Regulasi Siklus Sel: Kunci Sukses *Somatic Cell Nuclear Transfer*

Harry Murti[1,2], Arief Boediono[2], Boenjamin Setiawan[1], Ferry Sandra[1]
[1]Division of Stem Cell,Stem Cell and Cancer Institute,Jakarta 13210,Indonesia.
[2]Laboratory of Embryology,Faculty of Veterinary Medicine,Bogor Agricultural University,Bogor 16680,Indonesia.

ABSTRAK
Kebanyakan sel saat fase embrionik relatif berada pada kondisi membelah maupun persiapan untuk melakukan pembelahan. Serangkaian proses yang meliputi penggandaan materi genetik (DNA) serta komponen sel lainnya, pembelahan inti (karyokinesis), dan pembelahan sitoplasma (sitokinesis) disebut dengan siklus sel. Pemahaman terhadap regulasi siklus sel merupakan poin penting dalam manipulasi dan rekayasa sel oosit maupun embrio, khususnya pada SCNT. Prinsip transfer inti berkaitan erat dengan interaksi sitoplasma, *nuclear reprogramming*, dan efek siklus sel. Mayoritas proses dalam siklus sel dikendalikan oleh interaksi protein *cyclin-dependent kinases* (Cdks). MPF telah diidentifikasi sebagai kompleks cyclin dan Cdk. Aktivitas MPF relatif tinggi saat sel oosit berada pada metafase II. Aktivitas MPF yang tinggi saat dilakukan transfer inti dapat menyebabkan NEBD, PCC, dan reorganisasi sitoskleton. Mekanisme regulasi siklus sel serta efek siklus sel donor dan resipien akan dibahas dalam artikel ini.

Kata Kunci: Siklus Sel, Transfer Inti Sel Somatis, MPF, cyclin, Cdk
Korespondensi:
Harry Murti. Division of Stem Cell, Stem Cell and Cancer Institute. Jl. Ahmad Yani No.2 (Bintang Toedjoe), Pulomas, Jakarta 13210, Indonesia. hmurty@sci-indonesia.org

PENDAHULUAN

Siklus sel pada sel eukaryotik merupakan suatu tahapan kompleks meliputi penggandaan materi genetik, pengaturan waktu pembelahan sel, dan interaksi antara protein dan enzim[1]. Siklus sel pada sel eukaryotik dapat dibagi menjadi 4 tahap, yaitu: G_1 (*Gap* 1), S (Sintesis), G_2 (*Gap* 2), dan M (Mitosis)[1,2]. Tahap G1 merupakan selang antara tahapan M dengan S. Pada tahap ini sel terus tumbuh dan melakukan persiapan untuk sintesis DNA. Sel akan melakukan sintesis DNA dan terjadi proses replikasi kromosom pada saat berada di tahap S[3,4]. Pada tahap G_2, sel yang telah mereplikasi kromosom akan menduplikasi keseluruhan komponen seluler lainnya. Selain itu terjadi pula sintesis mRNA dan beberapa protein tertentu[4].

Secara umum tahap G_0, G_1, S, dan G_2 disebut juga sebagai tahap interfase[5]. Sedangkan pembelahan sel atau sering disebut dengan tahap mitosis, terdiri dari empat subtahapan, yaitu profase, metafase, anafase, dan telofase [6]. Pada kondisi tertentu, sel-sel yang tidak membelah, karena tidak berdiferensiasi, meninggalkan tahap G_1 dan pindah ke dalam tahap G_0. Sel-sel yang berada dalam tahap G_0 sering disebut sedang beristirahat/ diam (*quiescent*).

