

MONIKA MARTA ANTKIEWICZ<sup>1</sup>, ELIZABETH YOUNG ABRAHAMSEN<sup>2</sup>,  
BELINDA LANGNES<sup>2</sup>, HILDE-GUNN OPSAHL SORTEBERG<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Biotechnologia – Studia Międzywydziałowe  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja  
Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków*

<sup>2</sup>*Norwegian University of Life Sciences  
Ås, Norwegia  
E-mail: m.antkiewicz@poczta.onet.pl*

## CZY WSZYSTKIE SKLONOWANE ZWIERZĘTA STARZEJĄ SIĘ TAK SAMO? TELOMERY I TELOMERAZA – CZY SĄ JAKIEŚ RÓŻNICE?

### WPROWADZENIE

Już na początku XIX w. nadzieja, że w przyszłości będzie istniała szansa na klonowanie komórek spędzała sen z powiek wielu naukowcom. Przyczyniło się do tego z całą pewnością dokonanie Karl Ernst von Baer'a, który w 1827 r., jako pierwszy, wykrył ssaczy oocyt pochodzący od psa (patrz BETTERIDGE 2001). Obecnie, odkrycie komórek macierzystych oraz klonowanie *in vitro* są uważane za jedne z największych osiągnięć medycyny o ogromnym znaczeniu terapeutycznym (AGARWAL 2006). Rozwój technologii klonowania somatycznego (ang. somatic cell nuclear transfer, SCNT) pokazuje jak wiele możliwości, zarówno dla medycyny jak i rolnictwa, niesie ta technika.

Hipoteza dotycząca klonowania somatycznego zakładająca, iż oocyt zawiera wszystkie czynniki niezbędne do „wymazania wcześnie narzuconego programu rozwojowego jądra oraz nadanie mu stanu pluripotencji (...)” (AGARWAL 2006) została w pewnym stopniu potwierdzona sklonowaniem wielu gatunków zwierząt. Wciąż jest jednak wiele nie wyjaśnionych kwestii dotyczących rozwoju embrionalnej komórki macierzystej po procesie przeniesienia jądra komórki somatycznej. W tym artykule przyjrzymy się bliżej jednemu z aspektów starzenia się sklonowanych organizmów oraz udziału telomerów w tym procesie.

### KLONOWANIE A STARZENIE SIĘ

Mówiąc o współczesnej biotechnologii, klonowanie to jedno z pojęć najczęściej kojarzone z tą nową dziedziną wiedzy. Stało się tak prawdopodobnie dzięki sukcesowi owcy Dolly – pierwszego sklonowanego ssaka. Od tamtego czasu udało się sklonować wiele zwierząt, między innymi myszy, bydło, trzodę chlewną, konie oraz wiele innych, zarówno w celach rolniczych, produkcyjnych, jak i medycznych (LATHAM 2004).

Dzisiaj, technika klonowania somatycznego jest najbardziej powszechną metodą stosowaną w klonowaniu zwierząt. Polega ona na

przeniesieniu jądra komórki somatycznej pobranej z klonowanego osobnika, do komórki jajowej pozbawionej jądra tzw. enukleowanego oocytu (KUHOLZER-CABOT i BREM 2002). W wyniku tego procesu powstaje funkcjonalna zygota, która po umieszczeniu w odpowiednich warunkach, może rozwinąć się w żywego osobnika. Dawca komórki jajowej z reguły pochodzi z tego samego gatunku, a międzygatunkowe eksperymenty klonowania somatycznego są zazwyczaj nieudane (KUHOLZER-CABOT i BREM 2002). Owca Dolly to zapewne najbardziej znany sklonowany orga-

nizm. Przyszła ona na świat w 1996 r., w wyniku eksperymentu naukowców brytyjskich, jako pierwszy w historii organizm powstały w wyniku sklonowania komórek somatycznych dorosłego osobnika. Prace nad jej uzyskaniem przysporzyły naukowcom sporo problemów. Z ponad 250 komórek jajowych zawierających wszczepiony materiał genetyczny, jedynie 30 było w stanie utworzyć zarodki owcze, które następnie zaimplantowano owcom-matkom zastępczym. Z tej liczby zarodków tylko jeden rozwinął się formując niepatologiczną ciążę (CAMPBELL i współaut. 1996).

