

BOĞADA SİNAPTONEMAL KOMPLEKS ANALİZİ

Belma Alabay*

Emel Ergün**

Summary: *In this study, it has been aimed to modify the method to be used for the examination of synaptonemal complex between homolog chromosomes at the pakiten stage of meiotic division in bull primary spermatocytes. Chromosome aberations have not been observed in metaphase stages in four bulls which were examined by modified micro spreading method of Counce and Meyer.*

Homolog chromosomes were 29 pairs and bivalan. Y chromosome was paired by 1/3 of X chromosome.

Key Words: *Bull, meiosis, synaptonemal complex, electron microscope.*

Özet: *Bu araştırmada, boğa primer spermatositlerinde mayoz bölünmenin pakiten döneminde, homolog kromozomlar arasındaki sinaptonema kompleksinin incelenmesinde kullanılacak metodun kendi şartlarımıza ayarlanması amaçlandı. Counce ve Meyer'e ait olup modifiye edilen mikro yayma yöntemiyle incelenen 4 boğaya ait metafaz kromozomlarında bir düzensizliğe rastlanmadı.*

Homolog kromozomlar 29 çiftti ve bivalandı. Y koromozomu X kromozomunun sadece 1/3'ü ile eşleşmişti.

Anahtar Kelimeler: *Boğa mayoz, sinaptonemal kompleks, elektron mikroskop.*

Giriş

Bu araştırmada, boğa primer spermatositlerinde mayoz bölünmenin pakiten döneminde bulunan homolog kromozomlar arasındaki sinaptonema kompleksinin incelenmesinde kullanılan Counce ve Meyer (4) metodu orijinal şekliyle uygulandı. İyi sonuç alınamadı, bazı değişiklikler yapılarak lokal laboratuvar koşullarına ayarlanması amaçlandı.

Mayoz bölünme, eşeyli üreme ile çoğalan canlıların eşey hücrelerinde görülür. Mayoz ile bölünen hücrelerde birtakım aşamalar olur ve bu, kromozom sayısının redüksiyonu ile karakterizedir. Redüksiyon bölünmesinin amacı, her tür için belli olan kromozom sayısının kuşaktan kuşağa aynı kalmasını sağlamaktır.

Bir diploid hücrenin çekirdeği, biri anneden diğeri babadan gelen ve eş gen lokusları taşıyan kromozomlar içerir; bunlara homolog kromozomlar denir. Her bir kromozom iki kardeş kromatit'den oluşmuştur. I. mayoz bölünmenin profazında homolog kromozomlara ait

kromatit'ler kendi aralarında parçacıklar değiştirir; bu olaya rekombinasyon denir (1).

Kromozom eşleşmesi üzerindeki çalışmalar, sinaptonema kompleksi adı verilen üçlü bir yapının incelenmesine yöneliktir. Sinaptonema kompleksi, homolog kromozomların eksenlerini meydana getiren iki lateral ve bir sentral elementten oluşmuştur (13).

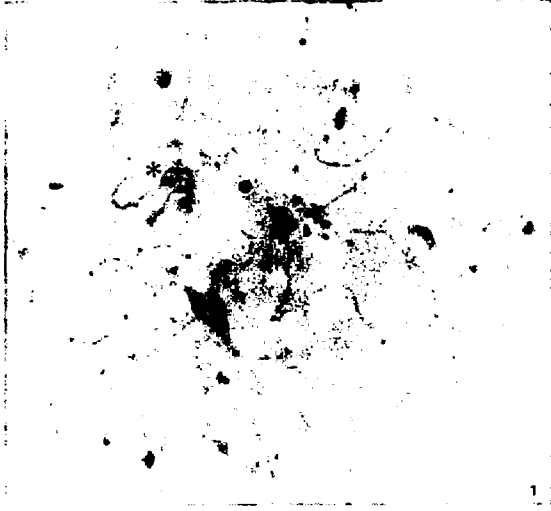
Spermatosit'lerin incelenmesi, oosit'lere oranla daha kolaydır. İlk defa 1956 yılında ke-revit spermatosit'lerinde, 1968'de güvercin, kedi ve insan spermatosit'lerinde Moses'in tarif ettiği sinaptonema kompleksinin fonksiyonu mayoz araştırmalarına yeni yaklaşımlar getirmiştir (12).