REGULASI SIKLUS SEL

Pada proses perkembangan sel dikenal beberapa tipe siklus sel yaitu siklus sel embrionik, siklus sel somatis, siklus endoreduplikasi, dan siklus sel miosis[7]. Masing-masing tipe siklus sel mempunyai komponen protein dan enzim yang berbeda dalam regulasi siklus sel. Dalam artikel ini hanya akan dibahas regulasi pada siklus sel embrionik dan sel somatis.

a. Protein,Enzim,dan *Inhibitor*

Enzim yang berperan secara dominan dalam regulasi siklus pembelahan sel adalah MPF (*Maturation/ Meiosis/ Mitosis-Promoting Factor*)[8], APC (*Anaphase-Promoting Complex*)[7] dan CSF (*Cytostatic Factor*)[9]. Masing-masing enzim mempunyai komponen protein dan *inhibitor* yang spesifik pada setiap tahap siklus pembelahan sel.

MPF merupakan suatu enzim heterodimer yang terdiri dari $p34^{cdc2}$ sebagai suatu subunit katalitik dan cyclins sebagai suatu subunit regulatorik. Cdk (*Cyclin dependent kinase*) adalah nama lain dari $p34^{cdc2}$; 34kDa. cdc2 merupakan gen siklus pembelahan sel yang mengkode enzim Cdk pada siklus sel mamalia[6,10,11]. Cdk merupakan protein kinase yang aktivitasnya diregulasi oleh keadaan terfosforilasi pada saat berikatan dengan *cyclin*. Selama siklus pembelahan sel, jumlah Cdk relatif sama, namun jumlah *cyclin* bervariasi pada tiap tahapan[12].

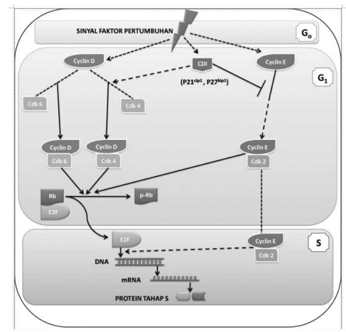
Pada keadaan *in vitro*, Cdk dapat memfosforilasi sejumlah protein yaitu *histone* H1, *nuclear lamins*, RNA *polymerase* II, p60src, antigen T, dan faktor elongasi[13]. Fosforilasi *histone* H_1 secara *in vitro* telah digunakan sebagai dasar dalam teknik biokimia pada penentuan dan pengukuran aktivitas enzim Cdk[14]. Pada keadaan *in vivo*, aktivasi Cdk akan memacu sel masuk ke dalam tahap M dan menyebabkan pecahnya membran inti (NEBD=*Nuclear Envelope Breakdown*)[15], kromosom mengalami kondensasi[16], penyusunan kembali sitoskeleton[17], dan duplikasi *centrosome*[18]. Aktivitas Cdk dikontrol oleh asosiasi dengan cyclin, sintesis dan proteolisis oleh Cdk sendiri, modifikasi posttranslasi, dan interaksi dengan sejumlah *inhibitor* kinase alami (CDI= *Cyclin-dependent kinase Inhibitor*). Faktor cekaman luar yang tinggi akan meningkatkan ekspresi CDI dan menyebabkan siklus sel terganggu/ terhenti[19]. Secara garis besar ada 2 golongan CDI, yaitu: golongan Ink4 (p15, p16, p18, p19) dan golongan Cip/ Kip ($p21^{cip1}$, $p27^{kip1}$, $p57^{kip2}$)[23].

APC merupakan suatu *multi-subunit* ubiquitin ligase yang berperan dalam regulasi transisi pada siklus sel. APC tersusun oleh protein yang berasosiasi salah satu atau kedua aktivatornya yaitu: Cdc20 dan Cdh1, untuk mengarahkan *polyubiquitylation* pada *securin, cyclin*, dan regulator siklus sel lain yang akan didegradasi oleh proteasome. Cdc20 merupakan substrat target pada awal mitosis, sedangkan Cdh1 merupakan substrat target pada akhir mitosis dan selama memasuki tahap G_1[9].

