

Jacek A. Modliński, Jolanta Karasiewicz

KLONOWANIE SOMATYCZNE SSAKÓW

Streszczenie. *Klonowanie somatyczne ssaków stało się możliwe dzięki udoskonaleniu metody transplantacji jąder komórkowych, polegającym na użyciu komórek-dawców jąder w fazie G0 lub na aktywacji rekonstruowanego oocyty w kilka godzin po wprowadzeniu jądra (post-aktywacja). Tak ulepszoną techniką udało się sklonować owce, kozy, świnię, bydło oraz myszy; dwa ostatnie gatunki – obojga płci.*

Klonowanie transgenicznych ssaków produkujących w mleku (lub moczu) ludzkie białka terapeutyczne może być wykorzystane do celów farmakologii i medycyny. Dokonano już somatycznego sklonowania transgenicznej kozy produkującej w mleku ludzką antytrombinę III.

Słowa kluczowe: klonowanie ssaków, klonowanie terapeutyczne, biotechnologia

SOMATIC CLONING IN MAMMALS

Abstract. *Somatic cloning in mammals became possible due to refinement of the nuclear transfer technique consisting of using nuclear donor cells in G0 or activating reconstituted oocytes few hours after nuclear transfer (post-activation). Sheep, goats, pigs, cattle and mice have been cloned this way; the latter two species – of both sexes.*

Cloning of transgenic mammals producing human therapeutic proteins in milk (or urine) can find application in pharmacology and medicine. Somatic cloning of a goat producing human antithrombin III in its milk has already been achieved.

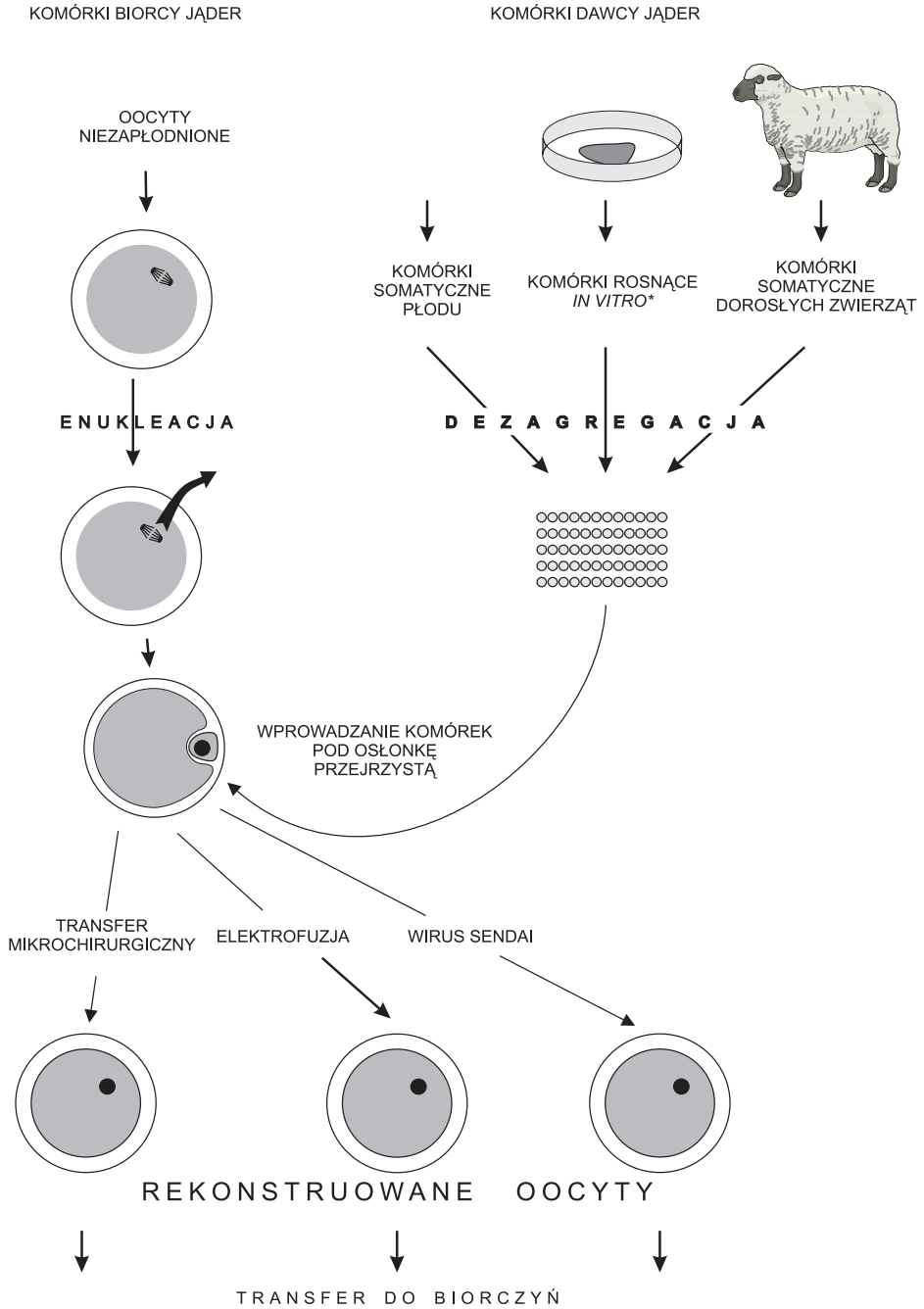
Key words: somatic cloning, therapeutic cloning, biotechnology

1. DOSKONALENIE METODY TRANSPLANTACJI JĄDER KOMÓRKOWYCH

Wśród wielu metod stosowanych w klonowaniu ssaków, metodą zapewniającą uzyskanie klonów o największej liczebności, jest technika transplantacji jąder komórkowych (ang. nuclear transfer) do enukleowanych oocytów, czyli do oocytów, z których usunięty został ich własny materiał genetyczny (Ryc.1).

