

## Anadolu Boz Sığırının Klonlanması

S Arat<sup>1\*</sup>, A Taş Çabutcu<sup>1</sup>, T Akkoç<sup>1</sup>, G Çetinkaya<sup>1</sup>, H Bağış<sup>1</sup>, S Pabuccuoğlu<sup>2</sup>, Ü Çirit<sup>2</sup>, K Demir<sup>2</sup>, K Ak<sup>2</sup>, A Şenünver<sup>2</sup>, R Kılıçaslan<sup>2</sup>, H Sağırkaya<sup>3</sup>, Y Nak<sup>3</sup>, D Nak<sup>3</sup>

- 1.TUBITAK, MAM-Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze, Kocaeli,
2. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama A.B.D ve Doğum ve Jinekoloji A.B.D Avcılar, İstanbul
3. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama A.B.D ve Doğum ve Jinekoloji A.B.D, Görükle, Bursa

### Özet

Klonlama eşeysiz üreme yöntemiyle genetik yapısı birbirinin aynı canlıların oluşturulması anlamına gelmektedir. Klonlama teknolojisinin tarımda ve tıpta çok büyük bir uygulama alanı bulacağı gerek bilim adamlarının gerekse özel sektörün ortak görüşüdür. Teknolojinin uygulama alanlarından biri nesli tükenmekte olan ve az sayıda kaldığı için üretilemeyen hayvanların bu teknoloji kullanılarak çoğaltılmasıdır. Bu projenin amacı sayıları gittikçe azalan Anadolu Yerli Sığırı Boz ırkın klonlama teknolojisi ile üretilme olanağının araştırılmasıdır. Çalışmada boz sığırdan elde edilen kıkırdak, granüloza, ve fibroblast olmak üzere üç hücre tipi çekirdek kaynağı vericisi olarak seçilmiştir. Kıkırdak ve fibroblast hücreleri kulaktan alınan doku parçasından, granüloza hücreleri ise ovaryum folliküllerinin aspirasyonu ile elde edilmiş, % 10 fetal buzağı serumu (FBS) içeren DMEM F12 medyumunda kültüre edilmiştir. Stoplazma kaynağı olarak mezbadan alınan sığır ovaryumlarından elde edilen yumurta hücreleri kullanılmıştır. Yumurta hücreleri 18 saat in vitro maturasyona tabi tutulmuş ve daha sonra enükle edilmiştir. Enükle edilen yumurta hücrelerinin her birine hücre transfer edilmiş ve elektrik akımı ile kaynaşması sağlanmıştır. Kaynaşma sonrası nükleer transfer embriyoları bölünmeleri için 10 dk 5 mM Calcium, 1 saat 10 µg/ml Cycloheximid ve 2.5 µg/ml Cytochalasin D kombinasyonu ve 4 saat 10 µg/ml Cycloheximid uygulaması ile aktive edilmiştir. Kimyasal aktivasyon sonrası embriyolar önce 8 mg/ml BSA içeren Sage bölünme medyumunda 72 saat ve % 5 FBS, 4 mg/ml BSA içeren Sage blastosist medyumunda ilave 4 gün kültüre edilmiştir. Kültür sonucu granüloza hücrelerinden gelişen klon blastosistlerin oranı (% 33.33; 90/270) kıkırdak ve fibroblast hücrelerinden gelişen klon blastosist oranından (%21.5; 134/623, %19.48; 30/154) yüksek bulunmuştur. Alıcılara transfer edilen 79 embriyonun 47'si granüloza, 24'ü kıkırdak, 8 adedi ise fibroblast hücrelerinden gelişen embriyolardır. Fibroblasttan gelişen embriyolardan bir tanesi sağlıklı bir klon buzağı ile sonuçlanmış, granüloza hücrelerinden gelişen embriyolardan 80-150 gün arası üç, kıkırdak hücrelerinden gelişen embriyolardan ise 80 günlük iki gebelik devam etmektedir. Bu çalışma ile dünyada ilk kez Anadolu Yerli Sığırlarından biri olan Boz ırk klonlanmıştır.

\*Yazışma adresi: sezen.arat@mam.gov.tr

## Giriş

Son yıllarda içinde sığırların da bulunduğu çiftlik hayvanlarının klonlanması üzerine birçok çalışma yapılmıştır. 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 üretilemeyen hayvanların bu teknoloji kullanılarak çoğaltılmasıdır. 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 yaşamıştır. Araştırmacılar klon yavrunun klonlamadaki bir probleminden değil, genelde yeni doğanlarda meydana gelen bir enfeksiyon sonucu öldüğünü açıklamışlardır (1). Başka bir grup 2001 yılında bir yaban koyununu evcil koyunun yumurta hücresi kullanarak başarıyla klonlamıştır (2).

