

Klonlama

Haydar BAĞIŞ* Hakan SAĞIRKAYA**

Geliş Tarihi: 12.12.2000

Özet: Bu makalenin temel amacı, 1997 yılında yetişkin bir koyundan elde edilen “Dolly” isimli kuzuyla yoğun şekilde çalışılan klonlama ile ilgili genel kavramları ve çalışmalarını kısaca özetlemek ve ilgili kişilere temel bilgileri sağlamaktır.

Anahtar Kelimeler: klonlama, nükleer transfer, embriyo.

Cloning

Summary: Basic purpose of this review is to summarize general concepts and studies related to cloning and give basic information to people interested in cloning studied intensively since the production of “Dolly” from adult sheep in 1997.

Key Words: Cloning, nuclear transfer, embryo.

Giriş

Klon, bir bireyden fertilizasyon olmaksızın elde edilen yavru olarak tanımlanabilir. Biyologlar, klonlama kelimesini genellikle genetik olarak birden çok identikal bireylerin üretimini ifade etmek için kullanırlar. Günümüzde ise, klonlama daha genel bir anlamda kullanılmaktadır. Buna örnek olarak fertilizasyon olmaksızın bir veya birden fazla bireyin üretilmesini verebiliriz. İdentikal ikizler (veya üçüzler vs.) genetik açıdan doğal klonlardır. Mikroskop altında morula ya da blastosist dönemindeki embriyoların iki eşit parçaya bölünmesi (embriyo splitting) ile elde edilen parçaların taşıyıcı ineklere transferi sonucu oluşturulan identikal ikiz sığırlar üzerinde 10 yılı aşkın bir süredir yoğun şekilde çalışılmaktadır²⁵. Loskutoff ve ark.³⁶, 1993 yılında, çok sayıda embriyonun, nükleer transfer (NT) yöntemiyle, teorikte sınırsız sayıda üretilmesine imkan sağlanmasına rağmen göreceli olarak daha kolay

olan blastomer separasyonu (4 ya da 8 hücreli gibi erken embriyonik gelişim dönemindeki embriyoların blastomerlerinin ayrıştırılarak her birinden bir embriyo gelişiminin sağlanması) ve embriyoların iki eşit parçaya bölünmesi metotları, sitoplazmik değişimlerden dolayı kaynaklanabilecek genetik bozuklukların ortaya çıkma riskini azaltması nedeniyle sınırlı sayıda identikal hayvanların üretiminde, hala dikkate değer faydalar sağlayan bu yöntemlerin, NT metodunun kullanımını sınırlayacağını belirtmiştir²³.

Elli yılı aşkın bir süredir, gelişim biyolojisinin en önemli sorularından birisi, farklılaşmamış bir hücredeki genlerin başka yönde farklılaşmış bir hücredeki genlere özdeş olup olmadığı ve farklılaşmış bir hücre nükleusunun, zigot nükleusu ile yerleri değiştirildiğinde, bunun normal bir embriyonik gelişmeyi başlatıp başlatmayacağı olmuştur. Bu sadece totipotent (yetişkin bir organizmadaki farklı bütün hücre tiplerini oluşturan hücre

* Dr.; TÜBİTAK-MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü. Gebze/Kocaeli-TÜRKİYE

** Araş. Gör.; U.Ü. Vet. Fak. Dölerme ve Suni Tohumlama ABD. Bursa-TÜRKİYE

hatlarına farklılaşabilen) bir nükleusun enükleasyon işlemi (yumurta hücresi içerisindeki I. kutup hücresinin ve metafaz II aşamasındaki olgun oositin DNA materyalinin bulunduğu kutup hücresine yakın bölgedeki ooplazmanın, toplam ooplazmanın 1/3'lük kısmını geçmeyecek şekilde bir pipet yardımıyla uzaklaştırılması) yapılmış olgun bir oosit içerisine transferini gerektiren nükleer transfer ya da nükleer transplantasyon (NT) denilen yöntem kullanılarak test edilebilmiştir. NT işleminden sonra, embriyonik gelişimin başlatılabilmesi için aktive edilmesi gerekmektedir. Bunun içinde çeşitli kimyasal maddeler kullanılmaktadır^{8, 46}. Briggs ve King⁹, 1952 yılında, yayınladıkları çalışmalarında, klonlanmış kurbağalarda gösterdikleri başarının, çok erken gelişme dönemlerinde verici olarak kullanılan kurbağa embriyolarından elde edilen nükleusların uygun bir şekilde yapılan transferine bağlı olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar, NT metodu ile normal kurbağa elde etme şansının, verici embriyonun yaşının artmasına paralel olarak hızla azaldığı kanısını ortaya çıkarmıştır. Nükleer yaşlanmayla birlikte meydana gelen totipotensi (bir hücrenin yetişkin bir organizmayı şekillendiren her türlü hücre tipine farklılaşma yeteneği) kaybı olgusu yoğun bir şekilde çalışılmış ve bu durumun, bütün amphibian türler için geçerli olduğu kabul edilmiştir. Aynı şekilde, NT sonucu elde edilmiş balıklar da bildirilmiştir. Daha sonra, 1981 yılında, Illmensee ve Hoppe²⁸, NT metodu ile fare yavrularını üretmeyi başarmışlardır. Bu uygulama, pronükleusları mikro-cerrahi yöntemiyle uzaklaştırılmış döllenmiş bir hücreli yumurtaya (zigota) fare blastosistlerinin iç hücre kitlesinden (inner cell mass) alınmış hücrelerin transferiyle gerçekleştirilmiştir. McGrath ve Solter³⁷, 1983 yılında, çiftlik hayvanlarında nükleer transfer için gerekli olan bütün manipulas-yon uygulamalarına temel olan fareler üzerindeki çalışmalarını tanımlamışlardır.

Memelilerde, nükleer transfer, daha çok embriyolojik çalışmalarda ve üstün vasıflı çiftlik hayvan embriyolarının çoğaltılmasında önemli bir araç olarak kullanılmaktadır^{6,7,14,16,51,64,65}. Son 10-20 yıl içerisinde, bazı biyoteknoloji firmaları çiftlik hayvan embriyolarının klonlamasının ticari olarak sunumu konusunda ciddi yatırımlar yapmışlardır. Prosedürlerin güvenilir, hantal ve oldukça da pahalı olmasından dolayı, bugün için ticari olarak dikkate değer bir ilerleme kaydedilmiş değildir. Nükleer transfer işlemi,

normal gebelik süresini daha da uzatmaktadır ve elde edilen yavrular, genellikle normalden daha iri, ama normal yaşama oranları daha düşük olarak dünyaya gelmektedir^{24,32,53}. Ayrıca, bunlara ilaveten klonlamada 3 yıl öncesine kadar embriyoların kullanılması, inek ve boğa genlerinin rekombinasyonunu gerektirdiğinden elde edilen buzağuların genetik özelliklerinin %100 iyi olacağını da garanti etmek mümkün olmamıştır.

Bu yayının amacı, klonlama alanındaki gelişmelerle ilgili bilgileri, kısa bir şekilde özetleyerek, klonlamanın potansiyel kullanım avantajları hakkında özlü bilgiler sağlamaktır.

