

SOMATİK HÜCRE NUKLEUS AKTARIMI-II: UYGULAMA ALANLARI

SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER-II: APPLICATION AREAS

Nurullah KEKLİKOĞLU¹

ÖZET

Somatik hücre nukleus aktarımı yöntemiyle yapılan klonlama çalışmalarından üreme amaçlı klonlama üstün verim alınan çiftlik hayvanlarının üretimi ve araştırmalarında, transgenik canlıların üretimi, transgenik çiftlik hayvanlarının üretimi ve soyu tükenmekte olan türlerin korunmasında kullanılmaktadır. Tedavi amaçlı klonlama çalışmaları ise daha çok kişiye özgü pluripotent kök hücre elde etmeyi ve bunu hücre replasmanı tedavisinde kullanmayı amaçlar. İnsanlarda transplantasyon için organ üretilmesi, gelişim ve hastalıkta genetik ve epigenetik değişiklikler, gen ekspresyon ve işlevlerinin temel araştırmaları ve fonksiyonel erkek veya dişi gamet üretilmesi klonlamanın ileriye dönük hedefleri arasındadır. Transgenik klonlar üretilerek çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilir bazı maddeleri elde etmek de amaçlanmaktadır. Klonlama yöntemiyle soyu tükenmiş ancak genetik yapılarına ulaşılması mümkün olan canlıların embriyoları oluşturulabilecek ve somatik hücre nukleus aktarımı yöntemiyle memelilerde bir soyun gelişimi izlenebilecektir. Klonlama çalışmalarının tedavi ve araştırma sürecinde sayılamayacak kadar çok yararları vardır. Ancak bu teknoloji beraberinde bazı riskler de taşır.

Anahtar Kelimeler: Somatik hücre nukleus aktarımı, Klonlama, Kök hücre, Transgenikler, Genetik.

ABSTRACT

Reproductive cloning as one of the cloning studies performed by somatic cell nuclear transfer (SCNT) method, is used in production of transgenics and transgenic livestock. It is also used in protection of species which are about to extinct. Therapeutic cloning studies is rather performed to obtain patient-specific pluripotent stem cells and it aims to use these cells in cell-replacement therapy. Organ generation in human for transplantation, genetic and epigenetic alterations during development or disease, basic research about gene expression and functions, functional male or female gamet production are some of the future goals of cloning. Producing transgenic clones, substances which can be used in treatments of various diseases is also aimed. Through cloning method, embryos of species which are extinct but their genetic structure is somehow available for us to reach, can be produced and using SCNT method development of mammal species can be observed. There are countless advantages of cloning studies, during treatment and research processes, however, this technology comes with some risks.

Key Words: Somatic cell nuclear transfer, Cloning, Stem cell, Transgenics, Genetic.

¹ İstanbul Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji BD.

Somatik hücre nükleus aktarımı (somatic cell nuclear transfer, SCNT) yöntemiyle yapılan klonlama çalışmalarından üreme amaçlı klonlama (reproductive cloning) çoğunlukla üstün verim alınan çiftlik hayvanlarının üretimi ve araştırmalarına, transgenik canlıların ve transgenik çiftlik hayvanlarının üretimine ve soyu tükenmekte olan türlerin korunmasına yöneliktir (1). Tedavi amaçlı klonlama (therapeutic cloning) çalışmaları ise genellikle kişiye özgü pluripotent kök hücre elde etmeyi ve bunu hücre replasmanı tedavisinde kullanmayı amaçlar (1, 2). Klonlama yönteminde nükleus donörü olarak kullanılan kültüre edilmiş hücrelerde gen hedefleme sürecinin (gene targeting procedures) geliştirilmesi sonucu, insanlarda transplantasyon için organ üretilmesi, insan genetik hastalıklarının araştırılması ve gen ekspresyon ve işlevlerinin temel araştırmalarında uygulanabilecektir (3). Transgenik klonlar üretilerek çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek bazı maddeleri elde etmek de mümkün olabilecektir. Klonlama yöntemiyle soyu tükenmiş ancak genetik yapılarına ulaşılması mümkün olan canlıların embriyolarını oluşturmak da tartışılan konular arasındadır.

