

PROJE SONUÇLARI

TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde üretilen klon embriyolar İstanbul ve Uludağ Üniversitesi'nde alıcı sığırlara transfer edilmiş, Uludağ Üniversitesi'nde iki adet klon buzağı doğumlarına 3 gün kala kaybedilmiş, İstanbul Üniversitesi'nde yapılan transfer sonucu üç klon buzağı (Efe, Ece ve Ecem) sağlıklı olarak sezeryan ile doğmuştur. Halen Uludağ Üniversitesi'nde de klon taşıyan 3 adet 7 aylık gebe inek bulunmaktadır.

Klonlama nedir?

TÜBİTAK-Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü
41470 Gebze/ Kocaeli
Doç.Dr.Sezen ARAT
sezen.arat@mam.gov.tr

GİRİŞ

Klonlama eşeysiz üreme yöntemiyle genetik yapısı birbirinin aynı canlıların oluşturulması anlamına gelmektedir. İlk klonlama çalışmaları embriyonun bölünmesi ve bir embriyodan birden fazla canlının oluşturulması ile 1980 yıllarının başlarında başlamış ancak 1997 yılında erişkin bir koyunun genetik kopyasının yapılmasıyla büyük bir ivme kazanmıştır. Son yıllarda içinde sığırların da bulunduğu çiftlik hayvanlarının klonlanması üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Klonlama teknolojisinin tarımda ve tıpta çok büyük bir uygulama alanı bulacağı gerek bilim adamlarının gerekse özel sektörün ortak görüşüdür. Bu teknolojinin çeşitli uygulama alanları vardır. Üstün genetik yapıya sahip ancak herhangi bir sebeple döl veremeyen veya ölmek üzere olan bir çiftlik hayvanı klonlanarak çoğaltılabilir. Bir başka uygulama alanı nesli tükenmekte olan ve az sayıda kaldığı için üretilmeyen hayvanların bu teknoloji kullanılarak çoğaltılmasıdır. Bunlara ilaveten genetik olarak değiştirilmiş klonlarda üretilebilir. Bu sayede özellikle hayvancılıkta genetik ıslahın çok kısa bir sürede tamamlanacağı, kaybolmakta olan genetik kaynakların koruma altına alınabileceği ve tedavi amaçlı olarak kullanılan birçok ilacın transgenik klon hayvanlardan büyük miktarlarda elde edilebileceği düşünülmektedir.

Klonlama teknolojisi 1970' li yılların sonunda memelilerde yavaş adımlarla ilerlemiş ancak son 7 yıl içinde çok büyük bir hızla ilerleyerek gerek biyomedikal gerekse tarımsal endüstrinin ilgi odağı haline gelmiştir (CAMPBELL, 1999; STICE, 2000; WOLF, 1998).

Teknik, ilk önceleri embriyoların bölünmesi ile bir embriyodan birden fazla embriyonun oluşturulması şeklinde başlamış, ancak nükleus transferi (NT) ile çiftlik hayvanlarında ilk başarılı klonlama, embriyonik hücreler vasıtasıyla 1986 yılında gerçekleşmiştir (WOLF, 1998). Daha sonra embriyodan elde edilen embriyonik hücrelerden 1996 yılında ilk koyun klonlaması yapılmış (CAMPBELL, 1996), ardından farklılaşmış bir hücrenin transferi yoluyla olgun bir hayvanın klonlanması ile en büyük adım atılmıştır (WILMUT, 1997).

Bunu takip eden yıllar içerisinde teknoloji hızla ilerlemiş ve günümüze kadar keçi, sığır ve domuz gibi çiftlik hayvanları da başarılı bir şekilde klonlanmıştır (BAGUISI,1999; KUBOTA, 2000; POLEJAEVA, 2000).

Bu teknoloji ile arzu edilen genetik yapı çoğaltılabilmekte ve böylece üstün genetik özelliklere sahip birden fazla çiftlik hayvanının üretilmesiyle üniform sürüler elde edilebilmektedir. Örneğin, artık döl veremeyecek yaşa gelmiş kaliteli bir inek, klonlama yöntemi ile çoğaltılabilmektedir. Bu teknoloji ile bir sığır çiftliği sahibinin isteği üzerine 13 yaşında ve artık döl vermeyen iyi kaliteli bir etçi inekten doku alınarak ilk ticari klonlama çalışması gerçekleştirilmiştir (ARAT, 2001a; GIBBONS, 2002).

Aynı teknoloji transgenik çiftlik hayvanlarının oluşturulması için de kullanılmaktadır. Daha önce klasik yöntem (embriyonun pronükleusuna DNA mikroenjeksiyonu) ile elde edilen transgenik bir domuz, klonlama teknolojisi ile çoğaltılmıştır (BONDIOLI, 2001).

Ancak asıl önemli olan, in-vitro ortamda genetik değişikliğe uğratılmış fetal fibroblast hücrelerinin nükleer transferi ile transgenik çiftlik hayvanlarının üretilmesidir. İlk transgenik klon buzağular 1998 yılında elde edilmiştir (CIBELLI, 1998). Takip eden yıllarda yine bu teknoloji ile transgenik koyun (SCHNIEKE, 1997), keçi (KEEFER, 2001), domuz (LAI, 2002) elde edilmiştir.

Bu çalışmaları takiben ilk transgenik granuloza hücresi kullanılarak yapılan klonlama çalışması 2001 yılında gerçekleştirilmiştir (ARAT, 2001b). Bunun ardında yine ilk kez olgun

transgenik fibroblast hücreleri, transgenik klon embriyoların üretimi için kullanılmıştır (ARAT, 2002).

Bugüne kadar değişik hayvan türlerinde yapılan embriyo kültürü, in-vitro fertilizasyon ve embriyo transferi gibi üreme ile ilgili çalışmalarda elde edilen embriyoların uzun süreler saklanması için birçok dondurma çalışması yapılmıştır ve halen bu çalışmalar devam etmektedir (FUKU, 1992 ; LANE, 1999; PALASZ, 1996; VAJTA, 1997).

Ancak klonlama çalışmalarında dondurma tekniğinin uygulanması üzerinde çok fazla çalışma yapılmamıştır. Bu alanda yapılan sınırlı sayıdaki çalışmada da sadece yumurta hücresi dondurulmuş fakat klon embriyoların dondurulması üzerinde fazla durulmamıştır (DINNYES, 2000; ITO, 1999; PEURA, 1999).

Klonlama çalışmalarında dikkati çeken bir noktada klonlamada kullanılan hücrelerin hemen hepsinin ya hayvan canlı iken veya henüz ölmüşken alınmış olmasıdır. Dolayısıyla hayvanın aniden ve dokusu alınmadan öldüğü durumda ne yapılabileceği tam olarak bilinmemektedir. Ancak hayvan dokularının 0 ve +4 derecede muhafaza edilmek koşuluyla hücrelerin 48 saat canlılıklarını muhafaza ettikleri ve klonlamada kullanılarak klon buzağı geliştirebildikleri gösterilmiştir. Bu çalışma projenin ön çalışması olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılmıştır (ADAMS, 2004). Bir başka çalışmada 24 saat önce ölü bulunan bir yaban koyunun türler arası nükleer transfer ile klonlandığını göstermiştir. Bu çalışmada ölü hayvanın yumurta hücrelerinin etrafındaki bölünme yeteneğini artık kaybetmiş olan ancak hücre morfolojisi henüz kaybetmemiş ve DNA yapısı bozulmamış granuloza hücreleri kullanılmıştır (LOI, 2001).

