

Morfologiczne i molekularne aspekty formowania zygoty oraz wczesnych stadiów rozwoju zarodkowego u świń w świetle badań genetycznych i mikrofluidycznych*)

BARTOSZ KEMPISTY, RAFAŁ WALCZAK*, PATRYCJA ŚNIADEK*, JAN DZIUBAN*,
DOROTA BUKOWSKA**, PAWEŁ ANTOSIK**, MARTA JACKOWSKA**,
MAGDALENA WOŻNA**, HANNA PIOTROWSKA***, MONIKA ŚWIERCZEWSKA,
JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI**

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego II UM, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

*Zakład Mikroinżynierii i Fotowoltaiki Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki PWr,
ul. Zygmunta Janiszewskiego 11/17, 50-372 Wrocław

**Katedra Weterynarii Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt UP, ul. Wojska Polskiego 52, 60-628 Poznań

***Katedra Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego UM, ul. Dojazd 30, 60-631 Poznań

Kempisty B., Walczak R., Śniadek P., Dziuban J., Bukowska D., Antosik P., Jackowska M.,
Woźna M., Piorowska H., Świerczewska M., Jaśkowski J. M.

Morphological and molecular aspects of zygote formation and early stages of embryo development in pigs in light of genetic and microfluidic research

Summary

The aim of this review was to present the role of embryonic genome activation in zygote formation and in early embryonic development. Moreover, the authors emphasize the influence of selected factors on the quality and development of embryos in preimplantation stages.

In recent years, reproductive biologists have focused on such processes as the regulation of oogenesis, folliculogenesis and morphogenesis. Thanks to the development of molecular biology and reproductive bio-techniques, it was possible to demonstrate the important role that activation of the embryonic genome plays in the above processes. Embryonic genome activation is a specific process whose origins dependent on the species of the mammal. In some species, activation of the embryonic genome begins in the 2-cell-stage embryo, while in others it begins during the 5th cell division. Molecular changes associated with embryonic genome activation play a crucial role in the morphological structure of the embryo. However, most of these morphological structure changes occur in the cell nucleus following the formation of nucleolus precursor bodies (NPB). It has also been suggested that epigenetic changes, such as the methylation and demethylation of embryonic DNA or the acetylation of histones, may play an important role in embryonic genome activation. There is little literature describing the influence of sperm RNA on basic semen parameters, the ability of a spermatozoon to fertilize an oocyte, or early mammalian embryonic development. This review discusses these parameters, as well as the role of micro-engineering and microfluidic research in the assessment of embryo quality.

Keywords: microfluidic research, embryonic genome activation, genome activation, epigenetic changes

W ciągu ostatniej dekady świnia zyskała szczególne zainteresowanie naukowców jako użyteczny model biomedyczny. Jest jednym z gatunków, który najlepiej odzwierciedla fizjologię i anatomię poszczególnych układów człowieka, jednocześnie stanowiąc powszechnie

dostępny materiał do badań. Dzieląc z człowiekiem wiele podobnych cech anatomicznych i fizjologicznych stanowi przydatny model wykorzystywany w medycynie, toksykologii, farmakologii i w badaniach nad przebiegiem wielu chorób (33). Pomyślnie zastosowania klonowania poprzez transfer jądra komórki somatycznej u świni nasiliły ten proces znacząco, umożliwiając

*) Praca finansowana z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, umowa nr POIG.01.03.01-00-014/08-00.

produkcję zwierząt modyfikowanych genetycznie. Od tego czasu zaczęły pojawiać się osobniki mające zainaktywowane techniką rekombinacji homologicznej geny, np. allel genu alfa-1,3-galaktozylotransferazy – potencjalnie wykorzystywane w ksenotransplantacji (29), a także transgeniczne zwierzęta obciążone genetycznymi chorobami występującymi u ludzi (5). Niemniej jednak, by w pełni wykorzystać potencjał tego gatunku jako modelu biomedycznego, istnieje ciągła konieczność prowadzenia dalszych badań w dziedzinie biologii rozrodu u świń. U ludzi, myszy i świni morfologiczne i molekularne mechanizmy początkowego rozwoju zarodka wskazują na wiele podobieństw, ale także na istotne różnice. To, co różni wymienione gatunki, dotyczy przede wszystkim zmian w epigenetycznym przeprogramowaniu zarodka tuż po zapłodnieniu, czasu rozpoczęcia głównej aktywacji genomu, molekularnej kontroli zarodka, wstępnego różnicowania komórek i pluripotencji czy też tworzenia tkanek płodowych i łożyska (30). Różnice te należy z całą pewnością uwzględnić przy wykorzystaniu świni jako modelu biomedycznego na każdym polu badawczym. Ponadto mogą stać się przyczyną niemałych trudności w hodowlach świńskich komórek macierzystych. Konieczne jest zatem nieustanne poznawanie procesów odpowiedzialnych za prawidłowy rozwój zarodków oraz określenie funkcji molekularnych mechanizmów kontrolujących jego wczesny rozwój.

