

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ZONA-FREE ПРИ КЛОНИРОВАНИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ (обзор)

Г.П. МАЛЕНКО^{1, 2}, А.В. КОМИССАРОВ³, О.И. СТЕПАНОВ¹,
Г.Ю. КОСОВСКИЙ¹

В современной биотехнологии широко дискутируется тема создания клонов млекопитающих. В представленном обзоре на основании данных литературы и результатов собственных исследований рассмотрены успехи и проблемы трансплантации ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT), используемой для этих целей, проведен сравнительный анализ традиционной процедуры SCNT и метода zona-free nuclear transfer (zona-free NT). Основные области применения SCNT — терапевтическое и репродуктивное клонирование, получение трансгенных животных, сохранение редких и исчезающих видов, фундаментальные исследования. Так, клонирование элитных быков-производителей позволяло бы воссоздавать их уникальный генетический материал, что невозможно при естественном воспроизводстве. Однако пока что клонирование животных не получило широкого распространения. Одна из причин — низкий выход здорового молодняка, который у крупного рогатого скота, например, составляет в среднем около 9 % от числа трансплантированных клонированных эмбрионов. Считается, что отклонения в развитии плода обусловлены нарушениями, имевшимися в процессе репрограммирования ядра соматической клетки. Хотя в настоящее время предложено несколько практических подходов, позволяющих повысить эффективность метода SCNT, проблема репрограммирования ядра как фундаментальный вопрос биологии развития требует дальнейшего глубокого изучения. Кроме того, проблемой, сдерживающей практическое применение метода SCNT, остается сложность исполнения манипуляций, предусмотренных традиционной технологией, которая была предложена около 30 лет назад S.M. Willadsen (1986) и используется до настоящего времени практически в неизменном виде. Вместе с тем существенный прогресс был достигнут при клонировании млекопитающих по так называемому zona-free NT методу, когда ооциты перед энуклеацией освобождают от блестящей оболочки. Впервые этот прием был успешно применен Т.Т. Реуга с соавт. (1998), донорами ядер blastомеров в их работе служили эмбрионы крупного рогатого скота. Метод оказался эффективен и при использовании соматических клеток для получения клонированных эмбрионов свиньи (P.J. Booth, 2001), овцы (Т.Т. Реуга, 2003), крупного рогатого скота (P.J. Booth с соавт., 2001), лошади (С. Galli с соавт., 2003). Zona-free NT метод был усовершенствован нами при получении клонированных эмбрионов крупного рогатого скота (Г.П. Маленко с соавт., 2006). В доступных источниках мы не встречали сообщений об использовании zona-free NT другими исследователями в России, хотя в мировой литературе признается, что по сравнению с традиционными приемами он более производительен, проще в исполнении и дает воспроизводимые результаты (I. Lagutina с соавт., 2007; В. Обак с соавт., 2007). При подготовке цитопластов энуклеация ооцитов без блестящей оболочки может проводиться без применения ядерных флуоресцентных красителей при эффективности 95-100 % и сохранении 96-97 % объема ооплазмы (М.И. Прокофьев с соавт., 2007). Частота электрослияния цитопластов без блестящей оболочки с соматическими клетками составляет 95-100 % (I. Lagutina с соавт., 2007; G.P. Malenko с соавт., 2007) по сравнению с 60-70 % при традиционном методе (I. Lagutina с соавт., 2007). Выход blastоцист оказывается равен или превышает этот показатель по сравнению с традиционным методом, результаты трансплантации также сопоставимы. Технология zona-free NT благодаря простоте исполнения и высокой результативности основных этапов рассматривается как эффективный протокол при создании клонированных эмбрионов сельскохозяйственных животных с целью получения жизнеспособного молодняка.

Ключевые слова: трансплантация ядер соматических клеток, метод zona-free, энуклеация, электрослияние, сельскохозяйственные животные.

Первая публикация об успешном переносе ядер клеток у млекопитающих вышла еще в 1981 году (1). Авторы сообщили о рождении трех мышей, полученных в результате трансплантации ядер клеток эмбриобласта в энуклеированные зиготы. Однако никто, включая авторов, не смог воспроизвести этот эксперимент. Спустя несколько лет сотрудник Кем-

бриджского университета S.M. Willadsen, специализирующийся в области эмбриологии сельскохозяйственных животных, совершил прорыв, получив первых клонированных ягнят в результате слияния blastomeres 8- и 16-клеточных эмбрионов с энуклеированной яйцеклеткой овцы (2). По методу S.M. Willadsen вскоре было получено клонированное потомство крупного рогатого скота и свиней (3, 4). Историческим в развитии технологии клонирования стало опубликованное в 1997 году сообщение о рождении овечки Долли (5), показавшее возможность полного репрограммирования ядра дифференцированной соматической клетки цитоплазмой энуклеированного ооцита-реципиента. Следом появились многочисленные публикации о клонировании эмбрионов на основе трансплантации ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) с последующей трансплантацией этих эмбрионов и рождением потомства у крупного рогатого скота (6, 7), мышей (8), коз (9), свиней (10, 11), кроликов (12), лошадей (13) и других видов животных.

