

**UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE**  
**FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED**

**VPLYV OOPLAZMY NA ŠTRUKTÚRU JADIERKA**  
**U KLONOVANÝCH INTERGENERICKÝCH EMBRYÍ**

**Diplomová práca**

**2012**

**Bc. Andrea Machová**

**UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE**  
**FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED**

**VPLYV OOPLAZMY NA ŠTRUKTÚRU JADIERKA**  
**U KLONOVANÝCH INTERGENERICKÝCH EMBRYÍ**

**Diplomová práca**

Študijný program: BIm09

Študijný odbor: 4. 2. 1 biológia

Školiace pracovisko: Katedra zoológie a antropológie

Školiteľ: RNDr. Martin Morovič, PhD.

Konzultant: RNDr. Martin Morovič, PhD.

**Nitra 2012**

**Bc. Andrea Machová**

## **Čestné vyhlásenie**

Čestne vyhlasujem, že problematiku práce som spracovala sama s využitím odbornej literatúry.

## **ABSTRAKT**

MACHOVÁ Andrea: Vplyv ooplazmy na štruktúru jadierka u klonovaných intergenerických embryí. (Diplomová práca). Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre. Fakulta prírodných vied. Školiteľ: RNDr. Martin Morovič, PhD. Stupeň odbornej kvalifikácie: Magister študijného odboru 4. 2. 1 biológia. Nitra : FPV, 2012. 89 s.

Vývoj zygoty je pod kontrolou ooplazmy, ale zatiaľ nie je známe, či je ooplazma schopná interakcie s prenesenou somatickou bunkou z iného druhu, čo sa týka medzidruhového somatického nukleárneho transferu.

Embryá boli analyzované v rôznom čase po aktivácii pre detailnú nukleolárnu analýzu a imunofluorescenciu na vizualizáciu jadierkových proteínov súvisiacich s transkripciou a procesingom. Prasacie intergenerické embryá boli porovnané s partenogenetickými za účelom posúdenia vplyvov ooplazmy na prenesenú somatickú bunku. Napriek absencii štrukturálnej prestavby chromatinu a jadrovej membrány zrekonštruované embryá preukázali morfológiu jadrového a jadierkového prekursora podobného hostiteľskej ooplazme, ktorá spolu so zistenou posttranslačnou aktivitou somatickej bunky zavedenej do ooplazmy naznačuje univerzálnu funkciu jej faktorov.

Výsledky poukazujú na možný dôvod, prečo intergenerické SCNT embryá nikdy nezískajú úplnú zrelosť.

**Kľúčové slová:** Klonovanie. Embryo. Jadierko. Ooplazma.

## **ABSTRACT**

MACHOVÁ Andrea: Impact of Ooplasm on the Structure of Nucleolar of Cloned Intergeneric Embryos. (Diploma Thesis). Constantine the Philosopher University in Nitra. Faculty of Natural Sciences. Supervisor: RNDr. Martin Morovič, PhD. Degree of Qualification: Master of study program 4. 2. 1 biology. Nitra : FNS, 2012. 89 p.

Development of the zygote is under control of the oocyte ooplasm, but is not yet known whether ooplazma capability to interact with transferred somatic cells from other species in terms of interspecific somatic nuclear transfer.

Embryos were processed at different times after activation nukleolar for detailed analysis and immunofluorescence to visualize nucleolar proteins associated with transcription and processing. Porcine intergeneric embryos were compared with parthenogenetic to assess the effects of introduced somatic cells. Despite the absence of morphological alterations renewed nuclear morphology of the embryos showed a similar nucleolar precursor host ooplazme, which together with known post-translational activity of somatic cells introduced into ooplazmy suggests a universal function of its factors.

The results demonstrate a possible reason why intergeneric SCNT embryos never reached full term.

Keywords: Cloning. Embryo. Nucleolus. Ooplasm.

# OBSAH

Úvod.....	12
<b>1 PREHĽAD LITERATÚRY.....</b>	<b>13</b>
1. 1 Oplodnenie <i>in vivo</i> .....	13
1. 2 Aktivácia transkripcie po oplodnení.....	16
1. 2. 1 Transkripčná aktivita oocyty.....	16
1. 2. 2 Transkripčná aktivita včasných embryí.....	16
1. 2. 3 Regulácia aktivácie embryonálneho genómu a maternálna regulácia vývoja včasných embryí.....	18
1. 3 Jadierko.....	20
1. 3. 1 Štruktúra jadierka.....	21
1. 3. 2 Funkcie jadierka.....	23
1. 3. 3 Jadierkové proteíny.....	24
1. 3. 4 Proteíny a mechanizmus processingu pre-rRNA.....	25
1. 3. 5 Aktivácia transkripcie rDNA.....	27
1. 3. 6 Somatická nukleogenéza.....	28
1. 3. 7 Embryonálna nukleogenéza.....	30
1. 4 Oplodnenie <i>in vitro</i> .....	35
1. 5 Nukleárny transfer.....	38
1. 5. 1 História klonovania.....	39
1. 5. 2 Techniky SCNT.....	43
1. 5. 3 Technické aspekty somatického nukleárneho transferu.....	44
1. 5. 4 Praktické využitie a význam tvorby klonovaných jedincov.....	52
1. 5. 5 Miera úspešnosti somatického klonovania a otázka normálnosti klonovaného potomstva.....	55
<b>2 CIELE PRÁCE.....</b>	<b>58</b>
<b>3 MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>59</b>
3. 1 Získavanie oocytov a <i>in vitro</i> maturácia.....	59
3. 2 SCNT a partenogenetická aktivácia.....	59
3. 3 Kravské tetraploidné embryá.....	60
3. 4 Príprava na autorádiografiu pre svetelnú a transmisnú elektrónovú mikroskopiu.....	61
3. 5 Imunodetekcia jadierkových proteínov.....	61

3. 6 Vývojová schopnosť embryí.....	62
3. 7 Etika.....	62
<b>4 VÝSLEDKY.....</b>	<b>63</b>
4. 1 Aktivácia transkripcie.....	63
4. 2 Intranukleárne štruktúry prasacích oocytov.....	63
4. 2. 1 Prasacie partenogeneticky aktivované (pPA) embryá.....	63
4. 2. 2 Kravské intergenerické SCNT(biSCNT) embryá.....	63
4. 3 Intranukleárne štruktúry kravských oocytov.....	63
4. 3. 1 Kravské partenogeneticky aktivované (bPA) embryá.....	63
4. 3. 2 Prasacie intergenerické SCNT(piSCNT) embryá.....	64
4. 3. 3 Kravské tetraploidné embryá.....	64
<b>5 DISKUSIA.....</b>	<b>67</b>
<b>6 ZÁVER.....</b>	<b>70</b>
<b>7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....</b>	<b>71</b>

## Zoznam obrázkov a tabuliek

Obrázok č. 1. Stretnutie vajíčka so spermiami.

Obrázok č. 2. Prienik spermie do vajíčka.

Obrázok č. 3. Zygota so samčím a samičím prvojadrom.

Obrázok č. 4. Jadro s jadierkom a ďalšími štruktúrami.

Obrázok č. 5. Stavba ribozómu.

Obrázok č. 6. Štrukturálne komponenty jadierka.

Obrázok č. 7. Jadierko pod TEM.

Obrázok č. 8. Biogenéza ribozómov.

Obrázok č. 9. Processing pre-rRNA

Obrázok č. 10. Ribozomálne transkripčné podjednotky.

Obrázok č. 11. Embryonálna nukleogenéza u hovädieho dobytku.

Obrázok č. 12. Embryonálna nukleogenéza v embryách ošípanej.

Obrázok č. 13. Postup *in vitro* fertilizácie.

Obrázok č. 14. Oplodnenie vajíčka metódou ICSI.

Obrázok č. 15. Oplodnenie vajíčka metódou SUZI.

Obrázok č. 16 . Vznik embrya *in vivo* a vznik SCNT embrya.

Obrázok č. 17. Hans Spemann.

Obrázok č. 18. Ovca Dolly.

Obrázok č. 19. Klony prasiatok.

Obrázok č. 20. Mikromanipulátor.

Obrázok č. 21. SCNT.

Obrázok č. 22. Fibroblasty.

Obrázok č. 23. Elektrická stimulácia enukleovaného oocyту s DNA donora.

Obrázok č. 24. Vývoj embrya od 1-bunkového po blastocystové štádium.

Obrázok č. 25. Klonovaný chimerický králik.

Obrázok č. 26. Reprodukčné a terapeutické klonovanie.

Obrázok č. 27. Intranukleárne štruktúry v bPA, piSCNT a TP 4 hpa.

Obrázok č. 28. Intranukleárne štruktúry v bPA, piSCNT a TP 12 hpa.

Obrázok č. 29. Lokalizácia UBF (červené) a fibrilarínu (zelené) 4 hpa a 12 hpa u embryí rôzneho pôvodu.



Tabuľka č. 1. Porovnanie podmienok *in vivo* a *in vitro*.

Tabuľka č. 2. Prehľad klonovaných živočíchov.

Tabuľka č. 3. Efektivita tvorby klonovaných jedincov prenosom jadra somatickej bunky.

Tabuľka č. 4. Lokalizácia fibrilarínu a UBF v partenogenetických, intergenerických a tetraploidných embryách.

## Zoznam použitých skratiek

- AOS – Abnormal Offspring Syndrome – abnormálny syndróm potomstva
- AT III – antitrombín III
- AVR – acute vascular rejection – akútne cievne odmietnutie
- B23 – nukleofozmín
- C23 - nukleolín
- CDK – cyclin dependent kinase – cyklín závislá kináza
- CHX - cyklohemixid
- CSF – cytostatic factor – cytostatický faktor
- DFC – dense-fibrillar component – denzno-fibrilárny komponent
- DMAP - dimetylamínopurín
- 6-DAMP – N-6 dimetylamínopurín
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid – kyselina etyléndiamíntetraoctová
- EGA – embryonic genome activation – aktivácia embryonálneho genómu
- EMA – European Medicines Agency – Európska medicínska agentúra
- FC – fibrillar center – fibrilárne centrum
- GC – granular component – granulárny komponent
- HAR – hyperacute rejection – hyperakútne odmietnutie
- HD – hovädzí dobytok
- HMC – hand made cloning – klonovanie bez mikromanipulátora (ručne)
- hpa – hours post activation – hodín po aktivácii
- ICSI – intercytoplasmatic sperm injection – intracytoplazmatická injekcia spermie
- IVF – *in vitro* fertilization – *in vitro* oplodnenie
- IVM - *in vitro* maturation - *in vitro* dozrievanie
- LOS – Large Offspring Syndrome – rozsiahly syndróm potomstva
- MII – metafáza II
- MET – maternal-embryonic transition – maternálno-embryonálny prechod
- mRNA – mediátorová (messenger) ribonukleová kyselina
- MPF – maturation promoting factor – maturačný faktor
- NOR – nucleolus organizing region – oblasť organizujúca jadierko, organizátor jadierka
- NPB – nucleolar precursor body – jadierkové prekurzorové telieska

p53 – tumor proteín – proteín kódovaný génom TP53 a transkripčný faktor zabraňujúci vzniku nádoru

PBN – prenucleolar bodies – prenukleolárne telieska

PHA - fytohemaglutinín

pre-rRNA – prekurzorová ribozomálna ribonukleová kyselina

rDNA – ribozomálna deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

RP1 – RNA polymeráza I

rRNA – ribozomálna ribonukleová kyselina

SCNT – somatic cell nuclear transfer – somatický nukleárny transfer

iSCNT – intergeneric SCNT – medzidruhový somatický nukleárny transfer

SLI – selectivity factor I

snoRNA – small nucleolar RNA – malá jadierková RNA

snoRNP – small nucleolar ribonucleolar protein – malý jadierkový ribonukleoproteín

SUZI – subzonal insertion of sperm – subzonálna injekcia spermie

TEM – transmisná elektrónová mikroskopia

TPI – topoizomeráza I

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

TSA - trichostatín

UBF – upstream binding factor – transkripčný faktor, ktorý sa viaže na regulačnú časť promótoru RNA polymerázy I

## Úvod

Základnou podmienkou vzniku nového jedinca je pohlavné rozmnožovanie, pri ktorom dochádza k oplodneniu, teda k splynutiu dvoch pohlavných buniek, ktoré sú pohlavne rozlíšené a výsledkom je vznik zárodku, ktorý sa ďalej vyvíja.

Sú však prípady, kedy z rôznych príčin k oplodneniu dôjsť nemôže. Táto skutočnosť viedla k vytvoreniu nových metód, ktoré zabezpečujú vznik nového jedinca. V súčasnosti sa využíva viacero metód, ktoré ovplyvňujú pohlavný cyklus a tak napomáhajú k liečeniu porúch plodnosti. Keď pohlavné rozmnožovanie nefunguje, existuje možnosť umelého oplodnenia. Ak zlyhá aj tento spôsob, účinnou metódou je somatický nukleárny transfer, teda klonovanie.

Cytoplazma oocyty, teda ooplazma, je dôležitá pre reprogramovanie haploidného maternálneho a paternálneho genómu po oplodnení ako aj diploidného genómu somatickej bunky po somatickom nukleárnom transfere (Somatic Cell Nuclear Transfer - SCNT). Pre vývoj embryí vzniknutých somatickým nukleárnym transferom je nevyhnutné reprogramovanie genómu. Jadrový obal sa rozpadá, predčasne kondenzované chromozómy a ďalšie jadrové štruktúry prechádzajú morfológickými zmenami. Rozpad jadrového obalu a predčasná kondenzácia chromatinu ešte neboli študované u intergenerických SCNT embryí. Skúmanie týchto vlastností môže prispieť k porozumeniu reprogramovania genómu a potencionálnych odchýlok počas embryogenézy. Reprogramovanie počas SCNT vedie k potlačeniu transkripcie genómu a je sprevádzané prítomnosťou jadrikových prekursorov. Hlavným predpokladom pre úspešné reprogramovanie genómu somatickej bunky je demontáž spojených fibrilogramulárnych jadriek na inaktívne jadrikové prekursory. Je otázne do akej miery ooplazma môže slúžiť ako univerzálne reprogramovacie médium a schopná pretvoriť somatickú bunku rôznych druhov. Cieľom súčasného štúdia je zistiť a preskúmať prestavbu jadrieka.

Z tohto dôvodu je táto práca zameraná na problematiku somatického nukleárneho transferu a poskytuje množstvo informácií týkajúcich sa tejto témy.

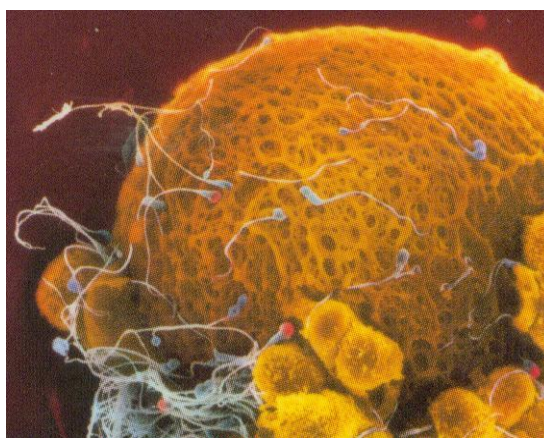
# 1 PREHLAD LITERATÚRY

## 1. 1 Oplodnenie *in vivo*

Oplodnenie – fertilizácia je proces, pri ktorom dochádza k splynutiu dvoch haploidných pohlavných buniek - gamét, ktoré sú pohlavne rozlíšené. Samičia gaméta – vajíčko splyva so samčou gamétou – spermiou, pričom vzniká jedna bunka – zygota, ktorá je diploidná.

V živočíšnej ríši poznáme dva spôsoby oplodnenia. Ak sa splynutie oboch gamét uskutočňuje mimo matky, ide o vonkajšie oplodnenie, ktoré je typické hlavne pre vodné živočíchy. Ak k splynutiu pohlavných buniek dochádza v pohlavných orgánoch samice, hovoríme o vnútornom oplodnení, ktoré sa uskutočňuje pomocou kopulačných orgánov, teda spermie sa dostávajú do blízkosti vajíčok pomocou penisu samca zavedeného do vagíny samice. Pravdepodobnosť oplodnenia vajíčok spermiami je oveľa vyššia ako pri vonkajšom oplodnení, preto aj produkcia gamét je omnoho nižšia. Vnútorné oplodnenie sa ďalej rozdeľuje na pošvové, kedy sa ejakulát pri párení dostáva do pošvy (prežúvavce) a maternicové, kedy sa ejakulát dostane do maternice (ošípané, kobyľa). Rozmnožovanie je závislé buď priamo na vonkajších faktoroch alebo je sprostredkované hormonálne a prejavuje sa zvýšením pohlavného pudu (Kapeller a Pospíšilová, 1991).

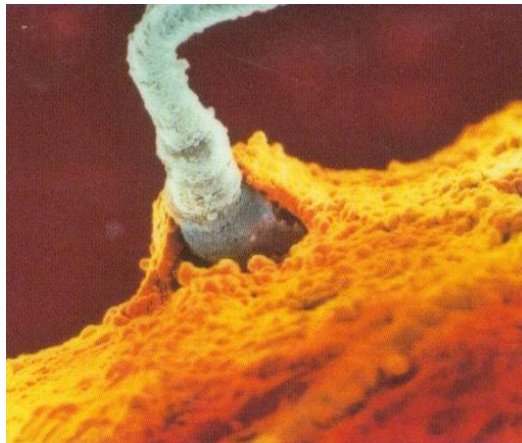
Proces oplodnenia má štyri fázy. Prvou je fáza približovania gamét (Obr. č. 1), kedy sa spermie dostávajú do blízkosti vajíčka a musia prekonať sériu bariér *cumulus oophorus* a *zonu pellucidu*, aby sa mohla uskutočniť fúzia spermie s cytoplazmatickou membránou oocyty.



Obrázok č. 1. Stretnutie vajíčka so spermiami. (Dostupné na: <http://www.osel.cz/>, 2011)

Prienik hlavičky spermie cez tieto bariéry je umožnený pomocou enzýmov, ktoré sú uvoľňované z akrozómu. Aby však mohlo dôjsť k akrozómovej reakcii, musia spermie prejsť cez samičí aparát, kde v dôsledku sekrétov samíc dochádza k tzv. kapacitácii spermií, pri ktorej sa účinkom niekoľko hodinového pôsobenia sekrétov v pohlavných orgánoch samice odstránia ochranné proteíny z hlavičky spermie a tým sa odhalia receptory na povrchu spermie, ktoré sa neskôr naviažu na *zonu pellucidu*, v dôsledku čoho sa zvýši metabolizmus a motilita spermií (Trojan et al., 2003).

Druhou fázou oplodnenia je fáza penetrácie. Po ovulácii dochádza k expanzii *cumulus oophorus*, teda uvoľňovaniu kumulárnych buniek, kedy už nie sú pevne spojené a prerušuje sa aj ich spojenie s oocytom, čo zjednodušuje prechod spermie k *zone pellucide* (Obr. č. 2). Potom dochádza k akrozómovej reakcii, čiže k spojeniu vonkajšej cytoplazmy a vonkajšej akrozómovej membrány hlavičky spermie a k vytvoreniu vezikulu naplneného enzýmami, ktoré rozpúšťajú látky stmefujúce kumulárne bunky a spermie dosiahnu *zonu pellucidu*, ktorá obsahuje receptory, na ktoré sa spermia naviaže. Potom dochádza k fúzii membrán vajíčka a spermie a po preniknutí spermie do vajíčka sa medzi *zonou pellucidou* a cytoplazmatickou membránou vajíčka vytvorí periviteliný priestor (Langmeier et al. 2009).

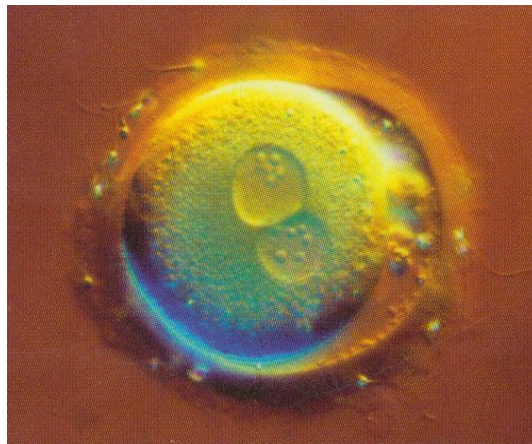


Obrázok č. 2. Prienik spermie do vajíčka. (Dostupné na: <http://www.osel.cz/>, 2011)

Treťou fázou oplodnenia je kortikálna reakcia, ktorá je charakteristická formovaním kortikálnych granúl, vytváraných Golgiho komplexom. Pri solitárnej formácii kortikálnych granúl sa granule rozostúpia tesne pod povrchom cytoplazmatickej membrány oocytu. Sú naplnené veľkým množstvom enzýmov a slúžia ako blok proti polyspermii, teda po preniknutí prvej spermie do vajíčka sa granule spoja s membránou a ich obsah sa vyleje do periviteliného priestoru. Cytoplazma sa stiahne v mieste vniknutia spermie,

vajíčko sa zmenší a vylíate enzýmy zabráni prieniku ďalších spermíí do vajíčka (Kittnar et al., 2011).

Poslednou fázou je vznik samčieho a samičieho prvojadra. Po penetrácii spermie do vajíčka sa ukončí druhé meiotické delenie, teda nastáva aktivácia vajíčka a vylúči sa druhé pólové teliesko a vzniká samičie prvojadro. Zo spermie sa po penetrácii oddelí bičik, hlavička dekonduzuje a vytvára sa samčie prvojadro. Prvojadrá migrujú do centrálnej oblasti vajíčka, kde prebieha ich splynutie – syngamia, pričom vznikne zygota (Obr. č. 3) (Laurincik et al., 2008).



Obrázok č. 3. Zygota so samčím a samičím prvojadrom.

(Dostupné na: <http://www.osel.cz/>, 2011)

Biologický význam oplodnenia spočíva v prenášaní dedičných vlastností z rodičov na potomkov, zahŕňa zväčšenie variability a tým aj schopnosti druhu prispôbovať sa zmeneným podmienkam prostredia v priebehu evolúcie, ďalej zahŕňa ontogenetický vývoj nového jedinca a veľký význam má tiež aktivácia vajíčka (Trojan et al, 2003).

## **1. 2 Aktivácia transkripcie po oplodnení**

Pohlavné rozmnožovanie zahŕňa vytvorenie nového funkčného genómu z dvoch rôznych buniek, z paternálnej a maternálnej gaméty, ktoré sa vyvíjajú samostatne a odlišne až do okamihu oplodnenia. U mnohých zvierat sú oocyty neaktívne k oplodneniu a vývoj je iniciovaný pod kontrolou maternálnych faktorov počas oogenézy. U drosofil, mRNA uskladnená v oocytoch je stabilná po oplodnení a reguluje veľa aspektov embryonálneho vývoja. Naopak, u zvierat, oocytmi získaná mRNA je degradovaná krátko po oplodnení a nemôže riadiť viac ako niekoľko prvých delení buniek. Preto aktivácia embryonálneho genómu musí nastať veľmi skoro v priebehu vývoja cicavcov. Formovanie embryonálneho genómu a založenie jeho vlastnej kontroly nad vývojovými procesmi sa týka aktivácie transkripcie a koordinovanej expresie špecifických génov v definovanom chronologickom poradí. Výsledkom aktivácie genómu je expresia nového génu, ktorý stanovuje totipotentný stav každej blastoméry v štádiu brázdenia embrya (Elder a Dale, 2000).

### **1. 2. 1 Transkripčná aktivita oocytu**

Rovnako ako sa folikul vyvíja z primordiálneho folikulu do štádia terciárneho (antrálneho) folikulu, tak aj oocyt sa dostáva do štádia rastu a získava svoju charakteristickú architektúru.

Počas vývoja oocyt vykazuje vysoký stupeň transkripcie a translácie vedúci k tvorbe rôznych RNA a proteínov, ktoré sú buď priamo využívané oocytom alebo sú uschované pre ďalšie využitie počas včasného embryonálneho vývoja.

Oocyty primordiálnych a primárnych folikulov nevykazujú transkripčnú aktivitu. Transkripčná aktivita je pozorovaná v oocytoch sekundárnych a včasných terciárnych folikulov. U neskorších terciárnych folikulov je transkripcia oocytov nachádzajúcich sa na konci fázy rastu ukončená (Laurincik et al, 2008).

### **1. 2. 2 Transkripčná aktivita včasných embryí**

Aktivácia embryonálneho genómu (Embryonic genome activation - EGA) je charakteristická tromi fázami. Prvou je nadobudnutie transkripčného stavu počas prvej S fázy. Ďalej nasleduje fáza minoritnej aktivácie genómu, ktorú možno pozorovať u niektorých druhov už v 1-bunkovom embryu v štádiu zygoty, trvá jeden alebo viac



štiepiacich cyklov a je charakteristická nízkou hladinou transkripcie a tvorbou transkriptov, ktoré sú dôležité pre život embrya počas prvých dní (Řezábek, 2008). Poslednou fázou je majoritná aktivácia genómu, ktorá je u všetkých druhov cicavcov zhodná s prechodom z maternálnej do embryonálnej kontroly vývoja. Predstavuje kľúčový krok vo vývoji embrya, pretože sa počas nej vytvárajú proteíny dôležité pre ďalší vývin embrya. Tie embryá, u ktorých nebola majoritná transkripcia naštartovaná sa obyčajne už ďalej nevyvíjajú (Laurincik et al., 2008).

Maternálno-embryonálna tranzícia (maternal-embryonic transition - MET), teda prechod z maternálnej na embryonálnu kontrolu vývoja znamená, že maternálne transkripty sú nahradené transkriptami novoaktivovaného genómu embrya (Pivko, 1995). Počiatočný vývin preimplantačného embrya je riadený transkriptami a polypeptidmi maternálneho pôvodu. Sú syntetizované a uložené v oocyte a po oplodnení prechádzajú do včasného embrya (Schultz, 1993). Avšak počas prvých embryonálnych cyklov sa kontrola vývoja dostáva z maternálnej pod embryonálnu kontrolu, pričom sú maternálne transkripty a polypeptidy postupne degradované. Prechod z maternálnej kontroly vývoja na embryonálnu kontrolu je teda postupný proces (Thompson, 1996).

Aktivácia genómu embrya má najmenej tri funkcie, ktoré sú nevyhnutné pre pokračovanie vývoja (Schultz, 2002). Prvou funkciou je odstránenie maternálnych vajíčkovovo-špecifických transkriptov, ktoré už potom nie sú vyjadrené. Deštrukcia tejto mRNA obmedzuje dobu, v ktorej tieto gény môžu fungovať. Druhou funkciou je nahradenie maternálnych transkriptov, ktoré sú spoločné pre oocyty a včasné embryo, ako sú aktíny a históny. Ak tieto transkripty nie sú nahradené, je zrejmé, že vývoj sa čoskoro zastaví kvôli neschopnosti embrya vykonávať svoje základné bunkové funkcie. Ich expresia je dôležitá napriek tomu, že nevedie k reprogramovaniu expresie génov. Treťou funkciou tohto prechodu je podporiť reprogramovanie vo vzore génovej expresie, ktorá je spojená s generáciou nových transkriptov, ktoré nie sú vyjadrené v oocytoch, teda iniciácia transkripcie génov, ktorých expresia v oocyte neprebíhala, ale sú nevyhnutné pre normálny embryonálny vývoj a diferenciáciu buniek. Toto reprogramovanie génovej expresie je pravdepodobne molekulárnou podstatou transformácie a diferenciácie oocytov na totipotentné blastoméry (Elder a Dale, 2000).

