



NÜKLEAR TRANSFERLERDE FÜZYON PARAMETRELERİNİN İNEK BLASTOSİST GELİŞİM ORANLARINA ETKİLERİ

Doç. Dr. SEZEN ARAT

ARZU TAŞ

TÜBİTAK MAM-GMBE

TRANSGEN ve DENEY HAYVANLARI

LABORATUARI

GİRİŞ

KLONLAMA: Eşeysiz Üreme

- **Fertilizasyon olmadan genetik olarak birbirinin aynı birden fazla bireyin üretilmesidir.**
- **TEK YUMURTA İKİZLERİ (DOĞAL KLONLAR)**
- **EMBİYOLARIN BÖLÜNMESİ veya BLASTOMERLERİN AYRILMASI**
- **NÜKLEER TRANSFER (ÇEKİRDEK TRANSFERİ)**

KLONLAMANIN UYGULAMA ALANLARI

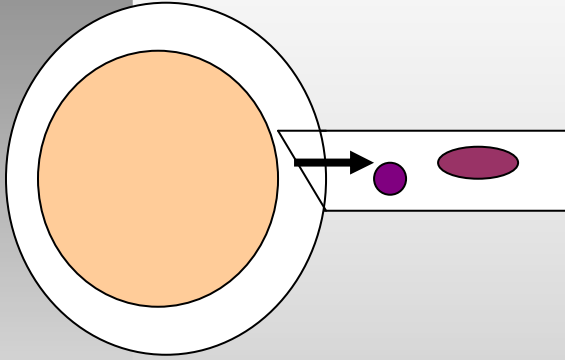
- Hayvancılık
 - Yüksek genetik yapının klonlanması
 - Hastalıklara dirençli hayvanların klonlanması
 - Genetik olarak değiştirilmiş hayvanların klonlanması (tg)
- Biofarming (tg)
- Hastalık modelleri (tg)
- Organ kaynakları (tg)
- Nesli tükenmekte olan hayvanlar (interspecies NT)
- Terapötik klonlama

KLONLAMADA NUKLEUS KAYNAKLARI

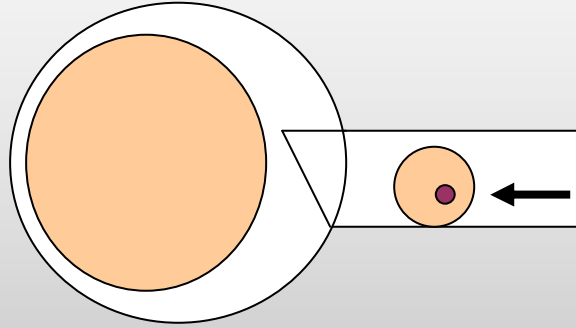
- **EMBRYONİK HÜCRELER**
- **VÜCUT HÜCRELERİ (Fetal ve erişkin vücut hücreleri)**

