

38118

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DÖLERME VE SUN'İ TOHURLAMA ANA BİLİM DALI

**TRANSGENİK FARE ELDESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR**

DOKTORA TEZİ

HAYDAR BAĞIŞ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
İSTANBUL TIBBİ ENSTİTÜSÜ


DANIŞMAN

Yar.Doç.Dr.SERHAT PAPUÇÇUOĞLU

İSTANBUL-1994

38118

Araştırma yapmama olanak sağlayan, ve bana  
yeni ufuklar aan değerli bilim adamı sayın  
hocam **Prof.Dr. Engin BERMEK'e,**



Sunulan bu tez çalışması TUBİTAK M.A.M. Gen.Müh.Biotek.Arş.Ens. (G.M.B.A.E) Transgen Laboratuvarında (UNİDO DP/TUR/87/042 nolu proje çerçevesinde) yapıldı.

## TEŞEKKÜR

Başta Doktora danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Serhat PAPUÇCUOĞLU olmak üzere, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Ana Bilim Dalı başkanı sayın hocam Prof.Dr. Kamuran İLERİ'ye, ve emekli hocam Prof.Dr.Adnan ÖZKOCA'ya deneyim ve bilgi birikimleri ile bana büyük destek verdiklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince akademik ilgisi ve desteği nedeniyle TÜBİTAK M.A.M Genetik Mühendisliği Biyoteknoloji Araştırma Ens.(GMBAE) Müdürü sayın Prof.Dr. Engin BERMEK'e, ayrıca her türlü desteği esirgemeyen ve UNIDO proje sorumlusu, GMBAE Moleküler İmmunoloji başkanı ve Marmara Üniv. Rektör Yardımcısı Prof.Dr. Beyazıt ÇIRAKOĞLU'na teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çalışmalarım süresince beni yalnız bırakmayan Transgen Laboratuvarından Dr. Sezen ARAT'a, DNA kontraktlarının hazırlanmasını ve transgenik analizleri yapan Moleküler Onkoloji Laboratuvarından Dr. Benan DİNÇTÜRK'e teşekkür ederim. Ayrıca TÜBİTAK'ta işe başladığım tarihten itibaren beni her yönden destekleyen arkadaşım Dr. Erol ATALAY'a teşekkür etmek isterim.

Lise ve Üniversite öğrenciliği yıllarımdan başlayarak beni bilgi birikimi ile yönlendiren ağabeyim ANKA Ltd. şirketi sahibi Fizik Yük.Müh. İbrahim BAĞIŞ'a, her türlü sıkıntıma öğrencilik yıllarımdan itibaren katlanan değerli eşim Belma BAĞIŞ'a saygı ve şükranlarımı, kızlarım Melis ve Merve'ye sevgilerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım süresince teknik yardımlarını esirgemeyen teknisyen arkadaşlarım Seyfettin ÇETİN ve Şakir SEKMEN'e teşekkürlerimi sunarım.



2.5. Alıcı Farelere (Recipient) Embriyo Transferi . . . . .	24
2.6. Doğan Hayvan Yavrularında Transgenik Analiz Yöntemleri . . . . .	25
2.6.1. Dot-Blot Hibridizasyon . . . . .	25
2.6.2. Southern-Blot Hibridizasyon . . . . .	26
<b>3. MATERYAL VE METOD . . . . .</b>	<b>27</b>
<b>3.1. MATERYAL . . . . .</b>	<b>27</b>
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler . . . . .	28
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler . . . . .	29
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Gereçlerin Hazırlanması . . . . .	30
3.1.3.1. Farelerin Üretilmesi Ve Bakımı . . . . .	30
3.1.3.2. Vazektomize Fare Eldesi . . . . .	31
3.1.3.3. Yıkama Mediumunun Stoklarının hazırlanması . . . . .	32
3.1.3.4. Hormon, Enzim ve Solusyonların Hazırlanması . . . . .	34
3.1.3.5. Pipetlerin ve Enjeksiyon Laminin Hazırlanması . . . . .	34
<b>3.2. METOD . . . . .</b>	<b>36</b>
3.2.1. Verici Farelerden Embriyo Eldesi . . . . .	36
3.2.1.1. Verici Farelerin (Donor) Süperovulasyonu . . . . .	36
3.2.1.2. Verici Farelerden Oviduktların Elde Edilmesi . . . . .	37
3.2.1.3. Oviduktan Embriyoların Kazanılması . . . . .	37
3.2.2. Kazanılan Embriyoların Değerlendirilmesi . . . . .	38
3.2.3. Alıcı (Recipient) Farelerin Senkronizasyonu . . . . .	38
3.2.4. Fare Zigotuna Mikroenjeksiyon . . . . .	39
3.2.4.1. Hamilton Şırınganın ve Tutucu Pipetin Hazırlanması . . . . .	40
3.2.4.2. Enjeksiyon Pipetine DNA'nın Yüklenmesi . . . . .	40

3.2.4.3. Mikromaniplatör ve Mikroenjektörün Ayarlanması . . .	41
3.2.4.4. Mikroenjeksiyon Lamına Zigotların Yüklenmesi . . . . .	41
3.2.4.5. Zigotun Pronukleusuna DNA'nın Mikroenjeksiyon ile Verilmesi . . . . .	42
3.2.5. Alıcı Farelerin (Recipient) Oviduktuna Zigotların Transferi . .	43
3.2.5.1. Mikroenjeksiyon Yapılmış Embriyoların Pipete Yüklenmesi . . . . .	43
3.2.5.2. Zigotların Ovidukta Transferi . . . . .	44
3.2.5.3. Embriyo Transferi Yapılan Farelerde Doğurganlık . .	45
3.2.6. Doğan Fare Yavrularının Transgenik Analizi . . . . .	45
3.2.6.1. Yavruların Kuyruk Dokusundan DNA Eldesi . . . . .	45
3.2.6.2. Dot-Blot Hibridizasyon . . . . .	46
<b>4. BULGULAR</b> . . . . .	<b>47</b>
4.1. pXGH5 GENİNİN SONUÇLARI . . . . .	47
4.1.1. Süperovulasyon Sonuçları . . . . .	47
4.1.2. Mikroenjeksiyon Sonuçları . . . . .	51
4.1.3. Embriyo Transferi Sonuçları . . . . .	52
4.1.4. Doğum Sonuçları . . . . .	53
4.1.5. Transgenik Sonuçlar . . . . .	54
4.1.6. pXGH5 Geninin Toplu Sonuçları . . . . .	55
4.2. p53-248 GENİNİN SONUÇLARI . . . . .	56
4.2.1. Süperovulasyon Sonuçları . . . . .	56
4.2.2. Mikroenjeksiyon Sonuçları . . . . .	59
4.2.3. Embriyo Transferi Sonuçları . . . . .	60
4.2.4. Doğum Sonuçları . . . . .	61
4.2.5. Transgenik Sonuçlar . . . . .	62
4.2.6. p53-248 Geninin Toplu Sonuçları . . . . .	63

<b>5. SONUÇ VE TARTIŞMA</b>	64
<b>6. ÖZET</b>	69
<b>7. SUMMARY</b>	71
<b>8. LİTERATÜR LİSTESİ</b>	73
<b>9. RESİMLER</b>	80
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b>	90



## 1. GİRİŞ

Son yıllarda üremenin manipülasyonu ve gen mühendisliği tekniklerinin hayvanlara uygulanması alanında önemli aşamalar kaydedilmiştir. Şimdilerde sun'i tohumlama ve embriyo transferi çiftlik hayvanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ülkemiz hayvan potansiyeli büyük, buna karşın, hayvansal üretimin verimliliği düşüktür. Sun'i tohumlama çalışmaları ile hayvan popülasyonunu genotipik yönden iyileştirmek çok uzun zaman almaktadır. Embriyo transferi çalışmaları ile genetik olarak üstün ebeveynlerin döl sayısını artırmak mümkündür (26).

Son zamanlarda Türkiye'de çiftlik ve laboratuvar hayvanlarında embriyo transferi ile in vitro kültür çalışmaları yapılmaktadır (1,34,35,43,44,61,62).

Embriyo transfer çalışmaları ile yüksek verimli ana babanın tüm üstün özellikleri daha ilk kuşakta bütünüyle yavrulara geçmekte ve verim yönünden üstün vasıflı hayvanların sayısı kısa sürede artmaktadır (10).

Ancak son yıllarda rekombinant DNA teknikleri yoluyla gen mühendisliğinde ortaya konan gelişmeler, embriyo manipülasyonlarının bu tekniklerle birleştirilebilmesi olasılığını gündeme getirmektedir.

Gen mühendisliği teknolojisi moleküler alanda çeşitli teknikler geliştirirken, çiftlik hayvanlarında da iyileşmeye neden olabilecek uygun genlerin klonlanmasını üstlenmektedir. Gen teknolojisi ile embriyo transfer çalışmalarının beraberce yürütülebilmesi ve çiftlik hayvanlarına adapte edilebilmesi için ihtiyaç duyulan koşulların, öncelikle laboratuvar hayvanlarında (fare, rat) sağlanması ve tekniğin oturtulması gerekmektedir (73).

Gen transferi çalışmaları ilk olarak fareler üzerinde SV 40 virusunun DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve integrasyon sağlanmış ancak verilen gen ifade olamamıştır (46,60). Daha sonra gerçekleştirilen çalışmalarda büyüme hormonu geninin değişik formlarının zigot erkek pronukleusuna enjeksiyonu ve enjekte edilen genin integre olması sonucu doğan fare yavrularında değişik büyüme şekillerinin ortaya çıktığı

bildirilmektedir (14,31). Yakın zamanlarda bu çalışmalar çiftlik hayvanlarında başarıyla denenmiştir. Örneğin, koyun embriyolarına insan pıhtılaşma faktörü IX ile insan  $\alpha$ -1-antitrypsin enzimlerini kodlayan genler enjekte edilmiş ve böyle genleri taşıyan transgenik koyunlar elde edilmiştir. Elde edilen transgenik koyunlar bu enzimin kodladığı proteini meme bezlerinde üreterek (biofarming) sütleriyle salgılamışlardır (16,40,73). Diğer taraftan domuz ve sığırlarda çeşitli transgenik denemeler yapılmıştır (40).

Son zamanlarda transgenik fareler hastalık modellerinin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (49).

Sonuç olarak, gen mühendisliği yoluyla, istenen özelliklerin ortaya çıkmasından sorumlu genlerin klonlanması halinde, hayvan ıslahı daha etkin bir şekilde yapılabilecektir.

Çeşitli laboratuvarlarda çiftlik hayvanlarının moleküler biyolojisinin daha iyi belirlenmesi, daha iyi embriyo kültür sistemlerinin oluşturulması, önemli karakterleri belirleyen genlerin izolasyonu ve genoma girdiğinde exprese olması gibi genetik çalışmalar devam etmektedir.

Buraya kadar açıklanan bilgilerin ışığında, ülkemizde hayvan ıslahına, hayvanlardaki genetik hastalıkların düzeltilmesine ve verimliliğin artırılmasına yönelik çalışmalara gereksinim bulunmaktadır. Bu nedenle transgenik teknoloji kullanılarak, koyunlarda ve keçilerde sütün kompozisyonu iyileştirilebilir, antibakteriyel peptitler sütte salgılatılarak mastitis önlenebilir ve insan sütüne ait bazı proteinler inek sütünde salgılatılarak (biofarming), insan anne sütünün kompozisyonuna yakın süt elde edilebilir (16,32,77). Yine aynı teknoloji kullanılarak, koyunların yapağı kalitesi düzeltilebilir ve insanların bazı hastalıklarının sağaltımında önemli olan farmosötik maddelerin bu hayvanların sütlerinde sentezlenmeleri sağlanarak saflaştırılmaları mümkündür.

Bu ürünler in vivo olarak transgenik hayvanlarda üretildiğinde gerçek formuna yakın olarak elde edilebilir. Bir kez transgenik bir hayvan elde edildiğinde, embriyo manipulasyonları yöntemleriyle gen havuzunu çabucak büyütme mümkündür.

Transgenik hayvanlar daha hızlı büyüme gösterip, hastalıklara dayanıklı ve etkin

bir metabolizmaya sahip oldukları, hayvan ıslahçalarına gelecekte ümid vaad edecekleri ve Türkiye’de bu türlü çalışmalara ihtiyaç olduğundan dolayı, öncelikle, transgenik çalışmaların teknik olarak oturtulması zorunluluğu bulunmaktadır.

Çiftlik hayvanlarına direkt olarak bu tekniği uygulamak, gerek materyalin fazlaca kullanılması gerekse teknikte doğabilecek problemleri çözmek oldukça güç olacağından, bakım, barınma ve reproduktif faaliyetlerinin uygunluğu, fare embriyosunun bu türlü çalışmalarda model oluşturması ve uygulamanın daha kolay olacağından dolayı çalışmalarda deney hayvanı olarak fare kullanılmaktadır (39,81).

Bu çalışmada; fare zigotlarına mikroenjeksiyon tekniği ile insan büyüme hormonu geni (pXGH5) ile insan p53 geninin 248’inci mutant formunun verilmesi ve bu zigotların alıcı annelere transferi sonucunda doğan yavruların transgenik sonuçları incelendi. Transgenik fare eldesi için kullanılan bu teknolojinin Türkiye genelinde yaygınlaştırılması ve gerekli altyapının oluşturulması bu çalışmanın temel hedefidir.

## **2. LİTERATÜR BİLGİSİ**

### **2.1. Dişi Farelerde Reprodüksiyon**

#### **2.1.1. Reprodüktif Organlar ve Puberteye Ulaşma Yaşı**

Puberteye ulaşmamış dişi farelerde ovaryumlar darı tanesi büyüklüğünde ve böbreklerin caudalinde lokalize olmuşlardır. Ovaryum ve infundibulum bir bursa içerisinde. Gelişmemiş bir dişide ovaryum parlak ve kaygan, puberteye ulaşmış dişilerde ise oluşan follikül ve corpus luteum sebebiyle girintili çıkıntılı gözükmektedir. Ovidukt (Ductus fallopi) 1.7 cm uzunluğunda kıvrımlı bir boru olup cornu uteri ve ovaryumun peri ovaryan yüzü ile temastadır (38).

Oviduktun 3 segmenti vardır: Ovaryum ile bağlantılı infundibulum, genişleyen kısımla devam eden ampulla ve cornu uterilerle birleşen isthmus kısmıdır (42). Uterus Y biçiminde ve tubuler bir yapı olup iki lateral kornu ve bir median gövdeden oluşarak serviks uteri ile vaginaya açılır (38).

Dişinin seksüel olgunluğa ulaştığı ve ikinci seks karakterlerinin ilk olarak görüldüğü dönem pubertedir, seksüel faaliyetleri başlatan gonadotropinlerin hipofiz ön loptan artan seviyelerdeki salgılanmaları, hipotalamusta bulunan ve belirli uyarımları alan merkezler tarafından idare edilmektedir (8).

Puberte öncesi düşük seviyede salgılanan gonadotropinlerin hipotalamus üzerine olan inhibitör etkisi pubertede steroidlerin artması ile ortadan kalkmakta ve böylece GnRH'nin gonadotropin salgısını uyardığı bildirilmektedir (58).

Dişi farelerde puberteye ulaşma yaşı, ırka, türe ve çevre şartlarına bağlı olarak değişmektedir. Yaklaşık 6 haftalık iken puberteye ulaşan dişi farelerin her bir ovaryumunda, olgunlaşmanın farklı safhalarında bulunan  $10^4$  oositin varlığından söz edilmektedir (28,42).

### **2.1.2. Seksüel Aktivite ve Östrus Siklusları**

Seksüel siklusun, merkezi sinir sistemi ile hipofiz önlopdan ve ovaryumlardan salgılanan hormanların birbirlerini etkiliyerek çalıştığı ve bu sistemin nörohormonal bir mekanizma ile işlev gördüğü bildirilmektedir (5).

Fareler poliöstrik hayvanlardır ve östrus siklusları 4-5 gündür. Östruslarının 9-20 saat arasında değiştiği ve ovulasyonun östrusun başlangıcından itibaren yaklaşık 2-3 saatlik bir zaman aralığında spontan bir şekilde oluştuğu ve ayrıca ovanın yaşam süresinin 10-12 saat arasında değiştiği bildirilmektedir (38).

Farelerde ovulasyon spontan olmasına rağmen çiftleşme olmadığı sürece korpus luteum fonksiyonel değildir. Bu nedenle fare ve ratların östrus siklusu çiftleşmedikleri sürece diğer hayvanlara göre kısadır (58).

### **2.1.3. Ovulasyonun Mekanizması**

Dişi fare yavrularının ovaryumunda bulunan foliküllerin yarısından çoğunun, yavru 3-5 haftalık yaşa gelinceye kadar dejenerasyona uğradığı, bu folikül kaybına neden olan etken ve bu sistemi kontrol eden hormonal veya diğer faktörler hakkındaki bilgilerin oldukça yetersiz ve araştırılmakta olduğu bildirilmektedir (28).

Dişi farelerde ovulasyon, optimum laboratuvar şartları altında her 4 ile 4.5 günde bir spontan olarak meydana gelmektedir (42,58). Östrus siklusunun uzunluğu bir çok çevresel faktörlerden etkilenebilmekte ve hormon enjeksiyonu ile yapay olarak ovulasyon gerçekleştirilebilmektedir (37).

G1. pituitariadan salgılanan L.H. hormonu seviyesindeki ani artışla gelişmiş ve olgunlaşmış graff folikülündeki ovumun, etrafındaki kumulus hücreleri ile birlikte ovidukta atılması olayına ovulasyon denmektedir (35, 42).

Fare ırklarına bağlı olmakla birlikte, normal bir siklus sonunda 8-12 yumurtanın ovulasyonla serbest bırakıldığı, fakat ovulasyonların aynı anda olmadığı ve bunun 2-3 saatlik bir sürede devam ettiği bildirilmektedir (42).

Ovulasyondan sonra korpus luteumlar gelişmektedir ve Ovaryum yüzeyinde parlak

sarı corpora luteaları sayarak kaç tane ovumun serbest bırakıldığını hesaplamanın güç de olsa mümkün olduğu bildirilmektedir (42,50).

#### **2.1.4. Gebeliğin Oluşması ve Embriyonun Gelişme Safhaları**

Ovule olan folliküllerin sayısı fare ırklarının özelliklerine bağlı olarak 8-12 adet arasında değişmektedir (36,38,42).

Erkek farelerin çiftleşmesi esnasında her bir ejakulatta  $58 \times 10^6$  spermatozoitin serbest bırakıldığı, bazı spermatozoitlerin 5 dakika içinde ampullaya ulaşabileceği ve spermatozoitlerin kapasite olabilmesi için 1 saatten daha fazla süreye ihtiyaç olduğu bildirilmektedir (42).

Spermatozoit zona pellucidadan içeri girdiği zaman ovumun ikinci kutup cisimciği atılmakta ve pronukleuslar oluşmaya başlamaktadır. Farelerde pronukleus hacimlerinin, diğer çiftlik hayvanlarına kıyasla tahminen 20 kat daha fazla ve erkek pronukleusların dişi pronukleuslardan daha büyük olduğu bildirilmektedir (42).

Çiftlik hayvanlarının pronukleuslarının farelerin pronukleuslarından daha küçük ve stoplazmik yapılarının kompakt olması nedeniyle de görülebilmelerinin oldukça güç olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (19,40,66,73).

Fertilizasyonun 2. mayoz bölünmeyi ve 2. polar body oluşumunu başlattığı, haploid olan erkek ve dişi pronukleuslarının merkeze doğru hareket ettiği ve bu arada pronukleusların birbirinden bağımsız olarak DNA replikasyonu yaptıktan sonra birbirleriyle birleşerek (syngami) fertilizasyonun tamamlandığı bilinmektedir (23,42). Eğer fertilizasyon olmaz ise ovumların 12 saat, spermatozoitlerin ise 6 saat civarında canlı kalabildiği bildirilmektedir (42).

Fertilizasyondan sonra embriyonun gelişim evresinin çiftleşmeden 1.5 gün sonra 2 hücreli, 2.5-3 gün sonra kompakt morula, 3.5-4 gün sonra blastocyst safhasına geldiği ve 4.5 gün sonunda da uterusu implante olduğu belirtilmektedir (38,42).

## **2.2. Farelerde Embriyo Eldesi:**

### **2.2.1. Verici Farelerin (Donor'ların) Eldesi ve Seçimi**

Çeşitli gen transferi çalışmalarında kullanılan fare ırklarının değişik sonuçlar vermesi nedeni ile çalışılacak ırkların titizlikle seçilmesi ve planlanan çalışmanın ihtiyacını karşılayacak şekilde bir üretim programının takip edilmesi zorunludur (13,42). Eğer her çalışmada 150-200 ovum elde edilmek isteniyorsa, yaklaşık 10 süperovule dişi, 10 damızlık erkek ile çiftleştirilmeli ve eğer bu miktarda yumurta haftanın 5 günü de gerekiyorsa, her erkek gurubun haftada 1 kez kullanılması esas alındığından 50 damızlık erkek ve haftalık 10-15 adet genç dişi üretimi sağlayacak şekilde damızlık dişi barındırılması zorunludur. Doğan yavruların % 40-50 si erkek doğacağından dolayı üretimin yaklaşık 30-40 adet yavru verecek şekilde planması ve damızlık dişi sayısının buna göre ayarlanarak yetiştirilmesi gerektiği bildirilmektedir (42).

Ayrıca ovum elde edilecek farelere özel yem rasyonun hazırlatılarak, yem ve suyun *Ad.Libitium* olarak verilmesi önerilmektedir (55,79).

Reetz ve ark. (69), damızlık ünite kurulacağı zaman bulundurulacak hayvan sayısının yanında fare ırkının da önemine dikkati çekerek, BALB/C, C57BL/6j ve DBA/2J gibi fare ırklarını  $22 \pm 2$  °C oda ısında ,  $55 \pm 10$  % nemli ortamda ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışık programlı laboratuvar şartlarında tutarak *Ad.Libitium* su ve yem verdiklerini bildirmişlerdir.

Farelerde en iyi ırk veya ırkları embriyo ve doğurganlık yönünden inceleyen araştırmacı bir grup [ C57BL/6 x BALB/C ] F<sub>1</sub> ve [ C57BL/6 x SJL ] F<sub>1</sub> ırkı hibrid fareleri yaptıkları çalışmalarda kullanarak yüksek sayıda embriyo elde ettiklerini ve bu embriyoların ovidukta transferi sonucunda yüksek sayıda canlı yavru aldıklarını bildirmişlerdir (2). Diğer yapılan transgenik bir çalışmada ise [ C57BL/6 x SJL ] F<sub>1</sub> ırkı hibrid fareler kullanarak çok sayıda embriyo elde edilmiştir (23).

Transgenik çalışmada kullanılacak fare ırkları ticari olarak elde edilebilir ise de süperovulasyonda belirli yaş ve ağırlıktaki genç dişileri bulmak güç olacağından, üretme yoluna gidilmesi önerilmektedir (42).

### **2.2.2. Verici Farelerde Süperovulasyon**

Gonadotropinlerin (PMSG; FSH ve HMG) dışardan verilmesiyle dişinin östrusta normalden daha fazla sayıda ovum üretmesini sağlayarak embriyo sayısını artırma olayı süperovulasyon olarak tanımlanmaktadır (8). Hipofiz ön lobundan salgılanan ve glikoprotein yapısında olan FSH bir gonadotropindir. 2-2.5 saat gibi kısa bir yarılanma süresine sahip olması, bu hormonun süperovulasyon çalışmalarında tekrarlı dozlar halinde kullanılmasını zorunlu kılmaktadır (8).

Menapozdaki kadınların idrarından veya insan hipofizinden elde edilen HMG hormonun FSH ve daha az olarak da LH aktivitesine sahip olduğu bildirilmektedir (34).

Gebe kısırakların endometriyumlarında fetal trophoblast hücreleri tarafından üretilen PMSG, daha çok FSH ve az olarak da LH benzeri etkiye sahip olmasına rağmen, yarılanma ömrü uzun olduğundan dolayı follikül gelişimini sağlamak ve süperovulasyon amacıyla kullanılabilmesi için tek enjeksiyonun yeterli olacağı bildirilmektedir (8).

#### **2.2.1.1. Gonadotropinlerin Uygulanma Zamanı**

PMSG ve hCG nin uygulanma zamanları kullanılan hayvan ırkına göre ayarlanır. Farelerde gonadotropinlerin uygulanma zamanı ışık döngüsüyle ayarlanarak, hem yumurtalarda gelişimsel bir örneklik hem de yeterli sayı da embriyo kazanımı sağlanabilir. Çoğu fare ırklarında PMSG enjeksiyonu ile hCG enjeksiyonu arasındaki 42-48 saatlik zaman aralığı, yumurta verimi açısından optimaldir. Genel olarak ovulasyon, HCG enjeksiyonundan sonra 10-13 saatlik bir süre içerisinde oluşur. Fakat, ovulasyonun zamanını tam olarak kontrol etmek için endojen LH salınımına göre hCG uygulamak önemlidir. PMSG'ye bir yanıt olarak oluşan endojen LH'nın aydınlık ve karanlık siklusu ile regüle edildiği bildirilmiştir (23,42).