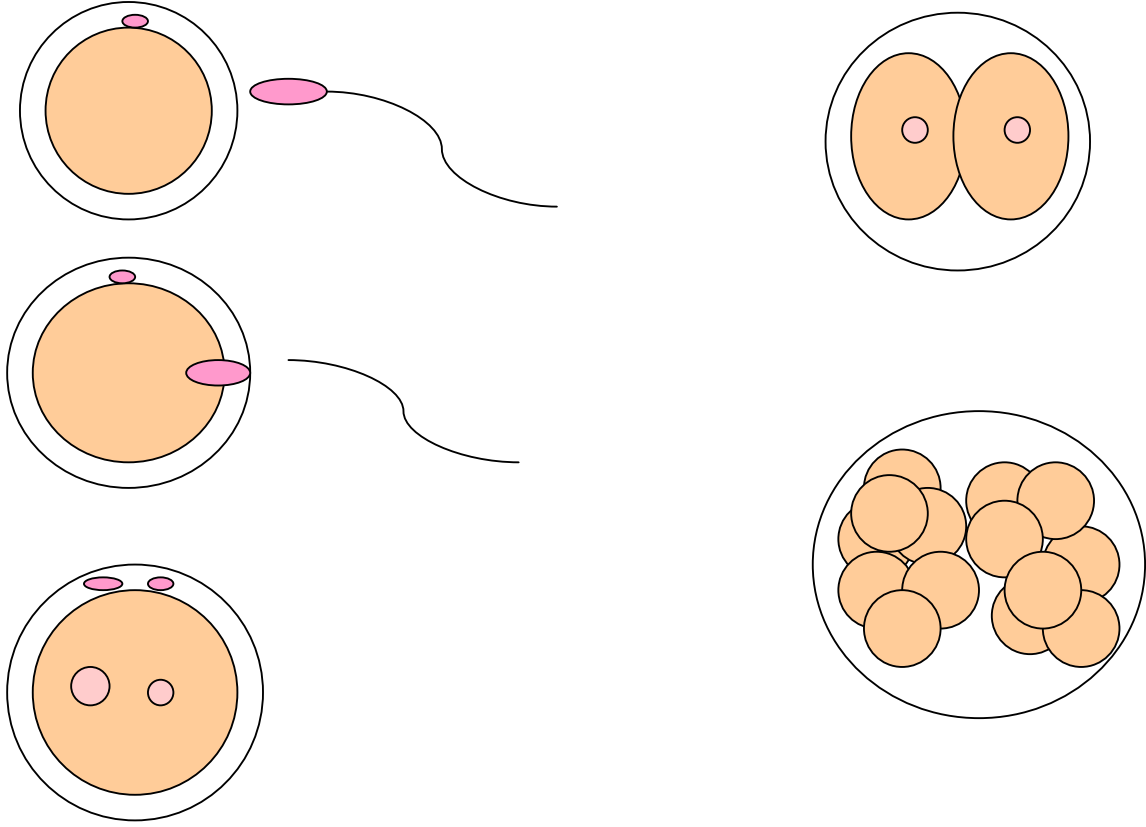
Nükleer transfer teknolojisi ile erişkin bir canlının yaratılabilmesi ve özellikle yakın türler arasında nükleer transfer çalışmalarının başarı ile sonuçlanması bu teknoloji ile birçok türün özellikle az sayıda kalan veya yok olma tehlikesi altında olan hayvanların tekrar doğaya kazandırılabilmesini göstermiştir. Bu teknoloji kullanılarak nesli tükenme tehlikesi altında olan bazı türler yeniden yaşam bulmuştur. Bu nedenle ABD'de çeşitli biyoteknoloji firmalarında, tarım kuruluşlarında ve hayvanat bahçelerinde doku ve hücre bankaları kurulmaya başlamıştır. Nesli tükenmekte olan hayvanların korunma altına alınabilmesi amacıyla türlerarası nükleer transfer çalışmaları son yıllarda çeşitli ülkelerde yoğunluk kazanmıştır (ADAMS, 2004; ARAT, 2003; CHEN, 2002; KITIYANANT, 2001; LOI, 2001; LOI, 2002).

Klonlama teknolojisinde kaydedilen bütün bu ilerlemelere karşın halen nedeni bilinmeyen ve kontrol edilemeyen birçok biyolojik faktör klonlama teknolojisinin başarı şansını olumsuz yönde etkilemektedir. Ancak hiç şüphesiz ki yapılan her yeni çalışma bu problemlerin çözümüne bir adım daha yaklaşılmasını sağlayacaktır.

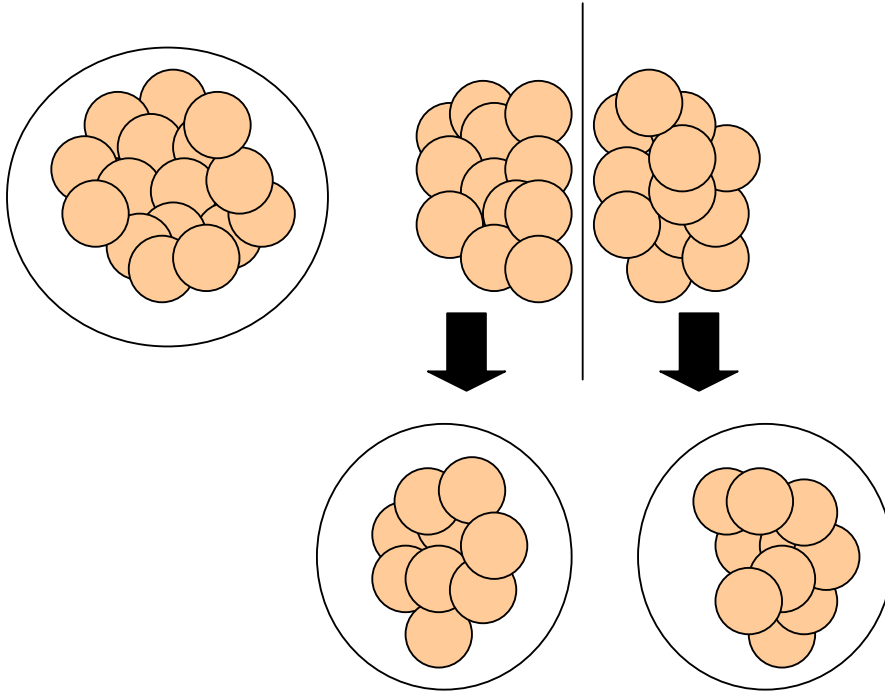
GENEL BİLGİ VE LİTERATÜR ÖZETİ

KLONLAMANIN TARİHÇESİ

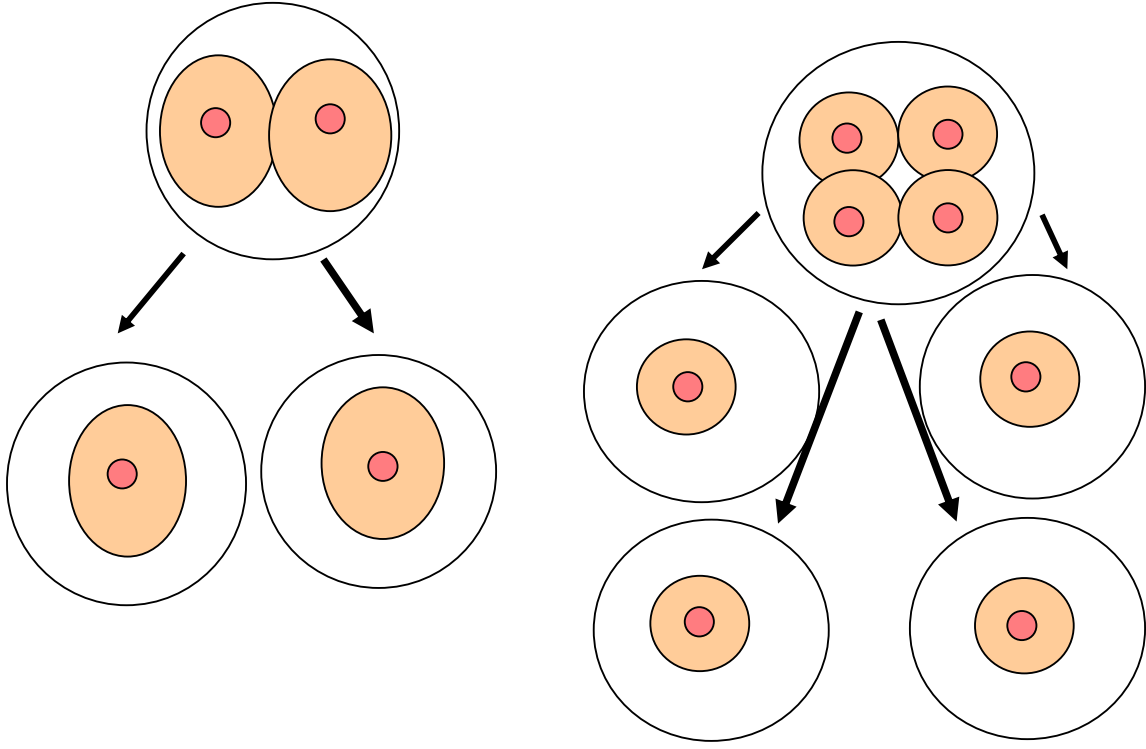
Tek yumurta ikizleri doğal klonlardır. Araştırmacılar ilk önceleri bu doğal olayı taklit ederek klonlama çalışmalarına başlamışlardır. Tek yumurta ikizlerinde embriyo iki hücreli dönemde iki embriyoyu geliştirmek üzere ayrılır (Resim 1). Embriyonun bölünmesi veya blastomerlerin ayrılması ile üretilen ilk çiftlik hayvanı türleri Willadsen tarafından rapor edilmiştir (WILLADSEN, 1979; WILLADSEN, 1981a; WILLADSEN, 1981b) (Resim 2,3). Bu teknik daha sonraki yıllarda diğer türlerde uygulanmıştır (STEIN-STEFANI, 1994).



Resim 1. Tek yumurta ikizlerinin oluşumu; fertilizasyon ve iki blastomerli embriyodan genetik yapısı aynı iki embriyonun oluşumu.