b. Mekanisme Regulasi

Pada umumnya sel-sel eukaryotik yang telah menyelesaikan pembelahan pada tahap M akan masuk ke dalam tahap G_1 untuk kembali melakukan pembelahan atau masuk ke dalam tahap G_0 untuk beristirahat/ diam[20]. Sel dapat keluar dari tahap G_1 dan masuk ke dalam tahap G_0, apabila berada dalam suatu kondisi tanpa faktor pertumbuhan. Sel-sel yang dikultur pada medium sedikit kadar serum tetap akan melakukan siklus sel G_1-S-G_2-M, namun setelah keluar dari tahap M akan langsung masuk ke tahap G_0. Penambahan serum atau faktor pertumbuhan akan menginduksi sel untuk masuk kembali ke siklus sel sampai ke titik restriksi untuk proses berikutnya[22]. Setelah melewati titik restriksi (protein Rb terfosforilasi), regulasi siklus sel tidak bergantung pada sinyal ekstraselular[21,23].

Sel yang berada di tahap G_0 yang distimulus dengan faktor pertumbuhan untuk masuk ke dalam G_1 , pada awalnya akan mengekspresikan *cyclin* D. Kemudian *cyclin* D akan berikatan dengan Cdk4 dan Cdk6. Kompleks Cdk-*cyclin* tersebut lalu masuk ke dalam inti dan akan memfosforilasi protein *Retinobla-stoma* (Rb), protein p107 dan p130. Fosforilasi terhadap Rb diikuti oleh aktivasi faktor transkripsi famili E2F dan memicu transkripsi protein yang diperlukan pada tahap G_1 dan S. Sinyal mitogenik yang menginduksi terbentuknya *cyclin* D, juga akan menginduksi terbentuknya *cyclin* E dan dua CDI yaitu: $p21^{cip1}$ dan $p27^{kip1}$.



Gambar 1. Mekanisme regulasi siklus sel pada tahap G_0,G_1, dan S. Pada tahap G_0 sinyal faktor pertumbuhan ekstra seluler akan menginduksi cyclin D, CDI, dan Cyclin E. Pada tahap G_1 serangkaian reaksi biokimia akan membuat Rb terfosforilasi sehingga faktor transkripsi E2F terlepas dan aktif menstimulasi sintesis protein tahap S.

Kedua CDI ini berikatan dengan *cyclin* D-Cdk4 tapi tidak menghambat aktivitas kinasenya dan hasil penelitian menunjukkan bahwa $p21^{cip1}$ dan $p27^{kip1}$ justru dibutuhkan untuk pembentukan dan impor *cyclin* D-Cdk4 oleh inti. Kedua CDI tersebut efektif menghambat aktivitas cyclin E-Cdk2. Dengan demikian keberadaan protein CDI di tahap G_1 adalah untuk memacu pembentukan kompleks aktif *cyclin* D-Cdk4 dan pada saat bersamaan menunda/ menghambat aktivasi dari kompleks cyclin E-Cdk2 [23].

Protein Rb merupakan penghambat transkripsi, karena keberadaannya menonaktifkan E2F yang berperan sebagai faktor transkripsi[7]. Setelah protein yang diperlukan dalam tahap S dihasilkan dari transkripsi, maka *cyclin* D-Cdk4, *cyclin* D-Cdk6, dan *cyclin* E-Cdk2 akan bersama-sama memfosforilasi protein Rb, p107 dan p130 menjadi tidak aktif sama sekali. Hal ini akan mengaktifkan secara penuh proses transkripsi pada tahap S [23]. Dengan demikian sel tersebut telah memasuki tahap S pada siklus sel. Pada sel mamalia jenis Cdk dan *cyclin* yang ditemukan pada masa transisi tahap G_1/S adalah Cdk2 (p33), Cdk4, Cdk6, serta *cyclin* A, D1, D2, D3, dan E[11].

Pada tahap S, kompleks *cyclin* E-Cdk2 berperan menginisiasi replikasi DNA. Selain itu *cyclin* A-Cdk2 juga berperan dalam menginisiasi replikasi DNA secara lengkap dan meningkatkan ekspresi histon dan beberapa gen/protein yang akan dibutuhkan saat replikasi[23].