Gates (29), süperovulasyon için satın alınan farelerin birkaç gün aydınlık-karanlık ışık döngüsüne tabii tutulmasıyla, hCG enjeksiyonundan önce, endojen LH salınımının, ırktan ırka değişmekle birlikte PMSG enjeksiyonunu takip eden 2. karanlık periyodunun orta noktası olan 15-20. saat arasında şekillendiğini bildirmiştir. Araştırmacı, ışığın sabah

5 de yakılıp akşam 7 de söndürüldüğünde, PMSG enjeksiyonunun öğleyin saat 1-2 de yapılmasını, bundan 48 saat sonra hCG uygulanmasının ve hemen arkasından her dişinin bir erkekle çiftleştirilmesi gerektiğini örnek olarak belirtmiştir.

Gordon ve ark. (30), ovulasyon ve çiftleşmenin günlük ışık periyodu ile ilişkili olduğunu ve östrusun genelde karanlığın başlamasından 4-6 saat sonra başladığını ve çiftleşmenin ise buna ilaveten 2-3 saat daha zamana ihtiyaç göstereceğini fakat fertilizasyonun çiftleşmeden genelde 6 saat sonra biteceğini ve embriyodaki pronukleusların ise çiftleşmeden sonra en erken 6 saat sonra görülebileceğini, fakat birkaç saat daha beklemenin iyi olacağını bildirmişlerdir.

Aynı araştırmacılar değişik ışık döngü programı uygulayarak süperovulasyon ile mikroenjeksiyon zamanını belirlemişler. Buna göre, Gordon'un (30) kullandığı ışık programı aşağıda gösterildiği şekilde uygulanmıştır.

- Işık sabah 8 de yanıp akşam 10 da sönüyor ve mikroenjeksiyon yapılacak gün ise 0. gün olarak kabul ediliyor ve buna göre:
- Mikroenjeksiyondan 3 gün önce saat 4 de 5 ünite PMSG i.p olarak uygulanır.
- PMSG enjeksiyonundan 48 saat, sonra saat 4 de 2.5-5 ünite hCG i.p yolla verildikten hemen sonra süperovule dişi bire bir oranında fertil erkek farelerle çiftleştirilir.
- Ertesi gün sabah 4 de östrusun başlayabileceğini ve,
- Aynı gün sabah saat 6 da ovulasyon ve çiftleşmenin tamamlanabileceğini,
- Aynı gün sabah saat 8-10 arası çiftleşmenin kontrolü için vaginal plak kontrolü yapılacağını,
- Aynı gün öğlen saat 12 de pronukleusun görülebilir bir hale gelebileceğini,
- Aynı gün saat 1-3 arası vaginal plak gösteren dişilerin öldürülerek embriyoların elde edilebileceğini,
- Aynı gün saat 3-4 arası mikroenjeksiyon yapılarak,
- Aynı gün saat 4-6 arası alıcı annelerin oviduktuna embriyoların transfer

yapılabileceğini bildirmiştir (30).

DePamphilis ve ark. (23) outbred farelerin embriyo eldesinde çok kullandıklarını fakat İnbred soylardan daha fazla embriyo aldıklarını ama bu soyların diğerlerinden pahalı olduğunu bildirmişlerdir.

Aynı araştırmacılar embriyo eldesi için PMSG'nin 5-10 ünitesini 6-8 haftalık (C57BL/6J x SJL/J) F<sub>1</sub> ırkı dişi farelere i.p. enjeksiyon yapmışlar, bundan 48 saat sonra 5-10 ünite hCG i.p. enjeksiyon yaptıktan hemen sonra her bir dişiye 10 haftalıktan daha yaşlı bir erkek fare ile çiftleştirmişler ve ertesi gün vaginal plak kontrolü yapmışlardır.

Araştırmacılar (23), gonadotropinlerle ovule olan yumurtaların sayısında, kullanılan hayvanların ırkları, ergin veya ergin olmamaları, PMSG ve hCG dozu, PMSG ve hCG enjeksiyonları arasındaki zaman aralığı, hCG enjeksiyonu ile yumurtaların kazanılması arasındaki süre gibi faktörlerin etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada ise hayvan başına maximum sayıda yumurta elde edilmek istendiğinde, immatüre hayvanların kullanılması gerektiği bildirilmiştir (25).

Çeşitli araştırmacıların kullandıkları ışık döngüsü ve gonadotropin dozajları hemen hemen birbirine yakınlık göstermektedir. Örneğin, ışık 14 saat aydınlık 10 saat karanlık periyoduna göre ayarlanmış; gonadotropinler 5-10 ünite PMSG olarak enjekte edilmiş ve bundan 44-48 saat sonrada 2.5-5 ünite hCG hormonu i.p. enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Hemen arkasından senkronize dişileri fertil erkek fareler ile bire bir oranında eşleştirerek ertesi gün vaginal plak kontrolü gerçekleştirilip farelerin döllenip döllenmediklerinin incelendiği ve aynı zamanda 20-30 gram ağırlığında, 4-12 haftalık yaş grubu arasında değişen hibrid farelerin F<sub>1</sub> döllerini kullanarak yüksek sayıda embriyo elde edildiği bildirilmiştir (2,6,9,15,37,42,48,50,51,70,74,80).

### **2.2.3. Alıcı Farelerin (Recipient) Senkronizasyonu**

Alıcı farelerin (recipient) senkronize edilmesi için vazektomi edilmiş erkek fareler gereklidir. Bunun için iyi performanslı herhangi bir ırktan en az 2 aylık ve 30-35 gr ağırlığındaki erkek farelerin vazektomi operasyonu için uygun olacağı belirtilmiştir (30,42).

DePamphilis ve ark. (23), alıcı farelerin senkronizasyonunda ya genetik olarak kısır farelerin veya vazektomi yapılmış erkeklerin kullanılabilceğini, fakat kendileri CD-1 ırkı hibrid 5-6 haftalık erkek fareleri laboratuvarlarında vazektomi ameliyatı yaptıklarını, ve bu fareleri alıcıların senkronizasyonunda kullandıklarını bildirmişlerdir.

Vazektomi ameliyatı yapılan erkek fareler bir haftalık postoperatif bakımdan sonra, bunların en az 3 kez fertil dişi farelerle çiftleştirilerek dişilerde vaginal plak kontrolü yapıldıktan ve, bu dişi farelerin gebe kalmadıkları belirlendikten sonra vazektomi ameliyatının başarılı olduğuna karar verilebilmektedir (30,42).

Vazektomize hayvan plak kontrolünden geçirilmeden kullanılırsa, vasa deferenisinde sperma kalacağından dolayı alıcı dişiyi dölleyeceği ve böylece alıcının gebe kalabileceği bildirilmektedir (30).

Haftanın 5 günü 4-8 alıcı dişi hazırlanması isteniyorsa, 20 adet vazektomize farenin yeterli olabileceği, ayrıca bu farelerin iki günde bir kez olmak üzere yaklaşık 2 yıl kullanılabilceği ve ardarda 4-6 defa alıcı dişilerle çiftleşmeyen vazektomize farelerin elden çıkarıldığı belirtilmektedir (42).

Alıcı (recipient) olarak kullanılacak fare ırkları, yapılan bilimsel çalışmalarda değişiklik göstermektedir. Örneğin bazı araştırmacılar, 6 haftalıktan büyük 20 gramın üstünde (C57BL/6 x BALB/C) F<sub>1</sub>, (C57BL/6 x SJL/j) F<sub>1</sub>, (C57BL/6 x CBA) F<sub>1</sub>, ve CD-1 ırkları gibi hibrid fare soylarını alıcı anne olarak kullanmışlar ve sonuçta outbred fare ırklarının en iyi sonucu verdiğini bildirmişlerdir (2,3,6,9,23,42,57).

Alıcıların senkronizasyonu için 20 vazektomize fare ile 40 alıcı farenin 2 dişi'ye 1 erkek fare olmak üzere çiftleşmeye alınabileceği, fakat çiftleşme zamanının süperovule edilen farelere göre değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (2).

Gordon (30), süper ovule edilen dişi farelere hCG enjeksiyonu yapıldığı anda bir vazektomize erkek ile iki alıcı dişiyi aynı anda çiftleştirdiğini ve ertesi gün vaginal plağını kontrol ederek pozitif olanları seçip, bu alıcı fareleri 0.5 günlük alıcı olarak değerlendirmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda (2,3), süperovule edilen dişi farelere hCG enjeksiyonu yapıldıktan 3 saat sonra, alıcıların senkronizasyonu için bir vazektomize erkek ile iki alıcı dişiyi çiftleştirdiklerini ve ertesi gün sabah 8:30'da vaginal plak kontrolü yaptıklarını ve pozitif olan alıcı fareleri embriyo transferi zamanı açısından yarım günlük alıcı fare olarak kabul ettiklerini bildirmişlerdir.

Vaginal plağın, erkeğin seminal sıvısının koagüle olmuş proteini olarak tarif edildiği, bu plağın varlığında hayvanın döllenmiş olduğuna karar verileceği, bazı fare ırklarında plak küçük olacağından dolayı alıcı dişinin vaginasına dikkatli bakılması gerektiği ve vaginal plağın görüldüğü gün 0. gün olarak kabul edildiği bildirilmektedir (15,20,30,54,55,59).

Bir hücreliden morula safhasına kadar olan embriyolar, alıcıların senkronizasyonundan 0.5-1.5 gün sonra oviduktlarının ampulla bölgesine doğru transfer edilebileceği, 3.5-4.0 günlük blastositlerin ise en geç 2.5 günlük alıcıların cornu uterilerine transfer edilebilmektedir (42).

## **2.2.4. Embriyoların Kazanılması**

### **2.2.4.1. Medium Hazırlanması**

Yıkama ve kültür mediumları, embriyolar kazanılmadan önce günlük taze olarak hazırlanmalıdır. Gordon (30), tarafından fare embriyolarında kullanılan MEM mediumun içeriği aşağıdaki gibidir.

#### **Mouse Embriyo Medium (MEM)**

<b><u>Kimyasal Maddeler</u></b>	<b><u>G/litre</u></b>
NaCl	5.15 g
KCl	0.36 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.29 g
$\text{NaHCO}_3$	11.00 g
Glucose	1.00 g
Calcium Lactate- $5\text{H}_2\text{O}$	0.53 g
Sodium Lactate (%60)	3.68 ml
Phenol Red (%1)	1.00 ml
BSA (Fraction 5 V)	3.00 g
Penicillin-Streptomycin (10.000 Ün./ml, 10.000 $\mu$ /ml)	10.00 ml
Distile $\text{H}_2\text{O}$	985 ml

Quinn ve ark (67), yıkama mediumu olarak bikarbonatı azaltılmış ve yerine hepes ilave edilmiş modifiye Kreps-Ringer solusyonu olan M<sub>2</sub> mediumunu aşağıda gösterildiği gibi hazırlayarak kullanmışlardır.

### M2 MEDİUMU

<u>Kimyasal Maddeler</u>	<u>G/litre</u>
NaCl	5.533
KCl	0.356
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.252
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.162
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.293
NaHCO <sub>3</sub>	0.349
Hepes	4.969
Sodium Lactate	2.610
Sodium Pyruvate	0.036
Glucose	1.000
BSA	4.000
Penicillin G. Potassium	0.060
Streptomycin Sulfate	0.050
Phenol Red	0.010

2 x Distile H<sub>2</sub>O ile 1 lt'ye tamamlanır.

Araştırmacılar M2 mediumunun Ph'sını 0.2 N NaOH kullanarak 7.2 - 7.4 sınırları içerisine denk getirmişlerdir. Bu araştırmacılar, M2 mediumunu bir müddet CO<sub>2</sub> inkübatörü dışında bırakıldığında mediumun pH'sının aşırı alkaliye kayacağından, yapısındaki bikarbonatın yerine hepes tamponu kullandıklarını bildirmişlerdir (23,42).

Çeşitli araştırmacılar (11,23,42,76,80), mediumda kullandıkları kimyasal maddelerin molekül değerlerini yayınlarında bildirmişlerdir. Örneğin, modifiye Krebs-Ringer bikarbonat solusyonunun mol değerleri aşağıda belirtildiği gibidir.

<u>Kimyasal Maddeler</u>	<u>miliMolar</u>
NaCl	94.6 mM
KCl	4.78 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.71 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.19 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.07 mM
Sodium Lactate	21.58 mM
Sodium Pyruvate	0.50 mM
Glukose	5.56 mM
Hepes	21.00 mM

DePamphilis ve ark. (23), medium yapımında kullandıkları substansların tümünün doku kültüründe kullanılan kimyasal maddelerden hazırladıklarını, kullandığı tüm malzemenin plastik ve disposable olduğunu, ayrıca mediumda kullandığı suyu önce deiyonize yaptığını ve daha sonra da iki kez distille ettiğini bildirmişlerdir.

Hogan ve ark. (42) kullanılan kimyasal maddelerin tamamının 10 veya 100 kez konsantre stokları hazırlanarak -20 °C de saklanabileceğini, ayrıca M2 mediumunun yapımında kullandıkları stok solusyonları aşağıda gösterildiği şekilde hazırladıklarını bildirmişlerdir (42).

<b><u>Stok A</u></b>	<b><u>Kimyasal Maddeler</u></b>	<b><u>Gr/100 ml</u></b>
(10 x konsantrasyon)	NaCl	5.534
	KCl	0.356
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.162
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.293
	Sodium Lactate	2.610
	Glukose	1.000
	Penicillin	0.060
	Streptomycin	0.050

<b><u>Stok B</u></b>	<b><u>Kimyasal Maddeler</u></b>	<b><u>Gr/100 ml</u></b>
(10 x konsantrasyon)	NaHCO <sub>3</sub>	2.101
	Phenol Red	0.010

<b><u>Stok C</u></b>	<b><u>Kimyasal Maddeler</u></b>	<b><u>Gr/100 ml</u></b>
(100 x konsantrasyon)	Sodium pyruvate	0.036

<b><u>Stok D</u></b>	<b><u>Kimyasal Maddeler</u></b>	<b><u>Gr/100 ml</u></b>
(100 x konsantrasyon)	CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.252

<b><u>Stok E</u></b>	<b><u>Kimyasal Maddeler</u></b>	<b><u>Gr/100 ml</u></b>
(10 x konsantrasyon)	Hepes	5.958
	Phenol Red	0.010

**M2 Mediumunun Ana Stoklardan Hazırlanışı**

<b><u>Stok</u></b>	<b><u>10 ml</u></b>	<b><u>50 ml</u></b>	<b><u>100 ml</u></b>
A (x10)	1.00	5.00	10.0
B (x10)	0.16	0.80	1.6
C (x100)	0.10	0.50	1.0
D (x100)	0.10	0.50	1.0
E (x100)	0.84	4.20	8.4
H <sub>2</sub> O	7.80	39.0	78.0
BSA	40 mg	200 mg	400 mg

Ana stoklardan hazırlanan M2 mediumunun pH sı 0.2 N NaOH ile 7.2 - 7.4'e ayarlandıktan sonra millipore filtreden süzülmekte ve 1 hafta +4 °C de plastik falkon tüplerde saklanmaktadır (42). Medium petri kutusu içine dökülür ve üzerine parafin veya mineral yağı örtülerek yaklaşık bir saat 37 °C de bekletildikten sonra embriyo kazanılması işlemine başlanacağı bildirilmiştir (30).

**2.2.4.2. Embriyoların Kazanılması**

Süperovule olan dişilerin vaginal plak gösterenleri laparatomiden önce servikal dislokasyonla öldürülürler (2,3,23,30,37,42,51,55,79). Öldürülen farelerin abdominal bölgesi bir makas yardımıyla kesilir ve üreme organlarından ovidukt ve ovariumlar yağ tabakasıyla beraber çekilerek abdominal bölgenin dışına alınır, daha sonra ovidukt cornu uteri ile ovaryum arasından dikkatli bir şekilde iris makasıyla kesilerek petri kutusu içine alınır ve üzerine enzimli medium (300 ünite Hyaluronidase enzim / 1 ml M2 medium) oviduktun üzerini kapatacak şekilde dökülür. Disseksiyon mikroskopunun 20x veya 40x büyütmesinde oviduktun ampulla bölgesi bulunur ve burada kumulus hücreleri ile çevrili yumurtalar ampulla içinde görülür 5 numara iki pens yardımıyla ampulla bölgesi uzulmasına yırtılarak, kumulus hücreleri ile çevrili yumurtalar enzimli mediumun içine

alınır. Burada birkaç dakika bekletilerek enzimin kumulus hücrelerini sindirmesi sağlandıktan sonra 9 inch'lik pastör pipetinden yapılmış iç çapı 150-200  $\mu\text{m}$  (Embriyonun çapından yaklaşık 1.5-2 kez daha büyük) olan embriyo manipulasyon pipetiyle birkaç kez çekilip bırakılır ve sonra enzim içermeyen yıkama mediumunun (M2) içine alınır. Burada birkaç kez daha yıkandıktan sonra kullanılana kadar 37°C de M2 mediumunda bekletilirler (2,3,13,23,30,37,42,51,54,55,79,80).

Oviduktlar zamanında açılmazlarsa kumulus hücreleriyle çevrili embriyolar dağılacığından dolayı embriyo eldesinin güçleşeceği bildirilmektedir (42).

### **2.2.5. Kazanılan Embriyoların Değerlendirilmesi**

Kazanılan embriyoların klasifikasyonları ve kaliteleri hakkında karar vermek bu gibi çalışmalarda en önemli kriterlerdendir. Mikroenjeksiyondan başarılı sonuç alabilmek için, özellikle kazanılan embriyoların döllenip döllenmedikleri, zona pellucidalarının durumu ve sitoplazmalarının homojeniteleri hakkında karar vermek mikroenjeksiyon için çok önemlidir (23,42).

Kazanılan döllenmiş tek hücreli embriyoların fertilize olup olmadığını belirlemek için, erkek ve dişi pronukleuslarının görülmesi veya ikinci polar cisimciğinin varlığı ile belirlenebileceği bildirilmektedir (30,42,56).

Embriyoların morfolojik incelenmeleri sonucunda normal büyüklükte ve daire şeklinde olmaları gerektiği, ayrıca sitoplazmanın berraklığı ve zona pellucidalarının düzgün olmasının gerekliliği vurgulanmıştır (30,34).

Embriyoların değerlendirilmesinin 200-400 büyütmedeki Differential İnterference Contrast (DIC) mikroskopunda çok rahat ve net bir şekilde yapılabileceği bildirilmiştir (23,30,40,42,66).

### **2.3. Gen Seçimi ve Gen Konstraktlarının Hazırlanması**

Mikroenjeksiyondan önce enjekte edilecek genin seçilerek hazırlanması gerekmektedir ve eğer yeni bir transgenik hayvan ünitesi kurulacaksa öncelikle bilinen gen konstraktlarının aktarımıyla işe başlanılmasının gerekliliği vurgulanmaktadır (73).

Transgenik çalışmalarda ilk önce SV40 (Simian Virus 40) DNA fragmentleri (46), daha sonraları fare Metallothionein-I promotor (MT-I) genini, rat büyüme hormonu (rGH) geni ile birleştirdikten (Rekombinat Gen) sonra mikroenjeksiyon yoluyla aktarıldığı (40,64), ve bu çalışmaların devamında fare metallothionein-1 promotor (MT-I) genini, insan büyüme hormonu (hGH) geni ile birleştirildiği ve mikroenjeksiyon yoluyla aktarıldığı bildirilmektedir (63).

Daha önceden bilinen gen kontraktı ile transgenik çalışmalara başlamak önemlidir çünkü, bu gen kontraktlarının integrasyonu ve ekspresyonu farelerde gerçekleştirilmiştir.

Transgenik hayvan eldesinde kullanılacak gen, Rekombinant DNA teknolojisiyle elde edilir. Bunun için bu teknoloji kullanılarak, bir genin promotor (DNA üzerinde, RNA polimerase enziminin bağlanarak transkripsiyonu başlattığı bölge) bölgesi, hangi gen nakil etmek isteniyorsa o genin fonksiyonel (kodlayan) kısmına takılarak elde edilir (21).

Bugün vektör olarak kullanılan plasmidleri bulmak mümkündür ve hala yeni genlerin klonlanması çalışmaları gen mühendisleri tarafından yapılmaktadır.

Selden ve ark. (72), pUC12 plasmidinden pXGH5 [mouse Metallothionein-1 promotor (mMT-I) + human Growth Hormon (hGH) geni] füzyon genini restriksiyon (genin istenilen bölgelerinden kesilmesini sağlayan enzim) enzimleri (EcoR1, BamH1 v.s) kullanarak plasmidden linear olarak kestiklerini sonra pXGH5 gen fragmentlerini agaroz jel elektroforezinde yürüterek 4.0 kb (kilo baz) lık DNA fragmentlerini jelden keserek çıkardıklarını ve daha sonra bu fragmentlerin jelden temizlenmesi için önce phenol ile ekstraksiyonunu yapıp sonra etanolla çöktürdükten sonra, enjeksiyon çözeltisi (5-10 mM Tris [pH 7.4] ve 0.1 mM EDTA) ile konsantrasyonunu 1-3 µg/ml ye ayarlayarak gen kontraktını hazır hale getirmişlerdir.

Yapılan çalışmada mikronjeksiyonda kullanılmak üzere çok çeşitli gen kontraktları hazırlanmıştır ve hazırlanma aşamalarında aşağıdaki hususlara dikkat edinilmesinin gerekliliği bildirilmektedir (13,23,42).

- 1-) DNA'nın şekli (linear veya sirküler [Plasmid]).
  - 2-) Kesilen linear DNA'nın uç kısımlarının, küt uçlu (Blunt) veya yapışkan uçlu (Cohesive) olmasına,
  - 3-) DNA'nın konsantrasyonuna,
  - 4-) DNA'nın içinde bulunduğu çözeltilinin kompozisyonuna,
  - 5-) DNA'nın büyüklüğüne,
  - 6-) DNA'nın pürifikasyonuna,
  - 7-) Plasmidin kendisine ait gen dizilerinin aktarılacak gen konstraktının içinde olmaması.
- Gibi faktörlerin transgenik hayvan üretiminde başarı şansını etkilediği bildirilmiştir.

Yapılan mikroenjeksiyon çalışmalarında DNA fragmentinin 100-1000 kopya arasında olması gerektiği (27), veya 1pl (piko litre) de 40-400 kopya genin gerekli olduğu bildirilmiştir (17).

Swift ve ark. (75), Rat Pankreatik Elastin I Geninin 27 kb'lık (kilobase) fragmenti ki bu yaklaşık 200 kopya gen fragmenti, injeksiyon çözeltilinde [10mM Tris-CL (pH 7.5), 0.25 mM EDTA] DNA'nın konsantrasyonunu 3µg/ml'de olacak şekilde dilue yaparak mikroenjeksiyon ile fare zigotlarına verdiklerini bildirmişlerdir.

## **2.4. Gen Transferinde Kullanılan Teknikler**

### **2.4.1. Viral Vektörlerle Gen Transferi Tekniği**

İnsan ve hayvanlara ait çok önemli genlerden bazılarının, ökaryotik viral vektörler aracılığı ile embriyolara nakli ve nakil işleminden sonra bu genlerin integrasyon ve ekspresyonlarının sağlandığı bildirilmektedir (4). Bu vektörler, birçok DNA ve RNA karakterinde genetik materyal taşıyan, özellikle RNA karakterindeki genoma sahip olan viruslardan, retrovirusların dışardan verilen yabancı DNA ile kombinasyonundan elde edilen rekombinant vektörlerinin fazlaca kullanıldığı ve bu rekombinant retroviral vektörlerin belirli bir kromozomun bölgesinde sadece bir proviral kopyasının yerleştiği ve integrasyonunda mozaikleşmenin olduğu bildirilmektedir (42,45).

Bu tekniğin germ hücrelerine yabancı DNA'nın integrasyonunda çok fazla verimli olmadığı, fakat tavuk embriyolarında daha başarılı olduğu bildirilmektedir (45).

#### **2.4.2. Embriyonik Stem Cells Tekniği**

Son zamanlarda kullanılmaya başlayan bu teknikle, blastocyst'in inner cell mass (ICM) hücrelerinden elde edilen embriyonik stem hücrelerinde kaymera oluşturmak için verilmesi düşünülen yabancı DNA'nın transformasyon veya transfeksiyon yoluyla aktarılması işleminden sonra, alıcı bir blastocyst'in blastosel boşluğuna enjekte edildiği ve bu hücrelerin embriyonun gelişmesi esnasında hemen hemen bütün fotal dokulara katıldığını ve bu tekniğin gen transferi uygulamalarına alternatif bir yol sunduğu bildirilmektedir (45).