Do połowy lat 90-tych jako dawców jąder używano wyłącznie komórek zarodkowych – do oocytów wprowadzane były jądra pochodzące z blastomerów zarodków przedimplantacyjnych będących w różnych stadiach rozwoju, od stadium kilkukomórkowego do blastocysty¹. Klo-

¹ *Modliński J.A.: Mikromanipulacje na gametach i zarodkach ssaków. [W:] Biotechnologia Zwierząt. L. Zwierzchowski, K. Jaszczak, J.A. Modliński (red.) Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1997*



Ryc. 1. Klonowanie somatyczne ssaków metodą transplantacji jąder komórkowych wg Modlińskiego i wsp. 2001

Fig. 1. Somatic cloning of mammals after Modliński et al., 2001

nowaniu podlegały więc zarodki (a nie dorosłe osobniki) i dlatego ten typ klonowania określany jest obecnie mianem *klonowania zarodkowego*. Pomimo dość dużej efektywności klonowania zarodków różnych gatunków zwierząt (u bydła uzyskuje się klony liczące od 5 do 11 cieląt) znaczenie tej metody dla praktyki hodowlanej i przyspieszenia postępu genetycznego, a także dla farmacji i medycyny (patrz niżej) jest problematyczne. Klonowany zarodek jest bowiem *terra incognita* zarówno pod względem płci, jak i wartości genetycznej, a więc również pod względem wynikającej z niej wartości użytkowej uzyskanych zarodkowych klonów zwierząt. Istnieją wprawdzie metody pozwalające określić płeć i wartość genetyczną zarodka, są one jednak całkowicie nieopłacalne z praktycznego punktu widzenia. Jedynym sposobem pozwalającym zarówno na uzyskanie klonów o znanych cechach genetycznych, jak i na znaczne zwiększenie ich liczebności jest tylko klonowanie dorosłych osobników. W przeciwieństwie do klonowania zarodkowego, w którym oprócz transplantacji jąder stosuje się jeszcze kilka innych technik takich jak izolacja blastomerów, klonowanie chimerowe i bisekcja zarodków, klonowanie dorosłych osobników ssaków przeprowadzone może być tylko metodą transplantacji jąder komórkowych.

Komórki zróżnicowane jako dawcy jąder. Większość komórek somatycznych dorosłych ssaków to komórki zróżnicowane. Do niedawna uważano, że klonowanie ssaków metodą transferu jąder komórek somatycznych jest, z biologicznego punktu widzenia, całkowicie niemożliwe. Wynikało to z powszechnie przyjętego założenia, że w rozwoju zarodkowym i płodowym ssaków – w miarę postępującego różnicowania komórek zachodzą w nich nieodwracalne zmiany, które powodują, że ich jądra nie mogą już powrócić do stanu niezróżnicowanego jądra zygoty. Zmiany te dotyczą zarówno struktury jąder jak i genomu. Powrót do stanu pierwotnego obcych jąder komórkowych wprowadzonych do cytoplazmy oocyta obejmować więc musi zarówno przemodelowanie struktur jądrowych jak i przeprogramowanie genomu. Oba te zjawiska są *conditio sine qua non* umożliwiającym pokierowanie przez wprowadzone jądro, a następnie przez jądra potomne, embriogenezy i ontogenezy sklonowanego zarodka lub osobnika dorosłego. Obowiązujący dogmat nieodwracalnych zmian zachodzących w jądrach w czasie różnicowania wykluczał *a priori* możliwość ich wykorzystania do klonowania osobników dorosłych. Jednak prowadzone w ostatnich latach intensywne badania doprowadziły do stworzenia nowych modeli doświadczalnych, które skierowały klonowanie ssaków na nowe tory. Wśród wielu czynników, które są odpowiedzialne za przeprogramowanie wprowadzonych jąder oraz prawidłowy rozwój rekonstruowanych zarodków, za szczególnie istotne uważa się odpowiedni dobór faz cyklu komórkowego komórki biorcy jądra i komórki dawcy jądra oraz metodę aktywacji rekonstruowanych oocytów.