Основные области применения SCNT — репродуктивное и терапевтическое клонирование, фундаментальные исследования. В практике животноводства с помощью клонирования могут быть созданы «копии» элитных быков, обладающих уникальным сочетанием генетического материала, повторение которого невозможно при естественном воспроизводстве. Рассматриваются перспективы метода клонирования для сохранения редких и исчезающих видов. Наибольшее прикладное значение SCNT связывают с трансгенезом животных. Эффективность микроинъекции генных конструкций в мужской пронулеус зиготы оказалась очень низкой в применении к сельскохозяйственным видам (14). В то же время клонирование позволяет получать трансгенных особей посредством использования соматических клеток, предварительно трансфицированных *in vitro*, в качестве доноров ядер. В результате эффективность повышается в десятки раз, что очень важно, когда речь идет о крупных сельскохозяйственных животных (6). Такие трансгенные фетальные фибробласты крупного рогатого скота сохраняют компетентность как доноры ядер в технологии SCNT (15). Описано рождение телят, трансгенных по фактору свертываемости крови человека 9 (hFIX), в эксперименте с применением этого подхода (16).

Основанный на использовании соматических клеток трансгенез совместим с целевыми генетическими модификациями при применении нуклеаз с доменом типа «цинковый палец» (zinc-finger nucleases, ZFNs), которые позволяют получать особей, нокаутных по специфическим эндогенным генам (17). В настоящее время в мире проводятся интенсивные исследования по трансгенезу свиней, пригодных в качестве доноров органов для ксенотрансплантации (18). Уже получены трансгенные свиньи — модели ряда болезней человека (19, 20).

Вместе с тем метод клонирования животных еще не нашел широкого распространения, главным образом из-за низкого выхода здорового молодняка. У крупного рогатого скота он составляет в среднем около 9 %. Отклонения в развитии у клонированных плодов в основном обусловлены нарушениями репрограммирования генома донорской клетки, в результате чего существенно нарушается экспрессия генов, в частности в плаценте (21, 22). Хотя в настоящее время предложено несколько практических подходов, позволяющих повысить эффективность SCNT (23-29), проблема репрограммирования ядра как фундаментальный вопрос биологии развития требует глубокого изучения и решения.

Еще одна проблема, сдерживающая развитие клонирования, —

это сложность техники исполнения ряда этапов SCNT. Существенный прогресс был достигнут с развитием клонирования млекопитающих по так называемому zona-free nuclear transfer методу (zona-free NT), когда ооциты перед энуклеацией освобождают от блестящей оболочки. Впервые он был успешно применен еще в 1998 году при клонировании крупного рогатого скота, донорами ядер служили бластомеры (30). Подход также оказался эффективным при использовании соматических клеток для создания клонированных эмбрионов свиньи (31), овцы (32, 33), крупного рогатого скота (33-38), лошади (13).

Zona-free NT метод был усовершенствован нами при получении клонированных эмбрионов крупного рогатого скота (39). В доступных нам источниках мы не встречали сообщений об использовании zona-free NT метода другими исследователями в России, хотя в мировой литературе признается, что по сравнению с традиционными приемами он более производительен, проще в исполнении и дает воспроизводимые результаты (40, 41). В настоящей работе, основываясь на данных литературы и собственных исследованиях, мы попытались провести сравнительный анализ основных этапов технологии SCNT при традиционном и zona-free методах клонирования крупного рогатого скота.

Ключевой процесс SCNT — репрограммирование ядра дифференцированной соматической клетки — происходит в результате непосредственного воздействия цитоплазмы ооцита на ядерный материал кариопласта. В качестве цитопластов-реципиентов, как правило, используют созревшие *in vitro* энуклеированные ооциты. Цитоплазма ооцитов крупного рогатого скота и свиней содержит много липидных гранул, и, как следствие, метафазная пластинка под микроскопом не видна. При удалении с первым полярным тельцем (polar body 1; PB1) 20-30 % объема цитоплазмы ооцита, прилегающей к PB1 (так называемая слепая энуклеация), энуклеированными оказываются только 42-60 % ооцитов (42-44), вследствие чего признается, что этот метод не подходит для подготовки цитопластов крупного рогатого скота (45).

Прижизненная окраска ооцитов флуоресцентным ядерным красителем Hoechst 33342 позволяет точно определить местонахождение и обеспечить эффективное (до 100 %) удаление материнских хромосом. Однако даже кратковременное воздействие ультрафиолетового света (УФ) может негативно сказаться на качестве цитопласта (44). Проведение энуклеации ооцитов крупного рогатого скота под контролем Oosight imaging system позволило вдвое увеличить эффективность SCNT по сравнению с использованием Hoechst 33342 в сочетании с УФ (46). Высокую степень энуклеации (95,7 %) без видимых отрицательных последствий обеспечило применение демеколцина (44).

Вне зависимости от того, как определяют местонахождение материнских хромосом, энуклеация ооцитов по традиционному методу выполняется при помощи микроманипулятора с использованием микроприсоски (holding pipette) и рабочей пипетки с заточенным под углом концом, желательна с дополнительным выступом (spike). Этот этап требует высокого мастерства исполнителя, которое приобретается в результате длительной практики.

