

Nükleer Transfer ile Elde Edilen Klon Sığır ve Yavrularının mtDNA ve Mikrosatellit Belirteçlerle Karakterizasyonu*

Emel TÜTEN SEVİM¹ Fulya ÖZDİL¹ Emel ÖZKAN ÜNAL² Sezen ARAT^{1**}

¹Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Tekirdağ, Türkiye

²Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Tekirdağ, Türkiye

**Sorumlu Yazar: sarat@nku.edu.tr

Geliş Tarihi (Received): 27.09.2016

Kabul Tarihi (Accepted): 07.04.2017

Klonlama teknolojisi; erişkin bir hücre çekirdeğinin yumurta hücresi içerisine konulup geriye programlanarak embriyonal döneme geri döndürülmesi prensibine dayanmaktadır. Ancak bu geri programlamayı etkileyen faktörler tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu nedenle elde edilen klonlar ve klonların yavrularının daha detaylı bir şekilde tanımlanması ile klonlama teknolojisi daha anlaşılır ve kontrol edilebilir hale getirilebilir. Bu çalışmanın amacı bir ırkın bireylerinin farklı bir ırka ait yumurta kaynağı kullanılarak klonlanması sonucu elde edilen klonların normal bir ırk popülasyonu oluşturmasının mümkün olup olmadığını ortaya koymak adına klon ve jenerasyonlarını moleküler olarak karakterize etmek ve böylece ileride bu teknolojinin nesli tükenmiş bir ırkın geriye getirilmesindeki muhtemel potansiyelini daha iyi anlamaya çalışmaktır. Bu amaçla çalışmada daha önce TÜBİTAK- TOVAG-104O360- projesi ile üretilmiş 5 klon boz sığır (1 erkek, 4 dişi) ve bu klonların yavruları (2 erkek, 4 dişi) materyal olarak kullanılmıştır. Öncelikle klonlar, onların yavruları ve klonların üretilmesinde kullanılan verici hücreden elde edilen genomik DNA'larda 10 mikrosatellit belirteç kullanılarak klonların genomik DNA açısından verici hücrelerin birebir kopyası olduğu ve yavrularında bu klonlara ait olduğu teyit edilmiş ve mtDNA D-loop bölgesi dizi analizi ile de klonların mtDNA'larının yumurta kaynaklı olduğu ve dolayısıyla verici hücreden farklı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu farklı mtDNA varlığı klonların yavrularında da izlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Klonlama, boz sığır, mtDNA D-Loop, mikrosatellit

Characterization of Cloned Cattle Obtained by Nuclear Transfer and Their Offspring with mtDNA and Microsatellite Markers

Cloning technology is based on the principle of turning back to embryonic period by reprogramming of that an adult cell nucleus was put into the oocyte cell. However, affecting factors of this reprogramming has not been clarified completely. Therefore, cloning technology can be made more understandable and controllable with a more detailed manner identifying of obtained clones and their offspring. The purpose of the study is to characterize the clones and their generations molecularly to reveal whether it is possible or not that creation of a normal race population through clones which acquired as a result of cloning individuals of one race by using ovular source which belongs to a different race, and thus to try to understand better that possible potential of this technology to reinstate an extincted race. For this purpose, 5 clone grey cattles (1 male, 4 female) and their offsprings (2 male, 4 female) which generated with TUBİTAK TOVAG-104O360- project had been used as material. First of all 10 microsatellite markers were used to test the clones, their offspring and donor cells which were used for producing the clones.It has been confirmed that the clones are the copy of donor cells and all offspring belong to the clones and by sequencing of D-Loop region of mtDNA, it has been determined that the origin of mtDNA from clones are eggs and therefore are different than donor cell. In addition the presence of mtDNA difference has been observed in offspring of the clones.

Key Words: Cloning, Grey Cattle, mtDNA D-Loop, microsatellite

**Emel TÜTEN SEVİM' in Yüksek Lisans Tezinden üretilmiştir.

Giriş

Klon, bir bireyden fertilizasyon olmaksızın elde edilen ve onunla genetik olarak özdeş olan yavru olarak tanımlanabilir. Biyologlar, klonlama kelimesini genellikle genetik olarak birden çok

identikal bireyin üretimini ifade etmek için kullanırlar. Tek yumurta ikizleri (veya üçüzler vs.)