Dobór faz cyklu komórkowego biorcy i dawcy jądra. Badania nad wpływem doboru faz cyklu komórkowego na rozwój oocytów rekonstruowanych przez wprowadzenie do nich jąder komórek zarodkowych doprowadziły, między innymi, do stworzenia modelu tzw. „uniwersalnych biorców” (ang. universal recipients)². W modelu tym, jądra komórek zarodko-

² Campbell, K.H.S., Ritchie W.A., Wilmut I.: Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. Biol. Reprod., 1993, 49, 933-942

wych wprowadzane są do cytoplazmy oocytów w kilka godzin po ich aktywacji. W oocytach takich, określanych mianem oocytów pre-aktywowanych, poziom MPF (czynnika dojrzwiania oocytów; ang. maturation/meiosis/mitosis promoting factor) jest bardzo niski. Aktywność MPF oraz aktywność stabilizującego go czynnika cytostaticznego CSF (ang. cytostatic factor) są głównymi czynnikami kontrolującymi wejście komórek w fazę M cyklu komórkowego. W nieaktywowanych oocytach, wysoka aktywność MPF utrzymuje żeńską chromatynę oocytu w postaci skondensowanych chromosomów metafazy II. Jeżeli do takich oocytów, określanych mianem oocytów MII, wprowadzi się jakiegokolwiek jądro interfazowe, to – pod wpływem MPF – dochodzi bardzo szybko do zaniku jego otoczki jądrowej (NEBD; ang. nuclear envelope breakdown) oraz do przedwczesnego wyróżnicowania się (kondensacji) chromosomów (PCC; ang. premature chromosome condensation). Aktywacja oocytu, zarówno naturalna, wywołana wnikiem plemnika, jak i sztuczna – spowodowana działaniem różnorodnych bodźców fizyko-chemicznych – powoduje gwałtowny spadek w jego cytoplazmie poziomu MPF. W jądrach wprowadzonych do cytoplazmy oocytów pre-aktywowanych nie dochodzi do NEBD i PCC i – jak wykazano – w jądrach takich, niezależnie od fazy ich cyklu komórkowego, jest kontynuowana, a nie podejmowana *de novo*, synteza DNA². Zachowanie się jąder będących w różnych fazach cyklu komórkowego i wprowadzonych do enukleowanych oocytów w różnych fazach aktywności metabolicznej jest omówione szerzej w artykułach przeglądowych *Modlińskiego i Karasiewicz*^{3, 4}.

Model „uniwersalnych biorców” stosowany jest obecnie z powodzeniem w klonowaniu zarodkowym ssaków zapewniając prawidłowy rozwój znacznie większego, niż uprzednio, odsetka zrekonstruowanych zarodków. Jednakże próby zastosowania tego modelu doświadczalnego do transplantacji jąder komórek innych niż komórki pochodzące z zarodków przedimplantacyjnych nie przyniosły zadowalających wyników. Po wprowadzeniu do oocytów jąder hodowanych *in vitro* komórek pochodzenia zarodkowego wyprowadzonych z tarczki zarodkowej (ED, ang. embryonic disc) blastocyst owczych tylko w kilku przypadkach uzyskano narodziny jagniąt, i to tylko wtedy, gdy komórki dawcy-jąder pochodziły z trzech pierwszych pasaży⁵. Jądra pochodzące z późniejszych pasaży (4-11) podtrzymywały rozwój tylko do stadium blastocysty. W przeprowadzonej analizie hodowanych *in vitro* owczych oraz bydłowych komórek ED wykazano, że – poczynając od trzeciego pasażu – zaczynają one wchodzić na drogę różnicowania, czego dowodem jest zanik aktywności fosfatazy zasadowej oraz pojawienie się cytokeratyn (cytoplazmatycznych znaczników typowych dla komórek nabłonkowych) oraz lamin jądrowych A/C, typowych znaczników komórek zróżnicowanych. Komórki niezróżnicowane, takie jak komórki węzła zarodkowego, komórki raka zarodkowego (ang. embryonal carcinoma cells) oraz mysie pierwotne komórki zarodkowe (ang. embryonic stem cells) wykazują pozytywną reakcję na obecność fosfatazy zasadowej, zaś negatywną reakcję na obecność cytokeratyn i lamin A/C. Uważa-

³ *Modliński J.A., Karasiewicz J.*: Klonowanie ssaków: mity czy rzeczywistość. W: Klonowanie człowieka: fantazje – zagrożenia – nadzieje. B. Chyrowicz red., Towarzystwo Naukowe KUL, Lublin, str. 23-92, 1999

⁴ *Modliński J.A., Karasiewicz J.*: Wykorzystanie linii komórkowych i metod synchronizacji cyklu komórkowego w klonowaniu ssaków. *Biotechnologia*, 1998, 2(41), 86-100

⁵ *Campbell K. H. S., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I.*: Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, 380, 64-66

no więc, że – obserwowane od 2-3 pasażu – postępujące różnicowanie komórek wprowadzonych z tarczki owcy, w kierunku komórek nabłonkopodobnych i mezenchymatycznych⁶ jest główną przyczyną nieprawidłowego przeprogramowania ich jąder w cytoplazmie oocytu, a co za tym idzie, nieprawidłowego rozwoju rekonstruowanych zarodków. Potwierdzało to tym samym panujący wówczas pogląd, że pełne przeprogramowanie jąder komórek zróżnicowanych nie jest możliwe.