По методу zona-free NT ооциты перед энуклеацией освобождаются от блестящей оболочки посредством обработки в растворе проназы. Последующая энуклеация может выполняться как ручным способом, так и с помощью микроманипулятора. По методу hand made cloning (HMC) ооциты острой бритвой разрезают пополам вручную под стереомикроскопом

(30, 33, 35, 47, 48). Половинки ооцитов окрашивают Hoechst 33342 и под микроскопом выявляют цитопласты, не содержащие ядерный материал.

По другому методу энуклеации, используемому в НМС, ооциты без блестящей оболочки обрабатывают в растворе демеколцина, под воздействием которого на поверхности ооцита появляется четко различимое под стереомикроскопом выпячивание цитоплазматической мембраны непосредственно в месте расположения метафазной пластинки. Эту часть ооцита отрезают бритвой, что позволяет отбирать цитопласты, не прибегая к их окрашиванию красителем Hoechst 33342 и последующему облучению УФ (49). Однако и в этом случае при энуклеации теряется около 25-30 % объема цитоплазмы ооцита, поэтому для получения одного реконструированного эмбриона по методу НМС необходимы два цитопласта. Реконструированные эмбрионы могут содержать до трех типов митохондриальной ДНК (митохондриальная гетероплазмия).

При помощи микроманипулятора энуклеация ооцитов без блестящей оболочки осуществляется без микроприсоски. При этом число энуклеированных ооцитов за определенный период времени оказывается в 2-3 раза выше по сравнению с традиционной энуклеацией ооцитов в блестящей оболочке (41), а количество цитоплазмы, удаляемой вместе с материнскими хромосомами, составляет менее 4 % от объема ооцита (38). Поэтому в качестве цитопласта используется один энуклеированный ооцит, что особенно важно при работе с такими видами животных, у которых доступно ограниченное число ооцитов, например с лошадьми (41). Местонахождение хромосом ооцита и достоверность энуклеации при этом также контролируются посредством окрашивания Hoechst 33342 с последующим применением УФ (32, 38, 41).

Мы предложили модифицированный метод слепой энуклеации ооцитов крупного рогатого скота без блестящей оболочки. Ооциты освобождали от клеток кумулюса и блестящей оболочки через 16 ч от начала дозревания *in vitro*. Ооциты с полярными тельцами сразу отбирали для энуклеации. Остальные клетки возвращали в среду дозревания и просматривали их с интервалом 30 мин, каждый раз отбирая ооциты с РВ1. По данным литературы, удаление клеток кумулюса через 15 ч от начала дозревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* не снижает степень их ядерного дозревания и не влияет на последующее развитие партеногенетически активированных или реконструированных эмбрионов (50, 51). По нашим данным, к 16,5 ч от начала дозревания около 25 % ооцитов крупного рогатого скота выделили РВ1, к 18 ч около 50 % ооцитов достигли стадии МП. При этом удаление клеток кумулюса с применением Vortex в растворе гиалуронидазы, а также энзиматическое удаление блестящей оболочки в эти сроки не приводило к отделению РВ1 с поверхности дозревших ооцитов (52). Поскольку в отсутствие блестящей оболочки первое полярное тельце РВ1 остается на поверхности ооцита только при сохранении связи с метафазной пластинкой, РВ1 служит точным указателем расположения материнских хромосом (53).

Энуклеацию ооцитов проводили при помощи микроманипулятора и рабочей микропипетки с ровно обрезанным концом диаметром 20-25 мкм. Конец пипетки подводили к РВ1 и аспирировали его вместе с небольшим участком прилегающей цитоплазмы. То есть энуклеация выполнялась слепым методом без дополнительных обработок демеколцином или ядерным красителем Hoechst 33342 и воздействия УФ. При этом эффективность энуклеации составляла 97-100 %, лизис цитопластов практически не наблюдался, а потери цитоплазмы ооцита не пре-

вышали 3 % его исходного объема (52).

Для получения реконструированных эмбрионов в некоторых случаях применяют микроинъекцию изолированного ядра или целой соматической клетки-донора ядра в цитопласт. Однако наиболее часто объединение клетки-донора ядра и цитопласта осуществляют посредством электрослияния. При традиционном методе клонирования соматическая клетка с помощью микропипетора из микропипетки помещается под блестящую оболочку, по возможности вплотную к плазматической мембране цитопласта. Одно из важнейших условий для успешного электрослияния — тесный контакт мембран клеток. Однако в перивителлиновом пространстве под блестящей оболочкой такой контакт между цитопластом и соматической клеткой, существенно различающимися по своим размерам, вероятно, не всегда достигается. Как правило, степень электрослияния составляет 50-70 % от числа подготовленных и подвергнутых воздействию электроимпульса конструкций. По данным I. Lagutina с соавт. (41), эффективность электрослияния при клонировании по традиционному методу у крупного рогатого скота не превышает 60-70 %, у лошадей — 65-83 %.

По методу zona-free NT конструкции «цитопласт—соматическая клетка» готовят вручную под стереомикроскопом, используя раствор фитогемагглютинина. В камере для электрослияния мы ориентировали каждую такую конструкцию относительно электродов вручную без воздействия переменного электрического поля как до, так и после импульса. Частота электрослияния в наших экспериментах достигала 95-100 % (52). Согласно I. Lagutina с соавт. (41), по zona-free методу этот показатель составлял у крупного рогатого скота и лошадей 96-100 %.