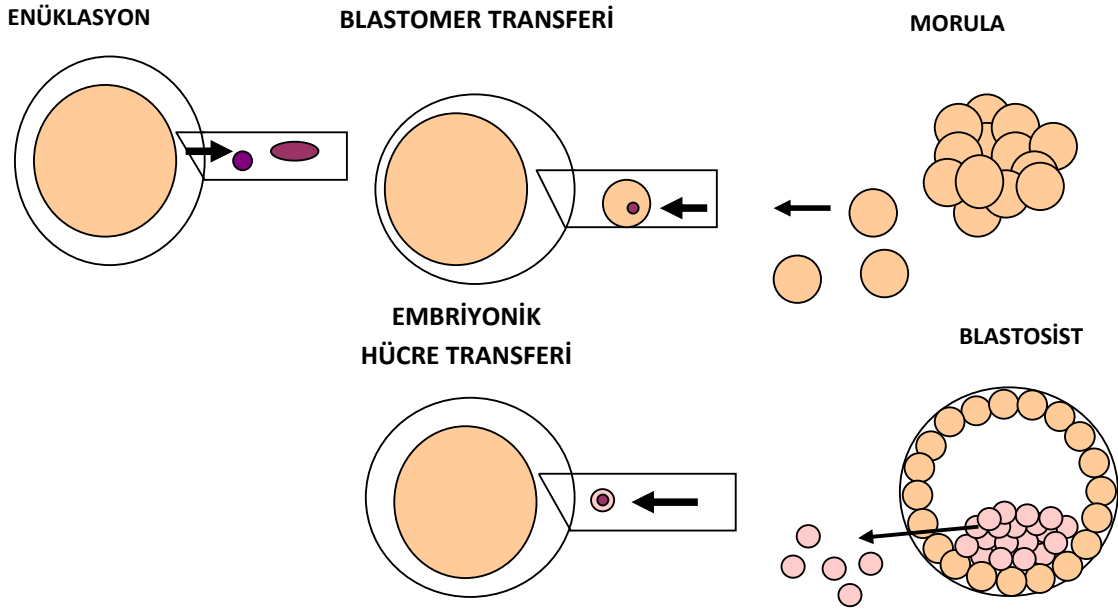
Resim 2. Morula dönemindeki embriyonun bölünmesi iki ayrı zona içine yerleştirilmesi.



Resim 3. Blastomerlerin ayrılarak her bir blastomerin ayrı zonalara yerleştirilmesi.

Blastomer ayrılması veya embriyonun bölünmesi ile oluşan embriyolar kendi normal programlarına göre gelişmeye devam ettikleri için bu yöntem ile elde edilen blastosistler normalden daha az hücre sayısına sahiptirler ve yaşama şansları da daha azdır. Bu yöntemle sadece iki veya en fazla dört olmak üzere az sayıda klon embriyo üretilebilmektedir (LOSKUTOFF, 1993).

Çekirdek transferi ile klonlama ise, klasik olarak farklılaşmamış embriyonik hücre çekirdeğinin (blastomer) çekirdeği çıkartılmış (enükle edilmiş) yumurta hücresi (oosit) veya zigot içine transfer edilmesi anlamına gelmektedir (Resim 4). Memelilerde bu teknik ilk olarak başarılı bir şekilde koyunlarda uygulanmış (WILLADSEN, 1986) ve bunun hemen arkasından sığırdan (PRATHER, 1987), tavşanda (STICE, 1988) ve domuzda da uygulanmıştır (PRATHER, 1989).



Resim 4. Blastomer veya embriyonik hücre çekirdeğinin (iç hücre yığını) transferi ile klonlama

Bunun ardından iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler kullanılarak sığırlarda (COLLAS, 1994) ve koyunlarda (SMITH, 1989) başarı ile klon embriyolar elde edilmiştir. İmplantasyon öncesi embriyolarda hücre sayısı sınırlı olduğu için onların kullanılması ile elde edilen klonlarda az sayıda olmaktadır. Bu nedenle kültürde çoğalabilen hücelere ihtiyaç bulunmaktadır. Böylece ilk kez iç hücre kitlesinden elde edilen ve 4 hafta boyunca kültürde çoğaltılan hücrelerin kullanılması ile sağlıklı buzağı (SIMS, 1994), ve bunun hemen ardından da 13 pasaj boyunca kültüre edilmiş embriyonik hücrelerin kullanılması ile sağlıklı klon koyun elde edilmiştir (CHAMPBELL, 1996).

Bu döneme kadar sadece embriyonik hücrelerin geriye programlanabileceğine inanılıyordu, ancak bunu takip eden yılda ilk kez fetüsten elde edilen vücut hücreleri kullanılarak sağlıklı klon koyunlar elde edilmiştir (SCHNIEKE, 1997; WILMUT, 1997). Bu teknolojiye en büyük adım, erişkin bir canlının kopyalanması olmuştur. İskoç bilim adamları 1997 yılında 6 yaşındaki bir koyunun meme hücrelerinden bir koyunu klonladıklarını rapor etmişlerdir (WILMUT, 1997). Bunun arkasından erişkin vücut hücrelerinin nükleer transferde

kullanılması ile bir çok tür klonlanmıştır (ARAT,2001; BAGUISI, 1999; GIBBONS, 2002; KUBOTA, 2000; POLEJAEVA, 2000).

Günümüzdeki anlamı ile klonlama erişkin bir canlıdan elde edilen vücut hücresinin o türe ait genetik materyali çıkartılmış bir yumurta hücresi içerisine konulması olarak ifade edilmektedir. Böylece erişkin bir canlının genetik yapısına sahip çok sayıda canlının oluşturulması mümkün olmaktadır.

KLONLAMANIN KULLANIM ALANLARI

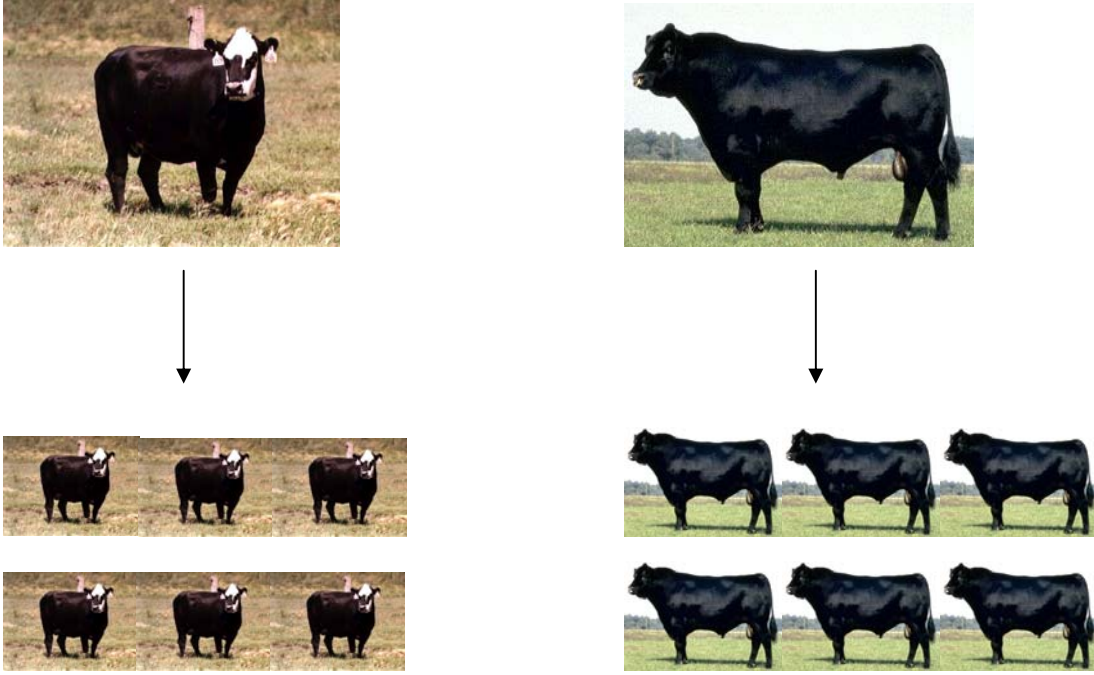
Tek başına nükleer transfer (çekirdek aktarımı) tekniği, çiftlik hayvanlarının iyileştirilmesi amacıyla seçilmiş nitelikli hayvanların kopyalanmasında kullanılabilir. Bunun yanı sıra hastalıklara doğal bağışıklık geliştirmiş bireyler tespit edilerek çoğaltılabilir. Bir başka uygulama alanı da nesli tükenmekte olan hayvanların sayılarının artırılmasını sağlamasıdır.

Genetik modifikasyon teknolojileri ile birleştirildiğinde ise çok daha etkili biyoteknolojik uygulamalar gündeme gelebilir. Nükleer transferin genetik modifikasyonla birleşmesi, birçok potansiyel biyoteknolojik uygulaması olan güçlü bir teknolojiyi ortaya çıkarmıştır. Nükleer transferde kullanılan verici hücreler, uygun genetik değişime uğratılmış transgenik bir hayvandan elde edilebilir (BONDIOLI, 2001) yada kültüre edilen verici hücreler nükleer transferden önce genetik modifikasyona uğratılabilir (ARAT, 2001b; ARAT, 2002; CIBELLI, 1998; KEEFER, 2001; LAI, 2002;SCHNIEKE, 1997). Ek olarak, DNA mikroenjeksiyonunun aksine, genlerin hedeflenmiş rekombinasyonları mümkündür ve bundan dolayı, genetik değişiklik hem kesin olarak hem de istenen şekilde gerçekleşecektir. Verici hücre, zaman, enerji ve para kaybını en aza indirmek üzere uygun modifikasyonun meydana gelip gelmediğini garantilemek amacıyla kontrol edilebilmektedir. Böylece, taşıyıcı annelerin sadece genetik değişikliğe uğratılmış embriyoları taşıması sağlanabilir. Genetik değişikliğe uğratılmış klonların elde edilmesine yönelik biyoteknolojik uygulamalar: farmasötiklerin üretimi, insanlara transplante edilebilecek nitelikte organ yada dokuların / hayvanların üretimi (ksenotransplantasyon), hastalıkların yok edilmesi ve çiftlik hayvanlarının ıslahı şeklinde sıralanabilir. Bu uygulamaların hepsinden sırayla bahsedilmiştir.