Pada tahap G_2, terjadi peningkatan sintesis *cyclin* B yang akan mencapai tingkat konsentrasi maksimal pada saat tahap M [6]. Pada sel mamalia jenis Cdk dan *cyclin* yang ditemukan pada masa transisi tahap G_2/M adalah Cdk1 (Cdc2) serta *cyclin* A, B1, dan B2 [11]. Setelah tumbuh dan menduplikasi komponen sel, maka sel akan melakukan pembelahan menjadi dua sel anakan yang terjadi pada tahap M.

Pada tahap M (profase, metafase, anafase, dan telofase), defosforilasi dan aktivasi *cyclin* B-Cdk1 berpengaruh terhadap perubahan morfologi selama mitosis berlangsung. Substrat dari *cyclin* B-Cdk1 adalah *nuclear lamins*, protein *nucleolar*, protein *centrosomal*, dan Eg5. Pada subtahap profase – metafase, konsentrasi MPF berada pada level tertinggi dan akan mengalami penurunan pada sub tahap berikutnya.

Sebelum memasuki subtahap berikutnya (anafase), sel oosit yang telah mencapai metafase pada meiosis II (MII), akan tertahan pada kondisi tersebut karena pengaruh CSF. Komponen utama CSF adalah golongan Emi yaitu Emi1 (*Early Mitotic Inhibition 1*) dan Emi2 [9]. Apabila terjadi fertilisasi atau partenogenesis, masuknya sperma akan mengaktivasi Ca^{2+}/*calmo-dulin-dependent protein kinase* II (CaMKII) dalam sitoplasma. CaMKII akan memfosforilasi protein yang mengekspresikan CSF, sehingga ekspresi CSF terhambat. Selain itu CSF juga akan terdegradasi oleh sistem ubiquitin/ *proteosome*. CSF yang mengalami degradasi menyebabkan APC dapat berperan aktif, sehingga sel oosit keluar dari tahap metafase dan masuk ke dalam anafase[9].

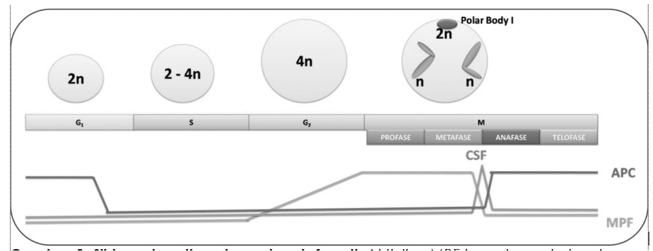
APC berperan sangat dominan pada tahap anafase. Salah satu peranan APC adalah menghancurkan *cyclin* A dan *cyclin* B yang mengaktifkan MPF, sehingga konsentrasi MPF akan turun drastis seiring selesainya tahap M [23].

3. Hubungan Siklus Sel dan SCNT

Aplikasi SNCT (*Somatic Cell Nuclear Transfer*) dalam bidang biomedis adalah sebagai salah satu teknik alternatif untuk memproduksi ntESC (*nuclear transfer Embryonic Stem Cell*)[24]. Transplantasi ntESC yang bersifat *autologous* diharapkan mampu mengatasi masalah penolakan sistem imun pada penderita[25]. Konsep *therapeutic cloning* ini dikembangkan untuk mengatasi berbagai jenis penyakit degeneratif[26]. Teknik SCNT pada dasarnya meliputi enukleasi (pengeluaran inti sel oosit resipien), transfer inti (inti sel somatis dimasukkan ke dalam sitoplasma sel oosit resipien), dan aktivasi (menginduksi sel oosit hasil rekontruksi untuk mengalami *nuclear reprogramming* dan berkembang seperti sel embrio yang normal)[13,27]. Keberhasilan *nuclear reprogramming* pada SCNT sangat dipengaruhi oleh sinkronisasi tahapan siklus sel antara sel somatis sebagai donor inti dan sel oosit sebagai resipien[28]. Hal ini menjadi faktor penting karena interaksi antara inti sel somatis dengan sitoplasma sel oosit merupakan kunci sukses pada awal perkembangan embrionik[29].