genetik açıdan doğal klonlardır ve bugünkü klonlama teknolojisinin keşfinde araştırmacılar için ilham kaynağı olmuşlardır (Arat, 2010). Erişkin bir canlının başarı ile klonlanması sonucu doğan ilk

klon koyun "Dolly" nin (Wilmut ve ark., 1997) ardından sığır (Cibelli ve ark., 1998; Kato ve ark., 1998; Vignon ve ark., 1998), fare (Wakayama ve ark., 1998), keçi (Baguisi ve ark., 1999), domuz (Onishi ve ark., 2000; Polejaeva ve ark., 2000), tavşan (Chesne' ve ark., 2002), kedi (Shin ve ark., 2002), sıçan (Zhou ve ark., 2003), at (Galli ve ark., 2003), katır (Woods ve ark., 2003), köpek (Lee ve ark., 2005), gelincik (Li ve ark., 2006), manda (Shi ve ark., 2007) ve deve (Wani ve ark., 2010) gibi birçok memeli türü aynı yöntem ile klonlanmıştır. İlk klonun üretilmesinden bu yana birçok çalışma yapılarak teknoloji iyileştirilmeye çalışılmış olsa da, başarı yüzdesi halen istenilen seviyede değildir. Bu bağlamda üretilen klonların ve onların yavrularının daha ayrıntılı tanımlanması teknolojinin daha anlaşılır ve kontrol edilebilir hale gelmesinde faydalı olacaktır. Bu amaç doğrultusunda klonlar ve klonların yavrularının moleküler karakterizasyonu için mikrosatellit ve mtDNA belirteçlerinden yararlanılabilir.

Mikrosatellitler genomda yaygın olarak bulunmaları, polimorfizm oranının yüksek olması nedeniyle birçok moleküler biyoloji çalışmasında tercih edilmektedir. Klonlama çalışmalarında Uluslararası Hayvan Genetik Derneği (ISAG) ve Dünya Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) tarafından bireysel tanımlamada kullanılacağı belirtilen mikrosatellit belirteçlerden yararlanılmaktadır. Çalışmalar incelendiğinde klon ve verici hayvanın genomik özdeşliğini belirlemek amacıyla farklı sayılarda mikrosatellitlerin kullanıldığı görülmektedir. Bir çalışmada; fetal fibroblast hücre hattı kullanılarak klonlanmış buzağı arasındaki genetik kimliğin doğrulanması amacıyla genomik DNA, buzağının periferik kan hücrelerinden ve fetal fibroblast hücrelerinden izole edilmiş ve 11 mikrosatellit belirteci (BM2113, TGLA122, BM1818, RM067, ETH10, INR023, TGLA126, SPS115, ETH225, BM1824, RM006) kullanılarak analiz edilmiştir (Mello ve ark., 2003). Analiz sonuçları tüm klon buzağuların kendi verici hayvanları ile özdeş genotipleri olduğunu ortaya koymuştur. Benzer şekilde Theoret ve ark. (2006), verici hücre olarak fetus dermal fibroblast hücrelerini kullanarak oluşturdukları üç klon sığırdan, onların oluşturulmasında kullandıkları verici hücrelerden ve kontrol hayvanlarından izole ettikleri DNA'da 12 mikrosatellit belirteç (BM1824, BM2113, CSSM36, ETH10, ETH225, ETH3, HEL1, INRA0123, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227) ile analiz yaparak üç klon ve NT'de kullanılan fetal verici

fibroblast hücre hattı arasındaki benzerliği doğrulamışlardır.

Klonlar özel hayvanlar oldukları için mtDNA yapıları ile ilgili çeşitli sonuçlar bildirilmiştir. Yetişkin somatik hücre hattından klonlanan ilk hayvan "Dolly" ve fetal hücre hattından nükleer transfer ile üretilmiş koyunların mtDNA kökenini rapor etmek amacıyla yapılan bir çalışmada; elde edilen koyunların mtDNA'sına somatik hücre vericisinin hiçbir katkısı olmadığı saptanmış ve mtDNA'nın yumurta kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Bu koyunlar özgün nükleer klonlar olmalarına rağmen, aslında somatik hücre kökenli nükleer DNA fakat yumurta kökenli mtDNA içeren genetik kimeralar olarak tanımlanmıştır (Evans ve ark., 1999). Nesli tehlike altında olan türlerin türler arası nükleer transfer işlemi ile korunup korunamayacağını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada; nesli tehlike altındaki "*Bos Gaurus*" somatik hücre kaynağı ve "*Bos Taurus*" yumurta kaynağı olarak kullanılarak nükleer transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Nükleer transfer işlemi ile elde edilen fetüslerde mtDNA'nın kökeni polimorfik belirteç analizleri ile tespit edilmiştir. Bu test 11 farklı doku tipinde (beyin, karaciğer, kas, göz, gonad, kalp, bağırsak, akciğer, deri, dil ve böbrek) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar tüm doku tiplerinde mtDNA kökeninin yumurta kaynaklı yani "*Bos Taurus*" ırkından kaynaklı olduğunu göstermiştir (Steinborn ve ark., 2000). Benzer bir çalışmada "*Bos Taurus*" yumurta içine "*Bos Indicus*" hücrelerinin transferi ile oluşturulmuş klon "*Bos Indicus*" buzağısında mtDNA'nın yumurta kökenli olduğu ve "*Bos Indicus*" mtDNA'sının erken embiyonik gelişim sırasında elimine edildiği rapor edilmiştir (Meirelles ve ark., 2001).