EGA nasleduje ako viacstupňová udalosť. U cicavcov vrátane človeka, je embryonálny genóm aktivovaný podobným spôsobom postupne na 2 - 4-bunkové štádium, 4 - 8-bunkové štádium alebo 8 - 16-bunkové štádium. Gény prednostne prepisované sú spojené s vývojovou schopnosťou a zúčastňujú sa na regulácii transkripcie a translácie,

posttranslačnej modifikácii proteínov, regulácii bunkového cyklu, folikulogenéze, histónovom zložení, syntéze prostaglandínov, rastových faktorov a bunkovej signalizácii (vrátane receptorov), metabolizme a transportnom systéme (Řezábek, 2008). Dozrievanie oocytov ukončí transkripciu pri zachovaní chromatinu v štádiu metafázy II. Spermie prechádzajú v transkripčnom stave cez balenie DNA v špecializovaných bázických proteínoch, vrátane rôznych variantov protamínov a histónov. Fúzia transkripčne potlačených gamét pri oplodnení je sprevádzaná obdobím transkripčnej neschopnosti, ktorej trvanie závisí od druhu. Transkripcia u myši je zistená krátko po iniciácii replikácie DNA a naznačuje, že DNA replikácia môže byť spojená s iniciáciou transkripcie. V súlade s týmto bolo zistené, že inhibícia prvého kroku replikácie DNA spôsobuje v 40% pokles v transkripcii. Aj keď transkripcia je zistená už v priebehu prvého bunkového cyklu po oplodnení u niektorých druhov cicavcov, nie je zjavné, či tieto transkripty sú efektívne preložené (Eppig et al., 2002). Biologický význam separácie transkripcie od translácie môže slúžiť na ochranu skorého embrya pred zmiešanou expresiou génov, ktorá by mohla vzniknúť ako dôsledok dramatických udalostí prestavby chromatinu, ktoré nastanú kým maternálne a paternálne genómy sú vymodelované do štruktúry chromatinu prítomného v nasledujúcich bunkových cykloch. Vytvorenie tejto zrelej štruktúry chromatinu môže byť základom pre podporu príslušného vzoru génovej expresie nevyhnutnej pre ďalší vývoj. Ďalšou možnosťou je, že slúži na označenie promótorov, ktoré budú rýchlo využité nasledujúcimi štiepeniami. Nasledujúca minoritná aktivácia genómu predstavuje kompletnú zmenu vo vzore syntézy proteínov, ktorá nastane počas doby štiepenia s rýchlou degradáciou maternálnych transkriptov. Embryonálna transkripcia je potom nevyhnutná pre ďalší vývoj a množstvo novosyntetizovaných transkriptov sa zvýši 5 až 10-násobne v čase, keď sa objaví prvá diferenciácia buniek v štádiu blastocysty (Baharvand, 2009).

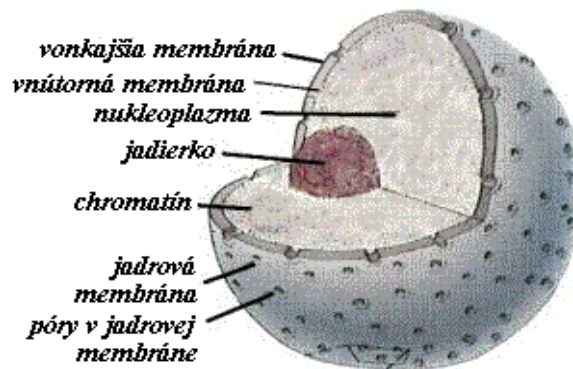
### **1. 2. 3 Regulácia aktivácie embryonálneho genómu a maternálna regulácia vývoja včasných embryí**

Produkty maternálnych génov riadia vývoj včasných embryí, keď je novovzniknuté embryo transkripčne inaktívne. Počas tohto obdobia, celkové množstvo cytoplazmy v embryu zostáva konštantné, počet jadier a množstvo DNA sa zvyšuje exponenciálne a mRNA a proteíny poskytnuté vajíčku matkou riadia vývoj. Napriek tomu je embryonálny genóm transkripčne aktivovaný len v neskoršom bunkovom cykle. EGA sa tak zhoduje

s predĺžovaním bunkového cyklu a degradáciou mnohých maternálnych RNA (Watson et al., 1999). Maternálna mRNA a proteínové rezervy v oocytoch ubúdajú s časom, s veľmi obmedzenou možnosťou pre posttranskripčný proces a postupnou náhradou transkriptov embrya a transláciou jeho produktov. Príslušná ooplazma má všetky mRNA potrebné pre embryonálny vývoj k majoritnej aktivácii genómu a teda pre úspešnú prestavbu maternálneho a paternálneho genómu do transkripčne aktívneho genómu embrya (Laurincik et al, 2008). V mnohých prípadoch aktivácia závisí na oslobodení mRNA od komplexov, ktoré blokujú iniciáciu translácie. Napríklad u myši bolo preukázané, že mRNA je viazaná komplexom potláčajúcim transláciu zabraňujúc náboru iniciačného faktora translácie. Počas maturácie oocytov sa prvky potláčajúceho komplexu fosforylujú a uvoľňujú mRNA pre transláciu (Baharvand, 2009). Zatiaľ čo mRNA zygoty je syntetizovaná v priebehu embryogenézy, mnohé mRNA matky sú degradované. Degradácia odstraňuje génové produkty, ktoré môžu ovplyvniť neskorší vývoj. Táto regulovaná maternálna destabilizácia mRNA je sprostredkovaná sekvenciami v 3' nepreloženej oblasti. Špeciálne proteíny a RNA sa spájajú do týchto sekvencií a indukujú tlmenie cieľových mRNA, ktoré sú potom náchylné k degradácii proteázou (Eppig et al., 2002).

### 1. 3 Jadierko

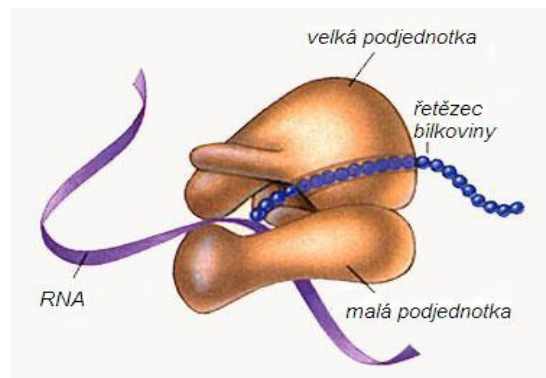
Jadierko (*nucleolus*) predstavuje jeden z markerov remodelovania somatickej bunky počas SCNT (Petrovičová, 2010). Je ultraštruktúralne najvýraznejšou jadrovou organelou (Obr. č. 4), ktorá je viditeľná v jadre buniek pomocou mikroskopu s fázovým kontrastom (Hernandez-Verdun, 2006).



Obrázok č. 4. Jadro s jadierkom a ďalšími štruktúrami.

(Dostupné na: <http://sk.wikipedia.org/wiki/Jadierko>, 2012).

Jadierko je jadrová organela, ktorá obsahuje gény pre rRNA, ktorá spolu s proteínmi migruje do cytoplazmy vo forme podjednotiek ribozómov (Obr. č. 5), kde je hlavnou zložkou vlastného proteosyntetického aparátu, prostredníctvom ktorého je možná proteosyntéza, teda tvorba všetkých bielkovín.



Obrázok č. 5. Stavba ribozómu. (Dostupné na: <http://www.sszdra-karvina.cz/>, 2011)

U vyšších eukaryotov sa jadierko objavuje pri prechode mitózy do interfázy a je lokalizované v blízkosti jadrovej membrány (Hernandez-Verdun, 2004; Bourgeios a Hubert, 1988). Cicavčie jadrá obsahujú jedno alebo viacero jadriek (Hernandez-Verdun, 2004). Veľkosť aj počet jadriek sa počas bunkového cyklu môže meniť, lebo môže

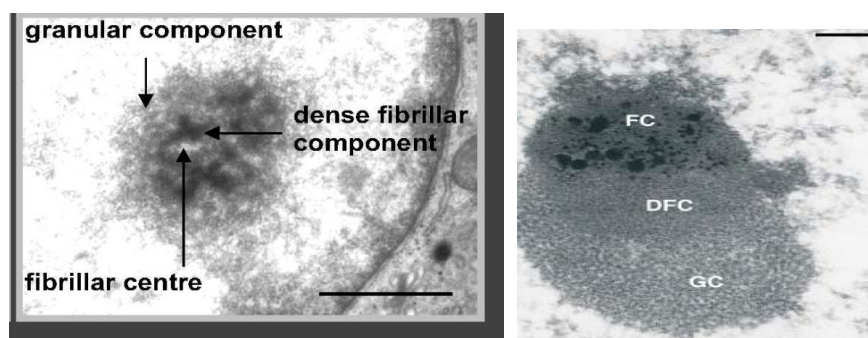
dochádzať k ich fúzii, teda spojeniu po vstupe bunky do interfázy (Savino et al., 2001). Veľké jadierka alebo ich veľký počet je typický pre bunky tvoriace veľké množstvo bielkovín, teda nezrelé, rastúce a málo diferencované bunky a pre bunky s vysokou sekrečnou aktivitou, čiže bunky s veľkou spotrebou rRNA (Bózner et al., 1986). Veľkosť jadierok je veľmi variabilná. Napríklad u človeka sa pohybuje od 0,5 mikrometrov v lymfatických uzlinách až po 3-9 mikrometrov v rakovinomerných bunkách (Hernandez-Verdun, 2006). Jadierko nie je trvalou štruktúrou a za jeho vznik sú zodpovedné gény pre rRNA. V profáze sa jadierko stráca a objavuje sa až na konci telofázy (King et al., 1988). Počet, veľkosť a tvar jadierok závisí od živočíšneho druhu a bunkového typu (Hadjiolov et al., 1985).

### 1. 3. 1 Štruktúra jadierka

Po každej mitóze produkty viacerých génov aktivujú gény pre-rRNA a nastáva tvorba, úprava a dozrievanie ribozómových zložiek, teda určité jadierkové štruktúry sa tvoria ako dôsledok rôznych aktivít v jednotlivých štádiách biogenézy ribozómov (Hadjiolov et al., 1985).

Typ a štruktúra jadierka závisia od živočíšneho druhu, typu bunky a hlavne od jeho funkčného stavu, teda od intenzity syntézy a processingu rRNA. Zmeny v transkripcii a processingu rRNA sa viditeľne odrážajú na ultraštruktúre jadierka (Schwarzacher a Wachtler, 1993).

Funkčné aktívne jadierko cicavčích embryí sa skladá z troch štruktúrnych komponentov, ktorými sú fibrilárne centrum (FC), denzný fibrilárny komponent (DFC) a granulárny komponent (GC) (Wachtler a Stahl, 1993). Jadierko obsahujúce všetky tieto komponenty sa označuje ako fibrilogramulárne (Obr. č. 6).



Obrázok č. 6. Štruktúrne komponenty jadierka.

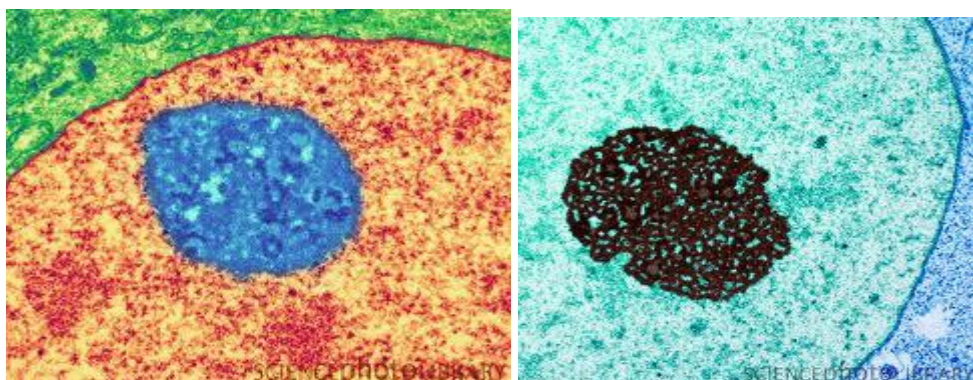
(Dostupné na: <http://users.path.ox.ac.uk/> a na: <http://www.sciencephoto.com/>, 2012)

Komponenty fibrilogramulárneho jadierka odzrkadľujú jednotlivé kroky biosyntézy ribozómov. FC a DFC obsahujú enzymatický aparát potrebný pre transkripciu, v DFC sa nachádza neupravený transkript, kým GC obsahuje už upravený transkript s bielkovinami v podobe preribozomálnych častíc a v konečnej podobe aj vo forme ribozomálnych podjednotiek. Transkripcia rDNA je lokalizovaná na periférii FC, pričom rastúca pre-rRNA rýchlo preniká do DFC, kde začína jej processing.

FC je tvorené sieťou jemných fibríl, s priemerom 4-8 nm. Bunky s malou proteosyntetickou aktivitou majú len jedno FC v jadierku, napr. ľudský lymfocyt. U buniek s vysokou proteosyntetickou aktivitou jadierko obsahuje veľký počet FC, napr. v jadierku rastúceho fibroblastu sa nachádza až 100 FC (Jordan a McGovern, 1981). FC je v úzkom kontakte s DFC, s chromatinovými fibrilami a GC. V elektrónovom mikroskope sa FC javí ako svetlé bodky na tmavom pozadí jadierka (Obr. č. 7).

DFC je zložený z tesne priliehajúcich jemných fibríl s priemerom 3-5 nm, ktoré spôsobujú pomerne vysoký kontrast v elektrónovom mikroskope. DFC vytvára sieť pásov s hrúbkou 0,01-0,1 $\mu$ m (tzv. nulkeolonéma). U vysoko proteosynteticky aktívnych buniek vypĺňa takáto sieť celú centrálnu oblasť jadierka, prerušovaná je len FC. V tomto prípade ide o retikulárny typ jadierka.

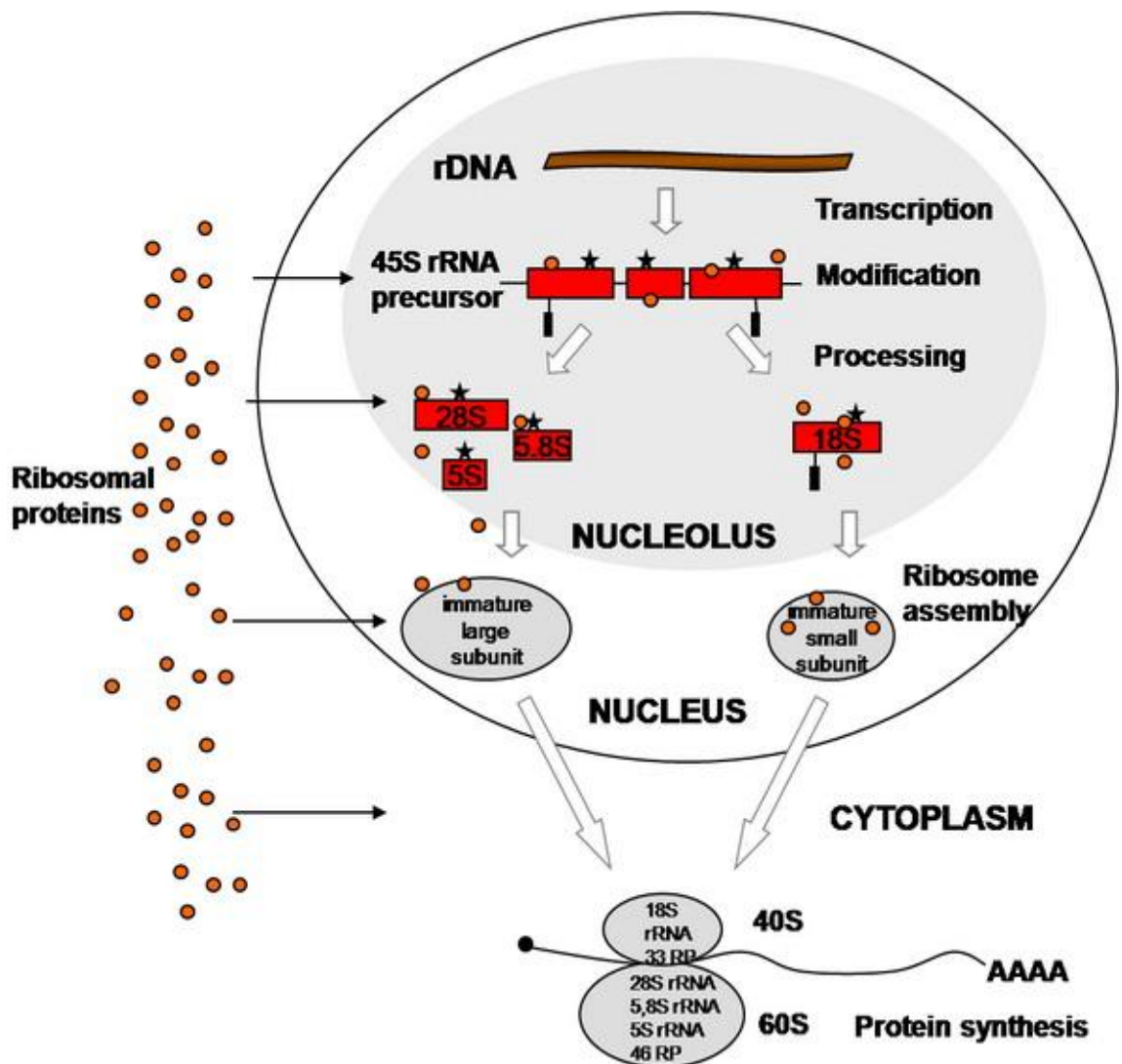
GC sa skladá z granulárnych štruktúr s priemerom 10-15 nm. Nachádza sa na periférii jadierka a obklopuje DFC. Na ich rozhraní je tranzitná zóna, niekedy označovaná aj ako fibrilo-granulárny komponent. Hlavnou zložkou GC sú preribozomálne podjednotky, ktoré tu prechádzajú konečnou úpravou pred exportom do cytoplazmy (Schwarzwacher a Wachtler, 1993).



Obrázok č. 7. Jadierko pod TEM. (Dostupné na: <http://www.sciencephoto.com/>, 2012)

### 1. 3. 2 Funkcie jadierka

V jadierku sa syntetizuje a istý čas uskladňuje rRNA a na jadrových ribozómoch prebieha syntéza niektorých jadrových proteínov. Z toho vyplýva, že jadierko je miestom biogenézy ribozómov (Obr. č.8) (Hadjiolov, 1985). Biogenéza ribozómov sa uskutočňuje prostredníctvom špecifickej transkripčnej a processingovej mašínérie a je sústredená v oblasti ribozomálnych génov.



Obrázok č. 8. Biogenéza ribozómov.

(Dostupné na: <http://www.molmedbiotech.com/>, 2012)

Hlavnou funkciou jadierka je príprava rRNA a jej čiastočná úprava na ribozomálne podjednotky. Jadierko je jediným miestom, v ktorom sú z chromatinu exprimované gény pre rRNA (rDNA). Syntéza prekurzorovej molekuly pre-rRNA z rDNA sa uskutočňuje

pomocou RNA polymerázy I, ale na správnu činnosť jadierka sú potrebné všetky tri eukaryotické RNA polymerázy. RNA polymeráza II akumuluje mRNA pre syntézu ribozomálnych proteínov a RNA polymeráza III syntetizuje 5S rRNA, ktorá sa spolu s 5,8S a 28S spája do veľkej podjednotky ribozómu. Nasyntetizovaná prekurzorová molekula pre-rRNA je v jednotlivých komponentoch jadierka upravovaná a modifikovaná na tri hlavné rRNA (5,8S; 18S a 28S rRNA), ktoré sa tu pred exportom do cytoplazmy spájajú s niektorými ribozomálnymi proteínami. V cytoplazme sa dokončuje tvorba ribozomálnych podjednotiek a ribozómy sa zapájajú do procesov proteosyntézy (Hadjiolov et al., 1985).

Okrem tejto hlavnej funkcie, je jadierko zapojené aj do množstva iných biologicky významných funkcií. Jadierko má významnú úlohu v processingu mRNA a tRNA. Dochádza tu k processingu a tvorbe k ribonukleoproteínu signál rozpoznávajúcej častice potrebnej k proteosyntéze. V jadierku je lokalizovaná aj RNA, ktorá je funkčnou súčasťou telomerázy. K ďalším funkciám jadierka patrí aj regulácia bunkového cyklu, starnutia bunky (Straight et al., 1999) a metabolizmu p53 (Zhang a Xiong, 1999).

### **1. 3. 3 Jadierkové proteíny**

Existencia jadierkových štruktúr je priamo závislá od transkripčnej funkcie jadierka. Jadierko sa objavuje v bunke v telofáze každého bunkového cyklu (Scheer et al., 1993).

Základnou úlohou jadierkových proteínov je kontrola transkripcie rRNA génov, úpravy transkriptov, spájania transkriptov s ďalšími dôležitými ribozomálnymi proteínmi do preribozomálnych podjednotiek a ich transportu do cytoplazmy (Hyttel et al., 1998). Jadierkové proteíny sa na základe ich hlavnej funkcie delia na proteíny transkripčnej a processingovej mašinerie (Wachtler a Stahl, 1993).

RNA pol I transkripčná mašineria je veľmi dynamickým proteínovým komplexom. Komponenty RNA pol I transkripcie sú neustále a rýchlo vymieňané medzi nukleoplazmou a miestami transkripcie rDNA. Medzi hlavné zložky RNA pol I transkripčnej mašinerie patrí RPI - RNA polymeráza I, UBF - upstream binding factor, SLI - promotor selectivity factor, TPI – topoisomeráza I.

RPI je hlavný enzým zodpovedný za syntézu pre-rRNA v jadierku (Dundr a Misteli, 2001). Na jeden aktívny gén je naviazaných 100-200 molekúl RPI. Špecifická podjednotka



RNA polymerázy I je dôležitá pre aktiváciu transkripcie pomocou transkripčného faktora UBF (Panov et al., 2006).

UBF je jadierkový proteín, ktorý bol prvým transkripčným faktorom RPI klonovaný a sekvenovaný u ľudí (Jantzen et al., 1990), myši, krýs (O'Mahony a Rothblum, 1991) a *Xenopus* (Bachvarov et al., 1991). Transkripčný faktor UBF dokáže rozpoznať štruktúrované nukleové kyseliny (Copenhaver et al., 1994) a podieľa sa na organizovaní chromatinu (Wright et al., 2006).

SL1 je multimerný proteín, ktorý je druhovo špecifický (Comai et al., 1992).

TPI je potrebná na dekondenzáciu superšpiralizovanej formy DNA (Miller et al., 1985). Nie je špecifická pre rDNA a nachádza sa v nukleoplazme a v jadierku (Raska et al., 1989).

### **1. 3. 4 Proteíny a mechanizmus processingu pre-rRNA**

Na processing pre-rRNA je potrebných vyše 100 proteínov. K najvýznamnejším processingovým faktorom patria napr. fibrilarín, nukleolín (C23), nukleofozmín (B23, numatrin), malé jadierkové ribonukleové proteíny (snoRNP) a malé jadierkové ribonukleové kyseliny (small nucleolar RNA – snoRNA), napr. U3, U8, U14 a iné. Processingové komplexy sa delia aj podľa doby pôsobenia na skoré, pôsobiace v prvých processingových krokoch, a neskoré, pôsobiace na konci processingových úprav (Savino et al., 1999).

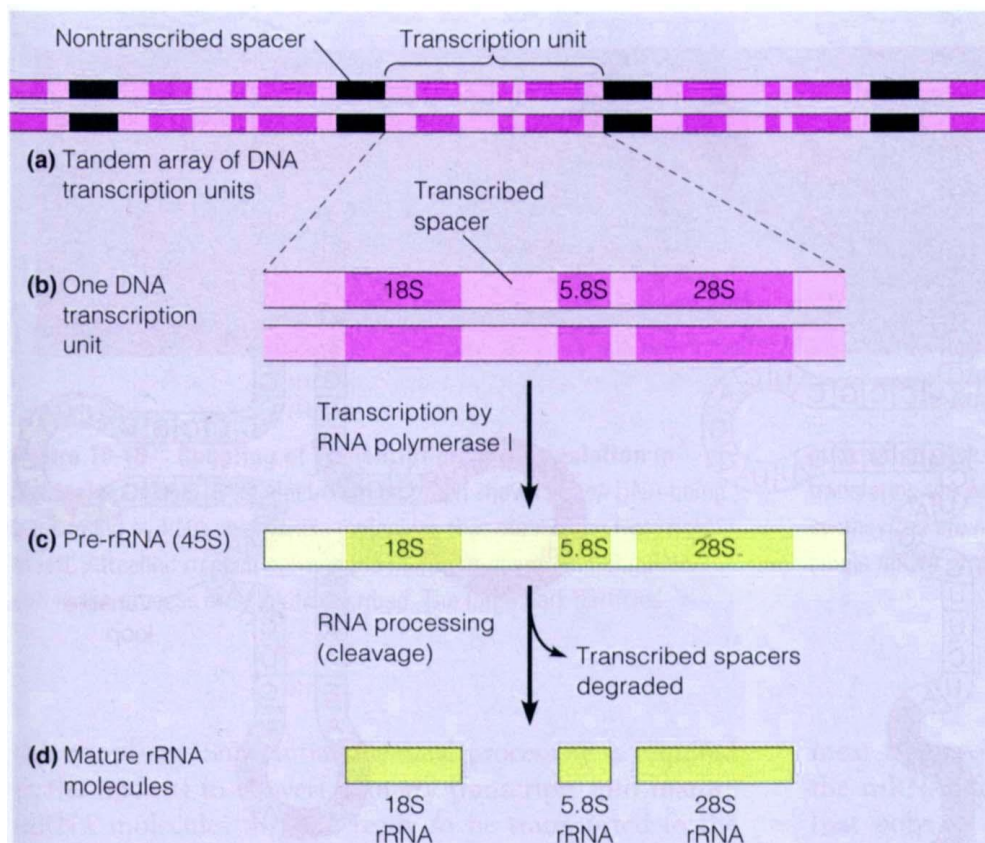
Fibrilarín bol po prvýkrát identifikovaný pomocou ľudského autoimúnneho séra získaného od pacientov so sklerodermou. Je to malý jadierkový ribonukleoproteín asociovaný s U3 malou jadierkovou RNA a s U8 a U13 snoRNA lokalizovanú v DFC a FC (Ochs et al., 1985) a je zapojený do včasného processingu rRNA. SnoRNA sú zapojené do processingu primárnych RNA transkriptov (Jansen et al., 1991).

Nukleolín (C23) je fosforylovaný proteín, ktorý je prítomný vo veľkom množstve v transkripčne aktívnych jadierkach (Lapeyere et al., 1987), kde je lokalizovaný v DFC a GC (Biggiogera et al., 2001). Zúčastňuje sa na rDNA transkripcii, kde je asociovaný s primárnymi rRNA transkriptami a podieľa sa na processingu pre-rRNA, kde zodpovedá za úpravu sekundárnej štruktúry rRNA, ktorá je dôležitá pri vytváraní pre-ribozomálnych podjednotiek (Ghisolfi et al., 1990) a reguluje intenzitu produkcie pre-ribozómov.

Nukleofozmín (B23) je zapojený do transportu ostatných proteínov jadierka, ako a je lokalizovaný prevažne v GC. Má RNA a DNA väzbové vlastnosti (Wang et al., 1994),

ribonukleázovú aktivitu (Herrera et al., 1995), viaže sa s snoRNP a podieľa sa na transporte preribozómov do cytoplazmy. Spolu s nukleolínom majú dôležitú úlohu pri formovaní a zostavení preribozomálnych častíc.

U3 snoRNA patrí medzi snoRNA s konzervatívnou štruktúrou a je potrebná pre vytvorenie 18S rRNA. U3 snoRNA sa viaže s pre-rRNA na dvoch miestach a vymedzuje tak vyštiepované úseky prekursora (Dumbar et al, 1989).