Dawcy jąder w fazie G0. Istotnym przełomem w badaniach nad klonowaniem ssaków okazały się badania *Campbella i wsp.*, którzy jako dawców jąder użyli komórek wprowadzonych w fazę (stan) G0⁵. Jest to stan spoczynkowy komórki oznaczający jej wyjście z cyklu komórkowego i charakteryzujący się obniżeniem poziomu transkrypcji, degradacją większości rodzajów mRNA, zmianami w polirybosomach oraz kondensacją chromatyny. *Campbell i wsp.* założyli, że ten specyficzny stan komórek i chromatyny jądrowej w fazie G0, umożliwi prawidłową reakcję wszystkich „uśpionych” genów (i być może również struktur jądrowych) wprowadzonego w tej fazie jądra na sygnały płynące z cytoplazmy oocytu, czyli – innymi słowy – umożliwi pełne przemodelowanie i przeprogramowanie jąder nawet tych komórek, które weszły na drogę różnicowania lub też są już w pełni zróżnicowane. Wprowadzenie komórek w spoczynkowy stan G0 uzyskano poprzez ich hodowlę przez 5 dni w pożywce o drastycznie obniżonej (z 10 do 0,5%) zawartości surowicy, która jest dla komórek podstawowym czynnikiem odżywczym.

Należy jednak zwrócić uwagę, że nie ma, jak do tej pory, metody pozwalającej jednoznacznie określić czy wszystkie komórki „głodzonej” populacji (a przynajmniej większość z nich) weszła w stan G0. W badaniach immunofluorescencyjnych przeprowadzonych przy użyciu przeciwciał antyPCNA i skoniugowanych z rodaminą przeciwciał na cykliny wykazano jedynie, że hodowane komórki nie są w fazie S⁷. PCNA (ang. proliferating-cell nuclear antigen) jest wskaźnikiem aktywnej replikacji DNA. Zastosowanie metody „głodzenia” komórek umożliwiło, w pierwszym etapie badań, uzyskanie jagniąt po transplantacji do enukleowanych oocytów jąder komórek owczych ED pochodzących z 6-13 pasażu⁵, a następnie jagniąt po transferze jąder fibroblastów płodowych oraz Dolly, po transferze jąder komórek gruczołu mlekowego 6-letniej ciężarnej owcy⁸.

Dolly była pierwszym ssakiem uzyskanym w wyniku sklonowania dorosłego osobnika, a tym samym pierwszym, wzorcowym przykładem *somatycznego*, a nie *zarodkowego*, klonowania ssaków. Przez ponad rok była ona jedynym zwierzęciem uzyskanym drogą klonowania somatycznego i sądzono nawet, że uzyskano ją „pomyłkowo”, przez wprowadzenie do oocytu jądra jakiegś nie w pełni zróżnicowanej komórki. Było to o tyle uzasadnione, że hodowle pierwotne komórek gruczołu mlekowego nie są jednorodną populacją. Oprócz

⁶ Karasiewicz J., Szablisty E., Guskiewicz A., Kossakowski M., Stefański G., Reed M., Modliński J.A.: Development of isolated sheep inner cell masses/embryonic discs in vitro. Roux's Arch. Dev. Biol., 1996, 205, 437-442

⁷ Kill I. R., Bridger J. M., Campbell K. H. S., Moldonado-Codina G., Hutchison Ch. J.: The timing of the formation and usage of replicase clusters in S-phase nuclei of human diploid fibroblasts. J.Cell Sci., 1991, 100, 869-876

⁸ Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. S.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 1997, 385, 810-813

nabłonkowych komórek gruczołu mlekowego, fibroblastów i komórek mioepitelialnych w hodowli mógł znajdować się również niewielki odsetek stosunkowo mało zróżnicowanych komórek wspomagających regenerację gruczołu mlekowego w okresie ciąży. Jednak wyniki opublikowane przez *Wakayamę i wsp.*, którzy uzyskali myszy po transferze jąder komórek pęcherzykowych, rozwiały te wątpliwości⁹. Komórki pęcherzykowe są komórkami wzgórka jajonośnego otaczającego owulowany oocyt. Ponieważ są one w fazie G0/G1, nie ma potrzeby ich „głodzenia”. W doświadczeniach *Wakayamy i wsp.* zastosowano jednak zupełnie nowy schemat doboru faz cyklu komórkowego, zaproponowany nieco wcześniej przez *Cibelliego i wsp.*¹⁰. Schemat ten polegał na wprowadzaniu jąder fibroblastów płodowych (są one również komórkami somatycznymi i ponad 50% z nich jest w fazie G1) do nieaktywowanych oocytów MII, które dopiero w kilka godzin po wprowadzeniu do nich jąder poddawane były aktywacji. Oocyty takie, określane mianem oocytów post-aktywowanych, stanowiły więc układ doświadczalny całkowicie odmienny od stosowanego w klonowaniu zarodkowym układu oocytów pre-aktywowanych. W jądrach wprowadzonych do post-aktywowanych oocytów dochodzi oczywiście do NEBD i PCC. Nie wiadomo dokładnie – jak na razie – dlaczego oba te zjawiska, których niekorzystny wpływ na rozwój rekonstruowanych zarodków stwierdzono w przypadku klonowania zarodkowego sprzyjają przeprogramowaniu i przemodelowaniu jąder komórek somatycznych¹. Przypuszcza się, że wystawienie „nagiej”, silnie skondensowanej chromatyny (po zajściu NEBD i PCC) oraz białek jądrowych na długotrwałe działanie czynników cytoplazmatycznych wpływać może korzystnie na przeprogramowanie i przemodelowanie jąder komórek zróżnicowanych. Można również przypuszczać, że przemodelowanie wprowadzonych jąder nie jest zjawiskiem jednorazowym lecz ciągiem przemian zachodzących podczas kolejnych mitoz. Z tego względu dodatkowa runda NEBD i PCC, jakim podlegają jądra w cytoplazmie post-aktywowanych oocytów miałyby korzystny wpływ na ich przemodelowanie.