Klonlamada Hücre Siklusu

Standart ökaryotik hücre siklusu, büyümenin ve DNA sentezinin gerçekleştiği interfaz ve hücre bölünmesinin meydana geldiği kısa bir aralığı kapsayan M fazı (mitoz ya da mayoz bölünme dönemi) olmak üzere iki kısma ayrılır¹. İnterfazda kendi içinde, G₁ fazı (DNA sentezinden önceki gelişme dönemi), S fazı (DNA sentezinin gerçekleştiği dönem) ve diğer gelişme dönemi olan G₂ fazı (bölünmeden önceki gelişme dönemi) olarak üçe ayrılır. Kontrol noktaları (checkpoints) ve kompleks kontrol mekanizmaları, hücre bölünme siklusuna, sadece her şeyin kendi sırası dahilinde ve normal şartlarda şekillendiği zaman ilerlemesi için izin vermekte ve bu münasebetle her bir hücre siklusundaki normal olayları koordine etmeleriyle hücreleri yıkımlan-madan korumada önemli rol oynarlar. Hücre bölünmesinin devam etmesi için gerekli olan uygun şartların bozulduğu durumlarda (uygun besin maddelerinin eksikliği ya da yokluğu gibi), en azından bazı hücreler hücre bölünmesinden sonra (örneğin; hücre G₁ fazında iken) G₀ fazı olarak adlandırılan sakin faza ya da dinlenme fazına girerek normal hücre siklusundan ayrılma yeteneğine sahiptir. Bu durumda iken, hücrenin metabolizması ve biyokimyası hücrenin yaşamını devam ettirmesi için gerekli olan minimum düzeye düşürülür⁶⁶.

Embriyonik gelişme fertilizasyonla aktive edilerek başlatıldıktan sonra, embriyonik hücre siklusu büyüme fazlarını atlayarak yoluna devam eder. Sadece S ve M fazlarından oluşan bu erken gelişme döneminde hücre siklusları göreceli olarak daha kısadır ve G₀ fazı için zaman ayrılmaz. Fertilizasyondan önce oositin gelişmesi iki kez durdurulur. Birincisi, I. mayoz

bölünmenin profaz döneminde (germinal vezikül döneminde) olur. Bu duraklama LH hormonunun etkisiyle ortadan kaldırılarak, ikinci duraklama dönemine kadar gelişme sürdürülür. İkinci duraklama, II. mayozun metafaz döneminde gerçekleşir ve böylece oosit maturasyonunu tamamlar. II. mayozda duraklamış olan oosit, sperm penetrasyonu ile tekrar aktive edilerek II. mayozu kaldığı yerden tamamlar. Geliştirilen NT prosedürlerinde, verici nükleusun hücre siklusunun düzenlenmesine ve alıcı sitoplazmanın (enükleasyondan sonra oositteki sitoplazma) durumuna daha çok dikkat gösterilmiştir. Uygun olmayan hücre siklus fazının seçilmesi, kromozomların zarar görmesine ve/veya birinci hücre siklusu süresince DNA replikasyonunun (DNA'nın kendini eşlemesi) uygun olmayan biçimde cereyan etmesinden dolayı, aneuploidi ve benzeri bozukluklara sebep olabilir^{10,14,15}. Bunun dışında, literatürlerden de anlaşılacağı gibi, hücre siklusu senkronizasyonunun derecesi de nükleer transfer embriyolarının gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır⁵². Örneğin; tavşanlarda yapılan bir çalışmada kimyasal yolla G₁ fazında iken durdurulan hücrelerin, S fazında iken durdurulanlara oranla, NT işleminden sonra, blastosist dönemine kadar olan gelişme oranları sırasıyla %71 ve %15 olarak bildirilmiştir¹⁹. Wakayama ve ark.⁶⁰, G₁ ya da G₂/M fazında bulunan fare embriyonik kök hücrelerinin klonlama sonrası doğuma kadar gelişimi destekleyebildiklerini bildirmişlerdir. NT yoluyla üretilen bir embriyonun, normal gelişmesini sürdürebilmesi için, yeni fertilize olmuş bir oositi taklit edebilecek şekilde gen ekspirasyonunu (anlatımını) yeniden programlayabilmesi (reprogramming) gerekmektedir³¹.

Nükleer Transfer (NT) Metodu ile Klonlama

Şu an popüler olan Edinburg grubunu oluşturan araştırmacılar, 1996 yılında, kurulmuş olan bir hücre hattından NT yoluyla doğan kuzuları rapor etmiştir¹¹⁻¹³. Koyun embriyo hücrelerinden elde edilen hücreler 6-13 kez pasajlanarak kültüre edildikten sonra, bu hücrelerin nükleuslarının enükle edilmiş oositler içine transferlerinden önce, G₀ fazına girmeleri, serum açıklığına tabii (serumdan yoksun ortamda) tutulmaları yoluyla sağlanmıştır. Verici hücrelerde G₀ fazının uyarılmasının, verici hücredeki kromatin yapısını, nükleer yeniden programlanmaya (nuclear rep-rogramming)

yardımcı olmak ve embriyonik gelişmeye fırsat sağlamak için modifiye ettiği bildirilmiştir. Bu yaklaşım çiftlik hayvanlarında gen fonksiyonlarının analizleri ve modifikasyonu için aynı düzeyde önemli fırsatları sağlamaktadır ki; bu işlem, embriyonik kök hücrelerin kullanımı yoluyla farelerde uygulanmaktadır.

Daha sonra 1997 yılı başlarında, yine Edinburg'tan Wilmut ve ark.⁶⁶ tarafından embriyonik hücrelerin, farklılaşmış fötüs ve yetişkin hayvan hücrelerinin NT metoduyla yapılmış transferlerinden sonra, her bir gruptan klon yavrular elde edilmiştir. Gebe bir koyunun meme bezinden alınan hücrenin nükleusunun transferi ile gerçekleştirilen yetişkin bir hayvanın klonlanması NT alanındaki önemli bir ilk olarak bilim dünyasında yeni bir dönemi başlatmıştır. Araştırmacılar raporlarında, olgun bir hücreden elde ettikleri kuzu ile, transfer edilen hücrenin farklılaşmasının, doğuma kadar ki gelişme için gerekli genetik materyalin tersine çevrilemeyen, tek yönlü bir modifikasyonunun olmadığı gerçeğini ispatlamışlardır. Elde edilen bu bulgular, nükleer verici hücrelerin dinlenme fazına gelmelerinin sağlanmasıyla, örneğin hücrelerin açlığa maruz bırakılmalarının sonucu olarak G₀ fazına girmeleriyle, yani normal hücre siklusundan ayrılmalarıyla, farklılaşmasını tamamlamış birçok hücreden NT metodu aracılığı ile normal embriyonik gelişimin sağlanabileceğinin mümkün olduğu görüşünü desteklemiştir⁶⁶.

Wilmut ve ark.⁶⁶ yayınlanan raporlarında, yukarıda da bahsedildiği gibi, en büyük ilgiyi gebeliğinin son 3 aylık dönemindeki 6 yaşlı bir koyundan köken alan meme bezi epitel hücrelerinin nükleer verici olarak kullanılması görmüştür. Bu çalışmada, hücre füzyonundaki % 63.8'lik başarıyla elde edilmiş 277 oosit, füzyondan sonra *in vivo* kültür için yumurta kanallarının içerisine transfer edilmiş ve 247 (% 89.2) tanesi tekrar geriye toplanabilmiştir. Bunlardan da, 29 (% 11.7) tanesi morula ya da blastosist dönemine ulaşabilmiştir. On üç tane taşıyıcı hayvana yapılan bu 29 embriyonun transferinden, sadece 1 gebelik elde edilmiş ve bu gebeliğin sonunda da, 1 tane canlı kuzu "Dolly" meydana gelmiştir. Burada, transfer edilen embriyolardan elde edilen canlı kuzu oranı % 3.4'tür. Fin Dorset kuzusunun 148 günlük gebelik sürecinden (bu ırk için ortalama gebelik süresi 143 gün) sonraki doğum ağırlığı 6.6 kg olarak tespit edilmiştir⁶⁶. NT'deki bütün aşamaların

geliştirilebileceği ve daha kolay ve elverişli hale getirilebileceği açık bir gerçektir; örneğin, tanımlanmış besi yerlerinin, oosit maturasyonu ve *in vitro* kültür için kullanılması gibi³⁴. Bu dikkate değer başarı, Schnieke ve ark. tarafından⁴⁹, Roslin Enstitüsünün ve PPL Therapeutics firmasının ortak katkıları sonucu, insan faktör IX geni ile transfeksiyon (trans-fectio) edilmiş fetal fibroblast hücrelerden, nükleer transfer metoduyla transgenik kuzuların klonlanmasıyla daha da ilerletilmiştir.