Nükleus aktarımı yöntemiyle klonlama günümüzde gelişim ve hastalıkta genetik ve epigenetik değişikliklerin rolünü araştırmakta kullanılmaktadır (4). Son yıllarda moleküler sitogenetik tekniklerin geliştirilmesi ve bunların çoğunun rutin uygulamalara girmesiyle yalnız genetik bozuklukların tanı ve tedavisinde değil genetik yapı araştırmaları, mayotik ve mitotik kromozomların klonlama açısından özelliklerinin aydınlatılması ve transgeniklerin üretilmesi konularında klonlama teknolojisi ile birlikte çalışılması sonucu çok geniş ve yararlı bir alan açılmıştır.

Moleküler sitogenetik teknikler; ardışık ve çok renkli işaretleme şansı sağlayan Floresan in situ hibridizasyon (fluorescent in situ hybridization, FISH), Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (comparative genomic Hybridization, CGH), spektral karyotipleme (spectral karyotyping) ve PRINS (primed in situ labelling) gibi teknikler ve peptid nükleik asit teknikleri (peptide nucleic acid techniques, PNA) gibi alternatif yöntemlerdir (5). FISH yöntemiyle kromozom segmentlerini veya kromozomun tümünü görünür hale getirmek mümkündür (6). FISH yöntemi kullanılarak sentromerik (veya lokus-spesifik, gen-spesifik) DNA problemlerine ve tüm kromozoma işaretleme

uygulandığında kromozomların ve serbest kromatidlerin tam bir in-situ tanısı mümkündür (7).

İnsan klonlama çalışmaları etik olarak kabul görmemektedir. Ancak somatik hücre nükleus aktarımı, üreme tedavisi sürecinde uygulanabilir bir teknoloji olarak görülebilir. Buradaki sorunun temeli 46 kromozoma sahip bir somatik hücreden 23 kromozomlu (ki bunu normalde mayoz bölünme sağlar) cins hücresi elde etmektir. Bunun için önce moleküler sitogenetik tekniklerin yardımıyla mayoz süreci tüm ayrıntılarıyla aydınlatılmalıdır. Seks kromozomlarını Multi-PRINS, multi-FISH ve CGH gibi tekniklerle inceleme yöntemleri (8, 9) mayotik kromozomların yapısı (10), bu yapıların oluşmasında gerekli genler ve proteinler (11, 12) ve mayoz bölünmeye nasıl müdahale edilebileceği konuları (13) bütün detaylarıyla araştırılmaktadır. DNA/tubulin boyasıyla nükleusun mayotik maturasyonu konfokal mikroskop ile incelenebilmektedir (14). Sentromerler ve telomerler mitotik ve mayotik kromozomların anahtar yapılarıdır ve özellikle telomerler mayozda yapısal özellikler geliştirirler. Mayotik kromozom özdeklerinin ve telomer proteinlerinin immunofloresans ile farklı işaretlenmesi mayotik kromozomların yapısı hakkında detaylı bilgiler sağlamaktadır (15). Cins hücrelerinden kaynaklanan doğumsal hastalıkların temelinde ayrışmama gibi hücre bölünmesindeki bozukluklar önemli yer tutar. Moleküler sitogenetik yaklaşımlar mayoz bölünmede kromozom çiftlerinin ayrılmasındaki bozuklukların mekanizması ile ilgili ek bilgiler sağlamıştır (5).

Nükleus aktarımı (nuclear transfer) ve haploidizasyon yöntemleri birlikte kullanılarak fonksiyonel erkek veya dişi gamet üretilebilir. Haploidizasyon, diploid kromozom yapısına sahip bir hücreden, kromozomlarını eksilterek haploid yapıda bir hücre elde etmek sürecidir. Bu yöntem geleneksel yapay döllenme (In vitro fertilization, IVF) yaklaşımlarının gametlerin yokluğu veya canlı olmaması nedeniyle yetersiz kaldığı durumlarda fonksiyonel erkek veya dişi yapay gametler oluşturulması için kullanılabilir (16). Geliştirilen bir kültür sistemiyle omurgalılarda kültüre edilmiş erkek germ hücrelerinin, fonksiyonel sperm oluşuncaya kadar mitoz ve mayoz süreçlerini tamamlayabildikleri gösterilmiştir (17). Ancak primordial germ hücrelerinden ovum veya sperm oluşumunun genetik yapılarına bağlı olduğu bildirilmiştir (18). Spesifik kültür şartları kullanılarak somatik hücre nükleus aktarımı