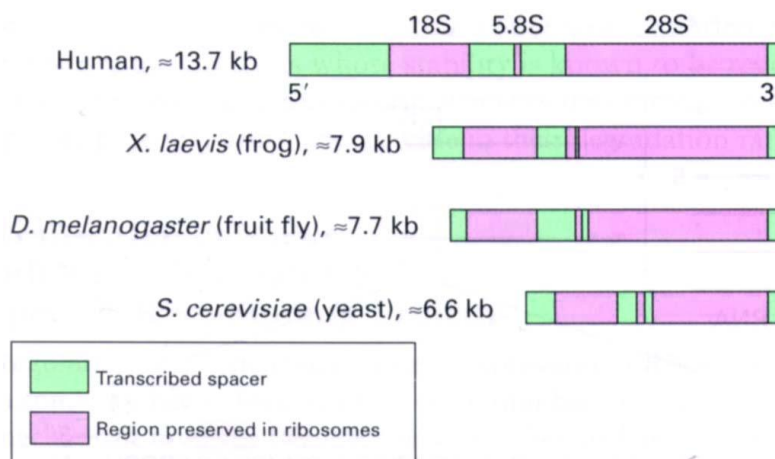
Obrázok č. 9. Processing pre-rRNA. (Dostupné na: <http://jpkc.scu.edu.cn/>, 2012)

Prvý krok processingu pre-rRNA (Obr. č. 9) predstavuje vyštiepenie intrónových oblastí, ako aj externých a interných transkribovaných spacerov špecifickými exo- a endonukleolytickými štiepeniami (Leary a Huang, 2001). Sekvencie pre 5,8S, 18S a 28S rRNA sa nametyľujú, ale intrónové úseky nie. Intróny sa oddelia hydrolýzou a uvoľnia sa príslušné rRNA (Hadjiolov et al., 1985). Paralelne s týmito procesmi prebiehajú aj modifikácie nukleotidov. Potom rRNA podlieha posttranskripčným úpravám, pri ktorých získava konečnú funkčnú sekundárnu a terciárnu konformáciu. Terciárna štruktúra vzniká poskladaním reťazca do unikátnej, nepravidelnej, ale stabilnej štruktúry. Týchto procesov sa zúčastňuje viac ako 100 proteínov a približne rovnaké množstvo snoRNA .

Štiepenia pre-rRNA v skorých fázach processingu neprebiehajú na rovnakých miestach s rovnakou postupnosťou, ale môžu sa obmieňať v závislosti od vyťaženia processingového systému (Leary a Huang, 2001).

### 1. 3. 5 Aktivácia transkripcie rDNA

Jadierko predstavuje miesto, kde sú syntetizované ribozomálne podjednotky a taktiež upravované pred exportom do cytoplazmy (Melese a Xue, 1995; Shaw a Jordan, 1995). Eukaryotická rRNA je zložená z majoritnej rRNA (18S-, 5,8S- a 28S-RNA) (Obr. č. 10) a 5S-rRNA. Gény majoritných rRNA (rDNA) sú u človeka lokalizované na krátkych ramenách piatich akrocentrických chromozómov (13, 14, 15, 21, 22), ktoré vytvárajú typické metafázové sekundárne konštrikcie. Tieto oblasti označujeme ako NOR (nucleolus organizing region - oblasť organizujúca jadierko, organizátor jadierka) (Roussel et al., 1996).



Obrázok č. 10. Ribozomálne transkripčné jednotky.

(Dostupné na: <http://jpkc.scu.edu.cn/>, 2012)

Mnohopočetné kópie 18S, 5,8S, 28S rRNA génov sa nachádzajú na niektorých chromozómoch v mieste NOR (King at al., 1988). Sú viditeľné v jadre v podobe malých guľôčok. Tesne pred rozpadom zárodočného vajíčku sa nachvíľu stratia a potom sú viditeľné ako NOR. Gény pre 18S, 5,8S a 28S rRNA sú vždy usporiadané v jednom opakovaní DNA veľkosti 44kb. Transkribovaných je však len 13 kb (transkripčná jednotka) a vzniká 47S pre-rRNA transkript. 5S-rRNA gény sa v genóme človeka nachádzajú asi v 90 kópiách blízko teloméry dlhého ramena chromozómu 1, ostatné sú na chromozóme 9 a 16. V každom NOR sa nachádza mnoho tandemovo usporiadaných kópií

génov majoritnej rRNA (rDNA). Každý genóm obsahuje 300-400 takýchto kópií (Kaplan et al., 1992).

rDNA sa z ultraštruktúrneho hľadiska nachádza na rozhraní FC a DFC, kde je intenzívne transkribovaná pomocou RNA polymerázy I. Okrem nej sa na syntéze pre rRNA podieľa množstvo iných proteínov a regulačných molekúl. Nevyhnutnou podmienkou pre zahájenie transkripcie rRNA génov je rozpletenie stočenej DNA, čo zabezpečuje topoizoméráza I (Wachtler a Stahl, 1993), ktorá je lokalizovaná v DFC a FC.

Aktivácia rDNA transkripcie vyžaduje vytvorenie transkripčného iniciačného komplexu, ktorý obsahuje RPI, hlavné RNA polymeráza I asociované faktory a aspoň dva transkripčné faktory, druhovo špecifický SL1 a UBF. Tento komplex sa viaže na rDNA a iniciuje transkripciu (Hyttel et al., 2005). Transkripcia rDNA je teda závislá na aktivite RPI, ktorá sa vyskytuje hlavne v FC ale nachádza sa aj v DFC (Raska et al., 1989). UBF sa viaže na promótor rDNA a indukuje tvorbu iniciačného komplexu RNA pol I transkripcie (Schnapp et al., 1994) tak, že ohne úsek DNA, čím môžu vzájomne pôsobiť dve podjednotky SLI (Maeda et al., 1992) a spolu s SL1 vytvára komplex, na ktorý sa môže naviazať RPI a iniciovať transkripciu (Jordan et al., 1996). UBF aj SL1 sú lokalizované v FC alebo DFC, ale väčšinou sa nachádzajú v oboch štruktúrach (Biggiogera et al., 2001).

### **1. 3. 6 Somatická nukleogenéza**

U somatických buniek prebieha nukleogenéza (vytvorenie jadierka) od prvého bunkového cyklu v každej interfáze. Začína sa koncom telofázy a vytvorí sa počas G1, S a G2 fázy. Na konci G2 fázy jadierko opúšťa rRNA processingovej mašínérie a začína sa distribuovať na povrch kondenzovaných chromozómov (Gautier et al., 1992). Pri vstupe do mitózy sa jadierko stráca. Počas profázy dochádza k rozpadu jadierka, resp. rozptýleniu jeho komponentov. U vyšších eukaryotov je vstup do mitózy spojený s inhibíciou transkripcie. Hlavné molekulárne zložky rDNA transkripčnej mašínérie, RPI, UBF, SL1 a TP1 ostávajú spojené s rDNA v oblasti NOR, v čase, keď sa interfázový chromátin kondenzuje na mitotické chromozómy (Scheer a Rose, 1984; Zatssepina et al., 2003). Naopak, komponenty rRNA processingovej mašínérie sú distribuované z NOR na povrch kondenzovaných chromozómov alebo sú rozptýlené v cytoplazme (Dundr et al., 1997). Po mitóze nasleduje interfáza s plne funkčným jadierkom, ktoré bolo opätovne vybudované

z jadierkových komponentov predošlého bunkového cyklu (Hernandez-Verdun, 2006). Obnova jadierka v skorých fázach G1 fázy sa môže definovať ako dvojkrokový proces. Prvým krokom je aktivácia transkripčnej mašínérie závislá na poklese aktivity CDK1 cyklín B kinázy. Druhý krok predstavuje reguláciu processingovej mašínérie do jadierka cez tvorbu PNB (prenucleolar bodies – prenukleolárne telieska). rDNA transkripcia je potlačená pri vstupe buniek do mitózy fosforyláciou komponentov transkripčnej mašínérie, ktorú riadi CDK1 cyklín B kináza (Sirri et al., 2000). Následnou inaktiváciou CDK1 cyklín B kinázy v telofáze je odblokovaná mitotická represia rDNA transkripcie. Reaktivácia rDNA transkripcie vyžaduje reaktiváciu pre-RNA processingovej mašínérie. V profáze proteíny zahrnuté v pre-RNA processingu opúšťajú jadierko a počas mitózy sú lokalizované na periférii chromozómov. Zatiaľ čo processingové komplexy opúšťajú jadierko, RPI je v profáze mitózy stále aktívna. Táto čiastočne procesovaná rRNA syntetizovaná počas profázy stabilne pretrváva počas mitózy a podieľa sa na opätovnom vytvorení jadierka (Dousset et al., 2000). V anafáze sú proteíny processingu homogénne distribuované okolo chromozómov. Počas telofázy a G fázy sa medzi perifériou chromozómov a miestami transkripcie koncentrujú proteíny processingovej mašínérie v miestach PNB (Hernandez-Verdun, 2006). Znovuvytvorenie jadierka začína na konci telofázy a začiatku G1 fázy a je spojené s tvorbou PNB, ktoré sa prvýkrát objavujú ako denzné fibrily a neskôr hlavne ako granulárne štruktúry (Verheggen et al., 2000). Tvorba PNB je hlavným javom, ktorý sa objavuje počas processingu jadierkových proteínov pri výstupe buniek z mitózy. Súbežne s tvorbou PNB dochádza aj k uvoľneniu jadierkových komponentov z dekondezujúceho sa chromatinu a ich presunu do PNB (Dousset et al., 2000). Na konci mitózy sa začínajú formovať jadierkové domény okolo aktívnych NOR a vzniká kompletne jadierko.

Eukaryotické jadro je opätovne vytvorené po každej mitóze a meióze. Obnovujú sa jeho funkcie aj jadrové štruktúry, chromozómy sa dekondezujú a chromatin vytvára diferencované oblasti. Jadrová mašínéria zodpovedná za transkripciu ribozomálnych génov je postupne importovaná do jadierka, kde je aktivovaná a dochádza k znovuvytvoreniu jadierkových prekurzorových teliesok (nucleolar precursor body - NPB). Výstavba jadierka v skorých postmitotických štádiách sa odohráva u všetkých proliferujúcich buniek. Vyžaduje si vzájomnú spoluprácu medzi transkripciou a processingom pre-rRNA. Tvorba aktívneho jadierka je dôležitá pre architektúru jadra, vytvorenie funkčných súčastí jadra, ako aj pre kontrolu proliferácie buniek (Scheer et al., 1993).

### 1. 3. 7 Embryonálna nukleogenéza

Jednou z organel, ktorá najlepšie odzrkadľuje morfológické zmeny v metabolizme a fyziológii bunky je jadierko. Systematické štúdium nukleogenézy embryí odhaľuje postupný prechod z inaktivovaného do plne aktivovaného štádia.

Nukleolárna formácia prebieha paralelne s majoritnou transkripčnou aktiváciou, čo nepriamo signalizuje aktiváciu a transkripciu rRNA génov (Camous et al., 1986; Tomanek et al., 1989; Kopecny et al., 1989).

Prechod z maternálnej na embryonálnu kontrolu vývoja je sprevádzaný sériou morfológických a fyziologických zmien a predstavuje fenomén, ktorý vrcholí majoritnou aktiváciou génovej expzie (Telford et al., 1990).

Zmeny v priebehu aktivácie embryonálneho genómu nie sú obmedzené na proteíny a RNA, ale ovplyvňujú aj bunkové organely. Znovurozdelenie mitochondrie a endoplazmatického retikula bolo dokumentované v niekoľkých organizmoch. Väčšia ultraštruktúrálna morfológická zmena nastane v nukleolárnych prekursoroch, z ktorých následne vzniká plne funkčné jadierko (Laurincik et al., 2008).

V bunkových cykloch majoritnej aktivácie embryonálneho genómu sa nachádzajú rôzne jadrové útvary, ale žiadny z nich neobsahuje štruktúrne komponenty funkčného jadierka (Hyttel et al., 2000; Laurincik et al., 2000; Laurincik et al., 2003).

Prvý ultraštruktúrne rozpoznateľný komponent jadierkového aparátu, ktorý sa objavuje v prvojadrách po oplodnení je jadierkové prekursorové teliesko NPB, ktorý sa javí ako elektrón-denzná kompaktná sféra, ale aj denzne zbalený fibrilárny materiál. Tieto štruktúry sú veľmi podobné u hovädzieho dobytká, ošípaných a človeka (Tesarik et al., 1987).

NPB predstavujú miesto pre vývoj funkčných jadriek v embryu, v procese, ktorý sa označuje ako nukleogenéza. Jadierko sa vyvíja z maternálneho a *de novo* syntetizovaného embryonálneho materiálu, pričom na základe toho, či prebiehajú tieto procesy vo vnútri NPB alebo na ich povrchu rozlišujeme dva modely nukleogenézy, interný a externý (Hyttel et al., 2000).

Interná nukleogenéza – bovinný typ je okrem hovädzieho dobytká typická pre kone, kozy, psy, líšky a človeka.

Externá nukleogenéza, je tzv. myšší alebo prasací typ. Nukleogenéza prebieha na povrchu NPB (Flechón a Kopečný, 1998). Diferenciácia funkčných jadierkových štruktúr na ultraštruktúrne úrovni prebieha na rozdiel od hovädzieho dobytká len na periférii NPB formovaním polmesiacovitých štruktúr vyvíjajúcich sa FC a DFC s GC na povrchu a NPB

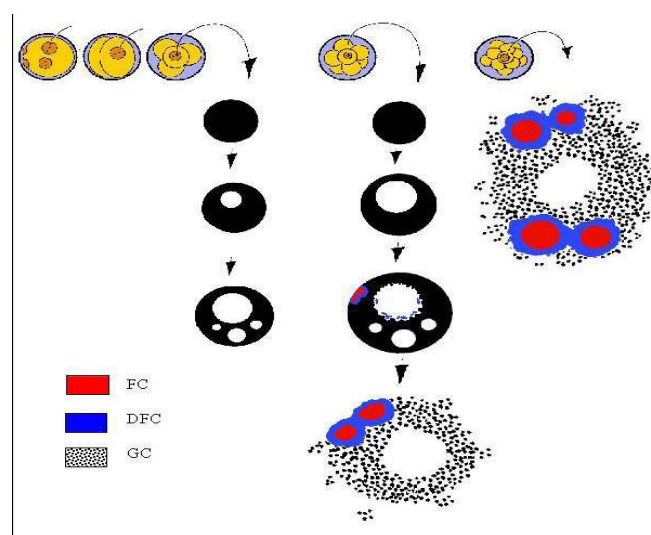
nepodliehajú vakuolizácii. V jednom jadre sa vyskytujú jadierka, ktoré sa nachádzajú v rôznych vývojových štádiách (Hyttel et al., 2000). Denzné jadro NPB je stále prítomné aj v aktívnom jadierku až do štádia moruly.

NPB sa pri aktivácii genómu embryí objavujú ako husto rozmiestnené guľovité orgány. V čase EGA, NPB začínajú strácať svoju kompaktnú formu a transformovať sa do zvláštnych komponentov funkčného jadierka, riadeného počiatkovou aktivitou transkripcie génov rRNA. Až do EGA sa homogénna hmota NPB transformuje na FC, DFC a GC. V bunkovom cykle po EGA sa plne funkčné jadierka nachádzajú vo všetkých blastomérach vyvíjajúceho embrya (Laurincik et al., 2008).

Aktivácia genómu embrya sa odohráva počas druhého (myš: Thompson, 1996), tretieho (ošípaná: Tomanek et al., 1989) alebo štvrtého (HD: Laurincik et al., 2000) embryonálneho bunkového cyklu.

U hovädzieho dobytku sa objavuje transkripcia už počas prvých dvoch bunkových cyklov (Hyttel et al., 1996) pred majoritnou aktiváciou embryonálneho genómu, ktorá začína počas štvrtého bunkového cyklu (Camous et al., 1986). Táto aktivácia rRNA génov počas prvých bunkových cyklov sa označuje tiež ako minoritná a nebýva spájaná s formáciou jadierka a tým pádom ani so syntézou ribozómov.

Nukleologenéza u embryí hovädzieho dobytku (Obr. č. 11) začína po majoritnej aktivácii rRNA, teda v priebehu štvrtého bunkového cyklu (Camous et al., 1986).



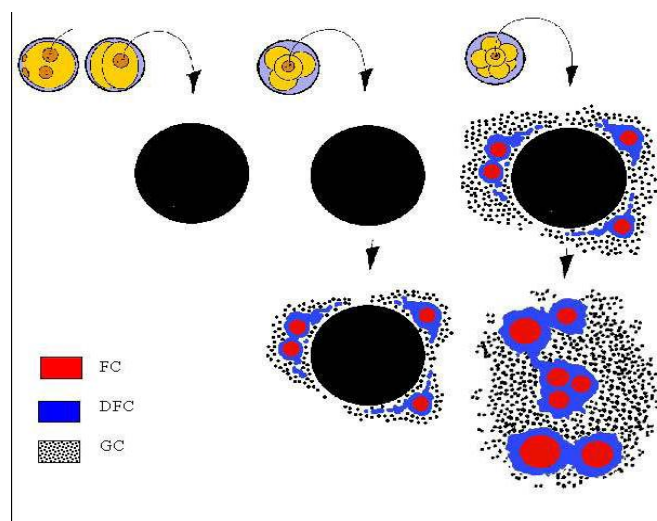
Obrázok č. 11. Embryonálna nukleologenéza u hovädieho dobytku (Hyttel et al., 2000).

V prvých troch bunkových cykloch sú najvýraznejšou vnútrojadrovou štruktúrou sférické NPBs a fibrilo-granulárne komplexy, ktoré obsahujú zhľuky elektrón-denzných granúl

spojených s fibrilárnym materiálom a kondenzovaným chromatínom (King et al., 1988; Kopecny et al., 1989). NPB a fibrilo-granulárne komplexy môžu byť navzájom priestorovo spojené (Laurincik et al., 2003). NPB postupne podliehajú vakuolizácii, kedy sa vyvíja centrálna primárna vakuola a následne sa tvoria periférne sekundárne vakuoly (Hyttel et al., 2000). Na začiatku štvrtého bunkového cyklu sa znovu objavujú NPB a v strede a na konci štvrtého bunkového cyklu sa na okrajoch NPB sa na periférii centrálnej primárnej vakuoly začínajú vytvárať FC, okolo ktorých je DFC a zároveň sa väčšina hmoty NPBs transformuje na GC. Tvorba FC a DFC signalizuje aktiváciu transkripcie ribozomálnych génov a tvorba GC je spojená s aktiváciou processingu pre-RNA. Na začiatku piateho bunkového cyklu sa formujú fibrilo-granulárne jadierka, z čoho vyplýva, že meioticky indukovaná inaktivácia rRNA génov je zastavená. V 16. blastomérovom embryu sa fibrilo-granulárne jadierka vyvíjajú do retikulárnej formy (Laurincik et al., 2003) a nukleoleogéza sa nelíši od somatického modelu.

U ošípaných sa objavuje majoritná aktivácia počas tretieho bunkového cyklu (Tomanek et al., 1989), ale doteraz nebolo pozorované, či podobne ako u hovädzieho dobytká tejto aktivácii predchádza minoritná aktivácia. Počas obdobia aktivácie embryonálneho genómu musí byť v presnom slede novo exprimovaných viac ako 10 000 génov, aby sa zabezpečil bezproblémový embryonálny aj fetálny vývoj (Niemann a Wrenzycki, 2000).

Fibrilo-granulárne jadierko v embryách ošípaných (Obr. č. 12) sa vyvíja počas tretieho bunkového cyklu (Tomanek et al., 1989), teda o jeden cyklus skôr ako u hovädzieho dobytká.



Obrázok č. 12. Embryonálna nukleoleogéza v embryách ošípanej (Hyttel et al., 2000).



Počas prvých dvoch bunkových cyklov je najdôležitejšou súčasťou objavenou v prvojadre a jadre NPB, ktorá je oveľa väčšia ako u embryí hovädzieho dobytku. Heterochromatínové oblasti slabo kondenzovaného chromatinu sú rozptýlené v celom jadre. V treťom bunkovom cykle sa NPB začínajú spájať s vláknami kondenzovaného chromatinu, ktorý je prepojený s ostatnými heterochromatínovými oblasťami. S postupom bunkového cyklu sa v jadre začína objavovať transkripčná aktivita. Na ultraštruktúrnej úrovni sú pozorovateľné rozdielne štádiá formovania jadierka, ktoré začínajú od NPB až po tvorbu funkčného fibrilogramulárneho jadierka (Hyttel et al., 2000). Počas štvrtého bunkového cyklu začínajú byť fibrilo-granulárne časti jadierka viac retikulárne. V piatom bunkovom cykle štruktúra vývoja jadriek naznačuje, že meioticky indukovaná inaktívacia rRNA génov je zastavená a opäť sa vyskytujú fibrilogramulárne jadierka spolu s inaktívnymi NPB. V nasledujúcich bunkových cykloch je proces nukleogenézy zhodný so somatickým modelom.

V prvom bunkovom cykle embryí ošípaných sa z nukleolárnych proteínov vyskytuje len nukleofozmín, ktorý je koncentrovaný vo veľkých okrúhlych telieskach. Počas druhého bunkového cyklu a na začiatku tretieho cyklu sa v jadre nenachádzajú žiadne jadierkové proteíny, čo poukazuje na to, že nukleofozmín v prvom bunkovom cykle by mohol byť maternálneho pôvodu. Na konci tretieho bunkového cyklu sa pri rDNA na povrchu NPBs objavujú malé ložiská RPI. Počas štvrtého bunkového cyklu sú RPI, TPI, UBF a fibrilarín lokalizované vo fibrilárnych komponentoch a nukleolín a nukleofozmín v granulárnom komponente vyvíjajúceho sa jadierka. Podobná situácia sa objavuje aj počas 5. bunkového cyklu (Hyttel et al., 2000).

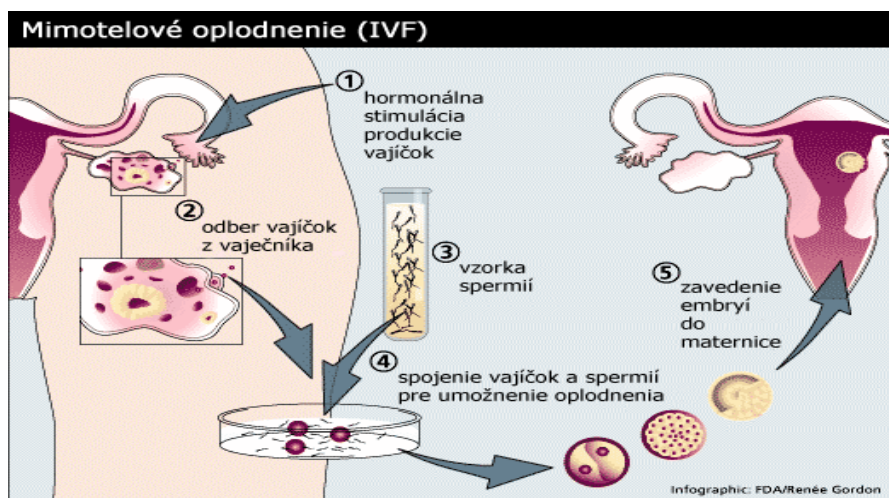
V embryách hovädzieho dobytku počas prvého bunkového cyklu sú TPI, RNA pol I, UBF, fibrilarín, nukleolín a nukleofozmín lokalizované v rôznych ohniskách rozptýlených v nukleoplazme. Počas druhého bunkového cyklu bola zistená predchádzajúca lokalizácia len u UBF a fibrilarínu, pričom u ostatných proteínov nebola zistená ich prítomnosť v jadre, čo svedčí o ich možnom maternálnom pôvode. Počas tretieho bunkového cyklu UBF a fibrilarín majú rovnaký typ značenia ako v predchádzajúcom cykle a nukleolín a nukleofozmín sa objavujú v ohniskách alebo sférických telieskach s výraznou vakuolou. Počas štvrtého bunkového cyklu sa fibrilarín lokalizuje v telieskach vytvárajúcich centrálnu vakuolu a značenie sa postupne stáva viacej komplexným. UBF je najskôr viditeľný vo forme malých ohnísk, ktoré neskôr vytvárajú zhľuky a ku koncu cyklu sa značenie UBF podobá značeniu pre fibrilarín. Nukleolín a nukleofozmín majú na začiatku podobné značenie ako UBF a neskôr sa ich značenie

zvýrazňuje a formuje do tvaru mušle obklopujúcej primárnu vakuolu. TPI sa prvýkrát objavuje až v strede štvrtého bunkového cyklu v podobe oddelených ohnísk, ktoré sa ku koncu cyklu spájajú do zhlukov. RNA pol I sa objavuje až na konci štvrtého bunkového cyklu a má tvar solitérnych ohnísk (Viuff et al., 1998; Viuff et al., 2000).

## 1. 4 Oplodnenie *in vitro*

Na oplodnení *in vitro* (*in vitro* fertilizácia – IVF) sa podieľa dozrievanie cytoplazmy oocytov, teda ooplazmy, kvalita spermíí a metodika umelého oplodnenia (Elder a Dale, 2000).

Pre oplodnenie *in vitro* (Obr. č. 13) sa používajú buď oocyty z antrálnych neovulačných folikulov, alebo oocyty z preovulačných folikulov. Oocyt získaný z antrálneho neovulačného folikulu sa kultivuje v podmienkach *in vitro*, pričom sa rozpadne jadrová membrána, čo sa nazýva jadrové zrenie, ktoré prebieha až do metafázy II, kedy sa zastaví a pokračuje až po vniknutí spermie do oocytu. Okrem jadrového zrenia poznáme aj cytoplazmatické zrenie, teda kvalitatívne dozrievanie cytoplazmy, ktoré sa prejavuje po penetrácii spermie do oocytu. Spermie sú získavané v čase odberu vajíčok. Oplodnenie prebieha v špeciálnych kultivačných médiách. Spermia sa dostáva do vajíčka, vznikajú prvojadrá a chromozómy sa štiepia na chromatídy. Výsledkom je jedna samčia a jedna samičia chromatída, ktoré sa spoja a vzniká embryo (Laurincik et al., 2008).



Obrázok č. 13. Postup in vitro fertilizácie. (Dostupné na: <http://www.fertility.sk/>, 2012)

Medzi v súčasnosti používané metódy umelého oplodnenia patrí: IVF s kapacitovanými spermiami, subzonálna injeckcia spermíí do perivitelinného priestoru (SUZI) a intracytoplazmatická injeckcia spermie do ooplazmy oocytu (ICSI).

Pri kapacitácii spermíí *in vitro* sa napodobňuje proces kapacitácie *in vivo*, čo spočíva v odmytí semennej plazmy a v aktivácii akrozómovej reakcie. Potrebný čas na spolukultiváciu s oocytmi je asi 17 hodín. Potom sú spermie odmyté a zhruba 10 % vajíčok

je fixovaných a farbených na stanovenie percenta penetrácie, resp. polyspermie (Gordon, 2004).

Metóda ICSI (intercytoplasmatic sperm injection) predstavuje priame vloženie spermie do cytoplazmy vajíčka (Obr. č. 14) (Griffiths et al., 2000).



Obrázok č. 14. Oplodnenie vajíčka metódou ICSI.

(Dostupné na: <http://www.ivf.at/>, 2012)

Metóda IVF s kapacitovanými spermiami a metóda ICSI sú v podstate rovnaké. Líšia sa iba v technike, ktorou sa vajíčko oplodňuje. IVF s kapacitovanými spermiami je založená na spontánnom oplodnení, pričom spermie sa umiestnia spoločne s vajíčkami. Pri ICSI embryológ vloží spermium priamo do oocytu (Elder a Dale, 2000).

Metóda SUZI (subzonal insertion of sperm) (Obr. č. 15) je predchodcom ICSI, ale nie je taká úspešná, pretože sa tu veľmi často vyskytuje polyspermia. Touto technikou sa zavádza niekoľko spermíí do periviteliného priestoru, pričom jedna z nich oplodní oocyt (Mann, 1988).