Sinaptonema kompleksinin analizi, erken mayotik bozuklukların incelenmesini kolaylaştırır. Böylece sinaptik düzensizlikler fark edilerek kromozom eşleşmesi anormallikleri ortaya çıkarılır (2, 7, 9).

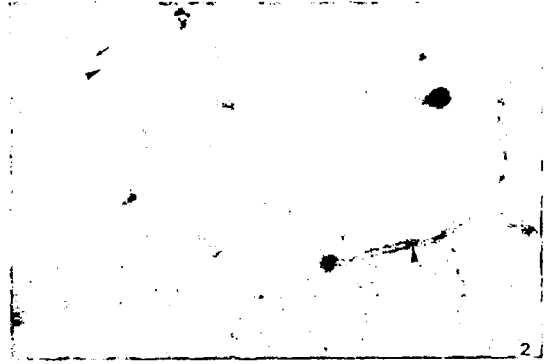
Kromozom bozuklukları, özellikle karşılık-

* Doç. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

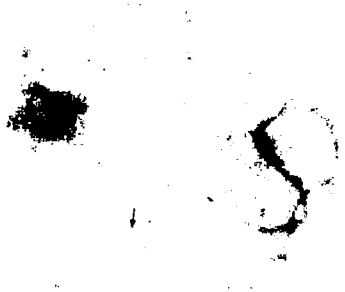
** Arş. Gör., Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.



Şekil 1. Boğada SC analizinde 29 otozomal ve cinsiyet kromozomu (asterisk) x 3600.
Figure 1. A complete set of bull bivalent is represented by 29 autosomal SC's and an XY pair (asterisk) x 3600.



Şekil 2. Sinaptonemal kompleksde, otozomal kromozomlar arasında telomerden telomere uzanma, sentral element (ok) ve rekombinasyon nodülleri (ok başı) x 12800.
Figure 2. End to end connections between an autosomal SC, central element (arrow) and recombination nodules (arrow head) are shown x 12800.



Şekil 3. Seks kromozomu (X ve Y). Y, X'in distal 1/3 ucu ile eşleşmiş (ok) x6400.
Figure 3. Seks chromosomes (X and Y). Showing an association at the 1/3 distal segment (arrow) x 6400.

3

lı kromozom translokasyonları, fertilité üzerinde etkilidir. Bu olay, kromozom segmentlerinin mayozda farklı şekilde eşleşmesiyle kromozomların ayrılmalarında düzensizliklere neden olur. Bu da karyotipik olarak dengesiz gametlere ve anormal embriyolara yol açar (8, 16, 19).

Evcil hayvanların mayozunda kromozomların ayrılmamasından ötürü, kromozom bozuklukları üzerinde çalışılmış, gametik sterilite adı verilen başarısızlığın, kromozomal olarak dengesiz gametlere ve fertilizasyondan sonra erken embriyonik mortaliteye neden olduğu görülmüştür (6, 11).

Bütün bu açıklamalardan anlaşılacağı üzere, primer spermatozoidlerinde kromozom anomalisi bulunan hayvanların damızlıktan çı-

karılmasıyla, verim gücü yüksek grupları oluşturmak mümkündür. Bu da, ekonomik yönden büyük değer taşımaktadır. Türkiye'de bu konuda yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Araştırmadan elde edilecek sonuçların bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Materyal ve Metod