yöntemiyle elde edilecek embriyo kaynaklı kök hücrelerden sperm hücreleri ve oositler elde edilebilmesi, öncelikle mitotik-mayotik hücre bölünmesi, genetik-epigenetik düzenlemeler ve hücrenin yeniden yapılanması ile ilgili sorunların giderilmesi ile mümkün olabilecektir (16).

Gelecekte genlerin yapı ve işlevleri aydınlatıldıkça klonlama teknolojisinin vazgeçilemez bir tedavi yöntemi olacağı açıktır. Geliştirilen yöntemler ve aygıtlar genetik yapının pek çok detayının anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. İmmunoelektron mikroskobu (IEM) yöntemi kullanılarak kromozomlar ve nukleolustaki kromatinler araştırılmaktadır (19, 20). Hücre nukleusunun üç boyutlu (three-dimensional, 3D) kromatin ince yapısı ve fonksiyonunun topolojik analizi yüksek çözünürlüklü konfokal lazer tarayıcı mikroskop (confocal laser scanning microscopy, CLSM) gibi bir mikroskopla yapılabilmekte iken CLSM'deki eksikliklerin de üstesinden gelmek için spectral precision distance mikroskobu (SPDM) geliştirilmiştir. SPDM çekirdek topolojisini ve kromatin yapısını üç boyutlu olarak analiz etmeyi sağlar. Böylece genlerin lokalizasyonunu daha doğru olarak tanımlamak mümkün olur (19). Genetik materyalin yapısının ayrıntıları anlaşıldıkça, genetik takip ve müdahale şansı da artmaktadır. Biyoteknolojik uygulamalar aynı zamanda genlerin işlevsel süreçlerini de aydınlatmaktadır. Örneğin; maternal kromatin ilk yarıklanmanın anafaz veya telofazında bloke edilmiş bir zigota yerleştirilmiş ve bu yöntemin memeli embriyolarında maternal genoma özgün değişikliklerin çalışılması için faydalı bir yaklaşım sağlayabileceği ileri sürülmüştür (21).

Somatik hücre nukleus aktarımı yöntemiyle memelilerde bir soyun gelişiminin izlenmesi mümkün olduğundan hücrelerde farklılaşma ile ilgili araştırmalara, özellikle soyun gelişimi esnasında hücrenin yapı veya işlevindeki özelliklerin kaybolması (dediferansiasyon) veya hücrelerin birbirine dönüşmesi (transdiferansiasyon) ve bu değişikliklerin kontrolü üzerindeki sorunlar üzerine araştırma fırsatı doğmuştur (1).

Rekombinant DNA teknolojisiyle yabancı bir genin yerleştirildiği veya genetik yapısı değiştirilen canlılar olan transgenikler, hastalıkların araştırılmasında yeni bir ufuk açmışlardır. Bunlar deneysel olarak bazı hastalıkların oluşturulduğu canlılar olabildiği gibi kendilerinden bazı tedavi edici madde, serum veya genlerin elde edilebileceği canlılar haline getirilebilmesi için de çalışmalar hızla sürmektedir. Ayrıca çiftlik hayvanlarının

verimliliğini artırmak için de transgenik hayvan soyları geliştirme çalışmaları sürmektedir. Klonlama yöntemiyle çok sayıda üretilebilecek bu tür canlılara örnek olarak bir H-transferase transgenik erkek domuzdan türetilmiş, kültürde çoğaltılan deri fibroblastları ile nukleusu çıkarılmış oositlerin füzyonu sonucu iki sağlıklı yavru domuz klonlanmıştır (22). Böylece somatik hücre nukleus aktarımı yöntemiyle transgenik çiftlik hayvanlarının da üretimi sağlanmıştır. Transgeniklerin ve omurgalıları klonlamanın türleri korumada bir rolü olabileceği iddia edilmiştir (23).