При использовании фитогемагглютинина возможно также автоматическое ориентирование группы из нескольких конструкций «цитопласт—соматическая клетка» под воздействием переменного электрического поля в камере с прямоугольными в сечении параллельными электродами длиной 35 мм, расположенными на расстоянии 3 мм друг от друга (37, 38, 54).

Кариопласт в составе реконструированного эмбриона подвергается комплексному воздействию со стороны цитоплазмы ооцита, в результате чего исходный ядерный материал дифференцированной соматической клетки может пройти репрограммирование и приобрести свойства тотипотентной клетки. Именно в цитоплазме ооцитов на стадии МП содержатся факторы, способствующие репрограммированию ядер дифференцированных клеток (2, 5).

В естественных условиях эмбриональное развитие запускается процессом активирования, когда в цитоплазме зрелого ооцита под воздействием волнового увеличения концентрации ионов кальция, вызванного пенетрацией сперматозоида, снижается количество фактора дозревания (maturation promoting factor, MPF). Реконструированные эмбрионы должны быть искусственно активированы, для чего (независимо от метода клонирования) используются как химические вещества, так и физические воздействия. При этом начиная с этапа активирования реконструированные эмбрионы без блестящей оболочки требуют индивидуального размещения для предотвращения агрегации. На этапе активирования при инкубации реконструированных эмбрионов в течение 4 ч в среде, содержащей 2 мМ DMAP (6-диметиламинопурин), эта проблема решается посредством их размещения по одному в микрокаплях среды по 5 мкл, покрытых вазелиновым маслом.

В дальнейшем реконструированные эмбрионы крупного рогатого

скота должны культивироваться в течение 6-7 сут до достижения ранних предимплантационных стадий развития, пригодных как для криоконсервации, так и для нехирургической трансплантации реципиентам. Индивидуальное культивирование эмбрионов крупного рогатого скота успешно проводят в небольших каплях среды (30, 38, 55, 56, 57). Вместе с тем имеются многочисленные данные, свидетельствующие о том, что эффективность развития эмбрионов при индивидуальном культивировании может существенно снижаться по сравнению с культивированием в группах. Кроме того, эмбрионы без блестящей оболочки в каплях на плоской поверхности дна чашки могут утратить отдельные бластомеры до достижения стадии компактизации. Поэтому для культивирования эмбрионов, лишенных блестящей оболочки, перспективной оказывается система культивирования the Well of the Well (WOW) (58).

Метод приготовления мелких углублений на дне пластиковой чашки Петри посредством механического надавливания кончиком холодной препаральной иглы на дно под каплей среды был предложен еще в 1993 году (59). В этой и следующей работе (60) система использовалась для агрегации эмбриональных стволовых клеток с эмбрионами мыши при создании химер. Небольшие по размеру углубления представляли удобные ячейки для индивидуального размещения освобожденных от блестящей оболочки дробящихся эмбрионов мыши. Коническая форма дна углубления способствовала поддержанию контакта между бластомерами и стволовыми клетками. Более того, в такой системе в непосредственной близости к эмбриону находится исключительно небольшой объем среды, приблизительно 0,04 мкл. Благодаря этому в процессе культивирования предположительно ограничивается разбавление аутокринных факторов, что благотворно влияет на развитие эмбрионов (49, 61).

В системе WOW общий объем среды составляет 0,5 мл на лунку четырехгнездного планшета, что позволяет проводить этап культивирования эмбрионов без замены среды. Недостаток системы WOW заключается только в необходимости готовить углубления в лунках планшетов вручную, поскольку планшеты такого профиля заводским (фирменным) способом в настоящее время в мире еще не производятся. В наших экспериментах (метод zona-free NT) выход клонированных бластоцист крупного рогатого скота при культивировании эмбрионов без блестящей оболочки в системе WOW составлял от 33 до 48 % от общего числа реконструированных эмбрионов (52).

По методу zona-free NT получены трансгенные овцы с повышенным содержанием в молоке омега-3 жирных кислот (62). При этом авторы также отметили, что zona-free NT метод не уступает по эффективности традиционному SCNT методу, но менее затратен и более прост в исполнении. Сотрудники института, в котором с использованием метода zona-free NT впервые в мире была клонирована лошадь (Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani, Италия) (13), на основании собственных исследований и данных литературы сравнили этот метод с традиционным в отношении клонирования эмбрионов и молодняка крупного рогатого скота, лошадей, овец и свиней. По мнению авторов, отсутствие блестящей оболочки у ооцитов существенно облегчает этап энуклеации и достоверно увеличивает эффективность электрослияния цитопласта и соматической клетки. Выход бластоцист оказывается равен или превышает эти показатели по сравнению с традиционным методом, выживание после криоконсервирования и результаты трансплантации при этом сопоставимы (41).

Таким образом, при использовании метода zona-free nuclear transfer

(zona-free NT) цитопласты готовят из зрелых ооцитов, предварительно освобожденных от блестящей оболочки. В целом эта технология проще в исполнении и обеспечивает более высокую эффективность по сравнению с традиционными способами, в связи с чем метод zona-free NT рассматривается как перспективный для получения клонированных эмбрионов, а в дальнейшем жизнеспособного молодняка сельскохозяйственных животных. В предложенной нами модификации этого метода энуклеация ооцитов проводится на микроманипуляторе с помощью простого в изготовлении микроинструмента без применения ядерных флуоресцентных красителей. При этом эффективность энуклеации составляет 95-100 % при сохранении 96-97 % объема ооплазмы и отсутствии лизиса цитопластов. Электрослияние конструкций цитопласт—соматическая клетка, подготовленных с применением фитогемагглютинаина, достигает 95-100 %.