W czasie stosunkowo krótkiego życia owcy Dolly zebrano wiele informacji na temat rozwoju sklonowanego organizmu. Zaobserwowano między innymi, że wiek materiału genetycznego sklonowanego zwierzęcia jest identyczny z wiekiem dawcy. Tym samym Dolly miała biologicznie 6 lat w chwili urodzenia, czyli tyle, ile miała owca-dawczyni. Powoduje to między innymi większe obciążenie klonu wadami rozwojowymi oraz mniejszą odporność na choroby (BORGE 2007).

Dolly została uśpiona w 2003 r., po 6 latach (owce żyją średnio 11-12 lat) ze względu na postępujący nowotwór płuc. Dowiedziano, że choroba ta nie była wynikiem klonowania. Za powstanie nowotworu najprawdopodobniej odpowiadał sposób przetrzymywania zwierzęcia w warunkach laboratoryjnych. Pomimo że technika klonowania somatycznego została odkryta już kilka lat temu, nadal pozostaje w powijakach i zapewne minie wiele lat nim zostanie ona w pełni udoskonalona. Warto bowiem pamiętać, że tylko mały odsetek doświadczeń kończy się sukcesem, a ponadto jedynie niewielki procent sklonowanych zwierząt dożywa wieku reprodukcyjnego i wydaje na świat swoje potomstwo. Co więcej, również długość życia sklonowanych zwierząt bywa krótsza w porównaniu do ich przodków i rówieśników nie poddanych procesowi klonowania.

Proces starzenia się od lat interesował naukowców, a wiele badań starało się wyjaśnić dlaczego jedne zwierzęta żyją długo, a inne bardzo krótko. Starzenie się jest związane ze stopniowym spadkiem wydolności organizmu, naturalnym i nieodwracalnym nagromadzeniem się uszkodzeń wewnątrzkomórkowych przerastających zdolności organizmu do samonaprawy, w konsekwencji prowadząc do jego śmierci (SHAY i WRIGHT 2007). Dodatkowo również, poprzez upośledzenie funkcjonowania komórek, tkanek i narządów,

proces starzenia się zwiększa podatność organizmu na choroby. Przez wiele lat twierdzono, że jest to przypadkowy proces rządzący się jedynie prawami entropii (KENYON 2005), ale najnowsze badania pokazują, że starzenie się to „zjawisko regulowane przez szlaki, które pozostały niezmienione w czasie ewolucji, a zmiana nawet pojedynczych genów w tych szlakach zmienia długość życia znacząco (...)” (KENYON 2005). Znanych jest już kilka takich genów, w których mutacja może przyczynić się do znaczącego skrócenia lub wydłużenia życia osobnika. Jednym z nich jest gen *daf-2* obecny u organizmu modelowego *Caenorhabditis elegans*, którego produkt białkowy jest receptorem insuliny, hormonu niezbędnego także do życia człowieka. Mutacja w obrębie tego właśnie genu nawet kilkakrotnie wydłuża życie nicienia (MURPHY i współaut. 2003).

Starzenie się jest jednak zjawiskiem wyjątkowo złożonym. Wiele mechanizmów leży u jego podstaw, a zależy on nie tylko od funkcjonowania genów, ale również od wpływu otoczenia na organizm.

Proces starzenia się organizmu tłumaczą m.in. teorie opierające się na zaprogramowanej śmierci oraz na kumulacji błędów. Pierwsza z nich zakłada udział biologicznych zegarów w odliczaniu życia organizmu, z kolei teoria kumulacji błędów za proces starzenia się obarcza negatywne warunki środowiskowe, w wyniku których kumulują się mutacje, a ich nadmierne nagromadzenie doprowadza do starzenia się, a w konsekwencji śmierci organizmu (KENYON 2005).