Zapłodnienie oraz aktywacja genomu zarodkowego

U niższych organizmów jak *Drosophila* czy *Xenopus* podczas wczesnych stadiów oogenezy oraz follikulogenezy gromadzony mRNA jest stabilny, jego ilość nie zmniejsza się tuż po zapłodnieniu oraz odgrywa on istotną rolę w formowaniu zygoty oraz kierowaniu wczesnymi stadiami rozwoju embrionalnego (48). W przeciwieństwie do tych gatunków, u ssaków mRNA gromadzony podczas oogenezy ulega degradacji krótko po zapłodnieniu. Dlatego też aktywacja genomu zarodkowego u ssaków, jak i synteza mRNA zarodkowego musi nastąpić we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego (4, 19, 38, 47). Aktywacja genomu zarodkowego u ssaków jest podzielona na dwa etapy; w pierwszym dochodzi do głównej aktywacji genomu zarodkowego, czemu towarzyszy znaczny wzrost transkrypcji, po czym następuje aktywacja mniejszej części genomu. Główna aktywacja genomu zarodkowego jest procesem gatunkowo specyficznym i występuje podczas ściśle określonego stadium rozwoju zarodka: pod koniec drugiego podziału komórkowego u myszy, pod koniec trzeciego podziału u świń, pomiędzy 4. a 5. podziałem u bydła i człowieka oraz podczas 5. podziału u królika (47).

Aktywacja genomu zarodkowego w aspekcie morfologicznym i molekularnym

Zmiany morfologiczne związane z aktywacją genomu zarodkowego dotyczą głównie jądra komórkowego formującej się zygoty, w którym dochodzi do kształtowania się w pełni funkcjonalnych rybosomów z nieaktywnych prekursorowych ciałek jąderkowych (NPB –

nucleolus precursor bodies). U świń przed główną aktywacją genomu zarodkowego NPB formują skondensowane sferyczne struktury. Podczas formowania zygoty struktury te znajdują się w przedjądrzu, gdzie przypominają pozostałości jąderkowe widoczne w oocytach po zakończonej fazie wzrostu (26). Podczas głównej aktywacji genomu zarodkowego NPB tracą swoją gęstość i upakowaną strukturę, a następnie ulegają transformacji do w pełni funkcjonalnego jąderka zawierającego wszystkie specyficzne komponenty, jak: centrum włókniste (gdzie znajduje się rybosomalny RNA-rRNA oraz enzymy niezbędne dla aktywacji transkrypcji), gęste komponenty włókniste (zawierający formujące się cząsteczki rRNA) oraz ziarniste komponenty, zawierające podjednostki rybosomowe i enzymy katalizujące proces kondensacji (14). Funkcjonalne struktury jąderkowe początkowo pojawiają się na powierzchni lub obwodzie NPB. Proces ten wykazuje specyficzność gatunkową. U myszy występuje w zarodkach w stadium dwukomórkowym, u świń w stadium 4-komórkowym, natomiast u człowieka w stadium 8-komórkowym (16, 42, 45, 46). Podczas kolejnych stadiów rozwoju zarodkowego, zachodzących podziałów komórkowych oraz aktywacji jąderkowej w pełni funkcjonalne jąderko widoczne jest we wszystkich blastomerach. Transformacja NPB do jąderka wymaga aktywacji RNA polimerazy I oraz właściwego funkcjonowania szeregu białek związanych z rRNA (41, 42). Podczas aktywacji jąderkowej u świń RNA polimeraza I jest zlokalizowana w centrum włóknistym. Następnie szereg innych białek związanych z jąderkiem, jak nukleolina czy nukleofosmina, jest zlokalizowanych w jąderku (2, 16). Rozwój jąderkowy w zarodku jest ściśle związany z wykorzystaniem jako matrycy maczynego materiału genetycznego pochodzącego z oocytów oraz po części z wykorzystaniem białek pochodzących z transkrypcji genów z wczesnych stadiów różnicowania się genomu zarodkowego (26, 31, 41, 48). Różnice charakteryzujące rozwój jąderkowy podczas wczesnych stadiów rozwoju embrionalnego mogą służyć jako markery aktywacji genomu zarodkowego w badaniach np. zarodków pochodzących z klonowania (42).