Получение клонированных эмбрионов крупного рогатого скота методом zona-free NT проводилось под руководством академика РАСХН М.И. Прокофьева в отделе «Биотехцентр» НИИ пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева (Московская обл., Ленинский р-н, Горки Ленинские) при финансовой поддержке ООО «Биолайн Фармторг» (г. Москва).

ЛИТЕРАТУРА

1. Illmensee K., Hoppe P.C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*. Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell*, 1981, 23: 9-18 (doi: 10.1016/0092-8674(81)90265-8).
2. Willadsen S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 1986, 320: 63-65 (doi: 10.1038/320063a0).
3. Prather R.S., Barnes F.L., Sims M.M., Robl J.M., Eyestone W.H., First N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 1987, 37: 859-866 (doi: 10.1095/biolreprod37.4.859).
4. Prather R.S., Sims M.M., First N.L. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.*, 1989, 41: 414-418 (doi: 10.1095/biolreprod41.3.414).
5. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810-813 (doi: 10.1038/385810a0).
6. Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon A., Robl J.M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280: 1256-1258 (doi: 10.1126/science.280.5367.1256).
7. Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J.-ya., Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, 282: 2095-2098 (doi: 10.1126/science.282.5396.2095).
8. Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394: 369-374.
9. 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. *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17: 456-461.
10. Betthausen J., Forsberg E.G., Augenstein M., Childs L., Eilertsen K., Enos J., Forsythe T., Golueke P., Jurgella G., Koppang R., Lesmeister T., Mallon K., Mell G., Misica P., Pace M., Pfister-Genskow M., Strelchenko N., Voelker G., Watt S., Thompson S., Bishop M. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18: 1055-1059 (doi: 10.1038/80242).
11. Polejaeva I.A., Chen S.H., Vaught T.D., Page R.L., Mullins J., Ball S., Dai Y., Boone J., Walker S., Ayares D.L., Colman A., Campbell K.H.S. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407: 86-90 (doi: 10.1038/35024082).
12. Chesné P., Adenot P.G., Viglietta C., Baratte M., Boulanger L., Renard J.P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20: 366-369 (doi: 10.1038/nbt0402-366).

13. Galli C., Lagutina I., Crotti G., Colleoni S., Turini P., Ponderato N., Duchì R., Lazzari G. A cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 2003, 424: 635.
14. Niemann H., Kues W.A. Transgenic farm animals: an update. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2007, 19: 762-770 (doi: 10.1071/RD07040).
15. Bressan F.F., Miranda M.S., Bajgelman M.C., Perecin F., Mesquita L.G., Fantinato-Neto P., Merighe G.F.K., Strauss B.E., Meirelles F.V. Effects of long-term in vitro culturing of transgenic bovine donor fibroblasts on cell viability and in vitro developmental potential after nuclear transfer. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 2013, 49: 250-259 (doi: 10.1007/s11626-013-9592-6).
16. Monzani P.S., Sangalli J.R., de Bem T.H., Bressan F.F., Fantinato-Neto P., Pimentel J.R.V., Birgel-Junior E.H., Fontes A.M., Covas D.T., Meirelles F.V. Breeding of transgenic cattle for human coagulation factor IX by a combination of lentiviral system and cloning. *Genet. Mol. Res.*, 2013, 12(AOP) (doi: 10.4238/2013.February.28.25).
17. Hauschild J., Petersen B., Santiago Y., Bressan F.F., Fantinato-Neto P., Pimentel J.R.V., Birgel-Junior E.H., Fontes A.M., Covas D.T., Meirelles F.V. Efficient generation of a biallelic knockout in pig using zinc-finger nucleases. *PNAS USA*, 2011, 108: 12013-12017 (doi: 10.1073/pnas.1106422108).
18. Niemann H., Lucas-Hahn A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012, 47(Suppl. 5): 2-10 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02121.x).
19. Kragh P.M., Nielsen A.L., Li J., Yutao Du, Lin Lin, Schmidt M., Bøgh I.B., Holm I.E., Jakobsen J.E., Johansen M.G., Purup S., Bolund L., Vajta G. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res.*, 2009, 18: 545-558 (doi 10.1007/s11248-009-9245-4).
20. Renner S., Fehlings C., Herbach N., Hofmann A., von Waldthausen D.C., Kessler B., Ulrichs K., Chodnevskaia I., Moskalenko V., Amselgruber W., Goke B., Pfeifer A., Wanke R., Wolf E. Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes*, 2010, 59: 1228-1238 (doi: 10.2337/db09-0519).
21. Humpherys D., Eggan K., Akutsu H., Friedman A., Hochedlinger K., Yanagimachi R., Lander E.S., Golub T.R., Jaenisch R. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *PNAS USA*, 2002, 99: 12889-12894 (doi: 10.1073/pnas.192433399).
22. Chavatte-Palmer P., Camous S., Jammes H., Le Cleach N, Guillemot M., Lee R.S.F. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta*, 2012, 33(Suppl): S99-S104 (doi: 10.1016/j.placenta.2011.09.012).
23. Akagi S., Matsukawa K., Mizutani E., Fukunari K., Kaneda M., Watanabe S., Takashi S. Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. *J. Reprod. Dev.*, 2011, 57: 120-126 (doi: 10.1262/jrd.10-058A).
24. Jafarpour F., Hosseini S.M., Hajian M., Forouzanfar M., Ostadhosseini S., Abedi P., Gholami S., Ghaedi K., Gourabi H., Shahverdi A.H., Taghi Vosough A.D., Nasr-Esfahani M.H. Somatic cell-induced hyperacetylation, but not hypomethylation, positively and reversibly affects the efficiency of in vitro cloned blastocyst production in cattle. *Cellular Reprogramming*, 2011, 13: 483-493 (doi: 10.1089/cell.2011.0005).
25. Lee M.-H., Kim S.-W., Lee H.-G., Im G.-S., Yang B.-C., Kim N.-H., Kim D.-H. Trichostatin A promotes the development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *J. Reprod. Dev.*, 2011, 57: 34-42 (doi: 10.1262/jrd.10-012A).
26. Su J., Wang Y., Li Y., Li R., Qian Li, Wu Y., Quan F., Liu J., Guo Z., Zhang Y. Oxamflatin significantly improves nuclear reprogramming, blastocyst quality, and in vitro development of bovine SCNT embryos. *PLoS ONE*, 2011, 6: e23805 (doi: 10.1371/journal.pone.0023805).
27. Wang Y., Su J., Wang L., Xu W., Quan F., Liu J., Zhang Y. The effects of 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on gene expression and DNA methylation status in cloned bovine blastocysts. *Cell Reprogram.*, 2011, 13: 97-306 (doi: 10.1089/cell.2010.0098).
28. Oh H.J., Lee T.H., Lee J.H., Lee B.C. Trichostatin A improves preimplantation development of bovine cloned embryos and alters expression of epigenetic and pluripotency genes in cloned blastocysts. *J. Vet. Med. Sci.*, 2012, 74: 1409-1415 (doi: 10.1292/jvms.11-0510).
29. Liu J., Wang Y., Su J., Xu W., Quan F., Liu J., Zhang Y. Nuclear donor cell lines considerably influence cloning efficiency and the incidence of large offspring syndrome in bovine somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Domest. Anim.*, 2013, Jan 16 (doi:

10.1111/rda.12140).

30. Peura T.T., Lewis I.M., Trounson A.O. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. *Mol. Reprod. Dev.*, 1998, 50: 185-191 (doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199806)50:2<185::AID-MRD9>3.0.CO;2-G).
31. Booth P.J., Tan S.J., Holm P., Callesen H. Application of the zona-free manipulation technique to porcine somatic nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 2001, 3: 191-197 (doi: 10.1089/15362300152725909).
32. Peura T.T. Improved in vitro development rates of sheep somatic nuclear transfer embryos by using a reverse-order zona-free cloning method. *Cloning Stem Cells*, 2003, 5: 13-24 (doi: 10.1089/153623003321512120).
33. Peura T.T., Vajta G. A comparison of established and new approaches in ovine and bovine nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 2003, 5: 257-277 (doi: 10.1089/153623003772032772).
34. Booth P.J., Tan S.J., Reipurth R., Holm P., Callesen H. Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique. *Cloning Stem Cells*, 2001, 3: 139-150 (doi: 10.1089/153623001753205098).
35. Peura T.T., Lane M., Vajta G., Trounson A.O. Cloning of bovine embryos from vitrified donor blastomeres. *J. Reprod. Fertil.*, 1999, 116: 95-101 (doi: 10.1530/jrf.0.1160095).
36. Peura T.T., Lane M., Levis I., Trounson A.O. Development of bovine embryo-derived clones after increasing rounds of nuclear recycling. *Mol. Reprod. Dev.*, 2001, 58: 384-389 (doi: 10.1002/1098-2795(20010401)58:4%3C384::AID-MRD5%3E3.0.CO;2-N).
37. Oback B., Wells D.N. Cloning cattle. *Cloning Stem Cells.*, 2003, 5: 243-256 (doi: 10.1089/153623003772032763).
38. Oback B., Wiersema A.T., Gaynor P., Laible G., Tucker F.C., Oliver J.E., Miller A.L., Troskie H.E., Wilson K.L., Forsyth J.T., Berg M.C., Cockrem K., McMillan V., Tervit H.R., Wells D.N. Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells*, 2003, 5: 3-12 (doi: 10.1089/153623003321512111).
39. Маленко Г.П., Прокофьев М.И., Пинюгина М.В., Антипова Т.А., Мезина М.Н., Букреев Ю.М. Получение клонированных эмбрионов крупного рогатого скота путем пересадки соматических клеток в энуклеированные ооциты без зоны пеллюиды. *Известия РАН. Серия биологическая*, 2006, 3: 284-291.
40. Oback B., Wells D.N. Cloning cattle: The methods in the madness. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007, 591: 30-57 (doi: 10.1007/978-0-387-37754-4_3).
41. Lagutina I., Lazzari G., Duchi R., Turini P., Tessaro I., Brunetti D., Colleoni S., Crotti G., Galli C. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology*, 2007, 67: 90-98 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.011).
42. Bordignon V., Smith L.C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.*, 1998, 49: 29-36 (doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199801)49:1%3C29::AID-MRD4%3E3.3.CO;2-T).
43. Dominko T., Chan A., Simerly C., Luetjens C.M., Hewitson L., Martinovich C., Schatten G. Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. *Bio. Reprod.*, 2000, 62: 150-154 (doi: 10.1095/biolreprod62.1.150).
44. Jeon B.-G., Betts D.H., King W.A., Rho G.-J. In vitro developmental potential of nuclear transfer embryos cloned with enucleation methods using pre-denuded bovine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.*, 2011, 46: 1035-1042 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01781.x).
45. Li G.-P., White K.L., Bunch T.D. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: State of the art. *Cloning Stem Cells*, 2004, 6: 5-13 (doi: 10.1089/15362300460743781).
46. Kim E.Y., Park M.J., Park H.Y., Noh E.J., Noh E.H., Park K.S., Lee J.B., Jeong C.J., Riu K.Z., Park S.P. Improved cloning efficiency and developmental potential in bovine somatic cell nuclear transfer with the oosight imaging system. *Cell Reprogram.*, 2012, 14: 305-311 (doi: 10.1089/cell.2011.0103).
47. Vajta G., Lewis I.M., Hyttel P., Thouas G.A., Trounson A.O. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*, 2001, 3: 89-95 (doi: 10.1089/15204550152475590).
48. 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. *Biol. Reprod.*, 2003, 68: 571-578 (doi: 10.1095/biolreprod.102.008771).
49. Vajta G., Maddox-Hyttel P., Skou C.T., Tecirlioglu R.T., Peura T.T., Lai L., Murphy C.N., Prather R.S., Kragh P.M., Callesen H. Highly efficient and reliable chemically assisted enucleation method for handmade cloning in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2005, 17: 791-797 (doi: 10.1071/RD05066).