Koyunlarda yaptıkları çalışmada, Loi ve ark.³⁴, beş ayrı grubun dördünden klon kuzular elde etmişlerdir. Bu kuzuların sayısı, beşer tanesi 2 ayrı gruptan gelen erkek ve dişi, diğer gruplardan gelen 2 çift erkek ikiz olmak üzere toplam 14 tanedir. Burada 16 hücreli embriyolardan elde edilen blastomerlerin enükle edilmiş preaktif sitoplazmalara S fazında iken transfer edilmesi yoluyla NT gerçekleştirilmiştir. *In-vivo* oositlerin eldesi ve NT uygulaması sonucu elde edilen embriyoların *in vivo* kültürü için kullanılan yöntemler Wilmut ve ark.'nın⁶⁶ uyguladıkları şekilde gerçekleştirilmiştir. Beş klon grubuna karşılık gelen toplam 29 tane 1. sınıf blastosist, 13 adet herhangi bir dış müdahale olmadan doğal olarak senkronize olmuş koyuna transfer edilmiştir. Bunlardan 9 tanesi, 90. güne kadar gebeliklerini sürdürmüşler ve canlı doğum oranı % 48 olarak gerçekleşmiştir. Burada uygulanan yöntemle, ilk transferden sonra embriyoların yumurta kanalı içerisine bırakılarak yapılan *in vivo* kültürüyle, daha düşük bir oranda, embriyoların kaybına neden olunmuştur. Böylece, bu yöntemle canlı yavru elde edilmesindeki oran daha da artırılmıştır³⁴.

Wells ve ark.⁶², kültür edilmiş embriyonik hücre hattından klonlanmış kuzular üretmişlerdir. Onların kullandığı hücre hattının, 8 günlük blastosistlerin iç hücre kitlesinden orijin aldığı ve farklılaşmış epitel hücre morfolojisini andırdığı bildirilmiştir. Kültür edilen nükleer verici hücrelerin G₀ fazına girmeleri için, hücreler 8. ve 16. hücre pasajları arasında indüklenmiş ve alıcı sitoplazma olarak kullanılan *in vivo* ya da *in vitro* elde edilen oositler arasında karşılaştırma yapılmıştır. Hücre füzyonundan sonra, nükleer transfer yapılmış embriyolar 6 gün süreyle *in vitro* kültür edildikten sonra, NT sonucu, *in vivo* elde edilmiş sitoplazmalardan (% 24.2), *in vitro* elde edilmiş olanlarınkine oranla (% 17.1) daha çok blastosist elde edilmiştir (p=0.1). Yine aynı şekilde, *in vivo* sitoplazmalardan, daha yüksek

gebelik (35. gün) oranı (% 40'a karşı % 9.1, p<0.05) ve daha yüksek embriyo yaşama oranı (% 19.4'e karşı % 4.5, p<0.05) elde edilmiştir. Sekiz fötustan, 5 tanesi gebeliklerinin son dönemlerinde ölmüş ve ürogenital kanallarla birlikte seyreden herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır. Üç kuzu gebeliğin 147. gününde sezaryenle dünyaya gelmiş ve bunlardan 1 tanesi, sezaryeni takip eden 10. dakikadan sonra ölmüştür. Bu kuzu, *in vitro* maturasyonla olgunlaştırılmış yumurtanın kullanımıyla elde edilen embriyodan köken almıştır. Diğer ikisinin 12 haftalık iken normal ve sağlıklı oldukları rapor edilmiş ve yapılan DNA analizleri ile, 3 kuzunun da genetik olarak identik oldukları ve embriyonik hücre hattından köken aldıkları doğrulanmıştır⁶². Yapılan başka bir çalışmada ise, klonlamada uygulanan iyonominin-6-dimetilaminopurin (6-DMAP) aktivasyon işleminin blastosist gelişim oranını (% 83) arttırdığı bildirilmiştir³⁵. Wells ve ark.⁶¹ ise, kültüre ettikleri embriyonik hücrelerle yaptıkları nükleer transfer işleminden sonra, hem erkek hem de dişi klon kuzular elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışma, kültüre edilen embriyonik hücrelerde çeşitli genetik modifikasyonların uygulanabilmesi sonucu transgenik çiftlik hayvanlarının üretimini kolaylaştırması bakımından önem taşımaktadır. Evans ve ark.²² tarafından Dolly'nin ve fetal hücrelerden elde edilen 9 adet klon koyunun mitokondriyal DNA'ları incelenmiş ve bu 10 koyunun gerçek birer nükleer klon olmalarına rağmen, aslında bunların transfer edilen somatik hücrelerden gelen nükleer DNA ile alıcı olarak kullanılan oositlerin mitokondrilerinden gelen DNA'nın kombinasyonlarından oluşan genetik kimeler olduğu bildirilmiştir.

Keçilerde de klonlama ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Yong ve Yuqiang⁶⁷ yaptıkları çalışmada 45 adet klon keçiyi üretmeyi başarmıştır. Baguisi ve ark.³, yaptıkları çalışmada, nükleer verici olarak transgenik bir annenin transgenik olmayan bir baba sperması ile sun'i olarak tohumlanması sonucu gelişen fötustan elde ettikleri primer fetal somatik hücre hattını kullanmıştır. Çalışma sonunda 3 adet identikal sağlıklı dişi keçi yavrusu dünyaya gelmiştir. Yapılan genotipik analizler bunların tümünün verici hücrelerin kopyaları olduklarını göstermiş ve ayrıca transgenik kopyalanmış keçilerden birisinin sütünde yapılan analiz, köken aldıkları transgenik hat gibi yüksek düzeyde insan

antitrombin III üretiminin gerçekleştiğini göstermiştir.

In-vivo oositlerden ve *in-vitro* fertilizasyon (IVF) yoluyla üretilmiş embriyolardan elde edilen blastomerlerden, NT metodu ile genetik yönden identikal Rhesus maymunları da başarıyla üretilmiştir. NT yapılmış embriyolar dondurulmadan ve taşıyıcı maymunlara transfer edilmeden önce, buffalo rat karaciğer hücreleri ile ko-kültür (birlikte kültür) edilmiştir. Yirmi dokuz embriyonun transfer edildiği 9 dişi maymundan, 3 tanesi gebe kalarak, birisi erkek, diğeri dişi olmak üzere köken aldıkları embriyoyla identikal olan iki canlı yavru dünyaya getirmişlerdir³⁸. Yapılan diğeri bir çalışmada ise, embriyo splitting yoluyla üretilmiş ve "Tetra" diye adlandırılmış bir maymun 2000 yılı içerisinde elde edilmiştir. Bilindiği üzere, embriyo splitting yoluyla üretilen klonlar birbirlerinin %100 kopyalarıdır. Çünkü bu işlemle oositten gelen mitokondriyal DNA sorunu ile karşılaşmamaktadır¹⁷.

Sığırlarda da başarılı çalışmalar yapılmıştır. 7-8 günlük sığır blastosist inner cell mass hücrelerinin verici olarak kullanılması sonucu, NT metodu ile elde edilmiş buzağılar mevcuttur^{30,51}. Kato ve ark.²⁹ tarafından 1998 yılı sonunda yapıldığı bildirilen bir çalışmada ise, bir tek yetişkin inekten elde edilen kumulus ve yumurta kanal hücreleri nükleer verici olarak kullanılmış ve 8 buzağı elde edilmiştir. Bunlardan 5 tanesi kumulus, 3 tanesi de yumurta kanal hücrelerinden elde edilmiştir. Doğan sekiz yavrudan dördü doğumdan hemen sonra çevresel nedenlerden ötürü ölmüş, yapılan postmortem analizlerde herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır.

