR) blastocyst (*oznacza $P=0.0372$), (D) Tabela 1 przedstawia jakość klonowanych blastocyst [ang. Inner Cell Mass (ICM) – węzeł zarodkowy, TE-trofektoderma), zarodki produkowane w warunkach *in vitro* użyte było jako kontrola [ang. *in vitro* fertilized (IVF)] (Iuso, Czernik i wsp., 2015; praca 5).

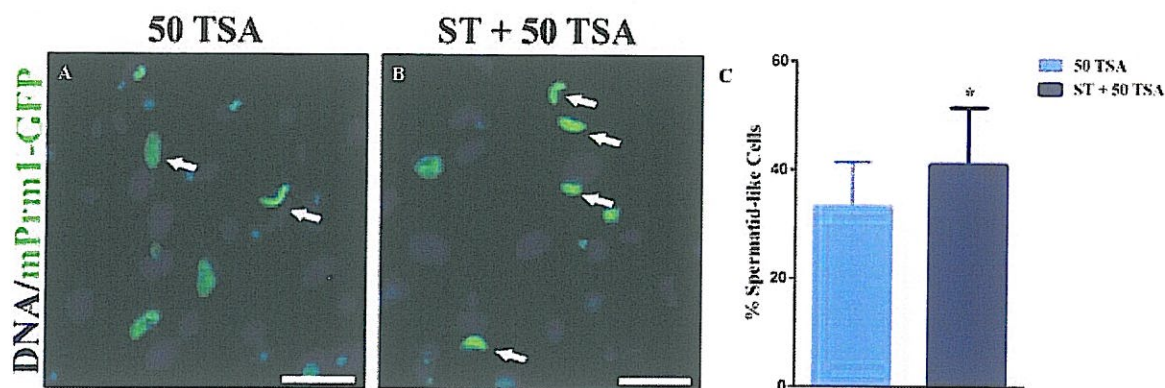
Proces protaminizacji komórek somatycznych został opatentowany europejskim patentem (PCT / EP2015 / 058701; Loi, Iuso, Czernik, i wsp., 2015, praca 6), w którym jestem współtwórcą. Ponadto, przedstawione osiągnięcie (protaminizacja jąder komórek somatycznych) zatytułowane "Exogenous Expression of Human Protamine 1 (hPrm1) Remodels Fibroblast Nuclei into Spermatid-like Structures", zaprezentowane było na międzynarodowym sympozjum "Future of Nuclear transfer and Nuclear Reprogramming" w Japonii, w Yamanashi (2016) i zostało nagrodzone przez Sir Johna Gurdon, Laureata Nagrody Nobla (2012), jako najlepsza zaprezentowana praca.

Dodatkowo osiągnięcie to odbiło się bardzo dużym echem w międzynarodowych mediach społecznościowych przez co dotarło do szerokiej rzeszy odbiorców m.in. <http://www.ilcentro.it/teramo/clonazione-una-nuova-tecnica-scoperta-dall-ateneo-di-teramo-1.1353686>; http://ilcentro.gelocal.it/teramo/cronaca/2015/11/27/news/clonazione-una-nuova-tecnica-scopertadall-ateneo-di-teramo-1.12521943?refresh_ce; <https://motherboard.vice.com/it/article/pg34e9/cellule-spermatozoi-clonazione>

Istotnym przełomem w badaniach nad klonowaniem ssaków były badania Campbella i współpracowników, którzy jako dawców jąder użyli komórek wprowadzonych w fazę (stan) G0 (Campbell i wsp.1996). Faza G0, jest to stan spoczynkowy komórki oznaczający jej wyjście z cyklu komórkowego i charakteryzujący się obniżeniem poziomu transkrypcji, degradacją większości rodzajów mRNA, zmianami w polirybosomach oraz kondensacją chromatyny. Autorzy założyli, że ten specyficzny stan komórek i chromatyny jądrowej w fazie G0, umożliwi prawidłową reakcję wszystkich usypionych genów (jak również - być może - także struktur jądrowych) wprowadzonego w tej fazie jądra na sygnały płynące z cytoplazmy oocyty, czyli, innymi słowy, umożliwi pełne przemodelowanie i przeprogramowanie jąder nawet tych komórek, które weszły na drogę różnicowania lub też są już w pełni zróżnicowane. Należy pamiętać, że komórka plemnikowa w momencie zapłodnienia również jest w fazie spoczynku (fazie G0).

Dlatego też postanowiliśmy udoskonalić dotychczasową metodę protaminizacji komórek somatycznych, w której odsetek jąder ulegających całkowitej protaminizacji wynosił 30% i którą uznaliśmy niezadowalającą.

Doświadczenia przeprowadzone przez doktoranta Lucę Palazzese, którego byłam promotorem pomocniczym pracy doktorskiej, pozwoliły upodobnić proces protaminizacji komórek somatycznych do tego, który zachodzi w warunkach fizjologicznych, podczas przemodelowania w kierunku jąder wydłużonych spermatyd. Obniżenie poziomu transkrypcji, jak również hiperacetylacja histonów w okrągłych spermatydach, odgrywa kluczową w prawidłowej przebudowie jądra komórki somatycznej do jądra komórki plemnikowej. Na tej podstawie postanowiliśmy udoskonalić dotychczasową metodę protaminizacji jąder komórek somatycznych poprzez głodzenie komórek, przez 48 godzin przed transfekcją w pożywce o niskiej zawartości surowicy (0,5%), aby wprowadzić je w stan G0, a następnie przez 16 godzin inkubować je w pożywce z trichostatyną A (50 nM TSA), która jest inhibitorem deacetylaz histonów [(ang. *histone deacetylases* (HDACs;)] w celu acetylacji białek histonowych. Wprowadzenie komórek przed procesem protaminizacji w stan G0 jak również traktowanie ich TSA (Ryc. 8A), nie tylko przygotowało komórki do odpowiedniego “przyjścia” jej przez cytoplazmę oocyty, ale również ułatwiło bardziej prawidłową protaminizację jądra komórki somatycznej (Fig. 8C). Dzięki tej modyfikacji metody protaminizacji odsetek całkowicie sprotaminizowanych jąder somatycznych wzrósł z 30 do 45% (Fig. 8C, *Palazzese i wsp. 2018; praca 2*).