Modyfikacje epigenetyczne a wczesne stadia rozwoju embrionalnego

Zmiany molekularne obejmujące aktywację genomu zarodkowego podczas formującej się zygoty oraz późniejszych stadiów różnicowania się blastomerów są ściśle związane z epigenetycznym remodelingiem ojcowskiego genomu do totipotencjalnego genomu zarodkowego. Pojęcie „epigenetyka” określa zmiany w ekspresji genów spowodowane mechanizmami odmiennymi od zmian sekwencji DNA, które mogą być dziedziczone przez podziały komórkowe w wielu pokoleniach komórek (11, 28). Głównymi modyfikacjami epigenetycznymi, mającymi ścisły związek z aktywacją genomu zarodkowego są: metylacja DNA oraz modyfikacje histonów. Hipermetylacja DNA jest zwykle związana z zahamowaniem transkrypcji (23). Proces metylacji

jest katalizowany przez grupę enzymów określanych jako DNA metylotransferazy (DNMT). Proces modyfikacji histonów obejmuje głównie acetylację i deacetylację. Acetylacja większej liczby reszt lizynowych niż 16 w strukturze histonów: H2A, H2B, H3 oraz H4 sprawia, że chromatyna jest aktywna transkrypcyjnie. Hiperacetylacja histonów rdzeniowych wzmacnia proces wiązania się do nukleosomów czynników transkrypcyjnych (39). Proces deacetylacji histonów związany jest ściśle z zahamowaniem transkrypcji oraz kondensacją chromatyny (40), dlatego też procesy metylacji DNA oraz acetylacji histonów są ze sobą zsynchronizowane.

Rozwój ssaków począwszy od etapu zapłodnienia charakteryzuje się dwukierunkowym modelingiem epigenetycznym. Pierwsze programowanie epigenetyczne w postaci metylacji DNA następuje podczas gametogenezy, podczas gdy drugi cykl ma miejsce krótko po zapłodnieniu podczas przedimplantacyjnego rozwoju zarodków (34, 35).

Podczas wczesnych stadiów rozwoju zarodkowego u ssaków dochodzi do formowania pierwotnych komórek zarodkowych (PGC, primordial germ cells). Początkowo te wysoce specyficzne komórki posiadają DNA w formie hipermetylowanej. Następnie w komórkach tych DNA występuje w formie hipometylowanej. Proces demetylacji jest specyficzny gatunkowo. U myszy zostaje zakończony do 13,5. dnia rozwoju zarodkowego (13, 36). Badania analizujące status metylacji powtórzeń centromerycznych pokazały, że u świń komórki PGC podlegają podobnemu procesowi demetylacji, który zostaje zakończony 28. dnia rozwoju zarodkowego (32). Podczas wczesnych etapów gametogenezy, gdy z komórek PGC różnicują się plemniki oraz oocyty, następuje proces metylacji *de novo*. Procesy demetylacji oraz remetylacji następujące w tych stadiach stanowią pierwszą rundę zmian epigenetycznych dotyczących komórek rozrodczych. Specyficzna płciowo metylacja DNA dotycząca poszczególnych *loci* prowadzi do uformowania wzoru imprintingu genomowego. Proces metylacji DNA *de novo* jest katalizowany przez jedne z izoform metylotransferazy-DNMT3a i DNMT3b. Istnieją również doniesienia wskazujące na rolę białka DNMT3L w piętnowaniu genomowym (3).