Cibelli ve ark.¹⁸ tarafından bildirilen çalışmada, aktif olarak bölünmekte olan fetal fibroblast hücreleri genetik yönden marker (belirteç) bir genle modifiye edildikten sonra, klonlanmış hücre hatları seçilerek nükleer transfer için kullanılmıştır. On bir alıcı ineğe transfer edilen 28 klonlanmış embriyodan, 3 tane sağlıklı ve identikal buzağı elde edilmiştir. Bu çalışmada, Wilmut ve ark.⁶⁶ tarafından yapılan çalışmaların tersine, optimal verici hücre olarak, hücrelerin aktif olarak bölünüyor olması dikkate alınmıştır. Bundaki amaç, erken embriyonik gelişimde gözlenen hızlı hücre bölünmesinin ve göreceli biçimde farklılaşmasını tamamlamamış hücrelerin gösterdiği özelliklerin benzer olmasıdır. Ayrıca, yine çalışmada kullanılan hücrelerin G₁ fazında

olmaları tercih edilmiş ve bu sebeple, hızla büyüyen ve genetiksel yönden de daha uzun G₁ fazına sahip fibroblast hücreleri seçilmiştir¹⁸. Sığırlarda yapılan başka bir çalışmada ise, sığır meme bezi epitel hücre hattı ile primer meme bezi hücreleri ve kulak derisinden elde edilen fibroblast hücreleri nükleer verici olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmada, sürekli hücre hattı olan sığır meme bezi epitel hücre hattından elde edilen klon embriyolar blastosist aşamasına dek gelişmemişken, primer hücre kültürlerinden elde edilen klon embriyoların blastosist aşamasına dek gelişim oranları ise, meme bezi hücreleri için % 60, kulak derisinden elde edilen fibroblast hücreleri içinde % 26 olarak bildirilmiştir. Ayrıca her iki primer hücre kültüründen elde edilen klon embriyoların transferlerinden birer adet buzağı elde edilmiştir. Sonuç olarak, yetişkinlerden elde edilen primer hücre kültürlerinin nükleer transfer işleminde başarıyla kullanılabilmesi, ancak sürekli hücre hatlarından elde edilen klon embriyoların gelişimlerinin başarısız olduğu bildirilmiştir⁶⁸.

Yapılan çalışmaların bazıları da hangi hücre tipinin, yetişkin hayvanların klonlanmasında daha iyi sonuç vereceğini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Sığırlarda böylesi bir çalışmada⁵ yetişkin bir sığırdan alınan fibroblast ve kondrosit hücreleri ile mezbaha materyalinden elde edilen kumulus hücreleri nükleer verici olarak kullanılmıştır. Blastosist gelişim oranları fibroblast, kondrosit ve kumulus hücreleri için sırasıyla % 13, 32 ve 26 olarak bildirilmiştir⁵. Diğeri bir çalışmada⁵⁰ ise, yetişkin 2 adet boğadan elde edilen kas hücreleri nükleer verici olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada kas hücreleri kültür edildikten sonra, enükle edilmiş metafaz II aşamasındaki oositler içerisine transfer edilmiştir. Klonlama işleminden sonra, % 20'si blastosist aşamasına dek gelişmiş ve transfer edilen blastosistlerin de % 15'i doğuma kadar gelişmiştir. Bu çalışmada ayrıca, nükleer transfer işleminden önce nükleer verici hücrelerin düşük yoğunluktaki (% 0.5) fetal buzağı serumu içeren bir ortamda kültür edilmesinin gerekli olmadığı da gösterilmiştir⁵⁰.

Peura ve ark.⁴⁵, 4 ya da 5 günlük *in vitro* şartlarda üretilmiş sığır embriyolarını vitrifikasyon yöntemi ile dondurmuş ve sonrasında embriyoların 24 saatlik kültüründen sonra blastomerlerini nükleer verici olarak kullanmışlardır. Nükleer transfer sonucunda elde edilen başarı taze embriyolarla yapılan nükleer

transferden elde edilen başarıyla benzer bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada⁵⁸ ise, *in vitro* üretilmiş morula aşamasından önceki sığır embriyoları düşük sıcaklık derecelerine oldukça duyarlı olan yağ damlacıklarının uzaklaştırılmasından sonra dondurulmuş ve böylece dondurmadan kaynaklanan zararlar azaltılmıştır. Bu şekilde dondurulan embriyoların blastomerleri nükleer verici olarak kullanılmış ve bunların başarıyla sığır klonlama uygulamasında kullanılabileceği bildirilmiştir. Daha önce 1997 yılında, buna benzer bir çalışma domuzlarda yapılmış ve başarılı sonuç alınmıştır⁴¹. Tani ve ark.⁵⁴ ise, kumulus hücrelerini serumdan yoksun vasatta kültür ettikten sonra, sakın fazdaki bu hücreleri -70°C'de dondurmuş ve çözündürme sonrası nükleer transfer uygulamasında verici olarak kullanmıştır. Anılan çalışmada, bu şekilde dondurulan kumulus hücrelerinden elde edilen kültür edilmiş hücrelerin, sığırların klonlanması için kullanılabileceği bildirilmiştir. Ayrıca transferin yapılacağı oositlerinde dondurulmasına ilişkin çalışmalar da mevcuttur. Dinnyes ve ark.²⁰ tarafından yapılan çalışmada, olgunlaşmış sığır oositleri vitrifikasyon yöntemiyle dondurulduktan sonra, bu oositler nükleer transfer için kullanılmıştır. Kültür edilmiş fibroblast hücrelerinin transferinden sonraki blastosist gelişim oranının, taze oositlerin kullanıldığı kontrol grubundan elde edilen blastosist gelişim oranından farklı olmadığı bildirilmiştir. Booth ve ark.⁸ ise, *in vitro* olgunlaştırılmış oositlerin kumulus hücrelerini uzaklaştırdıktan sonra, enükleasyon işlemini uygulamış ve enükle edilmiş bu oositleri kalsiyum iyonofor ve sikloheksamidle aktive etmiş ve vitrifikasyon yöntemi ile dondurmuşlardır. Vitri-fikasyon açık çekilmiş payet (Open Pulled Straw, OPS) diye adlandırılan yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Çözündürme sonrası embriyolardan elde edilen blastomer hücreleri ile yapılan NT uygulamasından sonra füzyondaki başarı oranı (% 83.7) ile kontrol grubu olarak kullanılan dondurulmamış enükle oositlerden elde edilen başarı oranı (% 79.8) arasında fark bulunmamasına rağmen, dondurulan ve dondurulmayan gruptan başarılı şekilde füzyon olan embriyolarda bölünme oranları sırasıyla % 55.7 ve % 98.0; blastosist gelişim oranları ise % 7.2 ve % 32.6 olarak istatistiksel değerlendirme sonucunda farklı bulunmuştur. Dondurulmuş gruptan elde edilen bir adet blastosistin bir taşıyıcıya transferinden sonra,

embriyonun ikiye bölünmesi ile gelişen identikal ikiz yavrular ölü olarak doğmuştur. Yapılan çalışma ile enükle edilmiş oositlerin dondurma sonrası NT işleminde kullanılabileceği ve elde edilecek blastosist transferlerinden doğuma dek gelişen yavruların elde edilebileceği gösterilmiştir. Nguyen ve ark.⁴² ise, yaptıkları çalışmada, kumulus hücrelerinin transferi sonucu elde edilen klon blastosistlerin ve *in vitro* fertilizasyon (IVF) sonucu elde edilen blastosistlerin vitrifikasyonla dondurularak saklanması sonucu elde ettikleri sonuçları karşılaştırmıştır. Kullanılan % 39 etilen glikol + 0.7 M sükröz ve % 8.6 fikol karışımı ile yapılan vitrifikasyonla NT sonucu elde edilen blastosistlerin canlılıklarını koruma oranı % 93, IVF sonucu elde edilen blastosistlerin ise % 85 olarak bildirilmiştir. Buradan da bu yöntemle, NT uygulamasından elde edilecek blastosistlerin başarıyla dondurulabileceği sonucu çıkarılmıştır. Yukarıda anlatılan dondurma ile ilgili çalışmalar NT metodunun uygulanabilirliğini kolaylaştıracak önemli gelişmelerdir.