Nie tylko organizmy mają ograniczoną długość życia. Dotyczy to również pojedynczych komórek. Wciąż jednak do końca nie wiadomo w jakim stopniu starzenie replikacyjne, na poziomie komórkowym, wpływa na proces starzenia się całego organizmu. Uważa się, że wiele molekularnych czynników ma wpływ na zakończenie proliferacji komórek. Są to uszkodzenia DNA i spadek jego metylacji, obniżona stabilność heterochromatyny, zwiększone stężenie nieprawidłowych białek komórkowych, uszkodzenia mitochondriów czy skracanie się telomerów (AUBERT i LANS-DORP 2008).

Skrócony telomer stanowi sygnał rozpoznawany w komórce jako uszkodzone DNA. Prowadzi to do aktywacji różnych białek. Jedne z nich są odpowiedzialne za rozpoznanie uszkodzonego fragmentu DNA, inne prowadzą do indukcji sygnału, który, poprzez aktywację białek zaangażowanych w regulację cy-

klu komórkowego (np. białko p53, inhibitor cyklozależnych kinaz p21), powoduje trwałe zahamowanie proliferacji, czyli starzenie komórkowe (MEIER i współaut. 2007).

Przyczyny skracania się telomerów nie zostały jednoznacznie wyjaśnione. Istnieje kilka czynników, których udział w tym procesie został potwierdzony eksperymentalnie. Sugeruje się również, że oprócz następujących w wyniku skracania uszkodzeń telomerowego DNA, pewną rolę w indukcji procesu starzenia komórkowego odgrywa tzw. efekt pozycyjny telomeru (SHAY i WRIGHT 2005). Model ten, zakładający wyciszenie genów zlokalizowanych w bliskim sąsiedztwie telomerów, tłumaczy, iż starzenie się komórek prowadzi do zmian polegających na uaktywnieniu wcześniej wyciszo-

nych genów. Ich działanie, głównie w komórkach starszych, może polegać np. na zmniejszeniu produkcji czynnika EF (ang. elongation factor), odpowiedzialnego za wydłużanie łańcucha białkowego.

To właśnie zmniejszone długości telomerów uważane były za powód przedwczesnego starzenia się sklonowanych zwierząt, między innymi Dolly. Kiedy w 1999 r. doniesiono, że odziedziczyła ona skrócone telomery od 6-letniej dawczyni jądra komórkowego (JEON i współaut. 2005), wiele badań naukowych starało się odpowiedzieć na pytanie, czy wszystkie sklonowane zwierzęta szybciej się starzeją oraz udowodnić udział telomerów w tym procesie. W tym artykule przyjrzymy się bliżej niektórym eksperymentom oraz ich wynikom.

## TELOMERY ORAZ TELOMERAZA

Telomery, wysoko powtarzalne sekwencje bogate w guaninę, są niezwykle konserwatywne. Wiadomo, że odpowiadają one za zabezpieczenie chromosomów przed uszkodzeniami podczas kopiowania, umożliwiają całkowitą replikację chromosomów, nadzorują ekspresję genów czy wspomagają organizację końców chromosomów w trakcie podziałów komórki (BETTS i współaut. 2005). Powszechnie wiadomo również, że ulegają one skróceniu w czasie życia osobniczego. Wynika to z faktu, że podczas każdego cyklu komórkowego polimeraza nie replikuje telomerów w całości, co w konsekwencji przejawia się skracaniem DNA o około 20 do 500 par zasad na cykl komórkowy (BETTS i współaut. 2005). Kiedy osiągną one swoją krytyczną długość stają się nie zdolne do pełnienia funkcji, następują aberracje chromosomowe, fuzje chromosomów, a wreszcie zatrzymanie podziałów komórkowych i starzenie (BETTS i współaut. 2005).