Ryc. 8. Stopień protaminizacji jąder komórek somatycznych. (A) zdjęcie przedstawia całkowicie protaminizowane jądra komórek somatycznych po incubacji z TSA (A) i po głodzeniu, i inkubacji z TSA (B) białe strzałki pokazują całkowicie spotaminizowane jądra komórek somatycznych. (C) Wykres przedstawia procent całkowicie protaminizowanych jąder komórek somatycznych (po incubacji z TSA (kolumna jasno niebieska) i po głodzeniu, i inkubacji z TSA (kolumna ciemno niebieska) (*oznacza $P=0.0301$) (Palazzese i wsp., 2018; praca 2).

Na badania nad klonowaniem ssaków przeznaczają się na świecie olbrzymie nakłady. Są dwa główne tego powody: pierwszy – natury czysto poznawczej, drugi – czysto praktycznej. Badania nad klonowaniem ssaków, w których jądra pochodzące z komórek różnych tkanek wprowadzane są do całkowicie odmiennego środowiska cytoplazmatycznego, dostarczyć mogą cennych informacji dotyczących interakcji jądro-cytoplazmatycznych we wczesnej embriogenezie ssaków, mechanizmów różnicowania komórkowego oraz natury i roli czynników odpowiedzialnych za przemodelowanie jąder komórkowych i przeprogramowanie genomu komórek somatycznych. Jednak niska wydajność związana z dotychczasowymi metodami uzyskiwania klonowanych zwierząt jest głównym czynnikiem ograniczającym praktyczne wykorzystanie na szerszą skalę tej metody w hodowli, biofarmacji i biomedycynie. Procedura może być wykorzystana w celu uzyskania gamet z komórek somatycznych oraz zrozumieniu mechanizmów molekularnych regulujących nakładanie imprintingu i konserwacji metylacji DNA. Co więcej, silna kondensacja chromatyny podczas procesu protaminizacji, chroni genom komórki przed uszkodzeniem, dzięki czemu komórki protaminizowane mogą być idealnym kandydatem na ulepszenie procesu liofilizacji komórek somatycznych. Zaprezentowana procedura jako osiągnięcie habilitacyjne jest bardzo innowacyjna i oryginalna, gdyż protaminizacja genomu komórek somatycznych nie została przeprowadzona (poza moimi badaniami) do dnia dzisiejszego.

W ostatnich latach zainteresowanie procesem klonowania somatycznego wzrosło ze względu na lepsze poznanie procesu przeprogramowania/przemodelowania jądrowego (Inoue

i wsp., 2010; Matoba i wsp., 2014; Iuso, Czernik i wsp., 2015; Czernik i wsp., 2016; Palazesse i wsp., 2018; praca 2, 4 i 5). Ostanie osiągnięciu i postępy w procesie klonowania somatycznego ssaków zostały dokładnie przeze mnie opisane i zanalizowane w pracy umieszczonej jako **praca 1** w osiągnięciu habilitacyjnym.

Zaprezentowane osiągnięcie habilitacyjnym, będące tematem postępowania habilitacyjnego otwiera ogromne możliwości w zrozumieniu najważniejszych ścieżek, które umożliwią poznanie i wyjaśnienie mechanizmów przeprogramowania jąder somatycznych w cytoplazmie oocytów, a także pozwoli na zwiększenie zarówno wydajności zwierząt uzyskanych drogą klonowania somatycznego, jak i poprawę ich jakości – pod względem zdrowotnym. Dodatkowo zaproponowany proces protaminizacji komórek somatycznych może okazać się idealnym modelem *in vitro* do poznania procesu spermatogenezy, nakładania imprintingu, a także poznania roli protaminy i histonów w strukturze chromatyny plemnika.

5. Dodatkowe osiągnięcia naukowe:

- a) **Zaburzona ekspresja białek mitochondrialnych wpływa na rozwój klonowanych zarodków: strategia zapobiegawcza** (w ramach projektu 2016/21/d/ NZ3/0210 SONATA od Narodowego Centrum Nauki (Kierownik projektu)

Moim kolejnym zainteresowaniem naukowym jest wpływ przeprogramowania jądrowego na funkcje i morfologie mitochondriów. Temat ten jest bardzo mało zbadany, gdyż badania nad mitochondriami w klonowanych zarodkach są głównie ograniczone do analizy homo/heterochromatyny mitochondrialnego DNA (mtDNA) w tkance sklonowanego potomstwa (*Lee i wsp., 2010; Bowles i wsp., 2007*). Brak jest natomiast jakichkolwiek danych o ewentualnym wpływie dysfunkcji tych organelli na rozwój zarówno sklonowanych zarodków w okresie przedimplantacyjnym jak również potomstwa uzyskanego metodą SCNT. Problem ten badam w ramach grantu SONATA 11, który uzyskałam od Narodowego Centrum Nauki z pierwszego miejsca na liście rankingowej.