a. Siklus Sel Somatis Sebagai Donor Inti

Pada teknik transfer inti, salah satu faktor yang harus diperhatikan dari sel donor inti adalah jumlah kromosom[30]. Sel somatis pada tahap G_0/G_1 mempunyai kromosom diploid (2n), tahap G_2 mempunyai kromosom tetraploid (4n) karena telah mengalami replikasi DNA pada tahap S, maka tahap S mempunyai jumlah kromosom yang bervariasi antara diploid-tetraploid (2n-4n). Penelitian kloning pada mamalia menggunakan teknik SCNT menunjukkan keberhasilan ketika menggunakan inti donor sel somatis pada tahap G_0 [31,32,33,34,35], tahap G_1 [35,36,37], tahap G_2 [36,38], tahap M pada metafase [36,39,40,41].



Gambar 2. Siklus sel oosit pada saat metafase II.
Aktivitas MPF berada pada level tertinggi pada saat profase dan metafase. Sebagian besar sel oosit mamalia diovulasikan pada saat metafase II. Sel oosit matang mempunyai sepasang kromosom haploid dan sebuah *polar body* I yang diploid. Aktivitas CSF menyebabkan sel oosit dapat stabil berada pada kondisi ini. Setelah sel oosit difertilisasi (diaktifasi) maka CSF akan terdegradasi dan aktivitas APC menjadi meningkat serta aktivitas MPF menurun drastis.

b. Siklus Sel Oosit Sebagai Resipien

Perbedaan kandungan protein yang terekspresi pada tiap tahap siklus sel, menjadi faktor penentu untuk memprogram kembali inti sel donor[42]. Sel oosit yang telah mengalami ovulasi biasanya berada pada metafase meiosis II (MII). Pada tahap tersebut konsentrasi MPF (cyclin B-Cdk1) mencapai tingkatan maksimal[43]. Selain itu CSF juga memegang kendali regulasi siklus sel dengan mempertahankan kondisi stabil pada MII dan menghambat masuk ke tahap anafase[9]. Penggunaan sel oosit pada tahap MII sebagai resipien SCNT telah berhasil pada kloning mencit[31,32,34], babi[35], domba[33], ferret [37,39], dan kambing[44].

Konsentrasi MPF sitoplasma sel oosit pada tahap MII juga dipengaruhi oleh aktivasi[13]. Setelah sel oosit diaktivasi baik secara elektrik[37] maupun secara kimiawi dengan SrCl2 [47,48] maka konsentrasi MPF akan menurun secara drastis.

DISKUSI

a. Sinkronisasi Siklus Sel

Dalam satu siklus sel secara normal, materi genetik (DNA) hanya mengalami satu kali replikasi dan mitosis. Hingga saat ini belum diketahui secara jelas mekanisme yang mendasari hal tersebut[8]. Namun beberapa hasil penelitian, menunjukkan bahwa diduga membran inti mempunyai andil dalam terjadinya replikasi DNA[13]. Pada transfer inti dengan resipien pada tahap MII, konsentrasi MPF yang tinggi dapat menyebabkan inti donor mengalami NEBD dan PCC (*Premature Chromosome Condensation*)[45]. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua inti sel pada semua tahap siklus sel akan mengalami NEBD dan PCC bila ditansfer ke sitoplasma sel oosit yang konsentrasi MPFnya tinggi[13]. Namun bagaimana efek NEBD dan PCC terhadap proses *nuclear reprogramming* belum diketahui secara tuntas hingga saat ini[49].

Inti donor pada tahap G_0 dan G_1 yang masing-masing jumlah kromosomnya diploid (2n) bila ditransfer ke dalam sel oosit resipien pada MII akan terjadi PCC pada kromatid tunggal, lalu mengalami *Nuclear Reformation* (2n) dan akan terjadi replikasi DNA (menjadi 4n) kemudian akan membelah menjadi dua sel dengan masing-masing kromosom diploid[8].