EMBRYONİK HÜCRELER

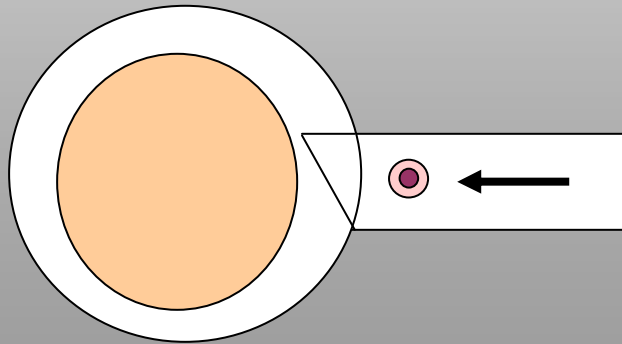
ENÜKLASYON



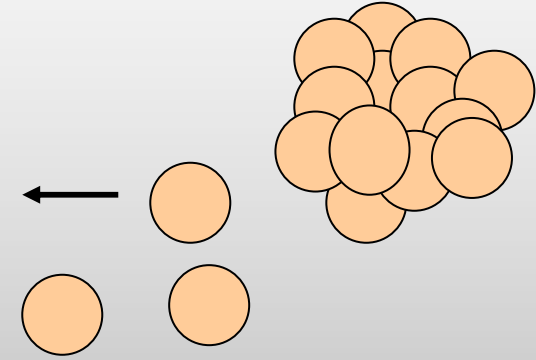
BLASTOMER
TRANSFERİ



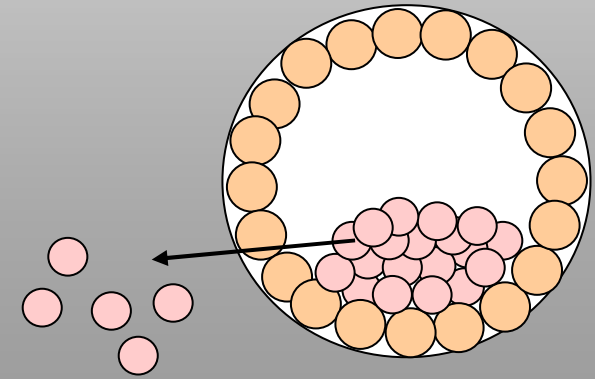
EKH
TRANSFERİ



MORULA



BLASTOSİST

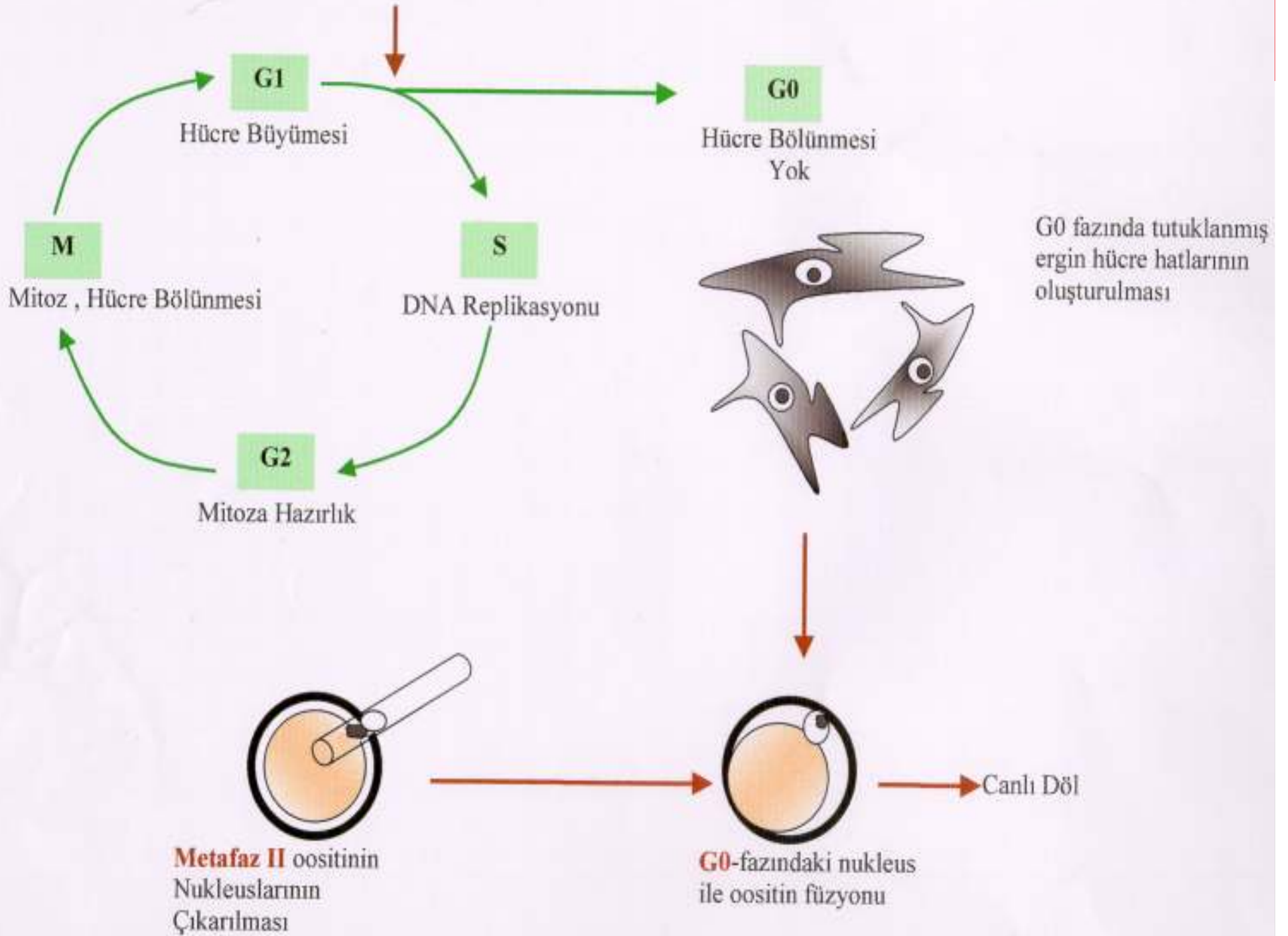


NUKLEUS KAYNAĞI OLARAK SOMATİK HÜCRELER

- **OOSİT (MII)**
- **G1-G0 DE TUTULAN VERİCİ HÜCRELER**
 - doğal olarak (örneğin kumulus hücreleri)
 - düşük serum konsantrasyonu
 - hücre siklusu inhibitörünü (roscovitine)
 - Kontak inhibisyon