Rola przeprogramowania jądrowego w prawidłowym funkcjonowaniu mitochondriów jest bardzo interesującym zagadnieniem i ze względu na to, że jest ona do tej pory niezbadana czyni te badania pionierskimi i unikatowymi.

Jak wspomniano we wstępie osiągnięcia habilitacyjnego, klonowanie ssaków ma bardzo szerokie spektrum zastosowań. Wiadomo, co jest doskonale udokumentowane, że jedną z głównych przyczyn niedorozwoju i śmierci klonowanych zwierząt jest nieprawidłowy rozwój łożyska wynikający z nieprawidłowego przeprogramowania jądrowego (*Hill i wsp., 2002; Loi*

i wsp., 2006). Istnieją sugestie, że większość nieprawidłowości - takich jak placentomegalia, zmniejszenie unaczynienia, niedorozwój trofoblastu, hypoksja - opisanych w łożyskach pozyskanych od klonowanych zwierząt (*Hill i wsp* 2002; *Fletcher i wsp*, 2007; *Loi i wsp*, 2006; *Palmieri i wsp*, 2008) może być wywołane nieprawidłowym funkcjonowaniem mitochondriów.

Wykazano, że poprawne funkcjonowanie mitochondriów odgrywa kluczową rolę w prawidłowym rozwoju zarodka, a zaburzenia funkcji mitochondriów w zarodku wpływa niekorzystnie na dalszy rozwój łożyska i płodu (*Romek i wsp.*, 2011; *Chiaratti i wsp.*, 2015). Mitochondria są jednym z głównych organelli komórkowych pełniących kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórki. Pełnią zarówno istotną rolę w regulacji procesu apoptozy, jak w kluczowych funkcjach komórkowych, takich jak, między innymi, oddychanie komórkowe, produkcja ATP, regulacja wewnętrznej homeostazy jonów wapnia (Ca²⁺), czy kontrola cyklu komórkowego (*McBride i wsp.*, 2006).

Genom mitochondrialny zawiera 37 genów z czego tylko 13 (odpowiedzialnych za podjednostki kompleksów oddechowych I, III, IV i V) koduje białka, a z pozostałych 22 kodują mitochondrialne tRNA a dwa rRNA. Reszta białek mitochondrialnych (1500/2000) kodowanych jest przez genom jądrowy. Dlatego też komunikacja pomiędzy genomem jądrowym i mitochondrialnym jest bardzo istotna w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania komórki (*Chappel*, 2013). Mitochondria, do utrzymania prawidłowych funkcji (eliminacja uszkodzonych i zdegenerowanych mitochondriów oraz mitochondriów z wadliwym/zmutowanym mtDNA) przechodzą liczne okresy fuzji i podziałów, które pozwalają na mieszanie uszkodzonych mitochondriów z mitochondriami o wysokiej jakości.

Znane są trzy białka zaangażowane w procesie fuzji mitochondriów: mitofuzyna 1 (Mfn1) mitofuzyna 2 (Mfn2) i Opal (*Santel i wsp*, 2001; *Chen i Chan* 2010). Wykazano jednak, że kluczową rolę w procesie fuzji odgrywa Mfn2 (*Chen i Chan* 2010). Mfn2 jest białkiem zewnętrznej błony mitochondrialnej, kodowanym przez genom jądrowy. Białko to odpowiedzialne jest nie tylko za proces fuzji, ale również łączy się z siateczką śródplazmatyczną (ER) przez co odgrywa istotną rolę w utrzymaniu stężenia jonów wapnia (Ca²⁺) na odpowiednim poziomie, jak również w kontrolowanej śmierci komórek (*Kasahara i Scorrano*, 2015). Ponadto, co ma istotne znaczenie w realizacji mojego projektu, *Chen i wsp.*, (2003) wykazali, że myszy z niedoborem Mfn2 umierały we wczesnych etapach rozwoju płodowego, głównie poprzez nieprawidłowy rozwój łożyska (*Chen i wsp.*, 2003). Nieprawidłowości obserwowane były głównie w rozwoju warstwy dwujądrazystych komórek trofoblastu. Obserwacje te, zostały potwierdzone także u ludzi. *Pang i wsp.* (2013) sugerują,

że niedobór białka Mfn2 w komórkach trofoblastu może być odpowiedzialny za wczesne poronienia u kobiet. Na tej podstawie wysunęłam hipotezę, którą stopniowo potwierdzam wstępnie otrzymanymi wynikami, że za anomalie łożyska i śmierć klonowanych zwierząt odpowiedzialna jest zaburzona ekspresja białek mitochondrialnych, a co za tym idzie nieprawidłowe funkcjonowanie tych organelli.

Jak już wspomniałam, powszechnie uważa się, że jednym z najbardziej istotnych czynników odpowiedzialnych za niską wydajność klonowania i spowodowanych nim zaburzeń rozwojowych jest nieprawidłowe przeprogramowanie jądrowe [ang. *Nuclear Reprogramming* (NR)] komórki somatycznej (*Inoue i wsp., 2010*). Możliwe jest więc, co jest moja hipotezą badawczą, że niekompletne NR nieprawidłowo aktywuje genom mitochondrialny, co skutkuje zaburzeniami w łożyskach i płodach klonowanych zwierząt.

Wstępnie udowodniliśmy, że ekspresja głównych białek mitochondrialnych w klonowanych zarodkach mysich jest wyraźnie zaburzona, co wpływa na aktywność mitochondriów. Jak zostało powiedziane we wstępie, mitochondria odgrywają kluczową rolę podczas rozwoju zarodkowego, jak również podczas implantacji zarodka. Zaburzone funkcjonowanie mitochondriów w klonowanych zarodkach może wpływać na ich niski stopień implantacji i późniejszy rozwój co również potwierdziły nasze wstępne obserwacje.