Telomeraza, z kolei, to enzym rybonukleinowy odpowiedzialny za dobudowywanie terminalnego odcinka nici 3'-5' DNA i tym samym odbudowywanie długości telomerów. Należy tutaj podkreślić jej niezwykle specy-

ficzność komórkową. Występuje w intensywnie dzielących się komórkach, a jej aktywność zmniejsza się z wiekiem. Ten spadek aktywności łączy się ze starzeniem się komórek. Natomiast w liniach komórek nowotworowych aktywność telomerazy jest zwykle podwyższona. Już w 1998 r. postawiono hipotezę, która zakłada, iż wzrost ekspresji telomerazy może prowadzić do transformacji komórek prowadzącej do ich uniesmiertelnienia (KENYON 2005). Te odkrycia potwierdzają udział telomerów w starzeniu replikacyjnym, jednym z bardziej znaczących modeli służących do poznania molekularnych mechanizmów starzenia komórkowego, ale stopień w jakim następuje redukcja długości telomerów u różnych organizmów jest odmienny. Dla przykładu, u myszy w ogóle nie dochodzi do skracania się telomerów (BLASCO i współaut 1997), podczas gdy u innych gatunków zjawisko to jest powszechne. Należy jednak pamiętać, że wciąż nie da się jednoznacznie stwierdzić, czy starzenie replikacyjne warunkuje starzenie się całego organizmu. Jest on, z całą pewnością, obok wielu innych, jednym z elementów wpływających na długość życia organizmu.

## DŁUGOŚĆ TELOMERÓW W SKLONOWANYCH ORGANIZMACH

### OWCE

Sklonowanie owcy Dolly zapoczątkowało dyskusję, czy klonowanie przyspiesza proces starzenia na poziomie molekularnym. Bada-

nia przeprowadzone przez Shielsa i jego zespół pokazały, że telomery sklonowanych owiec są znacznie krótsze w porównaniu do rówieśników nie poddanych procesowi klonowania (patrz KUHHLER-CABOT i BREM

2002). Naukowcy doszli więc do wniosku, że klony mają taką samą długość telomerów jak komórki użyte do klonowania, a starzenie się to wynik właśnie odziedziczenia skróconych telomerów. Nie prowadzono badań nad aktywnością telomerazy (KUHOLZER-CABOT i BREM 2002).

#### BYDŁO

Niedługo po publikacji na temat skróconych telomerów u owcy Dolly wynikających z wieku komórki dawcy, Japońscy naukowcy przeprowadzili podobny eksperyment na bydło. Sklonowali oni dziesięć cieląt. Komórkami użytymi do klonowania były fibroblasty skóry oraz komórki wzgórka jajonośnego krowy. Sześć klonów zmarło zaraz po urodzeniu się, a cztery przeżyły i były zdrowe. Zbadano genomowy DNA pochodzący z ucha (komórki z tej tkanki zostały użyte do klonowania) i okazało się, że długość telomerów u czterech klonów była podobna jak u zwierząt w tym samym wieku nie poddanych procesowi klonowania somatycznego. Wszystkie cielęta miały dłuższe telomery niż organizm użyty do klonowania, jak również klony, które zmarły miały porównywalną długość telomerów do zwierząt kontrolnych. Jak pokazały badania, długość telomerów nie skraca się po klonowaniu, a wręcz przeciwnie, telomery odbudowują swoją długość u sklonowanych zwierząt. Skrócone telomery nie są więc powodem wczesnej śmierci zwierzęcych klonów u bydła (TIAN i współaut. 2000).

Ze względu na otrzymanie sprzecznych rezultatów dla owiec i bydła, naukowcy starali się odnaleźć powód takiego stanu rzeczy. Po pierwsze, może to być proces gatunkowo specyficzny. Dodatkowo, otrzymano różną liczbę sklonowanych zwierząt, co wskazuje na różną wydajność metody w zależności od konkretnych gatunków. Ponadto, wykorzystano odmienne źródło DNA. W przypadku doświadczeń na bydło DNA pochodziło z komórek ucha, a przy klonowaniu owcy Dolly były to białe krwinki. Ilość podziałów, jakie do momentu wykonania doświadczenia przeszły te komórki, bez wątpienia była różna. Wiadomo bowiem, że leukocyty w trakcie infekcji są stymulowane do intensywnych podziałów. Można zatem przypuszczać, że ich telomery były wyjściowo krótsze (TIAN i współaut. 2000).

