

SOMATİK HÜCRE NUKLEUS AKTARIMI-I: YÖNTEM

SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER-I: METHOD

Nurullah KEKLİKOĞLU¹

ÖZET

Genetik yapısı aynı olan canlılar dizisi üretmeyi amaçlayan klonlama çalışmaları iki gruba ayrılır: üreme amaçlı klonlama ve tedavi amaçlı klonlama. Tedavi amaçlı klonlama, erişkin bir hücrenin klonlanmasıyla oluşturulan embriyodan pluripotent kök hücreler elde edip bunu tedavi amaçlı kullanmaktır. Bu yöntemin hedefi 'hücre replasmanı tedavisi' olarak nitelendirilebilir. Nukleus aktarımı yöntemiyle klonlama; bir donör hücrenin genetik materyalini içeren çekirdeğinin (karyoplast) genetik materyali çıkartılmış bir oosit veya zigota (sitoplast) transferi ile olur. Erişkin bir canlının somatik hücre nükleusu kullanılarak gerçekleştirilen klonlama yöntemine 'somatik hücre nükleus aktarımı' denir. Somatik hücre nükleus aktarımı yöntemiyle klonlanan Dolly'den beri bu teknoloji kullanılarak bir çok memeli türleri klonlanmıştır. Oositin, erişkin bir nükleusu yeni bir organizmayı doğrudan geliştirebilen embriyonik bir hale yeniden programlayabildiği gösterilmiştir. Nükleusun yeniden programlanması, epigenetik profil değişimlerini indükler ve özelleşmiş somatik çekirdeği pluripotent hale getirir. Yeniden programlanmış somatik hücre nükleusu, pluripotansiyel yeterlik bakımından embriyonik kök hücre nükleusuna benzer. Ancak gelecekte laboratuvar koşullarında hibridizasyon teknikleri kullanılarak doğrudan bağımsız hücre kültürü pasajlarının oluşturulması yoluyla erişkin hücrelerden pluripotent kök hücreler elde etmek, klonlamada elde edilen embriyonun parçalanarak yok edilmesinin doğrudan etik tartışmaları da sonlandırabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Klonlama, Nükleus aktarımı, Yeniden programlama, Kök hücre, Pluripotent.

ABSTRACT

Cloning studies performed in order to produce genetically identical living beings are separated in two groups: reproductive cloning and therapeutic cloning. Therapeutic cloning procedure involves acquiring pluripotent stem cells from the embryo obtained by cloning an adult cell, in order to use it for treatment purposes. The aim of this method can be defined as 'cell-replacement therapy'. Nuclear Transfer (NT) is a form of cloning. In this method the nucleus (karyoplast) which contains genetic material of a donor cell is transferred to an oocyte or zygote (cytoplast), genetic material of which is removed. Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) is performed by using a nucleus of adult somatic cell. SCNT technology was used in cloning of Dolly and since that, many mammal species have been cloned using this method. It has been demonstrated that oocyte could be reprogrammed an adult nucleus to an embryonic state which can develop a new organism directly. Nuclear reprogramming of differentiated adult nucleus to pluripotency induces epigenetic profile alterations. Reprogrammed somatic nuclei are similar to embryonic stem cells nuclei, by means of pluripotential competence. However, in future, ethical discussions arise from destruction of embryo during cloning may be closed by the possibility that, using hybridization techniques in laboratory conditions, it is possible to obtain pluripotent stem cells from somatic cells by creating independent cultured cell lines.

Key Words: Cloning, Nuclear transfer, Reprogramming, Stem cell, Pluripotent.