Mevcut çalışmada da klonlar ve vericileri 10 mikrosatellit belirteç kullanılarak karşılaştırılmış ve genomik DNA'larının vericiler ile özdeşliği belirlenmeye çalışılmıştır. Aynı şekilde klon yavruları da ebeveynlerini belirlemek amacıyla aynı mikrosatellit belirteçler ile analiz edilmiştir. Klonların mtDNA varlığının verici hücre mi yoksa alıcı yumurta mı kaynaklı olduğunu belirlemek amacıyla da mtDNA dizi analizleri yapılarak hem klonların mtDNA kaynağı belirlenmeye çalışılmış, aynı zamanda da mtDNA geçişi yavrularda da izlenmiştir.

Materyal ve Metod

Çalışmada Kullanılan Bireyler

Çalışmada daha önce "TÜBİTAK-TOVAG-1040360-Anadolu Yerli Sığır Irklarının Klonlanması" projesi (Arat ve ark., 2011) ile üretilmiş 1 erkek, 4 dişi olmak üzere 5 klon boz sığır (Şekil 1), bu klonların yavruları 2 erkek, 4 dişi yavrusu (Şekil 2), klonların üretilmesinde kullanılan 3 hücre hattı (kıkırdak,

fibroblast, granüloza) kullanılmıştır. Dişi klonların hepsi tek bir boz sığırın farklı hücreleri kullanılarak elde edilmiştir. Tüm klonların üretilmesinde alıcı sitoplazma olarak holstein sığırların yumurtaları kullanılmıştır.

Klon hayvanlar ve yavrularından alınan kan örnekleri ile klonlanan hayvanların asıllarına ait hücre örnekleri ve Klon 1 (EFE)'den alınan sperm örneğinden DNA izolasyonu yapılmıştır.



Şekil 1. Çalışmada kullanılan 4 dişi, 1 erkek klon ve hücre vericisi hayvanlar
Figure 1. Four female and one male clones and cell donor animals used in the study



Şekil 2. Çalışmada kullanılan klonlar ve yavruları
Figure 2. The clones and their offspring used in the study

DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden DNA izolasyon işlemi standart fenol/kloroform ekstraksiyon yönteminde küçük değişiklikler yapılarak (Sambrook ve ark., 1989) gerçekleştirilmiştir (Sevim, 2016).

Hücre örneklerinden DNA izolasyonunda ilk olarak, dondurulmuş haldeki hücreler +37°C'deki su banyosunda çözdürüldükten sonra DMEM-F12 hücre kültür medyumunu ile sulandırılıp 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant vakum aracılığıyla çekildikten sonra pelet 200 µl PBS ile sulandırılmıştır. Üzerine 30 µl proteinaz K (20 mg/ml), 30 µl RNAse (5 mg/ml) ve 400 µl NETS buffer eklenerek 65°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası standart fenol kloroform ekstraksiyonu ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Sevim, 2016)

Sperm örneğinden DNA izolasyonu iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada 2 ml'lik ependorf tüplerine yaklaşık 300 µl "high vacuum grease jel" konulmuştur. Aynı bir 1,5 ml'lik ependorf tüpe, vial içerisindeki sperm boşaltılmış ve 1 dk. 13.000 rpm de santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüpten süpernatant atılmış ve pelet 500 µl digestion buffer ile sulandırılmıştır. Bufferla resüspanse edilen bu karışım içerisinde "high vacuum grease jel" bulunan 2 ml'lik tüpe aktarılmış ve bu karışım üzerine 25 µl %20 lik SDS, 50 µl (10 mg/ml) Proteinaz K ve son olarak 25 µl (1M) DTT (Dithiothreitol) eklenmiştir. Bu karışım el ile baş aşağı ederek karıştırılmış ve 37°C'de 180 rpm de çalkalayıcı da 13-15 saat inkübe edilmiştir. İkinci aşamada ise inkübe edilen karışımdan fenol kloroform ekstraksiyonu ile genomik DNA elde edilmiştir (Sevim, 2016).