OOSİT ASPIRAYONU

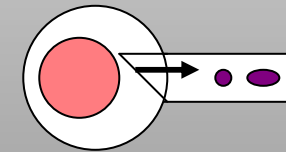




ALICI SİTOPLAZMANIN HAZIRLANMASI

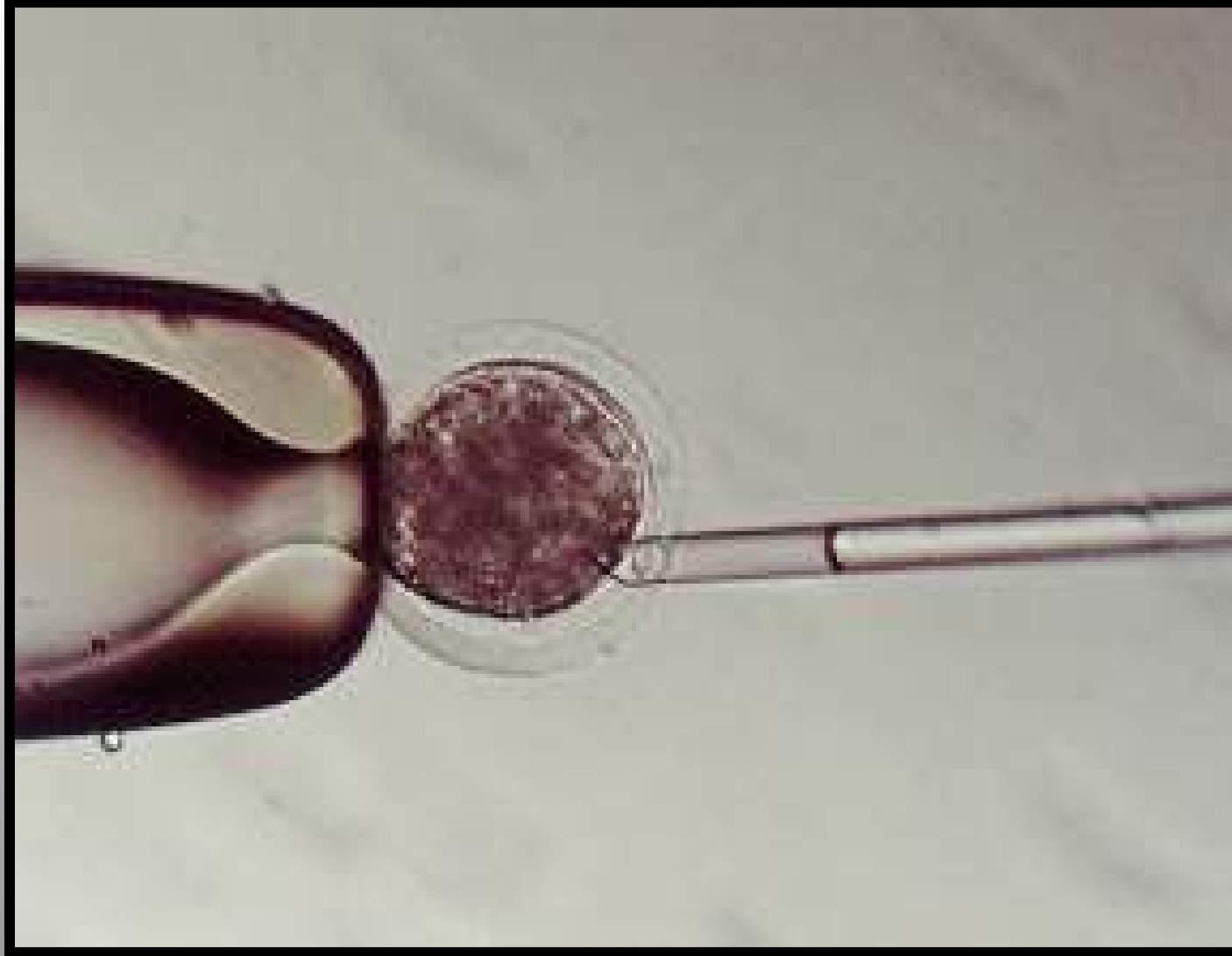


16-18 saat kültür

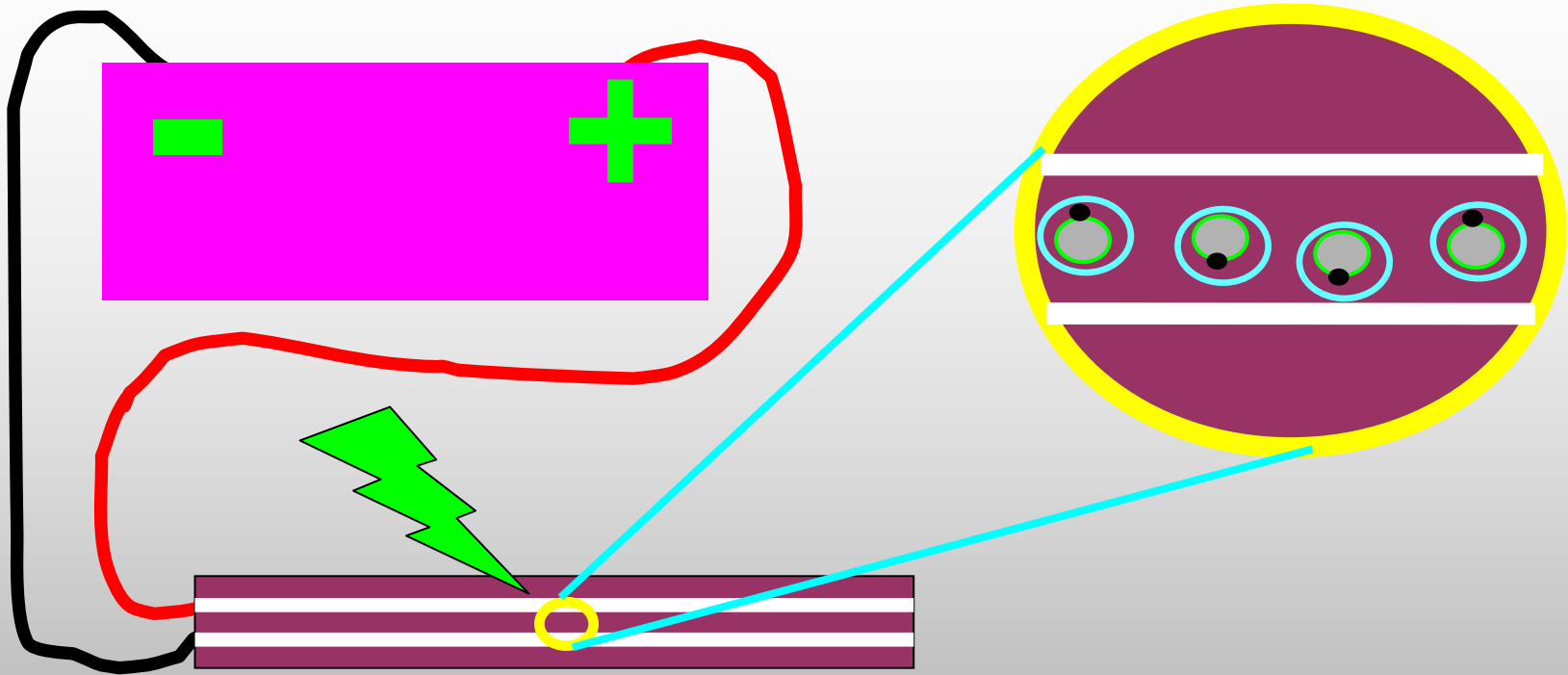


Oositin
enüklasyonu

VERİCİ HÜCRENİN TRANSFERİ



ELEKTRO-FÜZYON



ELEKTRO-FÜZYON



KLONLAMANIN BASAMAKLARI

- Oositin olgunlaştırılması
- Oositin enüklasyonu
- Hücrenin oosite transferi
- Sitoplazma ve hücrenin kaynaşması
- Aktivasyon
- In Vitro Kültür

OOSİTİN AKTİVASYONU

Memelilerde oosit, ovulasyondan sonra MII fazında tutuklu kalır.

Bu dönemdeki oositte yüksek oranda bulunan MPF (maturation promoting factor), oositin MII'de tutuklanmasında önemli bir faktördür.

Spermin oosit içerisine girmesi ile stoplazmik serbest Ca miktarı artar ve bu artışta MPF'in düzenleyici etkisi olduğu düşünülmektedir.

Ca artışı MPF aktivitesini düşürür ve oosit üzerindeki blok kalkarak aktivasyon başlar. Mayoz tamamlanır ikinci polar cisimcik atılır, nükleuslar birleşir, DNA replikasyonu oluşur ve bölünme ile devam eder.

KLON EMBRİYO ÜRETİMİNDE OOSİT AKTİVASYONU

Klon embriyo üretiminde oositin aktivasyonu önemli basamaklardan biridir.

Transfer edilen hücrenin oosit ile kaynaşmasından sonra normalde fertilizasyon sırasında kendiliğinden oluşan aktivasyon mekanizması çeşitli uyarıcılar ile başlatılır.

Bunlardan ilki yabancı nükleusu taşıyan oositin Ca'a maruz bırakılması ve bunun ardından ikinci polar cisimciğin atılımının önlenmesi

Arkasından yabancı nükleusun oosit stoplazması içinde hazırlığını tamamlayabilmesi için bir müddet DNA replikasyonunun önlenmesi amacıyla protein sentezi inhibitörü uygulanması

FÜZYONUN AKTİVASYONDA ETKİSİ

Yapılan partenogenetik aktivasyon çalışmaları, kimyasal aktivasyonun tek başına uygulandığında etkisinin az olduğunu göstermiştir.

Kimyasal aktivasyon öncesi uygulanan elektrik akımının partenogenetik aktivasyonu daha kuvvetli uyardığı ve blastosist oranının arttığı görülmüştür.