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

Klonlama aynı genetik yapıya sahip canlılar dizisi üretmektir. Klonlama ile elde edilmesi hedeflenen canlı dizisi bir organizma olabileceği gibi, bir doku, bir hücre hatta genetik materyalin bir bölümü de olabilir. İlk uygulanan klonlama çalışmalarında klonlar, tek yumurta ikizlerinin doğal yolla oluşumunu laboratuvar ortamında taklit ederek embriyonun erken aşamalarda bölünmesi yöntemiyle elde ediliyordu (1). Ancak günümüzde yoğun bir şekilde nukleus aktarımı (nuclear transfer, NT) yöntemiyle yapılmaktadır. Klonlama çalışmalarını amacı yönünden iki gruba ayırmak mümkündür: üreme amaçlı klonlama ve tedavi amaçlı klonlama. Tedavi amaçlı klonlama (therapeutic cloning), üreme amaçlı klonlamadan (reproductive cloning) farklı bir olaydır.

Tedavi amaçlı klonlama, erişkin bir hücrenin klonlanmasıyla oluşturulan embriyodan pluripotent kök hücreler elde edip bunu tedavi amaçlı kullanmaktır. Bu yöntemin hedefi 'hücre replasmanı tedavisi' olarak nitelendirilebilir.

Çekirdek aktarımı yöntemiyle embriyo klonlama, bir donör hücrenin genetik materyalini içeren çekirdeğinin (karyoplast) genetik materyali çıkartılmış bir oosit ya da zigota (sitoplast) transferi ile olur. Günümüzde kullanımı en yaygın olan sitoplast metafaz II oositidir. Klonlamada, çekirdeği çıkartılmış (enucleation) metafaz II oositin (M-II oocyte) perivitellin boşluğuna, kültüre edilen G_0/G_1 fazındaki verici hücre yerleştirilip genellikle elektrik akımı kullanılarak füzyona tabi tutulur ve mitoz için uyarılır (2-4). Üreme amaçlı klonlamada oluşan embriyo taşıyıcı dişiye implante edilir. Klonlama sürecinde hücrelerin alınmasında uygulanan yöntem ve kullanılan ilaçların doğru olmaması sonucu olumsuz etkileyebilir (5).

Farklılaşmamış embriyonik hücre (blastomer) nukleusunun aktarımıyla gerçekleşen klonlama yöntemine embriyonik hücre nukleus aktarımı (embryonic cell nuclear transfer, ECNT), erişkin bir canlının somatik hücre nukleusu kullanılarak gerçekleştirilen klonlama yöntemine de somatik hücre nukleus aktarımı (somatic cell nuclear transfer, SCNT) denilmektedir. Üreme amaçlı olarak yapılan klonlama çalışmalarında, koyun embriyosundan alınan hücrelerin kültüre edilmesiyle oluşturulan bir hücre pasajından nukleus aktarımı uygulamasıyla kuzular klonlanmıştır. Böylece yaşayan bir memeli soyu elde edilmesi, gen fonksiyonlarının analizi ve modifikasyonu için de bir fırsat doğurmuştur (6). Bu gelişmeden sonra somatik hücre nukleus aktarımı (somatic cell nuclear transfer, SCNT) yöntemiyle erişkin koyun meme bezinden elde edilen hücreler kullanılarak bir kuzu

klonlanmıştır. Erişkin bir canlının somatik hücre kullanılarak klonlanması, farklılaşmış hücrelerde genetik materyalin geri dönüşsüz bir modifikasyona uğramadığını da göstermiştir (7).

Günümüzde üreme amaçlı insan klonlama (reproductive human cloning) dünyanın pek çok ülkesinde yasal bir süreç değildir ve biyolojik anlamda da şiddetli doğum defektleri ya da genetik anomali riski taşıdığından etik olmayacağı tartışılmaktadır (8). Özellikle koyun ve siçanlarda yapılan araştırmalar klonlanmış canlılarda hücrelerin yaşlılığı ve klonların üretkenliğindeki sorunların henüz aşılmadığını göstermektedir. Klonlarda görülen özellikle vücut ağırlığında artış, böbreklerde ve timusta hipertrofi, testiste atrofi gibi anomalilerin giderilmesi çalışmaları henüz tamamlanmamıştır (9). Farklılaşmış somatik bir hücreden üreme amaçlı insan kopyalamasının gerçekleşme olasılığı her erişkin somatik hücrenin potansiyel bir birey olarak kabul edilip edilemeyeceği tartışmalarına neden olmuştur. Ancak üreme amaçlı klonlamada yer alan hücrenin yeniden programlanmasının (cell reprogramming) yeni bir şahıs gibi olacağı ve erişkin somatik hücrenin potansiyel fertler olamayacağı da tartışılmaktadır (10).