Hayvancılık alanında klonlama

1. Çiftlik hayvanlarının ıslahı

Tarımda, hayvanlar genetik özellikleri ve ticari değerleri açısından çok büyük çeşitlilik göstermektedir. Sağlık, et kalitesi, süt üretimi, büyüme oranı, yapağı üretimi ve döl verimi hayvanların değerlendirilmesinde dikkate alınan önemli kriterler arasında sayılabilir. Klonlama teknolojisi tarıma önemli katkılarda bulunabilir. Mükemmel kalitede süt veren bir inek veya diğerlerinin arasında derhal göze çarpan ideal bir boğa gibi üstün niteliklere sahip seçilmiş hayvanların birkaç kez kopyalanması veya çok kaliteli hayvanların kalabalık klon sürülerinin elde edilmesi gibi seçenekler mümkündür (PATERSON, 2003; STICE, 2000; WOLF, 1998) (Resim 5).



Resim 5. Klon elit sürüler

Seçilmiş hayvanların kopyalanmasına ek olarak, nükleer transferde kullanılacak verici hücrelere kaliteyi yükseltecek genlerin transfer edilmesi ile, çiftlik hayvanlarının ıslahı da mümkündür. Böylece doğan yavruya süt veriminin artışı, et kalitesinin yükselmesi ve daha hızlı büyüme yeteneği gibi özellikler kazandırılmış olunacaktır. Çiftlik hayvanlarındaki genlerin haritası oluşturulmuştur ve fonksiyonlarının aydınlatılmasını takiben en yararlı genler açığa çıkartılacaktır.

2. Hastalık direnci

Bu teknoloji ile doğal olarak hastalıklara direnç geliştirmiş bireyler klonlanarak çoğaltılabildiği gibi hastalıklara dirençlilik genetik değişiklik ile de sağlanabilir. Farenin dışında ilk knock-out memeli, sığıır fibroblastlarında Prion Proteinini (PrP) kodlayan genin delesyonu ile klonlanmış (PATERSON, 2003) ve hedeflenen gen delesyonunu taşıyarak gelişen 8 gebeliğin 4 tanesi doğumla sonuçlanmıştır. PrP geni koyunlardaki *scrapie*, sığıırlardaki *bovine spongiform encephalopathy* (BSE) ve insanlardaki *Creutzfeld-Jacob* (CJD) hastalıkları ile doğrudan ilişkilidir. Bu genin mutasyonu ile elde edilen prionsuz çiftlik hayvanlarının BSE ve *scrapie* gibi hastalıklara karşı dirençli olmaları beklenmektedir. Ayrıca, popülasyonda varolan zararlı genlerde yaratılacak mutasyonlara ek olarak, hayvanların bakteriyal ve viral enfeksiyonlardan korunmalarını sağlayacak proteinleri kodlayan genlerin verici hücre genomuna eklenmesi de mümkündür (mastitise dayanıklı transgenik canlı gibi).

İnsan hastalıklarının tedavisi için genetik modifikasyon ve klonlama

1. Farmasötik üretimi

Hastalıkların tedavi edilebilmesi amacıyla proteinlerin üretilmesi, karmaşık doğalarına bağlı olarak oldukça zordur. Bununla beraber, tıbbi açıdan önemli bir proteini kodlayan insan genini, bir hayvan genomuna yerleştirmek günümüzde mümkündür. Nükleer transfer yoluyla üretilen ilk transgenik hayvanlar 1998 yılında rapor edilmiştir (CIBELLI, 1998). Fetal fibroblastlar nükleer transfer öncesinde insan pıhtılaşıma faktörü IX'u kodlayan gen ile transfekte edilmiş ve bu gen meme bezlerinde yüksek düzeyde ekspresyonun sağlanması için başka gen dizileriyle birleştirilmiştir. Genleri süt promoter dizilerine bağlamak proteinin sütte salgılamasını sağlamaktadır ve bu yolla rekombinant proteinler toplanabilmektedir. İnsan pıhtılaşıma faktör genini taşıyan üç kuzu doğmuştur (SCHNIEKE, 1997). İnsan pıhtılaşıma faktörü IX'un eksikliği sonucu hemofili meydana gelmekte ve bu faktör günümüzde insan plazmasından saflaştırılabilmektedir. Ancak, bu yolla proteinin elde edilmesi, insan kanıyla taşınan bulaşıcı hastalıkların varlığı nedeniyle risklidir. Günümüzde nükleer transferin verimi düşük bile olsa, en azından iki çalışmada, genetik modifikasyon ile beraber yürütülen klonlama deneylerinde, bir tane transgenik hayvanın elde edilebilmesi için oldukça az sayıda hayvanın gerektiği belirtilmiştir (SCHNIEKE, 1997). Transgenik klonlar tıbbi açıdan önem taşıyan proteinleri, örneğin, diyabet hastaları için insülini, viral enfeksiyonlar için interferonları ve doku plazminojen aktivatörlerini geniş ölçüde üretecek şekilde dizayn edilebilirler (PATERSON, 2003). Buna ilaveten, tekniğin sadece koyun ve keçilerle sınırlı

olmadığı, sığır ve domuzlara da uygulandığı unutulmamalıdır (HODGES, 2003; PATERSON, 2003;).

3.2 Ksenotransplantasyon

Bugün tüm dünyada organ transplantasyonu için sırada bekleyen yüzlerce insan vardır ve bunların büyük çoğu uygun organ bulamadıkları için hayatlarını kaybetmektedirler. Biyolojik ve fizyolojik olarak insana yakınlığı ve organ büyüklüğünün uygunluğu dolayısıyla domuz organ transplantasyonunda en iyi aday hayvan olarak görülmektedir. Gerek doğmamış domuz yavrusunun gerekse yetişkin domuzun hücrelerinin kullanılmasıyla klon domuzlar üreten araştırmacılar klonlama teknolojisinin hücreler üzerinde istenen geni hedefleyerek değişiklik yapma olanağı sağlamasından faydalanarak özel bir gen üzerinde yoğunlaşmışlardır. Bu gen domuz hücrelerinin yüzeyinde α -1,3-galaktoz adı verilen bir şekerin birikmesine ve dolayısıyla domuz hücre ve dokularının reddine sebep olmaktadır. Ancak 2002 yılında iki farklı araştırma grubu bu geni ortadan kaldırılmış transgenik klon domuzlar üretmeyi başarmışlardır (LAI, 2002). Bu transgenik domuzların organ ve hücrelerinin insan vücudunda herhangi bir reaksiyona sebep olmayacağı iddia edilmektedir. Bununla birlikte en büyük endişeyi domuzlardan insanlara geçebilecek olan viral etkenler oluşturmaktadır.

3. Hastalık modelleri

Transgenезis ve klonlama teknolojileri, evcil hayvanların belirli insan hastalıklarını sergileyebilmelerine olanak tanımakta ve insan hastalıklarının tedavisi ve temel bilimsel araştırmalar için bir model olarak hizmet edebilmelerini sağlamaktadırlar. Günümüzde çok sayıda genetik yapısı değiştirilmiş model fare olmasına rağmen fizyolojik açıdan insanlara daha yakın olan büyük hayvanların kullanılmasının avantajları inkar edilemez. Örneğin, insan hastalıklarıyla sonuçlanan bazı gen mutasyonları, farelerde aynı tip hastalıklara neden olmamaktadır. Kistik fibrosis geni knock-out edilmiş bir fare insanlarla aynı patolojiyi göstermemektedir. Akciğer fizyolojisi ve boyutuna bağlı olarak, kistik fibrosis gibi insan solunum hastalıklarını araştırmak için koyun ideal bir hayvan modelidir. Hastalığı teşvik etmek üzere kistik fibrosis geninin ilk kez knock-out edilmesi ile elde edilen klon koyun, yeni terapilerin uygulanması ve ilaçların test edilmesi amacıyla kullanılabilir (MCCREATH, 2000).

Nesli tüklenmekte olan hayvanların klonlanması

Evcil hayvanların ataları olan yabani türler gerek hayvanlarda gerekse bitkilerde büyük önem taşırlar. Genetik açıdan birbirine çok benzer olan evcil hayvanlar hastalıklara çok açıktırlar. Bu nedenle yabani türler genetik çeşitlilik açısından gen depolarıdır ve evcil türlerin yaşamının sigortacılarıdır. Bu noktada nesli tüklenmekte olan hayvanların koruma altına alınması gündeme gelmektedir. Klonlama teknolojinin hedeflerinden biri de nesli tüklenmekte olan hayvanlar olmuştur. İlk olarak 1998 yılında ana vatanı Hindistan ve Çin olan yabani bir sığır türünden (gaur) elde edilen hücre, çekirdeği çıkartılmış evcil sığır yumurtasına transfer edildi ve doğan gaur yavrusu 48 saat yaşadı. Araştırmacılar klon yavrunun klonlamadaki bir problemde değil, genelde yeni doğanlarda meydana gelen bir enfeksiyon sonucu öldüğünü açıklamışlardır (LANZA, 2000). Başka bir grup 2001 yılında bir yaban koyununu evcil koyunun yumurta hücresi kullanarak başarıyla klonlamıştır (LOI, 2001). Şu an sadece hayatta veya yeni ölmüş olan hayvanların hücreleri alınarak klonları oluşturabilmektedir ancak yıllar veya yüzyıllar önce ölen bir hayvanın klonlama yöntemiyle tekrar günümüz dünyasına kazandırılması da yakın bir gelecekte gerçekleştirilebilir.