Inti donor pada tahap G_2 yang jumlah kromosomnya tetraploid (4n) bila ditransfer ke dalam sel oosit resipien pada MII akan terjadi PCC pada kromatid ganda, lalu mengalami *Nuclear Reformation* (4n) dan akan terjadi replikasi DNA (menjadi 8n) kemudian akan membelah menjadi dua sel dengan masing-masing kromosom tetraploid (4n). Hal ini menunjukkan bahwa inti donor tahap G_2 tidak sinkron apabila ditransfer pada tahap MII sel oosit resipien[8].

Pada transfer inti ke dalam sel oosit dengan MPF rendah yang dapat diperoleh dengan aktivasi secara cepat, menunjukkan bahwa inti donor sel tahap G_0, G_1, dan S akan tetap mengalami replikasi DNA, sehingga sel anakan mempunyai kromosom diploid (2n). Sedangkan inti donor tahap G_2 tidak melakukan replikasi DNA, sehingga pada kromosom sel anakannya tetap 2n. Hal ini juga memperkuat dugaan bahwa faktor yang mempengaruhi replikasi DNA bukan sekedar karena membran inti yang pecah dan terjadi kondensasi prematur (PCC), tapi diduga juga disebabkan oleh kandungan DNA (kromosom) pada inti donor[8].

Ada beberapa cara untuk memperoleh kultur sel somatis pada tahap-tahap tertentu dalam siklus sel. Untuk memperoleh sel pada tahap G_0/G_1, dapat dilakukan dengan cara mengkultur sel dengan medium tanpa/rendah serum[31]. Sinkronisasi tahap G_2 dapat dilakukan dengan cara menambahkan cycloheximide pada medium kultur[13]. Sedangkan tahap M pada metafase dapat diperoleh dengan menambahkan demecolcine[39] atau nocodazole[41] (senyawa penghambat polimerisasi mikrotubuli) pada medium kultur.

b. Perkembangan Embrio Pasca Aplikasi SCNT

Keberhasilan perkembangan dan pertumbuhan embrio hasil SCNT cenderung menurun seiring dengan meningkatnya jumlah pembelahan sel[50,51]. Jumlah embrio yang berhasil bertahan dan hidup pada tahap embrio 2 sel relatif lebih banyak daripada tahapan berikutnya, yaitu 4 sel, 8 sel, morula, dan blastula[46]. Beberapa penelitian menggunakan parameter keberhasilan perkembangan kultur embrio hingga mencapai tahap blastosis sebagai salah satu tolok ukur keberhasilan SCNT dan *nuclear reprogramming*[52]. Sel embrio hasil SCNT yang berhasil mencapai tahap blastosis dapat digunakan untuk keperluan kloning reproduksi (diimplantasi ke hewan betina) dan produksi *embryonic stem cell* (ntESC) dimana ICM diisolasi dan dikultur dalam keadaan belum berdiferensiasi[24].

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ntESC mempunyai sifat pluripoten dan dapat berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel, seperti *dopaminergic & seronergic neuron* dan *germ cells*[53]. Namun ntESC masih berpotensi memiliki beberapa karakter yang berbeda dengan ESC alami (hasil fertilisasi). Hal ini diduga dipengaruhi oleh memori epigenetik yang tidak sepenuhnya dapat dihapus dalam proses nuclear reprogramming[54].

SIMPULAN

Jumlah kromosom dalam inti sel donor dan kandungan MPF dalam sitoplasma sel oosit menentukan terjadinya replikasi DNA. Sel oosit pada tahap MII merupakan resipien bagi inti sel donor yang dapat memfasilitasi terjadinya proses nuclear reprogramming. Aktivasi sel oosit dapat menurunkan konsentrasi MPF secara drastis. Inti sel donor pada berbagai tahap siklus sel mempunyai jumlah kromosom yang berbeda, sehingga perlu dilakukan sinkronisasi sebelum melakukan transfer inti. Sinkronisasi tahapan sel donor dapat dilakukan dengan mengkultur sel tanpa serum atau penambahan berbagai senyawa kimia pada medium kultur. Pemahaman tentang regulasi siklus sel oosit sebagai resipien dan sel somatis sebagai inti donor merupakan faktor penting dalam keberhasilan SCNT. Dengan demikian dapat diperoleh sumber ntESC yang berpotensi tinggi untuk therapeutic cloning.