#### **2.4.3. Mikroenjeksiyon Tekniği**

##### **2.4.3.1. Mikroenjeksiyonda Kullanılan Aletler ve Özellikleri**

Transgenik hayvan üretiminde yukarıda açıklanan çeşitli teknikler geliştirilmesine rağmen pratikte en yaygın olanı tek hücreli embriyonun (zigot) bir pronukleusuna rekombinant DNA'nın doğrudan mikroenjeksiyon tekniğiyle verilmesinin, sonuçlar açısından uygun olacağı bildirilmektedir (31,45,53,71,81).

Mikroenjeksiyon tekniğiyle gen transferine geçmeden önce bu tekniği uygulamak için gerekli olan alet ve ekipmanların özellikleri, kimi araştırmacılar tarafından aşağıdaki şekilde bildirilmiştir.

#### **- Mikroenjeksiyon Seti -**

- a) Differential Interferens Contrast (DIC) mikroskop,
- b) Mikromanipulatorler,
- c) Mikroenjektör,
- d) Hamilton şırınga, mikropuller ve mikroforj'dur.

a) DIC Mikroskop: Mikroenjeksiyon genellikle sabit tablalı ters (Inverted) mikroskop altında kolay bir şekilde yapılmaktadır. Bunun için en iyi mikroskopun Zeiss IM 35, Nikon veya Olympus marka IMT-2. binokuler mikroskoplar olduğu ve mikroenjeksiyonun damlayı asılı tutan çukur lamlarda yapılmasının ve mikroskopun objektifinin 200-300 büyütmede olmasının gerekliliği, ayrıca mikroskopta kullanılan optik sisteminin Nomarski veya Hoffman optiği olmasının tercih edildiği, bu optik sistemler ince seçiciliğe sahip olduğundan, embriyolardaki pronukleusların dış ve iç kısımlarının daha rahat izlenebileceği ve mikroenjeksiyonun daha rahat yapılabileceği bildirilmektedir (23,30,42).

Hammer ve ark. (40), tavşanlarda pronukleusun DIC mikroskopunda kolay görülebilmesine karşın, koyun embriyolarında zor görüldüğünü ve bunun için embriyoların floresans boyalarla boyanmasını tavsiye etmektedirler.

Wilmot ve ark. (78), domuz ve sığır embriyolarını santrifüj yaptıktan sonra pronukleuslarını DIC mikroskopunda belirleyebildiklerini bildirmişlerdir.

b) Mikromaniplatör: Embriyo tutucu (holding) ve mikroenjeksiyon pipeti ile bu pipetlerin tutucularını beraberce x,y,z eksenleri doğrultusunda hareketlerini sağlar. Mikromaniplatör modelinin seçimi araştırmacılar tarafından değişmektedir (23,30).

c) Mikroenjektör: Bu alet mikroenjeksiyon pipetinde bulunan DNA solusyonunun embriyoya belirli basınç altında verilmesini sağlar ve azot gazı ile çalışır.

Yapılan bir çalışmada araştırmacılar (23). Eppendorf marka mikroenjektörü kullandıklarını ve mikroenjeksiyon çalışmalarında embriyo tutucu pipetin basıncını  $\sim 10$ , enjeksiyon için  $\sim 400$  ve enjeksiyon pipetinin temizleme basıncının  $\sim 6000$  hektopaskal olarak kullandıklarını bildirmişlerdir.

d) Hamilton şırınga: Bu şırınganın 150-250  $\mu$ l arasında bir hacimde olması gerektiği belirtilmektedir (23). Şırınganın ucuna ince bir hortum takılacağı ve hortumun diğer ucu embriyo tutucu pipetin arka bölgesine monte edilerek şırınganın kullanıma hazır hale geleceği bildirilmektedir (23,30,42).

Çeşitli araştırmacılar mikroenjeksiyonda kullandıkları pipetlerin yapımını şöyle bildirmişlerdir. Öncelikle kullanılacak pipetlerin çapları belirlenmekte, sonra bu çaplara uygun bir şekilde yatay pipet çekici (PN-3 Narishige) aleti ayarlanmakta ve sonra pipetler çekilmektedir. Örneğin, mikroenjeksiyon pipetinin uç kısmının dış çapının 2  $\mu\text{m}$  ve iç çapının 1-1.5  $\mu\text{m}$ , embriyo tutucu (holding) pipetin ucunun ise dış çapının 100-120  $\mu\text{m}$  ve iç çapının 20-30  $\mu\text{m}$  arasında olmasının mikroenjeksiyonda optimal olduğunu ve ayrıca kullandıkları pipetlerin borosilikatlı camdan yapıldığını ifade etmişlerdir (13,23,30,42,52).

#### **2.4.3.2. Embriyolara Mikroenjeksiyon Tekniğiyle Gen Aktarımı**

Embriyolara gen aktarımında mikroenjeksiyon zamanının, süperovulasyonda kullanılan ışık döngüsüne bağlı olduğu bildirilmektedir. Işığın sabah 5'de yanıp akşam 7'de söndüğü programda, mikroenjeksiyonun öğleden sonra saat 2-7 arasında uygulanması gerektiği fakat bu zamanın deneme yolu ile bulunabileceği bildirilmektedir (42).

Pronuklear safhaya gelmiş olan embriyolar, çukur bir lamın ortasında bulunan ve üzeri mineral yağla kapatılmış olan  $\sim 400 \mu\text{l}$ 'lik M2 mediumunun içine konmakta, preparatın hazır hale gelmesinden sonra, ters mikroskopun tablasına yerleştirilmekte ve mikroenjeksiyon setinde gerekli ayarlama işlemleri tamamlandıktan sonra mikroenjeksiyona başlanabileceği bildirilmektedir (23,30,42,52).

Brinster ve ark. (13), transgenik fare eldesinde sonuçlara etki eden faktörleri ortaya çıkarmak için çeşitli deneyler yapmışlar ve şu sonuçları elde etmişlerdir.

- 1) 10 mM Tris.HCL ve 0.25 mM EDTA (pH 7.5) enjeksiyon bufferinde 1-2 ng/ $\mu\text{l}$ 'lik DNA konsantrasyonunun birkaç yüz kopyasının mikroenjeksiyon için uygun olduğunu ve sonuçta DNA konsantrasyonu arttığı zaman embriyo için toksik etki yaptığı,
- 2) Bufferde kullanılan EDTA konsantrasyonunun 0.1-0.3 mM olması gerektiğini,
- 3) Hazırlanan DNA formunun linear olmasının transgenik yüzdelerini arttırdığını,
- 4) Hazırlanan DNA solusyonun erkek pronukleusa verilmesi gerektiğini,
- 5) Alıcı (donor) ve verici (recipient) olarak hibrid farelerin kullanılmasının

transgenik sonuçlar açısından optimal olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan transgenik çalışmalarda mikroenjeksiyonun yeri olarak genelde embriyonun erkek pronukleusu tercih edilmektedir (13,17,18,23,27,72).

Mikroenjeksiyon çalışmalarında, aktarımı yapılacak DNA hacmini  $\sim 2$  pl (piko litre) ve bu hacmi kontrol için de pronukleusun iki kat büyümesiyle elde edildiği ifade edilmektedir (12,13,17,23,70).

Mikroenjeksiyondaki başarının şu faktörlere bağlı olduğu çeşitli araştırmacı gruplar tarafından bildirilmektedir (12,13,23,40,42,72,78):

- a-) Tekniği uygulayan kişinin deneyim ve becerisi.
- b-) DNA'nın konsantrasyonun 1-3 $\mu$ l/ml olması.
- c-) Mikroenjeksiyonun verilmiş yeri (pronukleus, sitoplazma, blastomerlere).
- d-) DNA'nın şekli (linear, sirküler v.s).
- e-) Kullanılan tampon çözeltinin kompozisyonu.
- f-) DNA'nın kopya sayısı.

Hogan ve ark. (42) yaptıkları mikroenjeksiyon çalışmasında kullandıkları DNA'nın kopya sayısının piko litrede 200-400 molekül, konsantrasyonun 1-2  $\mu$ g/ml ve DNA fragmentininde 5 kb (kilo baz) olduğunu bildirmişlerdir.

Mikroenjeksiyon işlemi bittikten sonra tüm embriyoların canlılık yönünden kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle enjeksiyondan sonra embriyolardan belirli perivitellin boşluğa, düzgün plazma membranına ve kolayca görünebilen pronukleusa sahip olanlar seçilerek alıcılara transfer yapılabileceği bildirilmektedir (2,23,30,42,78).

### **2.5. Alıcı Farelere (Recipient) Embriyo Transferi**

Farelerde embriyo transferi, bir hücreli dönemden blastocyst dönemine kadar olan embriyoların, vazektomize erkek farelerle senkronize edilen alıcı (recipient) farelerin reproduktif kanalına embriyoların aktarılması ile yapılır (42,70).

Bazı araştırmacılar, farelerde embriyo ( 0.5-2.5 günlük embriyo ) transferini yapmak için oviduktun fimbriya bölgesinden ampullaya doğru embriyoları transfer yaptıklarını bildirmişlerdir (24,42,68).

DePamphilis ve ark. (23), vazektomize erkeklerle senkronize edilen alıcı fareleri % 2.5 lik avertin solusyonuyla i.p. enjeksiyon yaptıklarını ve bu genel anestezinin yaklaşık 40 dakika sürdüğünü bu zaman içerisinde transfer pipetine çektikleri 10-12 adet embriyoyu x15 büyütmedeki disseksiyon mikroskopu altında alıcı farenin infundibulumundan pipetle girerek, ampulla bölgesine doğru verdiklerini bildirmişlerdir.

## **2.6. Doğan Hayvan Yavrularında Transgenik Analiz Yöntemleri**

Embriyolara gen aktarımından sonra transferden doğan yavrularda aktarılan genin var olup olmadığının kontrolü için çeşitli moleküler teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikleri kullanabilmek için doğan yavrulardan DNA elde etmek gerekmektedir. Bunun için yavrular 2-3 haftalık yaş periyoduna geldikleri zaman, kuyruk dokularından çok ufak bir parça kesilip alınarak, dokunun ekstraksiyonu yapıldığında yaklaşık 10µg DNA elde edilebileceği bildirilmiştir (12,13,17,23,40,42,65). Daha sonra izole edilen DNA aşağıda belirtilen tekniklerle analiz edilmektedir.

### **2.6.1. Dot-Blot Hibridizasyon**

Elde edilen DNA önce konsantre edilmekte ve sonra denatürasyona tabii tutulmaktadır. Bu işlemlerden sonra kullanıma hazır hale getirilen DNA süspan-siyonundan bir damla alınarak nitrosellüloz kağıdı üzerine yerleştirilmekte, ısıtılarak fik-sasyon yapılmakta ve kağıt üzerine daha önceden hazırlanan <sup>32</sup>P ile işaretlenmiş prop (cDNA) konarak hibridizasyon sağlanmaktadır. Son olarak, filtre kağıdı üzerine X- ışın-larına duyarlı bir film yerleştirilmekte, radyoaktivitenin filme etkimesi sağlanmakta (Otoradiografi) ve üzerinde DNA-DNA hibridizasyon bölgeleri siyah lekeler halinde görüldüğü zaman, dışardan verilen genin kromozomlara girdiği (integre olduğu) tespit edilmiş olmaktadır (42).

### **2.6.2. Southern-Blot Hibridizasyon**

Southern isimli bir araştırıcı tarafından geliştirildiği için bu tekniğe kendi ismi verilmiştir. Bu teknik transgenik analizlerde dot-blot'a göre çok daha yaygın kullanılmaktadır (4,12,42,65). Tekniğe göre doğan yavruların kuyruk dokusundan elde edilen DNA fragmentleri önce spesifik resitriksiyon enzimleriyle (rn, EcoRI, BamH1 v.b) kesilerek agarose jel elektroforezisinde moleküler ağrılıklarına göre seperasyonlar yapılmakta ve seperasyondaki istenen DNA bantları Ethidium Bromidle boyanarak ortaya konmaktadır. Sonra jelin üzerine nitrosellüloz kağıdı koyarak istenen bantlar elktrotransfer yoluyla nitrosellüloz kağına transfer edilmekte ve kağıt şeritler kurutularak DNA'lar denatürasyona tabii tutulmaktadır. Denatrasyondan sonra kağıt şeritler belirli bir ısıda (80°C de) vakum altında tutularak kağıt üzerinde fikse edilmektedir. Fiksasyondan sonra kağıtların üzerine <sup>32</sup>P ile işaretili prob DNA'ları koyarak DNA-DNA hibridizasyonu sağlanmakta ve otoradiografi yapılarak filmde oluşacak siyah lekelere göre genin varlığına karar verilebilmektedir.

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1. MATERYAL**

Çalışmada hayvan materyali olarak C57BL/6J x BALBC ırkı farelerin çaprazlamasından doğan CB6 hibrid farelerden (F1) 146'sı verici, 38'ide alıcı olmak üzere toplam 184 dişi fare kullanıldı. Vericilerin tohumlanması için 30 CB6 ırkı (F1) erkek fare ve alıcıların senkronizasyonu için de 30 vazektomize fare kullanıldı.

Yapılan çalışmalarda transfer amacıyla 2 farklı gen kullanıldı. Bu genlerden biri olan pXGH5 geni insan büyüme hormonunu kodlamaktadır. İkinci gen, p53, insan tümör supresör genlerinden birisi olarak bilinmektedir. Çalışmada aktarılan ikinci gen (p53) mutant formu olan insan p53-248 geni kullanıldı.

Her iki gen konstraktı Tris Buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.5) içinde 2 µg/ml DNA konsantrasyonunda olacak biçimde hazırlandı. Ayrıca pXGH5 geninde promotor olarak mMT-1 (mouse Metallothionein) ve p53-248 geninde ise CMV (Cyto Megalo Virus) kullanıldı.

Gen enjeksiyonu gerçekleştirilen embriyolar transfer edildiler ve doğan yavrularda gen analizleri yapılarak transgenik yavrular belirlenmeye çalışıldı.

### **3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler: (Resim 1)**

Çalışma sırasında, gerek embriyoların elde edilmesinde, gerek gen transferi ve gerekse embriyoların transferinde kullanılan kimyasal maddelerin dökümü aşağıda belirtildiği gibidir.

<b><u>Kimyasal maddeler</u></b>	<b><u>Kat No</u></b>	<b><u>Firma</u></b>	<b><u>Molekül Ağırlığı/Mol</u></b>
NaCl	6400	Merck	58.44
KCl	P-4504	Sigma	74.55
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4871	Merck	136,09
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	549	Merck	246,48
NaHCO <sub>3</sub>	S-4019	Sigma	84,01
Hepes	H-3375	Sigma	238,3
Phenol Red.	P-4758	Sigma	354,38
D(+) Glucose	G-8270	Sigma	180,2
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2380	Merck	147.02
Ca-Lactate. 3H <sub>2</sub> O [L(+ )Lactic acid)]	L-2000	Sigma	109,1
Na-Pyruvate (Pyruvic Acid)	P-2256	Sigma	110
K-Pen G	P-7794	Sigma	-
Strept.Sulphate	S-6501	Sigma	1457,4
NaOH	S-5881	Sigma	-
Mineral Oil	M-5904	Sigma	-
BSA	A-3350	Sigma	-
PMSG	G-4877	Sigma	-
HCG		Organon	-
Beewax	2252	Merck	-
[(Wachs gebleicht)DAB8]			
İnjesiyonluk su		Haver Lab.	-

### 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler

<u>Cihaz</u>	<u>Firma</u>	<u>Katalog No</u>
İnverted Mikroskop	Carl Zeiss	Axiovert 35M
Microinjektor	" "	Eppendorf 5242
Stereomikroskop	" "	SV8
Mikrometreli Hamilton Şırınga		MSH2000
Oküler Mikrometresi	" "	434013
Yatay pipet çekici	Narishige Lab.	PN-3
2 Ad Mikromaniplatör	Leitz	MR-ML
Hava yastıklı masa	Newport	M-VM-3660-OPT
Mikroforge	Cit Alcatel	086945
Etüv	Ehret	3023
Manyetik ısıtıcı	Ika-Labortechnik	1660 800
Azot Tüpü	Bos	
Otoklav	Medexport	
Otomatik pipet	Eppendorf	50-250 µl
Lamel	Deckglaser	24x50 mm
Video Monitor	Sony	Pvm-122CE (31CM)
Mikroskop kamerası	Sony	CCD
Mikroskop fotoğraf mak.	Contax	167 MT
2 ad Pipet tutucu	Leitz	5242 150,009
Pyrex disposable pipet	Corning	7099S-50
Mikroenjeksiyon ve holding pipeti	Clark elektromedical instruments	GC120TF-10 350 PCS
Cerrahi set	Eusclap	
5-6/0 Katküt		

### **3.1.3. Çalışmada Kullanılan Gereçlerin Hazırlanması**

#### **3.1.3.1. Farelerin Üretilmesi Ve Bakımı**

Laboratuvarımızda ürettiğimiz farelerin damızlıkları Almanya'nın Hannover kentindeki ZFV (Zentralinstitut für Versuchstierzucht) laboratuvarından satın alındı. Bu fare ırklarının [C57BL/6J ve BALB/C] erkekleri 10'ar tane olmak üzere ayrı ayrı kafeslerde damızlık olarak tutuldu. Bu fareler en az 10 haftalık yaş gurubundan olan iri fenotipte farelerdi. Daha sonra 6-8 haftalık yaşındaki dişi fareler damızlık erkek fareler ile ikiye bir oranında çiftleştirildi ve 24-48 saatlik zaman aralığında bu dişi farelerin vaginal plakları zaman zaman kontrol edilerek çiftleşip çiftleşmediği hakkında karar verildi. Vaginal plak gösteren fareler ayrı bir doğum kafesine alınarak doğum süreleri olan 21 gün bekletildi. Doğumdan 21 gün sonra cinsiyet ayrımı yapılarak yavrular ayrı kafeslere alındılar.

Bu üretilen farelerden C57BL/6J erkek fare ile BALB/C ırkı dişi fareler 6-8 haftalık yaşa eriştikten sonra, embriyo eldesi için yukarıda anlatılan metod kullanılarak önce damızlıklar belirlendi ve sonra bu fareler kendi aralarında çiftleştirilerek CB6 F1 ırkı hibrid fareler üretildi.

Hibrid farelerin ve diğer inbred ırkların üretimi haftada en az 20-30 olacak biçimde düzenlendi.

Farelerin bulunduğu odanın ısısı 20-21 °C ye, nem % 50 ye gelecek şekilde klima ve nem kontrol cihazlarıyla ayarlandı, ışık bir zaman ayarlayıcı (Timer) ile 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak bir biçimde düzenlendi ve fareler günlük *Ad-Libitium* beslendi. Su ve yem otoklav yapılarak verildi. Ayrıca haftada 2 gün olmak üzere farelerin altlıkları temizlendi ve 15 günde bir olmak üzere kafesler, su şişeleri dezenfekte edildi.

### **3.1.3.2. Vazektomize Fare Eldesi**

Önce 10 haftalık yaş olgunluğuna erişmiş F<sub>1</sub> erkek CB6 ırkı gelişmiş hibrid fareler ayrıldı, daha sonra bu farelere Rompun ve Ketalar karışımı ile (30 µl+70 µl) 100µl dozajında İntraperitoneal enjeksiyon yapıldı. 30-45 dakikalık bir genel anestezi sağlandıktan sonra farenin abdominal bölgesinde bulunan prepusyal glandların 3-5 cm ilerisinden vertikal olarak deriye 1-2 cm lik ensizyon yapıldı. Daha sonra kas tabakaları kesilerek abdominal boşluğa girildi. Burada scrotum sıvazlanarak, testisler ensizyon aralığına doğru itildi ve ensizyon aralığından testislerdeki yağ dokusu bulundu ve yağ dokusu, testisler bulunana kadar ensizyon aralığından dışarı çekildi. Önce sağ ve daha sonra sol testis bulunarak abdominal boşluğun dışına alındı, cauda epididimiden köken alan tüp ve sert kordon şeklinde olan vasa deferens bulundu (Resim 2). Burası diğer dokulardan bir pens yardımıyla küt bir şekilde ayrılarak vasa deferensin aşağı ve yukarı taraflarına krome katkıle birer ligatür atıldı (Resim 3), daha sonra bu ligatürlerin arasından vasa deferensin bir parçası kesilerek alındı (Resim 4) ve alınan bu parça ameliyat masasının görünen bir tarafına bırakıldı. Daha sonra aynı işlem sol vasa deferens içinde yapılarak testisler tekrar abdominal boşluğun içine yerleştirildi. Daha sonra periton, kas tabakası ve deri 5/0 numara katkıle dikildi. Bu işlemler bitikten sonra daha önceden masaya bıraktığımız 2 adet vasa deferens parçası kontrol edildikten sonra fare 37 °C etüv içerisine bırakılarak ayılana kadar burada bırakıldı. Kesilen iki vasa deferens parçasının kontrol edilmesindeki amaç, ameliyat esnasında meydana gelebilecek bir unutkanlığı ortaya çıkartmaktır.

Vazektomi ameliyatı geçiren farelerin bir haftalık zaman periyodu içerisinde post-operatif bakımları yapıldı. Sonra en az üç kez olmak üzere fertil dişi farelerle eşleştirilerek vaginal plak kontrolü yapıldı. Üç kontrolden sonra dişi fareler gebe kalmamış ise bu vazektomize hayvanlar alıcı farelerin (recipient) senkronizasyonunda kullanılabilir diye karar verildi. Vazektomi ameliyatı 10 haftalık ergin 30 adet erkek CB6 F<sub>1</sub> ırkı hibrid farede yapıldı.

### **3.1.3.3. Yıkama (M2) Mediumunun Stoklarının hazırlanması**

M2 mediumunu hazırlamak için önce mediumun yapısını oluşturan kimyasal maddelerin ana stok solusyonları aşağıdaki şekilde hazırlandı.

<u>Stokların konsantrasyonu</u>	<u>Kimyasal Maddeler</u>	<u>50 ml'lik Falcon tüpte</u>
10 x	NaCl	2,7665 gr/50ml
100 x	KCl	1,78 gr/50ml
100 x	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.81 gr/50ml
100 x	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,465 gr/50ml
100 x	NaHCO <sub>3</sub>	1,745 gr/50ml
100 x	Ca-Lactate.3.H <sub>2</sub> O	2,35 gr/50ml
100 x	[L(+)]Lactic acid]	
100 x	Na-Pyruvate (Pyruvic acid)	0,18 gr/50ml
100 x	D(+)]Glucose	5,00 gr/50ml
100 x	K-Pen G	0,375 gr/50ml
100 x	Strept.Sulphate	0,25 gr/50ml

1) 10 x lik Hepes+Phenol Red'in Hazırlanması:

- a) 2,485 gr Hepes 50 ml falkon tüpe kondu ve üzerine,
  - b) 40 ml H<sub>2</sub>O+0,25 ml % 1 lik Phenol Red ilave edildi.
  - c) 5 Molar NaOH ile pH 7.4'e ayarlanarak hacim su ile 50 ml'ye tamamlandı.
  - d) Tamponlanmış Phenol Redli Hepesi 5'er ml'lik disposable enjektörlere bölündü.
- 2) 10x'lik NaCl Stoku da 5'er ml'lik disposable enjektörlere bölündü.
- 3) Hazırlanan tüm stok solusyonlar -20 °C deki derin dondurucuda saklandı.
- 4) Tüm stok solusyonlar ve M2 mediumu enjeksiyonluk (apirojen) sudan hazırlandı.

Haftalık (M2) mediumunun hazırlanması:

- 1) İlk önce derin dondurucuda bulunan stok solusyonların önce +4 °C de daha sonra oda ısısında bekletilerek çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra tüm stok solusyonlar çalkalandı.
- 2) 50 ml'lik Falkon tüp içerisine 25 ml H<sub>2</sub>O konuldu.
- 3) Bunun üzerine enjektörlerde bulunan 5 ml NaCl ve 5 ml Phenol Red'li Hepes ilave edildi.
- 4) Aşağıda yazılı herbir ana stoktan 500 µl otomatik pipetle alınarak yukardaki falkon tüpün içine konuldu.  
100 x'lik [KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, Ca-Lactate.3.H<sub>2</sub>O, Na-Pyruvate, D(+) Glucose, K-Pen.G, Strep.Sülfat]
- 5) Sonunda falkon tüpün volümü 50 ml'ye enjeksiyonluk H<sub>2</sub>O ile tamamlandı.
- 6) Hazırlanan bu 50 ml'lik solusyon 0.22 µm'lik millipor filtreden geçirildi.
- 7) Bu 50 ml'lik solusyonun içine 200 mg BSA ilave yapıldı ve tüp yavaşca ters düz edilerek BSA nın erimesi sağlandı. Böylelikle M2 mediumu hazırlanmış oldu.

### **3.1.3.4. Hormon, Enzim ve Solusyonların Hazırlanması**

**PMSG Hormonu (PMSG; Sigma):** Ticari olarak Sigma dan liyofilize toz halinde alınan 1000 Ünitelik PMSG hormonu önce 1000 IÜ/1 ml de olacak şekilde, hormon serum fizyolojikle çözdürüldü (süspansiyon). Hazırlanan bu ana stoktan otomatik pipetle 50µl alınarak 1ml'lik eppendorf tüplere bölündü. Daha sonra 50 µl/1ml de olacak şekilde serum fizyolojikle sulandırılıp, -20 °C de derin dondurucuda saklandı. Her bir eppendorf tüpün içindeki süspansiyon 10 fareye göre hazırlandı. Fare başına dozaj 5 IÜ/0.1 ml (=100µl) olacak şekilde hesaplandı.