Çalışmada Kullanılan Mikrosatellit Belirteçler

Çalışmada Uluslar arası Hayvan Genetiği Derneği (ISAG-International Society for Animal Genetics) ve FAO MoDAD (Measurement of Domestic Animal Diversity) tarafından tavsiye edilen belirteç listesinden (Hoffmann ve ark., 2004, FAO, 2011) seçilen 10 farklı mikrosatellit belirteci (TGLA122, ETH225, ETH10, TGLA227, BM1824, INRA23, SPS115, ETH3, BM1818) kullanılmıştır. Bu mikrosatellit belirteçler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları, 100 ng DNA, 1 x PZR buffer, 0,25 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM primer (ileri ve geri) ve 0,5 U Taq Polimeraz içeren 20 µl total hacimde gerçekleştirilmiştir. PZR koşulları;

denatürasyon aşaması 94 °C'de 5 dakika (1 döngü), bağlanma ve uzama aşaması 94°C'de 30 sn, 57°C'de 30 sn ve 72°C'de 40 sn (35 döngü), son uzama aşaması 72°C'de 20 dk (1 döngü) olarak ayarlanmıştır. Mikrosatellit belirteçleri ile polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirilen örneklerin fragment analizleri, RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji firmasından (ABI 310 Genetik Analiz Cihazı) hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

Çalışmada Kullanılan mtDNA Belirteci

mtDNA analizi için D-loop ileri (5'-CCATACACAGACCACAGAATGA-3') ve geri (5'-AGTCCAAGCATCCCCCAAATA-3') (Takeda ve ark., 2008) primer çifti kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları yapılmıştır. Bu mtDNA belirteci kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları 100 ng DNA, 1xPZR buffer, 0,2 mM dNTP, 1,8 mM MgCl₂, 0,25 µM primer (ileri ve geri) ve 0,5 U Taq Polimeraz içeren 20 µl total hacimde gerçekleştirilmiştir. PZR koşulları; denatürasyon aşaması 94 °C'de 5 dakika (1 döngü), bağlanma ve uzama aşaması 94°C'de 45 sn, 57°C'de 45 sn ve 72°C'de 1 dk (30 döngü), son uzama aşaması 72°C'de 15 dk (1 döngü) olarak ayarlanmıştır. MtDNA belirteci ile polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirilen örneklerin dizi analizleri Medsantek Laboratuvar Malzemeleri San. ve Tic. Ltd. Şti. firmasından (Applied Biosystems 3500XL Genetic Analyzer) hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Klonlama teknolojisi ile elde edilen hayvanlar ve yavrularının detaylı bir şekilde incelenmesi teknolojinin daha anlaşılır hale getirilmesinde faydalı olabilir. Bu amaç doğrultusunda klonlar ve yavrularının moleküler karakterizasyon sonuçlarının elde edilen klonların normal bir ırk popülasyonu oluşturmasının mümkün olup olmadığı ve bu teknolojinin nesli tükenmiş bir ırkın geriye getirilmesindeki muhtemel potansiyeli ile ilgili ipuçları vereceği düşünülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde 6 (Yang ve ark., 2012), 9 (Zakhartchenko ve ark., 1999), 12 (Theoret ve ark., 2006), 17 (Kato ve ark., 2000) adet mikrosatellit belirteci kullanılarak klon sığırların genomik DNA açısından karakterizasyonlarının yapıldığı görülmüştür. Yapılan bu yüksek lisans çalışmasında ise 10 adet mikrosatellit belirteci kullanılarak klon hayvanlar

ve yavrularının genomik DNA karakterizasyonları yapılmıştır. Fragment analizi sonucunda klon hayvanlar hücre vericileri ile karşılaştırılmış ve birbirleriyle özdeş oldukları gözlemlenmiştir (Çizelge 1).

Fragment analizi sonucunda klon hayvanların yavruları, ebeveynleri ile karşılaştırılmış ve birbirleriyle uyumlu oldukları gözlemlenmiştir. Ancak dişi klonların hepsinin (Klon 2, 3, 4, 5) tek bir hayvanın genetik kopyası, dolayısıyla genomik DNA'larının aynı olması sebebiyle yavruların annelerinin klon dişilerden hangisi olduğunu belirlemek mikrosatellit belirteçler ile mümkün değildir. Klonlar için özel bir durum olarak her bir klonun farklı yumurta kaynağından gelmiş olması mtDNA analizi ile annelerin tespit edilmesini sağlayabilir. Ancak bu durum mtDNA'nın anne kaynaklı olması sebebiyle babalar için geçerli değildir.