Hipoteza, oparta na naszych dotychczasowych wynikach (*Czernik i wsp. 2018*) i dotycząca roli przeprogramowania jądrowego w nieprawidłowym funkcjonowaniu mitochondriów u klonowanych zwierząt została omówiona w pracy przeglądowej wymienionej jako **praca 1** w osiągnięcia habilitacyjnym (*Czernik i wsp. 2019; praca 1*).

b) Poprawa jakości blastocyst uzyskanych w wyniku SCNT po traktowaniu komórek somatycznych inhibitorem kinazy syntezy glikogenu 3 β (Gsk 3 β) (CHIR99021) (w ramach po-doktorskiego stażu od Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) Fellowship, Japonia, Tsukuba, RIKEN)

Jak już wspomniano, klonowanie metodą transferu jąder komórek somatycznych (SCNT) ma szerokie spektrum zastosowań, ale wydajność tej metody jest wciąż rozczarowująco niska. Podczas po-doktorskiego stażu w instytucie RIKEN, w Japonii, w laboratorium Profesora Ogury pracowałam nad udoskonaleniem przeprogramowanie jąder mysich komórek somatycznych poprzez traktowanie komórek somatycznych, użytych w procesie klonowania, inhibitorem kinazy syntetazy glikogenu 3 β (Gsk 3 β) (CHIR99021). Zostało pokazane, że aktywacja drogi przekazywania sygnału WNT przez hamowanie kinazy

syntezy glikogenu 3 β (Gsk 3 β) poprzez CHIR99021 utrzymuje ludzkie i mysie komórki macierzyste w stanie niezróżnicowanym i zachowały ekspresję głównych genów pluripotencjalnych (D Cook i wsp., 1996; Fagotto i wsp, 1997). Dlatego też, na podstawie tych wyników wywnioskowaliśmy, że zablokowanie ścieżki przekazywania sygnału WNT w komórkach użytych w klonowaniu somatycznym może pozytywnie wpłynąć na przeprogramowanie jądrowe. Badania prowadzone były przy współpracy z Uniwersytetem w Teramo, gdzie przeprowadziłam podobne eksperymenty na modelu owczym. Owce i mysie komórki somatyczne zostały poddane działaniu inhibitora Gsk 3 β (CHIR) przez 24 godziny i następnie zostały użyte jako dawczynie w procesie klonowania somatycznego zarówno w modelu mysim (Japonia) jak i owczym (Teramo).

Wyniki pokazują, że traktowanie komórek inhibitorem CHIR i następnie użycie ich jako dawczyń jąder w procesie klonowania somatycznego korzystny wpływa na rozwój klonowanych zarodków mysich (Ryc. 8). Co prawda nie zwiększa ono liczebności klonowanych blastocyst (Ryc. 8A 24,2% CTR vs 21,6% CHIR), ale ich jakość okazała się znacznie lepsza (Ryc. 8B, C, D), co ma istotne znaczenie, jeśli chodzi o prawidłowe implantacje i po-implantacyjny rozwój płodu.

A - TABELA 2

	# oocytów	Wyniki fuzji	LICZBA (%) zarodków rozwijających się do:		
			2 -komórki (%)	4 / komórki (%)	Blastocysty
CTR	231	91/231 (39%)	57/91 (63%)	26/57 (45.6%)	22/91 (24.2%)
CHIR	151	97/151 (58%)	70/97 (72%)	40/70 (57%)	21/97 (21.6%)
Shame manipulation	32	-	28/32 (87.5%)	28/32 (87.5%)	26/28 (81%)



Ryc. 8. Wpływ aktywacji ścieżki przekazywania sygnału Wnt w komórkach somatycznych użytych w procesie klonowania somatycznego A - tabela przedstawia procent zarodków pozyskanych drogą klonowania somatycznego w stadium 2, 4- komórek i blastocyst; B – zdjęcia przedstawiają blastocysty pozyskane drogą klonowania somatycznego przy użyciu komórek kontrolnych (CTR) i inkubowanych z inhibitorem CHIR (CHIR), C-blastocysty pozyskane drogą klonowania somatycznego wybarwione przeciwciałem NANOG (zielone), i Hoechst'em (jądro). D - wykres przedstawia całkowitą liczbę komórek, liczbę komórek w węźle zarodkowym i trofektodermie w blastocystach kontrolnych i CHIR (ICM – węzeł zarodkowy).

Handwritten signature

Wyniki uzyskane podczas stażu w Japonii rzucają nowe światło na proces przeprogramowania jądrowego komórek somatycznych, a co za tym idzie umożliwić mogą ulepszenie metody klonowania somatycznego. Dowodzą one, że komórki dawcy traktowane inhibitorem Gsk3-beta mają większą zdolność przeprogramowania jąder somatycznych co wpływa korzystnie na jakość uzyskanych tą metodą blastocyst, co może skutkować prawidłowym rozwojem łożysk, a co za tym idzie, prawidłowym rozwojem płodów. Wyniki te przedstawione są w pracy (Czernik i wsp., *Improvement of cloned blastocyst quality upon CHIR treatment of donor cells*). Manuskrypt wysłany został do *Theriogenology* i jest obecnie w ocenie recenzentów.

- c) **Białka Late Embryogenesis Abundant (LEA) chronią komórki somatyczne od uszkodzeń podczas procesu liofilizacji** (w ramach projektu H2020-MSCA-RISE-2016: *“Setting an interdisciplinary/sectorial/international research network to explore dry storage as an alternative strategy for cells/germplasm biobanking” - DRYNET, no. 734434* (współkierownik).