W 2002 r. Miyashita i współpracownicy, kontynuując badania poprzedników, starali się odpowiedzieć na pytanie: czy typ komórki donorowej użytej w procesie klonowania

somatycznego ma wpływ na długość telomerów w komórkach organizmów powstałych w wyniku zastosowania tej metody? W doświadczeniu tym użyto jądra komórkowe pochodzące z kilku różnych rodzajów komórek. Na postawione przez naukowców pytanie odpowiedź jest oczywiście twierdząca. Okazało się, że z komórek nabłonka jajowodu pochodzących od 13-letniej krowy udało się uzyskać pięć klonów, u których telomery były krótsze niż w komórkach zwierząt kontrolnych, a także 18-letnich zwierząt nie poddanych procesowi klonowania somatycznego. Podobne rezultaty otrzymano również wtedy, kiedy do klonowania użyte były komórki nabłonka gruczołu mlekowego czy komórki śródbłonka jajowodu (MIYASHITA i współaut. 2002).

Kiedy do doświadczenia użyto komórki mięśniowe, długość telomerów u dwóch otrzymanych klonów była podobna do stwierdzonej u zwierząt kontrolnych, jednakże zaskakująco dłuższa niż u dawcy (MIYASHITA i współaut. 2002).

W doświadczeniu tym użyte były również fibroblasty skóry. W efekcie otrzymano dwa sklonowane cielęta, u których długość telomerów była zbliżona do tej u zwierząt w tym samym wieku, nie poddanych procesowi klonowania somatycznego (MIYASHITA i współaut. 2002).

Zaskakujące rezultaty uzyskano, gdy jako dawcy jąder komórkowych posłużyły komórki embrionalne. Zaowocowało to uzyskaniem sześciu sklonowanych zwierząt o telomerach dłuższych niż u zwierząt kontrolnych (MIYASHITA i współaut. 2002).

Otrzymane wyniki zmobilizowały naukowców do podjęcia próby wyjaśnienia, jakie mogą być powody obserwowanych różnic. Jedną z przyczyn może być różne tempo podziałów komórek, które jest zależne od wieku organizmu. Komórki organizmów młodszych dzielą się znacznie szybciej niż starszych. Dodatkowo, szybkość proliferacji zależy także od rodzaju komórki; komórki nabłonkowe dzielą się znacznie szybciej niż fibroblasty skóry czy komórki mięśniowe (MIYASHITA i współaut. 2002).

Kolejnym pytaniem, na które starano się uzyskać odpowiedź było, czy długotrwała kultura *in vitro* komórek-dawców jąder wpływa na proces starzenia się zwierzęcych klonów?

Jeden z eksperymentów został przeprowadzony na bydłeczych komórkach hodowanych w warunkach *in vitro* przez ponad 3 miesiące. Sklonowane zwierzęta po 15 mie-

siącach nie wykazywały żadnych wad rozwojowych (KUBOTA i współaut. 2000), co może dowodzić, iż długotrwała hodowla *in vitro* komórek-dawców jąder nie zmniejsza długości telomerów. W przeciwnym wypadku zwierzęta, z uwagi na postępujący proces starzenia się na poziomie komórkowym, byłyby bardziej podatne na choroby.