Mezbahada kesilen değişik yaşlardaki 4 adet boğadan alınan testis parçaları Hank's dengeli tuz solüsyonuna aktarıldı. Counce ve Meyer'e (4) ait mikro yayma yönteminin modifikasyonu ile preparatlar hazırlandı. Önce, diğer araştırmacıların (3, 9) kullandığı gibi 50 ml amil asetat içinde 3 ml nükleoidin eritildi. Bu solüsyon ile kaplanmış lamlardan, film ayrıldı. Daha sonra 5 ml nükleoidin eritildi; bu solüsyon ile kaplanmış lamların üzerine 0,2 M sukroz solüsyonu damlatıldı; testis parçaları ince uçlu pensle iyice tiftiklenerek 0,2 M sukroz solüsyonuna değiştirildi; böylece kromozomların bu solüsyona geçmeleri sağlandı. Preparat oda ısısında kurutulduktan sonra pH'sı 8,5 olan solüsyonda tespit edildi, sonuç alınamayınca pH 8,3'e ayarlandı ve %4'lük paraformaldehit solüsyonunda 10 dakika tespit edildi. Tespit sonrasında pH'sı borate buffer'la 8,5'a ayarlanan %0,04 photophlo'ya daldırılıp kurutuldu. Kuruyan preparatlar % 4'lük fosfotungstik asit ile 1-3 dakika boyandı. Boyanan kısımlarda kromozomlar faz-kontrast mikroskopunda görülerek işaretlendi. Kenarları keskin bisturi ile çizilen, nükleoidin kaplı lamlar suyla dolu petri kutusuna 45 derecelik açı ile daldırıldı. Lamdan ayrılan nükleoidin filminin üzerine 100 mesh'lik gridler kondu. Gridler sudan alınıp kurutulduktan sonra Carl-Zeiss EM 9 elektron mikroskopunda incelendi.

Bulgular

İncelenen metafaz'larda boğaya ait kromozom düzensizliğine rastlanmadı. Homolog kromozomlar, telomerden telomere uzanmış 29 çift ve bivalandı (şekil 1). Bu kromozomların arasında sentral elementler ve bu elementler üzerinde aralıklarla yerleşmiş rekombinasyon nodülleri ayırt edildi (Şek. 2, ok, ok başı).

Y kromozomunun kısa kolu X'in kısa kolu ile eşleşmişti. Bu da X kromozomunun distal 1/3'ü kadardı (Şek. 1, yıldız, Şek. 3 ok).

Tartışma ve Sonuç

Moses (14), hamsterden aldığı parçaları farklı yöntem kullanarak %0,03 formvar ve karbon kaplı gridler üzerine tiftiklemiş, 0,1 M sukrozda hazırlanan tespitten geçirdikten sonra %4'lük fosfotungstik asit ile boyayarak normal sinaptonema kompleks yapısını incelemiştir. Daha sonra yine aynı araştırmacı Dresser (5) ile birlikte metodunu modifiye ederek %5 PBS içine aldıkları hamster testisi parçalarını polylisin, plastik ve formvar kaplı gridler üzerine tiftikleyip %50 AgNO₃ ile boyayarak lateral elementlerin daha iyi gözlendiğini bildirmişlerdir. Jimenez ve arkadaşları (10) ise karınca yiyende plastik kaplı lamalar üzerinde 0,3 M sukrozda tiftikleme işlemini yapmış, tespitten sonra %50 AgNO₃ ile boyayarak cinsiyet kromozomunu incelemiştir.

Bu çalışmada, Counce ve Meyer'e (4) ait olup modifiye edilen metodla preparatlar hazırlandı. Tiftikleme işlemi diğer araştırmacıların yaptığı gibi gridler üzerine değil %10 nükleoidin kaplı lamalar üzerinde yapıldı. Böylece metafaz alanları faz kontrast mikroskopta görülerek işaretlendi. Ayrıca tespit solüsyonunun pH'sı 8,3'e ayarlandı. Kullanılan hipofazın molaritesi de 0,2 idi. %4 fosfotungstik asit ile boyanan kromozomlar elektron mikroskopta incelendiğinde, homolog kromozomların telomerden telomere uzandığı ve bivalan olduğu görüldü. Y kromozomunun kısa kolu X'in kısa kolu ile eşleşmişti. Bu da X kromozomunun kısa kolunun distal 1/3'ü kadardı. İnsan ve domuzda da Y kromozomunun, X kromozomunun kısa kolu ile eşleştiği Chandley ve ark. (3), Solari (17) ve Switonski (18) tarafından bildirilmiştir. Bugün bu bölgeler pseudootozomal bölge olarak tanımlanmaktadır. Ford (8) ise rat, tavşan ve insanda eşleşmenin Y kromozomunda sentromeri geçerek uzun kola uzandığını bildirmiştir.