Kubota ve ark.³³ tarafından yapılan çalışmada, 17 yaşında Siyah Japon Sığır ırkından bir boğanın kulak derisinden elde edilen fibroblast hücrelerinin 3 aya kadar varan bir süre (yaklaşık 10-15 hücre pasajı) *in vitro* kültür edildikten sonra NT metodunda verici olarak kullanılması sonucu 6 adet buzağı elde edilmiştir. Ayrıca, 10-15 kez pasajlanan hücrelerin 5 kez pasajlanan hücrelere oranla NT uygulanması sonucunda daha yüksek gelişim oranı verdiği bildirilmiştir. Böylesi uzunca bir süre kültür edilebilen hücrelerin nükleer verici olarak kullanılabilmesi, özellikle homolog rekombinasyon yoluyla yapılan gen nakavt (gene knock-out) gibi hedeflenmiş genetik manipülasyonların yapılabilmesine olanak sağlaması bakımından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma ile aynı zamanda yaşlı hayvanların da başarıyla klonlanabileceği gösterilmiştir. Sığırlarda yapılan başka bir çalışmada²⁶ ise, aynı genotipe sahip yetişkin ve fetal hücrelerin nükleer verici olarak kullanıldığı klonlama işleminden sonra gelişen embriyoların gelişim oranları karşılaştırılmıştır. Çalışmada yetişkin hücre olarak kullanılan fibroblast hücreleri 21 yaşındaki Brahman bir boğadan elde edilmiştir. Fetal hücreler ise, aynı boğadan daha önce kopyalanmış 40 günlük fötustan elde edilmiştir. Çalışmada NT embriyolarının gelişim oranları aynı genotipe sahip yetişkin ve fetal hücreler için

benzer bulunmuştur. Serumdan yoksun bırakmanın ise, yetişkin hücreler için iyileştirici bir etki oluşturmazken, fetal hücrelerin kullanıldığı grupta embriyonik gelişim oranını artırdığı bildirilmiştir.

Farelerde de klonlama ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada⁵⁷ erkek primordial germ hücreleri verici olarak kullanılmış ve *in vitro* blastosist dönemine kadar gelişen embriyolar elde edilmiş, yapılan transferlerden implantasyonun şekillenmesine rağmen yavru elde edilememiştir. Tsunoda ve Kato⁵⁶ ise 1993 yılında yaptıkları bir çalışmada, embriyonik kök hücrelerini kullanmışlar ve % 12-18 oranında blastosist elde etmişlerdir. Ancak, yapılan transferler sonucu implantasyon şekillenmesine rağmen yavru elde edememişlerdir. Farelerde yapılan bir çalışmada ise, üç farklı somatik hücre (sertoli, sinir ve kumulus hücreleri) nükleer verici olarak kullanılmıştır. Sonuçta sertoli ve sinir hücrelerinin kullanıldığı gruplarda embriyolar *in vitro* gelişmiş ve transferden sonra implante olmuşlardır. Ancak, hiç birisi 8.5 günlük gebeliğin ilerisine geçememiştir. Oysa, kumulus hücrelerinin kullanıldığı grupta, *in vitro* daha yüksek oranda embriyo elde edilmiştir. Yapılan transferler sonucunda da çoğu rezorbe olmasına karşın yine de çok sayıda embriyo implante olmuştur. Bunlardan da % 2.0-2.8'i gebelik sürecini tamamlamıştır. Bu çalışmada, diğer NT yöntemlerinden farklı olarak verici hücrenin sadece nükleusu, enükle oosit sitoplazması içerisine transfer edilmiş ve dolayısı ile, ayrı bir elektrofüzyon işlemine gerek kalmamıştır. Yapılan çalışmayla NT uygulamasında yeni ve farklı bir yöntem ortaya konmuştur⁵⁹. Wakayama ve ark.⁶⁰, bir çok kez pasajlanmış embriyonik kök hücre hattı R1'i kullanarak fare klonlamışlardır. Anılan çalışmada, nükleer transfer uygulanmış oositlerin % 29'u morula-blastosist aşamasına dek gelişmiştir. Elde edilen bu blastosistlerin transferi sonucunda da % 8'i canlı yavru olarak doğmuştur. Bunun yanı sıra, G₁ ya da G₂/M fazındaki embriyonik kök hücre nükleuslarının klonlama işleminde başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, embriyonik kök hücre teknolojisi ve klonlamanın birleştirilmesiyle tek bir hücreden çok sayıda klon yavruların elde edilebilmesinin dışında, embriyonik kök hücrelerinde gerçekleştirilecek genetik manipulasyonlar aracılığı ile transgenik

klonların da üretilebilmesine olanak sağlanmış olacağı bildirilmiştir.

Farelerde yapılan başka bir çalışmada⁴³ ise, yetişkin hayvanların kopyalanmasında başarı ile kullanılan kumulus/granuloza, ovidukt ve meme bezi epiteli gibi dişi reproduktif sisteme ait hücrelerin yerine, yeni doğmuş (3-10 günlük) farelerin testislerinden elde edilen olgunlaşmamış Sertoli hücre nükleusları, enükle edilmiş oositler içerisine enjekte edilmiştir. Verici hücrenin yaşına bağlı olarak nükleer transfer uygulanmış oositlerin % 22.0-37.4'ü morula/blastosist dönemine dek gelişmiştir. Yapılan transferlerden de 7 adet (% 3.3, 7/215) normal yavru elde edilmiştir. Bu çalışmayla erkek-spesifik somatik hücrelerinden olan olgunlaşmamış Sertoli hücrelerinin klonlama işleminde kullanılabilceği gösterilmiştir. Daha önceden nükleusların enükle oositlerin sitoplazması içerisine enjeksiyonu ile başarılı sonuçlar yetişkin hücrelerin ve embriyonik kök hücrelerinin kullanıldığı klonlama uygulamaları sonucunda elde edilmiştir^{59,60}. Ogura ve ark.⁴⁴ tarafından yapılan çalışmada ise, elektrofüzyon işleminin fare klonlama işleminde kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır. Çalışmada farelerin kuyruk uçlarından elde edilen fibroblast hücreleri enükle oositlerle elektrofüzyon aracılığıyla birleştirilmiştir. Elde ettikleri sonuçlar enjeksiyon yöntemiyle karşılaştırıldığında farklı bulunmamış ve elektrofüzyon yönteminin, verici hücre nükleuslarının enükle oosit sitoplazmaları içerisine transferinde, teknik güçlüklerin olması durumunda, fare somatik hücre klonlamasında pratik ve alternatif bir yöntem olarak kullanılabilceği bildirilmiştir.

Rideout ve ark.⁴⁸ ise, özellikle farelerde önemli rol oynayan genotipin etkisini incelemiştir. Yaptıkları bu çalışmada, F1 (129SvJaeXC 57BL/6) ve 129 (129SvJae) embriyonik kök hücre hatlarından hücreler nükleer verici olarak kullanılmıştır. Klonlama işlemi sonrasında, blasto-sistlerin gelişim oranları arasında fark bulunmamasına rağmen F1 hücrelerinden elde edilen 7 (% 20.59) yavrunun normal olarak gelişimlerine devam ettiği ancak 129 hücrelerinden elde edilen 8 (% 10.53) yavrunun doğumdan sonraki 24 saat içerisinde öldüğü bildirilmiştir.