50. Galli C., Lagutina I., Vassiliev I., Duchi R., Lazzari G. Comparison of microinjection (piezo-electric) and cell fusion for nuclear transfer success with different cell types in cattle. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4: 189-196 (doi: 10.1089/15362300260339476).
51. Li G.-P., Bunch T.D., White K.L., Rickords L., Liu Y., Sessions B.R. Denuding and centrifugation of maturing bovine oocytes alters oocyte spindle integrity and the ability of cytoplasm to support parthenogenetic and nuclear transfer embryo development. *Mol. Reprod. Dev.*, 2006, 73: 446-451 (doi: 10.1002/mrd.20436).
52. Malenko G.P., Stepanov O.I., Komissarov A.V., Antipova T.A., Pinyugina M.V., Prokofiev M.I. Efficiency of asynchronously in vitro-matured oocytes as recipients for nuclear transfer and of blind enucleation in zona-free bovine cloning. *Cloning Stem Cells*, 2009, 11: 287-292 (doi: 10.1089/clo.2007.0090).
53. Prokofiev M.I., Stepanov O.I., Komissarov A.V., Antipova T.A., Pinyugina M.V., Malenko G.P. Blind enucleation of oocytes is highly efficient in zona-free bovine cloning. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2007, 19: 156-157 (doi: 10.1071/RDv19n1Ab78).
54. Gaynor P., Wells D.N., Oback B. Couplet alignment and improved electrofusion by dielectrophoresis for a zona-free high-throughput cloned embryo production system. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 2005, 43: 150-154 (doi: 10.1007/BF02345137).
55. Carolan C., Lonergan P., Khatir H., Mermillod P. In vitro production of bovine embryos using individual oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 1996, 45: 145-150 (doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199610)45:2%3C145::AID-MRD6%3E3.0.CO;2-T).
56. Hagemann L.J., Weilert L.L., Beaumont S.E., Tervit R.H. Development of bovine embryos in single in vitro production (SIVP) systems. *Mol. Reprod. Dev.*, 1998, 51: 143-147 (doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199810)51:2%3C143::AID-MRD3%3E3.0.CO;2-Q).
57. Hagemann L.J., Beaumont S.E., Berg M., Donnison M.J., Ledger A., Peterson A.J., Schurmann A., Tervit H.R. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol. Reprod. Dev.*, 1999, 53: 451-458 (doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199908)53:4%3C451::AID-MRD11%3E3.0.CO;2-3).
58. Vajta G., Peura T.T., Holm P., Paldi A., Greve T., Trounson A.O., Callesen H. New method for culture of zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. *Mol. Reprod. Dev.*, 2000, 55: 256-264 (doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3%3C256::AID-MRD3%3E3.0.CO;2-7).
59. Nagy A., Rossant J. Production and analysis of ES cell aggregation chimeras. In: *Practical approach series: Gene targeting* /A.L. Joyner (ed.). Oxford University Press, Oxford, 1993: 177-206.
60. Wood S.A., Allen N.D., Rossant J., Auerbach A., Nagy A. Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimeras. *Nature*, 1993, 365: 87-89 (doi: 10.1038/365087a0).
61. Lopes A., Ottosen L.D.M., Greve T., Callesen H. Microsensor oxygen measurements around in-vitro developing cattle embryos: preliminary observations. *Theriogenology*, 2003, 59: 345.
62. Zhang P., Liu P., Dou H., Chen L., Chen L., Lin L., Tan P., Vajta G., Gao J., Du Y., Ma R.Z. Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 fatty acids. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e55941. Epub 2013 Feb 20 (doi: 10.1371/journal.pone.0055941).