**HCG Hormonu (Pregnyl; Organon):** 500 IÜ/1 ml olacak biçimde hormon serum fizyolojikle sulandırıldı ve hazırlanan bu ana stoktan 100'er µl alınarak bir ml'lik eppendorf tüplere bölündü. Daha sonra dozaj fare başına 5IÜ/ 100µl olacak şekilde, her tüp 1 ml'ye tamamlanarak -20 °C da saklandı

**Hyaluronidase enzimi:** Önce 60 mg enzim tartılıp 1000 µl'ye enjeksiyonluk suyla tamamlanarak ana stok hazırlandı. Bu ana stoktan otomatik pipetle 160 µl alınarak 1 ml'lik eppendorf tüplere bölündü. Daha sonra her tüp 1 ml'ye tamamlanarak 2. stok solusyon hazırlandı ve -20 °C de saklandı. Enzim kullanılacağı zaman dozaj 300 µg/1ml de olacak şekilde hesaplanarak 2. stok solusyondan otomatik pipetle 30 µl alınıp M2 medyumunu ile 1 ml'ye tamamlandı.

### **3.1.3.5. Pipetlerin ve Enjeksiyon Laminin Hazırlanması**

1-) **Embriyo toplama pipeti:** Bu pipet Corning marka pyrex disposable borosilikatlı cam borudan yapılmış olup, bunzen bekinde el yardımıyla çapları 150-200 µm olacak şekilde çekilerek hazırlandı.

2-) **Embriyo transfer pipeti:** Bu pipet de toplama pipeti ile aynı özelliklere sahip olup, çapı yaklaşık 100 µm olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra her iki çeşit pipetin ucu embriyoya zarar vermeyecek şekilde micrograyner taşında kesildi ve stereo mikroskop altında çap ve uçları kontrol edildi. Sağlam pipetler alüminyum folyo ile kaplı bir paket içine alınarak 90 °C de 2-4 saat kurutma fırınında bekletildi.

3-) Embriyo tutucu (Holding) pipet: Bu pipetler Clark elktromedikal GC120TF-10 katalog numaralı pipetlerden yapıldılar. Bu pipeti yapmak için yatay pipet çekici (Mikropuller) (Resim 20) (Heater: 4/80, Magnet Sub: 4/40, Magnet main: 6/80) kalibre edildi ve daha sonra bu yatay pipet çekicide pipetler çekildi. Hazırlanan pipetler micrograyner taşında dış çapı yaklaşık 100  $\mu\text{m}$  olacak şekilde kesildi ve ters mikroskopta 200 büyütme altında çap kontrolü yapıldı. Bu kontrolden sonra pipetin uç kısmının çapının 20-30  $\mu\text{m}$  olması için mikroforj aletinde (Resim 20) pipetin uç kısmı içeriye doğru kıvrıldı. Daha sonra aynı pipetin uç kısmına, mikroforj aleti kullanılarak yaklaşık olarak 30 derecelik bir açı verildi. Tutucu pipetler deneyden önce 2-3 adet olacak şekilde hazırlandılar.

4-) Mikroenjeksiyon pipeti: Bu pipetlerde tutucu pipet gibi aynı marka pipetten yapıldı. Pipet yapımından önce Mikropuller aleti (Resim 20) (Heater: 1/90, Magnet sub: 9/0, Magnet main: 10/0) kalibre edildi. Kalibrasyon, ısıtıcı flamentin şekline (omega şekli), kullanılan pipetin çapına ve özelliğine göre değiştiğinden bu ölçüler sabit olamamaktadır. Yukarıda bildirilen ölçülere göre alet kalibre edildikten sonra, pipetler çapı yaklaşık 1  $\mu\text{m}$  olacak şekilde mikropuller aletinde çekilerek yapıldı.

5-) Mikroenjeksiyon lamının hazırlanması: İnverted mikroskopun tablasının ölçüsüne göre dikdörtgen şeklinde pleksiglasdan ortası çukur olacak şekilde torna tezgahında hazırlatıldı. Hazırlanan lamın ortasını kapatacak ölçüde (24x50 mm) steril lamel beewax isimli yapıştırıcının manyetik ısıtıcıda eritilmesiyle, lamın açık olan ortasına yapıştırıldı. Böylelikle hazırlanan lamlar alüminyum folyolara sarılarak kullanıma hazır hale getirildiler.

## **3.2. METOD**

### **3.2.1. Verici Farelerden Embriyo Eldesi**

Embriyo eldesi aşağıda yazılı olan prosedüre göre yapıldı.

#### **3.2.1.1. Verici Farelerin (Donor) Süperovulasyonu**

Farelerde ovulasyon ve çiftleşme günlük ışık periyodu ile ilişkili olduğundan, elde edilecek embriyoların ne zaman pronuklear dönemde olacakları yaklaşık olarak belirlenmektedir. Laboratuvarında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışık periyodunda tutulan (C57BL/6J x BALB/C) F<sub>1</sub> ırkı hibrid 5-6 haftalık dişi farelere süperovulasyonu oluşturmak için aşağıdaki program uygulandı.

#### **- Süperovulasyon Programı -**

- a) Işık sabah saat 4:00 de yanıp akşam saat 16:00 da sönecek şekilde zaman ayarlı (timer) ile otomatik olarak ayarlandı.
- b) Mikroenjeksiyondan 3 gün önce (Pazartesi): Farelere saat 10:00 da 5 IU PMSG intra peritoneal olarak enjekte edildi.
- c) PMSG uygulamasından 48 saat sonra (Çarşamba): Farelere saat 10:00 da 5 IU hCG (Pregnyl), enjekte edildi. hCG enjeksiyonundan hemen sonra dişi fareler, önceden damızlık olarak ayrılmış bulunan aynı ırktan 10-12 haftalık erkek farelerle, bir dişiye bir erkek olmak üzere çiftleşmeye bırakıldı.
- d) Genellikle aynı gününün (Çarşamba) akşamı saat 22:00 da östrusun başlayacağı ve
- e) Aynı günün gecesinde saat 24:00-01:00 arasında ovulasyon ve çiftleşmenin gerçekleşmesi beklenmektedir.
- f) Mikroenjeksiyon günü (Perşembe): Sabah saat 6:00-6:30 arasında vericilerde vaginal plak kontrolü yapıldı. Plak gösteren verici fareler ayrılarak embriyo eldesi için ayrı bir kafesde bekletildi ve ayrıca vaginal palağın görüldüğü an embriyonun yaşı 0. gün olarak kabul edildi.
- g) Mikroenjeksiyon günü (Perşembe): Sabah saat 10:30-11:30 arasında pronukleuslar oluşmaya başlamaktadır.

### **3.2.1.2. Verici Farelerden Oviduktların Elde Edilmesi**

Çalışmada kullanılan ışık programına göre Perşembe sabah (0. gün) saat 6:30-7:00 arası oviduktların açılmasına ve saat 7:00-7:30 arasında ise embriyo eldesine başlandı.

Süperovule olan verici (donor) farelerden ovidukt dışarı alınmadan önce, iki 35 mm'lik petri kutusu içine M2 mediumu konuldu, buharlaşmayı ve kontaminasyonu engellemek için üzeri tamamen örtülecek biçimde mineral yağı ile kapatıldı. Daha sonra bu kutulardan biri (+) diğeri ise (-) işareti ile işaretlenerek 37 °C de yaklaşık bir saat kadar equilibrasyon'a bırakıldı. Ayrıca iki adet 5 er ml'lik steril enjektörlerden birisine yalnız M2 mediumu, diğeri ise 300 µg/ ml'de hyaluronidaz enzimi olacak şekilde M2 mediumu çekilerek etüvde yaklaşık 60 dakika bekletildi.

Süperovulasyon sonucunda vaginal plak gösteren tüm verici (donor) fareler servikal dislokasyonla öldürüldükten sonra tek tek batın bölgelerinden bir makas yardımıyla açıldı ve karın boşluğuna girildi. Karındaki diğer organlar vücut boşluğunun üst tarafına alındıktan sonra kornu uterilerle ona bağlı bulunan ovidukt ve ovaryum segmenti bulundu ve buradaki yağ tabakası diseke edildi (Resim 5). Saatçi pensi ile kornu uteri tutularak ovidukt, infundibulum ile ovaryum arasından çok ince bir makas ile kesildi. Aynı işlem diğer taraftaki ovidukt için de gerçekleştirildi. Böylece verici farelerin tüm oviduktları, steril 35 mm'lik petri kutusu içine alındılar. Embriyolar oviduktun ampulla bölgesinin yukarı kısmında lokalize olduğundan ovidukt dışarı alınırken ampulla bölgesinin patlatılmamasına özen gösterildi.

### **3.2.1.3. Oviduktan Embriyoların Kazanılması**

Petri kutusu içinde bulunan oviduktların üzerine hyaluronidaz enzimli M2 mediumu koyularak stereo mikroskop altında 20 büyütmede önce oviduktların ampulla bölgelerinin belirgin olup olmadıkları kontrol edildi ve mikroskop altında şişkin, şeffaf ve içinde bulutumsu kumulus hücre topluluklarının görüldüğü oviduktlar (Resim 6) saatçi pensi ile infundibulumdan tutuldu ve diğer pens ile de ampulla kısmı yırtıldı (Resim 7).

Böylece ampulla kısmında kumulus hücreleri ile beraber bir kitle halinde...

embriyolar enzimli M2 ortamına alındılar. Bu ortamda 3-5 dakika bekletildikten sonra kumulus hücrelerinden kurtulan embriyolar (Resim 8) çapı 150-200  $\mu\text{m}$  olan embriyo toplama pipeti ile çok süratli olarak toplanıp yapısında enzim bulunmayan M2 mediumu konulmuş bir başka petri kutusuna aktarıldılar. Daha sonra yeni bir pipet ile tüm embriyolar 3-4 kez yıkanarak temizlendiler. Bu temizleme işleminden sonra buradaki embriyolar daha önceden hazırlanan ve etüvde bulunan (-) işaretli, içinde üzeri mineral yağıyla kaplı olan M2 mediumlu petrilere yerleştirildiler. Daha sonra embriyolar 37 °C deki etüvde pronuklear döneme kadar bekletildi.

### **3.2.2. Kazanılan Embriyoların Değerlendirilmesi**

Mikroenjeksiyon ile gen aktarımında kullanılacak embriyonun pronuklear dönemde bulunması gerekmektedir. Bu nedenle embriyoların hangi zamanda pronuklear döneme geldiklerini hesaplamak için, süperovulasyonda kullanılan ışığın periyodunu ve gonadotropinlerin enjeksiyon zamanını bilmek gerekmektedir. Çalışmada kullanılan ışık periyoduna göre, embriyoların pronuklear döneme gelmesi gereken zaman sabah saat 10:30-11:30 arasındadır. İşte bu zamanda etüvde bulunan embriyolarda kalite kontrolü yapıldı. Yani, döllenmemiş yumurtalar (2.polar cisimciği belli olmayan) ve deforme olan embriyolar ortamdan alınarak geriye sadece zigotlar bırakıldı.

### **3.2.3. Alıcı (Recipient) Farelerin Senkronizasyonu**

Alıcı dişileri senkronize yapmak için materyal bölümünde açıklandığı gibi, üretilen vazektomize (C57BL/6j x BALB/C) CB6 F<sub>1</sub> ırkı hibrid 2 aylık fareler tek tek kafeslerde barındırıldı. Alıcı (recipient) fareler 10-12 haftalık yaş gurubunda bulunan CB6 F<sub>1</sub> hibrid dişi farelerden seçildi. Alıcı farelerin ne zaman senkronize yapılacağına karar verilebilmesi için, verici (donor) farelerin hCG enjeksiyon zamanını bilmek gerekmektedir. Bunun için, süperovulasyon prosedürüne uygun olarak, donörlara uygulanan hCG'nin enjeksiyon zamanından yaklaşık 5 saat sonra iki alıcı dişi bir vazektomize erkek ile çiftleştirilmeye alındılar. Yine süperovulasyon prosedürüne göre,

0. Gün (Perşembe) sabah saat 6:00-6:30 arası (recipient) alıcı dişilerin vaginal plakları kontrol edilerek pozitif olanların hepsi bir kafesde toplandı ve embriyo transferi için bekletilmeye alındılar. Vaginal plak gösteren bu fareler yarım günlük alıcı anne olarak değerlendirildiler.

#### **3.2.4. Fare Zigotuna Mikroenjeksiyon**

Aşağıdaki aletler mikroenjeksiyon çalışmasında kullanıldı. Bu cihazlar bir set oluşturduğu için bunlara mikroenjeksiyon seti denmektedir ve bu set aşağıdaki cihazları bünyesinde bulundurmaktadır (Resim 9).

- 1) İnvart Mikroskop (DIC).
- 2) 2 Ad. Sağ ve Sol Mikromaniplatör.
- 3) Mikroenjektör ve Buna Bağlı Azot Tüpü.
- 4) Mikrometreli Hamilton Şırınga.
- 5) 2 ad. Pipet tutucusu.
- 6) Mikroskop kamerası ve Monitör.

Zigotlara enjekte edilecek genler,  $\mu$ l'ye 200-400 molekül (DNA konsantrasyonu: 2  $\mu$ g/ml) düşecek şekilde Tris buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.5) içinde hazırlanır. Bu çalışmada kullanılan genler TÜBİTAK - GMBAE (Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü) laboratuvarlarında hazırlanmıştır.

Mikroenjeksiyona başlamadan önce mikroenjeksiyon setinde aşağıda yazıldığı biçimde gerekli ayarlamalar yapıldı ve sonra mikroenjeksiyona başlandı.

#### **3.2.4.1. Hamilton Şınganın ve Tutucu Pipetin Hazırlanması**

Mikroenjeksiyon sırasında embriyoyu tutmak için mikrometreli hamilton şınga, pipet tutucu ve embriyo tutucu (holding) pipeti gerekmektedir. Bunun için önce 250 µl'lik hamilton şıngasının uç kısmının çapına uyacak çok ince beyaz bir hortum bağlandı ve hortumun diğer ucu da pipet tutucusunun arka kısmına sıkıca fikse edildi. Bu bağlanma işleminden sonra pipet tutucu, içine mineral yağı konulmuş petri kutusu içine daldırıldı ve şınganın mikrometresi çalıştırılarak yağın emilmesi sağlandı. Daha sonra materyal bölümünde yapımı anlatılan ve mikroenjeksiyondan evvel hazırlanan embriyo tutucu (holding) pipetinin arka kısmına çok ince 3-5 mm uzunluğunda hortum takıldı. Sonra pipet daha önceden hazırlanmış bulunan pipet tutucunun ön kısmına monte edildi. Şınga mikrometresi çalıştırılarak şıngadaki yağın çok az bir kısmı tutucu pipetin yarısından çoğunu dolduruncaya kadar verildi ve sonra pipete hava kabarcığı çekildi. Bu pipetin uç kısmı içinde M2 mediumu bulunan petri kutusu içine daldırıldı ve pipetin uç kısmı dolacak şekilde medyum çekildi ve pipetin uç kısmı 5-6 dakika M2 medyumunun içinde basınç dengelenene kadar burada bekletildi. Böylelikle embriyoyu itme ve çekmeye yarayan düzenek, mikroenjeksiyon için hazır hale getirilmiş oldu.

#### **3.2.4.2. Enjeksiyon Pipetine DNA'nın Yüklenmesi**

Enjeksiyon pipeti çekildikten hemen sonra bir eppendorf tüpü içinde bulunan ve aktarılması düşünülen DNA konstraktının içine pipetin arka kısmı degecek bir biçimde daldırıldı ve 8-10 saniye sonra pipet tüpten kaldırıldı. Uç kısmına kadar solusyonun çekilip çekilmediği stereo mikroskop altında kontrol edildi. Burada pipetin uç kısmına kapillerite dolayısıyla kendiliğinden çekilen DNA solusyonun hacminin 0.5-1 µl arasında olabileceği tahmin edilmektedir.

### **3.2.4.3. Mikromaniplatör ve Mikroenjektörün Ayarlanması**

Çalışmada sağ ve sol olmak üzere iki adet maniplatör kullanıldı (Resim 9). Bunlardan sol maniplatöre embriyo tutucu (holding) pipet ve sağ maniplatöre ise mikroenjeksiyon pipeti monte edildi (Resim 9-10). Mikromaniplatörde gerekli olan ayarlamalar yapıldı.

Mikroenjektörün gerekli olan vakumu sağlayabilmesi için şu basınç değerlerine göre kalibre edildi (Resim 9).

$P_1$  basıncı 6500 hPa (Hekto paskal)

$P_2$  basıncı 1950-1970 hPa ve

$P_3$  basıncı 100-120 hPa olarak ayarlandı.

$P_1$  = Enjeksiyon pipetinin temizleme basıncı.

$P_2$  = Enjeksiyon basıncı.

$P_3$  = Enjeksiyon pipeti ile enjeksiyon yapılacak lamdaki solusyonun denge basıncını göstermektedirler. Yalnız bu basınçlar mikroenjeksiyon çalışmalarında standart teşkil etmezler ve mikroenjeksiyon pipetinin çapına göre değişiklik gösterebilirler.

### **3.2.4.4. Mikroenjeksiyon Lamına Zigotların Yüklenmesi**

Materyal bölümünde yapımı anlatılan çukur lamın tam ortasına otomatik pipet ile yaklaşık 100-150  $\mu$ l'lik bir damla yapacak şekilde M2 mediumu koyuldu (Resim 10). Daha sonra mediumun ve lamın üzeri tamamen kapanacak şekilde mineral yağı ile örtüldü. Lam bu şekilde hazırlandıktan sonra, (-) işaretli petri kutusundan embriyo toplama pipeti ile pronuklear safhaya gelmiş 15-20 embriyo pipete çekildi. Önceden hazırlanan lamdaki medium damlasının üstüne embriyolar pipetle dağılmıyacak bir şekilde stereo mikroskop altında bırakıldılar. Böylelikle mikroenjeksiyon yapılacak preparat hazırlanmış oldu.

### **3.2.4.5. Zigotun Pronukleusuna DNA'nın Mikroenjeksiyon ile Verilmesi**

Mikroenjeksiyon için gerekli ön hazırlıklar yapıldıktan sonra, mikroenjeksiyon aşağıdaki biçimde uygulandı.

- 1) Hazırlanan mikroenjeksiyon lamı ters mikroskobun tablasına yerleştirildi (Resim 10).
- 2) Materyal bölümünde anlatıldığı gibi kalibre edilen yatay pipet çekici (Mikropuller) ile mikroenjeksiyon pipeti çekildi ve tutucusu ile beraber sağ maniplatöre monte edildi (Resim 10).
- 3) Holding (tutucu) pipet tutucusu ile sol maniplatöre monte edildi (Resim 10).
- 4) Mikroenjektör çalıştırıldı.
- 5) Bu işlemler tamamlandıktan sonra düşük büyütme objektif ( $10 \times 5 = 50$ ) medium damlasının dibine odaklandı. Bu odak kısmının tam ortasına gelecek şekilde, önce sol maniplatör kullanılarak tutucu (holding) pipetin uç kısmı medium damlasına paralel gelecek şekilde damlaya daldırıldı. Daha sonra sağ maniplatör kullanılarak enjeksiyon pipeti medium damlasının tabanı ile  $5-10^0$  açı yapacak bir şekilde damlanın dibine değdirildi (Resim 10-11).
- 6) Bu işlemlerden sonra mikroskop 200 büyütme alınarak enjeksiyon pipetinin ucunun açıklığı kontrol edilerek, aktarılacak DNA solusyonunun damla hacmi mikroenjektör ile ayarlandı (Resim 13).
- 7) Yukarıda anlatılan ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra, zigotlara mikroenjeksiyona başlandı. Önce tutucu (holding) pipet embriyolardan birisine yaklaştırıldı ve herhangi bir tanesi yakalanarak tutuldu (Resim 14). Daha sonra hamilton şırınganın mikrometresi kullanılarak embriyo itilip çekildi ve böylece pronukleuslar daha belirgin bir hale getirildi. Bu esnada zona pellucidanın tutucu pipete doğru çekildiği görüldü, ayrıca erkek pronukleus (erkek pronukleus 2. Polar cisimcikten uzak ve dişi pronukleusdan daha büyük olanıdır.) enjeksiyon pipetinin uç kısmına yakın olacak şekilde holding pipetle tutuldu (pronukleus tutucu pipetin merkez eksenine olabildiğince yakın olacak biçimde tutuldu) (Resim 14).

Embriyo bu şekilde tutulduktan sonra, önce erkek pronukleus mikroskopta zumlama yapılarak netleştirildi ve sonra enjeksiyon pipetinin uç kısmı erkek pronukleusun görüntüsü ile aynı olana dek sağ manipulatörün ince ayar düğmesi vasıtasıyla ayarlandı. Her ikisi net bir şekilde görünür hale geldiği zaman, enjeksiyon pipeti çok hızlı bir şekilde zona pelusida'dan geçirilerek erkek pronukleusa doğru girildi (Resim 15). Özellikle enjeksiyon pipetinin uç kısmının pronukleusun içinde bulunan nükleolilere değmemesine dikkat edildi. Nükleolilerin üst bölgesine yaklaşık olarak 1-2 p.l (piko litre) DNA solusyonu verildi (Resim 15). Pronukleusun normalinden iki kat daha fazla büyüdüğü görüldüğü anda enjeksiyon pipeti çok hızlı bir şekilde (Resim 16) dışarı çekildi. Enjeksiyon yapılan embriyo 3-5 saniye daha tutulduktan sonra medium damlasının ayrı bir köşesine alındı. Yaklaşık 20 adet embriyoya tek tek mikroenjeksiyon yapıldı ve enjeksiyon yapılan her embriyo medium damlasının bir bölgesinde toplandı. Bu şekilde 20 adet embriyoya mikroenjeksiyon yapıldıktan sonra enjeksiyon lamı ters (invert) mikroskoptan alındı ve stereo mikroskop altına götürüldü. Burada sağlam kalan embriyolar (normal büyüklük ve daire şeklindeki embriyolar, zona pellusidaları düzgün, sitoplazmaları berrak ve pronukleusları dağılmamış olan embriyolar ) pipetle toplanarak daha önceden etüvde bulunan (+) işaretli petri kutusu içine aktarıldılar. Böylece yukarıda anlatılan şekilde her 20 adet embriyo için yeni bir enjeksiyon preparatı hazırlanarak mikroenjeksiyon yapıldı. Böylelikle enjeksiyon yapılan bütün sağlam embriyolar ovidukta transfer yapılıncaya kadar 37 °C'da bekletildi.

### **3.2.5. Alıcı Farelerin (Recipient) Oviduktuna Zigotların Transferi**

#### **3.2.5.1. Mikroenjeksiyon Yapılmış Embriyoların Pipete Yüklenmesi**

Alıcı (recipient) fare önce Rompun ve Ketalar kombinasyonu (30 µl Rom.+70µl Ket) ile genel anestezi altına alındılar. Sonra hızlı bir şekilde (+) işaretli petri kutusunda bulunan mikroenjeksiyon yapılmış embriyolardan canlı ve sağlam olanların tümü, içinde mineral yağı bulunmayan ve sadece M2 mediumu içeren yeni bir petri kutusuna aktarıl-

dılar. Bu arada pipet değiştirilerek çapı 100  $\mu\text{m}$  olan embriyo transfer pipetine önce bir miktar M2 mediumu onun önüne ufak bir hava kabarcığı, bu kabarcığın önüne de tekrar bir miktar M2 mediumu ve bunun da önüne ikinci bir hava kabarcığı çekildi (Resim 17). İşte bu ikinci hava kabarcığının önüne mikroenjeksiyon geçirmiş 20-25 adet embriyo arka arkaya gelecek şekilde dizildi. Sonra bu embriyoların önüne de tekrardan bir üçüncü hava kabarcığı çekildi. Özellikle embriyoları arka arkaya pipete dizerken M2 medyumu olabildiğince az (yaklaşık 1  $\mu\text{l}$ ) çekilmesine özen gösterildi.