Druga runda programowania epigenetycznego następuje pomiędzy zapłodnieniem a formowaniem blastocysty (38). Krótko po zapłodnieniu protaminy, które podczas spermatogenezy ściśle upakowywały nić chromatynową w główce plemnika, są zastępowane przez histony (7, 18, 20, 21). Mechanizm ten jest poprzedzony poprzez szybką utratę wzoru metylacji DNA w ojcowskich przedjadrach. Proces ten zachodzi przed początkiem replikacji DNA poprzez aktywne usuwanie grup metylowych przez dotychczas niezidentyfikowane enzymy (34). W tym momencie heterochromatyna, centromery, retrotranspozony oraz zametylowane geny ojcowskie są chronione przed demetylacją. W matczy-nych przedjadrach proces demetylacji zachodzi w sposób pasywny, polegający na nie dodawaniu nowych grup

metylowych do DNA podczas fazy S cyklu komórkowego. Dlatego też genom matczynej pozostaje w formie demetylowanej aż do momentu pierwszych podziałów komórkowych. Piętnowane epigenetycznie geny matczyne zachowują specyficzny dla linii komórek płciowych wzór metylacji prawdopodobnie dzięki aktywności dziedziczonego z oocytów białka DNMT1o (15). Rozpoczęcie drugiej rundy metylacji *de novo* następuje przed aktywacją genomu zarodkowego i umożliwia ekspresję różnych genów, skutkujących inaktywacją chromosomu X oraz aktywacją czynników regulujących tkankowo specyficzną ekspresję genów. Proces metylacji *de novo* obejmuje oba typy komórek wywodzących się z blastocysty, tak jak komórki trofoektodermalne oraz ICM. Do tego stadium komórki ICM pozostawały w stanie hipermetylowanym w porównaniu do komórek trofoektodermalnych.

Wzór metylacji nadawany komórkom po zapłodnieniu był, jak dotąd, przedmiotem badań u takich gatunków ssaków, jak: mysz, szczur, królik, bydło, świnie i człowiek (6, 49). U świń, podobnie jak u myszy, genom ojcowski w zygocie pozostaje w formie demetylowanej, podczas gdy genom matczynej jest hipermetylowany. Podczas różnicowania się zarodków do stadium dwu-, cztero-, ośmiokomórkowego oraz moruli wzór metylacji nie ulega znaczącym zmianom. W stadium blastocysty pojawiający się wzór metylacji *de novo* dotyczy głównie komórek ICM, podobnie do przebiegu tego procesu u myszy (10). W zygotach ludzkich natomiast nie obserwuje się znaczących zmian we wzorze metylacji pomiędzy genomem matczynym a ojcowskim. Główny wzór metylacji DNA stopniowo spada w stadium ośmiokomórkowym oraz moruli, natomiast wzrasta podczas różnicowania się zarodków do stadium blastocysty. W przeciwieństwie do myszy, komórki trofoektodermalne pozostają w formie hipermetylowanej w porównaniu do komórek ICM (10).

Dane piśmiennictwa wskazują, że badanie złożonego procesu zmian epigenetycznych w genomie zarodków może stać się ważnym narzędziem przy zwiększaniu produkcji zarodków *in vitro* (9, 24, 51). Przykładem tego mogą być zarodki pochodzące od świni, powstałe na drodze partenogenezy, w których wzór metylacji wzrastał w stadium dwukomórkowym oraz następnie gwałtownie obniżył się w stadium 8-komórkowym (8). Wyniki badań tego zespołu potwierdziły, że mechanizmy zmian epigenetycznych przebiegają w różny sposób w zarodkach pochodzących z aktywacji partenogenetycznej w odniesieniu do zarodków wyprodukowanych *in vivo*.

Rola wybranych czynników wpływających na wczesny rozwój zarodków

W ciągu ostatnich 10 lat opublikowano wyniki wielu badań odnoszących się do występowania, struktury oraz potencjalnej funkcji RNA zawartego w dojrzałych plemnikach. RNA zawarty w dojrzałych plemnikach stanowi pozostałość po nieodrzuconym ciałku resztkowym, kropli cytoplazmatycznej podczas wczesnych stadiów