İlk başarılı yetişkin hayvan klonlamasından bu yana, klonlanmış yavrular üzerinde herhangi bir öğrenme ve davranış şekli araştırması

yapılmadığı bildirilmiştir⁵³. Bilindiği üzere, yetişkin hayvanlardan elde edilen somatik hücrelerle yapılan klonlamada doğal olan birçok biyolojik olay pas geçilmekte ve kullanılan verici hücre DNA'sının çeşitli mutasyonlara uğrama olasılığı yüksek bulunmaktadır. İşte bu sebeplerden dolayı, yetişkin somatik hücrelerle yapılan klonlama sonucu elde edilen klon hayvanlarda çeşitli yan etkilerin görülme olasılığı yüksektir. Tamashiro ve ark.⁵³ tarafından yapılan çalışmada, enükle oositlere kumulus hücre nükleuslarının mikro-enjeksiyonu yoluyla elde edilen klon fareler kullanılmıştır. Elde ettikleri sonuçlardan hareketle klon fare üretmek için yetişkin somatik hücre nükleuslarının enükle oositlere mikroenjeksiyonunun, gelişim açısından önemli bazı aşamaları geciktirebileceği fakat farelerin doğum sonrası şekillenen tüm davranışlarını ters yönde etkilemeyeceği bildirilmiştir.

Domuzlarda da son yıllarda, özellikle organ transplantasyonu amacıyla yürütülen çalışmalara paralel olarak klonlama ile ilgili çalışmalar büyük ilgi görmüştür. Tao ve ark.⁵⁵ farelerde uygulanan mikroenjeksiyon yöntemini⁵⁹ kullanarak 30 günlük fötuslardan elde ettikleri fibroblast hücrelerini enükle oositlere enjekte ederek domuz embriyolarını üretmişlerdir. Kullanılan fibroblast hücreleri 2-10 kez pasajlandıktan sonra klonlama işleminde kullanılmıştır. Kültür aşamasında iken, bu hücrelerde çeşitli genetik manipulasyonlar gerçekleştirilebileceğinden dolayı, klonlamanın transgenik domuz üretimi için alternatif bir yol oluşturabileceği bildirilmiştir. Bethausser ve ark.⁴ ise, 4 adet sağlıklı erkek domuz yavrusunu kültür ettikleri fotal somatik hücreleri kullanarak ürettiklerini bildirmiştir. Böylece, organ transplantasyonu için kullanıma uygun ve insanlarda immun reaksiyon oluşturma riski az olan klonlanmış domuzların, klonlama işleminde kullanılan hücrelerin kültür aşamasında iken, genetik bakımından modifiye edilerek üretilebileceği gösterilmiştir. Domuzlarda yapılan başka bir çalışmada ise, yetişkin somatik hücrelerle yapılan klonlama sonucunda klon domuz yavrularının üretildiği de bildirilmiştir⁴⁷.

Tavşanlarda yapılan bir çalışmada³⁹, yetişkin bir tavşandan elde edilen fibroblast hücreleri kullanılarak yapılmış klonlama işleminden sonra elde edilen 54 hücreden 16 tanesi (% 29.6) blastosist aşamasına dek gelişmiştir. Yine tavşanlarda yapılan başka bir

çalışmada⁴⁶, 8 hücreli embriyonun blastomerleri verici olarak kullanılmış ve enükle oositlerle elektrofüzyon aracılığı ile birleştirilmiştir. Nükleer transferden önce aktive edilen enükle oositlerde embriyonik gelişim oranı % 56'ya çıkmıştır. Aynı çalışmada, bu oran önceden aktive edilmeyen enükle oositler için % 15 olarak bildirilmiştir. Ayrıca çalışmada, gelişen embriyolardan yapılan 2. ve 3. nükleer transfer uygulamalarından da sırasıyla % 48.6 ve % 47.2 embriyonik gelişim oranları elde edilmiştir. Tüm gruplardan elde edilen embriyolardan yapılan transferler sonucunda klon yavru tavşanlar elde edilmiştir.

Sığır oositlerinin diğer türden hayvanların nükleer transfer işleminde alıcı olarak kullanılabilmesi yolundaki çalışmalar klonlama tekniğinde yeni ufuklar açmıştır^{21,40,63}. Ayrıca, bunun gelişim biyolojisi açısından da birçok sorunun çözümünü kolaylaştıracağı açıktır. Wisconsin grubunca yapılan çalışmalarda^{21,40}, olgunlaştırılmış sığır oositlerine enükleasyondan sonra; yetişkin sığır, koyun, domuz, maymun ve rat fibroblast hücrelerinin, fotal buzağı serumunun yokluğunda 2-9 günlük kültürlerini takiben, yapılan nükleer transferlerinden, her gruptan blastosist aşamasında embriyolar elde edilmiştir. Bu da, sığır oosit sitoplazmasının farklı türlerden gelen somatik nükleusları yeniden başarılı bir şekilde programlayabileceğini ve erken embriyonik gelişimi başlatabileceğini göstermektedir. Diğer grubun çalışmasında ise, nesli tükenmekte olan Tibet koyununun (Ovis ammon) fibroblast hücrelerinin, enükle edilen sığır oositlerine transferi yoluyla blastosist aşamasında embriyo elde edilmiştir⁶³. Bu çalışma, Wisconsin grubunun çalışmasını desteklemektedir. Ancak günümüze kadar geçen süreçte, bu yöntemle elde edilen klon yavru üretimi gerçekleştirilememiştir.

Yapılan çalışmalarda verici nükleusların hücre siklusunun G₀ ya da G₁ fazında bulunmaları durumunda, embriyonik gelişimin daha iyi olduğu bildirilmektedir^{10,14,59,66}.

Klonlamanın Kullanım Alanları

İskoçya'da yapılan NT'deki yenilikle ilgili açıklamadan hemen sonra, insan klonlaması ile ilgili tartışmalar, en önemli gündem konusunu oluşturmuştur. Birçok ülke insanların klonlanmasına karşı kanunlar çıkarmış ve çıkarmaya da devam etmektedir.