Farklılaşmış (diferansiye) hücreler tam bir organizmayı oluşturacak bütün genetik bilgiye sahiptirler (nuclear totipotency). Nukleus aktarımı başlangıçta, farklılaşmış hücrelerden hayvanları klonlamak suretiyle bu bilginin bilimsel olarak kanıtlanmasını sağlamıştır (11).

Farklılaşmış donör hücrelerinden memelilerin klonlanması eski bir dogma olan 'gelişim geri dönüşü olmayan bir süreçtir' inancını yalanlamaktadır (12).

Embriyonik, fetal, ya da erişkin kaynaklı kültüre edilmiş hücrelerden embriyo klonlamadaki ilerlemeler, nukleus aktarımının potansiyel uygulamalarının geniş bir alanı olacağını göstermektedir (1). Somatik hücre nukleus aktarımı (somatic cell nuclear transfer, SCNT) yöntemiyle klonlanan Dolly'den beri bu teknoloji kullanılarak bir çok memeli türleri klonlanmıştır (13).

Çeşitli hayvanlarda somatik hücre nukleus aktarımı teknikleri araştırılmaya devam etmektedir (14). Nukleus aktarımı yöntemiyle yapılan klonlamada kullanılan hücreler farklılaşmasını tamamlamış hücreler olabildiği gibi kısmen farklılaşmış progenitör hücreler veya farklılaşmamış kök hücreler de olabilir. Somatik hücre nukleus aktarımı yöntemiyle klonlamada başarı şansı sınırlıdır (%1-5). Bu sınırlılığın, klonların sıklıkla kullanılan erişkin kök hücrelerden köken almaları yüzünden olabileceği tartışılmaktadır. Bazı

araştırmacılara göre embriyonik kök hücrelerle yapılan üreme amaçlı klonlamadaki başarı donörlerin somatik hücreleri ile yapılan klonlamadan 5-10 kez daha yüksektir (13).

Ancak bu alanda yayınlanan çalışma sonuçlarında küçük çaplı bir karmaşıklık söz konusudur. Değişik farklılaşma aşamalarındaki fare hematopoietik hücreleri olan hematopoietik kök hücreler, progenitor hücreler ve granülositler ile klonlama verimliliği test edilmiş ve farklılaşma aşamalarını tamamlamış (tam farklılaşmış) olan postmitotik granülositlerin klonlanmış yavru meydana getirmede en verimli hücreler olduğu gösterilmiştir (13). Başka bir çalışmada donör nukleusları olarak fetal fibroblast ve erişkin deri fibroblastları kullanılarak nukleus aktarımının (NT) kedi embriyolarına dönüşme yeterlilikleri araştırılmıştır. Füzyon, birinci yarıklanma ve blastosist aşamalarının oluşum oranı açısından fetal fibroblastlar ile erişkin deri fibroblastları arasında fark bulunmamıştır. Her ikisinden de klonlanmış kediler doğduğu, bu kedilerin donör hücre pasajındaki hücrelerle aynı genotipe sahip olduğu bildirilmiştir. Bu da erişkin somatik hücrelerin klonlamada kullanılabileceğini göstermektedir (15).