Aktywacja rekonstruowanego oocytu. Drugim, jak już wyżej wspomniano, istotnym czynnikiem wpływającym na rozwój rekonstruowanych oocytów jest metoda ich aktywacji. Aktywację metafazowych oocytów ssaków przeprowadzić można stosując różnorakie bodźce fizyko-chemiczne. Najczęściej stosowanym czynnikiem fizycznym są impulsy prądu stałego, natomiast stosowanymi czynnikami chemicznymi są etanol, jony strontu, jonofor wapniowy A23187 i jonomycyna. Prowadzone w ostatnim czasie badania nad udoskonaleniem metod sztucznej aktywacji oocytów MII ssaków polegają głównie na optymalizacji (w zależności od gatunku) parametrów stosowanego pola elektrycznego (siła, czas trwania impulsu i liczba impulsów) lub też, znacznie częściej, na łączeniu bodźca aktywującego (najczęściej jonomycyny) ze związkami blokującymi aktywność kinazy MPF/MAP, takimi jak 6-dwumetyloaminopuryna (6-DMAP) czy cykloheksamid. Jonomycyna i 6-DMAP są obecnie czynnikami najczęściej stosowanymi w somatycznym klonowaniu ssaków metodą post-aktywacji.

⁹ *Wakayama T., Perry A.C.F., Zucotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R.*: Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 57, 369-374

¹⁰ *Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F.A., Robl J.M.*: Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280, 1256-1258

Seryjna transplantacja jako udoskonalenie metody. Czynione są próby zwiększenia efektywności klonowania somatycznego poprzez zastosowanie tzw. wielokrotnego klonowania (ang. re-cloning) metodą seryjnej transplantacji jąder komórkowych. Metoda ta, zastosowana z powodzeniem w klonowaniu zarodkowym, polega na tym, że kilku- lub kilkunastokomórkowy zarodek powstały po transplantacji jądra do oocytu jest źródłem jąder do następnej rundy klonowania. Uzyskane tą drogą zarodki II generacji są dawcami jąder dla zarodków III generacji itd.¹¹ Stosując tę metodę uzyskano u bydła i królika¹¹ urodzone zwierzęta wywodzące się z III, a u kozy nawet z V generacji klonowanych zarodków. W przypadku klonowania somatycznego metoda seryjnej transplantacji jąder staje się nieco bardziej złożona. W pierwszym etapie jądra somatyczne wprowadzane są do post-aktywowanych oocytów. W etapie drugim natomiast, jądra pochodzące z rozwijających się zarodków przeszczepiane są, tak jak w klonowaniu zarodkowym, do oocytów preaktywowanych.

Dotychczas próby seryjnej transplantacji jąder w klonowaniu somatycznym przeprowadzono jedynie u bydła. Są one nieliczne i, choć obiecujące, nie dały na razie odpowiedzi, czy uda się w ten sposób wyraźnie zwiększyć efektywność klonowania somatycznego. Nie jest jednak wykluczone, że u pewnych gatunków, takich jak np. świnia, re-transplantacja jąder może być w ogóle jedynym sposobem uzyskania sklonowanego potomstwa¹². Wykorzystanie seryjnej transplantacji jąder w klonowaniu somatycznym omówione jest dokładniej w pracy Modlińskiego i wsp.¹³.

2. OSIĄGNIĘCIA W KLONOWANIU SSAKÓW

Udoskonalenie metody transplantacji jąder komórkowych zaowocowało uzyskaniem w ciągu ostatnich trzech lat wielu osobników otrzymanych w wyniku somatycznego klonowania przede wszystkim bydła, ale także owiec, kóz, świń oraz myszy. Komórki-dawcy jąder pochodziły bądź z tkanek płodowych, bądź też z tkanek osobników dorosłych. Ze zrozumiałych względów największe zainteresowanie budzi somatyczne klonowanie bydła, jako podstawowego gatunku gospodarskiego oraz myszy, jako podstawowego gatunku laboratoryjnego. U obu tych gatunków przeprowadzono najwięcej doświadczeń nad klonowaniem somatycznym i uzyskano klony o największej liczebności. Należy jednak zwrócić uwagę, że w wielu przypadkach (podobnie zresztą jak w przypadku Dolly, a także np. myszy uzyskanych po transferze komórek końca ogona) fenotyp komórek somatycznych pochodzących od osobników dorosłych i użytych jako dawców jąder, jest trudny do zdefinio-

¹¹ Piotrowska K., Modliński J.M., Korwin-Kossakowski M., Karasiewicz J.: Effects of preactivation of ooplasm or synchronization of blastomere nuclei in G1 on preimplantation development of rabbit serial nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.*, 2000, 63: 677-682