### **3.2.5.2. Zigotların Ovidukta Transferi**

Vazektomi erkek fareler ile senkronize edilen ve yarım günlük alıcı (C57BL/67 x BALB/C) CB6 F<sub>1</sub> ırkı farelerden vaginal plak gösterenler (Resim 18) genel anestezi altına alındılar. Sırt bölgeleri elektrikli traş makinası ile traş edildi ve sonra dorsal bölge tentürdiyot ile dezenfekte yapıldı. Sonra, sırt bölgesinin sağ tarafından, böbreklerin hemen gerisinden ve en alt kaburganın altından lateral ensizyon yapılarak sağ ovaryum ve ovidukt operasyon hattının dışına alındılar. Ovaryumun üstünde bulunan yağ tabakası serafin klip isimli çok ince bir pens ile tutturularak, ovaryum ve ovidukt fikse edildi. Organların fiksasyonundan sonra fare disseksiyon mikroskopu altına götürüldü ve burada 30 büyütme altında serafin klipi hareket ettirerek eldeki çok ince saatçi pensi yardımıyla oviduktun önce ampulla kısmı bulundu ve daha sonra fare mikroskopun altında çevrilerek infundibulum ile ampulla arasındaki bölgenin netliği sağlandı. Bu işlemlerden sonra sol ele saatçi pensi, sağ ele ise 30 gauge'lık bir enjektör ve bir hortum boru vasıtasıyla ağız kontrolünde bulunan ve daha önceden embriyo yüklenilen embriyo transfer pipeti alındı. Önce sol eldeki pens ile infundubulum ve ampulla arasındaki bölge tutuldu, ve sağ eldeki 30 gauge'lik iğne ile bu bölgeye önce bir delik açıldı ve hemen aynı elde bulunan transfer pipetindeki embriyolar, pipetteki ikinci hava kabarcığına kadar üflenerek bu bölgeye transfer edildi. Daha sonra mikroskop altında bulunan farenin oviduktunda, iki hava kabarcığının verilip verilmediği kontrol edildi ve hava kabarcıkları görüldükten sonra operasyonun başarılı olduğuna karar verildi. Operasyon

geçiren farelerin ovaryum ve oviduktları disseksiyon mikroskopu altında dikkatli bir şekilde ensizyon aralığından sokularak organlar yerleştirildi ve 5/0 katkı ile ensizyon bölgesi dikildikten sonra 37 °C de kapağı çok az açık olan etüvde ayılana kadar bekletildiler.

### **3.2.5.3. Embriyo Transferi Yapılan Farelerde Doğurganlık**

Embriyo transferi yapılan fareler post-operatif bakım odasına alınarak iyileşene kadar bir hafta izlendiler. Daha sonra iyileşenler doğum odasına alınarak doğurana kadar bekletildiler. Transferden yaklaşık 14 gün sonra abdominal palpasyon ve inspeksiyon ile gebe olanlar teşhis edildi. Daha sonra gebeliğin süresi olan 19-21 gün tamamlanuncaya kadar fareler çok dikkatli bir şekilde hergün izlendi. Doğan farelerin (Resim 19) cinsiyet kontrolleri 21 gün sonra yapılarak birbirlerinden ayrıldılar.

### **3.2.6. Doğan Fare Yavrularının Transgenik Analizi**

Enjeksiyon yapılmış embriyoların transferinden elde edilen yavruların transgenik olup olmadığının kontrolü aşağıda yazılı olan sıra dahilinde yapıldı.

#### **3.2.6.1. Yavruların Kuyruk Dokusundan DNA Eldesi**

Doğan fare yavruları yaklaşık 3 haftalık yaşa geldikleri zaman kuyruklarından 1-2 cm kesilerek parça alındı. Kuyruklarından parça alınan her bir farenin kulağı U veya V şeklinde kesilerek işaretlendi. Daha sonra alınan bu kuyruk dokuları ufak eppendorf tüpleri içine konuldu ve her tüpün üzerine 0.5-0.7 ml 50mM Tris.HCL, pH 8.0, 100 mM EDTA ve %0.5'lik S.D.S konuldu. Bunun üzerine 10 mg/ml de Proteinaz-K eklenerek 55 °C de gece boyu (overnight) inkübe yapıldı. Daha sonra mikrosantrifüjde 13:000 rpm'de santrifüj yapıldı. Elde edilen süpernatant giderilene kadar fenol, fenol/kloroform ile muamele yapıldıktan sonra üstte kalan süpernatant alınarak tüpün üzerine 70µl 3M Na-Asetat, pH: 6.0 da %100'lük etanolden 0.7 ml oda ısısında eklendi. Sonra bu tüp 13:000 rpm de mikrosantrifüj yapılarak DNA'nın çökmesi sağlandı. Elde edilen pellet (DNA) 1 ml %70'lik etanol ile yıkandı ve sonra tekrar santrifüj yapılarak 15 dakika 37°C

de bekletilerek peletten etanol uzaklaştırıldı. Sonunda her bir DNA örneği 0.1 ml 10mM Tris.HCl, pH: 8.0, 1mM EDTA'lı tampon içinde çözüldü.

### **3.2.6.2. Dot-Blot Hibridizasyon**

Önce her bir DNA örneğinden 5µg alınarak hacmi saf su ile 70µl'ye tamamlandı. Daha sonra DNA örnekleri nylon membrana vakum altında emdirildi. DNA'yı denatüre yapmak ve çift iplikçığının ayrılmasını sağlamak için membran 0.5M NaOH ile muamele edildi. Daha sonra filtre 1M Tris.HCl, pH: 7.5 ile 15 dakika kadar bir süre yıkandı. DNA'nın filtreye bağlanması için filtre oda ısısında kurutuldu ve 80 °C'lik etüvde 2 saat bırakıldı. Son olarak bu filtre 2-5 dakika U.V altında bırakıldı. Hibridizasyondan önce TÜBİTAK Genetik Mühendisliği Bioteknoloji Araştırma Enstitüsünün (G.M.B.A.E) Moleküler İmmunoloji laboratuvarında sentetik olarak primerler sentezlettiler. Elde edilen primerler 1 ünite gamma <sup>32</sup>P-ATP ile işaretlenerek proplar hibridizasyona hazır hale getirildi. Daha önceden nylon membrana bağlanmış olan DNA'lar prehibridize yapıldıktan sonra 5µl'lik hibridizasyon solusyonu ile birleştirildi. Bu karışımın içine nylon membran konuldu ve gece boyu (overnight) oda ısısında bekletilerek hibridizasyona bırakıldı. Ertesi sabah hibridizasyon işlemi bittiği için nylon filtre 6 x SSC buffer ile iki kez olmak üzere 10'ar dakikalık süre ile oda ısısında yıkandı ve kurutuldu. Bu şekilde kurutulan nylon membranın otoradyogramı yapılarak filmi çekildi ve filme göre transgenik kontroller değerlendirildi.

#### **4. BULGULAR**

Çalışmanın bulguları iki farklı gen için (pXGH5 ile insan p53-248 genleri) ayrı ayrı ele alındı.

#### **4.1. PXGH5 GENİNİN SONUÇLARI**

##### **4.1.1. Süperovulasyon Sonuçları**

Çalışmada 8 deney düzenlendi ve her deney bir parti olarak değerlendirildi (Tablo 1A). Her parti kendi içinde değerlendirildi. Örneğin; 1. Partide 10 verici (donor) fare süperovulasyona alındı. Bunlardan 10'u çiftleşerek hepsi vaginal plak gösterdiler. Vaginal plaklı farelerin servikal dislokasyonla öldürülmesiyle 20 ovidukt elde edildi ve bunlardan 18'sinde embriyolarla şişmiş ampulla gözlendi. Geriye kalan iki ovidukta ampulla şişkinliği belirlenemediğinden değerlendirmeye alınamadı. 1. gruptaki çiftleşme oranı %100 olarak bulundu (Tablo 1A).

**Tablo.1A. Süperovulasyonun ilk sonuçları:**

<b>Donor Fare Sayısı (n)</b>	<b>Vaginal Plak Sayısı</b>	<b>Elde Edilen Ovidukt Sayısı</b>	<b>Top. Ampulla Sayısı</b>	<b>Verici Farelerde Çiftleşme Oranı</b>
1.Parti: 10	10	20	18	100
2.Parti: 11	9	18	16	80
3.Parti: 10	8	16	14	80
4.Parti: 12	11	22	18	90
5.Parti: 10	9	18	18	90
6.Parti: 10	10	20	18	100
7.Parti: 11	10	20	16	90
8.Parti: 10	9	18	18	90
Kontrol: 10	9	18	14	90

Tablo 1A'da elde edilen bulguların devamı olan hücrenel bulgular Tablo 1B'de belirtildi. Tablo 1B'deki 2. parti örnek alındığında, 11 verici fareden 9'unun çiftleşerek vaginal plak gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu vaginal plaklı farelerden 18 ovidukt elde edildi (Tablo 1A). 18 oviduktun 16'sında ampulla görüldü ve 16 ampullalı oviduktan toplam 208 hücre elde edildi. Elde edilen bu 208 toplam hücreden 160'u zigot, 8'i ovum ve geriye kalan 40'ı da bunların dışında kalan dejenere olan embriyolardı (Tablo 1B).

**Tablo.1B. Süperovulasyonun Hücrenel Sonuçları:**

Süperovule Dişi/ Vag.Plk.Say.	Top.Hücre Say.	Top. Zigot (P.Nuklear Safha) Say.	Top.Ovum Say.	Top.Dej.Emb Say.
1.Parti: 10/10	225	171 (%76.00)	9	45
2.Parti: 11/9	208	160 (%76.92)	8	40
3.Parti: 10/8	189	144 (%76.19)	9	36
4.Parti: 12/11	270	206 (%76.29)	13	51
5.Parti: 10/9	225	174 (%77.33)	8	43
6.Parti: 10/10	252	192 (%76.19)	12	48
7.Parti: 11/10	256	195 (%76.17)	10	51
8.Parti: 10/9	288	228 (%76.16)	14	46
<b>Kontrol: 10/9</b>	<b>260</b>	<b>200 (%76.92)</b>	<b>13</b>	<b>47</b>

**Kısaltmalar:** *P.Nuklear Safha: Pronukleusu Görülen Hücreler*

*Vag.Plk.Say.:* *Vaginal Plak Gösteren Fare Sayısı*

*Top.Dej.Emb.Say.:* *Toplam Dejenere Olan Embriyo Sayısı*

Vaginal plaklı 76 fareden toplam 1913 hücre elde edilirken fare başına ortalama hücre sayısı 25.17 olarak belirlendi (Tablo 2). Elde edilen bu ortalama hücre sayısından 19.34'ü zigot, 1.09'u ovum ve 4.73'üde dejenere embriyo olarak dağılım gösterdi.

**Tablo.2. Vaginal Plaklı Fare Başına Elde Edilen Hücresel Sonuçlar:**

Vag.Plk.Baş.Hüc.	Vag.Plk.Baş.Zig.	Vag.Plk.Baş.Ovm.	Vag.Plk.Baş.D.E
25.17	19.34	1.09	4.73

*Kısaltmalar: Vag.Plk.Baş.Hüc.: Vaginal Plaklı Fare Başına Elde Edilen Hücre Sayısı*

*Vag.Plk.Baş.D.E.: " " " " " " Dejenere Olan Embriyo Sayısı*

Ampullaların herbirinden elde edilen ortalama hücre sayısı ve dağılımları Tablo 3'de görülmektedir. Vaginal plak gösteren 76 fareden toplam 136 ampullalı ovidukt belirlendi ve ampulla görülmeyen 16 ovidukt değerlendirme dışı bırakıldı. 136 ampullalı oviduktan ampulla başına ortalama toplam 14.06 hücre elde edildi. Elde edilen bu hücrelerden ortalama 10.75'i zigot, 0.61'i ovum ve geriye kalan 2.70'i ise dejenere embriyo olarak dağılım gösterdi (Tablo 3).

**Tablo.3. Ampullalı Oviduktan Elde Edilen Hücrelerin Dağılım Sonuçları:**

Amp.Baş.Hüc.	Amp.Baş.Zig.	Amp.Baş.Ovm.	Amp.Baş.D.E.
14.06	10.75	0.61	2.70

*Kısaltmalar: Amp.Baş.Hüc.: Bir Ampulladan Elde Edilen Hücre Sayısı*

Süperovulasyon sonucu elde edilen bulgulara göre, yapılan 8 deneyde toplam 84 verici (donor) fare kullanıldı ve sonuçları Tablo 4'te belirtildi. Kullanılan 84 fareden 76'sı çiftleşerek vaginal plak gösterdiler. Bu 76 fareden 152 ovidukt elde edildi ve elde edilen 152 oviduktun 136'sında ampulla görülebildi. 136 ampullalı oviduktun açılması sonucu toplam 1913 hücre elde edildi. Elde edilen hücrelerden 1470'i zigot, 83'i ovum ve geriye kalan 360 adeti de dejenere embriyo olarak dağılım gösterdiler (Tablo 4).

Elde edilen toplam 1913 hücrenin %76.42'si zigot, %4.33'ü ovum ve %19.23'ü dejenere embriyo olarak bulundu.

**Tablo.4. Süperovulasyon Uygulamasından Elde Edilen Toplam Hücre Sonuçları:**

Top.Ver.	Top.Vag.Plk.	Top.Hüc.	Top.Zig.	Top.Ovum.	Top.Dej.Emb.
84	76	1913	1470	83	360

*Kısaltmalar: Top.Ver.: Hormon Kullanılan Toplam Verici Fare Sayısı*

#### **4.1.2. Mikroenjeksiyon Sonuçları**

Kazanılan 1470 zigottan 1269'una mikroenjeksiyon yapıldı. Tablo 5'de belirtildiği gibi, 1. Parti de toplam 171 zigottan 150'sine mikroenjeksiyon ile pXGH5 geni aktarıldı. Mikroenjeksiyon sonunda toplam 75 embriyo canlı kaldı. Geriye kalan 75 embriyonun ise gerek mikroenjeksiyon esnasında gerekse alıcı anneye transfer yapılınca kadar bekletilen süre içerisinde canlılıklarını kaybettiler.

**Tablo.5. Mikroenjeksiyon Yapılan Zigotların Sonuçları:**

<b>PXGH5 Geni Verilen Deneş Grubları</b>	<b>Toplam Zigot</b>	<b>Mikroenjeksiyon Yapılan Zig.Say.</b>	<b>Mikroenjeksiyon Sonrası Canlı Kalan Zig.Say.</b>
1.Parti Deneş Sonuçları:	171	150	75 (%50.00)
2.Parti Deneş Sonuçları:	160	140	81 (%57.85)
3.Parti Deneş Sonuçları:	144	124	68 (%54.83)
4.Parti Deneş Sonuçları:	206	160	96 (%60.00)
5.Parti Deneş Sonuçları:	174	150	97 (%64.66)
6.Parti Deneş Sonuçları:	192	180	122 (%67.77)
7.Parti Deneş Sonuçları:	195	175	105 (%60.00)
8.Parti Deneş Sonuçları:	228	190	125 (%65.78)

### **4.1.3. Embriyo Transferi Sonuçları**

Tablo 5’de görüldüğü gibi mikroenjeksiyon yapılan ve canlı kalan embriyoları alıcı annelerin (recipient) oviduktuna transfer etmek için partilere göre dağılım şöyle oldu.

1. Parti de toplam 38 alıcı fare 2/1 oranında vazektomize erkek farelerle çiftleştirildi. 38 fareden 3’ü çiftleşerek vaginal plak gösterdiler ve bu partinin çiftleşme oranı %7.89, olarak bulundu. Diğer gruplarda çiftleşme oranları, %10.00, %5.00, %3.33, %5.00, %6.66, %2.94 ve %12.50 olarak bulundu.

Yapılan 8 parti deney sonucunda, dönüşümlü olarak kullanılan alıcı farelerden 18’i vazektomize fareler ile senkronize oldu (Tablo 6A). Her bir alıcı fare başına 20-25’şer adet embriyo transfer edildi.

**Tablo.6A. Mikroenjeksiyon Sonrası Embriyo Transferi:**

<b>Deney Grupları</b>	<b>Top.Alıcı.Say. Vag.Plk.Alıcı</b>	<b>M.enj.Son.Top.Em</b>	<b>Alıcı.Baş.Trn.Yap. Emb.Say.</b>
1.Parti için:	38/3	75	20
2.Parti için:	30/3	81	20
3.parti için:	20/1	68	25
4.Parti için:	30/1	96	25
5.Parti için:	40/2	97	25
6.Parti için:	30/2	122	25
7.Parti için:	34/1	105	25
8.Parti için:	40/5	125	25
Kontrol:	45/5	-	25

**Kısaltmalar:** *M.Enj.Son.Top.Emb.:* Mikroenjeksiyondan Sonraki Toplam Embriyo.

*Alı.Baş.Trn.Yap.Emb.Say.:* Alıcı Fare Başına Transfer Yapılan Embriyo Sayısı.

#### **4.1.4. Doğum Sonuçları**

Embriyoların transferinden elde edilen sonuçların gruplara göre dağılımı aşağıda yazıldığı şekilde bulundu (Tablo 6B).

- 1.Parti: 3 alıcı anneden sırasıyla 3-4-4 'er adet olmak üzere toplam 11 yavru elde edildi (Resim 17). Bu alıcıların sırasıyla doğum oranları %15, %20 ve %20 dir.
- 2.Parti: 3 alıcıdan 4-3 ve 1'er ad. yavru doğdu doğum oranı %20, %15 ve %5 oldu
- 3.Parti: 1 alıcıdan 2 ad. yavru doğdu ve doğum oranı %8 oldu.
- 4.Parti: 1 alıcıdan 3 ad. yavru doğdu ve doğum oranı %12 bulundu.
- 5.Parti: 2 alıcıdan 6-7 ad. yavru doğdu ve doğum oranları %24 ve %28 dir
- 6.Parti: 2 alıcıdan 5-9 ad. yavru doğdu ve doğum oranları %20 ve %36 dir.
- 7.Parti: 1 alıcıdan 1 ad. yavru doğurdu ve doğum oranı %4 dir.
- 8.Parti: 5 alıcıdan sırasıyla 4-5-3-1-5'er ad. yavru elde edildi doğum oranları sırasıyla %16, %20, %12, %4 ve %20 oldu.

Kontrol grubunda ise, 5 alıcıdan sırasıyla 8-7-5-9-10'ar yavru elde edildi ve doğum oranları sırasıyla %32, %28, %20, %36 ve %40 olarak bulundu.

**Tablo.6B. Embriyo Transferi ve Doğum Sonuçları:**

<b>Deney Yapılan Partiler</b>	<b>Transfer Yap.Top.Emb.</b>	<b>Trn.Yap.Top.Ah. Sayısı</b>	<b>Fare Baş.Doğan Yavru Sayıları</b>
1.Parti:	60	3	3-4-4=11
2.Parti:	60	3	4-3-1=8
3.Parti:	25	1	2
4.Parti:	25	1	3
5.Parti:	50	2	6-7=13
6.Parti:	50	2	5-9=14
7.Parti:	25	1	1
8.Parti:	125	5	4-5-3-1-5=18
<b>KONTROL:</b>	125	5	8-7-5-9-10=39

#### **4.1.5. Transgenik Sonuçlar**

Bu bölümde her partinin doğum oranları, doğan yavruların transgenik sayısı ile transgenik yüzdeleri verildi (Tablo 7). Örneğin; 1. Parti de yapılan deney sonucunda ovidukta transfer yapılan toplam 60 embriyodan toplam 11 yavru doğdu (Tablo 6B) ve doğan 11 yavrudan 1'inin transgenik olduğu belirlendi. 1. partinin transgenik oranı %9.09 olarak saptandı. Ayrıca 3'nc partiden 8'inci partiye kadar yapılan transgenik kontrollerde transgenik fare elde edilemedi (Tablo 7).

**Tablo.7. Embriyo Transferinin Doğum ve Transgenik Oranlarının Dağılımları:**

<b>Deney Yapılan Partiler</b>	<b>Doğan Yavru Sayısı</b>	<b>Doğum Oranı (%)</b>	<b>Doğan Yavrulardan Transgenik Olanların Sayısı</b>	<b>Yavruların Transgenik Oranı (%)</b>
1.Parti:	11	18.33	1	9.09
2.Parti:	8	13.33	2	25.00
3.Parti:	2	8.00	-	-
4.Parti:	3	12.00	-	-
5.Parti:	13	26.00	-	-
6.Parti:	14	28.00	-	-
7.Parti:	1	4.00	-	-
8.Parti:	18	14.00	-	-

#### **4.1.6. pXGH5 Geninin Toplu Sonuçları**

Yürütülen toplam 8 parti deneyin sonuçları, baştan sona rakamsal olarak Tablo 8'de verildi. Bu yapılan toplam 8 parti deneyde 84 verici (donor) fare süperovule edildi. Bunlardan 76'sı çiftleşerek vaginal plak gösterdi ve bu farelerden 68'inde ampullah ovidukt belirlendi (Tablo 1A). 136 ampulladan 1470 zigot elde edildi. Bu zigotlardan 1269'una mikroenjeksiyon ile pXGH5 gen kontraktı enjekte edildi.

Yapılan mikroenjeksiyon sonucunda 769'unun canlı olduğu belirlendi ve 420'si toplam 18 alıcı (recipient) annenin oviduktuna transfer edildi (Tablo 7). Transfer sonucunda toplam 70 yavru elde edildi. 70 yavrudan ise 3'ünün transgenik olduğu tespit edildi.

Tablo 8'deki sayısal bulguların oranları şöyle bulundu: Zigotların % 86.32'sine mikroenjeksiyon yapıldı ve bu zigotlardan %60.59'unun yaşadığı belirlendi. Bu embriyolardan % 54.61'i alıcı annelerin oviduktuna transfer edildi ve doğum oranı % 16.66 bulundu. Doğan bu yavruardan % 4.28'inin transgenik olduğu yapılan kontrollerle saptandı.

**Tablo.8. Yapılan 8 Parti Deneyin Toplu Sonuçları:**

<b>Kul.Top. Fare Say.</b>	<b>Top.Zig.</b>	<b>Top.M.E. Yap.Zig.Say</b>	<b>Top.M.E Son.Yaş.Say</b>	<b>Trn.Yap. Top.Emb.Say</b>	<b>Top.Doğ. Yav.Say.</b>	<b>Top.Tge. Fare Sy.</b>
84	1470	1269	769	420	70	3

***Kısaltmalar: Kul.Top.Fare.Say.:*** Kullanılan Toplam Fare Sayısı.

***Top.M.E.Yap.Zig.Say:*** Toplam Mikroenjeksiyon Yapılan Zigot Sayısı.

***Top.M.E.Son.Yaş.Emb.Say.:*** Toplam Mikroenjeksiyon sonrası Yaşayan Embriyo Sayısı.

***Top.Doğ.Yav.Say.:*** Toplam Doğan Yavru Sayısı.

***Top.Tge.Fare Say.:*** Toplam Transgenik Fare Sayısı.

## **4.2. p53-248 GENİNİN SONUÇLARI**

### **4.2.1. Süperovulasyon Sonuçları**

Her deney bir parti olarak değerlendirildi (Tablo 9A). Her partide kullanılan fare sayıları kendi deney grubu içinde değerlendirildi. Örneğin; 1. parti de 10 verici (donor) fare süperovulasyona alındı. Bunlardan 9'u çiftleşerek vaginal plak gösterdiler. Vaginal plaklı farelerin servikal dislokasyonla öldürülmesiyle 18 ovidukt elde edildi ve bunlardan 16 tanesinde embriyolarla şişmiş ampulla gözlemlendi. Geriye kalan iki oviduktta ampulla şişkinliği belirlenemediğinden değerlendirilmeye alınmadı. 1. gruptaki çiftleşme oranı % 90 olarak bulundu (Tablo 9A).

**Tablo.9A. Süperovulasyonun İlk Sonuçları:**

<b>Donor Fare Sayısı (n)</b>	<b>Vaginal Plak Sayısı</b>	<b>Elde Edilen Ovidukt Sayısı</b>	<b>Top.Amp.Sayısı</b>	<b>Verici Farelerde Çiftleşme Oranı</b>
1.Parti: 10	9	18	16	90
2.Parti: 10	9	18	18	90
3.Parti: 10	9	18	18	90
4.Parti: 11	10	20	18	90
5.Parti: 10	8	16	16	80
6.Parti: 11	10	20	18	90
<b>Kontrol: 10</b>	<b>9</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>90</b>

Tablo 9A'da elde edilen parti bulgularının verileri doğrultusunda Tablo 9B'de hücreler ile ilgili bulgular belirtildi. Bu bulgulara göre 2. parti'yi örnek verirsek 10 verici fareden 18 ovidukt elde edildi (Tablo 9A). 18 oviduktun 18'sinde ampulla görülüp (Tablo 9A) bunlardan toplam 288 hücre elde edildi (Tablo 9B). Bu 288 hücreden 222'si zigot, 11'i ovum ve geriye kalan 55'i de dejener embriyo olarak değerlendirildi (Tablo 9B) .

**Tablo.9B. Süperovulasyonun Hücresel Sonuçları:**

Süperovule Dışı/ Vag.plk.Sayısı	Top.Hücre Sayısı	Top. Zigot (P.Nuklear Safha)	Top.Ovum Sayısı	Top.Dej.Emb Sayısı
1.Parti: 10/9	240	185 (% 77.08)	9	46
2.Parti: 10/9	288	222 (% 77.08)	11	55
3.Parti: 10/9	252	204 (% 80.95)	12	36
4.Parti: 11/10	270	219 (% 81.11)	13	38
5.Parti: 10/8	224	183 (% 81.69)	9	32
6.Parti: 11/10	306	233 (% 76.14)	15	58
<b>Kontrol: 10/9</b>	<b>240</b>	<b>197 (% 82.08)</b>	<b>9</b>	<b>34</b>

Vaginal plaklı 55 fareden toplam 1580 hücre elde edilirken, fare başına ortalama hücre sayısı 28.72 olarak belirlendi. Elde edilen bu hücrelerden 22.65'i zigot, 1.25'i ovum ve 4.81'i de dejenere embriyo olarak dağılım gösterdi (Tablo 10).