spermiogenezy (21). Podczas późniejszych etapów różnicowania się męskich komórek linii płciowej transkrypty te uzyskują stabilność strukturalną, dzięki czemu są przekazywane do kolejnych stadiów rozwojowych komórek. Dlatego też w dojrzałych plemnikach izolowanych z ejakulatów występuje tzw. RNA długiego życia. Badania Millera (27) dowodzą, że RNA zawarty w plemnikach może być przekazywany do komórki jajowej podczas zapłodnienia. Do transkryptów tych należą protamina 1 oraz klusteryna. Sugeruje się, że cząsteczki te mogą wpływać w sposób toksyczny na komórkę jajową oraz formującą się zygotę. Przedstawione wyniki badań zostały częściowo potwierdzone przez Kempistego i wsp. (19). Zespół ten wykazał, że transkrypty te zawarte w plemnikach, zygotach oraz stadium 2-komórkowym zarodków świń, a nieobecne w oocytach mogą odgrywać istotną rolę w kierowaniu oraz regulowaniu wczesnymi stadiami rozwoju embrionalnego u tego gatunku (19). Ponadto wskazuje się na ważną rolę identyfikowanych transkryptów w plemnikach, jako markerów ruchliwości plemników, właściwej morfologii tych komórek oraz ich zdolności do zapłodnienia (18, 20). Badania Depay-Martynów i wsp. (7) wykazały również dodatnią korelację pomiędzy zawartością wybranych transkryptów w dojrzałych plemnikach dawców a jakością zarodków, uzyskiwanych na drodze zapłodnienia pozaustrojowego ICSI (7).

Innym z elementów, zaliczanych do czynników zewnętrznych, mogących wpływać na jakość zarodków, jest poddawanie samic działaniu wybranych hormonów podczas przeprowadzanej superowulacji. Badania Antosika i wsp. (1) wykazały znaczące różnice w jakości zarodków, ocenianych 5-stopniową skalą, pomiędzy osobnikami z naturalną rują a po stymulacji PMSG-PG600, w dwóch grupach wiekowych samic. Wykazano tym samym, że zarówno wiek samic, jak i dawka oraz kombinacja podawanych hormonów odgrywają znaczącą rolę w jakości wypłukiwanych zarodków.

Określanie jakości zarodków przy wykorzystaniu metod mikrofluidycznych

Alternatywą dla inwazyjnych metod molekularnych stosowanych w ocenie jakości zarodków może być zastosowanie układów mikrofluidycznych. Mikrofluidyka skupiona wokół systemów Lab-on-Chip określanych również jako μ TAS (micro-total analyzing systems) do tej pory służyła głównie do monitorowania zanieczyszczeń wody i powietrza, kontroli transportu leków oraz opracowywania nowych leków. Połączenie biotechnik stosowanych w rozrodcie z mikroinżynierią daje możliwość analizowania wielu aspektów związanych z rozwojem oraz różnicowaniem się oocytów oraz zarodków *in vivo*, bez zmian ich właściwości biochemicznych, biofizycznych oraz bez ich uszkodzenia (12, 22, 50). W ciągu ostatnich kilku lat ukazało się zaledwie kilka doniesień odwołujących się do możliwości wykorzystania tych systemów w ocenie jakości zarówno komórek jajowych, jak i zarodków bydła i świń (17,

25, 43, 44). Przeprowadzone badania przedstawiły możliwość opracowania urządzenia do parametrycznej analizy jakości oocytów i zarodków wyżej wymienionych gatunków, które w sposób szybki, nieinwazyjny i w pełni obiektywny określają właściwości spektralne analizowanych komórek (22). Szczepańska i wsp. (43, 44) badali wpływ wybranych czynników, takich jak wielkość pęcherzyków jajnikowych oraz morfologii oocytów na ich jakość ocenianą metodami fluorymetrycznymi. Wyniki tych badań potwierdziły, iż system Lab-on-Chip jest parametrycznym analizatorem jakości badanych komórek, co jest przedstawiane za pomocą ich właściwości spektralnych (43, 44). Wykazano również, że oocyty pochodzące z dużych pęcherzyków jajnikowych (powyżej > 5 mm u świń) wykazują wysoką homogenność morfologiczną w odniesieniu do komórek izolowanych z małych (< 3 mm) i średnich (3-5 mm) pęcherzyków. Ponadto określono również, że system ten oraz jego układ parametryczny stanowi nowe urządzenie do analizy jakości morfologicznej oocytów, ponieważ wszystkie badane klasy morfologiczne komórek charakteryzowały się specyficznymi dla danej grupy właściwościami spektralnymi. Takie rozwiązanie stanowić może nową, nieinwazyjną, obiektywną, a jednocześnie tanią alternatywną metodę w ocenie jakości oocytów i zarodków (22, 37).