Etik açıdan birçok tartışmaların yaşandığı bu konu, yine de hayvancılık açısından günümüzde üzerinde en çok çalışılan konuların başında gelmektedir. Totipotent nükleuslu hücrelerin NT'da kullanılmalarından önce kültür edilebilme özellikleri ve farelerde bugün için rutin olarak gerçekleştirilmekte olan genlerin hedeflenmesi²⁷ (gene targeting) ve nakavt edilmesi (gene knock-out) gibi uygulamaların çiftlik hayvanlarında da NT yoluyla gerçekleştirilmesi, hayvancılık açısından önemli bir unsur olarak göze çarpmaktadır. Böylece, kontrol edilebilir bir şekilde bazı genetik unsurların giderilmesi ya da değiştirilmesi mümkün kılınabilecektir. Bu yolla, transferden önce hücrelerde istenilen değişikliğin olup olmadığını da çoğu durumda tespit etmek mümkündür. Bunun dışında, seçilen transgenik hayvanların² kısa zamanda çoğaltılmasına da olanak tanıyacağından ve transgenik bir embriyodan klonlanarak elde edilmiş iki kuzunun ve transfeksiyon yoluyla genetiksel olarak modifiye edilmiş fetal fibroblast hücrelerinden klonlanmış transgenik buzağuların bildirilmesinden sonra, bu yöntem, transgenik hayvan üretiminde, üstün bir metot olarak dikkat çekmektedir. Bunun sonucu olarak, çok değişik tipte transgenik ürünlerin (süt içerisinde çeşitli glikoprotein farmasötiklerin eldesi; değiştirilmiş antijenik özellik taşıyan ve komplement inhibitörlerine sahip iç organların, organ nakli amacıyla üretilmesi, vs) üretiminin kısa zamanda gerçekleşmesi gündeme gelmiştir. Ayrıca, klonlama tekniği aracılığıyla epigenetik değişikliklerin (örneğin, somatik hücrelerde gelişme dönemi boyunca gerçekleşen imprinting ve yaşlılık dönemi süresince gerçekleşen telomerlerin kısalması olgusu) muhtemel mekanizmalarını ve etkilerini incelemede de önemli bir araç teşkil edecektir. Bunlara ilaveten, mitokondrilerdeki DNA'ların, genlerin fonksiyonlarına olan katkıları, klonlama yöntemiyle daha iyi şekilde anlaşılabilir ve elde edilecek sonuca göre avantaj olarak kullanılabilir. Bunların dışındaki diğer kullanım alanlarını ve avantajlarını kısaca özetleyecek olursak; bunlar, yapılan deneylerde genetiksel homojeniteyi sağlamak, inbred (aynı türden hayvanların dölünden elde edilen) hatların hızlı bir biçimde üretilmesi, yetiştiricilik için az sayıdaki üstün vasıflı hayvanların kopyalanarak çoğaltılması ve %100 garanti içeren cinsiyet tercihi olarak sıralanabilir. Ayrıca, klonlamada sığır oositlerinin

diğer türden hayvanların klonlanmasında kullanılabilmesi, özellikle nesli tükenmekte olan hayvanların klonlanarak çoğaltılmasını mümkün kılacak ve alıcı olarak kullanılan yumurtaların sağlanmasında büyük kolaylıklar sağlayacaktır. Hatta gelecekteki ilerlemeler ile maliyetin düşürülmesi sonucu, yöntemin yaşlanmış süs hayvanlarının kopyalanmasında kullanılması da ihtimal dahilinde görülmektedir.

Kanımızca, son yıllarda büyük ilerlemelerin kaydedildiği bu alanda yapılan yeniliklere, ülkemizin de zaman geçirmeden gereken ilgiyi göstermesi; bu konu ile ilgili çalışmalar için gereken alt yapının kurulması ve gerekli maddi kaynağın sağlanması gerekmektedir.

Kaynaklar

1. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D.: Chapter 17, The Cell-Division Cycle. Molecular Biology of The Cell. Third Edition, Garland Publishing, Inc. New York & London (1994).
2. BAĞIŞ, H., PABUÇÇUOĞLU, S.: Studies on the production of transgenic mice. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, 21, 287-292 (1997).
3. 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. Nature Biotechnology, 17, 456-461 (1999).
4. BETTHAUSER, J., FORSBERG, E., 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. Nature Biotechnology, 18, 1055-1059 (2000).
5. BEYHAN, Z., MITALIPOVA, M., CHANG, T., FIRST, N.L.: Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos produced using different types of adult donor cells. Theriogenology, 53, 210 (2000).
6. BONDIOLI, K.R., WESTHUSIN, M.E., LOONEY, C.R.: Production of identical bovine

- offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, 33, 165-174 (1990).
7. BONDIOLI, K.R.: Commercial Cloning of Cattle by Nuclear Transfer. Symposium on Cloning Mammals by Nuclear Transplantation. Colorado State University, Colorado, 35-38 (1992).
 8. BOOTH, P.J., VAJTA, G., HOJ, A., HOLM, P., JACOBSEN, H., GREVE, T., CALLASEN, H.: Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrified cytoplasm: Work in progress. *Theriogenology*, 51, 999-1006 (1999).
 9. BRIGGS, R., KING, T.J.: Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 38, 455-463 (1952).
 10. CAMPBELL, K.H.S., LOI, P., OTAEGUI, P.J., WILMUT, I.: Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev. in Reprod.*, 1, 40-46 (1996).
 11. CAMPBELL, K.H.S., MCWHIR, J., RITCHIE, W., WILMUT, I.: Development of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during and after isolation of an established cell line from embryonic disc cells. *J. Reprod. & Fertil.*, 15-31 (1995).
 12. CAMPBELL, K.H.S., MCWHIR, J., RITCHIE, W., WILMUT, I.: Production of live lambs following nuclear transfer of cultured embryonic disc cells. *Theriogenology*, 43, 181 (1995).
 13. CAMPBELL, K.H.S., RITCHIE, W., MCWHIR, J., WILMUT, I.: Featured article: Cloning farm animals by nuclear transfer: From cell cycles to cells. *Embryo Transfer Newsletter*, 14, 12-17 (1996).
 14. CAMPBELL, K.H.S., RITCHIE, W., MCWHIR, J., WILMUT, I.: Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380, 64-66 (1996).
 15. CAMPBELL, K.H.S., RITCHIE, W., WILMUT, I.: Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstituted bovine embryos: Implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol. Reprod.*, 49, 933-942 (1993).
 16. CAMPBELL, K.H.S., WILMUT, I.: Totipotency or multipotentiality of cultured cells: Applications and progress. *Theriogenology*, 47, 63-72 (1997).
 17. CHAN, A.W., DOMINKO, T., LUETJENS, C.M., NEUBER, E., MARTINOVICH, C., HEWITSON, L., SIMERLY, C.R., SCHATTEN, G.P.: Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science*, 287, 317-319 (2000).
 18. CIBELLI, J.B., STICE, S.L., GOLUEKE, P.J., KANE, J.J., JERRY, J., BLACKWELL, C., PONCE DE LEON, F.A., ROBL, J.M.: Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280, 1256-1258 (1998).
 19. COLLAS, P., BALISE, J.J., ROBL, J.M.: Influence of cell cycle stage of donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46, 492-500 (1992).
 20. 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. *Biology of Reproduction*, 63, 513-518 (2000).
 21. DOMINKO, T., MITALIPOVA, M., HALEY, B., BEYHAN, Z., MEMILI, E., FIRST, N.L.: Bovine oocyte as a universal recipient cytoplasm in mammalian nuclear transfer. *Theriogenology*, 49, 385 (1998).
 22. EVANS, M.J., GURER, C., LOIKE, J.D., WILMUT, I., SCHNIEKE, A.E., SCHON, E.A.: Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nature Genetics*, 23, 90-93 (1999).
 23. FREEMAN, A.E., BEITZ, D.C.: Cytoplasmic inheritance-molecular differences and phenotypic expression. SIDEL GE (ed.). *Proceeding of the Symposium on Cloning Mammals by Nuclear Transplantation*. Colorado State University, Colorado, USA., 17-20 (1992).
 24. GARRY, F.B., ADAMS, R., MCCANN, J.P., ODDE, K.G.: Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology*, 45, 141-152 (1996).
 25. GRAY, K.R., BONDIOLI, K.R., BETTS, C.C.: The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology*, 35, 37-44 (1991).
 26. HILL, J.R., WINGER, Q.A., LONG, C.R., LOONEY, C.R., THOMPSON, J.A., WESTHUSIN, M.E.: Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biology of Reproduction*, 62, 1135-1140 (2000).
 27. HOOPER, M.H.: *Embryonal Stem Cells: Introducing planned changes into the animal germline*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers (1993).
 28. ILLMENSEE, K., HOPPE, P.C.: Nuclear transplantation in *mus musculus*: Developmental potential of preimplantation embryos. *Cell*, 23, 9-18 (1981).
 29. KATO, Y., TANI, T., SOTOMARU, Y., KUROKAWA, K., KATO, J., DOGUCHI, H., YASEU, H., TSUNODA, Y.: Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282, 2095-2098 (1998).
 30. KEEFER, C.L., STICE, S.L., MATTHEWS, D.L.: Bovine inner cell mass cells and donor nuclei in the