¹² Polejaeva I.A., Chen S-H., Vaught T.D., Page R.L., Mullins J., Ball, S., Boone J., Walker S., Ayres D.L., Colman A., Campbell K.H.S.: Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 406: 505-508

¹³ Modliński J.A., Grabarek J., Plusa B., Karasiewicz J.: The possible role of cell cycle in mammalian cloning. *J. Appl. Gen.*, 2001, 42, 153-176

wania. Komórkami o ściśle określonym fenotypie były, jak dotychczas, jedynie komórki pęcherzykowe (pochodzące zarówno z resztek wzgórka jajonośnego otaczających owulowane oocyty myszy i bydła, jak ze ściennej warstwy ziarnistej bydłecych i świńskich pęcherzyków jajnikowych), komórki Sertolego i komórki nerwowe myszy, bydłecze komórki nabłonka jajowodu i macicy oraz (do pewnego stopnia) bydłecze leukocyty. W pozostałych natomiast przypadkach przypuszczać można, że dawcami jąder były wyłącznie fibroblasty – kiedy źródłem komórek były fragmenty tkanki pobranej z ucha lub skóry, czy też fibroblasty, fibrocyty lub satelitowe komórki mięśniowe – kiedy fragmenty tkanki pochodziły z mięśni. Fibroblastyczny charakter miały również użyte do klonowania komórki płodowe, niezależnie od tego, czy pochodziły one ze skóry, z mięśni czy też z innych tkanek. Komórki Sertolego i neurony są niezdelającymi się komórkami w stanie G0, zaś ponad 90% komórek pęcherzykowych wzgórka jajonośnego jest w fazie G0/G1. Nie zachodzi więc potrzeba ich eksperymentalnego wprowadzania w stan spoczynkowy. W przypadku innych rodzajów komórek stosowane jest czasami wprowadzanie ich w stan spoczynkowy, tym niemniej jednak badania porównawcze wykazały, że przy zastosowaniu metody post-aktywacji oocytów nie zawsze jest to konieczne.

U bydła i myszy sklonowano już osobniki obojga płci. Najliczniejsze, jak do tej pory, somatyczne klony bydłecze uzyskali *Kato i wsp.* w Japonii oraz *Wells i wsp.* w Nowej Zelandii¹⁴,¹⁵. Badacze japońscy uzyskali 8 cieląt po przeniesieniu do bioczyń 10 blastocyst powstałych w wyniku wprowadzenia do enukleowanych oocytów jąder komórek pęcherzykowych (6 blastocyst) i jąder komórek nabłonka jajowodu (4 blastocysty). Urodzonych 8 cieląt (4 zmarły jednak wkrótce po urodzeniu) stanowiło klon, ponieważ wszystkie komórki – dawcy jąder (choć o różnym fenotypie) pochodziły od jednego zwierzęcia. Klon uzyskany przez *Wellsa i wsp.* liczył 10 cieląt i powstał w wyniku transplantacji do enukleowanych oocytów jąder komórek pęcherzykowych ściennej warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego¹⁵. Oba wspomniane wyżej klony są somatycznymi klonami żeńskimi. Somatyczne klony męskie uzyskano po transplantacji do oocytów jąder komórek pochodzących m.in. z hodowli *in vitro* fragmentów mięśnia najdłuższego grzbietu (*musculus longissimus dorsi*) buhaja.

Wyjątkowo interesującym osiągnięciem, obrazującym możliwości klonowania somatycznego, było uzyskanie przez *Galliego i wsp.* buhaja po wprowadzeniu do enukleowanego oocytu jądra leukocyta krwi obwodowej¹⁶. Leukocyty stanowią wyjątkowo dogodny rodzaj komórek, które użyte być mogą do klonowania somatycznego. Są one bardzo łatwe do uzyskania od wszystkich zwierząt niezależnie od gatunku oraz płci i wieku, nie wymagają uprzedniej hodowli *in vitro*, co jest konieczne w przypadku większości komórek pobranych z innych tkanek, a także są bardzo łatwe do kriokonserwacji. Spektakularnym osiągnięciem jest również otrzymanie cieląt po transferze jąder komórek nabłonkowych uzy-

¹⁴ *Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y.*: Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, 282, 2095-1098

¹⁵ *Wells D. N., Misica P. M., Tervit H. R.*: Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 1999, 60, 996-1005

¹⁶ *Galli C., Duchi R., Moor R.M., Lazarri G.*: Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning*, 1999, 1(3), 161-170

skanych z siary laktujących krów¹⁷. Dokładny wykaz uzyskanych do chwili obecnej somatycznych klonów ssaków podany jest w pracy Modlińskiego i wsp¹³.

3. PERSPEKTYWY PRAKTYCZNEGO ZASTOSOWANIA KLONOWANIA SSAKÓW

Jak już wspomniano, tylko klonowanie somatyczne może umożliwić rzeczywiste zwiększenie liczebności osobników o szczególnie wartościowych cechach użytkowych. Rodzi się więc natychmiast pytanie: czy i w jaki sposób przedstawione wyżej spektakularne osiągnięcia w dziedzinie klonowania somatycznego ssaków mogą być wykorzystane?