Bu konuda sunulan birçok rapora rağmen mitokondriyal DNA geçişi klonlamada hala bir sorun veya en azından bir bilinmeyen olarak değerlendirilmektedir. Teknolojinin uygulandığının

bir sonucu olarak klonların mtDNA varlığının yumurtadan geleceği öngörülür. Bunu teyit eden birçok çalışmaya rağmen bazı raporlarda tam açıklanamayan bulgulara rastlanması ırklar arası nükleer transferde farklı genetik materyallerin birbiri ile uyumu konusunu gündeme getirmektedir. Klonlama teknolojisi ile elde edilen hayvanlarda mtDNA geçişinin incelendiği daha önceki çeşitli çalışmaların raporları incelendiğinde, mtDNA'nın normal seksüel üremede olduğu gibi genellikle alıcı yumurta kaynaklı olduğu görülmektedir (Plante ve ark., 1992; Evans ve ark., 1999; Steinborn ve ark., 2000; Tae Do ve ark., 2002; Burgstaller ve ark., 2007).

Yapılan yüksek lisans çalışmasında da daha önceki çalışma sonuçları ile uyumlu olarak moleküler karakterizasyonu yapılan 1 erkek ve 4 dişi klonun mtDNA'sının hücre vericilerinden farklı olduğu bulunmuş ve mtDNA'ların yumurta kaynaklı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 1. Klon hayvanlar ve hücre vericilerine ait fragment analiz sonuçları

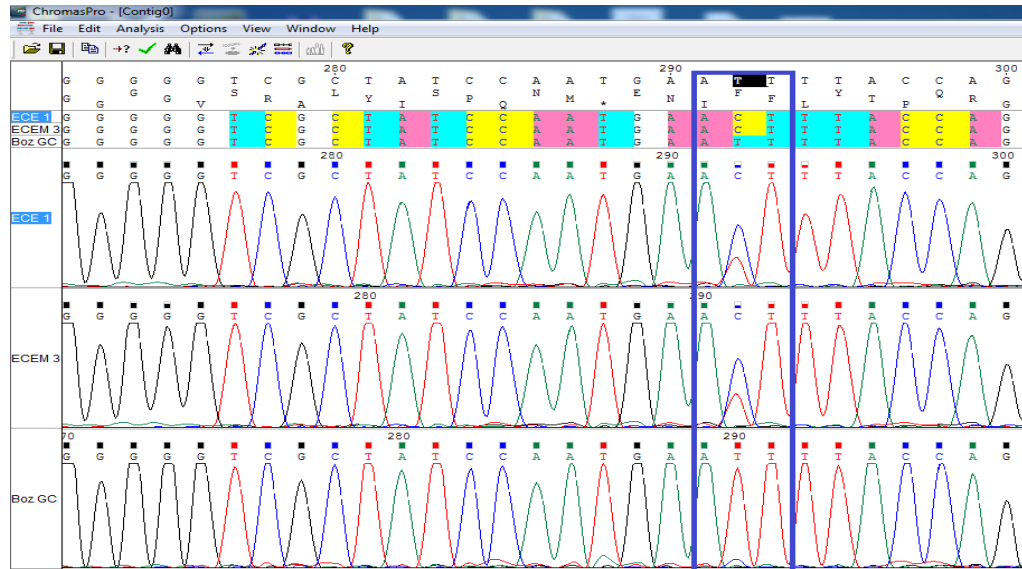
Table 1. Frangment analysis results of clone animals and their cell donor

	Hücre Vericisi 1	Klon 1	Hücre Vericisi 2	Klon 2, 3, 4, 5
TGLA122	152-152	152-152	164-164	164-164
ETH225	144-154	144-154	134-144	134-144
ETH10	206-214	206-214	206-212	206-212
TGLA227	78-98	78-98	116-126	116-126
BM1824	180-182	180-182	178-188	178-188
INRA23	196-196	196-196	216-218	216-218
SPS115	248-254	248-254	248-248	248-248
ETH3	114-124	114-124	114-126	114-126
BM1818	262-264	262-264	248-264	248-264
INRA63	186-188	186-188	186-196	186-196

Bu klonlardan Klon 2 ve 3 (Ece, Ecem)'ün analiz sonuçları incelendiğinde mtDNA'larının birbirleri ile aynı oldukları görülmüştür. Diğer 2 dişi klonun (Klon 4-Nilüfer ve Klon 5-Kiraz) ise hem birbirinden hem de Klon 2,3'ten farklı olduğu tespit edilmiştir. mtDNA geçişi generasyonlarda incelendiğinde Klon 4 ve 5'in mtDNA'ları yavruları ile aynı ancak Klon 3'ün yavrularından farklı olduğu belirlenmiştir. İntrauterin gelişimi boyunca embriyolar arasında karşılıklı hücre değişimi ve vasküler anostomozdan kaynaklanan kan lenfosit hücreleri ve üreme hücreleri kimerizmi ikiz sığırlarda iyi bilinen bir olgudur. Bu tip kimerizm aynı zamanda at, koyun, insan, lama gibi diğer memeli türlerinde de görülmüştür (Hiendleder ve Wolf, 2003). Bir çalışmada iki farklı yumurta kaynağından üretilen in vitro embriyoların aynı anneye transferi sonrasında ikiz fetusların kan ve karaciğerinde kimerizm tespit edilmiştir (Hiendleder, 2007). Bu durumda iki embriyo farklı yumurtadan gelmiş olsa dahi embriyolar arası hücre geçişi sebebiyle ikizlerin kanında iki ayrı yumurtadan kaynaklı hücrelerin bir arada varlığı görülebilir. Ancak bu durum diğer dokularda olmayabilir. Mevcut çalışmada aynı alıcı anneden doğan ikiz klonlardan biri olan Klon 3'ün yavrularında anneden farklı mtDNA varlığı