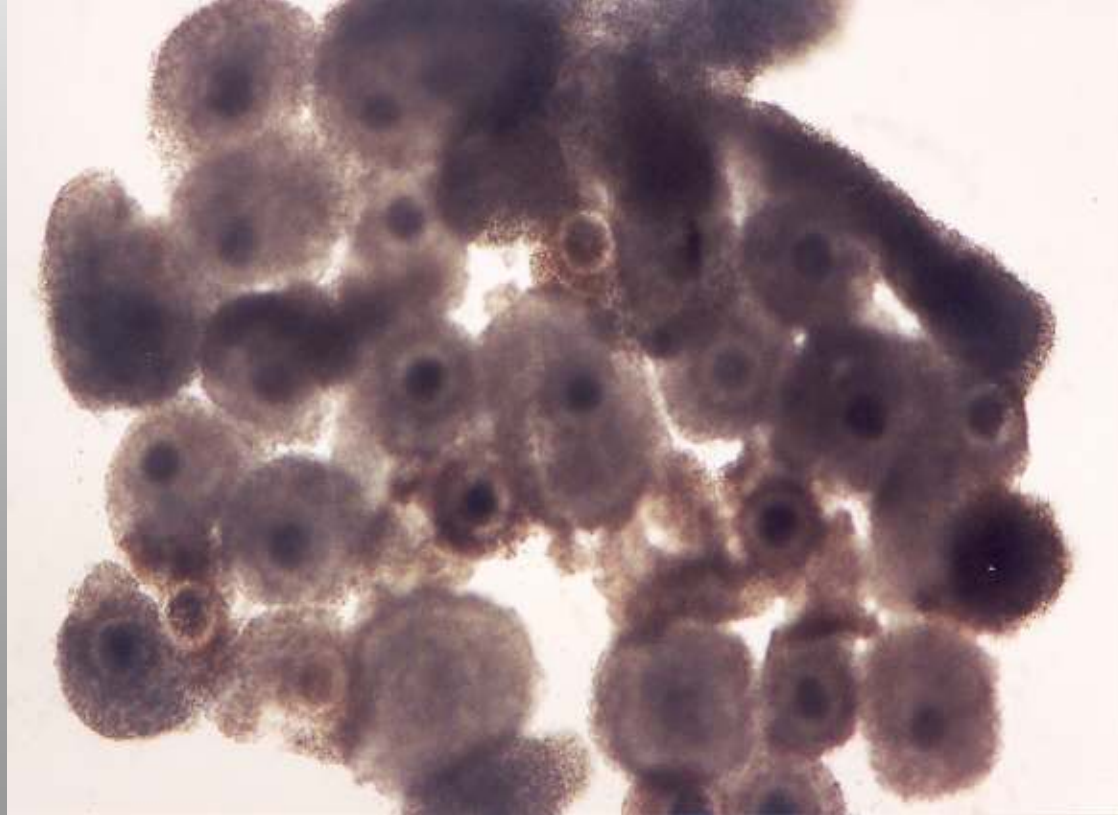
Bu nedenle klonlama çalışması sırasında uygulanan füzyon basamağının aktivasyonun başlangıcı olduğu düşünülmektedir.

ÇALIŞMANIN AMACI

Transfer edilen hücre ile oositin kaynaşmasını sağlayan füzyon işlemi sırasında uygulanan elektrik akımının somatik hücre nükleusunun geri programlanmasındaki etkisini araştırmaktır.

KÜLTÜRDEKİ KUMULUS-OOSİT KOMPLEKSLERİ

Kumulus-oosit kompleksleri 10%FCS, sodyum piruvat, EGF, bLH, bFSH ve penisilin/streptomisin içeren TCM199 medyumunda ve 39°C %5 CO₂'li inkübatörde 18 saat tutularak olgunlaştırılmıştır. Olgun yumurtalar(MII) kumulus hücrelerinden temizlendikten sonra metafaz pleitleri enüklasyon ile alınmıştır.