Obrázok č. 15. Oplodnenie vajíčka metódou SUZI.

(Dostupné na: <http://www.sciencephoto.com/>, 2012)

Ďalší vývoj embryí po *in vitro* oplodnení sa uskutočňuje buď v medzihostiteľovi s následným prenosom do hostiteľa alebo sa embryá kultivujú *in vitro* až do štádia vhodného na prenos do finálneho hostiteľa (Gordon, 2004).

Po oplodnení by mali byť za normálnych okolností prítomné dve prvojadrá. Mnoho krát sa stáva, hlavne pri *in vitro* oplodnení ošipáných, že dochádza k polyspermii, teda do oocyту naraz prejde dve a viac spermii a oocyt je oplodnený viacerými spermiami naraz, teda vo vnútri oocytu sa vyvíja tri a viac prvojadier, čo je nezlúčiteľné so životaschopnosťou embrya a takáto zygota zastavuje svoj vývoj. Pri *in vitro* oplodnení sa stretávame aj s mnohými inými anomáliami (Hunter, 1996).

Oplodnenie *in vitro* má význam a využitie vo viacerých oblastiach. Umožňuje zachovanie ohrozených druhov, hospodárske využitie geneticky cenných zvierat, používa sa na experimentálne účely a pri asistovanej reprodukcií (Laurincik et al., 2008).

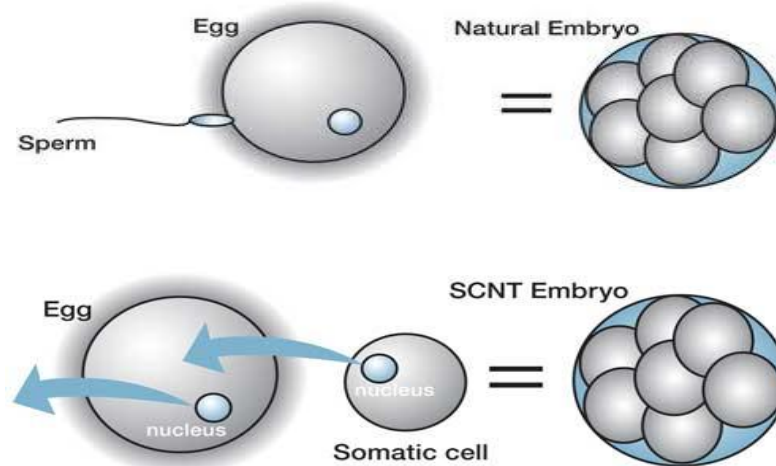
Tabuľka č. 1. Porovnanie podmienok *in vivo* a *in vitro*. (Laurincik et al., 2008).

<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Konštantná teplota	Výkyvy teplôt pri prenose oocytov (embryí) do nových médií
Úplná tma	Pri manipulácii sú oocyty (embryá) vystavené dennému svetlu resp. svetlu z mikroskopu
Koncentrácia O <sub>2</sub> a CO <sub>2</sub> sú pod tkanivovou kontrolou	Koncentrácia O <sub>2</sub> a CO <sub>2</sub> v inkubátore mierne kolíše
Objem tekutiny okolo oocytu resp. embrya je presne daný	Objem tekutiny okolo oocytu v týchto podmienkach je väčší
Neustála výmena substrátov a metabolitov medzi embyom a tkanivom	Výmena substrátov, ktoré sa pridávajú do média vo zvýšenej koncentrácii, je prerušovaná

## 1. 5 Nukleárny transfer

Klonovanie, nukleárny transfer, je technika na vytvorenie geneticky identických organizmov. Ide v podstate o nepohlavné rozmnožovanie, pri ktorom vzniká nový jedinec oddelením časti materského organizmu alebo zo skupiny buniek. Vo všetkých prípadoch ide o bunky somatické. U stavovcov sa tento spôsob rozmnožovania vyskytuje zriedkavo. Typickým príkladom je vznik jednovaječných – monozygotických dvojčiat, tzv. polyembryónia, kedy dochádza k rozdeleniu embrya na dva identické jedince – klony (Petrovičová, 2010). Klon je dokonalá kópia žijúceho organizmu so zhodnou DNA. Klon nemusí byť identický s donorom genetického materiálu z viacerých dôvodov. Jedným z dôvodov je, že DNA je lokalizovaná nielen v jadre bunky, ale aj v mitochondriách a tým sa prenáša prostredníctvom oocyty. Ďalším dôvodom je, že DNA dospeljej bunky sa môže odlišovať od zárodočnej DNA, a to poškodením napr. mutáciou. Jednovaječné dvojčičky sú identické iba po genetickej stránke, ale ich fenotypový prejav môže byť vplyvom prostredia rozdielny (Laurincik et al., 2008). Klonovanie možno rozdeliť na prirodzené (jednovaječné dvojčatá, pásavec), spontánne (obojživelníky) a riadené.

Somatický nukleárny transfer (Somatic Cell Nuclear Transfer- SCNT) predstavuje prenos jadra somatickej bunky do oocyty. Z oocyty sa odstráni genetický materiál, čím získame vajíčko bez jadra. Jadro vyberieme aj zo somatickej bunky a prenosieme ho do oocyty, ktorý potom vložíme do maternice alebo sa použije na získavanie kmeňových buniek (Obr. č. 16).



Obrázok č. 16 . Vznik embrya *in vivo* a vznik SCNT embrya.

(Dostupné na: <http://www.genea.com.au/>, 2011)

SCNT je teda biotechnologická metóda, ktorej princíp je založený na odstránení genetickej informácie z oocytu a jej nahradení jadrom zo somatickej bunky (Petrovičová, 2010). Predstavuje metódu vhodná na testovanie genetického potenciálu diferencovaných dospelých buniek. Kľúčový komponent v procese klonovania predstavuje oocyt. Princíp je založený na odstránení jadrovej DNA (chromatínu) z dozretého oocytu v štádiu metafázy II a nahradení jadrom z diferencovanej somatickej bunky. Keďže somatická bunka je diferencovaná, jadro, ktoré je nositeľom genetickej informácie musí byť reprogramované, teda vrátené na začiatok vývinu ekvivalentného so zygotou (Kaňka, 1999).

### 1. 5. 1 História klonovania

Klonovanie bolo prvýkrát popísané v roku 1928 Hansom Spemannom (Obr. č. 17), ktorý sa zaoberal totipotenciou buniek a je nositeľom Nobelovej ceny. Opísal experiment o transfere jadier diferencovaných štádií embryí obojživelníkov do cytoplazmy enukleovaných oocytov. Predpokladal, že v raných štádiách embryí, v ktorých sú jadrá totipotentné, bude po prenose vývoj rekapitulovaný a v čase, keď budú jadrá diferencované sa vývoj zastaví. Spemannove experimenty sa však do jeho smrti nedokončili (Tagarelli et al., 2004).



Obrázok č. 17. Hans Spemann. (Dostupné na: <http://www.nobelprize.org/>, 2011)

Briggs a King v roku 1952 ukázali, že normálne vyliahnuté žubrienky je možné získať po prenose jadra z bunky blastuly do enukleovaného vajíčka obojživelníkov *Rana pipiens*. Klonovaním embryonálnych buniek vzniklo normálne potomstvo, ale vývoj sa stal viac obmedzeným, keď boli použité viac diferencované bunky (Briggs a King, 1952).

Gurdon v roku 1962 skúmal reprogramovanie a remodelovanie jadier somatických buniek po transfere do oocytu žiab *Xenopus laevis*. Bol to prvý experiment u živočíchov,

ktorý dokázal, že jadro diferencovanej somatickej bunky je totipotentné, čiže schopné vytvoriť základ pre vývoj všetkých typov buniek organizmu.

U cicavcov sa úspešné klonovanie podarilo až oveľa neskôr, hlavne kvôli malej veľkosti vajíčka cicavcov (Campbell, 2002). Klonovanie cicavcov bolo možné, keď zariadeniami dostupnými koncom 60-tych a začiatkom 70-tych rokov bola umožnená mikromanipulácia s malými cicavčiami vajíčkami, ktoré tvoria len jednu desatinu priemeru vajíčka obožiteľníkov (McGrath a Solter, 1983).

V roku 1981 Karl Illmenses prvý krát uskutočnil úspešný nukleárny transfer cicavcov, ktorý bol zrealizovaný u myši. Tieto experimenty sa nepodarilo zopakovať a na základe toho niektorí vedci usúdili, že reprogramovanie jadier cicavcov je biologicky neuskutočniteľný proces. Následne bolo preukázané, že vývoj k blastocyste môže byť dosiahnutý, len keby jadro zygoty alebo 2-bunkového embrya bolo prenesené do enukleovanej zygoty (McGrath a Solter, 1983) a keď boli použité bunkové jadrá darcu z neskorších vývojových štádií, nebol dosiahnutý žiadny vývoj (McGrath a Solter, 1984). McGrath a Solter v roku 1984 usúdili, že klonovanie cicavcov jednoduchým nukleárnym transferom bolo biologicky nemožné, hlavne pri prudkej strate totipotencie embryonálnych buniek. Tento úsudok hlboko ovplyvnil výskum v tomto odbore.

Steen Willadsen v roku 1984 klonoval prvú ovcu a v roku 1986 úspešne klonoval kravu, z jadra, ktoré bolo získané z týždeň starého embrya, čím dokázal, že v procese diferenciácie nedochádza k redukcii genetického materiálu v bunke (Campbell, 2007). Predviedol používanie blastomér z deliaceho štádia cicavčích embryí (ovce) pre prenos do enukleovaných oocytov. Toto tvorilo základ pre úspešné embryonálne klonovanie u králikov (Stice a Robl, 1988), prasiat (Prather et al., 1989), myši (Cheong et al., 1993), kráv (Sims a First, 1994) a opíc (Meng et al., 1997).

Ian Wilmut a Keith Campbell v roku 1996 klonovali 2 jahňatá, Megan a Morag, z embryonálnych buniek kultivovaných v *in vitro* podmienkach niekoľko týždňov. Tieto bunky boli zablokované v pokojovom stave v sére hladovania pred ich fúziou s enukleovanými ovčiami oocytmi (Campbell et al., 1996; Wilmut et al., 1997).



V roku 1997 bol naklonovaný prvý cicavec zo somatickej bunky – ovca Dolly (Obr. č. 18). Somatické bunky odobraté z prsnej žľazy 6-ročnej ovce (plemeno Finn Dorest), boli vložené do oocyту a po pestovaní vo výživnom médiu boli prenesené do náhradnej matky. Dolly spustila celosvetovú prudkú etickú debatu.



Obrázok č. 18. Ovca Dolly. (Dostupné na: <http://zivot.lesk.cas.sk/>, 2012)

Viac ako 10 rokov neskôr sa táto technológia stala platnou a akceptovanou ako dôležitý prostriedok pre výskum (Wadman, 2007). Spočiatku bol vedecký pokrok pomalý, ale rýchlosť vývoja v posledných rokoch stúpala a technológia začína byť používaná pri dôležitých poľnohospodárskych druhoch vrátane hovädzieho dobytku, ošípaných (Obr. č. 19) a koní. Ovčia ooplazma riadi počiatkové zostavovanie jadierka u embryí klonovaných z buniek oviec, hovädzieho dobytku a ošípaných (Hamilton et al., 2004).



Obrázok č. 19. Klony prasiatok. (Dostupné na: <http://www.aktuality.sk/>, 2012)

Somatický nukleárny transfer bol úspešný pri 16 druhoch zahrňujúcich ovce (Wilmut et al., 1997), hovädzí dobytok (Kato et al., 1998), myši (Wakayama et al., 1998), kozy (Baguisi et al., 1999), ošípané (Polejaeva et al., 2000; Onishi et al., 2000), mačky (Shin et al., 2002), králiky (Chesne et al., 2002), mulice (Woods et al., 2003), kone (Galli

et al., 2003), potkany (Zhou et al., 2003), psy (Lee et al., 2005), fretky (Li et al., 2006), jelene (Berg et al., 2007), byvoly (Shi et al., 2007), sivé vlky (Oh et al., 2008) a ťavy (Wani et al., 2010).

Celosvetový výskum sa usiloval odhaliť základné mechanizmy pre úspešný somatický nukleárny transfer. Spočiatku existovala len jedna hypotéza pre obmedzený somatický nukleárny transfer, podľa ktorej klony vznikajú len zo subpopulácie dospelých kmeňových buniek (Hochedlinger a Jaenisch, 2002). Avšak presvedčivé dôkazy v súčasnosti ukázali, že diferencované somatické bunky môžu byť úspešne použité v SCNT. Najdramatickejšie epigenetické reprogramovanie sa odohráva pri SCNT, keď expresia diferencovaných buniek je odstránená a je zavedená embryu-špecifická expresia, ktorá riadi embryonálny a plodový vývoj (Niemann et al., 2008). Toto epigenetické reprogramovanie zahŕňa vymazanie programu génovej expície jednotlivých buniek darcu a znovunastolenie dobre zorganizovanej sekvencie expície približne 10 000 – 12 000 génov, ktoré regulujú embryonálny a fetálny vývoj (Kues et al., 2008). Somatický nukleárny transfer je veľmi sľubný pre základ biologického výskumu a pre rôzne poľnohospodárske a biomedicínske aplikácie.

Tabuľka č. 2. Prehľad klonovaných živočíchov (Meisner a Jaenisch, 2006).

<b>Prehľad viacerých druhov klonovaných živočíchov</b>			
<b>Rok</b>	<b>Druh</b>	<b>Vek donora</b>	<b>Zdroj</b>
1996	ovca	embryo	Campell et al., 1996
1997	ovca	fetal	Wilmut et al., 1997
	ovca (Dolly)	dospelý	
1997	opica	embryo	Meng et al., 1997
1998	HD	fetal	Cibelli et al., 1998
	HD	dospelý	Kato et al., 1998
	myš	dospelý	Wakayama et al., 1998
1999	myš	embryo	Wakayama et al., 1999
	koza	fetal	Baguisi et al., 1999
2000	prasa	dospelý	Polejaeva et al., 2000
	tur	dospelý	Lanza et al., 2000
2001	muflón	dospelý	Loi et al., 2001
2002	mačka	dospelý	Shin et al., 2002
	králik	dospelý	Chesne et al., 2002
	ryba	embryo	Lee et al., 2002
2003	potkan	fetal	Zhou et al., 2003
	mul	fetal	Woods et al., 2003
	kôň	dospelý	Galli et al., 2003
2005	pes	dospelý	Lee et al., 2005
2006	fretka	dospelý	Li et al., 2006

### 1. 5. 2 Techniky SCNT

Existujú 4 metódy, ktoré sa používajú na klonovanie. Prvou je bi- a trisekcia embryí, ktorá predstavuje najjednoduchšiu techniku klonovania. Pod pojmom bisekcia sa rozumie rozdelenie embrya v štádiu moruly alebo blastocysty pomocou mikromanipulátora (Obr. č. 20) na dve polovice, ktoré sa preniesú do recipientky, resp. náhradnej matky. Výsledkom je vznik geneticky identických jedincov - klonov, ktorých genetická výbava pochádza od obidvoch rodičov. Týmto spôsobom boli vyprodukované klonované jedince myší, králikov, oviec a hovädzieho dobytku (Chrenek, 2002).



Obrázok č. 20. Mikromanipulátor. (Dostupné na: <http://www.babyonline.cz/>, 2012)

Druhá metóda je nukleotransfér embryonálnych buniek do oocyty. Ide o prenos jadra včasných embryí, resp. blastomér do enukleovaného oocyty, ktorý bol mechanicky zbavený genetického materiálu.

Tretou metódou je nukleotransfér somatickej bunky, ktorý predstavuje prenos jadra somatickej bunky do enukleovaného oocyty (Chrenek, 2002).

Štvrtou metódou je technika HMC (handmade cloning), pri ktorej sa nepoužíva mikromanipulátor (Vajta et al., 2003). Táto technika spočíva v odstránení *zona pellucida*, čím sa zjednoduší manipulácia s oocytom. Oocyt sa manuálne rozdelí na dve polovice pomocou špeciálnej čepele, následne sa spoja fytohemaglutinínom (PHA) a prebieha fúzia s bunkou donora. Nakoniec sa musí uskutočniť aktivácia fúzovaného jadra. Táto metóda môže značne zvýšiť produkciu blastocýst, je jednoduchšia a náklady na prístrojové vybavenie sú nižšie v porovnaní s technikou využívajúcou mikromanipulátor (Galli et al., 2003). Výhodou techniky HMC je jej jednoduchosť a nevýhodou je strata väčšej časti

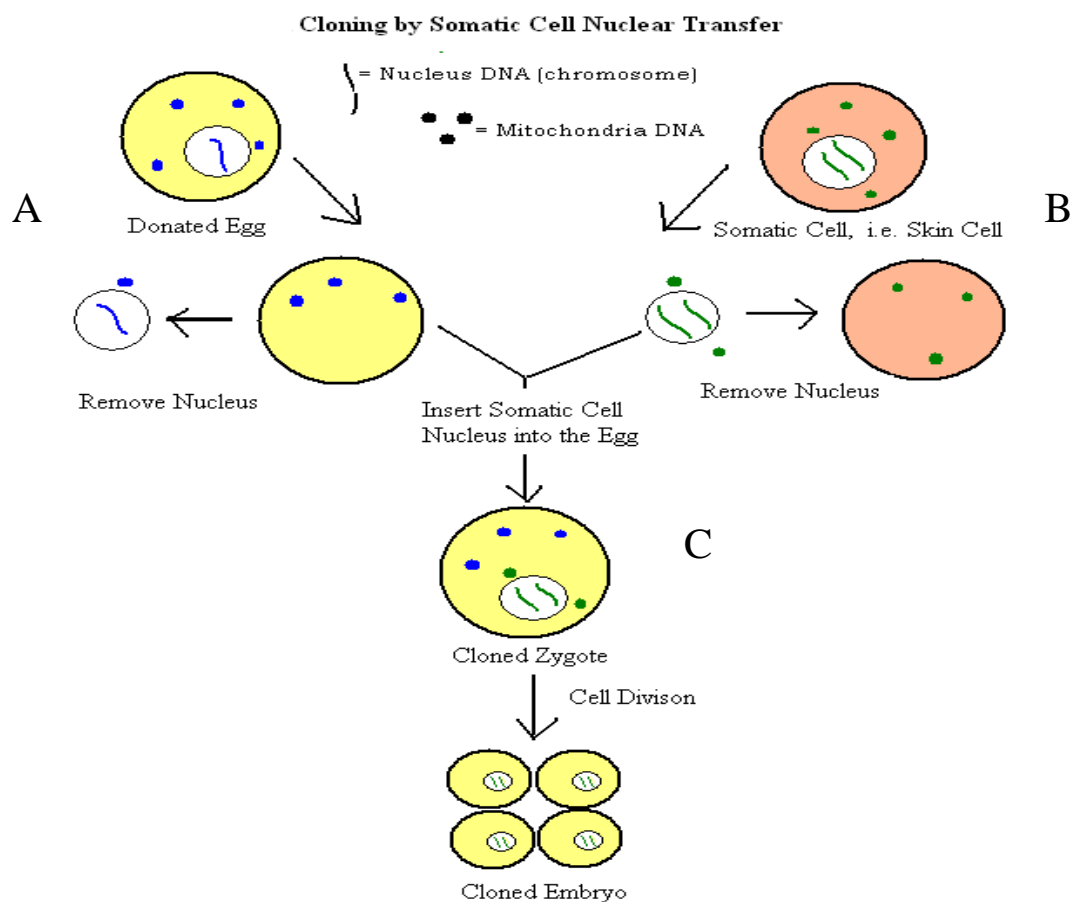
cytoplazmy z oocyty, čo môže spôsobiť redukciiu množstva proteínov potrebných pre reprogramovanie embrya a jeho počiatočný vývin.

### 1. 5. 3 Technické aspekty somatického nukleárneho transferu

Prvým krokom celého procesu je zhromaždenie a enukleácia oocytov recipienta. U mnohých domestikovaných druhov môžu byť oocyty ľahko získané z vaječníkov. Alternatívne oocyty môžu byť zhromažďované zo živých zvierat ultrazvukom sprevádzaným laparoskopiou (Oropeza et al., 2007). Tieto nezrelé oocyty sú zvyčajne v štádiu zárodočného vaku a potrebujú dozrieť v *in vitro* podmienkach a predstavujú prakticky neobmedzené zdroje materiálu pre experimenty klonovania. Trvanie *in vitro* dozrievania oocytov recipienta ovplyvňuje vývoj blastocysty klonovaných embryí ošípaných (Holker et al., 2005). U hovädzieho dobytku a ošípaných *in vitro* dozrievanie (*in vitro* maturation - IVM) postúpilo do takej miery, že môže byť použité v somatickom klonovaní bez veľkých strát na efektívite a sú porovnateľné z ich *in vivo* zrelými dvojníkmi. Počas periódy *in vitro* dozrievania oocyty podstúpia komplexnú sériu štrukturálnych a biochemických zmien kulminujúcich v štádiu metafázy II meiózy, v ktorom získali potenciál byť úspešne oplodnené a podstúpiť embryonálny a fetálny vývoj. Presvedčivé dôkazy signalizujú, že oocyty v štádiu metafázy II skôr než v akejkoľvek inej vývojovej fáze sú najvhodnejším recipientom pre produkciu životaschopných klonovaných cicavčích embryí (Miyoshi et al., 2003). *In vitro* aj *in vivo* vývoj klonovaných embryí hovädzieho dobytku sa môže zlepšiť nukleoplazmínom alebo kyselinou polyglutámovou (Betthausen et al., 2006). Výrazne vyššia úspešnosť klonovania dobytku bola dosiahnutá autológym SCNT, v ktorom somatické jadro darykyne bolo prenesené do jej vlastného enukleovaného oocyty, ktorý bol obnovený ultrazvukom (Yang et al., 2006). Táto vyššia úspešnosť bola vysvetlená nižšími epigenetickými abnormalitami v porovnaní s alogénnym SCNT. Bolo teda preukázané, že zygoty dobytku a myši môžu byť použité ako recipient buniek pre produkciu životaschopného klonovaného potomstva (Schurmann et al., 2006; Egli et al., 2007).

Oocyty sú enukleované nasávaním ich chromozómov s mikrokapilármi alebo sú vytláčané malé časti cytoplazmy oocytov, kde sú chromozómy zvyčajne lokalizované.

Enukleácia oocytu (Obr. č. 21A) je proces, pri ktorom sa neodstraňuje celé jadro, ale iba metafázová platnička a pólové teliesko, pričom sa využíva viacero techník vizualizácie ako je farbenie chromatinu fluorescenčnými farbivami a expozícia pod UV lampou. Nevýhodou je, že tieto dva procesy môžu spôsobiť nenávratné poškodenie oocytu. Ďalším spôsobom je aspirácia časti jadra v blízkosti vylúčeného pólového telieska. Nevýhodou tejto metódy je schopnosť pólového telieska migrovať v perivitellinnom priestore, takže pri aspirácii nemusí dôjsť k odstráneniu chromatinu. Ďalším problémom je odstránenie väčšej časti cytoplazmy oocytu, v dôsledku čoho sa môže zredukovať jej kapacita nevyhnutná pre epigenetické reprogramovanie prenášaného jadra a tým aj následný vývoj rekonštruovaného embrya (Campbell et al., 2007). Napriek tomu však táto metóda patrí medzi najčastejšie používané spôsoby enukleácie.

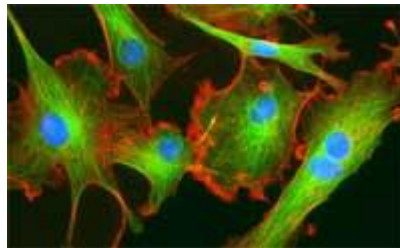


Obrázok č. 21. SCNT – A – enukleácia oocytu, B – odstránenie jadra zo somatickej bunky, C – vloženie jadra somatickej bunky do oocytu a vznik SCNT embrya.

(Dostupné na: <http://www.marymeetsdolly.com/>, 2012).

Ďalším krokom je selekcia, príprava a subzonálny prenos donorových buniek (Obr. č. 21B), kedy celá neporušená bunka donora, teda jadro aj cytoplazma, izolovaná z bunkovej kultúry ošetrenej trypsínom je pomocou vhodnej mikropipety vložená pod *zonu pellucidu* v tesnom kontakte s cytoplazmatickou membránou oocyty.

Pre produkciu klonovaných zvierat bolo použité veľké množstvo diferencovaných typov somatických buniek, vrátane prsných epiteliálnych buniek, kumulárnych buniek, buniek vajcovodu, leukocytov, hepatocytov, granulóznych buniek, epiteliálnych buniek, myocytov, nervových buniek, lymfocytov, imunologicky relevantných buniek, Sertoliho buniek, zárodočných buniek a najčastejšie fibroblastov (Obrázok č. 22) (Brem a Kuhholzer, 2002; Hochedlinger a Jaenisch, 2002; Miyoshi et al., 2003; Eggan et al., 2004; Oback a Wells, 2007).