Podsumowanie

Molekularne oraz morfologiczne zmiany w zarodkach ssaków zachodzące podczas aktywacji genomu zarodkowego, a tym samym różnice charakteryzujące rozwój zarodkowy podczas wczesnych stadiów rozwoju embrionalnego stanowiąc mogą przydatne markery aktywacji genomu zarodkowego stosowane w szerokim aspekcie badań nad zarodkami (klonowanie). Uwagę należy zwrócić również na istotną rolę modyfikacji epigenetycznych, włączając w to metylację i demetylację DNA oraz acetylację histonów, w kierowaniu oraz regulacji początkowych stadiów rozwoju embrionalnego.

Coraz częściej wskazuje się także na istotną funkcję plemnikowego RNA, który może pełnić rolę markera płodności oraz wpływać na rozwój zarodków. Ponadto analiza złożonego procesu, jakim są zmiany epigenetyczne zachodzące w genomie zarodków, może stać się w przyszłości istotnym narzędziem pomocnym w zwiększaniu ilości zarodków *in vitro*. Połączenie badań biomedycznych z mikroinżynierią doprowadziło do opracowania urządzeń służących do analizy wielu procesów biologicznych *in vivo* bez uszkodzenia bądź zmiany właściwości biochemicznych lub biologicznych komórek. Podjęte w ostatnich latach badania nad wykorzystaniem zdobyczy mikrofluidyki umożliwiły opracowanie parametrycznego oraz obiektywnego systemu do analizy jakości oocytów oraz zarodków ssaków. W przyszłości wiedza dostarczona z doświadczeń przeprowadzonych na modelu świńskim czy bydłowym będzie mogła zostać wykorzystana w szeroko rozumianej biologii rozrodu innych gatunków ssaków.