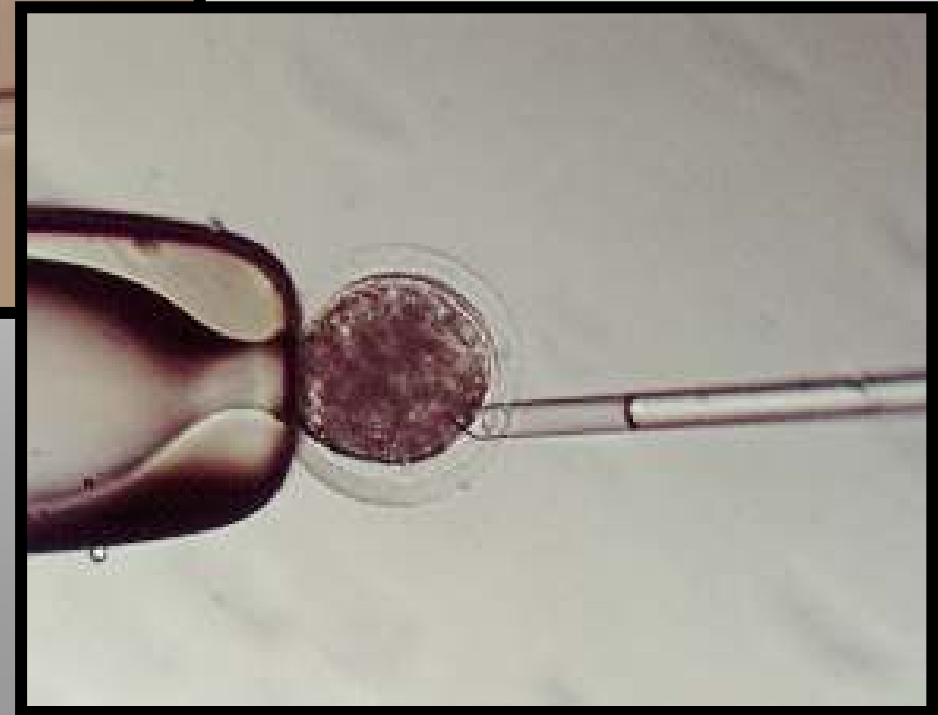
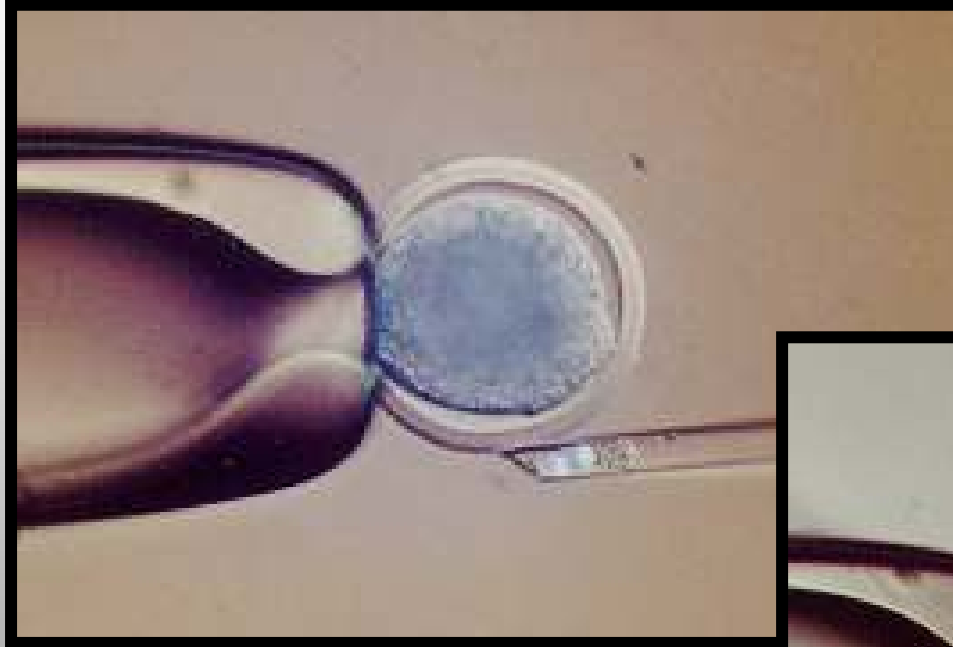


SOMATİK HÜCRE KAYNAĞI



Bu çalışmada Yerli Kara sığır ırkından elde edilen kıkırdak hücreleri nükleus kaynağı hücre olarak kullanılmıştır.