Na badania nad somatycznym klonowaniem ssaków przeznaczają się na świecie olbrzymie nakłady. Są dwa główne tego powody: pierwszy natury czysto poznawczej, drugi czysto praktycznej (nie będziemy omawiać możliwości zastosowania klonowania somatycznego w hodowli zwierząt, gdyż nie mieści się to w ramach tego artykułu). Badania nad somatycznym klonowaniem ssaków, w którym jądra pochodzące z komórek różnych tkanek wprowadzane są do całkowicie odmiennego środowiska cytoplazmatycznego, dostarczyć mogą cennych informacji dotyczących interakcji jądro-cytoplazmatycznych we wczesnej embriogenezie ssaków, mechanizmów różnicowania komórkowego oraz natury i roli czynników odpowiedzialnych za przemodelowanie jąder komórkowych i przeprogramowanie genomu komórek somatycznych.

Otrzymywanie i klonowanie zwierząt transgenicznych. Jeżeli chodzi o aspekt praktyczny, to somatyczne klonowanie owiec, kóz, bydła czy świń ma ogromne znaczenie dla farmacji i medycyny, uzasadniające nieograniczone niemal środki, jakie wielkie firmy farmaceutyczne i biotechnologiczne przeznaczają na ten cel. Badania te bowiem dotyczą zarówno otrzymywania, jak i klonowania zwierząt transgenicznych, które produkować by mogły w mleku i być może również w moczu¹⁸ cenne ludzkie białka terapeutyczne takie jak: czynniki krzepliwości krwi (VIII i IX) podawane chorym na hemofilię, α -1-antytrypsynę, antytrombinę III – przeciwzakrzepowe białko – inhibitor krzepnięcia osoczonego, β -laktoalbuminę umożliwiającą uzyskanie bardziej zbliżonego do ludzkiego mleka krowiego oraz wiele innych, wśród nich α - i β -interferon, albuminę krwi, hormon wzrostu, tkankowy aktywator plazminogenu czy laktoferynę. Wielu leków jest zbyt mało, a ich produkcji nie można zwiększyć z powodu braku surowców – głównie krwi ludzkiej. Dodatkowym zagrożeniem jest rozprzestrzenianie się wirusów HIV i zapalenia wątroby typu C. Alternatywnym rozwiązaniem jest biosynteza tych białek przez zmodyfikowane genetycznie organizmy (przede wszystkim ssaki).

¹⁷ Kishi M., Itagaki Y., Takakura R., Imamura M., Sudo T., Yoshinari M., Tanimoto M., Yasue H., Kashima N.: Nuclear transfer in cattle using colostrum-derived mammary gland epithelial cells and ear-derived fibroblast cells. *Theriogenology*, 2000, 54, 675-684

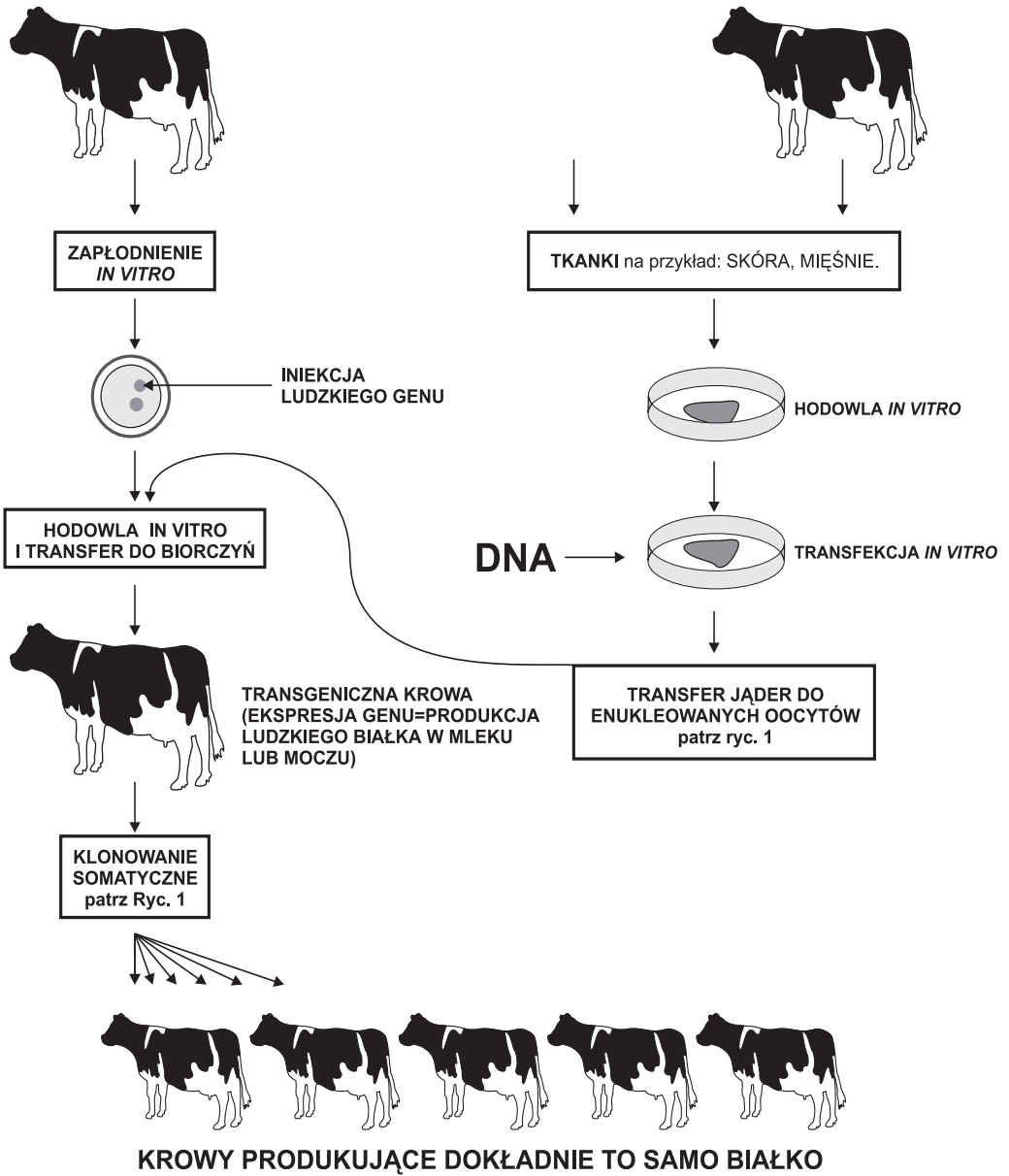
¹⁸ Kerr D.E., Liang F., Bondioli K.R., Zhao H., Kreibich G., Wall R.J., Sun T.T.: The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nature Biotechnol.* 1998, 16, 75-79