Piśmiennictwo

1. Antosik P., Kempisty B., Jackowska M., Bukowska D., Woźna M., Lianeri M., Brüssow K. P., Jaśkowski J. M.: Differential expression of genes encoding EGF, IGF-1 and TGF β 1, β 2 and β 3 in porcine endometrium during estrus cycle in different age. *Medycyna Wet.* 2010, 66, 618-621.
2. Bjerregaard B., Maddox-Hyttel P.: Regulation of ribosomal RNA gene expression in porcine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 2004, 82-83, 605-616.
3. Bourc'his D., Xu G. L., Lin C. S., Bollman B., Bestor T. H.: Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 2001, 294, 2536-2539.
4. Bukowska D., Kempisty B., Antosik P., Jaśkowski J. M., Olechnowicz J.: Selected aspects of canine oocytes maturation, fertilization and embryo development in dogs. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 617-736.
5. Critser J. K., Laughlin M. H., Prather R. S., Riley L. K.: Proceedings of the Conference on swine in biomedical research. *ILAR J.* 2008, 50, 89-94.
6. Dean W., Santos F., Stojkovic M., Zakhartchenko V., Walter J., Wolf E., Reik W.: Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2001, 98, 13734-13738.
7. Depay-Martynów M., Kempisty B., Lianeri M., Jagodziński P. P., Jedrzejczak P.: Association between fertilin beta, protamines 1 and 2 and spermatid-specific linker histone H1-like protein mRNA levels, fertilization ability of human spermatozoa, and quality of preimplantation embryos. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2007, 45, 79-85.
8. Deshmukh R., Ostrup O., Li J., Callesen H., Vajta G., Maddox-Hyttel P.: DNA methylation in porcine parthenogenetic preimplantation embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2009, 21, 143.
9. Du Y., Kragh P. M., Zhang X., Purup S., Yang H., Bolund L., Vajta G.: High overall in vitro efficiency of porcine handmade cloning (HMC) combining partial zona digestion and oocyte trisection with sequential culture. *Cloning Stem Cells* 2005, 7, 199-205.
10. Fulka H., Mrazek M., Tepla O., Fulka J.: DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction* 2004, 128, 703-708.
11. Górska I., Kempisty B., Jagodziński P. P.: Epigenetyczne modyfikacje w komórkach rozrodczych. Epigenetic modifications in the germline cells. *Ginek. Prakt.* 2006, 3, 2-5.
12. Hahn S., Jackson L. G., Kolla V., Mahyuddin A. P., Choolani M.: Noninvasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies and Mendelian disorders: new innovative strategies. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2009, 9, 613-621.
13. Hajkova P., Erhardt S., Lane N., Haaf T., El-Maarri O., Reik W., Walter J., Surani M. A.: Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* 2002, 117, 15-23.
14. Hernandez-Verdun D.: The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem. Cell Biol.* 2006, 126, 135-148.
15. Hirasawa R., Chiba H., Kaneda M., Tajima S., Li E., Jaenisch R., Sasaki H.: Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev.* 2008, 22, 1607-1616.
16. Hyttel P., Laurincik J., Rosenkranz C., Rath D., Niemann H., Ochs R. L., Schellander K.: Nucleolar proteins and ultrastructure in preimplantation porcine embryos developed in vivo. *Biol. Reprod.* 2000, 63, 1848-1856.
17. Jaśkowski J. M., Kempisty B., Woźna M., Walczak R., Szczepańska P., Dziuban J., Antosik P.: Wybrane metody oceny kompetencji rozwojowej oraz selekcji oocytów i zarodków bydłych. *Medycyna Wet.* 2010, 66, 740-744.
18. Jedrzejczak P., Kempisty B., Bryja A., Mostowska M., Depa-Martynów M., Pawelczyk L., Jagodziński P. P.: Quantitative assessment of transition proteins 1, 2 spermatid-specific linker histone H1-like protein transcripts in spermatozoa from normozoospermic and asthenozoospermic men. *Arch. Androl.* 2007, 53, 199-205.
19. Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaśkowski J. M., Jagodziński P. P.: Analysis of selected transcript levels in porcine spermatozoa, oocytes, zygotes and two-cell stage embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2008, 20, 513-518.
20. Kempisty B., Depa-Martynów M., Lianeri M., Jedrzejczak P., Darul-Wasowicz A., Jagodziński P. P.: Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2007, 45, 109-113.
21. Kempisty B., Jedrzejczak P., Jagodziński P. P.: Structure and role of protamines 1 and 2 in spermatogenesis and male infertility. *Ginek. Pol.* 2006, 77, 238-245.
22. Kempisty B., Walczak R., Antosik P., Szczepańska P., Woźna M., Bukowska D., Zaorska K., Dziuban J., Jaśkowski J. M.: Systemy oceny kompetencji rozwojowej oocytów oraz zarodków ssaków oparte na technologii mikrofluidycznej typu Lab-on-Chip. *Medycyna Wet.* 2011, 67, 25-28.
23. Klose R. J., Bird A. P.: Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 2006, 31, 89-97.
24. Kragh P. M., Du Y., Corydon T. J., Purup S., Bolund L., Vajta G.: Efficient in vitro production of porcine blastocysts by handmade cloning with a combined electrical and chemical activation. *Theriogenology* 2005, 64, 1536-1545.
25. Le Gac S., van den Berg A.: Single cells as experimentation units in lab-on-a-chip devices. *Trends Biotechnol.* 2010, 28, 55-62.