görülmesi dişi klonun kan hücrelerinde ikizi olan diğer klonla bağlı bir kimerizm olmasına rağmen üreme hücreleri de dahil olmak üzere kan dışındaki diğer dokularında tek bir yumurtadan gelen mtDNA varlığının mümkün olabileceğini düşündürmektedir. Ancak tüm mtDNA analizleri kan örneklerinde yapıldığı için bu çalışmada kesin bir şey söylemek mümkün değildir. Ayrıca aynı anneden doğan klon dişilerin dizi analiz sonuçlarında bazı nükleotidlerde görülen çift bantın (Şekil 3) kirlilikten mi yoksa kimerizmden mi kaynaklandığı ayırt edilememektedir. Görülen ikinci bantın gerçek olup olmadığı farklı bir yöntemle teyit edilmelidir.

Klonlardaki mtDNA varlığı ile ilgili olarak tam tersi bir görüş klon evcil hayvanların üretilmesinde mtDNA farklılığının getirebileceği avantajlarla ilgilidir. MtDNA polimorfiktir ve spesifik ana hattındaki bazı polimorfizmler süt üretimi ve büyüme performansı ile alakalıdır. Klonlama teknolojisi istenen genomik DNA ile arzu edilen polimorfizmi taşıyan mtDNA'nda bir araya getirilmesini ve böylece daha mükemmel bireylerin ortaya çıkmasını da sağlayabilir. Ancak bütün bu öngörülerin araştırmalarla desteklenmeye ihtiyacı vardır.



Şekil 3. Klon 2, Klon 3 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. Nükleotidde gözlemlenen farklılık

Figure 3. The difference between Clone 2, 3 and cell donor 2 observed on nucleotid 15892 according to the gene bank sequence reports.

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışma ırklar arası nükleer transfer sonucu oluşturulmuş klon siğir ve jenerasyonları üzerinde yürütülmüş moleküler karakterizasyon bulgularını içermektedir. Çalışma bulguları mikrosatellit belirteçlerin klonların özellikle köken aldığı birey ile genomik DNA açısından özdeş olduğunu tespit etmek amacıyla kullanılabilceğini, ancak genomik DNA bakımından özdeş klonların yavrularının hangi ebeveynine ait olduğunu belirlemede yetersiz olduğunu göstermiştir.

Klonlama çalışmalarında mtDNA geçişi halen bir bilinmeyen olarak gizemini sürdürmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalar gelişim biyolojisinden bildiğimiz “mtDNA anne orijinlidir” temel bilgisinin gerçek temellerini ve mekanizmanın işleyişini aydınlatmada şaşırtıcı ipuçları sunarken her bulgunun bir öncekini destelemeyebildiği ve birbirinden farklı sonuçların ortaya çıkabileceği de görülmektedir. Mevcut çalışmada klonların hepsinin mtDNA’ları klonlandıkları hayvandan farklı bulunmuştur. Dolayısıyla tüm klonlar genomik DNA bakımından identikal ancak mtDNA bakımından birbirinden farklıdır. Bu daha önce yapılmış birçok çalışma ile uyumludur ancak iki dişi klonun klonlandıkları hayvandan farklı mtDNA’ya sahip olmalarına rağmen aralarında hiçbir fark görülmemesi düşündürücü bulunmuştur. Yine genel bilgi olarak yavruların mtDNA’larının anneleri ile aynı olması gerekir. Oysa iki dişi klonun yavrularının mtDNA’sı anneleri ile aynı iken bir dişi klonun yavrularının mtDNA’sı annelerinden farklı bulunmuştur. MtDNA geçişinin daha iyi aydınlatılması amacıyla klonların daha çok sayıda yavrusu ile çalışılması önerilebilir. Yine özellikle birbirinin aynı mtDNA’ya sahip tek taşıyıcı anneden doğan ikiz klon dişilerin mtDNA varlığı kan dışındaki dokularda da araştırılabilir. MtDNA profili dizi analizine ilave olarak farklı moleküler yöntemler kullanılarak incelenebilir ve sonuçların dizi analizi sonuçları ile nasıl örtüştüğü değerlendirilebilir.