- production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol.Reprod.*, 50, 935-939 (1994).
31. KIKYO, N., WOLFFE, A.P.: Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons. *Journal of Cell Science*, 113, 11-20 (2000).
 32. KRUIP, T.A.M., DEN DAAS, J.H.G.: *In vitro* produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, 47, 43-52 (1997).
 33. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 990-995 (2000).
 34. LOI, P., BOYAZOGLU, S., GALLUS, M., LEDDA, S., NAITANA, S., WILMUT, I., CAPPAL, P., CASU, S.: Embryo cloning in sheep: Work in progress. *Theriogenology*, 48, 1-10 (1997).
 35. LOI, P., LEDDA, S., FULKA, J.Jr., CAPPAL, P., MOOR, R.M.: Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biology of Reproduction*, 58, 1177-1187 (1998).
 36. LOSKUTOFF, N.M., JOHNSON, W.H., BETTERIDGE, K.J.: The developmental competence of bovine embryos with reduced cell numbers. *Theriogenology*, 39, 95-107 (1993).
 37. MCGRATH, J., SOLTER, D.: Nuclear transplantation in the mouse by microsurgery and cell fusion. *Science*, 220, 1300-1302 (1983).
 38. MENG, L., ELY, J.J., STOUFFER, R.L., WOLF, D.P.: Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 57, 454-459 (1997).
 39. MITALIPOV, S.M., WHITE, K.L., FARRAR, V.R., MORREY, J., REED, W.A.: Development of nuclear transfer and parthenogenetic rabbit embryos activated with inositol 1, 4, 5-triphosphate. *Biology of Reproduction*, 60, 821-827 (1999).
 40. MITALIPOVA, M., DOMINKO, T., HALEY, B., BEYHAN, Z., MEMILI, E., FIRST, N.L.: Bovine oocyte cytoplasm reprograms somatic cell nuclei from various mammalian species. *Theriogenology*, 49, 389 (1998).
 41. NAGASHIMI, H., ASHMAN, R.J., NOTTLE, M.B.: Nuclear transfer of porcine embryos using cryopreserved delipated blastomeres as donor nuclei. *Molecular Reproduction and Development*, 48, 339-343 (1997).
 42. NGUYEN, B.X., SOTOMARU, Y., TANI, T., KATO, Y., TSUNADO, Y.: Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. *Theriogenology*, 53, 1439-1448 (2000).
 43. OGURA, A., INOUE, K., OGONUKI, N., NOGUCHI, A., TAKANO, K., NAGANO, R., SUZUKI, O., LEE, J., ISHINO, F., MATSUDA, J.: Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, 62, 1579-1584 (2000).
 44. OGURA, A., INOUE, K., TAKANO, K., WAKAYAMA, T., YANAGIMACHI, R.: Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells. *Molecular Reproduction and Development*, 57, 55-59 (2000).
 45. PEURA, T.T., LANE, W.W., VAJTA, G., TROUNSON, A.O.: Cloning of bovine embryos from vitrified donor blastomeres. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116, 95-101 (1999).
 46. PIOTROWSKA, K., MODLINSKI, J.A., KORWIN-KOSSAKOWSKI, M., KARASIEWICZ, J.: Effects of preactivation of ooplasts or synchronization of blastomere nuclei in G₁ on preimplantation development of rabbit serial nuclear transfer embryos. *Biology of Reproduction*, 63, 677-682 (2000).
 47. 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.: Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407, 86-90 (2000).
 48. RIDEOUT, W.M.3rd, WAKAYAMA, T., WUTZ, A., EGGAN, K., JACKSON-GRUSBY, L., DAUSMAN, J., YANAGIMACHI, R., JAENISCH, R.: Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nature Genetics*, 24, 109-110 (2000).
 49. SCHNIEKE, A.E., KIND, A.J., RITCHI, W.A., MYCOCK, K., SCOTT, A.R., RITCHI, M., WILMUT I, COLMAN A, CAMPBELL KH.: Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278, 2130-2133 (1997).
 50. 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).
 51. SIMS, M., FIRST, N.L.: Production of calves by nuclear transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 6143-6147 (1993).
 52. STICE, S.L., ROBL, J.M., PONCE DE LEON, F.A., JERRY, J., GOLUEKE, P.G., CIBELLI, J.B., KANE, J.J.: Cloning: New breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology*, 49, 129-138 (1998).

53. TAMASHIRO, K.L., WAKAYAMA, T., BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C., YANAGIMACHI, R.: Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. *Biology of Reproduction*, 63, 328-334 (2000).
54. TANI, T., KATO, Y., TSUNODA, Y.: Developmental potential of cumulus cell-derived cultured cells frozen in a quiescent state after nucleus transfer. *Theriogenology*, 53, 1623-1629 (2000).
55. TAO, T., MACHATY, Z., BOQUEST, A.C., DAY, B.N., PRATHER, R.S.: Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into *in vitro* matured oocytes. *Animal Reproduction Science*, 56, 133-141 (1999).
56. TSUNODA, T., KATO, Y.: Nuclear transplantation of embryonic stem cell in mice. *Journal of Reprod. & Fertil.*, 98, 537-540 (1993).
57. TSUNODA, Y., TOKUNAGA, T., IMAI, H., UCHIDA, T.: Nuclear transplantation of male primordial germ cells in the mouse. *Development*, 107, 407-411 (1989).
58. USHIJIMA, H., YAMAKAWA, H., NAGASHIMA, H.: Cryopreservation of bovine pre-morula-stage *in vitro* matured/*in vitro* fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. *Biology of Reproduction*, 60, 534-539 (1999).
59. WAKAYAMA, T., PERRY, A.C.F., ZUCCOTTI, M., JOHNSON, K.R., YANAGIMACHI, R.: Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394, 369-374 (1998).
60. WAKAYAMA, T., RODRIGUEZ, I., PERRY, A.C.F., YANAGIMACHI, R., MOMBAERTS, P.: Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 14984-14989 (1999).
61. WELLS, D.N., MISICA, P.M., DAY, A.M., PETERSON, A.J., TERVIT, H.R.: Cloning sheep from cultured embryonic cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10, 615-626 (1998).
62. WELLS, D.N., MISICA, P.M., DAY, A.M., TERVIT, H.R.: Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: A comparison between *in vivo*- and *in vitro*-matured cytoplasts. *Biol. Reprod.*, 57, 385-393 (1997).
63. WHITE, K.L., MITALIPOV, S.M., REED, W.A., FARRAR, V.R., BUNCH, T.D.: Embryo clones derived from Tibetan argoli (*Ovis ammon*) nuclear-donor fibroblast cells and enucleated bovine oocytes. *Theriogenology*, 49, 396 (1998).
64. WILLADSEN, S.M.: Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 98, 537-540 (1986).
65. WILMUT, I., CAMPBELL, K.H.S.: Embryo multiplication in livestock: Present procedures and the potential for improvement. Chapter 11. *Embryonic Development and Manipulation in Animal Reproduction*. Lauria A, Gandolfi F (eds.). Portland Press, London (1992).
66. WILMUT, I., SCHNIEKE, A.E., MCWHIR, J., KIND, A.J., CAMPBELL, K.H.S.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810-813 (1997).
67. YONG, Z., YUQIANG, L.: Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: Production of goats by serially cloning embryos. *Biology of Reproduction*, 58, 266-269 (1998).
68. ZAKHARTCHENKO, V., ALBERIO, R., STOJKOVIC, M., PRELLE, K., SCHERNTHANER, W., STOJKOVIC P., WENIGERKIND, H., WANKE, R., DUCHLER, M., STEINBORN, R., MUELLER, M., BREM, G., WOLF, E.: Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. *Molecular Reproduction and Development*, 54, 264-272 (1999).