Yalnız farklılaşma aşaması değil aktarılacak nukleusun canlılığının yaşam sürecinin hangi aşamasında alınmasının klonlama verimliliğinde önemli olduğu da tartışılmaktadır. Fertilizasyon, parthenogenez ve somatik hücre nukleus aktarımından köken alan tavşan blastosistlerinden yalıtılıp kültüre edilen embriyonik kök hücreler kullanılarak yapılan klonlama çalışmasında her üç tip hücrenin de embriyo benzeri bedenler oluşturduğu ve üç tabakalı germ yapraklarının bütün doku tiplerini içeren teratomalar oluşturduğu gözlenmiştir. Bunlardan fertilizasyonla elde edilen, uzun bir süre farklılaşmamış yapısını koruyarak çoğaldığı, yüksek klonlama verimliliği gösterdiği savunulmuştur (16). Ancak tedavi amaçlı klonlamada asıl hedefin erişkin için replasman yapılabilecek hücre elde etmek olduğunu kabul edersek erişkin hücre nukleusuyla yapılan klonlamanın başarı şansı düşük olsa bile geliştirilmesi zorunludur. Embriyodan elde edilecek hücreler daha çok çiftlik hayvanlarında yapılan üreme amaçlı klonlama çalışmalarında yararlı olabilecektir.

Somatik hücre nukleus aktarımı, nukleusun yeniden programlanması (nuclear reprogramming) yoluyla hücre farklılaşmasının stabilitesini etkin bir şekilde aşabilir. Hücrenin farklılaşmış durumunda sessiz olan genler aktifleşirler, oysa farklılaşmış

durum için özgün olan genler yeniden programlama sürecinde etkisiz olurlar (17).

DNA metilasyonu genomun fonksiyonunun önemli yönlerini düzenleyen önemli bir epigenetik modifikasyonudur. Farklılaşmış somatik hücrelerde genomik metilasyon modeli genellikle stabildir. Ancak klonlamada nukleusun metilasyon modeli yeniden programlanır (reprogramming) (18). Nukleusun yeniden programlanması (nuclear reprogramming), epigenetik profil değişimlerini indükler ve özelleşmiş somatik nukleusu pluripotent hale getirir. Nukleusun yeniden programlanmasından hangi anahtar molekülün sorumlu olduğu açık değildir. Erişkin somatik hücre nukleusunun in vitro olarak embriyonik kök hücreler ile füzyonu sonucu elde edilen hibrid hücreler de yeniden programlanabilmektedir (19). Embriyonik kök hücreler, nukleuslarının yeniden programlanma aktivitelerini korurlar. Yeniden programlanmış somatik çekirdek, pluripotansiyel yeterlik bakımından embriyonik kök hücre nukleusuna benzer. Nukleusun yeniden programlanmasının moleküler süreci en azından iki aşamada gerçekleşir: somatik epigenetik modifikasyonun silinmesi (genome-wide reprogramming) ve pluripotansiyel epigenetik modifikasyonun kurulması (gene-specific reprogramming). Pluripotensinin devamlılığında Nanog ve Oct4 genleri kooperasyon halinde işlev görür. Somatik kaynaklı Nanog, hibrid hücreler ve aynı zamanda klonlamayla elde edilen blastosistin yeniden programlanmış nukleusunda reaktiftir (19). Hibrid hücrelerden embriyonik kök hücre kaynaklı kromozomların eliminasyonunu sağlayacak teknolojik bir yenilik, kişiye ait pluripotent kök hücrelerin üretimini tedavi amaçlı kopyalamaya ihtiyaç duyulmaksızın mümkün kılabilir (19).

Oositin, erişkin bir nukleusu yeni bir organizmayı doğrudan geliştirebilen embriyonik bir hale yeniden programlayabildiği gösterilmiştir. Gelecekte nukleus aktarımı için yeniden programlama (reprogramming) oosit kullanılmaksızın Petri kutularında yapılmalıdır (12). Çünkü oosit içine enjekte edilen somatik nukleusun yeniden yapılanması (nuclear remodeling) oosit sitoplazması tarafından düzenlenmektedir (20). Bu da özellikle oositin mitokondrial DNA'sının da genetik yapıya eklendiği düşünüldüğünde, aslında ortaya çıkan klonun hiçbir zaman transfer edilen nukleusdaki genetik yapının %100 aynısına sahip olamayacağını gösterir. Ayrıca laboratuvar koşullarında hibridizasyon teknikleri kullanılarak somatik hücrenin yeniden programlanması ve doğrudan bağımsız hücre kültürü pasajlarının oluşturulması yoluyla hastaya özgü pluripotent kök hücre elde