Bir diğer konu farklı mtDNA geçişi ile oluşturulan klon sürünün süt verimi veya büyüme performansının ırk ortalamasından farklı olup olmadığının araştırılmasıdır. Elde edilen sonuçlar teknolojinin iyi yönde bir ilerlemeyi sağlamada muhtemel potansiyelini görmek açısından faydalı olabilir.

Teşekkür

Çalışmaya gerek bilimsel gerekse teknik desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN’e, çalışmayı NKUBAP.03.YL.16.017 numaralı proje ve kısmı olarak da NKUBAP.00.24.AR.14.25 numaralı proje ile destekleyen Namık Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)’ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Arat, S. 2010. “Hayvan Klonlama Teknolojileri”, “Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları” Editör: Dündar M, Bağış H, Erciyes Üniversitesi Matbaası, 56-98.
- Arat, S., A. Çaputcu, T. Akkoç, S. Pabuccuoğlu, H. Sağırkaya, U. Cirit, Y. Nak, E. Koban, H. Bağış, K. Demir, D. Nak, A. Senunver, R. Kılıçaslan, B. Tuna, G. Çetinkaya, M. Denizci, Ö. Aslan, 2011. Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 23: 1012-1023.
- Baguisi, A., E.Behboodi, D.T. Melican, J.S. Pollock, M.M. Destrempes, C.Cammuso, J.L. Williams, S.D. Nims, C.A. Porter, P. Midura, M.J. Palacios, S.L. Ayres, R.S. Denniston, M.L. Hayes, C.A. Ziomek, H.M. Meade, R.A. Godke, W.G. Gavin, E.W. Overstrom, Y. Echelard, 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 17:456-461.
- Burgstaller, J.P., P. Schinogl, A. Dinnyes, M. Müller and R. Steinborn, 2007. Mitochondrial DNA heteroplasmy in ovine fetuses and sheep cloned by somatic cell nuclear transfer. *BMC Developmental Biology*. 7:14.
- Chesne’, P., P.G. Adenot, C. Viglietta, M. Baratte, L. Boulanger, J.P. Renard, 2002. Cloned rabbits production by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 20(4):366-9.
- Cibelli, J.B., S.L. Stice, P.J. Golueke, J.J. Kane, J.Jerry, C. Blackwell, F.A. Ponce de Leon, J.M. Robl, 1998. Cloned transgenic calves from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*. 280:1256-1258.
- Evans, M.J., C. Gurer, J.D. Loike, I. Wilmut, A.E. Schnieke, E.A. Schon, 1999. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep, *Nat Genet.* 23:90-93.
- FAO 2011. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. No. 9. Rome
- Galli, C., I. Lagutina, G. Crotti, S. Colleoni, P. Turini, N. Ponderato, R. Duchi, G.A. Lazzari, 2003. Cloned horse born to its dam twin. *Nature*. 424:635.
- Hiendleder, S and E. Wolf, 2003. The mitochondrial genome in embryo Technologies. *Reprod Domest Anim.* 38:290-304.
- Hiendleder, S., 2007. Mitochondrial DNA Inheritance after SCNT, Somatic Cell Nuclear Transfer, Ed: P. Sutovsky, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, 103-116.