DAFTAR PUSTAKA

1. Campbell MK, Farrell SO. Biochemistry. 4th ed. UK, London: Thomson Learning Inc., 2003; Hal 272-3.
2. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. Ann Rev Pharmacol Toxicol. 1999; 39: 295-312.
3. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Pharmacology. 5th ed. UK, London: Churchill Livingstone, 2003; Hal 69-73.
4. Doree M, Hunt T. From Cdc2 to Cdk1: When did the cell kinase joint its partner?. Cell Sci. 2002; 115: 2461-4.
5. Tyson JJ, Czikasz-Nagy A, Novak B. The dynamics of cell cycle regulation. BioEssays. 2002; 24: 1095-109.
6. Koolman J, Rohm KH. Atlas berwarna dan teks biokimia. Alih bahasa: Septelia Inawati. Jakarta: Penerbit Hipokrates, 2001; Hal 352-3.
7. Van den Heuvel S. Cell-cycle regulation. The C. elegans Research Community, WormBook, http://www.wormbook.org. 2005; doi/10.1895/wormbook.1.28.1.
8. Campbell KHS, Loi P, Otaegui PJ, Wilmut I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. Reprod Fert. 1996; 1: 40-6.
9. Schmidt A, Rauh NR, Nigg EA, Mayer TU. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. Cell Sci. 2006; 119: 1213-8.
10. Gilbert SF. Developmental Biology. 7th ed. Massachusetts, Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2003; Hal 222.
11. Gupta PK. Key regulators of cell cycle: 2001 nobel prize for physiology or medicine. Current Science. 2001; 81: 1280-87.