Podobny eksperyment został przeprowadzony przez LANZA i jego współpracowników (2000), którzy w swoim doświadczeniu wykorzystali fibroblasty płodowe poddane długotrwałej hodowli *in vitro*. Ich badania pokazały, że komórki wyizolowane od sklonowanych osobników wcale nie były w wieku (mierzonej zdolnością do przejścia określonej liczby podziałów) w jakim były starzejące się komórki, których jądra wykorzystano w procesie klonowania somatycznego. Zatem przyjęto, że zastosowanie do klonowania jąder komórek pochodzących z długotrwałej hodowli komórkowej nie wpływa na proces starzenia się zwierząt sklonowanych.

#### MYSZY

Od bardzo dawna myszy stanowią jeden z wygodnych organizmów modelowych dla genetyków. Wynika to z bardzo krótkiego okresu generacji, jak również ich niewielkich rozmiarów. U nich także badano, jak klonowanie wpływa na proces starzenia się. Wakayama i jego zespół uzyskał kilka pokoleń sklonowanych myszy i stwierdzili brak różnic fizjologicznych pomiędzy osobnikami sklonowanymi i dzikimi. Zbadano również długość telomerów i, tak jak oczekiwano, nie znaleziono dowodów na ich skracanie się (WAKAYAMA i współaut. 2000). Warto jednak podkreślić, iż telomery myszy są niezwykle długie oraz, że u tego gatunku w trakcie starzenia komórkowego nie dochodzi do ich skracania się (SHAY i WRIGHT 2007). Badacze ci stwierdzili także, że każde kolejne pokolenie sklonowanych myszy charakteryzowało się większą długością telomerów. Wyjaśnieniem tej sytuacji może być fakt, iż komórką wyjściową do procesu klonowania była komórka wzgórka jajonośnego. Ma ona wzmo-

żoną aktywność telomerazy i dlatego właśnie doszło do odbudowy długości telomerów (KUHHLER-CABOT i BREM 2002). Zupełnie inne wyniki otrzymał Ogonuki i jego współpracownicy. Sklonowane przez nich myszy umierały znacznie szybciej. Aż 10 z 12 myszy umarło znacznie wcześniej w porównaniu do zwierząt nie klonowanych, a jądra które wykorzystano w tym wypadku pochodziły z komórek Sertoliego. Nie udowodniono tutaj udziału chromosomów w procesie starzenia, a autorzy wyjaśniają swe wyniki brakiem specyficznej odpowiedzi immunologicznej u sklonowanych osobników, co skutkowało ich większą podatnością na różne choroby (głównie na zapalenie płuc) (OGONUKI i współaut. 2002).

#### ŚWINIE

Kiedy w 2000 r. po raz pierwszy sklonowano świnie (BORGE 2007), dało to nadzieję na przyspieszenie procesu ksenotransplantacji. Niestety, również u świń obserwuje się niezwykle niską wydajność procesu klonowania somatycznego. Tylko z ok. 1% zarodków udaje się uzyskać sklonowane świnie. Przeprowadzone badania miały na celu sprawdzenie długości telomerów oraz aktywności telomerazy u tych osobników. Zaskakujące wyniki otrzymane przez naukowców wskazują na brak skracania się telomerów w komórkach klonowanych organizmów. Wręcz przeciwnie, autorzy badań zauważyli wydłużanie się tych fragmentów chromosomów (JEON i współaut. 2005).

Jeon i współpracownicy badając aktywność telomerazy zauważyli, że była ona znacznie wyższa w blastocystach po klonowaniu, niż w komórkach użytych do klonowania. To właśnie może wyjaśniać obserwowane wydłużanie się telomerów (JEON i współaut. 2005). Należy pamiętać, iż zmiana aktywności telomerazy we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego może mieć swoje konsekwencje w wydłużaniu telomerów w komórkach sklonowanego organizmu (HOCHEDLINGER i JAENISCH 2006).