**Tablo.10. Vaginal Plaklı Fare Başına Elde Edilen Hücresel Sonuçlar:**

Vag.Plk.Baş.Hüc.	Vag.Plk.Baş.Zig.	Vag.Plk.Baş.Ovm.	Vag.Plk.Baş.D.E
28.72	22.65	1.25	4.81

Bir ampulladan elde edilen hücre sayısı ve dağılımları Tablo 11'de görülmektedir. Buna göre 55 vaginal plak gösteren farede toplam 104 ampulla görüldü (Tablo 9A). Ampulla başına ortalama 15.19 hücre elde edildi, bu hücrelerden 11.98'i zigot, 0.66'sı ovum ve 2.54'ü de dejenere embriyo olarak belirlendi (Tablo 11).

**Tablo.11. Ampullalı Oviduktlardan Elde Edilen Hücrelerin Dağılım Sonuçları:**

Ampulla Baş.Hüc.Say.	Ampulla Baş.Zig.Say.	Ampulla Baş.Ovm.Say.	Amp.Baş.Dej.Emb.
15.19	11.98	0.66	2.54

Süperovulasyon sonucu elde edilen bulgulara göre yapılan 6 deneyde toplam 62 verici (donor) fare kullanıldı (Tablo 9A) ve sonuçlar Tablo 12'de belirtildi. Yapılan 6 deney sonucu 55 fare çiftleşerek vaginal plak gösterdiler. Bu vaginal plaklı farelerden 104 ampullalı ovidukt belirlendi ve bu ampullalı oviduktlardan toplam 1580 hücre elde edildi (Tablo 9B). Bu hücrelerden 1246'sı zigot, 69'u ovum ve geriye kalan 265'i de dejenere embriyo olarak bulundu (Tablo 12). Elde edilen toplam 1580 hücrenin %78.86'si zigot, %4.36'ı ovum ve %16.77'si dejenere embriyo olarak dağılım gösterdi

**Tablo.12. Süperovulasyon Sonucu Elde Edilen Toplam Hücresel Sonuçlar:**

Top.Ver.	Top.Vag.Plk.	Top.Hüc.	Top.Zig.	Top.Ovum.	Top.Dej.Emb.
62	55	1580	1246	69	265

#### **4.2.2. Mikroenjeksiyon Sonuçları**

Kazanılan 1580 hücreden 1246 zigotta mikroenjeksiyon yapılarak P53-248 geni verildi (Tablo 13). Tablo 13’de belirtildiği gibi 1. parti ele alınırsa toplam elde edilen 185 zigottan 160’ına mikroenjeksiyon ile P53-248 geni aktarıldı. Yapılan gen aktarımı işleminden sonra geriye 80 canlı embriyo kaldı (Tablo 13). Geriye kalan 80 embriyo gerek mikroenjeksiyon esnasında gerekse alıcı anneye transfer yapılıncaya kadar bekletilen süre içerisinde canlılıklarını kaybettiler.

**Tablo.13. Mikroenjeksiyon Yapılan Zigotların Sonuçları:**

<b>P53 Geni Verilen Deney Partileri</b>	<b>Toplam Zigot</b>	<b>Mikroenjeksiyon Yapılan Zig.Say.</b>	<b>Mikroenjeksiyon Sonrası Canlı Kalan Zig.Say.</b>
1.Parti:	185	160	80 (% 50.00)
2.Parti:	222	180	90 (% 50.00)
3.Parti:	204	170	85 (% 50.00)
4.Parti:	219	160	112 (% 70.00)
5.Parti:	183	160	120 (% 75.00)
6.Parti:	233	190	114 (% 60.00)

### **4.2.3. Embriyo Transferi Sonuçları**

Tablo 14 A'da gibi mikroenjeksiyon yapıldıktan sonra canlı kalan ve alıcı annelerin (recipient) oviduktlarına transfer edilen embriyoların partilere göre dağılımı gözlenmektedir. Örneğin: 1. parti de toplam 42 alıcı fare 2/1 oranında vazektomize erkek farelerle çiftleştirildi ve 42 fareden 2'si çiftleşerek vaginal plak gösterdi. 1. partinin çiftleşme oranı %4.76 olarak bulundu. Diğer gruplardaki çiftleşme oranları sırasıyla %10.00, %9.09, %10.00, %5.71 ve %10.52 olarak bulundu (Tablo 14A).

Yapılan toplam 6 parti deney sonucunda dönüşümlü olarak kullanılan alıcı farelerin 20'si vazektomize fareler ile senkronize oldu (Tablo 14A). Alıcı fare başına Tablo 14A'da belirtildiği gibi 20'ser embriyo transfer edildi.

**Tablo.14A. Mikroenjeksiyon Sonrası Embriyo Transferi:**

<b>Deney Grupları</b>	<b>Top.Ah.Say. Vag.Plk.Ah.</b>	<b>M.enj.Son.Can.Emb</b>	<b>Alı.Baş.Trn. Yap.Emb.Say.</b>
1.Parti:	42/2	80	20
2.Parti:	40/4	90	20
3.Parti:	44/4	85	20
4.Parti:	40/4	112	20
5.Parti:	35/2	120	20
6.Parti:	38/4	114	20
Kontrol:	40/5	-	20

*Kısaltmalar: M.Enj.Son.Can.Emb.: Mikroenjeksiyondan Sonra Canlı Kalan Embriyo Sayısı.*

#### **4.2.4. Doğum Sonuçları**

Embriyoların transferinden elde edilen sonuçların gruplara göre dağılımı aşağıda yazıldığı şekilde bulundu (Tablo 14B):

1.Parti: Fare başına 20' şer embriyo transferi olmak üzere 40 ad embriyo 2 ad. alıcı fareye verildi. Sırasıyla 1-6 ad. yavru elde edildi ve doğum oranları %5-%30 bulundu.

2.Parti: Doğum oranları sırasıyla %10, %30, %35 ve %35 olarak bulundu.

3.Parti: " " " %50, %40, %45 ve %30 " "

4.Parti: " " " %35, %15, %25 ve %30 " "

5.Parti: Doğum Yok

6.Parti: " " " %40, %50, %10 ve %10 " "

Kontrol grubunda ise, 5 alıcı anneden sırasıyla 8-10-5-7 ve 6'şar yavru elde edildi. Doğum oranları sırası ile %40, %50, %25, %35 ve %30 olarak bulundu (Tablo 14B).

**Tablo.14B. Embriyo Transferi ve Doğum Sonuçları:**

<b>Deney Grupları</b>	<b>Transfer Yap.Top.Emb.</b>	<b>Trn.Yap.Top.Alı. Sayısı</b>	<b>Fare Baş.Doğan Yavru Sayıları= Top.Doğ.Yav.Say.</b>
1.Parti:	40	2	1-6=7
2.Parti:	80	4	2-6-7-7=22
3.Parti:	80	4	10-8-9-6=33
4.Parti:	80	4	7-3-5-6=21
5.Parti:	40	2	Doğum yok.
6.Parti:	80	4	8-10-2-2=22
<b>KONTROL:</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>8-10-5-7-6=36</b>

#### **4.2.5. Transgenik Sonuçlar**

Tablo 15’de doğum oranları ile doğan yavruların transgenik sayısı ile transgenik yüzdeleri verildi. Bu sonuçlara göre 1. partiyi örnek verirsek embriyo transferi yapılan toplam 40 embriyodan (Tablo 14B) 7 yavru elde edildi ve 1. partinin doğum oranı %17 olarak bulundu (Tablo 15). Bu parti de yapılan transgenik analizlerde transgenik fare saptanamadı. Fakat 3. parti de doğan 33 yavrudan 3’ünün transgenik olduğu belirlendi. 3. partinin transgenik oranı % 9.09 bulundu (Tablo 15).

**Tablo.15. Embriyo Transferinin Doğum Ve Transgenik Oranlarının Dağımları:**

<b>Deney Grupları</b>	<b>Doğan Yavru Sayısı</b>	<b>Doğum Oranı (%)</b>	<b>Doğan Yavrulardan Transgenik Olanların Sayısı</b>	<b>Doğan Yavruların Transgenik Oranı (%)</b>
1.Parti:	7	17.50	-	-
2.Parti:	22	27.50	-	-
3.Parti:	33	41.25	3	9.09
4.Parti:	21	26.25	2	9.52
5.Parti:	0	0	-	-
6.Parti:	22	27.50	1	4.54

#### **4.2.6. p53-248 Geninin Toplu Sonuçları**

Yapılan çalışmada 6 parti deneyin sonuçları toplu olarak değerlendirildiğinde (Tablo 16). 6 deney sonucuna 52 ampullalı oviduktan 1246 zigot elde edildi. Zigotlardan 1020'sine mikroenjeksiyon ile P53-248 geni verildi ve enjeksiyon sonununda 601 embriyo canlı kaldı. Canlı kalan bu embriyolardan 400'ü fare başına 20'şer embriyo olmak üzere toplam 20 alıcı annenin (recipient) oviduktuna transfer edildi. Bu transferler sonunda 105 yavru doğdu ve bu yavruların kontrollerinde 6'sının transgenik olduğu saptandı (Tablo 16).

Tablodaki bulguların oranları şöyledir: Zigotların %81.86'sına mikroenjeksiyon yapıldı ve bu zigotlardan %58.92'si yaşadı geriye kalan %41.07'si öldü. Yaşayan %58.92'lik embriyonun %66.55'i 20 alıcının oviduktuna transfer edildiler. Transfer sonrası doğum oranı %26.25 bulundu. Doğan bu %26.25 yavrunun %5.71'inin transgenik olduğu yapılan kontrollerle saptandı.

**Tablo.16. Yapılan 6 Parti Deneyin Toplu Sonuçları:**

<b>Kul.Top. Fare Say.</b>	<b>Top.Zig.</b>	<b>Top.M.E Yap.Zig. Sayısı</b>	<b>Top.M.E. Son.Yaş. Emb.Say.</b>	<b>Trn.Yap. Top.Emb. Sayısı</b>	<b>Top.Doğ. Yav.Say.</b>	<b>Top.Tge. Fare Sy.</b>
62	1246	1020	601	400	105	6

## **5. SONUÇ VE TARTIŞMA**

Son yıllarda gerek laboratuvar ve gerekse çiftlik hayvanlarının iyileştirilmesi amacıyla çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerin başında embriyo transferi gelmektedir. Embriyoların in vitro yaşam koşullarının sağlanması, embriyolar üzerinde daha detaylı çalışmaları da beraberinde getirmiştir. Gen mühendisliği alanındaki gelişmeler sayesinde, embriyolar üzerinde çeşitli uygulama imkanları ortaya çıkmıştır. Embriyolara gen transferi ile transgenik hayvanların elde edilmesi gündeme gelmiş ve yaygın olarak uygulanmaya başlanmıştır (19,21,45,66,73).

Çeşitli genlerin mikroenjeksiyon tekniği ile transferi bir çok çiftlik hayvanlarında gerçekleştirilmiştir (40,66). Bu genlerin transferi sonucunda genlerin ekspresyonu sağlanmış, fakat ekspresyon yüzdesi düşük bulunmuştur. Elde edilecek yeni füzyon gen kombinasyonlarının transgenik evcil hayvanların geliştirilmesinde etkili olacağı düşünülmektedir. Çiftlik hayvanlarında embriyo manipülasyonu ve birçok yeni genetik teknikler çok hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Şu anda dünyanın bir çok laboratuvarında bu konular ile ilgili olarak çalışılmakta ve çeşitli alanlardaki problemlerin çözümü için embriyo ve gen manipülasyonları umut ışığı olarak gözükmektedir (21,23,73).

Sunulan çalışma, bu bilgilerin ışığı altında düşünülerek transgenik fare elde etmek amacıyla gerçekleştirildi. Temel olarak, süperovulasyon uygulanmış donörlerden elde edilen embriyolara iki ayrı grup altında iki farklı gen konstraktı (pXGH5, p53-248) verildi.

Birçok araştırmacı gerek normal embriyo transferinde ve gerekse mikroenjeksiyon tekniği ile gen aktarımı uygulamalarında, hibrid fare embriyoları ile çalışıldığında verimin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (2,3,17,25,27,42).

Çalışmanın materyali seçilirken CB6 hibrid (F<sub>1</sub>) farelerin üzerinde durulmasında Arat ve ark.'larının (2,3), önerileri doğrultusunda hareket edildi ve araştırmacıların elde ettikleri yüksek çiftleşme oranı ile embriyo sayıları esas alındı.

Embriyo eldesi için yapılan her iki çalışma grubunda süperovulasyon için fare başına 5'er IU olmak üzere PMSG ve hCG hormonları kullanıldı. 1'nci çalışmada süperovulasyona alınan toplam 84 fareden 76'sı (%90.47) çiftleşerek vaginal plak gösterdi. 2'nci grupta ise yapılan 6 parti deneyde kullanılan 62 fareden 52'si (%83.87) çiftleşti.

Yapılan bazı süperovulasyon çalışmalarında da (2,13,81), PMSG ve hCG hormonları 5'er IU intra peritoneal olarak kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen çiftleşme oranları, Rafferty (68), Spindle ve ark. (74), Dickmann (24) ve Van der Putten (81)'nin elde ettiği çiftleşme oranlarından yüksek bulunurken (%90.00), Gordon ve ark. (30), DePamphilis ve ark. (23)'ünün ve yapılan bir diğer çalışmanın (2) sonuçlarından biraz daha düşük olmakla birlikte, yaklaşık benzer oranlarda gerçekleşmiştir.

Yapılan çalışmada, 1. grupta vaginal plak gösteren 76 fareden 68'inde ampullalı ovidukt belirlenerek, toplam 1913 hücre ve ampullalı fare başına ortalama 28 embriyo elde edildi. Elde edilen bu hücrelerden 1470'inin (%76.84) pronukleus gösteren zigot olduğu belirlendi. 2. grupta ise, vaginal plak gösteren 62 fareden 52'sinde ampullalı ovidukt belirlendi. Toplam 1580 hücre ve ampullalı fare başına ortalama 30 embriyo elde edildi. Elde edilen bu hücrelerden 1246'sı (%78.86) zigot olarak saptandı. Çalışmalarımızda elde ettiğimiz embriyo sayısı Van der Putten (81), Brinster ve ark. (13), Kaufman ve ark. (47), Gordon ve ark. (30), Arat ve ark. (2) ve Church ve ark. (21)'lerinin elde ettiğinden daha yüksek fakat, DePamphilis ve ark. (23)'ünün gözlediği sonuçlardan daha düşük bulundu.

Sunulan çalışmada, 1. grupta elde edilen 1470 zigottan 1269'una (%86.32) pXGH5 gen konstraktı solusyonundan (konsantrasyon: 2 µg/ml) 1 piko litre enjekte edildi. Mikroenjeksiyon sonrası 1269 zigottan 758'si (%60.59) canlı kaldı. 2. grupta ise, 1246 zigottan 1020'sine (%81.86) p53-248 geni 1. gruptaki gen gibi aynı hacim ve konsantrasyonda verildi ve mikroenjeksiyon sonucu 601 (% 58.92) zigot canlı kaldı.

Mikroenjeksiyon ile gen konstraktı verilen embriyoların yaşama oranının % 50-80 arasında değiştiği bildirilmektedir (3,22,23,33,42).

Mikroenjeksiyon sonrası canlı kalan embriyo oranlarını, Petters ve ark. (65), % 57.7 , Gunderson (33) ise % 50 , Costantini ve ark. (22) % 50 olarak bildirirken, Van der Putten (81) bu değerleri %60 ile %66 arasında, Hogan ve ark. (42) ise %66 olarak bulmuşlardır.

Sunulan bu çalışmada mikroenjeksiyon sonrası zigot canlılık yüzdeleri, kullanılan iki değişik gen grubu (pXGH5 ve p53-248) arasında istatistiki bir fark olmadığını göstermektedir ( $P > 0.05$ ).

Church ve ark. (21) bazı genlerin birkaç bin kopyasının fare zigotlarına enjekte edildiğinde, fare yavrularının % 25'nin transgenik olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, mikroenjeksiyon sonrası canlı kalan zigotları in vitro kültüre almışlar ve morula safhasına ulaşan 44 embriyodan transfer sonrası 28 yavru elde etmişlerdir.

Brinster ve ark. (13) transgenik fare eldesinde sonuçlara etki eden faktörleri inceledikleri çalışmalarda elde ettikleri sonuçlara göre, birkaç yüz DNA kopyasının embriyo için toksik olmadığını ve kullanılan bufferin 0.1-0.3 mM EDTA konsantrasyonunda olmasının uygun olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, aynı araştırmacılar (13) C57BL/6J x SJL/J farelerin çaprazlamasından oluşan  $F_1$  ırkı farelerin kullanılmasıyla % 44.8 transgenik fare elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Yaptığımız 1. grup çalışmalarda alıcı annelerin herbirine 20-25 embriyo transfer edilmiş ve transfer edilen 420 embriyodan 70 yavru (% 16.66) sağlanmıştır. Buna karşılık, mikroenjeksiyon yapılmamış kontrol grubunda elde edilen yavru yüzdesi % 31.2 olarak tespit edilmiştir. 2. grup çalışmalarımızda alıcı annelerin herbirine 20 embriyo transferi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, 400 embriyonun alıcı annelere transferi sonucunda 105 yavru (% 26.25) elde edilirken, ikinci grup kontrollerde yavru elde yüzdesi % 36 olarak saptanmıştır.

Benzer çalışmalarda, Jaenisch ve ark. (46) % 38.75, Van der Putten (81) % 25, Lin (52) % 15, Barnaga (7) % 25, DePamphilis ve ark. (23) % 25, Gunderson ve ark (33) % 21 Costantini ve ark. (22) % 11.5, Harbers ve ark. (41) %40 yavru elde yüzdelere ulaşmışlardır. 1. ve 2. grupta elde ettiğimiz sonuçların ortalaması, literatürde

bulunan yavru eldesi yüzde ortalamalarına denk düşmektedir. 1'nci ve 2'nci grup kendi aralarında doğum oranı açısından istatistiki yönden değerlendirildiğinde, iki grup arasında ikinci grup çalışmaların lehine önemli derecede farklılık belirlenmiştir ( $P < 0.001$ ). Bu istatistiki önemliliğin, pXGH5 geninin enjeksiyonu sırasında ortaya çıkan güçlüklerden, verilen genin toksisitesinden ve embriyo transferi sırasındaki operatif zorluklardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Halbuki, kontrol gruplarının kendi aralarındaki farkların istatistiki karşılaştırmalarında herhangi bir anlamlılığa rastlanmadı ( $P > 0.05$ ). Bu sonuçlar, 1. ve 2. gruptaki yavru eldesi farklılığının, daha çok embriyo transferi öncesi zorluklardan veya hatalardan kaynaklandığını işaret etmektedir. Transgenik yüzdeleri (Integration frekansı), 1. grupta elde edilen yavrularda % 4,28, 2. grupta ise, % 5.7'dir. 1. grupta elde edilen transgenik farelerde fenotipik yönden bir büyüme görülmediğinden, aktarılan genin eksprese olmadığı düşünüldü. pXGH5 geni verilen 1'nci grup ile p53 geni verilen 2'nci grupta doğan yavruların transgenik oranları kendi aralarında karşılaştırıldığında, istatistiki bir farklılık görülmemiştir ( $P > 0.05$ ).

Bulunan bu değerlerin, bazı araştırmacıların elde ettikleri verilerle karşılaştırıldığında daha düşük oldukları görülmektedir (7,12,13,17,33,65,75,81).

Yapılan çalışmada, elde edilen zigotların mikroenjeksiyon sonrasında canlı kalma oranları ve yavru elde etme yüzdesi, literatür verileri ile benzer sonuçlar vermektedir. Bu da mikroenjeksiyon tekniğinin ve embriyo transferinin optimize olduğunu fakat, transgenik fare yüzdesinin düşük olması nedeninin, daha çok transgenik analizlerin (Dot-Blot Hibridizasyon) henüz yeterince optimize olmadığı kaygısını veya enjekte edilen gen konsantrasyonlarının hazırlanması aşamasında yeni optimizasyonların gerçekleştirilmesi ihtiyacını gündeme getirmektedir (4,7,12,17,19,23,42,65,70,81).

Transgenik çalışmalarda hazırlanan DNA fragmentinin konsantrasyonu, pürifikasyonu, DNA'nın büyüklüğü, DNA'nın şekli [supercoiled, linear], enjeksiyon bufferinin kompozisyonu, enjeksiyonun şekli (pronukleus, sitoplazma v.s), enjeksiyonun hangi pronukleusa verildiği ve sonuçta verici (donor) ile alıcı (recipient) olarak kullanılan fare ırklarının uygunluğu gibi parametrelerin, transgenik yavru elde edilmesinde etkili olacağı belirtilmektedir (13,23).

Bazı araştışıcılar (7,40,47,66,67,73,78), koyun, domuz, tavşan ve sığırlarda yaptıkları transgenik hayvan eldesinde, elde ettikleri integrasyon frekansını, farelere oranla çok düşük bulduklarını bildirmişlerdir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, mikroenjeksiyon tekniğinin ve embriyo transferinin optimize olduğu düşünölmektedir. İleride, sığır, koyun, keçi ve domuz gibi hayvanların embriyolarına gen transferi yaparak transgenik çiftlik hayvanları elde edilmesi planlanabilir. Transgenik hayvan eldesi ile, çeşitli hastalıkların modellendirilmesi, fonksiyonları henüz bilinemeyen genlerin ve mutant genlerin fonksiyonlarının incelenmesi (*İn vitro mutagenesis*) ve biyomedikal önemi olan moleküllerin (cytokinler, aşı antijenleri v.b.) çiftlik hayvanlarında geniş ölçekte üretilmesi (biyofarming) ve benzeri uygulama alanlarının geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Yapılan bu çalışma ile, ileride gerek hayvan ıslahı ve gerekse insan sağığı açısından önemli transgenik uygulamaların yapılabilmesi için, bir alt yapı oluşturulduğuna inanılmaktadır.

## **6. ÖZET**

Sunulan çalışmada iki farklı gen konstraktı kullanılarak transgenik fare elde edilmesi amaçlandı. Bu doğrultuda araştırma, farelerde süperovulasyon, embriyoların kazanılması, kazanılan embriyolara mikroenjeksiyon tekniği ile gen transferi, gen transferi yapılmış embriyoların alıcı (recipient) annelerin oviduktuna cerrahi yol ile transferi ve transferden doğan yavruların, transgenik analiz yöntemleri kullanılarak tespit edilmesi olmak üzere 5 aşamada gerçekleşti.

Bu çalışmada CB6 hibrid (F1) ırk farelerden 146'sı verici ve 38'i alıcı olmak üzere toplam 184 adet fare kullanıldı. Damızlık olarak aynı ırktan 30 erkek, alıcıların senkronizasyonu için de 30 vazektomize fare kullanıldı.

Sunulan çalışmada, verici farelerin süperovulasyonları 5'er I.U PMSG ve hCG hormonları uygulanarak gerçekleştirildi. Vericilerden elde edilen zigotların erkek pronukleuslarına 1'nci grupta pXGH5, 2'nci grupta p53-248 gen konstraktları mikroenjeksiyon tekniğiyle verildi. Bu zigotlar alıcı (recipient) annelerin oviduktuna cerrahi yol ile transfer edildi. Transferden doğan yavruların transgenik kontrolleri Dot-Blot hibridizasyon yöntemi ile yapıldı.

Her iki deney gruplarında alınan sonuçlar toplu olarak şöyle bulundu:

1. grupta 1470 zigot elde edildi ve bu zigotlardan 1269'una (%86.32) mikroenjeksiyon ile pXGH5 geni verildi. Bu zigotlardan 769'unun (%60.59) canlı olduğuna karar verildi ve 420'si (%54.61) alıcı annelerin oviduktuna transfer edildi. Yapılan bu transfer sonunda 70 yavru (%16.66) elde edildi. Yapılan transgenik kontrollerde elde edilen yavrulardan 3'ününün (%4.28) transgenik olduğu belirlendi.

2. grupta 1246 zigot elde edildi ve bu zigotlardan 1020'sine (%81.86) mikroenjeksiyon ile p53-248 geni verildi. Bu zigotlardan 601'inin (%58.92) canlı olduğuna karar verildi ve 400'ü (%66.55) alıcıların oviduktuna transferi edildi. Transfer sonunda 105 (%26.25) yavru elde edildi. Yapılan transgenik kontrollerde elde edilen yavrulardan 6'sınının (%5.71) transgenik olduğu saptandı.