Tedavi amaçlı klonlamada asıl amaç hastaya özgü pluripotent kök hücreler elde etmektir. Kök hücreler, hemen her tip hücreye farklılaşabilen totipotent, birçok hücreye farklılaşabilen pluripotent ve bir tek hücreye farklılaşabilen unipotent kök hücreler olmak üzere üç grupta incelenirler. Kök hücre veya progenitör hücreler kültür ortamında aktif olarak çoğaltılabilmektedir (24). İnsan ve sıçan embriyolarının erken aşamalarında iç hücre kitlesindeki pluripotent embriyonik kök hücreler kültürde aşırı kendini yenileme (self-renewal) gösterirler ve bütün hücre türlerine farklılaşma yeteneklerini korurlar. Bu özellikleri embriyonik kök hücreleri hücre replasman tedavisi için uygun bir aday yapar (2). Araştırmacıların pluripotent kök hücreleri nöronlar ve kas hücreleri gibi spesifik hücre tiplerine farklılaşmasını sağlamak için canlılığını en çok koruyan kök hücre pasajını bulmaya ihtiyaçları vardır. Yeni hücre pasajı oluşturmak için preimplantasyon aşamasında blastosistin parçalanıp hücrelerinin alınması gereklidir (25). Fakat bu uygulama etik tartışmalar doğurur. Erişkin kök hücrelerin başlangıçta zannedildiğinden daha geniş bir potansiyele sahip oldukları anlaşıldığı için erişkin dokulardan elde edilen kök hücreleri pluripotent hale getirmenin bir yolunu bulmak daha kolay kabul edilebilecek bir seçenektir (2).

Hücre füzyonu ile elde edilebilecek pluripotent kök hücre araştırmaları için ideal sayılabilecek kaynak erişkin mezenkimal kök ve progenitor hücrelerdir. Erişkin kemik iliğinde bulunan ve multipotent hücreler olduğuna inanılan insan mezenkimal kök hücreleri farklılaşmamış hücreler olarak çoğaltılabilirler ve bunlar kemik, kıkırdak, yağ, tendon, kas, ve kemik iliği stroması da dahil olmak üzere bir dizi mezenkimal dokuya farklılaşabilirler (26). Mezoderme progenitör hücrelerin klinik olarak uygulanabilir koşullar altında belirgin bir yaşlılık olmaksızın proliferere

olması ve sadece mezenkimal hücrelere değil, aynı zamanda viseral mezoderme farklılaşma yetenekleri bu hücrelerin mesoderm kökenli hücreleri etkileyen genetik veya dejeneratif bozuklukların tedavisi için ideal bir kök hücre kaynağı olabileceğini göstermiştir (27).

Klonlama çalışmalarının tedavi ve araştırma sürecinde sayılamayacak kadar çok yararları olabilecektir. Ancak bu teknoloji beraberinde bazı riskleri de getirecektir. Bu riskler özellikle transgenik klonlar açısından endişe verici boyutlara ulaşabilir. Transgenikler doğal popülasyona uyum sağlayamayıp yok olabilirler ve çaprazlaşmalar sonucu eski genetik yapılarına dönebilirler; doğal yaşam transgenik organizmalar tarafından tamamen işgal edilebilir; üretilmiş organizmaların veya onların ürünlerinin toksisitesi veya patojenitesi söz konusu olabilir; ve transgenik organizmaların denenmesi ve uygulanmasında nasıl sonuçlanacağı bilinmeyen ciddi uygulama hataları olabilir. Ayrıca üretilmiş organizmaların biyolojik silahların geliştirilmesine yardım etme tehlikesi; doğal kaynakların kişiselleşmesine yol açacak gen patentleşmesi ve koruma çalışmaları alanının doğanın kendisinden laboratuvara dönmesi olasılığı vardır (23).