Resim 6 . Türler arası transferden elde edilen klon yaban koyunu ve taşıyıcı annesi olan evcil koyun (LOI, 2001).

KLONLAMADA ÖNEMLİ PARAMETRELER

Günümüzdeki anlamı ile klonlama erişkin bir canlıdan elde edilen vücut hücresinin o türe ait genetik materyali çıkartılmış bir yumurta hücresi içerisine konulması olarak ifade edilmektedir. Klonlamanın temel basamakları aşağıdaki gibi sıralanmaktadır.

1. Olgun yumurtanın (Metafaz II oositinin) kutup hücresi ve metafaz kromozomları uzaklaştırılır (Enükleasyon).
2. Kültüre edilen G0-G1 fazındaki (sessiz) verici hücre enükle MII oositin perivitellin boşluğuna yerleştirilir.
3. Oosit ve verici hücre füzyona tabi tutulur.
4. Kimyasalar veya elektrik akımı ile hücre bölünmesi aktive edilir.
5. Başarıyla gelişen embriyolar taşıyıcı dişilere transfer edilir.
6. Doğacak klon yavrular verici hücre ile tamamen aynı nükleer genlere sahiptir.

Yumurta hücresinin (oosit) olgunlaşması

In vitro fertilizasyondan sonra normal embriyonik gelişimin tamamlanabilmesi için gerekli olan kaliteli yumurta hücresinin elde edilmesinde en önemli basamak yumurta hücresinin olgunlaştırılmasıdır. Blastosist implantasyonundaki başarısızlık ve anormal fetal gelişim büyük çoğunlukla bu basamaktaki aksaklıklardan köken almış olabilir (MOOR, 1998; WANG, 1997). Nükleer transferde ise durum çok daha karmaşıktır ve verici hücre çekirdeğinin geriye proglamlanmasında en uygun alıcı yumurta hücresi stoplazmasının seçimi klonlamanın başarısını doğrudan etkilemektedir (CAMPBELL, 1999; MIYOSHI, 2003).

Nükleer transfer çalışmalarında farklı dönemlerde (zigot, Metafaz I, Metafaz II) yumurta hücreleri denenmiştir ancak en iyi sonuç metafaz II (MII) döneminde bulunan yumurta hücresinden alınmıştır. Bir örnek stoplazma topluluğu elde etmek için uygulanan yöntem sığır, koyun, keçi, domuz gibi çiftlik hayvanlarında oositin in-vitro olgunlaştırılmasıdır (ARAT, 2001a; ARAT, 2001b; ARAT, 2002; CAMPBELL,1999; CIBELLI, 1998; MIYOSHI, 2003; WILMUT, 1997; WILMUT, 1999; WOLF, 1998). Çünkü yumurta hücreleri kolaylıkla mezbaha ovaryumlarından elde edilmektedir.

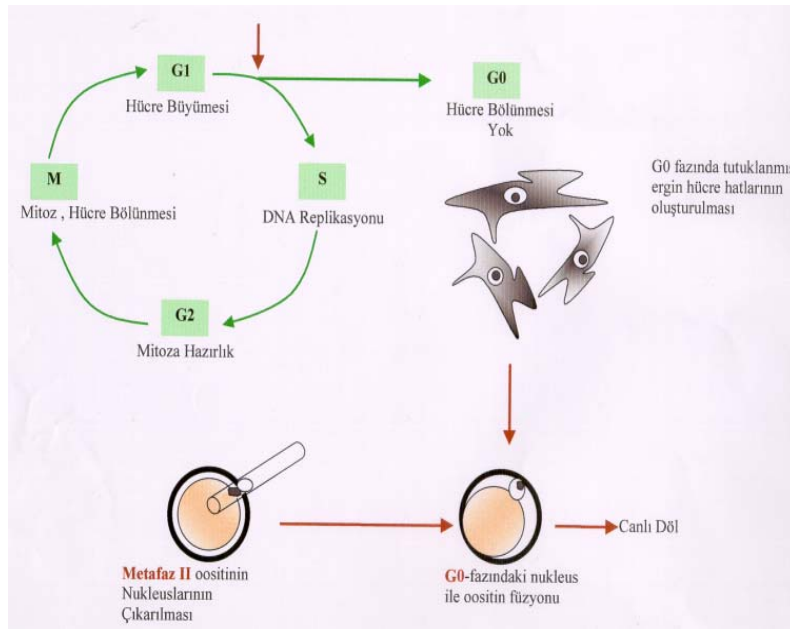
Medyuma serum, gonadotropin, estradiol, büyüme hormonları veya epidermal büyüme faktöründe dahil olmak üzere büyüme faktörlerinin katılmasının çeşitli türlerde yumurta hücresinin in vitro olgunlaşmasında pozitif etki yaptığı rapor edilmektedir (ABYDEERA, 1998; GRAZUL-BILSKA, 2003; LONERGAN, 1996).

Yumurta gelişiminin düzenlenmesi ve kontrolü, hem lokal (parakrin) hem de yumurtalık dışı (endokrin) faktörleri kapsayan kompleks bir süreçtir. Yumurta gelişiminin düzenlenmesinde hormonların yanı sıra (LH, FSH), büyüme faktörleri, sitokinler, inhibin/aktivin gibi faktörler kritik önem taşımaktadır (ERICKSON, 1995; SAHLA, 1998). Reprodüktif sistemde, hormonlar ve büyüme faktörleri yakın ilişki içindedir. Büyüme faktörleri yumurtalıklarda somatik hücreler tarafından, embriyonun değişik bölünme aşamalarında embriyo tarafından ve dişi üreme kanallarına ait hücreler tarafından sentezlenebilmektedir (DE LA, 1999; DONG,1996). Son zamanlarda büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin bazılarının ovaryum içi düzenleyiciler olarak etki ettiği ve büyüme faktörlerinin gonadotropinlerin etkisini düzenlediği gösterilmiştir (BEVERS, 1997). Yine çalışmalar memeli granüloza ve kumulus hücrelerinin EGF reseptörlerine sahip olduklarını göstermektedir (FENG, 1987; SINGH, 1995). Folikül içi EGF granüloza hücrelerinde proliferasyonu sağlayan bir etkiye sahip olabilir (BENDELL, 1990). Yapılan bir çalışmada EGF'in gonadotropinler ile birlikte kullanılması durumunda nükleer maturasyonu artırdığı belirlenmiştir (HARPER, 1993). FSH folikül gelişimini uyarırken folliküldeki in vivo LH artışına bağlı olarak pozitif bir sinyal gelişir ve primer yumurta hücresinin stoplazması asimetric olarak bölünüp, farklı büyüklükte iki hücre oluşmasına yol açar. Bu dönemdeki yumurta hücresine MII denir ve bu hücre bu aşamada tutulur. Buna nükleer olgunlaşma denir. Sitoplasmik olgunlaşmada ise; yumurtanın fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi için hazırlandığı ve mayotik ilerleme ile doğrudan ilgisi olmayan diğer olgunlaşma olayları gerçekleşir. Bu aşamada yumurtanın stoplazması ve organellerinin iç yapısında değişiklikler gerçekleşir (EPPIG, 1994).

Hücre Siklusu

Hücre siklusu dört fazdan oluşur. Miyozu takiben iki kardeş hücre G1 fazına girer. Bu dönemdeki hücre büyür ve hücre dışı büyüme faktörlerine cevap verir. Yine bu dönemde kromozom yoğunlaşması kaybolur ve tekrar çekirdek zarfı oluşur. Bunu takip eden S fazında ise DNA replikasyonu meydana gelir yani iki katına çıkar. G2 fazında ise yeniden kromozomlar yoğunlaşır ve hücre mitozu girer. Mitoz esnasında kromozomlar yoğunlaşmış olarak kalır (Resim 7). Nükleer transfer çalışmalarında çoğunlukla G1/GO fazındaki hücreler seçilir. Bu dönemdeki hücreler geriye programlanmaya daha uygundur ve daha yüksek oranda normal embriyo gelişimi ile sonuçlanırlar (ARAT, 2001a; BAGUISI, 1999; GIBBONS, 2002; KUBOTA, 2000; POLEJAEVA, 2000; WILMUT, 1997). Hücreler bu sıklusa değişik şekillerde getirilebilirler. Kumulus hücreleri elde edildikleri anda bu dönemde dirler ve hemen kullanılabilirler. Eğer hücreler kültüre ediliyorsa bölünen hücre popülasyonunda çok değişik

dönemlerde hücre vardır. Bu hücreleri istenen döneme getirmek için serum starvasyonu (düşük serum varlığında kültür) uygulanabilir ve böylece hücreler yeteri kadar beslenemedikleri için dinlenme fazına yani G0 fazına geçerler (WILMUT, 1997) veya hücreler kültür kaplarını kapladıklarında birbirleri ile temas ettikleri için (kontak inhibisyon) S fazına geçemezler ve G1'de kalırlar (ARAT, 2001b; ARAT, 2002; CIBELLI, 1998) veya siklin kinaz inhibitörü gibi (roscovitin) bazı kimyasallar kullanılarak hücreler G1 fazında bloklanır (ARAT, 2001b; GIBBONS, 2002).