Her iki grup kendi içlerinde contingency Chi-square test istatistik yöntemiyle karşılaştırıldı ve şu sonuçlar elde edildi. Her iki grupta mikroenjeksiyon yapılan zigotların canlılık oranları karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunamadı ( $P>0.05$ ). İki grup doğum oranları bakımından karşılaştırıldığında ise p53-248 geni uygulanan grup lehine istatistiksel bir anlamlılık görüldü ( $P<0.001$ ). Doğum oranları yönünden 1. grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, deney grubunun oranları önemli derecede düşük bulunurken ( $P<0.001$ ), 2. grup ile kontrol grubu arasında doğum oranları yönünden önemli bir fark oluşmadığı görüldü. Son olarak her iki grup kendi içlerinde transgenik fare eldesi açısından karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlendi ( $P>0.05$ ).

Enjeksiyon yapılmış embriyolardan yavru elde edilmesi nedeni ile mikroenjeksiyon tekniğinin ve embriyo transferinin optimize olduğu söylenebilir. İleride yürütülecek çalışmalarla da elde edilecek optimizasyonundan sonra, sığır, koyun, keçi ve domuz gibi hayvanların embriyolarına gen transferi yaparak transgenik çiftlik hayvanları elde edilebileceği ülkemiz için de düşünülmektedir.

## **7. SUMMARY**

### **STUDIES FOR THE PRODUCTION OF TRANSGENIC MICE**

The main objective of the thesis was to obtain transgenic mice by using two different gene constructs. The experimental strategy consisted of 5 main steps which were summarized as, superovulation of the mice, embryo collection from the superovulated mice, gene transfer to the collected embryos via microinjection, the implantation of the embryos into the oviduct of recipients, and the control of the newborn mice with transgenic analysis procedures.

In total 184 female mice (CB6 F<sub>1</sub> hybrid) were used. The number of the donor female mice was 146. 38 mice were used as recipient mothers. For the synchronization of the recipient mothers, 30 vasectomized male mice of the same strain were used.

In the study, the superovulation was obtained with PMSG and hCG with a concentration of 5 IU. The gene constructs, pXGH5 and p53-248, were microinjected into the male pronuclei of the collected zygotes, and then these microinjected zygotes (about 20-25) were transferred into the oviduct of the recipient mother. The new born transgenic mice were checked by a dot-blot hybridization protocol.

The results of the two experiment can be summarized as follows:

In the first group, 1470 zygote were obtained and 1269 (86.32%) were microinjected with the pXGH5 gene of these zygotes 769 (60.59%) proved to be alive after the injection. And 420 of them were transferred into the recipient mothers (54.61%). As a result, 70 off-springs were obtained. Out of these 3 (4.28%) proved to be transgenic.

In the second group, 1246 zygotes were obtained and 1020 (81.86%) of them were microinjected with the p53-248 gene. 601 zygotes (58.92%) proved to be alive after the injection. And 400 (66.55%) of them were transferred to the recipient mothers. 105 (26.25%) off-springs were obtained. Out of these 6 (5.71%) proved to be transgenic.

All statistical data were discussed using the Chi-square test.

No significant statistic relationship between the numbers of the live zygotes used in the two experiments could be found ( $P>0.05$ ). When the birth ratios of the two group's were compared, a statistically significant value ( $P<0.001$ ) was found for the p-53-248 gene. While comparison of the first group's birth rates with the control group showed a significant drop, no such difference was found for the second group. Comparison of the ratio of transgenic mice in both groups of showed no significant difference ( $P>0.05$ ).

According to the data obtained, the transgenic mice production was optimized. And in the future we think that this technique will help us in the production of live stock like cows, sheep, goats and pigs which are important for Turkish farmers.

## **8. LİTERATÜR LİSTESİ**

- 1-Ahmad,M.; Özkoca,A.; İleri,İ.K.; Pabuçcuoğlu,S.; Usta,S. (1992):** Effect of Variable Concentration of Bovine Serum or Rabbit Embryo Development. Pakistan Vet.Jour. 12(4):186-189.
- 2-Arat,S.; Bağış,H.; Çirakoğlu,B. (1994):** Fare Irklarında Tek Hücreli Embriyonun Ovidukta Transfer Çalışmaları. Türk.Vet.Hay.Derg. 18(4):169-173.
- 3-Arat,S.; Bağış,H.; Çirakoğlu,B. (1994):** Tek Hücreli Fare Embriyolarında Mikroenjeksiyon. Türk.Vet.Hay.Derg. 18(5):237-240.
- 4-Arda,M. (1990):** Embriyonik Manipasyonlar. Embriyolara Gen transferleri. Pendik Hayvan Hast.Merk.Arşt.Ens.Dergisi. 21:80-93.
- 5-Arthur,G.H.; Noakes,D.E.; Pearson,H. (1982):** Veterinary Reproduction and Obstetrics 5th.ed.East susex.
- 6-Awata,T.; Onishi,A.; and Muramatsu,S. (1984):** A Simple Technique for Production of Chimeric Mouse Embryos. Proc.Japon.Acad.Ser.B. 60:253-255.
- 7-Barnaga,M. (1989):** Making Transgenic Mice: Is It Really That Easy? Science. 245: 590-591.
- 8-Bearden,H.I.; Fugay,J.W. (1984):** Applied Animal Reproduction Boston Publishin Company Boston Virginia.
- 9-Bensaude,O.; Babinet,C.; Morange,M.; Jacob,F. (1983):** Heat Shock Proteins, First Major Products of Zygotic Gene Activity in Mouse Embryo. Nature. 305:331-332.
- 10-Betteridge,K.J. (1981):** An Historical look at Embryo Transfer. J.Reprod.Fert.62:1-13
- 11-Biggers,I.D.; Whitten,W.K.; and. Whittingham.D.G. (1971):** The Culture of Mouse Embryos in Vitro in Methods in Mammalian Embryology (Ed.J.C.Danie) pp.86-116 W.H. Freeman San Francisco.
- 12-Botteri,F.M.; Putten,V.H; Wong,D.F.; Sauvage,C.A.; Evans,R.M. (1987):** Unexpected Thymic Hyperplasia in Transgenic Mice Harboring a Neuronal Promoter Fused with Simian Virus 40 Large T Antigen. Mol.Cell.Biol. 7(9):3178-3184.

- 13-Brinster,R.L.; Chen,H.Y.; Trumbauer,M.E.; Yagle,M.K.; Palmiter,R.D. (1985):** Factors Affecting the Efficiency of Introducing Foreign DNA into Mice by Microinjecting eggs Proc.Natl.Acad.Sci. 82:4438-4442.
- 14-Brinster,R.L. (1969):** In Vitro Cultivation of Mammalian Ova.Adv.Biosci. 4:199-234.
- 15-Bronson,R.; Cunnane,M. (1975):** Transfer of Uterine Implantation Blastocyst to the Oviduct in Mice. Fert.Steril. 5:455-459.
- 16-Brunt,I.V. (1988):** Molecular farming: Transgenic Animals as Bioreactors. Bio/Technology 6(10):1149-1154.
- 17-Buchini,D.; Ripoche,M.A.; Stinnakre,M.G.; Desbois,P.; Lores,P.; Monthieux,E.; Absil,J.; Lepesant,J.A.; Pictet,R.; Jami,J. (1986):** Pancreatic Expression of Human Insulin Gene in Transgenic Mice. Proc.Natl.Acad.Sci. 83: 2511-2515.
- 18-Burki,K. (1990):** Transgenic Animals as Models in Biomedical Research. In: Farm Animals in Biomedical Research. Ed.Uladimir Pliska and Gerald Stranzinger. Verlag PaulParey. Hamburg and Berlin.
- 19-Carver,A.S.; Dalrymple,M.A.; Wrigt,G.; Cottom,D.S.; Reeves,D.B.; Gibson,Y.H.; Keenan,J.L.; Barrass,Scott,A.R.; Colman,A.; and Garner,I. (1993):** Transgenic Livestock as Bioreactors: Stable Expression of Human Alpha-1-Antitrypsin by a Flock Sheep. Bio/Technology 11:1263-1269.
- 20-Champlin,A.K.; Dorr,D.L.; and Gates,A.H. (1973):** Determining the Stage of the Östrus Cycle in the Mouse by the apperance of the Vagina. Biol.Reprod. 8:491-494.
- 21-Church,R.B.; Schaulfele,F.S.; and Meckling,K. (1985):** Embryo Manipulation and Gene Transfer in Livestock. Canadian Journal of Animal Science. 65:527-537.
- 22-Costantini,F.; Lacy,E. (1981):** Introduction of a Rabbit  $\beta$ -Globin Gene into the mouse Germ Line. Nature. 294:92-94.
- 23-DePamphilis,M.L., Herman,S.A., Martinez-Salas,E., Chalifour,L.E, Wirak,D.O., Cupo,D.Y.,Miranda,M. (1988):** Microinjecting DNA into Mouse Ova to Study DNA Replication and Gene Expression and to Produce Transgenic Animals.Bio Techniques. 6(7):662-680.

- 24-Dickmann,Z. (1971):** Egg transfer.In: Methods in Mammalian Embryoloji. SanFrancisco, W.H.Freeman. p: 133-145.
- 25-Dickmann,Z. (1982):** Egg Transfer in the Mouse and Rat.In: Mammalian Egg Transfer (ed.C.E.Adams) Florida, Inc.Boca Raton, CRS Press. (2): 20-26.
- 26-Drost,M. (1986):** Embryo Transfer. In: S.J.Robert, Veterinary Obstetrics and Genital Diseases (Theriogenology), Edwar Brothers. Inc.Ann.Arbor. Michigan.
- 27-Ebert,K.L. (1989):** Gene Transfer Through Embryo Microinjection. Chap.6, In: Animal Biotechnology. Ed.L.A. Babiuk.,J.P.Phillips. Pergamon Press, Oxford.
- 28-Faddy,M.I.; Gordon,R.G.; and Edwards,R.G. (1983):** Ovarian Follikülce Dynamics in Mice. A Comparative Study of three İnbred Stranis and F<sub>1</sub> Hybrid. j.Endocrinology. 96:23-24.
- 29-Gates,A.H. (1971):** Maximizing Yield and Developmental Uniformity of Eggs in Methods in Mammalian Embryology, pp.64-76 W.H.Fremaan. San Francisco.
- 30-Gordon,J.W.; Ruddle,F.H. (1983):** Gene Transfer into Mouse Embryos: Production of Transgenic Mice by Pronuclear İnjection. Methods Enzymology. 101:411-433.
- 31-Gordon,J.W.;Ruddle,F.H.(1981):** Integration and Stable Germ Line Transmission of Genes Injected into Mouse Pronuclei. Science. 214:1244-1246.
- 32-Gordon,K.; Lee,E.; Vitale,I.A.; Smith,A.E; Westphal,H.; Henughausen.(1987):** Production of Human Tissue Plasminojen Activator in Transgenic Mouse Milk. Bio/Tech. 5:1183-1187
- 33-Gunderson,K.; Hanley,T.H.; and Merlie,I.P.; (1993):** Transgenic Embryo Yield is Increased by a Simple, Inexpesive Micropipet Treatment. Dept. of Moleccular Biology and Pharmacology. Washington University Box 8103 660 S.Euclid Avenue St.Louis, MO 63108. BioTechniques. 3:412-414
- 34-Gökçen,H. (1989):** Reprodüktif Fizyoloji Alanındaki Son Gelişmelerin Pratikteki Yan-sımları. Bursa Vet.Hek.Odası 2. Mesleki Eğitim Semineri (Tebliğ özetleri) 17-18 Mayıs 1989. Bursa.

- 35-Gökçen,H. (1990):** Reprodüktif Fizyoloji p.17-21 Ed. Alaçam In "Theriogenoloji"  
Nurol Matbacılık. Ankara.
- 36-Hafez,E.S.E. (1987):** Embryo Transfer I.V.F. and Genetic Engineering. In: Reproduction in Farm Animals 5th ed, (ed.E.S.E.Hafez). Philadelphia, Lea and Febiger. 528-545.
- 37-Hafez,E.S.E.(1987):** Reproductive Cycles. Ch. 6: 107-129 ed. Hafez In "Reproduction in Farm Animals" Lea and Febiger, Philadelphia.
- 38-Hafez,E.S.E. (1987):** Laboratory Animals p.363-378 Ed.E.S.E.Hafez In "Reproduction in Farm Animals" Lea and Febiger, Philadelphia.
- 39-Hahn,J. (1984):** The Value of Laboratory Animal Models in Embriyo Transfer Resch. Theriogenology. 21(1):45-49.
- 40-Hammer,R.E.; Pursel,K.G.; Palmiter,R.D.; Brinster,R.L. (1989):** Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microenjection. Nature. 315: 680-683.
- 41-Harbers,K.; jahner,D.; and. Jaenisch,R. (1981):** Microinjection of Cloned Retroviral Genomes into Mouse Zygotes, İntegration and Expression in the Animal. Nature 293: 540-542.
- 42-Hogan,B.; Costantini,F.; Lacy,E. (1986):** Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manuel. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- 43-İleri,İ.K.; Özkoca,A.; Ak,K.; Papuçoğlu,S.; Usta,S.; Soylu,K.(1989):** Hayvan İslahında Embriyo Transfer Çalışmalarının Yeri ve Önemi. Bursa Vet.Hek.Odası. II. Mesleki Eğitim Semineri (Tebliğ özetleri) 17-18 Mayıs 1989 Bursa.
- 44-İleri,İ.K.; Sayın,T. (1986):** Sığırlarda Embriyo Transfer Çalışmaları İst.Ünv.Vet.Fak. Derg. 12(1):23-25
- 45-Janenisch,R. (1988):** Transgenic Animals. Science. 240:1468-1479.
- 46-Janenisch,R.;and Beatrice,M. (1974):** Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healty Adult Mice Derived from Pre-İmplantasyon Blastocysts İnjected with Viral DNA. Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 71(4):1250-1254.

- 47-Kaufman,M.H.; and Whittingham,D.G. (1971):** Viability of Mouse Oocytes Ovulated within 14 hours of an Injection of Pregnant Mares' Serum Gonadotrophin J.Rep.Fert. 28:465-468.
- 48-Kılıçoğlu,C. (1985):** Fare Ovumlarının Tek Hücreliden Blastosist Aşamasına Kadar in Vitro Kültürü. A.Ü.Vet.Fak.Derg. 32:301-310.
- 49-Koike,K.; Hinrichs,S.H.; Isselbacher,K.J.; Jay,G. (1990):** Transgenic Mouse Model for Human Gastric Carcinoma. Proc.Natl.Acad.Sci. 86: 5615-5619.
- 50-Kraemer,D.C.; Bowen,M.J. (1986):** Embryo Transfer in Laboratory Animals. In:Current Therapy in Theriogenology (ed.D.A.Morrow). Philadelphia, W.P.Saunders. Co. p:73-76
- 51-Lehtonen,E.; and Kankondi,R. (1987):** Rate of Gonadotrophin-Induced Abnormalities in Mouse Ova is Related to the Site of Hormone Administration. Journal of Reproduction and Fertility. 80(2):613-617.
- 52-Lin,T.P. (1966):** Microinjection of Mouse Eggs. Science. 151:333-337.
- 53-Lovell-Badge,R.H. (1985):** Transgenic Animals. New advances in Field. Nature. 315: 628-629.
- 54-Luckett,D.C.; Muleherjee,A.B. (1986):** Embryonic Characteristics in Superovulated Mouse Strains. The Journal of Heredity 77:39-42.
- 55-Marsk,L.; Larsson,K.S. (1974):** A simple Method for Non-Surgical Blastocyst Transfer in Mice. J.Reprod.Fert. 37:393-398.
- 56-Maurer,R.R.; Echterncamp,S.E. (1982):** Hormonal Asynchrony and Embryonic Development. Theriogenology. 17(1):11-21.
- 57-Mehta,T.S.; and Kiessling,A.A. (1990):** Development Potential of Mouse Embryos Conceived in Vitro and Cultured in E.D.E.A. Acid with or without Amino Acids or Serum Biology of Reproduction. 43: 600-606.
- 58-Mc Donald,L.E. (1980):** Veterinary Endocrinology and Reproduction. 3th Ed. Lea & Febiger, Philadelphia.

- 59-Mc Laren,A.; Michie,D. (1959):** Studies on the Transfer of Fertilized Mouse Eggs to Uterine Foster Mothers. J.Exp.Biol. 36:40-50.
- 60-Old,R.W.;and Primrose,S.B. (1985):** Principles of Gene Manipulation an İntroduction to Genetic Engineering. Third Edition. Blackwell Scientific Publication.
- 61-Özkoca,A.; İleri,İ.K.; Sayın,T. (1984):** Tavşanlarda Ovidukt Yıkaması Yöntemiyle Embriyo Kazanımı ve Transplantasyon Üzerinde Araştırmalar. İst.Ünv.Vet.Fak.Derg. 10(1):1-25.
- 62-Pabuçcuoğlu,S.; İleri,İ.K. (1994):** PMSG'nin İki Farklı Uygulaması ile Kazanılan Tavşan Embryolarının Değişik Vasatlarda Kùltürleri ve Transferi. Türk Vet.Hayv. Derg. 18(2):53-58.
- 63-Palmiter,R.D.; and Brinster,R.L. (1985):** Transgenic Mice. Cell. 41:343-345.
- 64-Palmiter,R.D.; Brinster,R.L.; Brinster,R.L.; Hammer,R.E.; Trumbauer,M.E.; Rosenfeld,M.G.; Brinberg,N.G.; and Evans,R.M. (1982):** Dramatic Growth of Hormon Microinjected with Metallothionein-Growth Hormone Fusion Genes Nature. 300:611-615.
- 65-Petters,R.M.; Johnson,B.H.; and Mercer,W.E. (1987):** Production of Transgenic Mice Following Deoxyribonucleic Acid Microenjektion and Embryo Freezing. Theriogenology. 27(3):507-515.
- 66-Pursel,V.G.; Pinkert,C.A.; Miller,K.F.; Bolt,D.J.; Campbell,R.G.; Palmiter,R.D.; Brinster,R.L.; Hammer,R.E. (1989):** Genetic Engineering of Livestok. Science. 244: 1281-1287.
- 67-Quinn,P.; Barros,C.; Whittingham,D.G. (1982):** Preservation of Hamster Oocytes to Assay the Fertilizing Capacity of Human Spermatozoa. J.Reprod.Fertil. 66: 161-168.
- 68-Rafferty,K.A. (1970):** Methods in Experimental Embryology of the Mouse. Baltimore and London The Johns Hopkins Press.
- 69-Reetz,I.C.; Schmidt,M.W.; Kraft,V.; and Hedrich,H.J. (1988):** Rederivation of İnbred Strains of Mice by Mens of Embryo Transfer. Laboratory-Animal Science. 38(6):696-701.

- 70-Rubin,E.M.; Lu,R.; Cooper,S.; Mohandas,N.; Wai Kan,Y. (1988):** Introduction and Expression of the Human  $\beta$ -Globin Gene in Transgenic Mice. *Am.J.Hum.Genet.* 42: 582-591.
- 71-Seidel,G.E. (1982):** Applications of Microsurgery to Mammalian Embryos. *Theriogenology.* 17:23-34.
- 72-Selden,R.F.; Wagner,T.E.; Blethen,S. (1988):** Expression of the Human Growth Hormone Variant Gene in Cultured Fibroblasts and Transgenic Mice. *Proc.Nat. Acad. Sci.* 85:8241-8245.
- 73-Simons,J.P.; Wilmut,I.; Clark A.I.; Archibald,A.L.; Bishop,J.O. (1988):** Gene Transfer Into Sheep. *Bio/Technology.* 6:179-183.
- 74-Spindle,A.I.; Goldstein,L.S. (1975):** Induced Ovulation in Mature and Mice Developmental Capacity of the Embryos In Vitro. *J.Reprod.Fert.* 44:113-116.
- 75-Swift,G.H.; Hammer,R.E.; MacDonald,R.J.; Brinster,R.L. (1984):** Tissue-Specific Expression of the Rat Pancreatic Elastase I Gene in Transgenic Mice. *Cell.* 38:639-646.
- 76-Toyoda,Y.; Chang,M.C. (1974):** Fertilization of Rat Eggs In Vitro by Epididymal Spermatozoa and the Development of Eggs Following Transfer. *J.Reprod.Fert.* 36:9-22.
- 77-Westphal,H. (1986):** Transgenic Mammals and Biotechnology. *FASEB.J.* 3: 117-120.
- 78-Wilmut,I.; Archibald,A.C.; Harris,S.; McClenaghan,M.; Simons,J.P. (1990):** Methods of Gene Transfer and Their Potential Composition. *Theriogenology.* 33(1): 113-123.
- 79-Wordinger,R.J.; Brown,D.; Atkins,E.; and Jackson,F.C. (1989):** Superovulation and early Embryo Development the Adult Mouse After Prenatal Exposure to Diethylstilbestrol. *J.Reprod.Fert.* 85:383-388.
- 80-Whittingham,D.G. (1968):** Fertilization of Mouse Egg In Vitro. *Nature* 220: 592-593
- 81-Van der Putten,H. (1992-1993):** " Kişisel Görüşme " Department of Biotechnology, Ciba-Geigy A.G., CH-4200 Basel, Switzerland.

**9. RESİMLER****Resim 1. Çalışmada kullanılan çeşitli kimyasal maddeler ve pipetler.****Resim 2. Vazektomi ameliyatında vasa deferensin bulunması.**

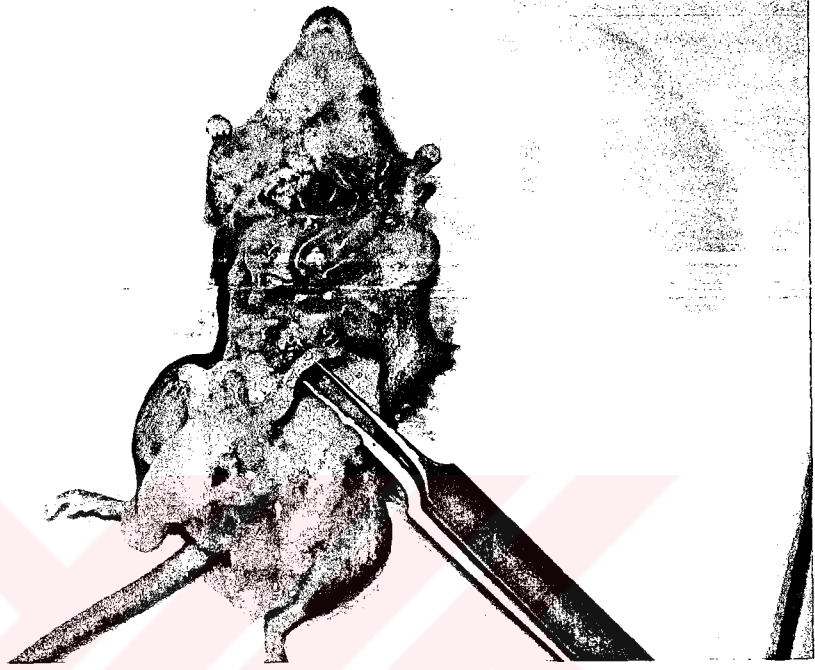
**Resim 3. Vasa deferense ligatür atılması.**



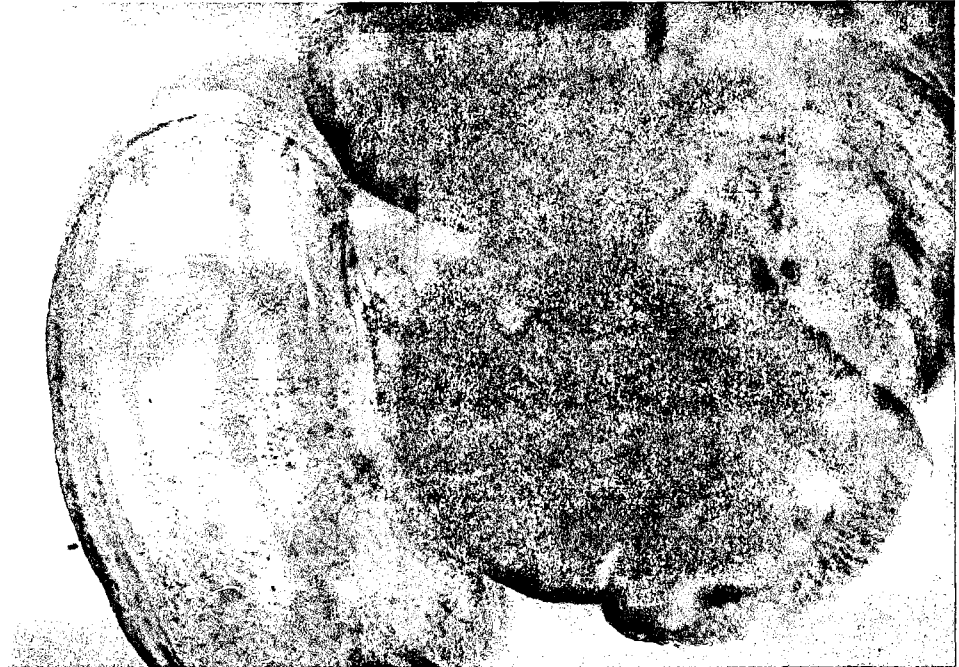
**Resim 4. Vasa deferensin bir parçasının kesilerek alınması.**