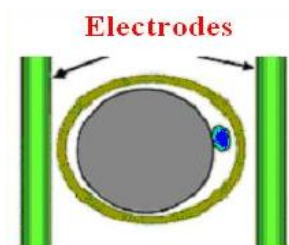
Obrázok č. 22. Fibroblasty. (Dostupné na: <http://www.cosmetic.pl/>, 2012)

Nie je jasné, ktorý typ buniek je najlepší pre nukleárny transfer do oocytov, pretože neboli nájdené žiadne rozdiely v úspešnosti pri použití rôznych typov somatických buniek, či už dospelých, novorodeneckých, fetálnych, prípadne pohlavne odlišných donorov (Kato et al., 2000). Avšak niektoré diferencované vysoko špecializované bunky ako sú kardiomyocyty nemôžu byť reprogramované s vysokou účinnosťou pomocou súčasných klonovacích metód, hoci génová expresia u týchto buniek bola inhibovaná okamžite po fúzii a aktivácii (Schwarzer et al., 2006). Aj keď prvé skúsenosti naznačovali, že klonovanie s dospelými somatickými bunkami bolo úspešné jedine keď bunky boli zo samičieho reprodukčného traktu, vrátane prsného epitelu, kumulárnych, granulóznych alebo vajcovodových buniek, samce myši boli nakoniec klonované z buniek distálnej časti chvosta (Wakayama a Yanagimachi, 1999) a následne podobné vývojové stupne boli pozorované u embryí klonovaných buď zo samčieho alebo samičieho jadra u hovädzieho dobytku a myši (Kato et al., 2000; Wakayama a Yanagimachi, 2001). Bunky zo skorých štádií sú najčastejšie vybrané pre somatické klonovanie (Kubota et al., 2000). Bunky plodu, špecializované fibroblasty sú najčastejšie používané v experimentoch somatického klonovania u väčšiny poľnohospodárskych druhov, pretože majú menšie genetické poškodenia a vyššiu

proliferačnú kapacitu ako dospelé somatické bunky (Kues et al., 2008). Úspech klonovania myši z diferencovaných buniek ako sú B- a T-lymfocyty alebo neuróny jednoznačne preukázali, že úplne diferencované jadro môže byť vrátené do geneticky totipotentnej fázy (Hochedlinger a Jaenisch, 2002; Eggan et al., 2004). Avšak je stále nejasné, či úroveň diferenciácie bunky donora je kľúčová pre úspešné somatické klonovanie. Porovnávacie údaje sú k dispozícii pre myši. Pri testovaní buniek myši v rôznych fázach diferenciácie bolo zistené, že účinnosť klonovania sa skutočne zvýšila s diferenciáciou, čo v konečnom dôsledku zvýšilo celkový počet živonarodených jedincov (Sung et al., 2006). Klonovanie myši je založené skôr na produkcii embryonálnych kmeňových buniek z klonovanej blastocysty ako na produkcii živého potomstva. Menej diferencované bunky boli viac účinné pri klonovaní myši ako diferencované bunky pri meraní produkcie kmeňových buniek z klonovaných blastocýst (Hochedlinger a Jaenisch, 2007). Účinnosť klonovania, definovaná ako potenciál na získanie pluripotentných embryonálnych kmeňových buniek z klonovanej blastocysty, bola nižšia ako 10% s diferencovanými bunkami donora, vrátane lymfocytov a neurónov (Hochedlinger a Jaenisch, 2002). Podobne bunky svalov hovädzieho dobytku s odlišnou diferenciáciou mikrotubulov, prekursorových buniek a svalových fibroblastov v konečnom dôsledku neposkytli odlišné úrovne úspechu v *in vitro* vývoji k blastocyste alebo vo vývoji *in vivo* po prenose klonovaných embryí do náhradnej matky (Green et al., 2007). V experimentoch s myšami mohlo byť jadro z rôznych nádorových buniek, vrátane leukémie, lymfómu a karcinómu prsníka reprogramované nukleárnym transferom a prinieslo zrejme normálne blastocysty, avšak embryonálne kmeňové bunky nemôžu byť získané z týchto blastocýst. Embryonálne kmeňové bunky môžu byť získané z blastocysty klonovanej z buniek melanómu a tieto embryonálne kmeňové bunky boli schopné diferenciácie na rôzne typy buniek. Chiméry získané z týchto embryonálnych kmeňových buniek preukázali vysoký výskyt nádorových formácií, čo naznačuje, že nádorový potenciál darcovských buniek nebol úplne vymazaný procesom reprogramovania (Hochedlinger et al., 2004). Či bunky donora potrebujú byť nútené k pokojovému stavu buď sérom hladovania alebo pomocou inhibítorov bunkového cyklu je stále vecou diskusie. V mnohých experimentoch sú bunky donora indukované na ukončenie bunkového cyklu sérom hladovania, ktoré udržiava bunky v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fáze bunkového cyklu (Campbell et al., 1996). Špecifické inhibítory cyklín závislej kinázy ako roscovitin zvyšujú účinnosť procesu klonovania, ale konečné dôkazy vo formovaní zdravého potomstva chýbajú (Miyoshi et al., 2003). Napriek tomu nezosynchronizované somatické bunky donora môžu byť úspešne použité na klonovanie potomstva u myši

a dobytka (Cibelle et al., 1998; Wakayama et al., 1999). Štádium bunkového cyklu donora má vplyv na morfológiu chromatinu a jadra transplantovaných králičích embryí (Collas et al., 1992). Pokusy na zlepšenie somatického klonovania boli vykonané zmenením epigenetického stavu buniek donora ošetrením chemikáliami, ktoré ovplyvňujú jeho DNA metyláciu a histónovú acetyláciu. Úpravou donorových buniek hovädzieho dobytka trichostatínom A a inhibítorom DNA metylácie sa zlepšil *in vitro* vývoj k blastocyste, ale *in vivo* vývoj testovaný nebol (Wee et al., 2007). Účinnosť klonovania bola výrazne zlepšená u vysoko inbrídnych kmeňov miniatúrnych ošípaných po úprave donorových fibroblastov pomocou špecifického inhibítora histón deacetylázy. Avšak toto zlepšenie môže byť špecifické pre toto inbrídne miniatúrne prasacie plemeno, ktoré by inak nemohlo byť úspešne klonované (Zhao et al., 2009). Zostáva odhaliť, či úprava buniek donora buď DNA metyláciou alebo inhibítorom histón deacetylázy nakoniec zvyšuje výnosy normálne žijúceho klonovaného potomstva. Súčasné dôkazy naznačujú, že hlavne zdroje donorových buniek majú najväčší vplyv na úspešnosť klonovania. Po prenose embryí klonovaných zo 6 rôznych darcovských zvierat môžu byť získané životaschopné teľatá len z 2 darcov (Powell et al., 2004). Je ešte potrebné vyvinúť spoľahlivé metódy pre výber alebo modifikáciu buniek donora na zvýšenie účinnosti somatického nukleárneho transferu.

Ďalší krok predstavuje fúzia enukleovaného oocytu a donorovej bunky (Obr. č. 21C). Tieto dva komponenty typicky splývajú pomocou krátkych pulzov s vysokým napätím cez kontaktný bod medzi dvoma bunkami. Tento pulz otvorí póry v membráne a menšia donorová bunka je začlenená do cytoplazmy oocytu recipienta (Obr. č. 23.). U myši môže byť namiesto elektrofúzie použitý piezoelektrický mikroinjekčný nástroj. Membrána donorovej bunky je narušená a separovaná od jadra nasatím do sklenenej mikropipety a jadro je potom injektované do cytoplazmy oocytu (Wakayama et al., 1998). Splynutý oocyt obsahujúci bunku alebo jadro donora sa nazýva rekonštruovaný komplex.



Obrázok č. 23. Elektrická stimulácia enukleovaného oocytu s DNA donora.  
(Dostupné na: <http://www.cogforlife.org/>, 2012)



Nasledujúcim krokom je aktivácia rekonštruovaného komplexu. Pri prirodzenom oplodnení prenikanie spermie aktivuje vajíčko, čím sa vajíčko stáva pripraveným na udržanie embryonálneho a fetálneho vývoja. Aktivácia je komplexný štrukturálny a biochemický proces, ktorý zahŕňa zmenu pH a presun vezikulárnych granúl na okraj oocyty, aby sa zabránilo polyspermii. Aktivácia komplexov nukleárneho transferu sa pokúša napodobniť tieto procesy a je dosiahnutá buď krátkymi elektrickými impulzmi alebo pri krátkom pôsobení chemických látok ako je ionomycín alebo dimetylaminopurín (DMAP). Obidve metódy spúšťajú prívod vápnika a začatie bunkového cyklu. Výsledkom aktivácie je začatie vývinu rekonštruovaného embrya (Obr. č. 24.), ktorý bol zastavený u oocyty v štádiu metafázy II.



Obrázok č. 24. Vývoj embrya od 1-bunkového po blastocystové štádium.

(Dostupné na: <http://www.cogforlife.org/>, 2012)

Úspešná produkcia klonovaných embryí pomocou SCNT závisí na interakcii donorského jadra s recipientným cytoplasmom a aktivácii cytoplasmu. Existuje množstvo umelých ošetrení napodobňujúcich aktiváciu, ku ktorej dochádza v procese oplodnenia vajíčka spermiami napr. elektrická stimulácia (elektroporácia) alebo chemická stimulácia (ionomycínom, stronciom, kalciovou ionoforézou), ktoré vedú k dokončeniu meiotického zrenia (Petrovičová, 2010). U cicavcov je aktivácia vajíčka pri oplodnení indukovaná sériou opakovaných zmien v koncentrácii intracelulárneho  $Ca^{2+}$  počas uvoľnenia z endoplazmatického retikula (Miyazaki et al., 1993). Tieto oscilácie  $Ca^{2+}$  sú nevyhnutné pre vývoj embrya a začínajú niekoľko minút po fúzii gamét, pričom sa objavujú v rôznej frekvencii a pretrvávajú až do vzniku prvojadier (t.j. asi 4-6 hodín po oplodnení (Tóth et al., 2006). Chronologický sled udalostí počas nukleárneho transferu je nevyhnutný pre nasledujúci úspešný vývin klonovaného embrya. Existujú tri spôsoby aktivácie z hľadiska načasovania tohto procesu. Prvým je preaktivácia, teda aktivácia prebieha pred vlastnou fúziou jadra a cytoplasmom. Druhým spôsobom je bezprostredná aktivácia, ktorá prebieha buď v čase fúzie alebo tesne po fúzii. Posledným spôsobom je oneskorená aktivácia, ktorá prebieha v presne určenom šase po fúzii. V prípade jadier embryonálnych buniek je najoptimálnejší čas aktivácie pred alebo počas fúzie (Akagi et al., 2003), zatiaľ čo u jadier

somatických buniek sa ukazuje ako najvhodnejšia možnosť aktivácie niekoľko hodín po transfere, čiže oneskorená aktivácia v závislosti od použitého kinázového inhibítora (Onishi et al., 2000). V podmienkach oneskorenej aktivácie prebieha remodelácia a vývoj jadra prenesených prasacích oocytov (Yin et al., 2006). Najčastejším spôsobom aktivácie je kombinácia ionomycínu alebo kalciovej ionofórey s 6-dimetylaminopurínom (6DMAP) alebo cykloheximidom (CHX). Ionomycín prednostne mobilizuje intracelulárne zásoby  $Ca^{2+}$ , pričom vyvoláva iba jednoduché uvoľnenie  $Ca^{2+}$  skôr než dôjde k prirodzenému opakovanému uvoľneniu. Vápnik inaktivuje CSF supresorovú aktivitu MPF (maturation promoting factor) faktora a následnou aplikáciou látok ako 6-DAMP (inhibítora serínovej proteázy) alebo CHX (inhibítora syntézy proteínov), potláča alebo zabraňuje reformácii aktivity maturačného faktora MPF. Ošetrovanie 6-DAMP môže zabrániť extrúzii chromozómov (Galli et al., 2003). Často sa používa tiež cytochalazín, ktorý potláča usporiadanie mikrofilamentov tým, že pokryje jeden z jeho koncov. Ďalším činiteľom môže byť nokodazol, ktorý vplýva na stavbu mikrofilamentov. Pri aktivácii oocytov použitím stroncia za prítomnosti cytochalazínu majú zygoty dve alebo tri pseudo-prvojadrá. Avšak pri aplikácii nokodazolu je v rekonštruovaných zygotách viacero prvojadier. Miera schopnosti vývinu je rovnaká pri oboch typoch cytokinetických inhibítorov, z čoho vyplýva, že nemajú škodlivý efekt na ďalší vývin rekonštruovaných embryí (Wakayama, 2007).

Ďalším krokom je dočasná *in vitro* kultivácia rekonštruovaného embrya. Klonované embryá môžu byť kultivované *in vitro* do štádia blastocysty (5-7 dní) na posúdenie začiatkovej vývojovej schopnosti pred prenosom do náhradnej matky. Kultúrové systémy pre myšie embryá a embryá prežúvavcov sú celkom pokročilé a umožňujú bežnú produkciu 30-40% blastocýst z *in vitro* oplodnených oocytov izolovaných z bitúnkových vaječníkov (Niemann et al., 2002). Kultivačným médiám chýbajú dve obvyklé zložky, EDTA a glutamín, zlepšujúce *in vitro* vývoj klonovaných myších embryí (Dai et al., 2009). Doplnenie kultivačného média s antioxidantom vitamínom E počas *in vitro* dozrievania oocytov a buniek donora zlepšilo formovanie blastocýst a zmenšilo sa poškodenie DNA embryí hovädzieho dobytku (Wongsrikeao et al., 2007). Úspešné pokusy boli tiež vykonané na zvýšenie vývojového potenciálu klonovaných embryí zmenením ich epigenetického stavu. Doplnenie kultivačného média s inhibítormi diacetylázy, trichostatínom (TSA), na zvýšenie histónovej acetylácie malo tiež nejaký úspech. Doplnenie kultivačného média s 50nM TSA zlepšilo *in vitro* a *in vivo* vývoj prasacích embryí, kým ďalšie TSA dávky nezlepšili vývoj (Zhao et al., 2010). TSA ošetrovanie zvýšilo

acetyláciu len na špecifických histónových miestach u prasacích embryí klonovaných z fibroblastov a zlepšenie vývoja bolo špecifické pre typ donorovej bunky. S fibroblastom pochádzajúcim z prasacích embryí sa ukazuje lepší vývoj ako z embryí klonovaných z buniek kostnej drene (Martinez-Diay et al., 2010). Doplnenie média s inhibítorom histón deacetylázy kyseliny valproovej zlepšilo vývoj klonovaných embryí miniatúrnych prasiat a zachovalo ich schopnosť k vyjadreniu OCT4 génu, ktorý je kritickým transkripčným faktorom kontrolujúcim indukciu a udržanie pluripotencie (Miyoshi et al., 2010). Tieto výsledky ukazujú, že exogénna modifikácia epigenetického stavu kultivovaných klonovaných embryí možno zlepšuje vývoj pre určité typy donorových buniek.

Posledný krok predstavuje prenos do náhradnej matky alebo skladovanie v tekutom dusíku (-196). Klonované myšie embryá sú zvyčajne chirurgicky prenášané do vajcovodov alebo maternice náhradnej matky. Podobne u prasiat sú aktivačné komplexy nukleárneho transferu okamžite prenesené do vaječníka recipientného zvierat'a. Úspech klonovania ošipaných bol významne zlepšený selekciou mladých recipientov a poskytnutím 24 hodinovej asynchronie medzi preovulačnými vajcovodmi recipientov a rekonštruovanými embryami. Pravdepodobne toto dalo embryám viac času na dosiahnutie potrebnej úrovne jadrového reprogramovania a viedlo k tehotenstvu približne na 80% a len mierne zníženej veľkosti pri vrhu (Petersen et al., 2008). Embryá hovädzieho dobytku v štádiu moruly alebo blastocysty môžu byť prenesené nechirurgicky do rohov maternice synchronizovaných recipientiek prostredníctvom zavedených postupov prenosu embrya alebo môžu byť zmrazené kryoprezerváciou (kryokonzerváciou) pôvodne vyvinutej pre *in vitro* produkované embryá. Somatické bunky môžu byť ľahko uchovávané zmrazené v tekutom dusíku (-196°C) a po rozmrazení môžu byť použité ako donor buniek v SCNT na získanie živého potomstva. Živé myši boli dokonca klonované z buniek zmrazených na -80 alebo -20°C pre predĺženie časového intervalu bez kryoprotektantu (Li a Mombaerts, 2008; Wakayama et al., 2008).

#### 1. 5. 4 Praktické využitie a význam tvorby klonovaných jedincov

V súčasnosti sa tvorba klonovaných jedincov zameriava na viaceré oblasti vedy a výskumu.

Reprodukčné klonovanie (Obr. č. 26) sa využíva na záchranu ohrozených druhov a zachovanie genetických zdrojov (Chrenek, 2008). Klonovanie je dôležité v živočíšnej výrobe a pri zachovaní biodiverzity a populácie ohrozených druhov živočíchov. Jeho cieľom je klonovať hospodársky významné zvieratá s vysokou plemennou a úžitkovou hodnotou (Petrovičová, 2010). Reprodukčné klonovanie predstavuje možnosť liečenia mužskej neplodnosti. Bolo klonované ľudské 4-bunkové embryo (Zavos a Illmense, 2006).

Medzi oblasti využitia SCNT ďalej patrí tvorba transgénnych zvierat, resp. geneticky modifikovaných jedincov. Na zvýšenie úspešnosti tvorby geneticky modifikovaných jedincov sa vo väčšine experimentov využíva kombinácia viacerých biotechnologických metód napr. *in vitro* dozrievanie oocytov, transgénéza, klonovanie a metóda tvorby chimér. Synchronizovaním týchto metód je možné vytvoriť chimerického klonovaného transgénneho jedinca (Obr. č. 25), ktorý tvorí základ pre založenie novej geneticky upravenej línie (Chrenek, 2008).

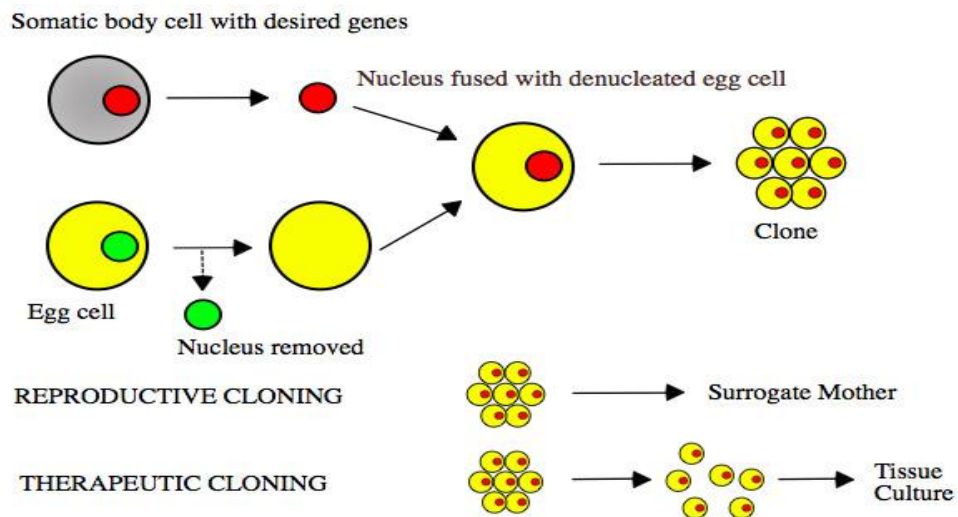


Obrázok č. 25. Klonovaný chimerický králik.

(Dostupné na: <http://www.agroporadenstvo.sk/>, 2012)

SCNT je vhodný na produkciu transgénnych hospodárskych zvierat a nahradil DNA mikroinjekciu cudzej DNA do prvojadra pre tento účel. Zlepšená transgénéza má osobitný význam v oblasti reprodukčného klonovania vďaka množstvu významných výhod oproti predtým používaným technológiám mikroinjekcie (Kues a Niemann, 2004; Niemann a Kues, 2007). Veľkou výhodou tejto metódy je, že somatické bunky darcu môžu byť prenesené s rôznymi génovými konštrukciami a tieto bunky s najvhodnejšou expresiou vzoru môžu byť vybrané *in vitro* ako donor buniek. Dokonca ciele genetické modifikácie, také ako napríklad génový knock-out homologickej rekombinácie, sú zlučiteľné s primárnymi bunkovými kultúrami. Transgénna expresia vzoru poskytuje oveľa viac kontrol ako bolo možné s mikroinjekciou (Kues a Niemann, 2004).

Terapeutické klonovanie (Obr. č. 26) slúži na získavanie kmeňových buniek, resp. na produkciu klonovaných buniek, ktoré môžu nahradiť poškodené tkanivá alebo orgány, teda využívajú sa pri liečbe rôznych chorôb. Jej cieľom je vyliečenie ochorení bunkami vyprodukovanými vlastným telom (Petrovičová, 2010). Terapeutické klonovanie sa zatiaľ úspešne otestovalo len na myšiach, ale vedci sú presvedčení, že ho bude možné použiť aj pri liečení ľudí (Chrenek, 2008).



Obrázok č. 26. Reprodukčné a terapeutické klonovanie.

(Dostupné na: <http://scienceprogress.org/>, 2012)

Kmeňové bunky sú nediferencované pluripotentné somatické bunky, z ktorých v prípade potreby môže vzniknúť hocijaká bunka. Sú roztrúsené po celom tele a majú schopnosť migrácie (Laurinčík, 2008). Majú obrovský potenciál, pretože teoreticky by mohli byť využité na liečenie mnohých chorôb ako je Alzheimerova alebo Parkinsonova choroba, cukrovka, rakovina, leukémia, neurodegeneratívne ochorenia, invazívne úrazy a ďalšie. Kmeňové bunky nemajú znaky buniek žiadneho konkrétneho orgánu. Dokážu delením obnovovať samé seba a meniť sa na bunky rôznych tkanív. Pri liečbe pacienta jeho vlastnými kmeňovými bunkami nehrozí, že by ich telo odmietlo tak, ako sa to môže stať pri transplantácii cudzích orgánov (Chrenek, 2008). Embryonálne kmeňové bunky boli vytvorené aj nukleárnym transferom ľudského somatického jadra do králičích oocytov (Chen et al., 2003). Z dospelých somatických buniek boli klonovaní ohrození vlci (Kim et al., 2007). Zo somatických kmeňových buniek plodu boli vyprodukované životaschopné ošípané (Hornen et al., 2007).

Ďalšou oblasťou možného využitia SCNT sú xenotransplantácie, ktoré predstavujú transplantáciu cudzieho orgánu medzi rôznymi živočíšnymi druhmi. Množstvo pacientov

zomiera pre nedostatok orgánov (srdce, pečeň, obličky a iné), ktoré sú vhodné na transplantáciu. Možné riešenie je vo využití orgánov ošípanej, pretože má veľmi podobné usporiadanie vnútorných orgánov ako človek. Ošípaná samozrejme musí byť geneticky upravená z hľadiska imunity a prítomnosti patogénov (Chrenek, 2008). Medzidruhová transplantácia a nukleárny transfér umožňujú zachovanie ohrozených druhov cicavcov (Amstislavskij, 2006). Ohrozené mačkovité šelmy boli klonované pomocou heterošpecifických oocytov donora a medzidruhového embryotransferu (Gomez et al., 2009).

Klonovanie má význam a využitie aj v oblasti poľnohospodárstva. V poľnohospodárstve sa klonovanie využíva na produkciu jedincov s genetickým vybavením najlepšieho jedinca. Produkcia klonovaných jedincov prenosom somatickej bunky eliminuje jedného z rodičov, čím by sa výrazne zvýšila ekonomika chovu. Na druhej strane je riziko, že pri nekontrolovanom párení môže dôjsť k vysokému stupňu príbuznosti, čo môže spôsobiť výskyt porúch, degenerácií a defektov.

Klonované jedince sa používajú aj na experimentálne účely, kde sa geneticky identické jedince využívajú v rôznych experimentoch na sledovanie vplyvu prostredia (Chrenek, 2008).

Vynikajúce oblasti aplikácie SCNT zahŕňajú produkciu rekombinantných farmaceuticky významných proteínov v prsnej žľaze transgénnych hospodárskych zvierat (pharming) a generáciu transgénnych prasiat pre xenotransplantačný výskum. Gén „pharming“ predstavuje produkciu rekombinantných farmaceuticky aktívnych ľudských proteínov u transgénnych zvierat. Táto technológia prekonáva obmedzenia konvenčných mikrobiálnych výrobných systémov alebo výrobných systémov založených na bunkovej kultúre s rekombinantnou DNA a postúpila do štádia komerčnej aplikácie. Prsná žľaza je prednostným miestom produkcie hlavne preto, že množstvo proteínov, ktoré môžu byť produkované v tomto orgáne pomocou špecifických promotórových častí prsnej žľazy. Produkty prsnej žľazy transgénnych kôz a oviec boli podrobené rôznym klinickým štúdiám a boli schválené regulačnými orgánmi (Kind a Schnieke, 2008). Antitrombín III (ATIII) produkovaný v prsnej žľaze transgénnych kôz bol schválený pre liečbu pacientov rezistentných na heparín podstupujúcich srdcovopľúcne procedúry. Enzým  $\alpha$ -glukozidáza (Pharming BV) z mlieka transgénnych králikov bol úspešne používaný na liečbu chorôb. Očakáva sa, že aj rekombinantný C1 inhibítor (Pharming BV) produkovaný v mlieku transgénnych králikov bude v blízkej budúcnosti schválený pre používanie v humánnej

medicíne. Odhaduje sa, že viac ako 12 rekombinantných proteínov je aktuálne v odlišných fázach klinického testovania (Kind a Schnieke, 2008).

Na uzavretie rastúceho rozdielu medzi dopytom a dostupnosťou vhodných orgánov, transplantáční chirurgovia teraz zvažujú používanie xenoimplantátov z domestikovaných prasíat. Prekonávanie imunologickej prekážky pre nesúhlasného darcu druhov ako je prasa, vyžaduje prevenciu hyperakútneho odmietnutia (HAR) a akútneho cievneho odmietnutia (AVR) (Petersen et al., 2009; Oropeza et al., 2009).

### **1. 5. 5 Miera úspešnosti somatického klonovania a otázka normálnosti klonovaného potomstva**

Úspešnosť somatického nukleárneho transferu cicavcov je nízka a pohybuje sa v rozmedzí 1-3% transferovaných embryí. O väčšine druhov nie je veľa informácií a čo bolo zverejnené je z veľkej časti založené na prvých priekopníckych pokusoch. Pre hovädzí dobytok a ošípané boli zostavené väčšie dátové súbory a jasne ukazujú, že účinnosť klonovania sa neustále zlepšuje s väčšími technickými zručnosťami a rastúcimi znalosťami základných mechanizmov. Klonovanie hovädzieho dobytku teraz dosahuje úspešnosť 20-25% živo narodeného potomstva (Panarace et al., 2007; Kues et al., 2008). Úspech klonovania ošípaných je 80%, hoci veľkosť vrhu je mierne znížená v porovnaní s konvečnými komerčnými počtami chovu (6 prasíatok vs. 9-10 prasíatok). Zisk živo narodených na prenesených embryách je 3-5% (Petersen et al., 2008). Prežívajúce embryá môžu vykazovať rôzne ultraštrukturálne abnormality ako sekundárne lyzozómy a vakuoly, menej mitochondrií, polyribosómov, pevných uzlov a filamentových štruktúr v porovnaní s ich *in vitro* vyprodukovanými kolegami (Alexopoulos et al., 2008). Na základe toho možno usúdiť, že prirodzená úmrtnosť embryí je 35-50% u prasíat a hovädzieho dobytku.

Tabuľka č. 3. Efektivita tvorby klonovaných jedincov prenosom jadra somatickej bunky.  
(Dostupné na: <http://www.agroporadenstvo.sk/zv/ostatne/klonovanie.htm>, 2012)

<b>Druh</b>	<b>Úspešnosť tvorby klonovaných embryí (%)</b>	<b>Úspešnosť narodených klonovaných jedincov (%)</b>	<b>Životaschopnosť klonovaných jedincov (%)</b>	<b>Efektivita klonovania (%)</b>
králik	64	10	66	0,3
ošípaná	9,5	20	80	0,5
koza	27	20	85	5,2
ovca	25	20	36	3,0
HD	29	29	64	1,5

Pre- a postnatálny vývoj môže byť ohrozený a rôzny podiel potomstva u hovädzieho dobytku, oviec a myši ukázali aberantné (nenormálne) vývojové modely a vzrástla perinatálna úmrtnosť. Tieto abnormality zahŕňujú širokú škálu symptómov, vrátane predĺženého obdobia gravidity, nadmernej veľkosti potomstva, aberantnej placenty, kardiovaskulárnych problémov, respiračných porúch, imunologických nedostatkov, problémov so šľachami, obezity, porúch obličiek a pečene a vyššej citlivosti na novorodenecké choroby. Tieto sú zhrnuté pod spoločným názvom rozsiahly syndróm potomstva (Large Offspring Syndrome – LOS) a prevažne boli nájdené u prežúvavcov (ovce, dobytok) a u myši (Renard et al., 1999; Tamashiro et al., 2000; Ogonuki et al., 2002; Perry a Wakayama, 2002; Rhind et al., 2003; Panarace et al., 2007). Výskyt týchto porúch je náhodný a nebol spojený s aberantnou expresiou žiadnych samostatných génov alebo špecifickou patofyziológiou. S ďalším triedením podľa výsledku takého tehotenstva bol neskôr navrhnutý nový termín abnormálny syndróm potomstva (Abnormal Offspring Syndrome - AOS) pre lepšie vyjadrenie širokého spektra tohto patologického fenoménu (Farin et al., 2006). Hlavný predpoklad je, že základnou príčinou tejto patológie je nedostatočné alebo chybné reprogramovanie prenášaného jadra somatickej bunky, ktoré primárne ovplyvňuje rast a funkcie placenty (Bauersahs et al., 2009). Mnohé časti génomu dôležité pre metabolizmus a imunitnú funkciu sú podstatne zmenené v tehotenstve u klonov hovädzieho dobytku v porovnaní s komerčne chovanými zvieratami (Mansouri-Attia et al., 2009).