Resim 7. Hücre siklusu ve klonlama

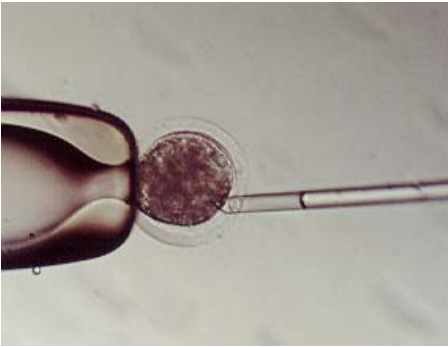
Nükleer Transfer

Mature edilen kumuluslu yumurtalar 100 IU/ml hiyaluronidaz enzimi (Sigma) içeren TL Hepes medyumunda 6dk vortekslenir. Kumulus hücrelerinden temizlenen oositler 2 µg/ml Hoechst 33342 ve 7.5 µg/ml Cytochalasin B içeren TL hepes içinde boyanarak ve MII yumurta hücreleri UV ışık altında enükle edilir. Bunun için iç çapı 15 µm olan hazır enüklasyon pipetleri (Eppendorf) kullanılır. UV ışık altında görünür duruma gelen birinci kutup cisimciği ve metafaz plağı bu pipet ile aspire edilerek alınır (Resim 8).



Resim 8. MII oositin enüklasyonu

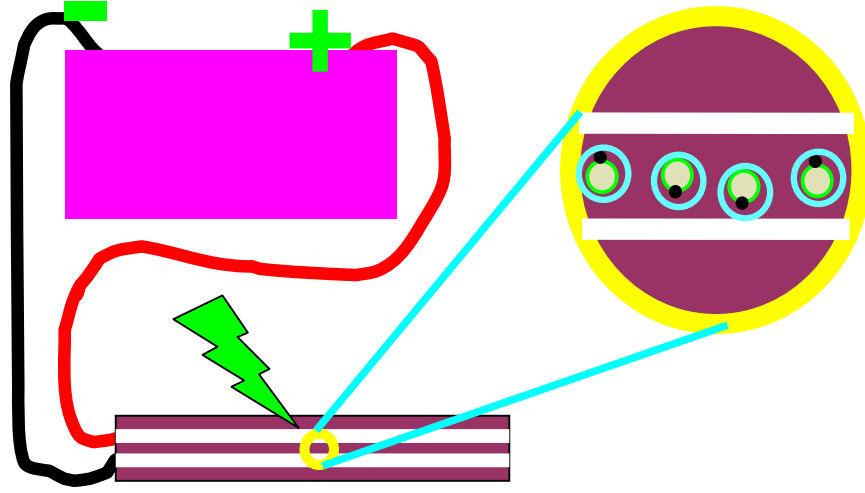
Kültürde çoğaltılan hücreler tripsinlenerek kültür kapının yüzeyinden kaldırılır ve mavi uçlu pipet ile pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir. Enüklasyon pipeti içine küçük, yuvarlak, parlak ve düzgün kenarlı hücreler tek tek çekilerek enükle edilmiş yumurta (osit) hücrelerinin zonası altına bırakılmıştır (Resim 9).



Resim 9. Hücrenin oosit zonası altına bırakılması

Füzyon

Seçilen hücre, çekirdeği alınmış MII yumurta hücresinin zonası altına bırakıldıktan sonra iki hücrenin birleşmesi için elektrik akımı uygulanır. Bu basamak çalışmanın en önemli basamağıdır. Füzyon ile iki hücre kaynaştırılır ve verici hücrenin çekirdeğinin yumurta stoplasması içine girmesi sağlanır. Bu gerçekleşmediği takdirde nükleer transfer başarılı olmamış demektir. Bunun için çeşitli hücre füzyon aletler geliştirilmiştir. Temel olarak + ve - yüklü iki elektrod arasına şekilde görüldüğü gibi hücre transfer edilmiş yumurtalar elektrodla paralel olarak yerleştirilir ve ayarlı bir akım verilir (BAGUISI, 1999; GIBBONS, 2002; KUBOTA, 2000; SCHNIEKE, 1997; WILMUT, 1997).



Resim 10. Elektrik akımı ile enükle edilmiş oosit ve verici hücrenin füzyonu

Aktivasyon

Metafaz II dönemdeki yumurta hücresinin en önemli özelliği yüksek oranda MPF (maturation promoting factor)'e sahip olmasıdır (CAMPBELL,1999; MIYOSHI, 2003). MPF çekirdek zarfının yıkılmasını kromozomların yoğunlaşmasını sağlar. Nükleer transfer veya fertilizasyon için seçilen sitoplazma kaynağı olan MII'de tutuklanmış yumurta hücresi kalsiyuma duyarlı stoplazmik faktor (calcium sensitive factor-CSF) tarafından stabilize edilen yüksek orandaki MPF'e sahiptir. Fertilizasyonda veya yapay aktivasyon esnasında iç stoklardan veya kültür medyumundan salınan kalsium CSF'yi inaktive eder bunun sonucu olarak MPF aktivitesi düşer, kromatin tekrar yoğunluğunu kaybeder pronükleuslar şekillenir. Bu pronükleuslar DNA sentezine gider ve MPF aktivitesindeki artış mitosisin başlamasını uyarır. Böylece kopyalanan DNA iki kardeş hücreye bölünür (CAMPBELL, 1999). Nükleer transfer çalışmalarında partenogenetik aktivasyon değişik kimyasalların kombinasyonu (Calcium ionophor, cycloheximide) ve elektrik akımı ile sağlanır. Cytochalasin B (Cyto-B) veya D (Cyto-D) ise aktivasyon sonrası yumurta hücresinin ikinci kutup cisimciğini atarak haploid kromozom sayısına inmesini engellemek için kullanılır (DU, 2002; LIU, 1998; SMITH, 1989)

KLONLAMADA KARŞILAŞILAN SORUNLAR

Telomer

Telomerler , birçok somatik hücre içerisinde, in vivo ve in vitro ortamlarda hücre bölünmeleri süresince kısalarak tekrarlayan, yuvarlak yapılar oluşturan kromozomların özelleşmiş yapılarıdır. Telomerler, doğrusal ökaryotik kromozomların sonlarındaki kodlanmayan DNA dizilimleridir, kromozomal sonları küçülmekten korur, nükleus içinde kromozomların pozisyon almasını sağlar. Telomerlerin uzunluğunun ilerleyen azalmaları, sonunda kopyalanabilme kapasitesinin kaybıyla sonuçlanır. Telomeraz enzimi, telomerik DNA'nın uzunluğunu ve kromozom bütünlüğünü korurlar. Normal somatik hücreler telomeraz aktivitesi göstermezler ve bu nedenle yaşam döngüsünde in vitro koşullarda sınırlı replikasyon olmaktadır (SHI, 2003). Telomeraz aktivitesi embriyonik genom aktivitesi ile başlar embriyonal kök hücrelerin gelişimi esnasında devam eder ancak hücre farklılaşması ile bu aktivite azalır ve somatik hücrelerde tamamen kaybolur (EPPIG, 1994; SHI, 2003).

Somatik hücreden klonlanmış hayvanların telomer uzunluklarının normalden kısa olabileceği düşüncesi klonlamanın en büyük dezavantajı olarak görülmektedir. Oysa yapılan çalışmalar sığırların kas, yumurta kanalı, meme ve kulak derisi hücrelerinden elde edilen hücrelerle klonlanan hayvanlarda telomer uzunluklarında önemli bir varyasyonu göstermiştir. Dikkate değer bir şekilde, klonlanmış sığırların epitel hücrelerinden elde edilen telomerin uzunlukları, karşılaştırmadaki kontrollerinden kısa olarak bulunmuştur. Halbuki klonlanmış sığırın kas hücrelerinden ve fibroblastlarından elde edilen telomerlerin uzunlukları normal boyutunda tespit edilmiştir (KATO, 2000; MIYASHITA, 2002). Bu çalışmalar varyasyonun hücre tipinden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Verici hücrenin elde edilmesi

Çok çeşitli amaçlara hizmet edebilecek olan bu teknolojinin en önemli alanı üstün veya genetik kaybolmakta olan genetik yapının korunması olarak görülmektedir. Ancak bugüne kadar yapılan klonlama çalışmalarında hücreler canlı hayvandan elde edilmiştir (BAUISI, 1999; CAMPBELL, 1996; CIBELLI, 1998; GIBBONS, 2002; KEEFER,2001; KUBOTA, 2000; POLEJAEVA, 2000; WILMUT, 1997). Bu teknolojinin kullanılabilirliğini sınırlamaktadır. Çünkü hücreleri alınmadan aniden ölen bir canlının tekrar klonlanıp

klonlanamayacağı belli değildir. Şimdiye kadar ölü hayvandan elde edilen hücrelerle yapılmış iki çalışma mevcuttur (ADAMS, 2004; LOI, 2001).