Moim dodatkowym zainteresowaniem naukowym, poza przeprogramowaniem jądrowym i klonowaniem somatycznym, jest opracowanie protokołu – alternatywnego do tradycyjnej metody konserwacji materiału biologicznego - pozwalającego na efektywne przechowywanie komórek/tkanek/zarodków w stadium liofilizowanym (odwodnionym), w temperaturze pokojowej. Z uwagi na swoje zalety proces suszenia sublimacyjnego (liofilizacja) ma szerokie zastosowanie w zapewnianiu trwałości i stabilności materiałów biologicznych. Ma to miejsce głównie przy produkcji szczepionek bakteryjnych i wirusowych. W przemyśle farmaceutycznym stosuje się liofilizację do przechowywania surowic, antybiotyków a także hormonów, a także konserwacji plazmy i składników krwi.

Obecnie jestem zaangażowana w projekt europejski (H2020-MSCA-RISE-2016) jako współkierownik, w którym wykorzystujemy proces liofilizacji w celu przechowywania materiału biologicznego jakim są komórki somatyczne – fibroblasty owcze. W tym celu, zbadałam trzy białka LEA (z ang. *Late Embryogenesis Abundant* (LEA) występujące głównie w roślinach i innych niższych organizmach, które mogą ulegać odwracalnej dehydratacji (zjawisku określanym jako "anhydrobioza"). Wstępne wyniki pokazują, że białka LEA chronią komórki somatyczne przed wysuszeniem i dodatkowo, po raz pierwszy wykazaliśmy ekspresję trzech różnych białek LEA w komórkach somatycznych i udowodniliśmy współdziałanie między tymi białkami. Wyniki zostały zawarte w pracy (Czernik i wsp., *Late*

Embryogenesis Abundant (LEA) proteins confer water stress tolerance to mammalian somatic cells) wysłanej do czasopisma *Scientific Reports*. Praca jest trakcie oceny recenzentów.

Literatura

1. BAGUISI A, BEHBOODI E, MELICAN DT, POLLOCK JS, DESTREMPES MM, CAMMUSO C, WILLIAMS JL, NIMS SD, PORTER CA, MIDURA P, PALACIOS MJ, AYRES SL, DENNISTON RS, HAYES ML, ZIOMEK CA, MEADE HM, GODKE RA, GAVIN WG, OVERSTRÖM EW, ECHELARD Y (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol.* May;17(5):456-61.
2. BENCH G.S., FRIZ A.M., CORZETT M.H., MORSE D.H., BALHORN R (1996). DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry*, 23: 263–271.
3. BOWLES EJ, CAMPBELL KH, ST JOHN JC. (2007) Nuclear transfer: preservation of a nuclear genome at the expense of its associated mtDNA genome(s). *Curr Top Dev Biol.* 77: 251-90.
4. BRIGGS R AND KING TJ (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 38: 455–461.
5. CAMPBELL KH, MCWHIR J, RITCHIE WA, WILMUT I (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 7: 64-6.
6. CAMPBELL KH, LOI P, OTAEGUI PJ, WILMUT I (1996a). Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev Reprod.* Jan;1(1):40-6. Review.
7. CHAPPEL S (2013). The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Obstet Gynecol Int.* 183024.
8. CHEN H, CHAN DC (2010). Physiological functions of mitochondrial fusion. *Ann N Y Acad Sci.* 1201: 21- 5.
9. CHEN H, DETMER SA, EWALD AJ, GRIFFIN EE, FRASER SE, CHAN DC (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.* 20: 189-200.
10. CHIARATTI MR, MALIK S, DIOT A, RAPA E, MACLEOD L, MORTEN K, VATISH M, BOYD R, POULTON J (2015). Is Placental Mitochondrial Function a Regulator that Matches Fetal and Placental Growth to Maternal Nutrient Intake in the Mouse? *PLoS One.* 1, 10: e0130631.
11. COOK D, FRY M.J, HUGHES K, SUMATHIPALA R, WOODGETT J.R, DALE TC (1996). Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *W. EMBO J.* September 2; 15(17): 4526–4536.
12. CZERNIK M, ANZALONE DA, PALAZESSE L, OIKAWA M, LOI P (2019). Somatic Cell Nuclear Transfer: Failures, Successes and the Challenges Ahead. *J. Dev. Biol.* 63: 123 – 130.
13. CZERNIK M, TOSCHI P, ZACCHINI F, IUSO D, PTAK GE (2017). Deregulated Expression of Mitochondrial Proteins Mfn2 and Bcl3L in Placentae from Sheep

- Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) Conceptuses. *PLoS One*. Jan 11;12(1): e0169579.
14. CZERNIK M, IUSO D, TOSCHI P, KHOCHBIN S, LOI P (2016). Remodelling somatic nuclei via exogenous expression of protamine 1 to create spermatid-like structures for somatic nuclear transfer. *Nat Protoc*. Nov;11(11):2170-2188.
 15. CZOŁOWSKA R, MODLIŃSKI JA, TARKOWSKI AK (1984). Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes. *J Cell Sci*. Jul;69:19-34.
 16. DE MATEO S, RAMOS L, DE BOER P, MEISTRICH M, OLIVA R (2011). Protamine 2 precursors and processing. *Protein Pept Lett*. 18, (8):778-85.
 17. FAGOTTO F, GUGER K, GUMBINER BM (1997). Induction of the primary dorsalizing center in *Xenopus* by the Wnt/GSK/beta-catenin signaling pathway, but not by Vg1, Activin or Noggin. *Development*. Jan;124(2):453-60.
 18. FLETCHER CJ, ROBERTS CT, HARTWICH KM, WALKER SK, MCMILLEN IC (2007). Somatic cell nuclear transfer in the sheep induces placental defects that likely precede foetal demise. *Reproduction*. 133: 243–255.
 19. FOLCH J, COCERO MJ, CHESNÉ P, ALABART JL, DOMÍNGUEZ V, COGNIÉ Y, ROCHE A, FERNÁNDEZ-ARIAS A, MARTÍ JI, SÁNCHEZ P, ECHEGOYEN E, BECKERS JF, BONASTRE AS, VIGNON X (2009). First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*. Apr 1;71(6):1026-34.
 20. 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*. 7: 424:635.
 21. GIL MA, MASIDE C, CUELLO C, PARRILLA I, VAZQUEZ JM, ROCA J, MARTINEZ EA (2012). Effect of Hoechst 33342 staining and ultraviolet irradiation on mitochondrial distribution and DNA copy number in porcine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*. Sep;79(9):651-63.
 22. GOVIN J. AND KHOCHBIN S (2013). Histone variants and sensing of chromatin functional states. *Nucleus* 4: 438–442.
 23. GURDON J. B, ELSDALE T. R, FISCHBERG M (1958). Sexually Mature Individuals of *Xenopus laevis* from the Transplantation of Single Somatic Nuclei. *Nature* 182 (4627): 64–65
 24. HILL JR (2002). Abnormal in utero development of cloned animals: implications for human cloning. *Differentiation*. 69: 174-8.
 25. HILL JR, ROUSSEL AJ, CIBELLI JB, EDWARDS JF, HOOPER NL, MILLER MW, THOMPSON JA, LOONEY CR, WESTHUSIN ME, ROBL JM, STICE SL (1999). Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*. 1999 Jun;51(8):1451-65.
 26. HILL JR, WINGER QA, LONG CR, LOONEY CR, THOMPSON JA, WESTHUSIN ME (2000). Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol Reprod*. May;62(5):1135-40.
 27. INOUE K, KOHDA T, SUGIMOTO M, SADO T, OGONUKI N, MATOBA S, SHIURA H, IKEDA R, MOCHIDA K, FUJII T, SAWAI K, OTTE AP, TIAN XC,

- YANG X, ISHINO F, ABE K, OGURA A (2010). Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science*. 330: 496-9.
28. INOUE K, OGONUKI N, MOCHIDA K, YAMAMOTO Y, TAKANO K, KOHDA T, ISHINO F, OGURA A (2003). Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning. *Biol Reprod*. 69: 1394–1400.
 29. IUSO D, CZERNIK M*, ZACCHINI F, PTAK G, LOI P (2013). A simplified approach for oocyte enucleation in mammalian cloning. *Cell Rerogram*. 15: 490-4. *pierwszy autor /równy wkład.
 30. IUSO D*, CZERNIK M*, TOSCHI P, FIDANZA A, ZACCHINI F, FEIL R, CURTET S, BUCHOU T, SHIOTA H, KHOCHBIN S, PTAK GE, LOI P (2015). Exogenous Expression of Human Protamine 1 (hPrm1) Remodels Fibroblast Nuclei into Spermatid-like Structures. *Cell Rep*. Dec 1;13(9):1765-71. *pierwszy autor /równy wkład.
 31. JASON L.J, MOORE S.C, LEWIS J.D, LINDSEY G, AUSIO J (2002). Histone ubiquitination: a tagging tail unfold? *Bioessays*, 24: 166–174.
 32. KASAHARA A, SCORRANO L (2014). Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation. *Trends Cell Biol*. 2014 Dec;24(12):761-70.
 33. KIM KJ, BYUNG-GAK KIM, YONG-HEE, KIM YONG-AN, LEEBANG-JIN, KIMSANG-EUN, JUNGYEON-JIN, CHOSANG-HOON LEEBUOM-YONG RYU (2015). *In vitro* spermatogenesis using bovine testis tissue culture techniques. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* October Volume 12, Issue 5, pp 314–323.
 34. KUBIAK JZ, TARKOWSKI AK (1985). Electrofusion of mouse blastomeres. *Exp Cell Res*. Apr;157(2):561-6.
 35. LEE JH, PETERS A, FISHER P, BOWLES EJ, ST JOHN JC, CAMPBELL KH (2010). Generation of mtDNA homoplasmic cloned lambs. *Cell Reprogramming* 12: 347-55.
 36. LIU X, WANG Y, GAO Y, SU J, ZHANG J, XING X, ZHOU C, YAO K, AN Q, ZHANG Y (2018). H3K9 demethylase KDM4E is an epigenetic regulator for bovine embryonic development and a defective factor for nuclear reprogramming. *Development*. 2018 Feb 16;145(4). pii: dev158261.
 37. 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*. Feb 8;172(4):881-887.
 38. LOI P, CLINTON M, VACKOVA I, FULKA J JR, FEIL R, PALMIERI C, DELLA SALDA L, PTAK G (2006). Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. *Theriogenology*. 65: 1110–1121.
 39. LOI P, FULKA J JR, HILDEBRAND T, PTAK G (2011). Genome of non-living cells: trash or recycle? *Reproduction*. Oct;142(4):497-503.
 40. LOI P, IUSO D, CZERNIK M, OGURA A (2016). A New, Dynamic Era for Somatic Cell Nuclear Transfer?. *Trends Biotechnol*. Oct;34(10):791-797.
 41. LOI P, PTAK G, BARBONI B, FULKA J JR, CAPPAL P, CLINTON M (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol*. 19: 962-4.