#### PODSUMOWANIE

Proces starzenia się jest zjawiskiem gatunkowo-specyficznym. Z powodu stosunkowo krótkiej historii techniki klonowania (nieco ponad 10 lat) trudno jest wyciągać wnioski i przewidywać jaka będzie przyszłość tej me-

tody. Z przedstawionych przykładów wyraźnie widać, że u sklonowanych zwierząt nie zawsze dochodzi do skracania się telomerów, a molekularne mechanizmy regulujące długość oraz aktywność telomerazy są nadal

przedmiotem badań (ENGELHARDT i MARTENS 1998). Pomimo, iż w przypadku owcy Dolly zauważono, iż długość telomerów jest identyczna jak u organizmu, którego jądro wykorzystano w procesie klonowania somatycznego, wiele badań na bydło, trzodzie chlewnej czy myszach pokazuje zupełnie odmienne wyniki. Aktualny poziom wiedzy pozwala na stwierdzenie, że brak jest wyraźnej korelacji pomiędzy długością telomerów a długością życia sklonowanych zwierząt. Długość telomerów u zwierząt pochodzących z procesu klonowania jest bowiem różna w zależności od: gatunku, wieku, płci, typu komórki czy warunków hodowli.

Należy także pamiętać, że długość telomerów może wskazywać na proces starzenia się komórki, ale niekoniecznie jest związana z procesem starzenia się organizmu oraz, że inne czynniki, obok telomerów i telomerazy, mogą pełnić istotną rolę w procesie starzenia się.

Do tej pory pozostaje wiele niewyjaśnionych kwestii dotyczących procesu starzenia się zwierzęcych klonów. Dalsze badania z całą pewnością dostarczą wiedzy na ten temat i tym samym pomogą w ulepszeniu techniki klonowania somatycznego.

#### DO ALL CLONED ANIMALS AGE IN THE SAME WAY – TELOMERES AND TELOMERASE, IS THERE ANY DIFFERENCE?

##### Summary

In discussions regarding modern biotechnology, cloning is the word commonly associated with this field of knowledge. This is a direct result of the world famous cloning of "Dolly" in 1997. Even though, the technology have been developed several years ago it is still in its infancy, and years might go by before good solutions are developed. What has to be noticed is that only a small percentage of cloning experiments will lead to viable offspring, and in addition, the lifespan of cloned animals seems to be shorter than their donor ancestors and sibling from normal reproduction.

"Dolly's" early death led to many questions, among them; did the cloning process accelerate aging? Subsequently, many studies have been performed to find a reason for Dolly early aging. As a result, it was stated that this animal inherited shortened telomeres from the donor cell, and that was the reason for the rapid aging process. Since then

many various animals have been successfully cloned. Different observations suggest that the age of the donor cell used in somatic cell nuclear transfer technique not necessarily affect the aging of cloned animals. The telomere length in animals that underwent the cloning procedure vary based on species, age, gender, cell type, culturing environment and so on. It is also important to consider genetic facts in donor animals, when telomere length seems to vary within the species. It is shown that telomere length can give an indication on cell senescence, but is not necessarily related to the aging of the organism.

Different results presented in the articles imply that there is no straightforward answer when comes to early aging of cloned animals. Still there are many unanswered questions. Future research will provide us with deeper knowledge of these mechanisms, necessary for optimizing of the cloning procedure.