*¹ФГБНУ Центр экспериментальной эмбриологии
и репродуктивных биотехнологий,*

127422 Россия, г. Москва, ул. Костякова, 12, стр. 4,
e-mail: galina_malenko@mail.ru;

*²ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
биотехнологии,*

127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42;

³ГБУЗ Родильный дом № 17,

127247 Россия, г. Москва, ул. 800-летия Москвы, 22

*Поступила в редакцию
21 августа 2014 года*

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2015, V. 50, № 4, pp. 420-430

PERSPECTIVE OF ZONA-FREE METHOD USE IN FARM ANIMAL CLONING (review)

G.P. Malenko^{1, 2}, A.V. Komissarov³, O.I. Stepanov¹, G.Yu. Kosovskii¹

¹Center for Experimental Embryology and Reproductive Biotechnology, Federal Agency of Scientific Organizations, str. 4, 12, ul. Kostyakova, Moscow, 127422 Russia, e-mail galina_malenko@mail.ru;

²All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Federal Agency of Scientific Organizations, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia;

³Maternity Hospital № 17, 22, ul. 800-letiya Moskvy, Moscow, 127247 Russia

Acknowledgements:

Bovine embryos cloning using zona-free NT was led by M.I. Prokof'ev and carried out in the Biotechcenter of V.A. Afanas'ev Research Institute of Fur Farming and Rabbit Breeding (Moscow Province, Leninskii Region, Gorki Leninskii).

Supported by LLC «Bioline Pharmtorg» (Moscow)

Received August 21, 2014

doi: 10.15389/agrobiology.2015.4.420eng

Abstract

The review is dedicated to one of the relevant and widely discussed topics of modern biotechnology, namely cloning of mammals. Particularly, the success and problems of the somatic nuclear transfer (SCNT) are discussed herein. The advantages and disadvantages of a commonly used SCNT and zona-free modification are compared based on special publications and the data obtained in our experiments. The most promising targets for the SCNT are reproductive cloning, therapeutic cloning and fundamental science. Conservation of rare and endangered species is also in focus. Nevertheless, to date the cloning application is still relatively limited. One of the reasons is a low yield of healthy offspring in mammals, for example, average yield in cattle is about 9 % of cloned embryo transfers result in birth of healthy offspring. It is assumed that deviations in the development of cloned fetuses are caused by disorders in genomic reprogramming of a somatic cell nucleus, which results in significant disturbance of gene expression particularly in placenta. Even though there are several practical techniques that allow to increase effectiveness of SCNT, reprogramming of the nucleus demands further study as one of the fundamental problems of developmental biology. Second problem that hinders practical application of SCNT method is complexity of the conventional technique, which was introduced about 30 years ago by S.M. Willadsen (1986). Since then the technique has been applied almost without any variations. At the same time significant progress has been achieved in the so called zona-free nuclear transfer method (zona-free NT), where oocytes are freed from zona pellucida before enucleation. This method was successfully applied for the first time by T.T. Peura et al. (1998). They used blastomeres of bovine embryo for electrofusion. The method was also effective for creation of cloned embryos of pig (P.J. Booth, 2001), sheep (T.T. Peura, 2003), cow (P.J. Booth et al., 2001), horse (C. Galli et al., 2003) using somatic cells. We have improved zona-free NT method for cattle embryo cloning (G.P. Malenko et al., 2006). In the available publications there are no references about zona-free NT use by other researchers in Russia while worldwide it is considered more simple, effective and reproducible method compared to a conventional one (I. Lagutina с соавт., 2007; B. Oback с соавт., 2007). Preparation of cytoplasts by enucleation of zona-free oocytes can be carried out without fluorescent dyes with effectiveness of 95-100 % and preservation of 96-97 % of ooplasm volume (M.I. Prokofiev et al., 2007). Electrofusion rate of zona-free cytoplasts and somatic cells is 95-100 % (I. Lagutina et al., 2007; G.P. Malenko et al., 2007) compared to 60-70 % achieved during conventional cloning (I. Lagutina et al., 2007). Blastocyst yield is equal or higher then yield produced by the conventional method. Embryo transfer results are comparable for both methods. Zona-free NT method may further increase the output of cloned embryos and offspring of the farm animals due to the simplicity and high effectiveness. Since the unique gene combinations of elite bulls' genotypes can not be copied by natural reproduction, their cloning is promising, particularly by means of zona-free NT—SCNT. SCNT application also seems to be the most prospective in animal transgenesis.

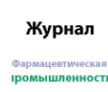
Keywords: somatic cell nuclear transfer, zona-free method, enucleation, electrofusion, farm animals.

Научные собрания

9-й МЕЖДУНАРОДНЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФОРУМ-ВЫСТАВКА РосБиоТех-2015

(28-30 октября 2015 года, г. Москва,

ЦВК «Экспоцентр», павильон 8, выставочный зал 4)



Контакты и информация: <http://www.rosbiotech.com>, info@rosbiotech.com