1. Slide: Kolegice i ja smo za seminarsku temu dobile transfer jezgre somatske stanice, odnosno somatic cell nuclear transfer ili SCNT.
2. Slide: Za početak ćemo ponoviti što je to totipotentnost. Totipotentnost je dakle sposobnost stanice da stvori, odnosno diferencira se u sve tipove stanica organizma uključujući i ekstraembrionalna tkiva kao što je placenta. U normalnom razvoju sisavaca totipotentnost je ograničena na zigote ili blastomere preimplantacijskog embrija u ranoj fazi. Nakon oplodnje oocite su sposobne reprogramirati terminalno diferencirane spermije u totipotentno stanje. Nakon toga se totipotentnost postepeno gubi tijekom preimplantacijskog razvoja. Postoje i „umjetni“ načini kojima možemo inducirati totipotentno stanje, a inducibilna metoda o kojoj ćemo mi danas pričati je transfer jezgre somatske stanice, odnosno SCNT koja se još naziva i kloniranje. Dr. John Gurdon je 1958. prvi pokazao da je moguće klonirati životinje preko diferenciranih somatskih stanica žabe SCNT metodom. 90-ih godina kloniran je prvi sisavac – ovca Dolly. Od tada do danas uspješno je klonirano preko 20 vrsta sisavaca.
3. Slide: SCNT možemo definirati kao laboratorijsku strategiju stvaranja održivog embrija iz somatske i jajne stanice. Tehnika se sastoji od uzimanja enukleirane jajne stanice i implantacije donorske jezgre iz somatske stanice. Drugim riječima jezgra somatske stanice transferira se u citoplazmu enukleirane jajne stanice (jajne stanice kojoj je uklonjena jezgra). Kada somatska jezgra uđe u stanicu citoplazmatski faktori jajne stanice ju reprogramiraju da postane jezgra zigote. Razvija se do stadija blastociste iz čije se unutarnje stanične mase mogu stvoriti embrionalne matične stanice odnosno ECS. Ovakve blastociste, odnosno ESC primjenjuju se u terapeutskom, ukoliko su ljudskog podrijetla, i reproduktivnom kloniranju. Terapeutsko kloniranje odnosi se na potencijalnu upotrebu SCNT-a u regenerativnoj medicini.
4. Slide: SCNT zahtijeva upotrebu mikromanipulatora, skupih uređaja za fizičku interakciju s uzorkom pod mikroskopom. Koriste se za precizno manipuliranje stanicama. Koristeći mikromanipulator, napravi se otvor u zoni pellucidi i pomoću pipete se usisava jezgra jajne stanice. Zatim se napravi još jedan otvor drugom pipetom za ubrizgavanje somatske jezgre. Alternativno se može koristiti električna energija za spajanje prazne jajne stanice sa stanicom donora koja sadrži jezgru.
5. Slide: Postoji nekoliko tehničkih prepreka koje ograničava upotrebu SCNT tehnologije. Prije svega je to niska učinkovitost kloniranja gotovo svih vrsta. Također su često opažene abnormalnosti u ekstraembrionalnim tkivima kloniranih embrija kao što je npr. placenta. Uočavaju se i abnormalnosti kloniranih životinja nakon rođenja kao što su pretilost, imunodeficijencije, respiratorni nedostatci, rana smrt, ali izgleda da se ovi fenotipovi ne prenose na potomstvo.
6. Slide:
7. Slide: SCNT uključuje 3 glavna koraka: enukleaciju, injektiranje odnosno fuziju i aktivaciju. Enukleacija dakle predstavlja uklanjanje jezgre jajne stanice nakon čega se u nju injektira jezgra somatske stanice, odnosno one se fuziraju. Nedugo nakon toga somatska jezgra prolazi kroz razgradnju nuklearne membrane kako bi se formirali kondenzirani kromosomi nalik onima u metafazi. Taj se proces naziva preuranjena kondenzacija kromosoma ili PCC, a uvjetuju ga čimbenici koji potiču M fazu odnosno MPF-ovi prisutni u citoplazmi jajne stanice. Tijekom PCC-a većina proteina vezanih za kromatin uključujući transkripcijske faktore se odvaja od genoma. PCC se može stabilno održavati satima dok se jajne stanice ne aktiviraju. Dakle, nakon toga slijedi aktivacija rekonstruiranog embrija.
8. Slide: Aktivacija oocite je zapravo njen izlazak iz M faze te početak njenog razvoja u embrij. Prilikom oplodnje to se postiže fosfolipazom C zeta 1 ili PLCZ1 koju prenosi spermij, a uzrokuje oscilacije kalcija i razaranje MPF-ova. PLCZ1 nije prisutna u somatskim stanicama pa se ovdje oocite moraju aktivirati „umjetnim“ putem. Za mišje modele se najčešće koristi stroncijev klorid. Kod stanica nekih drugih vrsta, uključujući ljude i majmune, on nije baš potpuno djelotvoran pa se koriste neke druge tvari. Aktivacijom, odnosno izlaskom iz M faze stanica ulazi u G1 fazu i formira nuklearnu membranu. Oplođena zigota u ovoj fazi ima 2 jezgre koje se nazivaju majčinski i očinski pronukleus ili PN, dok se u SCNT embrijima formira pseudo-pronukleus odnosno PPN. Broj PPN-ova varira među embrijima ovisno o slučajnoj raspodjeli PCC kromosoma, ali normalno nastaju 1 ili 2. PPN prolazi i nuklearnu ekspanziju jer inkorporira velik broj majčinskih proteina. Tada se događaju veće promjene kromatina i proteina. Nakon ovih procesa slijedi replikacija DNA. Oocite i spermiji su transkripcijski inaktivni. Nakon oplodnje, ili u našem slučaju reprogramiranja, zigota postupno obnavlja transkripciju što se naziva aktivacija zigotskog genoma. Rezultat ovih događanja je klonirana blastocista iz koje možemo dobiti ESC koje možemo kultivirati *in vitro*.