12. Sherr CJ, Robets JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependant kinases. Gene Dev. 2004; 18: 2699-711.
13. Campbell KHS, Ritchie WA, Wilmut I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid and development. Biol Reprod. 1993; 49: 933-42.
14. Loog M, Morgan DO. Cyclin specifity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. Nature. 2005; 434: 104-8.
15. Kawahara M, Wakai T, Yamanaka KI, et al. Caffeine promotes premature chromosome condensation formation and in vitro development in porcine reconstructed embryos via a high level of maturation promoting factor activity during nuclear transfer. Reprod. 2005; 130: 351-7.
16. El Achkar E, Gerbault-Seureau M, Muleris M, Dutrillaux B, Debatisse M. Premature condensation induces break at the interface of early and late replicating chromosome bands bearing common fragile sites. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102: 18069-74.
17. Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical review.Biochem. 1995; 308: 697-711.
18. Lacey KR, Jackson PK, Stearns T. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96: 2817-22.
19. Crews CM, Shotwell JB. Small-molecule inhibitors of the cell cycle: an overview. Progress in cell cycle research. 2003; 5: 125-33.
20. Qu Z, MacLellan WR, Weiss JN. Dynamics of the cell cycle: checkpoints, sizers, and timers. Biophysical. 2003; 85: 3600-11.
21. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. Science. 1989; 246: 629-34.
22. Jones SM, Kazlauskas A. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. Federation of European Biochemical Societies. 2001; 490: 110-6.
23. McGowan CH. Regulation of the eukaryotic cell cycle. Progress in Cell Cycle Research. 2003; 5: 1-4.
24. Gurdon JB, Colman, A. The future of cloning. Nature 1999; 402: 743-6.
25. Cibelli JB, Kiessling AA, Cunniff K, Richards C, Lanza RP, West MD. Somatic cell nuclear transfer in humans: pronuclear and early embryonic development. Regenerative Med. 2001; 2: 25-31.
26. Hipp J, Atala A. Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy. Exp Clin Assist Reprod. 2004; I:3.
27. McLaren A. Cloning: pathway to a pluripotent future. Science. 2000; 288: 1775-80.
28. Stice SL, Robl JM, Ponce de Leon FA, Jerry J, Golueke PG, Cibelli JB, Kane JJ. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. Theriogenology. 1998: 49: 129-38.
29. Colman A. Somatic cell nuclear transfer in mammals: progress and applications. Clon. 2000; 1: 185-200.
30. Kato Y, Tsunoda Y. Totipotency and pluripotency of embryonic nuclei in the mouse. Mol Reprod Dev. 1993; 36: 276-8.
31. Wakayama T, Yanagimachi R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. Mol Reprod Dev. 2001; 58: 376-83.
32. Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature. 1998; 394: 369-74.
33. McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. Nature 2000; 405: 1066-9.
34. Wakayama T, Yanagimachi R. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. Nature Gen. 1999; 22: 127-8.
35. Tomii R, Kurome M, Ochiai T, et al. Production of cloned pig by nuclear transfer of preadipocytes established from adult mature adipocytes. Cloning Stem Cell 2005; 7: 279-88.
36. Tian XC, Kubota C, Enright B, Yang X. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer-biological factors. Reprod Biol Endocr. 2003; I:98.
37. Li Z, Sabet MR, Zhou Q, et al. Developmental capacity of ferret embryos by nuclear transfer using G0/G1-phase fetal fibroblast. Biol Reprod. 2003; 68: 2297-303.
38. Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, et al. Somatic cell nuclear transfer. Nature 2002; 419: 583-6.
39. Li Z, Chen X, Sun X, et al. Nuclear transfer of M-phase ferret fibroblasts synchronized with the microtubule inhibitor demecolcine. Experimental Zoology. 2005; 303: 1126-34.
40. Wakayama T, Rodriguez I, Perry ACF, Yanagimachi R, Mombaerts P. Mice cloned from embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96: 14984-89.
41. Ono Y, Scimozawa N, Muguruma K, et al. Production of cloned mice from embryonic stem cells arrested at metaphase. Reprod. 2001; 122: 731-6.
42. Dinnyes A, Szmolenszky A. Animal cloning by nuclear transfer: state-of-the-art and future perspectives. Acta Biochimica Polonica. 2005; 52: 585-8.
43. Mohamed Nour MS, Ikeda K, Takahashi Y. Bovine nuclear transfer using cumulus cells derived from serum-starved and confluent cultures. Reprod Dev. 2000; 46: 85-92.
44. Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. Nature Biotech. 1999; 17: 456-61.
45. Wakayama T, Yanagimachi R. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. Reprod. 2001; 122: 49-60.
46. Bing Y, Che L, Hirao Y, Takenouchi N, Nagai T. Development of porcine embryos reconstructed by nuclear transfer of culutured cumulus cells into in vitro maturated and enucleated oocytes. Reprod Dev. 2000; 46: 375-9.
47. Kato M, Hirabayashi M, Aoto T, Ito K, Ueda M, Hochi S. Strontium-induced activation regimen for rat oocytes in somatic cell nuclear transplantation. Reprod Dev. 2001; 47: 407-13.
48. Tomashov-Matar R, Tchetchik D, Eldar A, Kaplan-Kraicer R, Oron Y, Shalgi R. Strontium-induced rat egg activation. Reprod. 2005; 130: 467-74.
49. Sung LY, Shen P, Jeong BS, et al. Premature chromosome condensation is not essential for nuclear reprogramming in bovine somatic nuclear transfer. Biol Reprod. 2006; DOI:10.1095/biolreprod.106.053561.
50. McEvoy TG, Robinson JJ, Sinclair KD. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. Reprod. 2001; 122: 507-18.
51. Liu SZ, Yao LJ, Jiang MX, et al. Apoptosis in rabbit embryos produced by fertilization or nuclear transfer with fibroblast and cumulus cells. Reprod. 2005; 130: 359-66.
52. Ng SC, Chen N, Yip WY, et al. The first cell cycle after transfer of somatic cell nuclei in a non-human primate. Dev. 2004; 131: 2475-84.
53. Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry ACF, Studer L, Mombaerts P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. Science. 2001; 292: 740-3.
54. Ng RK, Gurdon JB. Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:1957-62.