HC2

42. LOI P, SARAGUSTY J, PTAK G (2014). Cloning the mammoth: a complicated task or just a dream? *Adv Exp Med Biol.* 753: 489-502.
43. MARTÍNEZ-SOLER F, KURTZ K, AUSIÓ J. & CHIVA M (2007). Transition of nuclear proteins and chromatin structure in spermiogenesis of *Sepia officinalis*. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 360–370.
44. MATOBA S, INOUE K, KOHDA T, SUGIMOTO M, MIZUTANI E, OGONUKI N, NAKAMURA T, ABE K, NAKANO T, ISHINO F, OGURA A (2011). RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 20;108(51):20621-6.
45. MATOBA S, LIU Y, LU F, IWABUCHI KA, SHEN L, INOUE A, ZHANG Y (2014). Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell.* 6: 884-95.
46. MATOBA S, WANG H, JIANG L, LU F, IWABUCHI K.A, WU, INOUE K, YANG L, PRESS W, LEE JT, OGURA A, SHEN L, ZHANG Y (2018). Loss of H3K27me3 Imprinting in Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos Disrupts Post-Implantation Development. *Cell stem Cell* 2 Sep 6;23(3):343-354.e5.
47. MCBRIDE H.M, NEUSPIEL M, WASIAK S (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology.* 16 (14). Elsevier Science.
48. MCKAY D.J, RENAUX B.S, DIXON G.H (1986). Human sperm protamines. Amino-acid sequences of two forms of protamine P2. *Eur. J. Biochem.* 156: 5–8
49. MEISTRICH M.L., MOHAPATRA B., SHIRLEY C.R., ZHAO M (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, 111: 483–488
50. MEISTRICH M.L, TROSTLE-WEIGE P.K, LIN R, BHATNAGAR Y.M, ALLIS C.D (1992). Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 170–181.
51. MODLINSKI JA (1978). Transfer of embryonic nuclei to fertilised mouse eggs and development of tetraploid blastocysts. *Nature.* Jun 8;273(5662):466-7.
52. MODLINSKI JA (1981). The fate of inner cell mass and trophectoderm nuclei transplanted to fertilized mouse eggs. *Nature.* Jul 23;292(5821):342-3.
53. MODLIŃSKI JA (1975). Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus. *J Embryol Exp Morphol.* Jul;33(4):897-905.
54. MONTELLIER, E. (2013). Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev.* 27, (15):1680-92 (2013).
55. OGONUKI N, INOUE K, YAMAMOTO Y, NOGUCHI Y, TANEMURA K, SUZUKI O, NAKAYAMA H, DOI K, OHTOMO Y, SATOH M, NISHIDA A, OGURA A (2002). Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat Genet.* 30: 253–254.
56. OGURA A, INOUE K, WAKAYAMA T (2013). Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 5;368(1609):20110329.
57. OIKAWA M, MATOBA S, INOUE K, KAMIMURA S, HIROSE M, OGONUKI N, SHIURA H, SUGIMOTO M, ABE K, ISHINO F, OGURA A (2013). RNAi-mediated knockdown of Xist does not rescue the impaired development of female cloned mouse embryos. *J Reprod Dev* 59(3):231-237.

58. PALAZZESE L, CZERNIK M, IUSO D, TOSCHI P, LOI P (2018). Nuclear quiescence and histone hyper-acetylation jointly improve protamine-mediated nuclear remodelling in sheep fibroblast. *PLoS One* 13(3): e0193954.
59. PALMIERI C, LOI P, PTAK G, DELLA SALDA L (2008). Review paper: a review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sheep, and mice. *Vet Pathol.* Nov;45(6):865-80.
60. PALMIERI C, LOI P, REYNOLDS LP, PTAK G, DELLA SALDA L (2007). Placental abnormalities in ovine somatic cell clones at term: a light and electron microscopic investigation. *Placenta.* May-Jun;28(5-6):577-84.
61. PANG W, ZHANG Y, ZHAO N, DARWICHE SS, FU X, XIANG W (2013). Low expression of Mfn2 is associated with mitochondrial damage and apoptosis in the placental villi of early unexplained miscarriage. *Placenta* 34: 613-618.
62. PIRHONEN A, VALTONEN P, LINNALA-KANKUUNEN A, HEISKANEN ML, MAENPAA PH (1990). Primary structures of two protamine 2 variants (st2a and st2b) from stallion spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta*, 1039: 177–180.
63. QUERALT R, OLIVA R, WINKFEIN RJ, RETIEF JD, DIXON GH (1995). Evolution of protamine P1 genes in mammals. *J Mol Evol* 40: 601–607.
64. RATHKE C, BAARENDS WM, AWE S, RENKAWITZ-POHL R (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1839: 155–168.
65. REDA A, HOU M, WINTON TR, CHAPIN RE, SÖDER O, STUKENBORG JB (2016). In vitro differentiation of rat spermatogonia into round spermatids in tissue culture. *Mol Hum Reprod.* Sep;22(9):601-12.
66. ROMEK M, GAJDA B, ROLKA M, SMORAĞ Z (2011). Mitochondrial activity and morphology in developing porcine oocytes and pre-implantation non-cultured and cultured embryos. *Reprod Domest Anim.* 46: 471-8.
67. RUAN D, PENG J, WANG X, OUYANG Z, ZOU Q, YANG Y, CHEN F, GE W, WU H, LIU Z, ZHAO Y, ZHAO B, ZHANG Q, LAI C, FAN N, ZHOU Z, LIU Q, LI N, JIN Q, SHI H, XIE J, SONG H, YANG X, CHEN J, WANG K, LI X, LAI L (2018). XIST Derepression in Active X Chromosome Hinders Pig Somatic Cell Nuclear Transfer. *Stem Cell Reports.* 2018 Feb 13;10(2):494-508.
68. SAMANS B, YANG Y, KREBS S, SARODE GV, BLUM H, REICHENBACH M, WOLF E, STEGER K, DANSRANJAVIN T, SCHAGDARSURENGIN U (2014). Uniformity of nucleosome preservation pattern in Mammalian sperm and its connection to repetitive DNA elements. *Dev Cell.* 14: 23-35.
69. SANJO H, KOMEYA M, SATO T, ABE T, KATAGIRI K, YAMANAKA H, INO Y, ARAKAWA N, HIRANO H, YAO T, ASAYAMA Y, MATSUHISA A, YAO M, OGAWA T (2018). In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. *PLoS One.* Feb 12;13(2): e0192884.
70. SANTEL A, FULLER MT (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci.* 114: 867–874.
71. SARAGUSTY J, DIECKE S, DRUKKER M, DURRANT B, FRIEDRICH BEN-NUN I, GALLI C, GÖRITZ F, HAYASHI K, HERMES R, HOLTZE S, JOHNSON S, LAZZARI G, LOI P, LORING JF, OKITA K, RENFREE MB, SEET S, VORACEK T,