Napriek týmto patologickým zmenám, prehľad zverejnenej literatúry o klonovaní poukazuje na to, že najviac klonovaných zvierat je zdravých a vyvíjajú sa normálne (Cibelli et al., 2002). Toto je v súlade s pozorovaním, že vývoj cicavcov je pomerne tolerantný na menšie epigenetické odchýlky v génome. Nepatrné abnormality v génovej



expresii sa nezďajú byť v rozpore z prežitím klonovaných zvierat (Humphreys et al., 2001). Je jasné, že akonáhle klonované potomstvo prežilo neonatálnu periódu a dosiahlo 6 mesiacov veku (dobytok, ovce), nie je odlišné s ohľadom na mnohé biochemické parametre krvi a moču (Chavatte-Palmer et al., 2002), imunitného stavu, telesného stavu (Lanza et al., 2001), reprodukčných parametrov (Enright et al., 2002) a zisk a zloženie mlieka (Pace et al., 2002). Neboli nájdené žiadne rozdiely v mäse a v zložení mlieka klonov hovädzieho dobytky v porovnaní s ich rovnako starými jedincami, všetky parametre boli v normálnom rozmedzí (Tian et al., 2005; Yang et al., 2007). Podobné výsledky boli zaznamenané aj v prípade klonovaných ošípaných (Archer et al., 2003). Podľa odborných komisií to nie je dostatočný vedecký dôkaz pri riešení otázky bezpečnosti jedla pochádzajúceho z klonovaných zvierat (Rudenko et al., 2007; Fox, 2008). Očakáva sa, že produkty z klonovaných zvierat a ich potomstva vstúpia na trh v najbližších rokoch odrážajúc regionálne politické predpisy. Vzhľadom k obmedzeným skúsenostiam so somatickým klonovaním, ktoré bolo vo všeobecnosti používané len od roku 1997 a relatívne dlhých generačných intervaloch u domácich zvierat, špecifické efekty klonovania na dlhovekosti a starnutí ešte neboli plne hodnotené. Predbežné údaje nenaznačujú patologické zmeny v druhej a ďalších generáciách klonovaných myší a dobytky (Wakayama et al., 2000; Kubota et al., 2004).

## **2 CIELE PRÁCE**

Cieľom tejto práce je zozbierať a poskytnúť čo najviac informácií týkajúcich sa somatického nukleárneho transferu, ďalej skúmanie vývoja klonovaných intergenerických embryí, preskúmanie schopností a vlastností ooplazmy v procese reprogramovania somatického jadra, posúdenie vplyvu ooplazmy na štruktúru jadierka, štruktúrna analýza jadierka pomocou TEM, vizualizácia a lokalizácia jadierkových proteínov, posúdenie vplyvov cytoplazmy oocyty na nukleogenézu.

## 3 MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 Získavanie oocytov a *in vitro* maturácia

Kumulo-oocytárne komplexy (cumulus-oocyte complexes - COCs) hovädzieho dobytku boli izolované rozrezaním (slicing) vaječníkov z porazeného dobytku rôzneho pôvodu. Vybrané COCs boli maturované *in vitro* v tkanivovom kultivačnom médiu TCM 199, ktorý obsahoval  $\alpha$ -glutamín, 25mM HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA) doplnený o 22  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pyruvát, 2,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{NaHCO}_3$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicín, 10 IU/mL eCG a 5 IU/mL hCG (Suigonan, Intervet, Tönisvorst, Germany). Maturačné médium bolo doplnené o 0,1%-ný hovädzí sérový albumín bez mastných kyselín (BSA) (frakcia V, A9647, Sigma). Oocyty boli *in vitro* maturované v 100  $\mu\text{l}$  kvapôčkach maturačného média (15-20 oocytov na kvapôčku) pod hladinou silikónového oleja 19 hodín pri 39°C a 5%  $\text{CO}_2$  vo vlhkom prostredí. Po maturácii, kumulárne bunky boli kompletne odstránené vortexovaním s 0,1% hyaluronidázou vo fosfátovom pufrí. Oocyty s jasne viditeľnými extrudovanými polárnymi telieskami (MII oocyty) boli vybrané pre ďalšie experimenty (Eckert a Niemann, 1995).

Ováriá (vaječníky) z predpubertálnych prasničiek boli získané z miestnych bitúnkov. Oocyty s aspoň tromi kompletnými vrstvami kumulárnych buniek boli zozbierané a maturované *in vitro* po dobu 40 hodín (Holker et al., 2005). Následne boli dozreté oocyty prenesené do TL-HEPES s obsahom 0,1% hyaluronidázy a inkubované 5 min. Kumulárne bunky boli odstránené opakovaným pipetovaním. Obnažené oocyty boli prenesené do kvapiek TL-HEPES pokryté minerálnym olejom (silikónová kvapalina DC200, Serva, Biochemica, Heidelberg).

### 3.2 SCNT a partenogenetická aktivácia

Prevažne dospelé samičie fibroblastypoužívané pre SCNT u oboch druhov boli získané zo vzoriek kože uší získaných z bitúnkov. Tkanivo bolo rozrezané a rozptýlené v 0,1% trypsíne. Explantáty boli udržiavané v DMEM-F12 a trypsinizované. Zozbierané bunky boli zriedené na koncentráciu jedného milióna buniek/mL a potom buď zmrazené v 10% DMSO alebo vrátené do kultúry. Fibroblasty boli uvedené do obdobia pokoja (G0)

sérom hladovania počas 3 dní (0,5% fetálneho tel'acieho séra-FCS) (Holker et al., 2005; Niemann et al., 2002). Hneď pred transferom do enukleovaného oocyty bola suspenzia donorových buniek pripravená štandardnou trypsinizáciou. Bunky boli ošetrené, premiešané a udržiavané v TCM-air médiu.

Pre produkciu embryí nukleárnym transférom, MII oocyty boli umiestnené v TCM-air médiu obsahujúcom 5 µg/ml Hoechst 33342 a 7,5 µg/ml cytochalzínu B počas 8 min. Oocyty boli enukleované odsatím prvého polárneho telieska a MII platničky. Samostatný oddelený fibroblast bol prenesený do perivitelinného priestoru enukleovaného oocyty recipienta pomocou 30-µm pipety. Oocytárno-fibroblastové bunkové komplexy boli elektricky fúzované 1-2 impulzami 0,7 kV počas 30 µsek (hovädzie oocyty) alebo jedným 1 kV impulzom počas 99 µsek (prasacie oocyty) v 0,285 M manitolovom médiu obsahujúcom 0,1 mM MgSO<sub>4</sub> a 0,05% BSA s Eppendorfovým Multiporatorovým strojom (Hamburg, Germany). Fuzované bunkové hybridy (SCNT) a neporušené oocyty (partenogeneticky aktivované) boli chemicky aktivované v roztoku 5 µM ionomycínu (Sigma) počas 5 minút s následnou 3-4 hodinovou inkubáciou v 2 mM 6-dimetylaminopurínu (6-DMAP; Sigma). Po aktivácii boli embryá premyté a kultivované v 30-µL kvapkách SOFaa média doplneného s 0,4% BSA 39°C v 5% CO<sub>2</sub> a 90% N<sub>2</sub> v modulárnych inkubátorových komorách (Hornen et al., 2007; Niemann et al., 2002). Embryá boli získané 2, 4, 8 a 12 hodín po aktivácii (hpa) pre ďalšie použitie.

### **3. 3 Kravské tetraploidné embryá**

Tetraploidné embryá boli produkované podľa protokolu pre SCNT embryá splynutím diploidného ženského fibroblastu s oocytom MII bez predchádzajúcej enukleácie. Polárne telieska boli odstránené z perivitelinného priestoru bez ovplyvnenia oolémy.

### **3. 4 Príprava na autorádiografiu pre svetelnú a transmisiú elektrónovú mikroskopiu**

Štyri až šesť embryí na skupinu bolo hodnotených pre nukleolárnu ultraštruktúru. Embryá boli fixované v 3% glutaraldehyde v 0,1 M Na-fosfátovom pufri (pH 7,2), následne premyté v 0,1 M Na fosfátovom pufri a fixované v 1% OsO<sub>4</sub> v 0,1 M Na-fosfátovom pufri, vložené do Eponu a postupne nakrájané na poloténkové rezy (2 µm). Tieto rezy boli zafarbené so základnou toluidínovou modrou a vyhodnotené pod svetelným mikroskopom. Vybrané poloténkové rezy boli znovu zaliate do Eponu (Hyttel a Madsen, 1987) a spracované pre ultratenké rezanie (70nm). Ultratenké rezy boli kontrastované s uranyl acetátom a citrátom olova a vyhodnotené pod transmisiú elektrónovým mikroskopom Philips CM100.

### **3. 5 Imunodetekcia jadierkových proteínov**

Na imunodetekciu boli použité ľudský antifibrilárín (1:500) (Ochs et al., 1985) a myši monoklonálny antiupstream väzbový faktor (UBF; 1:50). U týchto protilátok bolo preukázané na špecificky označených komponentoch jadierka u embryí myši (Svarcová et al., 2009), hovädzieho dobytku (Laurincik et al., 2000; Svarcova et al., 2007, 2008) a ošípaných (Hyttel et al., 2000a).

Pre núčely nepriamej imunofluorescencie bolo zozbieraných 8-15 embryí v každej skupine 4 a 12 hpa. *Zona pellucida* embryí bola odstránená ošetrením 1% pronázou. Následne boli embryá fixované v 4% paraformaldehyde po dobu 40minút pri izbovej teplote, premývané v 1% Tritone X-100 v PBS, blokované v 2% hovädzom sérovom albumíne BSA v PBS 30 minút a inkubované 1 hodinu s primárnou protilátkou pri izbovej teplote. Nadbytok primárnej protilátky bol odstránený rozsiahlym umývaním tesne pred inkubáciou s Alexa 488 (fibrilárín) a s Alexa 594 (UBF), zriedenej v PBS obsahujúcej 2% BSA počas 1 hodiny pri izbovej teplote. Nakoniec boli embryá umiestnené na podložné sklíčka pomocou Antifade pripevňovacieho média a zakryté krycím sklíčkom. Embryá boli pozorované na konfokálnom laserovom skenovacom mikroskope (Zeiss). Kontrola imunofarbením bola vykonaná vynechaním primárnej protilátky, čo viedlo vo všetkých prípadoch ku strate značenia.

### **3. 6 Vývojová schopnosť embryí**

Intergenerické embryá piSCNT boli schopné vývinu do štádia 16-bunkového embrya a biSCNT embryá do 4-bunkového štádia, čo zodpovedá vývojovému bloku definovaného hostiteľskou ooplazmou. Prasacie a hovädzie partenogenetické embryá sa vyvinuli do štádia blastocysty s úspešnosťou medzi 40-50%.

### **3. 7 Etika**

Zaobchádzanie so zvieratami bolo vykonávané v súlade s Príručkou pre starostlivosť a využívanie poľnohospodárskych zvierat v poľnohospodárskom výskume a výučbe.

## **4 VÝSLEDKY**

### **4. 1 Aktivácia transkripcie**

Žiadne z hodnotených embryí neprejavilo autorádiografické farbenie, čo je v súlade s predpokladom, že v tejto fáze je nedostatok transkripčnej aktivity.

### **4. 2 Intranukleárne štruktúry prasacích oocytov**

#### **4. 2. 1 Prasacie partenogeneticky aktivované (pPA) embryá**

Po celú dobu pozorovania boli v jadrách pPA embryí lokalizované rozsiahle NPBs zložené z denzného fibrilárneho materiálu typického pre zygoty ošípaných a začiatkové štádium štiepenia embryí. 2 a 4 hpa bol chromatín pripojený k niektorým NPBs. 8 hpa boli guľovité zhluky rozsiahlych elektrónovo-denzných granúl podobajúce sa zrníčkam vnútorného chromatínu lokalizované spolu s NPBs.

#### **4. 2. 2 Kravské intergenerické SCNT(biSCNT) embryá**

Po celú dobu pozorovania boli v jadrách biSCNT embryí lokalizované typické prasacie NPBs. 2 a 12 hpa bol s NPBs spojený slabý chromatín. 8 hpa boli v pripojení s NPBs zazamenané guľovité zhluky veľkých elektrón-denzných granúl.

### **4. 3 Intranukleárne štruktúry kravských oocytov**

#### **4. 3. 1 Kravské partenogeneticky aktivované (bPA) embryá**

V bPA embryách boli prvé štruktúry súvisiace s jadierkom pozorované v troch zo štyroch vzoriek 4 hpa vo forme malých kravských NPBs zložených z denzného materiálu (Obr. č. 27a). K týmto štruktúram boli pripojené slabé zhluky heterochromatínu. Podobne to bolo aj 8 hpa. 12 hpa spolu s NPBs existovali guľovité zhluky malých elektrón-denzných granúl (Obr. č.28d).

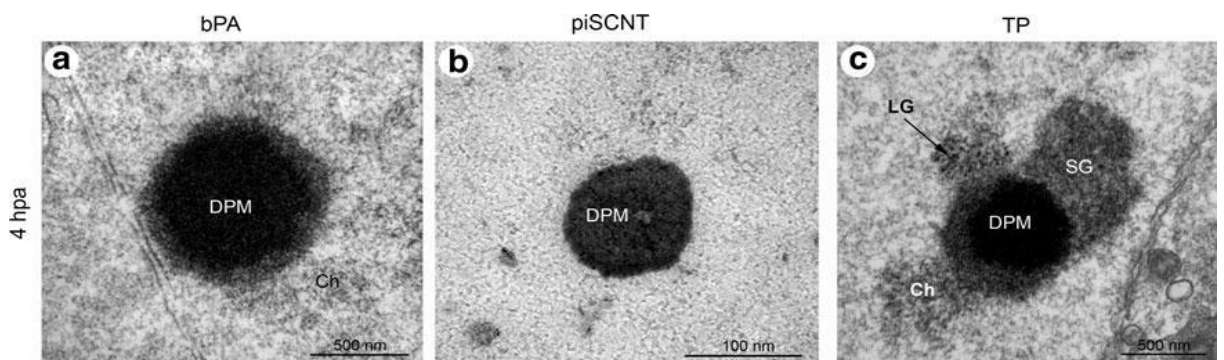
#### 4. 3. 2 Prasacie intergenerické SCNT(piSCNT) embryá

2 hpa jadrá piSCNT embryí obsahovali zhluky elektrón-denzného zrnitého materiálu. Od 4 do 12 hpa jadrá preukazovali vakuolové zhluky elektrón-denzného zrnitého materiálu, ktoré boli spojené so zhlukmi heterochromatínu (Obr. č. 27b). Na periférii denzných centier boli pozorované voľne balené agregáty malých granúl, na ktorých periférii boli nájdené nesúvislo rozložené veľké granule, ktorých množstvo rástlo až do 12 hpa (Obr. č. 28e).

#### 4. 3. 3 Kravské tetraploidné embryá

Intranukleárna (vnútrojadrová) štruktúra popisovaná nižšie bola prítomná len v pronukleárnych jadrách. Podobné štruktúry boli nájdené v obidvoch typoch prvojadier; teda nebolo možné rozpoznať maternálny a somatický pôvod jadra. 4 hpa, keď boli zaznamenané prvé intranukleárne štruktúry, dve zo štyroch embryí preukazovali prítomnosť denzne baleného fibrilárneho materiálu spojeného so skupinami malých a veľkých elektrón-denzných granúl a heterochromatínom (Obr. č. 27c). 8 a 12 hpa boli pozorované typické malé kravské NPBs, ktoré v mnohých prípadoch obsahovali veľké vakuoly a boli spojené so skupinami elektrón-denzných granúl a heterochromatínom (Obr. č. 28f).

Imunocytochemická lokalizácia fibrilarínu a UBF (upstream binding factor) - súhrn výsledkov vid'. Tab. č. 4.



Obrázok č. 27. Intranukleárne štruktúry v bPA, piSCNT a TP 4 hpa.

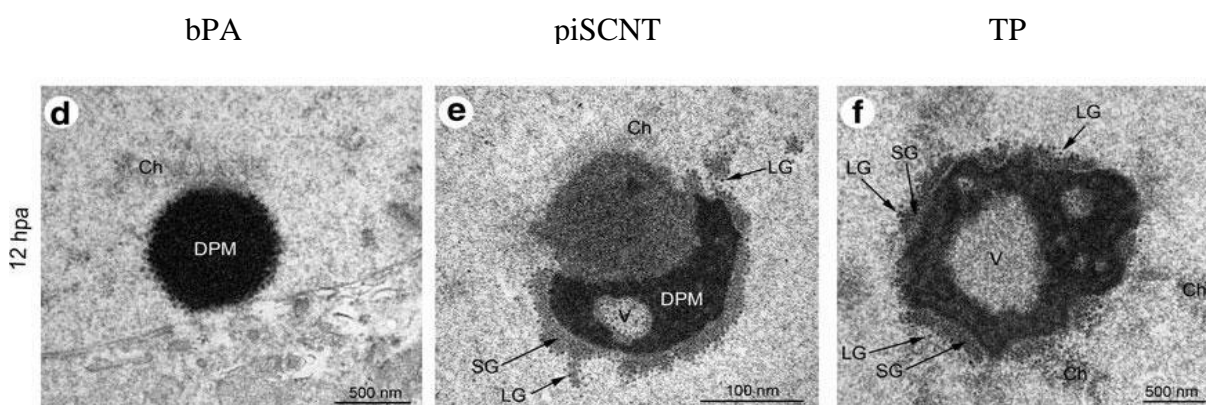


Tabuľka č. 4. Lokalizácia fibrilarínu a UBF v partenogenetických, intergenerických a tetraploidných embryách.

		hpa	Fibrilarín		UBF		N
			distinct	absencia	distinct	absencia	
Prasacia ooplazma	pPA	4	14	0	0	14	14
		12	14	0	11	3	14
	biSCNT	4	7	0	0	7	7
		12	7	0	0	7	7
Kravská ooplazma	bPA	4	10	0	0	10	10
		12	8	0	8	0	8
	piSCNT	4	10	1	0	11	11
		12	13	0	0	13	13
	TP	4	17/17	0/0	5/5	12/12	17+17
		12	10/10	1/1	9/8	2/3	11+11

pPA – 4 hpa bola nájdená odlišná lokalizácia fibrilarínu vo forme prstencov, zatiaľ čo UBF farbenie chýbalo (Obr. č. 29A1). 12 hpa bol fibrilarín opäť lokalizovaný vo forme prstencovitých vnútrojadrových štruktúr, pričom v 11 zo 14 vzoriek bol lokalizovaný spolu s UBF ohniskami (Obr. č. 29A2).

biSCNT embryá – 4 a 12 hpa bola pozorovaná odlišná lokalizácia fibrilarínu vo forme prstencov. UBF zafarbenie chýbalo v oboch časových bodoch (Obr. č. 29A1, A2).

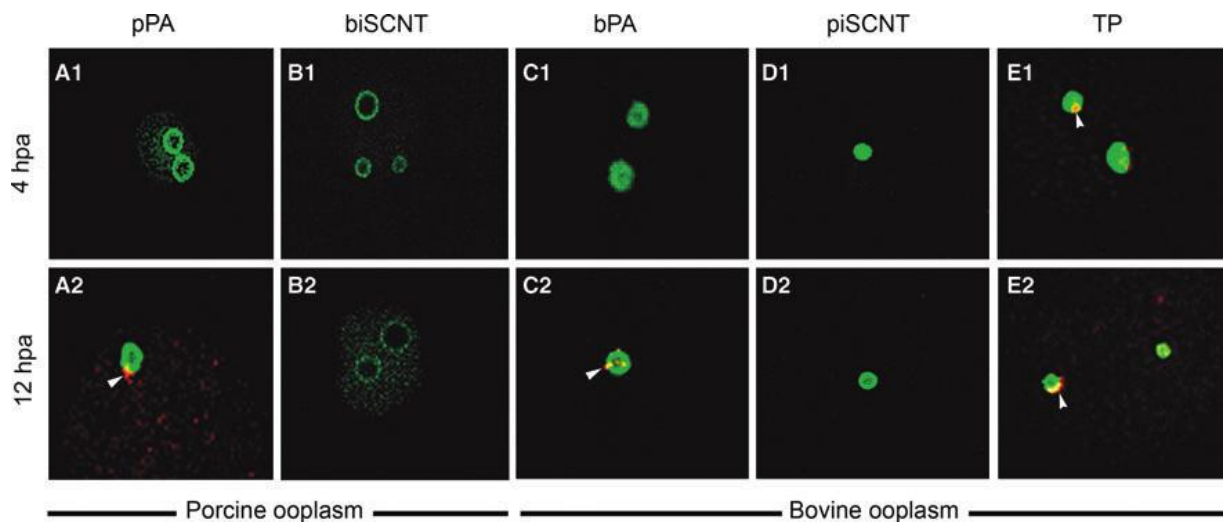


Obrázok č. 28. Intranukleárne štruktúry v bPA, piSCNT a TP 12 hpa.

bPA embryá – 4 hpa bol fibrilarín lokalizovaný v malých guľovitých vnútrojadrových ohniskách, zatiaľ čo UBF značenie chýbalo (Obr. č. 29C1). 12 hpa bol fibrilarín lokalizovaný vo forme prstencov, ktoré boli lokalizované spolu s UBF (Obr. č. 29C2).

piSCNT embryá – 4 hpa bol fibrilarín lokalizovaný v malých guľovitých vnútrojadrových ohniskách, kým farbenie UBF nebolo pozorované (Obr. č. 29D1). 12 hpa bol fibrilarín lokalizovaný ako malá kompaktná guľovitá štruktúra no nebolo zistené žiadne označenie UBF (Obr. č. 29D2).

Kravské TP – 4 hpa obidve jadrá preukazovali špecifickú lokalizáciu fibrilarínu v malých guľovitých intranukleárných štruktúrach. Ohniská UBF zafarbenia boli lokalizované spolu s týmito štruktúrami typicky iba v jednom z dvoch až troch jadier (Obr. č. 29E1). 12 hpa bol fibrilarín lokalizovaný vo forme prstencovitých vnútrojadrových štruktúr väčšiny jadier a UBF zafarbenie tvorilo vonkajší obal okolo fibrilarínového značenia (Obr. č. 29E2).



Obrázok č. 29. Lokalizácia UBF (červené) a fibrilarínu (zelené) 4 hpa a 12 hpa u embryí rôzneho pôvodu.

## 5 DISKUSIA

Medzidruhový a medzirodový SCNT sa považuje za dôležitý nástroj pre štúdium jadrovo-cytoplazmatických interakcií (Dominko et al., 1999b; Illmense et al., 2006), liečbu neplodnosti (Zavos and Illmense, 2006), produkciu kmeňových buniek (Chen et al., 2003) a klonovanie ohrozených zvierat, ktorých oocyty sa náročne získavajú (Amstislavskij, 2006; Li et al., 2007; Thongphakdee et al., 2006; Williams et al., 2006; Zhao et al., 2006). Avšak, produkcia živého potomstva z intergenerických embryí nebola zistená a embryonálny vývoj okrem fázy majoritnej aktivácie embryonálneho genómu je výrazne brzdený.

Remodelovanie a reprogramovanie preneseného genómu je nevyhnutné pre úspešný vývoj embrya nasledujúci po SCNT. Tento proces je sprevádzaný PCC a NEBD (Collas et al., 1992; Tani et al., 2001).

Neprítomnosť úplného NEBD u medzidruhových embryí nie je nevyhnutne limitujúcim faktorom pre interakcie medzi ooplazmou a zavedeným somatickým jadrom. Neúplné jadrové obaly pozorované u väčšiny embryí v priebehu celého pozorovania vyjadrujú potenciál pre prenos materiálu ooplazmy do zavedených jadri (Sung et al., 2007).

Úspešné prijatie somatického materiálu ooplazmou je indikované formáciou ooplazmy druhovo-špecifických jadrových subjektov vnútri somatických jadri už 2 hpa.

Jednobunkové štádiá pochádzajúce z prasacích oocytov (pPA, biSCNT) preukazovali rozsiahle NPBs typické pre zygoty ošípaných a začiatok fázy štiepenia embryí (Tomanek et al., 1989). Jednobunkové štádiá pochádzajúce z kravských oocytov (bPA, piSCNT) na druhej strane preukazovali zhluky granúl a malé NPBs často s vakuolami typickými pre kravské zygoty a začiatok štádia štiepenia embryí (Kopečný et al., 1989, 2000; Laurincik et al., 1996, 1998). Podobné zistenia potvrdzujúce reguláciu ooplazmy jadierkového vývoja boli zistené v intergenerických embryách, keď ovčie ooplasty prijali prasačie somatické jadrá (Hamilton et al., 2004).

Výsledky práce jasne ukazujú, že faktory ooplazmy sú schopné vstúpiť do somatického jadra a regulovať procesy súvisiace so začiatočnými krokmi jadierkovej formácie v intergenerických embryách dokonca aj keď NEBD nenastane.

Embryá rekonštruované z kravskej ooplazmy (bPA, piSCNT, TP) preukazovali variabilnú dynamiku ich jadrových štruktúr počas prvého bunkového cyklu. Kravské partenogenetické embryá obsahovali neporušené jadierkové štruktúry v priebehu celého

bunkového cyklu. Intergenerické piSCNT embryá a jedno z dvoch až troch jadier v TP embryách obsahovali jadierkové štruktúry s rôznym množstvom pripojených malých a veľkých granúl. Počet veľkých granúl sa zvýšil ku koncu bunkového cyklu, zatiaľ čo množstvo malých granúl sa znížilo. Kvôli neprítomnosti transkripčnej aktivity v tejto fáze (Kopečný, 1989; Ostrup et al., 2009) je možné, že RNA procesing lokalizovaný v jadierku bol aktivovaný. Aktivačné faktory alebo prípadné substráty, teda pravdepodobne nepochádzajú z maternálnej ooplazmy, pretože aktivácia nenastala v partenogenetických embryách a tieto sú zavedené somatickým jadrom. Podobná situácia bola pozorovaná v oplodnených kravských embryách, kde penetrácia spermii predstavovala somatický faktor (Kopečný, 1989; Kopečný et al., 1989, 2000; Laurincik et al., 1996, 1998). Do akej miery je táto aktivita potrebná pre ďalší vývoj je zatiaľ neznáme. Na základe nášho ultraštruktúrneho pozorovania predpokladáme, že zavedený prasací somatický fibroblast vlastní komponenty nevyhnutné pre aktiváciu dynamiky jadierkových štruktúr kravskej ooplazmy.

Z molekulárneho hľadiska, všetky hodnotené jadierkové štruktúry v tomto štúdiu obsahujúce fibrilarín už od 4 hpa potvrdzujú, že proteín rRNA processingu je základom pre formáciu jadierkových štruktúr. Avšak, vzhľadom na nešpecifickosť protilátky sme nemohli definovať somatický alebo maternálny pôvod tohto proteínu. Na druhej strane sme boli schopní vyvodit' pôvod UBF. V partenogenetických embryách bol UBF najskôr lokalizovaný spolu s fibrilarínom 12 hpa bez zobrazenia odlišného vzoru typického pre aktívne jadierka. V intergenerických embryách UBF nemohol byť nikdy detekovaný. V TP kravských embryách bol UBF lokalizovaný v jednom z jadier zygoty 4 hpa a v oboch jadrách 12 hpa. Môžeme predpokladať, že maternálne zdedený UBF (bPA, pPA, jedno z jadier v TP embryách) sa dostáva k fibrilarínu obsahujúci jadierkové štruktúry približne 12 hpa zodpovedajúce neskorej S alebo G2 fáze prvého bunkového cyklu (prasa: Laurincik et al., 1995; HD: Comizzoli et al., 2000; Laurincik et al., 1998). Presumptívny somatický UBF v TP embryách je zreteľne lokalizovaný v jadierkových štruktúrach až do 4 hpa, čo je v súlade s predchádzajúcimi štúdiami vo vnútrodrohových SCNT embryách (Ostrup et al., 2009). Somatický UBF v intergenerických embryách (piSCNT, biSCNT) je odstránený z jadier už pred 4 hpa a nie je nahradený ooplazmatickým UBF. Porucha v odvoде ooplazmatického UBF k jadierkovým štruktúram môže teda predstavovať hypotézu limitov ooplazmy v molekulárnych interakciách so somatickými cieľmi.