etmek, klonlama yöntemiyle elde edilen embriyonun parçalanarak yok edilmesinin doğurduğu etik tartışmaları da sonlandırabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Wolf E, Zakhartchenko V, Brem G. Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. *J Biotechnol*, 1998: 65: 99-110.
2. Li Z, Rezaei Sabet M, Zhou Q, Liu X, Ding W, Zhang Y, Renard JP, Engelhardt JF. Developmental capacity of ferret embryos by nuclear transfer using G0/G1-phase fetal fibroblasts. *Biol Reprod*, 2003;68:2297-303.
3. Pralong D, Mroziak K, Occhiodoro F, Wijesundara N, Sumer H, Van Boxtel AL, Trounson A, Verma PJ. A novel method for somatic cell nuclear transfer to mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*, 2005;7:265-71.
4. Hosaka K, Sato Y, Okamoto N, Kazami A, Sato K. Development of reconstituted embryos derived from somatic cell nuclei in the rabbit. *Hum Cell*, 2004;17:29-32.
5. Beeson D, Lippman A. Egg harvesting for stem cell research: medical risks and ethical problems. *Reprod Biomed Online*, 2006;13:573-9.
6. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996;380:64-6.
7. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997; 385: 810-3.
8. Lane R. Safety, identity and consent: a limited defense of reproductive human cloning. *Bioethics*, 2006: 20: 125-35.
9. Shimosawa N, Sotomaru Y, Eguchi N, Suzuki S, Hioki K, Usui T, Kono T, Ito M. Phenotypic abnormalities observed in aged cloned mice from embryonic stem cells after long-term maintenance. *Reproduction*, 2006: 132: 435-41.
10. Oakley J. Reproductive cloning and arguments from potential. *Monash Bioeth Rev*, 2006: 25: 42-7.
11. Meissner A, Jaenisch R. Mammalian nuclear transfer. *Dev Dyn*, 2006: 235: 2460-9.
12. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, 2006: 441: 1061-7.
13. Sung LY, Gao S, Shen H, Yu H, Song Y, Smith SL, Chang CC, Inoue K, Kuo L, Lian J, Li A, Tian XC, Tuck DP, Weissman SM, Yang X, Cheng T. Differentiated cells are more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat Genet*. 2006: 38: 1323-8.
14. Yamazaki W, Ferreira CR, Meo SC, Leal CL, Meirelles FV, Garcia JM. Use of strontium in the activation of bovine oocytes reconstructed by somatic cell nuclear transfer. *Zygote*, 2005;13:295-302.
15. Yin XJ, Lee HS, Lee YH, Seo YI, Jeon SJ, Choi EG, Cho SJ, Cho SG, Min W, Kang SK, Hwang WS, Kong IK. Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction*, 2005: 129: 245-9.
16. Fang ZF, Gai H, Huang YZ, Li SG, Chen XJ, Shi JJ, Wu L, Liu A, Xu P, Sheng HZ. Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos. *Exp Cell Res*, 2006: 312: 3669-82.
17. Simonsson S, Gurdon JB Changing cell fate by nuclear reprogramming. *Cell Cycle*, 2005: 4: 513-5.
18. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001;293:1089-93.
19. Tada T. Toti-/pluripotential stem cells and epigenetic modifications. *Neurodegener Dis*, 2006;3:32-7.
20. Bui HT, Van Thuan N, Wakayama T, Miyano T. Chromatin remodeling in somatic cells injected into mature pig oocytes. *Reproduction*, 2006;131:1037-49.

Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Nurullah KEKLİKOĞLU
İstanbul Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji BD, Çapa, İstanbul.
Tel: +90.212.4142020-30221
+90.542.6114845
E-mail: nkeklık@istanbul.edu.tr