Klonlama olarak bilinen nükleer transfer (NT) çeşitli başarılarla öncülük etmiş ve bugünkü transgenik tekniklere çok sayıda avantaj getirmiştir ancak gelecekteki başarısını arttırmak için geliştirilmesi gerekir. Sığır da dahil olmak üzere çoğu hayvanda NT'in başarı ortalaması %0.5 ila 10 arasında değişmektedir. IVF'le karşılaştırıldığında embriyoların çoğu hamileliğin 35 ila 60. günleri arasında %50-100 fetal kayıpla sonuçlanmaktadır (3). Klonlanmış sığırdaki perinatal kayıp genel populasyona oranla daha fazladır. Bu kayıplar tek bir anomaliden çok, yenidoğanın artan ağırlığından, akciğerdeki anormalliklere, solunum problemlerinden metabolik hasarlara kadar değişen komplikasyonlara bağlıdır. Yavrunun normalden büyük olması ile karakterize büyük yavru sendromu sık görülen bir gelişme bozukluğudur (4).

Şuan bilinmeyen birçok yönü olmasına rağmen klonlama gerek hayvancılık konusunda genetik verimliliği üstün hayvanların, nesli tükenmekte olan canlıların yada genetik manipülasyonlarla üretilmiş örneğin transgenik hayvanların çoğaltılmasında gerekse terapotik klonlama olarak adlandırılan tedavi yöntemleri konusunda elit bir biyoteknolojik yöntemdir. Bu yöntemin gelecekte sorunlarının çözümleneceği düşünülmekte ve özellikle doğanın korunması için oluşturulan gen bankalarında hücreler gelecekte kullanılabilme umuduyla stoklanmaktadır. Bu projede kullanılan hücreler ülkemizde oluşturulan hayvan gen bankasında saklanan hücrelerdir. Sayıları ülkemizde gittikçe azalan bir ırk olan Anadolu Boz sığırının hücreleri gen bankasında stoklanmıştır. Bu bağlamda doğan sağlıklı klon buzağı gen bankasında saklanan hücrelerin gelecekte bir canlıya dönüşebileceğinin canlı kanıtıdır.

## Materyal ve Metod

### **Hücre izolasyonu ve kültürü:**

Kıkırdak ve fibroblast hücreleri kulaktan alınan doku parçasından, granüloza hücreleri ise ovaryum folliküllerinin aspirasyonu ile elde edilmiş, %10 fetal buzağı serumu (FBS), %1 antibiyotik antimikotik içeren hücre kültür medyumunda (DMEM-F12) % 5 CO<sub>2</sub> 'li 37 °C kültüre edilmiştir. Kültür kaplarını tamamen kaplayan hücreler tripsinlenmiş ve %10 DMSO, %40 FBS ve %50 DMEM-F12 içeren dondurma medyumunda dondurulmuş ve sıvı azot tankına yerleştirilmiştir.

### **Hücre Sinkronizasyonu:**

Nükleer transfer (NT) öncesinde somatik hücreler %10 FCS içeren DMEM/F12 medyumunda kültüre edilerek konfluent (GO/G1) olması sağlanmıştır (Kontakt İnhibisyon). Hücrelerin konfluent olmasının ardından 4 gün boyunca %5 FCS içeren medyumda bırakılmışlardır. NT günü hücreler tripsin ile kaldırılmış ve %5 FCS içeren medyum ile hazırlanmıştır (5,6).

### **Yumurta hücresinin maturasyonu:**

Mezbahadan alınan ovaryumlardan foliküllerin aspirasyonu ile kumululu yumurtalar toplanmıştır. Kumulus-yumurta kompleksleri 10 % FCS, 50 µg/ml sodyum piruvat, 0.01U/ml bLH, 0.01 U/ml bFSH, 100 ng/ml IGF-1, 10 ng/ml EGF ve penisilin/streptomisin içeren TCM199 medyumunda ve 39°C %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 18 saat tutularak olgunlaştırılmıştır. Olgun yumurtalar(MII) kumulus hücrelerinden hyalorinidaz enzimi yardımı ile temizlendikten sonra birinci polar cisimciye sahip olanlar kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Nükleer transfer :**

Mature yumurtalar, 1 ml TL-Hepes içerisine 1,5 µl Cyto-B ve 2 µl bisbenzimid eklenmiş boyama medyumunda 10 dakika tutularak boyanmış ve 1.polar cisim ile metafaz pleytinin görünmesi sağlanmıştır. İvert mikroskop altında mikromaniplatörlerin yardımı ile UV ışıktaki 1.polar cisim ile metafaz pleyti enüklasyon pipeti ile alınmıştır. Enükle edilen yumurtaların perivitellin aralığına bir adet hücre verilerek nükleer transfer tamamlanmıştır. Hücrenin transferinden sonra elektrik akımı verilerek hücre ve yumurta stoplazmasının kaynaşması sağlanmıştır. Bu işlem sonrası elde edilen tek hücreli embriyolar bölünmeleri için kimyasal olarak uyarılmış ve bunun ardından 7-8 gün boyunca embriyo kültür medyumunda kültüre edilmiştir. Kültüre edilen embriyolar daha önce hormonal olarak sinkronize edilmiş olan 7 günlük alıcılara transfer edilmiştir (6,7).