**Resim 5. Verici (donor) farenin üreme organları.**



**Resim 6. Verici (donor) farenin ampullası.**



**Resim 7. Ampullanın delinmesiyle dışarıya çıkan kumulus hücre topluluğu içinde bulunan embrioların invert mikroskoptaki görüntüsü (50 Büyütme).**

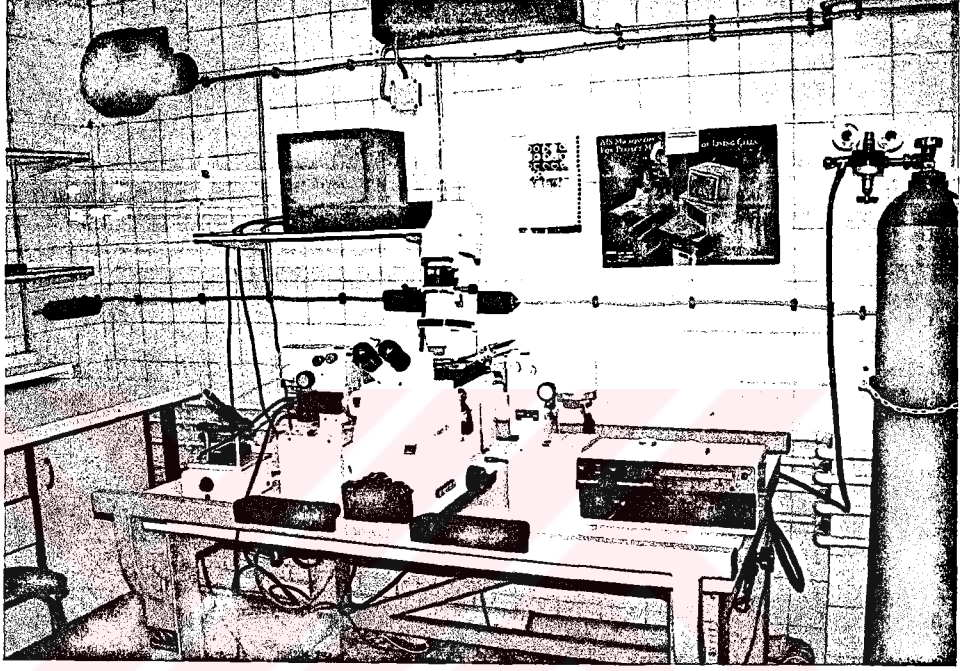


**Resim 8. Hyaluronidaz enzimli M2 mediumunda bulunan embrioların kumulus hücrelerinden kurtulması (50 Büyütme).**

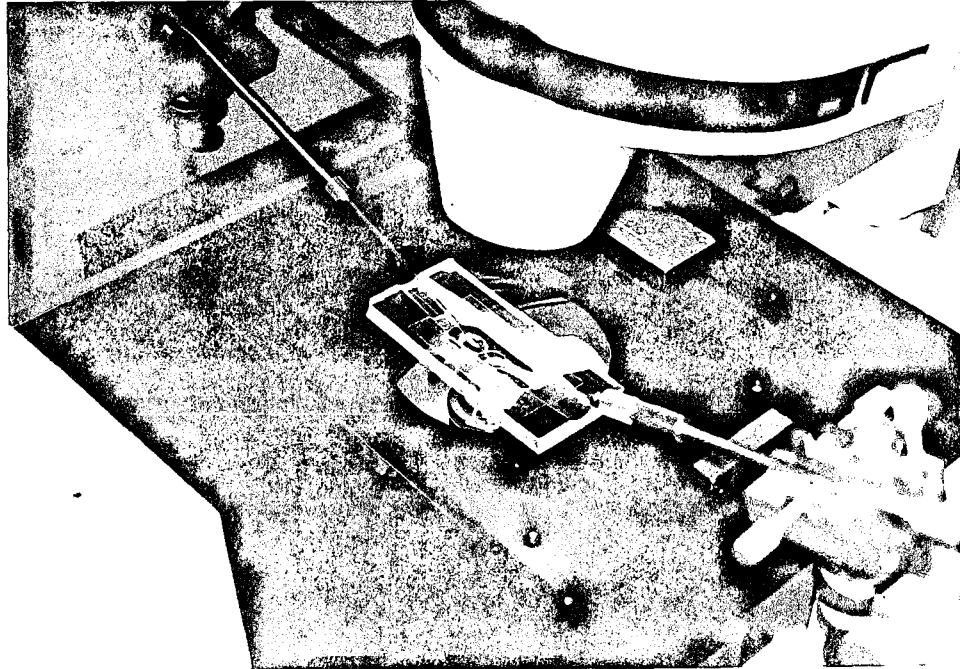


**Resim 9. Mikroenjeksiyon Seti**

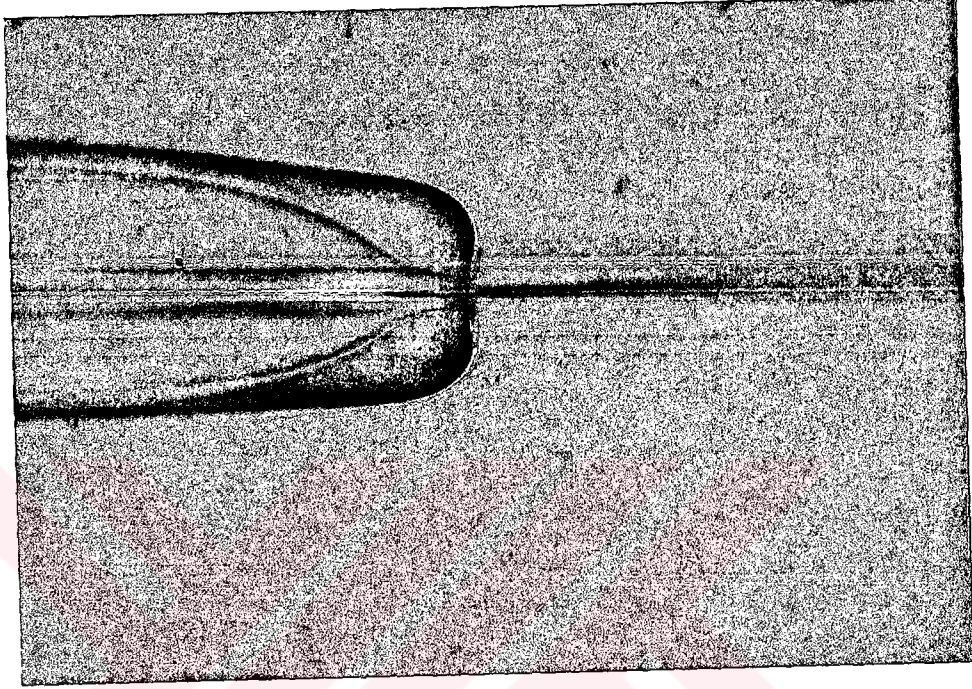
(İnvert Mikroskop, Mikroenjektör, 2 Ad. Mikromaniplatör,  
Mikrometreli Hamilton Şırınga, 2 Ad. Pipet Tutucusu, Azot  
Tüpü, Monitör ve Kamera)



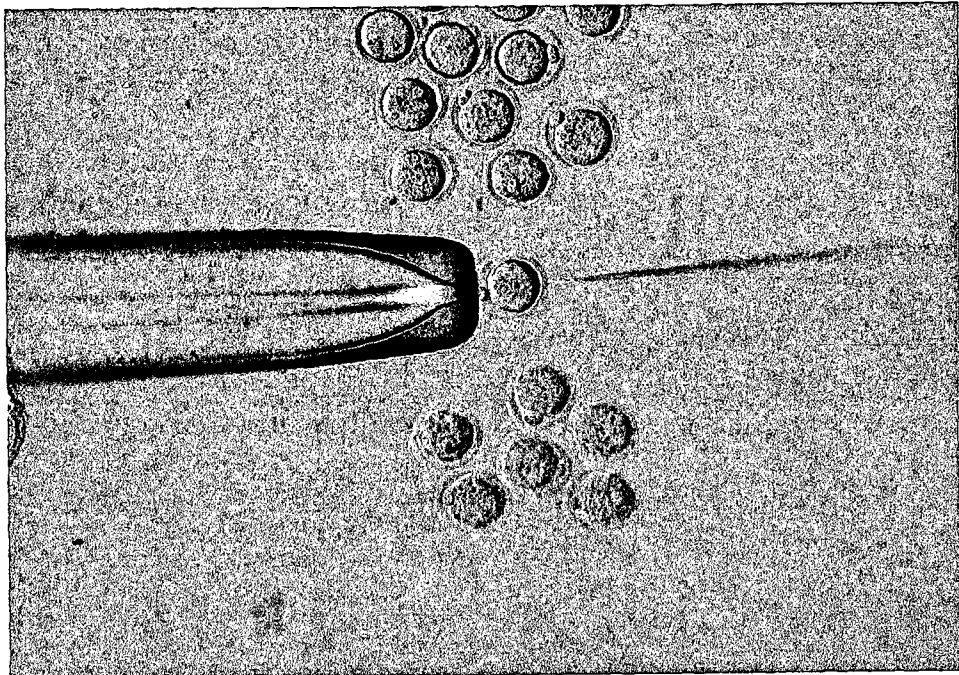
**Resim 10. Mikronjeksiyon lamının invert mikroskopun tablasına yerleştirilmesi ve embriyo tutucu (holding) pipet ile enjeksiyon pipetinin M2 medium damlasının dibine odaklanması.**



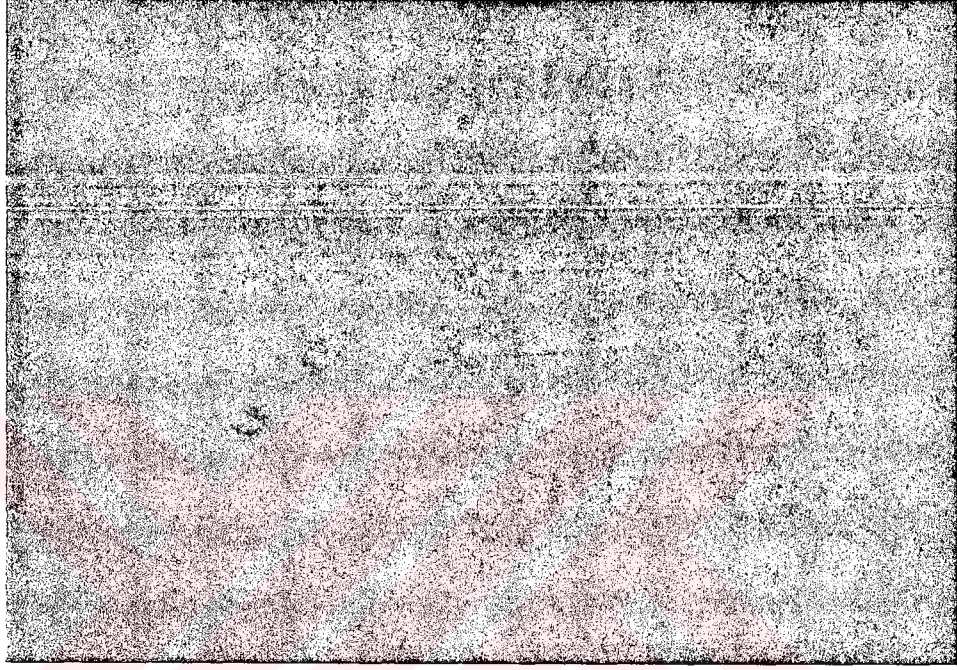
**Resim 11. İnvirt mikroskopta tutucu (solda) ve enjeksiyon (sağda) pipetlerinin ayarlarının yapılması (200 Büyütme).**



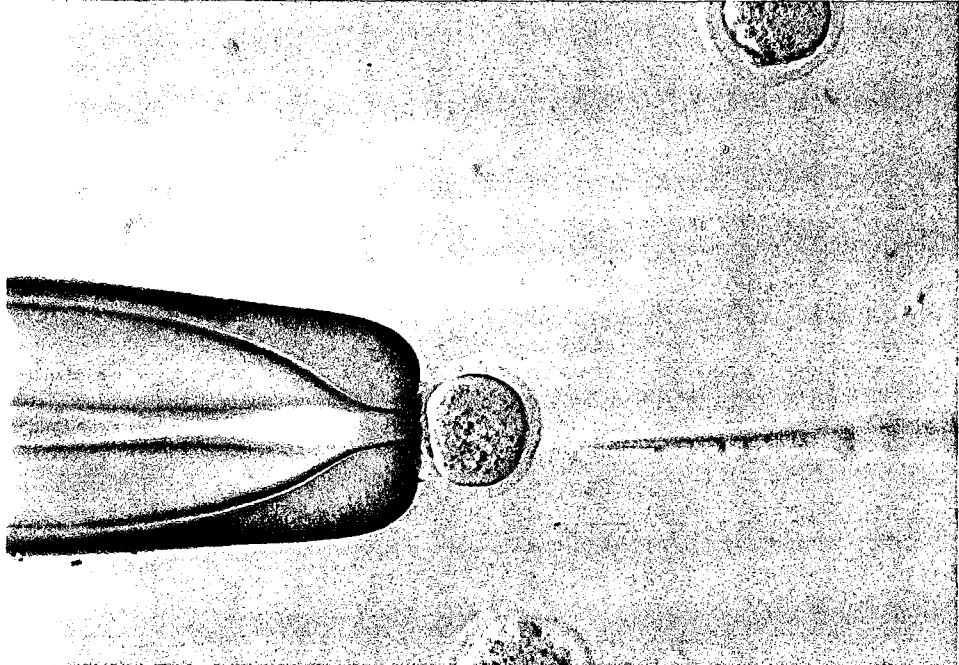
**Resim 12. İnvirt mikroskopta embriyoların ve pipetlerin görüntüsü. (100 Büyütme)**



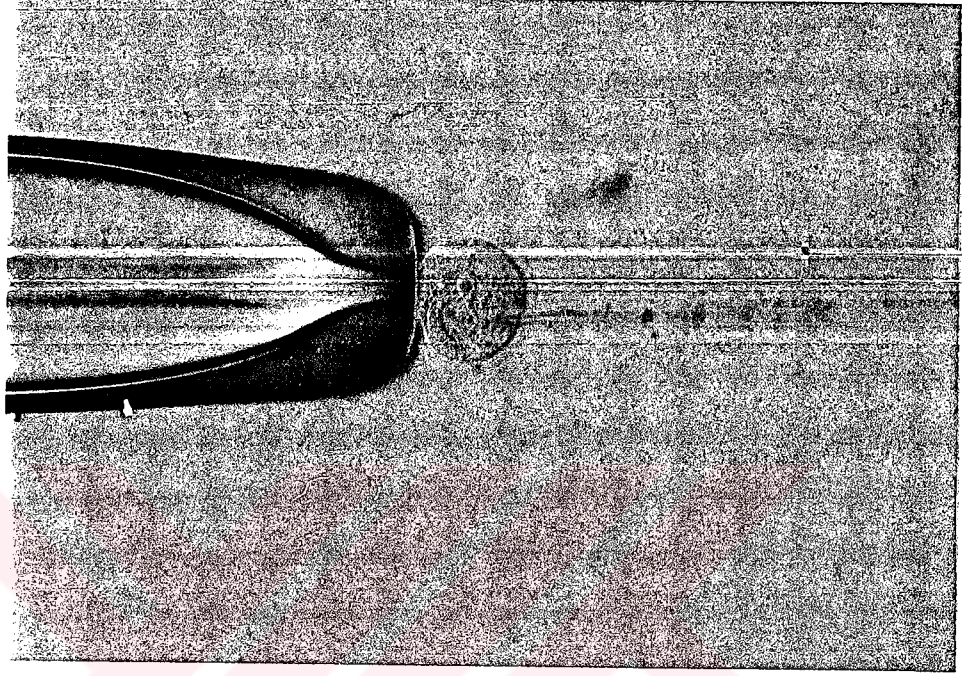
**Resim 13. Enjeksiyon pipetinin uç kısmının açıklığının kontrolü ile verilecek DNA konstraktının hacminin (1-2 piko-litre) ayarlanması.**



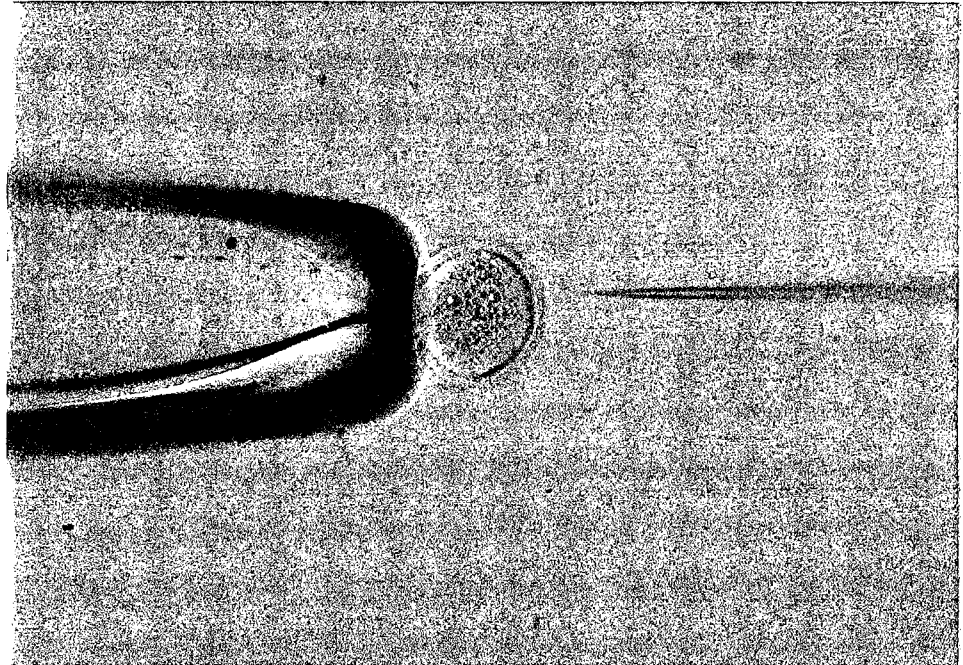
**Resim 14. Embriyonun tutucu pipet (holding) ile tutulması.**



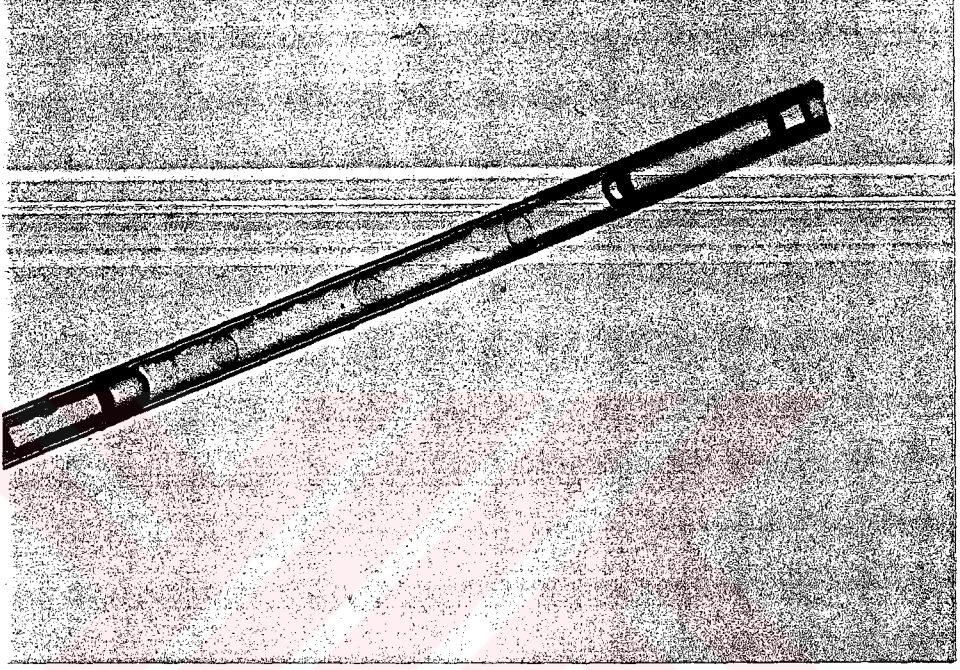
**Resim 15. Mikroenjeksiyon pipetinin erkek pronukleusun içine sokulması.  
(200 büyütme)**



**Resim 16. DNA solusyonunun erkek pronukleusa verilmesinden sonra  
pronukleusun büyümesi.**



**Resim 17. Embriyo transfer pipetine enjeksiyon yapılmış embriyoların iki hava kabarcığı arasına dizilerek yüklenmesi.**



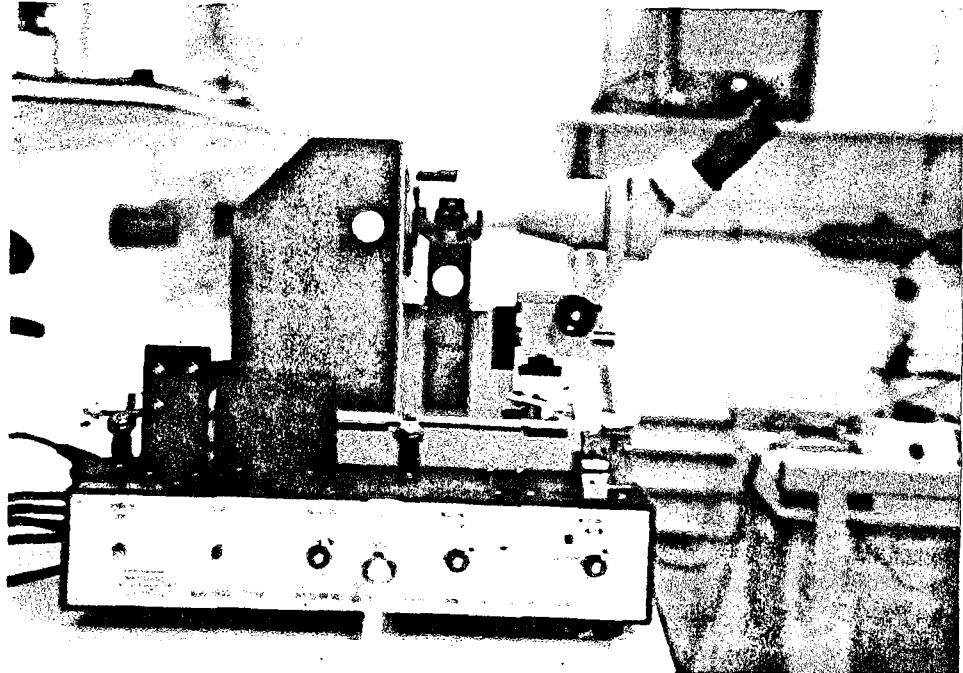
**Resim 18. Çiftleşmiş Farede Vaginal Plak.**



**Resim 19. Embriyo transferi yapılmış alıcı annelerin (recipient) yavruları.**



**Resim 20. Tutucu (holding) ve mikroenjeksiyon pipetlerinin hazırlanmasında kullanılan Mikropuller ve Mikroforj.**



## 10. ÖZGEÇMİŞ

1959 yılında Adıyamanın Besni ilçesinde doğdum. İlk, Orta ve lise tahsilimi İstanbul'da tamamladım.

1979 yılında Edirne Yüksek Öğretmen Okulu Fizik-Biyoloji Bölümünde 1 yıl okuduktan sonra, 1980 yılında kayıt olduğum Sakarya D.M.M. Akademisi Metalürji Mühendisliğinde yaklaşık 2 ay okudum. Aynı yıl ön kayıt sistemiyle Kocaeli D.M.M. Akademisi Jeofizik Mühendisliğine geçtim. Bu bölümde 1 yıl okuduktan sonra 1981 yılında ÖYS ile İ.T.Ü. Jeofizik Mühendisliğine kayıtlarımı yaptırarak 1982 yılına kadar bu bölümde eğitim gördüm. 1982 yılında İ.Ü. Vet.Fak'sini kazandım ve 1987 yılında aynı fakülteden mezun oldum.

1987-1988 yılları arasında Bayramoğlu Şirketler Grubunda ve Bursa Güneşli Koçman Damızlık Tavuk ünitelerinde Teknik Müdür olarak görev yaptım.

Vatani görevimi Yedek Subay olarak tamamladıktan sonra, 1990 yılının Nisan ayında TÜBİTAK M.A.M. Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'ne bağlı Transgen Laboratuvarında kuruluş aşamasından itibaren laboratuvar sorumlusu olarak çalışmaktayım.

1991 yılında İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne Doktora öğrencisi olarak kayıt oldum.

Yapmış olduğum çalışma süreci içerisinde, UNİDO (Birleşmiş Milletler Kalkınma Örgütü) destekli proje çerçevesinde transgenik fare eldesine yönelik teknolojik çalışmaları bitirdik. Halen Enstitümüzün Moleküler Onkoloji Laboratuvarı ile ortak bir proje üzerinde çalışmalarına devam etmekteyim.

DOKÜMANIASYON MÜHÜRÜ