UBF je dôležitý pre aktiváciu ribozomálnej RNA transkripcie a patrí k rodine proteínov obsahujúcich druhovo-špecifické nukleové kyseliny viažuce domény a je

schopný viazať DNA (Brown a Szyf, 2008; Panov et al., 2006; Wright et al., 2006; Young et al., 2007) rovnako ako RNA (Copenhaver et al., 1994). UBF je odvedený k aktívnemu jadierku, kde sa viaže s rRNA génovými sekvenciami cez kyselinový koniec (Maeda et al., 1992). V skorých zygotách sa UBF môže najprv spájať s dekonzenzovaným chromatínom približne v S-fáze ako u partenogenetických embryí. Avšak u intergenerických embryí ooplazmický UBF napriek jeho vysoko zachovanej proteínovej štruktúre (Bolivar et al., 1999), zlyháva viazanie chromatínu počas S-fázy indikujúce aberantnú DNA-proteínovú interakciu. Vo všeobecnosti môže byť niekoľko ooplazmických faktorov zapojených do DNA/RNA proteínových interakcií, ktoré zoslabujú interakciu s introdukovaným chromatínom a tak brzdia remodelovanie a reprogramovanie v intergenerických embryách. Na potvrdenie alebo popretie tohto fenoménu sú potrebné ďalšie štúdie.

## 6 ZÁVER

Práca jednoznačne preukázala, že ooplazma cicavcov je schopná interakcie s jadrom somatickej bunky rôzneho druhu a do určitej miery kontroluje intranukleárne molekulárne procesy. Introdukované somatické bunky preukazovali podobnú morfológiu nukleárnych a nukleolárnych štruktúr ako hostiteľská ooplazma.

Napriek tomu transkripčný faktor UBF nebol lokalizovaný v jadierkach v pseudoprvojadrách intergenerických embryí, čo naznačuje možnú obmedzenú úlohu druhovo-špecifických interakcií. Naše údaje môžu prispieť k vysvetleniu, prečo intergenerické SCNT embryá nikdy nedosiahnu úplnú zrelosť.

Tento poznatok výrazne napomôže, pri hľadaní ďalších možných molekulárnych faktorov ovplyvňujúcich správny vývin embryí získaných metódou SCNT, pomocou ktorých bude možné optimalizovať rôzne maturačné a kultivačné médiá.

## 7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. AKAGI, S. – ADACHI, N. – MATSUKAWA, K. – KUBO, M. – TAKAHASHI, S.: Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 66(3)/2003, p. 264-272.
2. ALEXOPOLUS, N.I. – MADDOX-HYTTEL, P. – TVEDEN-NYBORG, P. – D'CRUZ, N.T. – TECIRLIOGLU, T.R. – COONEY, M.A. – SCHAUSER, K. – HOLLAND, M.K. – FRENCH, A.J.: *Reproduction*, 136/2008, p. 433-455.
3. AMSTISLAVSKII, S.I.: Interspecies transplantation of embryos and nuclear transfer as an approach to conservation of disappearing mammalian species. In: *Ontogenez*, 37/2006, p. 3-11.
4. ARCHER, G.S. – DINDOT, S. – FRIEND, T.H. – WALKER, S. – ZAUNBRECHER, G. – LAWHORN, B. – PIEDRAHITA, J.A.: Hierarchical phenotypic and epigenetic variation in cloned swine. In: *Biol. Reprod.*, 69/2003, p. 430-436.
5. BACHVAROV, D. – NORMANDEAU, M. – MOSS, T.: Heterogeneity in the *Xenopus* ribosomal transcription factor xUBF has a molecular basis distinct from that in mammals. In: *FEBS Lett.*, 288/1991, p. 55-59.
6. BAGUISI, A. – BEHBOODI, E. – MELICAN, D.T. – POLLOCK, J.S. – DESTREMPES, M.M. – CAMMUSO, C. – WILLIAMS, J.L. – NIMS, S.D. – PORTER, C.A. – MIDURA, P. – PALACIOS, M.J. – AYRES, S.L. – DENNISTON, R.S. – HAYES, M.L. – ZIOMEK, C.A. – MEADE, H.M. – GODKE, R.A. – GAVIN, W.G. – OVERSTROM, E.W. – ECHELARD, Y.: Production of goats by somatic cell nuclear transfer. In: *Nat. Biotechnol.*, 17/1999, p. 456-461.
7. BAHARVAND, H.: *Trends in stem cell biology and technology*. Humana press, 2009, p. 413, ISBN 978-1-60327-904-8.
8. BAUERSACHS, S. – ULBRICH, S.E. – ZAKHARTCHENKO, V. – MINTEN, M. – REICHENBACH, M. – REICHENBACH, H.D. – BLUM, H. – SPENCER, T.E. – WOLF, E.: The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106/2009, p. 5681-5686.
9. BERG, D.K. – LI, C. – ASHER, G. – WELLS, D.N. – OBACK, B.: Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. In: *Bio. Reprod.*, 77/2007, p. 384-394.
10. BETTHAUSER, J.M. – PFISTER-GENSKOW, M. – XU, H. – GOLUEKE, P.J. – LACSON, J.C. – KOPPANG, R.W. – MYERS, C. – LIU, B. – HOESCHELE, I. – EILRTSEN, K.J. – LLENO, G.H.: Nucleoplasmin facilitates reprogramming and in vivo development of bovine nuclear transfer embryos. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 73/2006, p. 977-986.

11. BIGGIOGERA, M. – MALATESTA, M. – ABOLHASSANI-DADRAS, S. – AMALRIC, F. – ROTHBLUM, L.I. – FAKAN, S.: Revealing the unseen: the organizer region of the nucleolus. In: *J. Cell Sci.*, 114/2001, p. 3199-3205.
12. BOLIVAR, J. – IGLESIAS, C. – ORTIZ, M.: The DNA binding domains of UBF represent major human autoepitopes conserved in vertebrates species. In: *Cell Mol. Biol.*, 45/1999, p. 277-284.
13. BOURGEOIS, C.A. – HUBERT, J.: Special relationship between the nucleolus and the nuclear envelope: structural aspects and functional significance. In: *Int Rev Cytol*, 111/1988, p. 1-52.
14. BÓZNER, R.A. – BOBÁK, M. – DAVID, H. – SMETANA, K.: *Cytológia*. Osveta. Bratislava, 1986, s. 155-170.
15. BREM, G. – KUHHLHOLZER, B.: The recent history of somatic cloning in mammals. In: *Cloning Stem Cells*, 4/2002, p. 57-63.
16. BRIGGS, R. – KING, T.J.: Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 38/1952, p. 455-463.
17. BROWN, S.E. – SZYF, M.: Dynamic epigenetic states of ribosomal RNA promoters during the cell cycle. In: *Cell Cycle*, 7/2008, p. 382-390.
18. CAMOUS, S. – KOPECNY, V. – FLECHON, J.E.: Autoradiographic detection of the earliest stage of (3H)-uridine incorporation into the cow embryo. In: *Biol. Cell*, 58/1986, p. 195-200.
19. CAMPBELL, K.H.S.: Ten Years of Cloning: Questions Answered And Personal Reflections. In: *Cloning and Stem Cells.*, 9(1)/2007, p. 8-11.
20. CAMPBELL, K.H.S.: A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. In: *J. Anat.*, 200/2002, p. 267-275.
21. CAMPBELL, K.H. – McWHIR, J. – RITCHIE, W.A. – WILMUT, I.: Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. In: *Nature*, 380/1996, p. 64-66.
22. CHAVATTE-PALMER, P. – HEYMAN, Y. – RICHARD, C. – MONGET, P. – LEBOURHIS, D. – KANN, G. – CHILIARD, Y. – VIGNON, X. – RENARD, J.P.: Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. In: *Biol. Reprod.*, 66/2002, p. 1596-1603.
23. CHEN, Y. – HE, Z.X. – LIU, A.: Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. In: *Cell Res.*, 13/2003, p. 251-263.
24. CHEONG, H.T. – TAKAHASHI, Y. – KANAGAWA, H.: Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. In: *Biol. Reprod.* 48/1993, p. 958-963.



25. CHESNE, P. – ADENOT, P.G. – VIGLIETTA, C. – BARATTE, M. – BOULANGER, L. – RENARD, J.P.: Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. In: *Nat. Biotechnol.*, 2002, p. 366-369.
26. CHRENEK, P.: Genetické manipulácie s embryami. In: *Publikácia VÚŽV Nitra*, 7, 2002, ISBN 80-88872-25-1.
27. CHRENEK, P.: Genetické manipulácie s embryami. In: *Publikácia SCPV Nitra*, 18, 2008, ISBN 978-80-88872-79-5.
28. CIBELLI, J.B. – CAMPBELL, K.H. – SEIDEL, G.E. – WEST, M.D. – LANZA, R.P.: The health profile of cloned animals. In: *Nat. Biotchnol.*, 20/2002, p. 13-14.
29. CIBELLI, J.B. – STICE, S.L. – GOULEKE, P.J. – KANE, J.J. – JERRY, J. – BLACKWELL, C. – PONCE DE LEON, F.A. – ROBL, J.M.: Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. In: *science*, 28/1998, p. 1256-1258.
30. COLLAS, P. – PINTO-CORREIA, C. – PONCE DE LEON, F.A.: Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant in rabbit embryos. In: *Biol. Reprod.*, 46/1992, p. 501-511.
31. COMAI, L. - TANESE, N. - TIJAN, R. (1992). The TATA-binding protein and associated factors re integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell* 68, 965-976.
32. COMIZZOLI, P. – MARQUANT-LE, G.B. – HEYMAN, Y.: Onset of the first S-phase is determinted by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. In: *Biol. Reprod.*, 62/2000, p. 1677-1684.
33. COPENHAVER, G.P. – PUTNAM, C.D. – DENTON, M.L.: The RNA polymerase I transcription factor UBF is a sequence-tolerant HMG-box protein that can recognize structured nucleic acids. In: *Nucleic Acids Res.*, 22/1994, p. 2651-2657.
34. DAI, X. – HAO, J. – ZHOU, Q.: A modified culture method significantly improves the development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos. In: *Reproduction* 138/2009, p. 301-308.
35. DOMINKO, T. – RAMALHO-SANTOS, J. – CHAN, A.: Optimalization strategies for production of mammalian embryos by nuclear transfer. In: *Cloning*, 1/1999, p. 143-152.
36. DOUSSET, T. – WANG, C. – VERHEGEN, C. – CHEN, D. – HERNANDEZ-VERDUN, D. – HUANG, S.: Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription I: *Mol. Biol. Cell.*, 11/2000, p. 2705-2717.
37. DUMBAR, T.S. – GENTRY, G.A. – OLSON, M.O.: Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. In: *Biochemistry*, 28/1989, p. 9495-9501.

38. DUNDR, M. – MEIER, U.T. – LEWIS, N. – REKOSH, D. – HAMMARSKJOLD, M.L. – OLSON, M.O.: A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. In: *Chromosoma*, 105/1997, p. 407-417.
39. DUNDR, M. – MISTELI, T.: Functional architecture in the cell nucleus. In: *Biochem. J.*, 356/2001, p. 297-310.
40. ECKERT, J. – NIEMANN, H.: In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. In: *Theriogenology*, 43/1995, p. 1211-1225.
41. EGGAN, K. – BALDWIN, K. – TACKETT, M. – OSBORNE, J. – GOGOS, J. – CHESS, A. – AXEL, R. – JAENISCH, R.: Mice cloned from olfactory sensory neurons. In: *Nature*, 428/2004, p. 44-49.
42. EGLI, D. – ROSAINS, J. – BIRKHOFF, G. – EGGAN, K.: Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. In: *Nature*, 447/2007, p. 679-685.
43. ELDER, K. – DALE, B.: In vitro fertilization. Cambridge University press, 2000, p. 288, ISBN 978-0-521-73072-3.
44. ENRIGHT, B.P. – TANEJA, M. – SCHREIBER, D. – RIESEN, J. – TIAN, X.C. – FORTUNE, J.E. – YANG, X.: Reproductive characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. In: *Biol. Reprod.*, 66/2002, p. 291-296.
45. EPPIG, J. – HEGELE-HARTUNG, C. – LESSL, M.: The future of the oocyte: basic and clinical aspects. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2002, p. 196, ISBN 3-540-43747-9.
46. FARIN, P. – PIEDRAHITA, J.A. – FARIN, C.E.: Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. In: *Theriogenology*, 65/2006, p. 178-191.
47. FLECHON, J.E. – KOPECNY, V.: The nature of the nucleolar precursor body in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. In: *Zygote*, 6/1988, p. 183-191.
48. FOX, J.L.: Cloned animals deemed safe to eat, but labelling issues loom. In: *Nat. Biotech.*, 26/2008, p. 249-250.
49. GALLI, C. – LAGUTINA, I. – CROTTI, G. – COLLEONI, S. – TURINI, P. – PONDERATO, N. – DUCHI, R. – LAZZARI, G.: Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. In: *Nature*, 424/2003, p. 424-635.
50. GAUTIER, T. – ROBERT-NICOUD, M. – GUILLY, M.N. – HERNANDEZ-VERDUN, D.: Relocations of nucleolar proteins around chromosomes of mitosis. A study by confocal laser scanning microscopy. In: *J. Cell Sci.*, 102/1992, p. 729-737.

51. GRIFFITHS, T.A. – MURDOCK, A.P. – HERBERT, M.: The laboratory primate. In: *Human Reprod.*, 15/2000, p. 1592-1596.
52. GHISOLFI, L. – JOSEPH, G. – ERARD, M. – ESCOUBAS, J.M. – MATHIEU, C. – AMALRIC, F.: (1990). Nucleolin-pre-rRNA interactions and preribosome assembly. In: *Mol. Biol. Rep.*, 14/1990, p. 113-114.
53. GOMEZ, M.C. – POPE, C.E. – RICKS, D.M.: Cloning endangered felids using heterospecific donor oocytes and interspecies embryo transfer. In: *Reprod. Fertil. Dev.*, 21/2009, p. 76-82.
54. GORDON, I.R.: *Reproductive technologies in farm animals*. CABI Publishing, 2004, ISBN 0-85199-862-3.
55. GREEN, A.L. – WELLS, D.N. – OBACK, B.: Cattle cloned from increasingly differentiated muscle cells. In: *Biol. Reprod.*, 77/2007, p. 395-406.
56. HADJIOLOV, A.A.: The nucleolus and ribosome biogenesis. In: *Vol.*, 12/1985, p. 268.
57. HAMILTON, H.M. – PEURA, T.T. – LAURINCIK, J.: Ovine ooplasm directs initial nucleolar assembly in embryos cloned from ovine, bovine, and porcine cells. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 69/2004, p. 117-125.
58. HERNANDEZ-VERDUN, D.: The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. In: *Histochem. Cell Biol.*, 126(2)/2006, p. 135-148.
59. HERNANDEZ-VERDUN, D.: Behavior of the nucleolus during mitosis. In: Olson, M.O.J. *The nucleolus*. Landes Biosci. Georgetown, 2004, p. 41-57.
60. HERRERA, J.E. – SAVKUR, R. – OLSON, M.O.: The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. In: *Nucleic Acids Res.*, 23/1995, p. 3974-3979.
61. HOCHEDLINGER, K. – BLELLOCH, R. – BRENNAN, C. – YAMADA, Y. – KIM, M. – CHIN, L. – JAENISCH, R.: Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. In: *Genes Dev.*, 18/2004, p. 1875-1885.
62. HOCHEDLINGER, K. – JAENISCH, R.: Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. In: *Nature*, 415/2002, p. 1035-1038.
63. HOCHEDLINGER, K. – JAENISCH, R.: On the cloning of animals from terminally differentiated cells. In: *Nat. Gener.*, 39/2007, p. 136-137.
64. HOLKER, M. – PETERSEN, B. – HASSEL, P.: Duration of in vitro maturation of recipient oocytes affects blastocyst development of cloned porcine embryos. In: *Cloning Stem Cells*, 7/2005, p. 35-44.
65. HORNEN, N. – KUES, W.A. – CARNWATH, J.W. – LUSCAS-HAHN, A. – PETERSEN, B. – HASSEL, P. – NIEMANN, H.: Production of viable pigs from fetal somatic stem cells. In: *Cloning and Stem Cells*, 9/2007, p. 364-373.

66. HUMPHERYS, D. – EGGAN, K. – AKUTSU, H. – HOCHEDLINGER, K. – REDEOUT, W.M. – BINISZKIEWICZ, D. – YANAGIMACHI, R. – JAENISCH, R.: Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. In: *Science*, 293/2001, p. 95-97.
67. HUNTER, R.H.: Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. In: *Mol. Reprod. Dev.* 44/1996, p. 417-422.
68. HYTTEL, P. – LAURINCIK, J. – ROSENKRANZ, C. – NIEMANN, H. – OCHS, R.L. – SCHELLANDER, K.: Nucleolar proteins and ultrastructure in preimplantation porcine embryos developed in vivo. In: *Biol. Reprod.*, 63/2000, p. 1848-1856.
69. HYTTEL, P. – LAURINCIK, J. – TERKELSEN, O. – VIUFF, D. – FAIR, T. – THOMSEN, P.D. – HAY-SCHMIDT, A. – VAJTA, G. – CALLESEN, H. – GREVE, T.: Activation of ribosomal RNA genes in pre-implantation bovine embryos. In: *Reprod. Dom. Anim.*, 33/1998, p. 331-342.
70. HYTTEL, P. – LAURINCIK, J. – VIUFF, D. – FAIR, T. – ZAKHARTCHENKO, V. – ROSENKRANZ, C. – AVERY, B. – RATH, D. – NIEMANN, H. – THOMSE, P.D. – SCHELLANDER, K. – CALLESEN, H. – WOLF, E. – OCHS, R.L. – GREVE, T.: Activation of ribosomal RNA genes in preimplantation cattle and swine embryos. In: *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61/2000, p. 49-60.
71. HYTTEL, P. – MADSEN, I.: Rapid method to prepare mammalian oocytes and embryos for transmission electron microscopy. In: *Acta Anat. (Basel)*, 129/1987, p.12-14.
72. HYTTEL, P. – VIUFF, D. – AVERY, B. – LAURINCIK, J. – GREVE, T.: Transcription and cell cycle-dependent development of intranuclear bodies and granules in two-cell bovine embryos. In: *J. Reprod. Fert.*, 108/1996, p. 263-270.
73. ILLMENSEE, K. – HOPPE, P.C.: Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. In: *Cell*, 23/1981, p.9-18.
74. ILLMENSEE, K. – LEVANDUSKI, M. – ZAVOS, P.M.: Evaluation of the embryonic preimplantation potential of human adult somatic cells via an embryo interspecies bioassay using bovine oocytes. In: *Fertil. Steril.*, 85(Suppl 1)/2006, p. 1248-1260.
75. JANTZEN, H.M. – ADMON, A. – BELL, S.P. – TIJAN, R.: Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. In: *Nature*, 344/1990, p. 830-836.
76. JANSEN, R.P. – HURT, H.C. – KERN, H. – LEHTONEN, H. – CARMO-FONESECA, M. – LAPEYERE, B. – TOLLERVEY, D.: Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast. In: *J. Cell Biol.*, 113/1991, p. 715-729.
77. JORDAN, P. – MANNERVIK, M. – TORA, L. – CARMO-FONESECA, M.: In vivo evidence that TATA binding protein SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either ctive or inactive. In: *J. Cell Biol.*, 133/1996, p. 225-234.

78. JORDAN, E.G. – MCGOVERN, J.H.: The quantitative relationship of the fibrillar centres and other nucleolar components to changes in growth conditions, serum deprivation and low doses of actinomycin D in cultured diploid human fibroblasts. In: *J. Cell Sci.*, 52/1981, p. 373-389.
79. KANKA, J. – HOZAK, P. – HEYMAN, Y. – CHESNE, P. – DEGROLARD, J. – RENARD, J.P. – FLECHON, J.E.: Transcriptional activity and nucleolar ultrastructure of embryonic rabbit nuclei after transplantation to enucleated oocytes. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 43(2)/1996, p. 135-144.
80. KANKA, J. – SMITH, S.D. – SOLOY, E. – HOLM, P. – CALLESEN, H.: Nucleolar Ultrastructure in Bovine Nuclear Transfer Embryos. In: *Molecular Reproduction and Development*, 52/1999, p. 253-263.
81. KAPPELLER, K. – POSPÍŠILOVÁ, V.: *Embryológia člověka*. Martin: Osveta, 1991, 341s., ISBN 80-217-0332-6.
82. KAPLAN, F.S. – MURRAY, J. – SYLVESTER, J.E. – GONZALES, I.L. – O'CONNOR, P. – DOERING, J.L. – MUENKE, M. – ZASLOFF, M.A.: A repetitive element map of the nucleolus. In: *Genomics*, 15/1992, p. 123-132.
83. KATO, Y. – TANI, T. – TSUNODA, Y.: Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. In: *J. Reprod. Fertil.*, 120/2000, p. 231-237.
84. KATO, Y. – TANI, T. – SOTOMARU, Y. – KUROKAWA, K. – KATO, J. – DOGUCHI, H. – YASUE, H. – TSUNODA, Y.: Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. In: *Science*, 282/1998, p. 2095-2098.
85. KIM, M.K. – JANG, G. – OH, H.J.: Endangered wolves cloned from adult somatic cells. In: *Cloning Stem Cells*, 9/2007, p. 130-137.
86. KIND, A. – SCHNIEKE, A.: Animal pharming, two decades on. In: *Transgenic Res.*, 17/2008, p. 1025-1033.
87. KING, W.A. – NIAR, A. – CHARTRAIN, I. – BETTERIDGE, K.J. – GUAY, P.: Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. In: *J. Reprod. Fertil.*, 8/1988, p. 87-95.
88. KITTNAR, O. – JANDOVÁ, K. – KURIŠČÁK, E. – LANGMEIER, M. – MAREŠOVÁ, D. – MLČEK, M. – MYSLIVEČEK, J. – POKORNÝ, J. – RILJAK, V. – TROJAN, S.: *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011, 800 s., ISBN 978-80-247-3068-4.
89. KOPECNY, V.: High-resolution autoradiographic studies of comparative nucleologenesis and genome reactivation during early embryogenesis in pig, man and cattle. In: *Reprod. Nutr. Dev.*, 29/1989, p. 589-600.

90. KOPECNY, V. – BIGGIOGERA, M. – PIVKO, J.: Finestructural cytochemical and immunocytochemical observations on nuclear bodies in the bovine 2-cell embryo. In: *Zygote*, 8/2000, p. 315-328.
91. KOPECNY, V. – FLECHON, J.E. CAMOUS, S. – FULKA, J., Jr.: Nucleologenesi and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 1/1989, p. 79-90.
92. KUBOTA, C. – TIAN, X.C. – YANG, X.: Serial bull cloning by somatic cell nuclear transfer. In: *Nat. Biotechnol.*, 22/2004, p. 693-694.
93. KUBOTA, C. – YAMAKUCHI, H. – TODOROKI, J. – MIZOSHITA, K. – TABARA, N. – BARBER, M. – YANG, X.: Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97/2000, p. 990-995.
94. KUES, W.A., - RATH, D. – NIEMANN, H.: Reproductive biotechnology in farm animals goes genomics. In: *CAB Rev.*, 3/2008, p. 1-18.
95. KUES, W.A. – NIEMANN, H.: The contribution of farm animals to human health. In: *Trends Biotechnol.*, 22/2004, p. 286-294.
96. LANGMEIER, M. – KITTNAR, O. – MAREŠOVÁ, D. – POKORNÝ, J.: *Základy lékařské fyziologie*. Praha. Grada Publishing, a.s., 2009, 320s., ISBN 978-80-247-2526-0.
97. LANZA, R.P. – CIBELLI, J.B. – FABER, D. – SWEENEY, R.W. – HENDERSON, B. – NEVALA, W. – WEST, M.D. – WETSTEIN, P.J.: Cloned cattle can be healthy and normal. In: *Science*, 294/2001, p. 1893-1894.
98. LAPEYERE, B. – BOURBON, H. – AMALRIC, F.: Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84/1987, p. 1472-1476.
99. LAURINCIK, J. – CHRENEK, P. – PETROVICOVA, I. – STREJCEK, F. – SVARCOVA, O. – TRANDZIK, J.: *Animal Biotechnology*. In: *Faculty of Natural Sciences*, 2008, ISBN 978-80-8094-611-2.
100. LAURINCIK, J. – HYTTEL, P. – BARAN, V.: A detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vitro: cell-cycle chronology and ultrastructure. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 50/1998, p. 192-199.
101. LAURINCIK, J. – HYTTEL, P. – KOPECNY, V.: DNA synthesis and pronucleus development in pig zygotes obtained in vivo: an autoradiographic and ultrastructural study. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 40/1995, p. 325-332.
102. LAURINCIK, J. – KOPECNY, V. – HYTTEL, P.: Detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vivo: ultrastructure and cell cycle chronology. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 43/1996, p. 62-69.

103. LAURINCIK, J. – SCHMOLL, F. – MAHABIR, E. – SCHNEIDER, H. – STOJKOVIC, M. – ZAKHARTCHENKO, V. – PRELLE, K. – HENDRIXEN, P.J. – VOSS, P.L. – MOESZLACHER, G.G. – AVERY, B. – DIELEMAN, S.J. – BESENFELSER, U. – MULLER, M. – OCHS, R.L. – WOLF, E. – SCHELLANDER, K. – MADDOX-HYTTEL, P.: Nucleolar proteins and ultrastructure in bovine in vivo developed, in vitro produced, and parthenogenetic cleavage-stage embryos. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 65/2003, p. 73-85.
104. LAURINCIK, J. – THOMSEN, P.D. – HAY-SCHMIDT, A. – AVERY, B. – GREVE, T. – OCHS, R.L. – HYTTEL, P.: Nucleolar proteins and nuclear ultrastructure in preimplantation bovine embryos produced in vitro. In: *Biol. Reprod.*, 62/2000, p. 1024-1032.
105. LEARY, D.J. – HUANG, S.: Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. In: *FEBS Lett.*, 509/2001, p. 145-150.
106. LEE, B.C. – KIM, M.K. – JANG, G. – OH, H.J. – YUDA, F. – KIM, H.J. – SHAMIM, M.H. – KIM, J.J. – KANG, S.K. – SCHATTEN, G. – HWANG, W.S.: Dogs cloned from adult somatic cells. In: *Nature*, 436/2005, p. 641.
107. LI, Y. – DAI, Y. – DU, W.: In vitro development of yak (*Bos grunniens*) embryos generated by interspecies nuclear transfer. In: *Anim. Reprod. Sci.*, 101/2007, p. 45-59.
108. LI, J. – MOMBAERTS, P.: Nuclear transfer-mediated rescue of the nuclear genome of nonviable mouse cells frozen without cryoprotectant. In: *Biol. Reprod.*, 79/2008, p. 588-593.
109. LI, Z. – SUN, X. – CHEN, J. – LIU, X. – WISELY, S.M. – ZHOU, Q. – RENARD, J.P. – LENO, G.H. – ENGELHARDT, J.F.: Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. In: *Dev. Biol.*, 293/2006, p. 439-448.
110. MAEDA, Y. – HISATAKE, K. – KONDO, T. – HANADA, K. – SONG, C.Z. – NISHIMURA, T. – MURAMATSU, M.: Mouse rRNA gene transcription factor mUBF requires both HMG-box I and an acidic tail for nucleolar targeting mechanism. In: *EMBO J*, 11/1992, p. 3695-3704.
111. MANN, J.R.: The laboratory primate. In: *Biol. Reprod.*, 13/1998, p. 1077-1083.
112. MANSOURI-ATTIA, N. – SANDRA, O. – AUBERT, J. – DEGRELLE, S. – EVERTS, R.E. – GIRAUD-DELVILLE, C. – HEYMAN, Y. – GALIO, L. – HUE, I. – YANG, X. – TIAN, X.C. – LEWIN, H.A. RENARD, J.P.: Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation Technologies. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106/2009, p. 5687-5692.
113. MARTINEZ-DIAZ, M.A. – CHE, L. – ALBORNOZ, M. – SENEDA, M.M. – COLLIS, D. – COUTINHO, A.R.S. – EL-BEIROUTHI, N. – LAURIN, D. – ZHAO, X. – BORDIGNON, V.: Pre- and postimplantation development of swine-cloned embryos derived from fibroblasts and bone marrow cells after inhibition of histone deacetylases. In: *Cell reprogramming*, 12/2010, p. 85-94.