Homolog kromozomlarda sinaptonemal kompleks boyunca sentral elementler ayırt ediliyordu; ayrıca bu elementler üzerinde aralıklar

la yerleşmiş rekombinasyon nodülleri vardı. Rekombinasyon nodüllerinin gen değişimi olaylarının regülasyonu ile ilgili olduğu bildirilmektedir (15).

Sonuç olarak sinaptonemal kompleks analizinde kullanılan bu yöntemle kromozomlar incelenerek evcil hayvanlarda dejenerasyonla sonuçlanan kromozom eşleşmesi anormallikleri ortaya çıkarılabilecektir. Bu konu ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir.

Kaynaklar

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, S.D. (1989): *The Cell Garland Publishing, Inc. New York p. 848-849.*
2. Chandley, A.C (1984): *Infertility and Chromosome Abnormality. In Oxford Review of Reproduction Biology. Clarendon Press. Oxford p.1-46.*
3. Chandley, A.C., Goetz, P., Hargreave, T.B., Joseph, A.M., Speed, R.M. (1984): *On the nature and extent of XY pairing at meiotic prophase. Cytogenet. Cell Genet. 38: 241-247.*
4. Counce, S.J., Meyer G.F. (1973): *Differentiation of synaptonemal complex and the kinetochore in locusta spermatocytes studied by whole mount electron microscopy. Chromosoma 4: 231-253.*
5. Dresser, M.E., Moses M.J. (1979). *Silver staining of synaptonemal complexes in surface spreads for light and electron microscopy. Exp. Cell. Res. 121: 416-419.*
6. Ford C.E. (1971). *Gross Genome Unbalance in Mouse Spermatozoa: Does it influence the Capacity to Fertilize? Proc Int Symp. The Genetics of the Spermatozoon Edinburgh, p. 359-369.*
7. Ford, C.E. (1975): *The Time in Development at which Gros Genome Unbalance is Expressed. The Early Development of Mammals, British Society for Developmental Biology Symposium Cambridge University Press, p. 285-304.*
8. Ford, C.E. (1982). *Structural Rearrangements and Infertility in Mammals. 5th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim. Milano-Gargnano, Italy, p.17-41.*
9. Gustavsson, I. (1980): *Chromosome aberrations and their Influence on the reproductive performance of domestic animals-a review. Zeitschrift für Tierzucht und Züchtungsbiologie, 97: 176-195.*
10. Jimenez, J., Burgos, M., Sanchez, A. Diaz de la Guerdio, R. (1990): *Synaptonemal complex analysis in talpa occidentalis spermatocytes (Insectivora, Mammalia). Cyt. Cell. Genet. 54: 35-37.*
11. King, W.A. (1980): *Spontaneous Chromosome Translocations in Cattle and Pigs: A Study of the Causes of their Fertility Reducing Effect. PhD Thesis Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala Sweden.*
12. Moses, J.M. (1968). *Synaptonemal complex. Ann. R. Genet. 2: 363-412.*
13. Moses, J.M. (1977). *Microspreading and the Synaptonemal complex in Cytogenetic Studies. Chromosomes Today, Vol. 6. Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.*

14. **Moses, J.M.** (1977). *Karyotyping in spermatocytes of the chinese hamster (Cricetulus Griseus)*. *Chromosoma* 60: 99-125.
15. **Roeder, G.S.** (1990): *Chromosome synapsis and genetic recombination their role in meiotic chromosome segregation*. *Trends in Genetics*. 6: 385-389.
16. **Searle, A.G., Ford, C.E., Beechey, C.V.** (1971): *Meiotic disjunction in mouse translocations and the determinations of centromere position*. *Genet. Res. Cambridge*. 18: 215-235.
17. **Solari, A.J.** (1989): *Sex Chromosome Pairing and Fertility in the Heterogametic Sex of Mammals and Birds in Fertility and Chromosome Pairing: Recent Studies in Plants and Animals*. CRC Press. Boca roton. p.77-107.
18. **Switonski, M.** (1993): *Synaptonemal Complex Studies in Domestic Animals*. *Proceedings of the 8th North American Colloquium on Domestic Animal Cytogenetics and Gene Mapping*. University of Guelph, Ontario, Canada, July, 13-16.
19. **Sybenga, J.** (1975). *Meiotic Configurations*. Springer, Verlag, New York, p.46-62.