- STEJSKAL J, RYDER OA, HILDEBRANDT TB (2016). Rewinding the process of mammalian extinction. *Zoo Biol.* Jul;35(4):280-92.
72. SATO T, KATAGIRI K, GOHBARA A, INOUE K, OGONUKI N, OGURA A, KUBOTA Y, OGAWA T (2011). In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature.* Mar 24;471(7339):504-7.
73. SATO T, KATAGIRI K, KOJIMA K, KOMEYA M, YAO M, OGAWA T (2015). *In Vitro* Spermatogenesis in Explanted adult mouse testis tissue. *PLoS One.* Jun 12;10(6): e0130171.
74. SATO T, KATAGIRI K, KUBOTA Y, OGAWA T (2013). In vitro sperm production from mouse spermatogonial stem cell lines using an organ culture method. *Nat Protoc.* Nov;8(11):2098-104.
75. SCHNIEKE AE, KIND AJ, RITCHIE WA, MYCOCK K, SCOTT AR, RITCHIE M, WILMUT I, COLMAN A, CAMPBELL KH (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science.* Dec 19;278(5346):2130-3.
76. SHAHBAZIAN MD, GRUNSTEIN M (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76: 75–100.
77. SHINAGAWA T, TAKAGI T, TSUKAMOTO D, TOMARU C, HUYNH LM, SIVARAMAN P, KUMAREVEL T, INOUE K, NAKATO R, KATOU Y, SADO T, TAKAHASHI S, OGURA A, SHIRAHIGE K, ISHII S (2014). Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 14 (2):217-27.
78. SMITH LC, WILMUT I (1989). Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod.* May;40(5):1027-35.
79. SMITH LC, WILMUT I, HUNTER RH (1988). Influence of cell cycle stage at nuclear transplantation on the development in vitro of mouse embryos. *J Reprod Fertil.*84: 619-24.
80. SMORAG R, SŁOMSKI L, CIERPKA (2013). Klonownie ssaków. W "Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji, Ośrodek Wydawnictw Naukowych (Dla wersji angielskiej: Scientific Publishers OWN), Poznań str 131-241.
81. SPEMANN H. (1938) Embryonic Development and Induction pp 210–211. Hafner Publishing Company, New York.
82. WAKAYAMA S, KOHDA T, OBOKATA H, TOKORO M, LI C, TERASHITA Y, MIZUTANI E, NGUYEN VT, KISHIGAMI S, ISHINO F, WAKAYAMA T (2013). Successful serial recloning in the mouse over multiple generations. *Cell Stem Cell* 12: 293–297.
83. WELLS DN, FORSYTH JT, MCMILLAN V, OBACK B (2004). The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells.* 6: 101-10.
84. WILLADSEN SM (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature.* 6-12;320(6057):63-5.
85. WILMUT I, BAI Y, TAYLOR J (2015). Somatic cell nuclear transfer: origins, the present position and future opportunities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370, 20140366.

86. WILMUT I, SCHNIEKE AE, MCWHIR J, KIND AJ, CAMPBELL KH (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385: 810-3.
87. WOLF DP, MITALIPOV S, NORGREN RB JR (2001). Nuclear transfer technology in mammalian cloning. *Arch Med Res*. 32: 609-13.
88. YOKONISHI T, SATO T, KATAGIRI K, OGAWA T (2013). *In vitro* spermatogenesis using an organ culture technique. *Methods Mol Biol*. 927:479-88.
89. YUAN L, WANG A, YAO C, HUANG Y, DUAN F, LV Q, WANG D, OUYANG H, LI Z, LAI L (2014). Aberrant expression of Xist in aborted porcine fetuses derived from somatic cell nuclear transfer embryos. *Int J Mol Sci*. Nov 25;15(12):21631-43.
90. ZENG F, HUANG Z, YUAN Y, SHI J, CAI G, LIU D, WU Z, LI Z (2016). Effects of RNAi-mediated knockdown of Xist on the developmental efficiency of cloned male porcine embryos. *J Reprod Dev* 62: 591-597.
91. ZHANG Y, WANG Q, LIU K, GAO E, GUAN H, HOU J (2018). Treatment of donor cells with recombinant KDM4D protein improves preimplantation development of cloned ovine embryos. *Cytotechnology*. May 15.

Marta Czernik