- Hoffmann, I., P.A. Marsan, J.S.F. Barker, E.G. Cothran, O. Hanotte, J.A. Lenstra, D. Milan, S. Weigend, H. Simianer, 2004. New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: Recommendations of a joint ISAG/FAO working group. 29th ISAG (International Society of Animal Genetics) Congress, Tokyo.
- Kato, Y., T. Tani, Y. Sotomaru, K. Kurosawa, J.Y. Kato, H. Doguchi, H. Yasue and Y. Tsunoda, 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*. 282:2095–2098.
- Kato, Y., T. Tani, Y. Tsunoda, 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 120:231-237.
- Lee, B.C., M.K. Kim, G. Jang, H.J. Oh, F. Yuda, H.J. Kim, M.H. Shamim, J.J. Kim, S.K. Kang, G. Schatten and W.S. Hwang, 2005. Dogs cloned from somatic cells. *Nature*. 436:641.
- Li, M.H., T. Adamowicz, M. Switonski, I. Ammosov, Z. Ivanova, T. Kiselyova, R. Popov, J. Kantanen, 2006. Analysis of population differentiation in North Eurasian cattle (*Bos taurus*) using single nucleotide polymorphisms in three genes associated with production traits. *Anim Genet*. 37(4):390–392.
- Meirelles, F.V., V. Bordignon, Y. Watanabe, M. Watanabe, A. Dayan, R.B. Lobo, J.M. Garcia and L.C. Smith, 2001. Complete Replacement of the Mitochondrial Genotype in a *Bos indicus* Calf Reconstructed by Nuclear Transfer to a *Bos taurus* Oocyte. *Genetics*. 158:351–356.
- Mello, M.R.B., H.V.A. Caetano, M.G. Marques, J.F. Garcia, M.P. Milazzotto, C.M. Mendes, V.P. Oliveira, J.A. Visintin, 2003. Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 36:1485-1489.
- Onishi, A., M. Iwamoto, T. Akita, S. Mikawa, K. Takeda, T. Awata, H. Hanada and A.C.F. Perry, 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*. 289:1188–1190.
- Plante, Y., S.M. Schmutz, K.D.M. Lang, 1992. Restriction fragment length polymorphism in the mitochondrial DNA of cloned cattle. *Theriogenology*, 38: 897-904.
- Polejaeva, I.A., S.H. Chen, T.D. Vaught, R.L. Page, J. Mullins, S. Ball, Y. Dai, J. Boone, S. Walker, D.L. Ayares, A. Colman and K.H.S. Campbell, 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*. 407:86–90.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed.), 3 vol, Cold-Spring Harbor, New York.
- Sevim Tüten, E. 2016. Nükleer Transfer ile Elde Edilen Klon Sığır ve Yavrularının mtDNA ve Mikrosatellit Belirteçlerle Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 80 s.
- Shi, D., F. Lu, Y. Wei, K. Cui, S. Yang, J. Wei and Q. Liu, 2007. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol. Reprod*. 77:285–291.
- Shin, T., D. Kraemer, J. Pryor, L. Liu, J. Rugila, L. Howe, S. Buck, K. Murphy, L. Lyons and M. Westhusin, 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*. 415:859.
- Steinborn, R., P. Schinogl, V. Zakhartchenko, 2000. Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nat Genet*. 25:255-257.
- Tae Do, J., J.W. Lee, B.Y. Lee, S.B. Kim, Z.Y. Ryoo, H.T. Lee, K.S. Chung, 2002. Fate of Donor Mitochondrial DNA in Cloned Bovine Embryos Produced by Microinjection of Cumulus Cells. *Biology of Reproduction*. 67: 555-560.
- Takeda, K., K. Kaneyama, M. Tasai, S. Akagi, S. Takahashi, M. Yonai, T. Kojima, A. Onishi, T. Tagami, K. Nirasawa, H. Hanada, 2008. Characterization of a donor mitochondrial DNA transmission bottleneck in nuclear transfer derived cow lineages. *Mol Reprod Dev*. 75(5):759-65.
- Theoret, C.L., M. Dore, P. Mulon, A. Desrochers, F. Viramontes, F. Filion, L.C. Smith, 2006. Short-and long-term skin graft survival in cattle clones with different mitochondrial haplotypes. *Theriogenology*. 65:1465-1479.
- Vignon, X., P. Chesne, D. Le Bourhis, J.E. Flechon, Y. Heyman and J.P. Renard, 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C. R. Acad. Sci, III* 321:735–745.
- Wakayama, T., A.C.F. Perry, M. Zuccotti, K.R. Johnson and R. Yanagimachi, 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 394:369–374.
- Wani, N.A., U. Wernery, F.A.H. Hassan, R. Wernery and J.A. Skidmore, 2010. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod*. 82:373–379.
- Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind and K.H. Campbell, 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385:810–813.
- Woods, G.L., K.L. White, D.K. Vanderwall, G.P. Li, K.I. Aston, T.D. Bunch, L.N. Meerdo and B.J. Pate, 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*. 301:1063.
- Yang, B., S. Lee, S. Hwang, H. Lee, G. Im, D. Kim, D. Lee, K. Lee, I. Jeon, S. Oh, S. Park, 2012. Phenotypic characterization of Hanwoo (native Korean cattle) cloned from somatic cells of a single adult BMB reports. 45(1):38-43.
- Zakhartchenko, V., G. Durcova-Hills, M. Stojkovic, W. Scherthaner, K. Prella, R. Steinborn, M. Müller, G. Brem, E. Wolf, 1999. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts *Journal of Reproduction and Fertility*. 115:325-331.
- Zhou, Q., J.P. Renard, G. Le Friec, V. Brochard, N. Beaujean, Y. Cherifi, A. Fraichard and J. Cozzi, 2003. Generation of fertile cloned rates by regulating oocyte activation. *Science*. 302:1179.