114. McGRATH, J. – SOLTER, D.: Nuclear transplantation in mouse embryos. In: *J. Exp. Zool.*, 228/1983, p. 355-362.
115. McGRATH, J. – SOLTER, D.: Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. In: *Science*, 226/1984, p. 1317-1319.
116. MEISNER, A. – JAENISCH, R.: Mammalian Nuclear Transfer. In: *Developmental Dynamics*, 235/2006, p. 2460-2469.
117. MENG, L. – ELY, J.J. – STOUFFER, R.L. – WOLF, D.P.: Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. In: *Biol. Reprod.*, 57/1997, p. 454-459.
118. MILLER, K. G. - TOWER, J. - SOOLLNER-WEB, B. (1985). A complex control region of the mouse rRNA gene directs accurate initiation by RNA polymerase I. *Mol. Cell Biol.* 5, 554-562.
119. MIYAZAKI, S. – SHIRAKAWA, H. – NAKADA, K. – HONDA, Y.: Essential role of the inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor/Ca<sup>2+</sup> release channel in Ca<sup>2+</sup> waves and Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization of mammalian eggs. In: *Developmental Biology*, 158/1993, p. 62-78.
120. MIYOSHI, K. – MORI, H. – MIZOBE, Y. – AKASAKA, E. – OZAWA, A. – YOSHIDA, M. – SATO, M.: Valproic acid enhances in vitro development and Oct-3/4 expression of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. In: *Cell. Reprogramming*, 12/2010, p. 67-74.
121. MIYOSHI, K. – RZUCIDLO, S.J. – PRATT, S.L. – STICE, S.L.: Improvements in cloning efficiency may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. In: *Biol. Reprod.*, 68/2003, p. 1079-1086.
122. NIEMANN, H. – KUES, W.A.: Transgenic farm animals. In: *Reprod. Fert. Dev.*, 19/2007, p. 762-770.
123. NIEMANN, H. – TIAN, X.C. – KING, W.A. LEE, R.S.F.: Epigenetic reprogramming in embryonic and fetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. In: *Reproduction*, 135/2008, p. 151-163.
124. NIEMANN, H. – WRENZYCKI, C.: Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. In: *Theriogenology*, 53/2000, p. 21-34.
125. NIEMANN, H. – WRENZYCKI, C. – LUCAS-HAHN, A.: Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. In: *Cloning Stem Cells*, 4/2002, p. 29-38.
126. OBACK, B. – WELLS, D.N.: Donor cell differentiation, reprogramming, and cloning efficiency: Elusive or illusive correlation? In: *Mol. Reprod. Dev.*, 74/2007, p. 646-654.
127. OCHS, R.L. – LISCHWE, M.A. – SPHON, W.H. – BUSCH, H.: Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. In: *Biol. Cell*, 54/1985, p. 123-133.



128. Ogonuki, N. – Inoue, K. – Yamamoto, Y. – Noguchi, Y. – Tanemura, K. – Suzuki, O. – Nakayama, H. – Doi, K. – Ohtomoto, Y. – Satoh, M. – Nishida, A. – Ogura, A.: Early death of mice cloned from somatic cells. In: *Nat. Genet.*, 30/2002, p. 253-254.
129. Oh, H.J. – Kim, M.K. – Jang, G. – Kim, H.J. – Hong, S.G. – Park, J.E. – Park, K. – Park, C. – Sohn, S.H. – Kim, D.Y. – Shin, N.S. – Lee, B.C.: Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cell collected postmortem. In: *Theriogenology*, 70/2008, p. 638-647.
130. O'Mahony, D.J. – Rothblum, L.I.: Identification of two forms of the RNA polymerase I transcription factor UBF. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.*, 88/1991, p.3180-3184.
131. Onishi, A. – Iwamoto, M. – Akita, T. – Mikawa, S. – Takeda, K. – Awata, T. – Hanada, H. – Perry, A.C.: Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. In: *Science*, 289/2000, p. 1198-1190.
132. Oropeza, A. – Hadelers, K.G. – Niemann, H.: Application of ultrasound-guided follicular aspiration (OPU) in prepubertal and adult cattle. In: *J. Reprod. Dev.*, 52/2007, p. 31-38.
133. Oropeza, M. – Petersen, B. – Carnwath, J.W. – Lucas-Hahn, A. – Lemme, E. – Hassel, P. – Herrmann, D. – Barg-Kues, B. – Holler, S. – Queisser, A.L. – Schwinzer, R. – Hinkel, R. – Kupatt, C. – Niemann, H.: transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli. In: *Xenotransplantation*, 16/2009, p. 522-534.
134. Ostrup, O. – Petrovicova, I. – Strejcek, F.: Nuclear and nucleolar reprogramming during the first cell cycle in bovine nuclear transfer embryos. In: *Cloning Stem Cells*, 11/2009, p. 367-375.
135. Pace, M.M. – Augenstein, M.L. – Betthausen, J.M. – Childs, L.A. – Eilertsen, K.J. – Enos, J.M. – Forsberg, E.J. – Golueke, P.J. – Graber, D.F. – Kemper, J.C. – Koppang, R.W. – Lange, G. – Lesmeister, T.L. – Mallon, K.S. – Mell, G.D. – Misica, P.M. – Pfister-Genskow, M. – Strelchenko, N.S. – Voelker, G.R. – Watt, S.R. – Bishop, M.D.: Ontogeny of cloned cattle to lactation. In: *Biol. Reprod.*, 67/2002, p. 334-339.
136. Panarace, M. – Agüero, J.J. – Garotte, M. – Jauregui, G. – Segovia, A. – Cané, L. – Gutiérrez, J. – Marfil, M. – Rigali, F. – Pugliese, M. – Young, S. – Lagioia, L. – Garnil, C. – Forte Pontes, J.E. – Ereno Junio, J.C. – Mower, S. – Medina, M.: How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. In: *Theriogenology*, 67/2007, p. 142-151.
137. Panov, K.I. – Panova, T.B. – Gadala, O.: RNA polymerase I-specific subunit CAST/hPAF49 has a role in the activation of transcription by upstream binding factor. In: *Mol. Cell Biol.*, 26/2006, p. 5436-5448.

138. PERRY, A.C. – WAKAZAMA, T.: Untimely ends and new beginnings in mouse cloning. In: *Nat. Genet.*, 30/2002, p. 243-244.
139. PETERSEN, B. – CARNWATH, J.W. – NIEMANN, H.: The perspectives for porcine-to-human xenografts. In: *Comp. Immunol. Microbiol. Infectious Diseases*, 32/2009, p. 91-105.
140. PETERSEN, B. – RAMACKERS, W. – TIEDE, A. – LUCAS-HAHN, A. – HERRMANN, D. – BARG-KUES, B. – SCHUETTLER, W. – FRIEDRICH, L. – SCHWINZER, R. – WINKLER, M. – NIEMANN, H.: Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C. In: *Xenotransplantation*, 16/2009, p. 486-495.
141. PETERSEN, B. – LUCAS-HAHN, A. – OROPEZA, M. – HORNEN, N. – LEMNE, E. – HASSEL, P. – QUEISSER, A.L. – NIEMANN, H.: Development and validation of a highly efficient protocol of porcine somatic cloning using preovulatory embryo transfer in peripubertal gilts. In: *Cloning and Stem Cells.*, 10/2008, p. 355-362.
142. PETROVIČOVÁ, I.: *Somatický nukleárny transfer*. Nitra: Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre. 2010, 79 s., ISBN 2978-80-8094-711-8.
143. PIVKO, J.: *Morfogenéza oocytov a raných embryí niektorých živoíchov (Morfologické a cytoautorádiografické štúdie)*. SAP Bratislava, 1995, s. 41-47.
144. POLEAJEVA, I.A. – CHEN, S.H. – VAUGHT, T.D. – PAGE, R.L. – MULLINS, J. – BALL, S. – DAI, T. – BOONE, J. – WALKER, S. – AYARES, D.L. – COLMAN, A. – CAMPBELL, K.H.: Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. In: *Nature*, 407/2000, p. 86-90.
145. POWELL, A.M. – TALBOT, N.C. – WELLS, K.D. – KERR, D.E. – PURSEL, V.G. – WALL, R.J.: Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. In: *Biol. Reprod.*, 71/2004, p. 210-216.
146. PRATHER, R.S. – SIMS, M.M. – FIRST, N.L.: Nuclear transplantation in early pig embryos. In: *Biol. Reprod.*, 41/1989, p. 414-418.
147. RASKA, I. – REIMER, G. – JARNIK, M. – KOSTROUCH, Z. – RASKA, K.: Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centres or dense fibrillar components. In: *Biol. Cell*, 65/1989, p. 79-82.
148. RENARD, J.P. – CHASTANT, S. – CHESNE, P. – RICHARD, C. – MARCHAL, J. – CORDONNIER, N. – CHAVATTE, P. – VIGNON, X.: Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. In: *Lancet*, 353/1999, p. 1489-1491.
149. ROUSSEL, P. – ANDRE, C. – COMAI, L. – HERNANDEZ-VERDUN, D.: The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. In: *J. Cell. Biol.*, 133/1996, P. 235-246.

150. RUDENKO, L. – MATHESON, J.C. – SUNDLOF, S.F.: Animal cloning and the FDA – the risk assessment paradigm under public scrutiny. In: *Nat. Biotech.*, 25/2007, p. 39-43.
151. ŘEZÁBEK, K.: *Léčba neplodnosti*. Praha: Grada Publishing,a.s., 2008, 176 s., ISBN 978-80-247-2103-3.
152. SAVINO, T.M. – BASTOS, R. – JANSEN, E. – HERNANDEZ-VERDUN, D.: The nucleolar antigen Nop 52, the human homologue of the yeast ribosomal RNA processing RRPI, is recruited at late stages of nucleologenesis. In: *J. Cell Sci.*, 112/1999, p. 1889-1900.
153. SAVINO, T.M. – GÉBRANE-YOUNÉS, J. – DEMEY, J. – SIBARITA, J.B. – HERNANDEZ-VERDUN, D.: Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. In: *J. Cell Biol.*, 153/2001, p. 1097-1110.
154. SCHEER, U. – ROSE, K.M.: Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. In: *Proc Acad Sci USA*, 81/1984, p. 1431-1435.
155. SCHEER, U. – THIRY, M. – GOESSENS, G.: Structure, function and assembly of the nucleolus. In: *Cell Biol.*, 3/1993, p. 236-241.
156. SCHNAPP, G. – SANTORINI, F. – CARLES, C. – RIVA, M. – GRUMM, I.: The HMG box-containing nucleolar transcription factor UBF interacts with a specific subunit of RNA polymerase I. In: *EMBO J.*, 3/1994, p. 236-241.
157. SCHULTZ, R.M.: Regulation of zygotic gene activation in the mouse. In: *Bioessays*, 15/1993, p. 531-538.
158. SCHULTZ, R.M.: The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. In: *Hum. Reprod. Update.*, 8/2002, p. 323-331.
159. SCHURMANN, A. – WELLS, D.N. – OBACK, B.: Early zygotes are suitable recipients for bovine somatic nuclear and result in cloned offspring. In: *reproduction*, 132/2006, p. 839-848.
160. SCHWARZER, M. – CARNWATH, J.W. – LUCAS-HAHN, A. – LEMNE, E. – KUES, W.A. – WACHSMANN, B. – HAVERICH, A. – MARTIN, U. – NIEMANN, H.: isolation of bovine cardiomyocytes for reprogramming studies based on nuclear transfer. In: *Cloning and Stem Cells*, 8/2006, p. 150-158.
161. SCHWARZWACHER, H.G. – WACHTLER, F.: The nucleolus. In: *Anat. Embryol.*, 188/1993, p. 515-536.
162. SHI, D. – LU, F. – WEI, Y. – CUI, K. – YANG, S. – WEI, J. – LIU, Q.: Buffaloes (*bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. In: *Biol. Reprod.*, 77/2007, p. 285-291.

163. SHIN, T. – KRAEMER, D. – PRYOR, J. – LIU, L. – RUGILA, J. – HOWE, L. – BUCK, S. – MURPHY, K. – LYONS, L. – WESTHUSIN, M.: A cat cloned by nuclear transplantation. In: *Nature*, 415/2002, p. 859-860.
164. SIMS, M. – FIRST, N.L.: Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91/1994, p. 6143-6147.
165. SIRRI, V. – ROUSSEL, P. – HERNANDEZ-VERDUN, D.: The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. In: *Micron*, 31/2000, p. 121-126.
166. STICE, S.L. – ROBL, J.M.: Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. In: *Biol. Reprod.*, 39/1988, p. 657-664.
167. SUNG, L.Y. – GAO, S. – SHEN, H. – YU, H. – SONG, Y. – SMITH, S.L. – CHANG, C.C. – INOUE, K. – KUO, L. – LIAN, J. – LI, A. – TIAN, X.C. – TUCK, D.P. – WEISSMAN, S.M. – YANG, X. – CHENG, T.: Differentiated cells are more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. In: *Nat. Genet.*, 38/2006, p. 1323-1328.
168. SVARCOVA, O. – LAURINCIK, J. – AVERY, B.: Nucleolar development and allocation of key nucleolar proteins require de novo transcription in bovine embryos. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 74/2007, p. 1428-1435.
169. SVARCOVA, O. – STREJCEK, F. – PETROVICOVA, I.: The role of RNA polymerase I transcription and embryonic genome activation in nucleolar development in bovine preimplantation embryos. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 76/2008, p. 1095-1103.
170. SVARCOVA, O. – DINNYES, A. – POLGAR, Z.: Nucleolar reactivation is delayed in mouse embryos cloned from two different cell lines. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 76/2009, p. 132-141.
171. TAMASHIRO, K.L. – WAKAYAMA, T. – BLANCHARD, R.J. – BLANCHARD, D.C. – YANAGIMACHI, R.: Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. In: *Biol. Reprod.*, 63/2000, p. 328-234.
172. TELFORD, N.A. – WATSON, A.J. – SCHULTZ, G.A.: Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 26/1990, p. 90-100.
173. TESARIK, J. – KOPECNY, V. – PLACHOT, M.A. – MANDELBAUN, J.: Highresolution autoradiographic localization of DNA-containing sites and RNA synthesis in developing nucleoli of human preimplantation embryos: a new concept of embryonic nucleogenesis. In: *Development*, 101/1987, p. 777-791.
174. THOMPSON, E.M.: Chromatin structure and gene expression in the preimplantation mammalian embryo. In: *Reprod. Nutr. Dev.*, 36/1996, p. 619-635.

175. THONGPHAKDEE, A. – NUMCHAIKRIKA, P. – OMSONGKRAM, S.: In vitro development of marbled cat embryos derived from interspecies somatic cell nuclear transfer. In: *Reprod. Domest. Anim.*, 41/2006, p. 219-226.
176. TIAN, X.C. – KUBOTA, C. – SAKASHITA, K. – IZAIKE, Y. – OKANO, R. – TABARA, N. – CURCHOE, C. – JACOB, L. – ZHANG, Y. – SMITH, S. – BORMANN, C. – XU, J. – SATO, M. – ANDREW, S. – YANG, X.: Meat and milk compositions of bovine clones. In: *Proc. Acad. Sci. USA*, 102/2005, p. 6261-6266.
177. TOMANEK, M. – KOPECNY, V. – KANKA, J.: Genome reactivation in developing early pig: an ultrastructural and autoradiographic analysis. In: *Anat. Embryol. (Berl)*, 180/1989, p. 309-316.
178. TOTH, S. – HUNEAU, D. – BANREZES, B. – OZIL, J.P.: Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse. In: *Reproduction*, 113/2006, p. 27-34.
179. TROJAN, S. – LANGMEIER, M.: *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2003, 772 s., ISBN 80-247-0512-5.
180. VAJTA, G. – LEWIS, I.M. – TROUNSON, A.O. – PURUP, S. – MADDOX-HYTTEL, P. – SCHMIDT, M. – PEDERSEN, H.G. – GREVE, T. – CALLESEN, H.: Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. In: *Biol. Reprod.*, 68(2)/2003, p. 571-578.
181. VERHENGEN, 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. In: *J. Cell. Biol.*, 149/2000, p. 293-305.
182. VIUFF, D. – GREVE, T. – AVERY, B. – HYTTEL, P. – BROCKHOFF, P.B. – THOMPSEN, P.D.: Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination. In: *Biol. Reprod.*, 63/2000, p. 1143-1148.
183. VIUFF, D. – HYTTEL, P. – AVERY, B. – VAJTA, G. – GREVE, T. – CALLESEN, H. – THOMPSEN, P.D.: Ribosomal ribonucleic acid is transcribed at the 4-cell stage in in vitro-produced bovine embryos. In: *Biol. Reprod.*, 59/1998, p. 626-63
184. WACHTLER, F. – STAHL, A.: The nucleolus: a structural and functional interpretation. In: *Micron.*, 24/1993, p. 505.
185. WADMAN, M.: Dolly: a decade on. In: *nature*, 445/2007, p. 800-801.
186. WAKAYAMA, S. – OHTA, H. – HIKICHI, T. – MIZUTANI, E. – IWAKI, T. – KANAGAWA, O. – WAKAYAMA, T.: Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20°C for 16 years. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105/2008, p. 17318-17322.
187. WAKAYAMA, T. – YANAGIMACHI, R.: Cloning of male mice from adult tail-tip cells. In: *Nat. Genet.*, 22/1999, p. 127-128.

188. WAKAYAMA, T. – PERRY, A.C. – ZUCCOTI, M. – JOHNSON, K.R. – YANAGIMACHI, R.: Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. In: *Nature*, 394/1998, p. 369-374.
189. WAKAYAMA, T. – RODRIGUEZ, I. – PERRY, A.C. – YANAGIMACHI, R. – MOMBAERTS, P.: Mice cloned from embryonic stem cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96/1999, p. 14984-14989.
190. WAKAYAMA, T. – SHINKAI, Y. – TAMASHIRO, K.L. – NIDA, H. – BLANCHARD, D.C. – BLANCHARD, R.J. – OGURA, A. – TANEMURA, K. – TACHIBANA, M. – PERRY, A.C. – COLGAN, D.F. – MOMBAERTS, P. – YANAGIMACHI, R.: Cloning of mice to six generations. In: *Nature*, 407/2000, p. 318-319.
191. WANG, D. – BAUMANN, A. – SZEBENI, A. – PLSON, M.O.: The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23. 1 resides in its carboxyl-terminal end. In: *J. Biol. Chem.*, 269/1994, p. 30994-30998.
192. WANI, N.A. – WERNERY, U. – HASSAN, F.A.H. – WERNERY, R. – SKIDMORE, J.A.: Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. In: *Biol. Reprod.*, 82/2010, p. 373-379.
193. WATSON, A.J. – WESTHUSIN, M.E. – DE SOUSA, P.A. – BETTS, D.H. – BARCROFT, L.C.: Gene expression regulating blastocyst formation. In: *Theriogenology*, 51/1999, p. 117-133.
194. WEE, G. – SHIM, J.J. – KOO, D.B. – CHAE, J.I. – LEE, K.K. – HAN, Y.M.: Epigenetic alternation of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. In: *Reproduction*, 134/2007, p. 781-787.
195. WILLADSEN, S.M.: Nuclear transplantation in sheep embryos. In: *Nature*, 320/1986, p. 63-65.
196. WILLIAMS, J.B. – SHIRT, T. – LIU, L.: Cloning of exotic/endangered species: desert bighorn sheep. In: *Methods Mol. Biol.*, 348/2006, p. 169-182.
197. WILMUT, I. – SCHNIEKE, A.E. – McWHIR, J. – KIND, A.J. – CAMPBELL, K.H.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. In: *Nature*, 385/1997, p. 810-813.
198. WONGSRIKEAO, P.- NAGAI, T. – AGUNG, B. – TANIGUCHI, M. – KUNISHI, M. – SUTO, S. – OTOI, T.: Improvement of transgenic cloning efficiencies by culturing recipient oocytes and donor cells with antioxidant vitamins in cattle. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 74/2006, p. 694-702.
199. WOODS, G.L. – WHITE, K.L. – VANDERWALL, D.K. – LI, G.P. – ASTON, K.I. – BUNCH, T.D. – MEERDO, L.N. – PATE, B.J.: A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. In: *Science*, 301/2003, p. 1063.

200. WRIGHT, J.E. – MAIS, C. – PRIETO, J.L.: A role for upstream binding factor in organizing ribosomal gene chromatin. In: *Biochem. Soc. Symp.*, 2006, p. 77-84.
201. YANG, X. – SMITH, S.L. – TIAN, X.C. – LEWIN, H.A. – RENARD, J.P. – WAKAYAMA, T.: Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. In: *Nat. Genet.*, 39/2007, p. 295-302.
202. YANG, X. – TIAN, X.C. – KUBOTA, C. – PAGE, R. – XU, J. – CIBELLI, J. – SEIDEL, Jr., G.: Risk assessment of meat and milk from cloned animals. In: *Nat. Biotech.*, 25/2007, p. 77-83.
203. YIN, X.J. – CHO, S.K. – PARK, M.R.: Nuclear remodelling and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes under delayed-activated conditions. In: *Zygote.*, 11/2003, p. 167-174.
204. YOUNG, D.W. – HASSAN, M.Q. – PRATAP, J.: Mitotic occupancy and lineage-specific transcriptional control of rRNA genes by Runx2. In: *Nature*, 445/2007, p. 442-446.
205. ZATSEPINA, O. – BALY, C. – CHEBROUT, M. – DEBAY, P.: The step-wise assembly of a functional nucleolus in preimplantation mouse embryos involves the cajal (coiled) body. In: *Dev. Biol.*, 253/2003, p. 66-83.
206. ZAVOS, P.M. – ILLMENSEE, K.: Possible therapy of male infertility by reproductive cloning: one cloned human 4-cell embryo. In: *Arch. Androl.*, 52/2006, p. 243-254.
207. ZHAO, J. – HAO, Y. – ROSS, J.W. – SPATE, L.D. – WALTERS, E.M. – SAMUEL, M.S. – RIEKE, A. – MURPHY, C.N. – PRATHER, R.S.: Histone deacetylase inhibitors improve in vitro and in vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. In: *Cell. Reprogramming*, 12/2010, p. 75-83.
208. ZHAO, Z.J. – OUYANG, Y.C. – NAN, C.L.: Rabbit oocyte cytoplasm supports development of nuclear transfer embryos derived from the somatic cells of the camel and Tibetan antelope. In: *J. Reprod. Dev.*, 52/2006, p. 449-459.
209. ZHAO, J. – ROSS, J.W. – HAO, Y. – SPATE, L.D. – WALTERS, E.M. – SAMUEL, M.S. – RIEKE, A. – MURPHY, C.N. – PRATHER, R.S.: Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. In: *Biol. Reprod.*, 81/2009, p. 525-530.
210. ZHOU, Q. – RENARD, J.P. – FRIEC, G. – BROCHARD, V. – BEAUJEAN, N. – CHERIFI, Y. – FRAICHARD, A. – COZZI, J.: Generation of fertile cloned rats using controlled timing of oocyte activation. In: *Science*, 302/2003, p. 1179.

### Internetové zdroje:

1. Aktuality. sk: Fotogaléria: Klony útočia! Do obchodov, na naše taniere.  
<http://www.aktuality.sk/fotogaleria/174504/klony-utocia-do-obchodov-na-nase-taniere/3>  
(2011-05-25)
2. Baby online: Umělé oplození a časný vývoj mimo mateřský organizmus („ve zkumavce“).  
<http://www.babyonline.cz/vyvoj-miminka/fota-z-ivf> (2011-09-29)
3. Children of God For Life: One method of cloning-Somatic cell nuclear transfer.  
<http://www.cogforlife.org/scnt.htm> (2012- 02-19)
4. Cloning: A Ban on Human Cloning that actually Bans Human Cloning!  
<http://www.marymeetsdolly.com/blog/index.php/?archives/2011/03/C6.html> (2011-10-08)
5. Cosmetic pl: Na počiatku bola koža (časť šiesta – kožné bunky).  
<http://www.cosmetic.pl/pro/index.php?grupa=6&art=1140551511&dzi=1130183233>  
(2012-02-23)
6. Department of Molecular Medicine and Biotechnology: Ribosome biogenesis.  
<http://www.molmedbiotech.com/view.asp?idp=3&c=4> (2012-03-31)
7. Fertility: Techniky asistovanej reprodukcie.  
[http://www.fertility.sk/sk\\_SK/riesenie-problemov/techniky-asistovanej-reprodukcie/techniky-asistovanej-reprodukcie.html](http://www.fertility.sk/sk_SK/riesenie-problemov/techniky-asistovanej-reprodukcie/techniky-asistovanej-reprodukcie.html) (2011-09-19)
8. Genea, World leaders in fertility: Somatic Cell Nuclear Transfer.  
<http://www.genea.com.au/Our-Science/Somatic-Cell-Nuclear-Transfer/Somatic-Cell-Nuclear-Transfer> (2012-01-10)
9. IVF Zentren Prof. Zech: Umělé oplodnění = oplodnění ve zkumavce (in vitro fertilizace – IVF). <http://www.ivf.at/cs-cz/behandlung/k%C3%BCnstlichebefruchtung.aspx> (2011-05-15)
10. Nobelprize.org: Biography.  
[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1935/spemann-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1935/spemann-bio.html) (2012-02-12)
11. Objective Source E-learning – OSEL: Oplození na hlavě.  
<http://www.osel.cz/index.php?clanek=1156&akce=show2&dev=1> (2012-04-16)
12. Pôdohospodársky poradenský systém: Význam tvorby klonovaných jedincov.  
<http://www.agroporadenstvo.sk/zv/ostatne/klonovanie.htm> (2011-06-27)
13. Science photo library: Cancer cell nucleolus, TEM.  
<http://www.sciencephoto.com/media/254333/enlarge> (2012-03-21)
14. Science photo library: Cell nucleolus, TEM.  
<http://www.sciencephoto.com/media/214809/enlarge> (2012-03-20)



15. Science photo library: In vitro fertilisation.  
<http://www.sciencephoto.com/media/288668/enlarge> (2011-10-20)
16. Science progress: Pro-life?, Pro-cloning?  
<http://scienceprogress.org/2008/10/pro-life-pro-cloning/> (2012-01-15)
17. Transcription Outline: Eukaryotic RNA Synthesis-Processing of pre-rRNA (Figure 29-23).  
<http://oregonstate.edu/instruction/bb451/fall11/lecturesecampus/transcriptionoutline.html>  
(2012-03-10)
18. Ultrastructure of the nucleolus.  
<http://users.path.ox.ac.uk/~pcook/students/Figs/nuem.png> (2011-10-02)
19. Wikipedia, slobodná encyklopédia: Jadierko.  
<http://sk.wikipedia.org/wiki/Jadierko> (2011-12-12)
20. Život online: Dolly sa narodila pred pätnástimi rokmi, dlho to tajili.  
<http://zivot.lesk.cas.sk/clanok/9584/dolly-sa-narodila-pred-patnastimi-rokmi-dlho-to-tajili.html> (2011-10-07)
21. <http://www.sszdra-karvina.cz/bunka/bi/02pro/obr/ribozom.jpg> (2011-11-01)
22. <http://jpkc.scu.edu.cn/ywwy/zbsw%28E%29/edetail9.htm> (2012-04-04)