ENÜKLEASYON VE HÜCRE TRANSFERİ

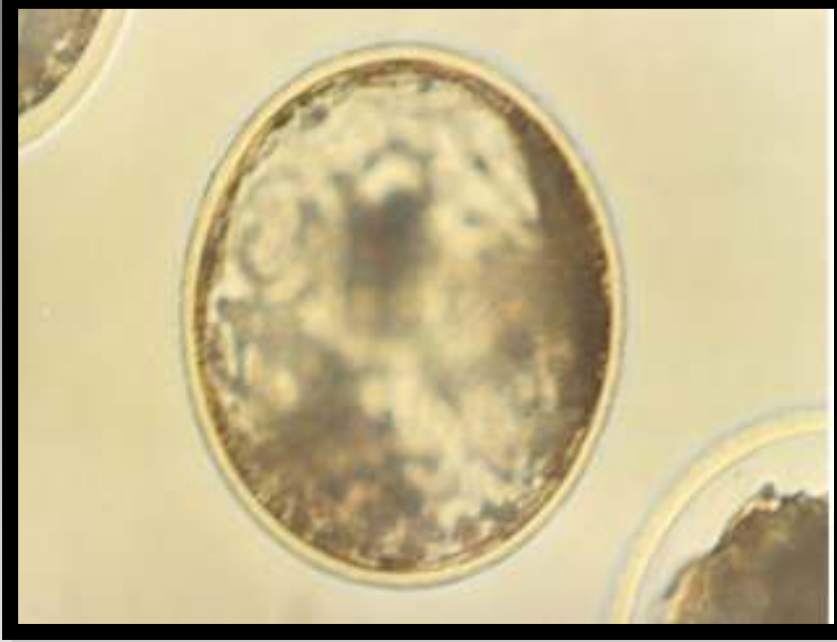


FÜZYON PARAMETRELERİ

- NT sonrası yumurtalara iki ayrı füzyon parametresi uygulanmıştır. Birinci füzyonu takiben füzyon olmayan yumurtalar ikinci füzyona tabi tutulmuşlardır.
- Birinci füzyonda;
 - 133V/500 μ m25 μ s1 atış(Grup1)
 - 133V/500 μ m30 μ s1 atış(Grup2)
- İkinci füzyonda;
 - 60V/500 μ m25 μ s 2 atış(Grup3)
 - 70V/500 μ m40 μ s1 atış(Grup4)

- Füzyon sonrası gruplar kimyasal aktivasyona alınmıştır.
- Cal(5 μ M)5dakika,CD(2.5 μ g/ml)+cycloheximide(CHX,10 μ g/ml) 1 saat ve CHX'de 4 saat aktive edilmiştir. Aktivasyon sonrası SAGE medyumunda 7gün boyunca kültüre edilmişlerdir.
- Füzyon oranları ve kültür sonrasında elde edilen blastosist oranları karşılaştırılmıştır.

NT SONRASI OLUŞAN BLASTOSİST



SONUÇ

Birinci Füzyon Parametreleri						
GRUPLAR	Parametreleri	Toplam Oosit Sayısı	Füzyon Olanların Sayısı ve %	Ölü Sayısı ve %	Füzyon Olmayanların Sayısı ve %	Blastosist Oranı %
NT	133 V, 25 μ sec	39	39/20 %51,28	14 %35,89	5 %12,82	20/3%15,0
NT	133 V, 30 μ sec	64	64/46 %71,87	12 %18,75	7 %10,93	36/7%19,4

İkinci Füzyon Parametreleri						
GRUPLAR	Parametreleri	Toplam Oosit Sayısı	Füzyon Olanların Sayısı ve %	Ölü Sayısı ve %	Füzyon Olmayanların Sayısı ve %	Blastosist Oranı %
NT	60V, 25 μ sec, 2 tekrar	29	29/8 %27,58	2 %6,89	19 %65,51	18/2%5,5
NT	70V, 40 μ sec, 1 tekrar	200	200/83 %41,5	76 %38	49 %24,5	83/7%8,43

SONUÇ

- Sonuçlar incelendiğinde, NT'de füzyon parametresi olarak 133V/500µm 30 µs 1 atış değerinin füzyon oranını artırdığını ve embriyo gelişimi üzerinde olumlu etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir.
- Ancak birinci füzyon ve ikinci füzyon sonrası blastosist gelişimine bakıldığında ikinci füzyondan sonra blastosist oranının ciddi oranda düştüğü görülmektedir.
- Bu durumun iki kez uygulanan elektrik akımının yumurtalar üzerinde yarattığı olumsuz etkiden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

TEŐEKKÜRLER