Materyallerin dondurulması

Embriyo Transfer Teknolojisi, Sun'i Tohumlama uygulamasından sonra hayvan ıslahında büyük gelişmelere öncülük etmiştir. Taze embriyo transferlerindeki en büyük sorunlardan birisi, transferlerin yapılacağı taşıyıcı hayvanların önceden senkronize edilmesi zorunluluğudur. Ayrıca, tek bir embriyo transferi için en az iki taşıyıcının senkronize edilerek transfere uygun taşıyıcının garanti edilmesi, maliyeti artıran kısıtlayıcı diğer bir unsurdur. Embriyoların dondurulması ile taşıyıcılarda senkronizasyona gerek kalmadan transfer işlemi gerçekleştirilebildiğinden, maliyette önemli düşmeler gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca, üstün niteliklere sahip hayvanlardan elde edilen embriyoların dondurularak farklı bölgelere kolayca transfer edilmeleri de mümkün olabilmekte ve kurulacak embriyo bankası ile nesli tükenmekte olan hayvan varlıklarının korunması sağlanabilmektedir. Dondurulmuş sperma ile sadece babadan gelecek genetik yapıdan yararlanılabılırken, embriyo ile hem anne hem de babadan gelen genlerden doğrudan yararlanılabilir. Kriyoprezervasyon işleminde kullanılan yöntemleri geleneksel yavaş dondurma (slow freezing), hızlı dondurma (rapid freezing) ve vitrifikasyon (vitrification) olarak üç grupta incelemek mümkündür (CSEH, 1999; EDASHIGE, 1999; PALASZ, 1996). Başlangıçta embriyoların dondurulmasında yavaş ya da kademeli soğutmayı gerektiren yavaş dondurma yöntemi kullanılmıştır (MARTINEZ, 1998; VAN WAGTENDONK-DE,1997). Geleneksel bir yöntem olan yavaş dondurmada, embriyoların dondurulması için çok pahalı ve komplike cihazlara gereksinim vardır. Hızlı dondurma işleminde ise, en az iki farklı kriyoprotektan madde ve yüksek donma hızları kullanılır. Yapılan çalışmalar sonucunda, 1985 yılında vitrifikasyon denilen embriyoyu dondurma sistemi geliştirilmiştir (RALL, 1985). Bahsedilen bu iki yöntem sayesinde yavaş dondurma yönteminde gerekli olan pahalı ve komplike cihazlara olan gereksinim ortadan kalkmıştır.

Son yıllarda embriyoların yanı sıra oositlerin dondurulması konusunda da yoğun çalışmalar yapılmaktadır (DINNYES, 2000; HURTT, 2000). Ancak, embriyoların dondurulması ile karşılaştırıldığında başarı oranının daha düşük olduğu görülmektedir.

KLONLAMANNIN İNSANLARDA UYGULAMASI

Buraya kadar anlatılan kısımda klonlamanın üreme amaçlı kullanımından söz edilmiştir. Ancak klonlamanın birde tedavi amacıyla kullanımından bahsedilebilir. Klonlama teknolojisi insanların tedavisinde kullanılacak embriyonik kök hücrelerin üretiminde kullanılabilir. Kök hücreler bugün mucizevi hücreler olarak görülüyor. Ancak bu hücrelerin tedavi amaçlı kullanılmasını zorlaştıran ve çözümlenmesi gereken sorunlar vardır. Bunlar 1) nasıl daha etkili bir şekilde spesifik hücre tiplerine dönüşmeleri için yönlendirilebilir 2) farklılaşmış hücreler tümöral oluşumlara sebep olabilecek farklılaşmamış hücrelerden nasıl ayırt edilebilir 3) dokuları yenileyebilmeleri için nasıl etkili bir şekilde transfer edilebilir 4) farklılaşmış hücrelerin transferinden sonra hasta tarafından reddedilmesi nasıl önlenebilir? şeklinde sıralanmaktadır. Terapötik (tedavi amaçlı) klonlamanın bu sorunun çözümü olabileceği düşünülmeye başlanmıştır. Terapötik klonlama, hastadan alınan erişkin hücrenin yumurta hücresine transferi ile klon bir embriyonun üretilmesi, bu embriyodan kök hücrelerin elde edilmesi ve elde edilen kök hücrelerin istenilen hücreye dönüştürülerek tekrar hastaya verilmesidir. Hiç kuşkusuz kök hücre uygulamaları tedavisi günümüzde mümkün olmayan birçok hastalığın çözümü olacaktır. Bu gün kök hücreler göbek kordonu, kemik iliği gibi vücudun bazı bölgelerinden elde edilebilmesine karşın bunların sınırlı sayıda dokuya dönüşebilmeleri uygulama alanlarını kısıtlamaktadır. Oysa embriyodan elde edilen kök hücreler hertürlü dokuya dönüşebilme özelliğine sahiptir. Ancak bilim adamları bu kök hücrelerin vücut tarafından reddedilebileceğini bu nedenle kök hücrelerin hasta insanın hücreleri kullanılarak oluşturulan klon embriyolardan geliştirilmesinin daha iyi sonuç vereceğini iddia etmektedirler. Bu güne kadar klon insan embriyosundan üretilmiş kök hücre hattı mevcut değildir. Geçtiğimiz yıllarda Güney Kore’de üretildiği söylenen klon insan embriyonik kök hücrelerinin gerçek olmadığı geçtiğimiz günlerde ortaya çıkmıştır. Günümüzde embriyonik kök hücreler ile çalışmalar birçok ülkede ya çok sınırlı veya tamamen yasaktır. Ülkemizde de insan embriyonik kök hücrelerinin eldesi ve bu hücreler ile yapılacak çalışmalar Sağlık Bakanlığı tarafından düzenlemeler getirilene kadar yasaklanmıştır. Embriyonik kök hücrelerin klinik kullanımı henüz hiçbir yerde yoktur.

KAYNAKLAR

ABYDEERA, L.R., Wang, W.H., Cantley, T.C., Rieke, A., Prather, R.S., Day, B.N. Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture

can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev*, 51,395-401 (1998).

ADAMS, A.M., Pratt, S.L., Gibbons J.R., Arat,S., Respass D.S., Stice, S.L. Production of a cloned calf using kidney cells obtained from a 48-hour cooled carcass *Reprod Fertility Dev* 6(1,2):133 (2004).

ARAT, S., Gibbons, J., Rzucidlo, S.J., Miyoshi, K., Venable, A., Waltenburg, R., Stice, S.L. Bovine cloning using adult donor cells treated with roscovitine. *Biol. Reprod.*;64(suppl 1):173 (2001a).

ARAT, S., Rzucidlo S.J., Gibbons, J., Miyoshi, K., Stice, S.L. Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulosa cells into enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 60: 20-26 (2001b).

ARAT, S., Gibbons, J., Rzucidlo, S.J., Respass, D.S., Tumlin, M., Stice, S.L. In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. *Biol Reprod* 66: 1768-1774 (2002).

ARAT, S., Rzucidlo S.J., Stice, S.L. (2003) Gen expression and in-vitro development of interspecies nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev.* 66:334-342 (2003).

BAGIS, H., Odaman, H., Sagirkaya, H., Dinyéss, A. Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. *Mol. Reprod. Dev.*61: 173-179 (2002) .

BAGIS, H., Mercan Odaman, H. Effect of culture medium supplemented with β -mercaptoethanol and amino acids on implantation and development of different stage in vivo- or in vitro-derived mouse embryos. *Mol Reprod Dev.* 69:52-59. (2004)

BAGUISI, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Desrempes, 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* 17:456-461 (1999).

BENDELL, J.J., Dorrington, J.H. Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology*, 127, 533-540 (1990).

BEVERS, M.M., Dieleman, S.J., van den Hurk, R., Izadyar, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, 47,13-22 (1997).

BONDIOLI, K., Ramsoondar, J., Williams, B., Costa, C., Fodor, W. Cloned pigs generated from cultured skin fibroblast derived from a H-transferase transgenic boar. *Mol. Reprod. Dev.* 60:189-185 (2001).

CAMPBELL, KH., McWhir, J., Kind, AJ., Campbell, KH. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-66 (1996).

CAMPBELL, KH. Nuclear transfer in farm animal species. *Cell Dev Biol* 10: 245-252 (1999).

CHAMPBELL, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A., Wilmut, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380, 64-66 (1996).

CHEN D-Y., Wen, DC., Zhang, YP., Sun, QY., Han, ZM., Liu, ZH., Shi, P., Li JS., Xiangyu, JG., Lian, L., Kou, ZH., Whu, YQ., Chen, YC., Wang, PY., Zhang, HM. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol Reprod* 67: 637-642 (2002).

CIBELLI JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256-1258 (1998).

COLLAS, P., Robl, J.M. Nuclear transplantation by microinjection of inner cell mass and granulosa cell nuclei. *Mol. Reprod. Dev.* 38, 264-267 (1994).

- CSEH S, Horlacher W, Brem G, Corseli J, Seregi J, Solti L, Bailey L. Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions. *Theriogenology* 52: 103-113 (1999).
- DE LA Fuente, R., J.O'Brien, M., Eppig, J.J. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Hum. Reprod*, 14, 3060-3068 (1999).
- DE MATOS DG, Furnus C.C. The importance of having high glutathione level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, 53; 761-771 (2000).
- DINNYES A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod*63: 513-518 (2000).
- DONG, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N., Matzuk, M.M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383, 531-535 (1996).
- DU F., Sung L-Y., Tian X.C., Yang X. Differential cytoplasm requirement for embryonic and somatic cell nuclear transfer in cattle. *Mol Reprod Dev.* 63;183-191 (2002).
- EDASHIGE K, Asano A, An TZ, Kasai M. Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. *Cryobiology* 38: 273-280 (1999).
- EPPIG, J.J., Schultz, R.M., O'Brien, M., Chesnel, F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev.Biol*, 164, 1-9 (1994).
- ERICKSON, G.F., Danforth, D.R. Ovarian control of follicle development. *Am.J.Obstet.Gynaecol*, 172, 736-744 (1995).