KAYNAKLAR

1. Trounson AO. Future and applications of cloning. *Methods Mol Biol*, 2006;348:319-32.
2. Kues WA, Carnwath JW, Niemann H. From fibroblasts and stem cells: implications for cell therapies and somatic cloning. *Reprod Fertil Dev*, 2005; 17: 125-34.
3. Paterson L, DeSousa P, Ritchie W, King T, Wilmut I. Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. *Applications of reproductive cloning. Anim Reprod Sci*, 2003; 79: 137-43.
4. Meissner A, Jaenisch R. Mammalian nuclear transfer. *Dev Dyn*, 2006; 235: 2460-9.
5. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Hum Reprod Update*, 2005; 11: 15-32.
6. Berr A, Schubert I. Direct labelling of BAC-DNA by rolling-circle amplification. *Plant J*, 2006; 45: 857-62.
7. Anahory T, Andreo B, Regnier-Vigouroux G, Soulie JP, Baudouin M, Demaille J, Pellestor F. Sequential multiple probe fluorescence in-situ hybridization analysis of human oocytes and polar bodies by combining centromeric labelling and whole chromosome painting. *Mol Hum Reprod*, 2003; 9: 577-85.
8. Traut W, Eickhof U, Schorch JC. Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). *Methods Cell Sci*, 2001; 23: 155-61.
9. Gadji M, Krabchi K, Drouin R. Simultaneous identification of chromosomes 18, X and Y in uncultured amniocytes by using multi-primed in situ labelling technique. *Clin Genet*, 2005; 68: 15-22.
10. Marko JF, Siggia ED. Polymer models of meiotic and mitotic chromosomes. *Mol Biol Cell*, 1997; 8: 2217-31.
11. Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell*, 2003; 4: 497-508.
12. Rhee K, Wolgemuth DJ. The NIMA-related kinase 2, Nek2, is expressed in specific stages of the meiotic cell cycle and associates with meiotic chromosomes. *Development*, 1997; 124: 2167-77.
13. Kishimoto T. Cell cycle arrest and release in starfish oocytes and eggs. *Semin Cell Dev Biol*, 1998; 9: 549-57.
14. Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, de Lesegno CV, Chastant-Maillard S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, 2005; 130: 193-201.
15. Hausmann M, Liebe B, Perner B, Jerratsch M, Greulich KO, Scherthan H. Imaging of human meiotic chromosomes by scanning near-field optical microscopy (SNOM). *Micron*, 2003; 34: 441-7.
16. Nagy ZP, Chang CC. Artificial gametes. *Theriogenology*, 2007; 67: 99-104.
17. Sakai N. Transmeiotic differentiation of zebrafish germ cells into functional sperm in culture. *Development*, 2002; 129: 3359-65.

18. McLaren A. Germ cells and germ cell sex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1995; 350: 229-33.
19. Esa A, Edelmann P, Kreth G, Trakhtenbrot L, Amariglio N, Rechavi G, Hausmann M, Cremer C. Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome. *J Microsc*, 2000; 199: 96-105.
20. Ghosh S, Paweletz N. Detection of intranucleolar chromatin using an ultrastructural immunolabelling technique. *Cell Biol Int*, 1998; 22: 609-14.
21. Plusa B, Grabarek JB, Karasiewicz J, Modlinski JA. Meiotic maternal chromosomes introduced to the late mouse zygote are recruited to later embryonic divisions. *Mol Reprod Dev*, 2005; 70: 429-37.
22. Bondioli K, Ramsoondar J, Williams B, Costa C, Fodor W. Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-transferase transgenic boar. *Mol Reprod Dev*, 2001; 60: 189-95.
23. Ehrenfeld D. Transgenics and vertebrate cloning as tools for species conservation. *Conserv Biol*, 2006; 20: 723-32.
24. Moore KA, Ema H, Lemischka IR. In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood*, 1997; 89: 4337-47.
25. Fischbach GD, Fischbach RL. Stem cells: science, policy, and ethics. *J Clin Invest*, 2004; 114: 1364-70.
26. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284: 143-7.
27. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 2001; 98: 2615-25.

Yazışma Adresi:**Doç. Dr. Nurullah KEKLİKOĞLU**

İstanbul Üniversitesi,

Dışhekimliği Fakültesi,

Histoloji ve Embriyoloji BD.

Çapa, İstanbul.

Tel: +90.212.4142020-30221

+90.542.6114845

E-mail: nkeklik@istanbul.edu.tr