##### LITERATURA

- AGARWAL S., 2006. *Cellular Reprogramming*. Methods Enzymol. 420, 265-270.
- AUBERT G., LANSDORP P. M., 2008. *Telomeres and aging*. Physiol. Rev. 88, 557-579.
- BETTERIDGE K. J., 2001. *Comparative aspects of conceptus growth: a historical perspective*. Reproduction 122, 11-19.
- BETTS D. H., PERRAULT S. D., PETRICK J., LIN L., FAVETTA L. A., KEEFER C. L., KING W. A., 2005. *Telomere Length Analysis in Goat Clones and Their Offspring*. Mol. Reprod. Dev. 72, 461-470.
- BLASCO M. A., LEE H. W., HANDE M. P., SAMPER E., LANSDORP P. M., DE PINHO R. A., GREIDER C. W., 1997. *Telomere shortening and tumor formation in mouse cells lacking telomerase RNA*. Cell 91, 25-34.
- BORGE O. J., 2007. *10 år siden Dolly forandret verden*. Genialt 1, 14-15.
- CAMPBELL K. H. S., MCWHIR J., RITCHIE W. A., WILMUT I., 1996. *Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line*. Nature 380,64-66.
- ENGELHARDT M., MARTENS U. M., 1998. *The implication of telomerase activity and telomere stability for replicative aging and cellular immortality*. Oncol. Rep. 5, 1043-52.
- HOCHEDLINGER K., JAENISCH R., 2006. *Nuclear reprogramming and pluripotency*. Nature 441, 1061-67.
- JEON H. Y., HYUN S. H., LEE G. S., KIM H. S., KIM S., JEONG Y. W., KANG S. K., LEE B. C., HAN J. Y., AHN C., HWANG W. S., 2005. *The Analysis of Telomere Length and Telomerase Activity in Cloned Pigs and Cows*. Mol. Reprod. Dev. 71, 315-320.
- KENYON C., 2005. *The Plasticity of Aging: Insights from Long-Lived Mutants*. Cell 120, 449-460.
- KUBOTA C., YAMAKUCHI H., TODOROKI J., MIZOSHITA K., TABARA N., BARBER M., YANG X., 2000. *Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long term culture*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 97, 990-995.
- KUHHOLZER-CABOT B., BREM G., 2002. *Aging of animals produced by somatic cell nuclear transfer*. Exp. Gerontol. 37, 1315-1321.

- LANZA R. P., CIBELLI J. B., BLACKWELL C., CRISTOFALO V. J., FRANCIS M. K., BAERLOCHER G. M., MAK J., SCHERTZER M., CHAVEZ E. A., SAWYER N., LANSDORP P. M., WEST M. D., 2000. *Extension of cell lifespan and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells*. Science 288, 665–669.
- LATHAM K. E., 2004. *Cloning: questions answered and unsolved*. Differentiation 72, 11–22.
- MEIER A., FIEGLER H., MUNOZ P., ELLIS P., RIGLER D., LANGFORD C., BLASCO M. A., CARTER N., JACKSON S. P., 2007. *Spreading of mammalian DNA-damage response factors studied by ChIP-chip at damaged telomeres*. EMBO J. 26, 2707–18.
- MIYASHITA N., SHIGA K., YONAI M., KANEYAMA K., KOBAYASHI S., KOJIMA T., GOTO Y., KISHI M., ASO H. A., SUZUKI T., SAKAGUCHI M., NAGAI T., 2002. *Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types*. Biol. Reprod. 66, 1649–1655.
- MURPHY C. T., MCCARROLL S. A., BARGMANN C. I., FRASER A., KAMATH R. S., AHRINGER J., LI H., KENYON C., 2003. *Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of Caenorhabditis elegans*. Nature 424, 277–284.
- OGONUKI N., INOUE K., YAMAMOTO Y., NOGUCHI Y., TANEMURA K., SUZUKI O., NAKAYAMA H., DOI K., OHTOMO Y., SATOH M., NISHIDA A., OGURA A., 2002. *Early death of mice cloned from somatic cells*. Nat. Gen. 30, 253–254.
- SHAY J. W., WRIGHT W. E., 2005. *Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase*. Carcinogenesis 26, 867–874.
- SHAY J. W., WRIGHT W. E., 2007. *Hallmarks of telomeres in ageing research*. J. Pathol. 211, 11–123.
- TIAN X. C., XU J., YANG X., 2000. *Normal telomere lengths found in cloned cattle*. Nat. Genet. 26, 272–273.
- WAKAYAMA T., SHINKAI Y., TAMASHIRO K. L. K., NIIDA H., BLANCHARD D. C., BLANCHARD R. J., OGURA A., TANEMURA K., TACHIBANA M., PERRY A. C. F., COLGAN D. F., MOMBAERTS P., YANAGIMACHI R., 2000. *Aging: cloning mice to six generations*. Nature 407, 318–319.