- FAHRUDIN M, Otoi T, Suzuki T. Developmental competence of bovine embryos reconstructed by the transfer of somatic cells derived from frozen tissue. *J.Vet Med.Sci* 63(10).1151-54 (2001).
- FENG, P., Knecht, M., Catt, K.J. Hormonal control of epidermal growth factor receptor by gonadotropins during granulosa cell differentiation. *Endocrinology*, 120, 1121-1126 (1987).
- FUKU E, Kojima T, Shioya Y, Marcus GJ, Downey BR. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology* 29: 485-492 (1992).
- GRAZUL-BILSKA, A.T., Choi, J.T., Bilski, J.J., Weigl, R.M., Kirsch, J.D., Kraft, K.C., Reynolds, L.P., Redmer, D.A. Effect of epidermal growth factor on early embryonic development after in vitro fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogenology* 59,1449-1457 (2003).
- GIBBONS J, Arat S, Rzedzidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respass D, Venable A, Stice SL. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol. Reprod.* 66, 895-900 (2002).
- HARPER, K.M., Brackett, B.G. Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol Reprod.* 48, 409-416 (1993).
- HOCHI S. Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses. *J. Reprod Dev.* 49;13-21 (2003).
- HODGES, C.A., Stice, S.L. Generation of bovine transgenics using somatic cell nuclear transfer. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1-7 (2003).
- HURTT AE, Landim-Alvarenga F, Seidel GE, Squires EL. Vitrification of immature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology*, 54: 119-128 (2000).

- ITO K, Hirabayashi M, Ueda M, Nagao Y, Kimura K, Hanada A, Hochi S. Effect of timing of oocyte cryopreservation on in vitro development of nuclear-transferred bovine zygotes. *Mol. Reprod. Dev.* 54: 81-85 (1999).
- KASINATHAN P., Knott J.G., Wang Z, Jerry D.J., Robl J.M. Production of calves from G1 fibroblast. *Nature Biotech*, 19;1176-78 (2001).
- KATO Y., Tani T., Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J.Reprod Fertil*, 120:231-237 (2000).
- KEEFER CL, Baldassarre H, Keyston R, Wang B, Bahatia B, Bilodeau AS, Zhou JF, Leduc M, Downey BR, Lazaris A, Karatzas CN. Generation of dwarf goat (*capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. *Biol. Reprod.* 64: 849-856 (2001).
- KITIYANANT Y. Et al. Somatic cell cloning in buffalo: effect of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cell*;3:97-104 (2001).
- 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. *PNAS* 97:990-995 (2000).
- LAI L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* Jan 3 (2002).
- LANE M, Forest KT, Lyons EA, Bavister BD. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique. *Theriogenology*, 51:167 (1999).
- LANZA, R.P., Cibelli, J., Diaz, F., Moraes, C., Farin, P.W., Farin, C.E., Hammer, C.J., West, M.D., Damiani, P. Cloning of an endangered species using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2, 29-80 (2000).

- LIU, L., Ju, J-C., Yang X. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol Reprod Dev.* 49:298-307 (1998).
- LIU, J-L., Wang, M-K, Sun, Q-Y., Zhang, X-R., Jiang, L-K., Chen, D-Y. Refrigeration of donor cells in preparation for bovine somatic nuclear transfer. *Reproduction*, 122:801-808 (2001).
- LOI, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J., Cappai, P., Clinton., M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotech* 19:962-964 (2001).
- LOI, P., Clinton, M., Barboni, B., Fulka, J., Cappai, P., Feil, R., Moor, RM., Ptak, G. Nuclei of nonviable ovine somatic cells develop into lambs after nuclear transplantation. *Biol Reprod*, 67: 126-132 (2002).
- LOSKUTOFF, N.M., John, W.H., Betteridge, K.J. The developmental competence of bovine embryos with reduced cell numbers. *Theriogenology* 39, 95-107 (1993).
- LONERGAN, P., Carolan, C., Langendonck, A.V., Donnay, I., Khatir, H., Merimillod, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod*, 54,1420-1429 (1996).
- MARTINEZ AG, Matkovic M. Cryopreservation of bovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology*, 49: 1039-1049 (1998).
- MEN H., Monson R.L., Rutledge J.J. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. *Theriogenology*, 57;1095-1103 (2002).
- MCCREATH, K.J., Howcroft, J., Campbell, K.H., Colman, A., Schnieke, A.E., King, A.J. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 405,1066-1069 (2000).
- MIYASHITA, N., Shiga, K., Yonai, M., Kaneyama, K., Kobayashi, S., Kojima, T., Goto, Y., Kishi, M., Aso, H., Suzuki, T., Sakaguchi, M., Nagai, T. Remarkable differences in

telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol Reprod.* 66, 1649-1655 (2002).

MIYOSHI, K., Rzucidlo, S.J., Pratt, S.L., Stice, S.L. Improvement in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol Reprod.* 68,1079-1086 (2003).

MOOR, R.M., Dai, Y., Lee, C., Fulka, J.Jr. Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum Reprod Update*, 4,223-236 (1998).

MTANGA N.R., Varisanga M.D., Dong Y.J., Rajamahendran R., Suzuki T. Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. *Theriogenology*, 59; 1393-1402 (2003).

PALASZ AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol AV* 14: 127-149(1996).

RALL WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos. *Nature*, 313: 573-574 (1985)

PATERSON, L., DeSousa, P., Ritchie, W., King, T., Wilmut, I.A. Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials application of reproductive cloning. *Anim.Reprod.Sci* 79,137-143 (2003).

PEURA TT, Vajta G, Lane MW, Boekel KN, Trounson AO. Vitrification of bovine cytoplasts for nuclear transfer. *Theriogenology*, 51: 211 (1999).

POLEJAEVA IA, Chen SH, Vaught T, Page R, Mullins J, Ball S, Dai Y, Iran J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407: 86-90 (2000).

PRATHER, R.S., Barnes, F.L., Sims, M.M., Robl, J.M., Eyestone, W.H., First, N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryos: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol.Reprod.* 37, 859-866 (1987).

- PRATHER, R.S., Sims, M.M., First, N.L. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41, 414-418 (1989).
- RHO G-J, Kim S., Yoo J-G., Balasubramanian S., Lee H-J., Choe S.Y. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 63:464-470 (2002).
- SAHLA, O., Nugent, D., Dada, T., Kaufmann, S., Levett, S., Jenner, L., Lui, S., Sharma, V. The relationship between follicular fluid aspirate volume and oocyte maturity in in-vitro fertilization cycles. *Human Reproduction*, 123,1901-1906 (1998).
- SAKAGUCHI M., Dominko T., Yamauchi N., Leibfried-Rutledge M.L., Nagai T., First N.L. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. *Reproduction*, 123;135-142 (2002).
- SCHNIEKE AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. Human factor IX transgenic sheep production by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278: 2130-2133 (1997).
- SIMS, M., First, N.L. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cell. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 6143-6147 (1994).
- SMITH, L.C., Wilmut, I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40, 1027-1035 (1989).
- STEIN-STEFANI, J., Holtz, W. Splitting of porcine embryos at the four-cell or morula stage. *Theriogenology* 41, 961-968 (1994).
- STICE, S.L., Robl, J.M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol.Reprod.* 39, 657-664 (1988).

- STICE SL, Gibbons J, Rzucidlo SJ, Baile CA. Improvements in nuclear transfer procedures will increase commercial utilization of animal cloning. *Asian-Aus J Anim Sci*, 13: 856-860 (2000).
- SINGH, B., Rutledge, J.M., Armstrong, D.T. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev*, 40, 391-399 (1995).
- SHI, W., Zakhartchenko, V., Wolf, E. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation* 71, 91-113 (2003).
- SHIGA K., Fujita T., Hirose K., Sasae Y., Nagai T. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology*, 52;527-535 (1999).
- TAKAHASHI M., Nagai T., Okamura N., Takahashi H., Okano A. Promoting effect of β -mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol Reprod*, 6:562-567 (2002).
- VAJTA G. Vitrification of bovine oocytes and embryos. *Embryo Transfer Newsletter* 15: 12-18 (1997).
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW AM, Den Daas JHG, Rall WF. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification of one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology* 48: 1071-1084, 1997 (1997).
- VIGNON X., Chesne P., LeBourhis D., Flechon JE., Heyman Y., Renard J.P. Development potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes with cultured somatic cells. *Compt Rend Acad Sci*, 321;735-745 (1998).
- WANG, W.H., Abeydeera, L.R., Cantley, T.C., Day, B.N. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by in vitro fertilization. *J Reprod Fertil*, 111,101-108 (1997).

- WELLS D.N., Laible G., Tucker F.C., Miller A.L., Oliver J.E., Xiang T., Forsyth J.T., Berg M.C., Cockrem K., L'Huillier P.J., Tervit H.R., Oback B. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology*, 59;45-59 (2003).
- WILLADSEN, S.M. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277, 298-300 (1979)
- WILLADSEN S.M. The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 65, 165-172 (1981a).
- WILLADSEN S.M., Polge, C..Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet.Rec.*108, 211-213 (1981b).
- WILLADSEN S.M. Nuclear transplantaion in sheep embryos. *Nature* 320, 63-65 (1986).
- WILMUT I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell HS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813 (1997).
- WOLF E, Zakhartchenko V, Brem G. Nuclear transfer in mammals: Recent developments and future perspectives. *Journal of Biotech* 65: 99-110 (1998).