26. Maddox-Hyttel P., Svarcova O., Laurincik J.: Ribosomal RNA and nucleolar proteins from the oocyte are to some degree used for embryonic nucleolar formation in cattle and pig. *Theriogenology* 2007, 68, 63-70.
27. Miller M. M.: Genome news highlights loss of chicken strains. *Nature* 2004, 432, 799.
28. Morgan H. D., Santos F., Green K., Dean W., Reik W.: Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 2005, 14, 47-58.
29. Nottle M. B., Beebe L. F. S., Harrison S. J., McIlfatrick S. M., Ashman R. J., O'Connell P. J., Salvaris E. J., Fiscaric N., Pommeys S., Cowan P. J., d'Apice A. J., Antony J. F.: Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation* 2007, 14, 339-344.
30. Ostrup O., Hall V., Petkov S. G., Wolf X. A., Hyldig S., Hyttel P.: From zygote to implantation: morphological and molecular dynamics during embryo development in the pig. *Reprod. Domest. Anim.* 2009, 44, 3, 39-49.
31. Ogushi S., Palmieri C., Fulka H., Saitou M., Miyano T., Fulka J.: The maternal nucleolus is essential for early embryonic development in mammals. *Science* 2008, 319, 613-616.
32. Petkov S. G., Reh W. A., Anderson G. B.: Methylation changes in porcine primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 2009, 76, 22-30.
33. Petters R. M.: Transgenic livestock as genetic models of human disease. *Reprod., fertyl. dev.* 1994, 6, 643-645.
34. Reik W., Dean W., Walter J.: Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001, 293, 1089-1093.
35. Santos F., Dean W.: Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* 2004, 127, 643-651.
36. Sato S., Yoshimizu T., Sato E., Matsui Y.: Erasure of methylation imprinting of Igf2r during mouse primordial germ-cell development. *Mol. Reprod. Dev.* 2003, 65, 41-50.
37. Schmid A., Kortmann H., Dittrich P. S., Blank L. M.: Chemical and biological single cell analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010, 21, 12-20.
38. Schultz R. M.: The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum. Reprod. Update* 2002, 8, 323-331.
39. Spivakov M., Fisher A. G.: Epigenetic signatures of stemcell identity. *Nat. Rev. Genet.* 2007, 8, 263-271.
40. Suganuma T., Workman J. L.: Crosstalk among histone modifications. *Cell* 2008, 135, 604-607.
41. Svarcova O., Laurincik J., Avery B., Mlynček M., Niemann H., Maddox-Hyttel P.: Nucleolar development and allocation of key nucleolar proteins require de novo transcription in bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2007, 74, 1428-1435.
42. Svarcova O., Strejček F., Petrovicova I., Avery B., Pedersen H. G., Lucas-Hahn A., Niemann H., Laurincik J., Maddox-Hyttel P.: The role of RNA polymerase I transcription and embryonic genome activation in nucleolar development in bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2008, 75, 1095-1103.
43. Szczepańska P., Walczak R., Dziuban J., Jackowska M., Kempisty B., Jaśkowski M. J., Bargiel S.: Lab-on-chip quality classification of porcine/bovine oocytes. *Proc. Chemistry* 2009, 1, 341-344.
44. Szczepańska P., Walczak R., Dziuban J., Kempisty B., Jackowska M., Antosik P., Jaśkowski J., Bargiel S.: Ocena jakościowa komórek rozrodczych zwierząt hodowlanych z wykorzystaniem mikrocyclometru typu lab-chip. *Elektronika* 2010, 6, 93-96.
45. Tesarik J., Kopečný V., Plachot M., Mandelbaum J.: Activation of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and changes in the ribosomal content of human embryos developing in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1986, 78, 463-470.
46. Tesarik J., Kopečný V., Plachot M., Mandelbaum J.: High-resolution autoradiographic localization of DNA-containing sites and RNA synthesis in developing nucleoli of human preimplantation embryos: a new concept of embryonic nucleologenesis. *Development* 1987, 101, 777-791.
47. Thompson E. M., Legouy E., Renard J. P.: Mouse embryos do not wait for the MBT: chromatin and RNA polymerase remodeling in genome activation at the onset of development. *Dev. Genet.* 1998, 22, 31-42.
48. Verheggen C., Almouzni G., Hernandez-Verdun D.: The ribosomal RNA processing machinery is recruited to the nucleolar domain before RNA polymerase I during *Xenopus laevis* development. *J. Cell Biol.* 2000, 149, 293-306.
49. Wilmut I., Beaujean N., de Sousa P. A., Dinnyes A., King T. J., Paterson L. A., Wells D. N., Young L. E.: Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2002, 419, 583-586.
50. Zeggari R., Wacogne B., Pieralli C., Roux C., Gharbi T.: A full micro-fluidic system for single oocyte manipulation including an optical sensor for cell maturity estimation and fertilization indication. *Sensors and Actuators* 2007, 125, 664-671.
51. Zhang Y., Li J., Villemoes K., Pedersen A. M., Purup S., Vajta G.: An epigenetic modifier results in improved in vitro blastocyst production after somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 2007, 9, 357-363.

Adres autora: dr Bartosz Kempisty, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań;
e-mail: etok@op.pl