## **Sonuç ve Tartışma**

Kültür sonucu granüloza hücrelerinden gelişen klon blastosislerin oranı (% 33.33; 90/270) kıkırdak ve fibroblast hücrelerinden gelişen klon blastosist oranından (%21.5; 134/623, %19.48; 30/154) yüksek bulunmuştur. Alıcılara transfer edilen 79 embriyonun 47'si granüloza, 24'ü kıkırdak, 8 adedi ise fibroblast hücrelerinden gelişen embriyolardır. Transfer edilen 79 embriyodan 6 tanesi 80 (% 7.5) günü geçmiştir. Fibroblasttan gelişen embriyolardan bir tanesi (%12.5) sağlıklı bir klon buzağı ile sonuçlanmış, granüloza hücrelerinden gelişen embriyolardan 80-150 gün arası üç (% 6.3), kıkırdak hücrelerinden gelişen embriyolardan ise 80 günlük iki gebelik (% 8.3) devam etmektedir. Klon yavrunun 11 mikrosatelit lokusu için genotipi hücre vericisi (donör) ile tamamen aynıdır.

Bu çalışma yerli sığır ırklarımızda yapılan dünyadaki ilk çalışmadır. Bu nedenle alınan sonuçlar özellikle de daha önce hiç çalışılmamış ırklar olduğu göz önüne alındığında literatür verilerinden çok farklı değildir. Literatür verileri klonlamada canlı doğum oranının % 0.5-10 arasında olduğunu bunun sebeplerinin, vericinin yaşı, ırkı, hücre tipi, hücre pasaj sayısı, yumurta hücresinin kalitesi, yumurta vericisinin ırkı, embriyo kültür koşulları, alıcının yaşı, bakım ve beslenmesi gibi çok sayıda faktöre bağlı olduğunu bildirmektedir. Klon embriyolarda en önemli kayıpların 30-60 günlük erken gebelikte olduğu ve kayıp oranının %50-100 arasında olduğunu belirtilmektedir. İleri gebeliklerde ise en büyük sorunun yavrunun kendi ırkına göre daha hızlı gelişmesi (iri yavru sendromu) ancak buna plasentanın uyum sağlayamaması sonucu fetal distres ve ardından şekillenen hipoksi olduğu

belirtilmektedir. Diğer önemli bir sorun plasentanın yetersizliğine bağlı gelişen hidrops vakalarıdır. Klon plasentada, plasentom sayısının azlığı, anormal büyük plasentomlar plasentanın yetersizliğinin göstergesi olarak bildirilmekte, verici hayvandan alınan hücrenin geriye programlanmasında meydana gelen ve klonlama teknolojisine bağlı açıklanamayan sorunlardan en önemlisi olduğu vurgulanmaktadır (8,9,10,11). Bu çalışma TOVAG-1040360, ve KAMAG-106G005 nolu projeler ile desteklenmiştir.

### Referanslar

1. R.P. Lanza, J. Cibelli, F. Diaz, C. Moraes, P.W. Farin, C.E. Farin, C.J. Hammer, M.D. West, P. Damiani, "Cloning of an endangered species using interspecies nuclear transfer". Cloning, Vol.2, pp. 29-80, 2000.
2. P. Loi, G. Ptak, B. Barboni, J. Fulka, P. Cappai, M. Clinton, "Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells", Nature Biotech, 19:962-964, 2001.
3. J.L. Edwards, F.N. Schrick, M.D. McCracken,. "Cloning adult farm animals:a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer". Am J Reprod Immunol. Vol.50, pp.113-123, 2003.
4. J.B. Cibelli, S.L. Stice, P.J. Golueke, J.J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, F.A.P. de Leon, J.M. Robl, "Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts" Science, Vol. 280, pp.1256-1258, 1998.
5. S. Arat, J. Gibbons, S.J. Rzucidlo, D.S. Respass, M. Tumlin, S.L. Stice, In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. Biol Reprod , Vol.66, pp.1768-1774, 2002.
6. S. Arat, A. Tas, G. Cetinkaya, T. Akkoc, H. Bagis," The Effects of Embryo Culture Mediums on Reprogramming of Cartilage Cells From Male and Female Cow", FEBS, Vol. 275(1), pp. 296-296, 2008.
7. S. Arat, S.J. Rzucidlo, J. Gibbons, K. Miyoshi, S.L. Stice, 2001. Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulose cells into enucleated oocytes. Mol. Reprod. Dev, Vol. 60, pp. 20-26.
8. Y. Heyman, P. Chavatte-Palmer, D. LeBourhis, "Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos", Biol Reprod, Vol. 66, pp.6-13, 2002.
9. P.W. Farin, J.A. Piedrahita, C.E. Farin, "Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos", Theriogenology, Vol. 65, pp. 178-191, 2006.
10. P. Lonergan, A.C.O. Evans, Boland E, "Pregnancy and fetal characteristics after transfer of vitrified in vivo and cloned bovine embryos", Theriogenology, Vol. 68, pp.1128-1137, 2007.
11. M. Panarace, J.I. Agüero, M. Garrote, "How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experince", Theriogenology, Vol. 67, pp.142-151, 2007.