Obecnie, podstawową metodą uzyskiwania transgenicznych zwierząt jest iniekcja obcego genu (transgenu) do jednego z przedjądrzy zygoty. W odniesieniu do zwierząt gospodarskich technika ta ma wiele wad ograniczających jej stosowanie na szeroką skalę. Jest mało wydajna, w odniesieniu do liczby zwierząt wykazujących integrację (mniej niż 5%), a tym bardziej ekspresję wprowadzonego genu (z reguły mniej niż 1%) przejawiającą się wytwarzaniem przez komórki gruczołu mlekowego pożądaných białek w ilościach opłacalnych z ekonomicznego punktu widzenia. Miejsce integracji obcego genu do genomu zarodka jest czysto przypadkowe, co rzutuje, z kolei, na poziom jego ekspresji. Powoduje to, że uzyskanie nawet dwóch zwierząt transgenicznych wykazujących taki sam poziom ekspresji transgenu rzadko kończy się powodzeniem, a często jest wręcz niemożliwe. Poza tym, jeżeli nawet wprowadzony gen zostanie przekazany potomstwu, istnieje możliwość, że jego ekspresja w kolejnych pokoleniach ulegnie osłabieniu. W przeciwieństwie do iniekcji egzogenego DNA do przedjądrzy zygoty, genetyczna transformacja hodowanych *in vitro* komórek somatycznych jest zabiegiem stosunkowo prostym, szybkim i – co najważniejsze – dotyczy ogromnej liczby komórek. Poza tym, jeżeli wraz z określonym genem wprowadzony zostanie markerowy gen odporności na neomycynę, selekcja komórek, które uległy transfekcji może być łatwo przeprowadzona w hodowli *in vitro*. Jądra wyselekcjonowanych komórek są następnie wprowadzane do enukleowanych oocytów MII. Pierwsze udane tego typu doświadczenia przeprowadziła *Schnieke i wsp.* wykorzystując do tego owcze fibroblasty płodowe¹⁹. Metodą transfekcji, przy użyciu lipofektaminy, wprowadzony został do nich konstrukct pMIX1 składający się z ludzkiego genu (FIX) IX czynnika krzepliwości krwi oraz promotorowego genu owczej μ -laktoalbuminy, który – jak uprzednio stwierdzono – zapewnia wysoki poziom ekspresji pMIX1 w mleku transgenicznych myszy. Wraz z konstruktem pMIX1 wprowadzony został markerowy konstrukct PGKneo. U trzech z sześciu urodzonych jagniąt stwierdzono obecność obu genów.

Badania porównawcze wykazały, że w produkcji transgenicznych owiec wprowadzanie do oocytów jąder transformowanych genetycznie fibroblastów płodowych jest metodą znacznie bardziej wydajną i znacznie bardziej opłacalną z ekonomicznego punktu widzenia niż tradycyjna metoda iniekcji DNA do przedjądrzy. W pierwszym przypadku jedną transgeniczną owcę uzyskuje się średnio z każdych 20,8 wyprodukowanych zwierząt, podczas gdy w drugiej metodzie uzyskanie jednej transgenicznej owcy wymaga wyprodukowania 51,4 owiec. Dodatkową zaletą wykorzystywania do produkcji zwierząt transgenicznych hodowanych *in vitro* komórek somatycznych jest to, że bardzo łatwo określić płeć komórek, które poddane będą transfekcji, co ma istotne znaczenie gdy produkt transgenu uzyskiwany będzie z mleka.

Transgeniczne zwierzęta, wykazujące wysoki poziom ekspresji transgenu, mogą być następnie „replikowane” metodą klonowania somatycznego (Ryc.2). Ma to istotne znaczenie w przypadku, gdy uzyskiwane z tych zwierząt białka stosowane będą w terapii u ludzi. Każde bowiem białko terapeutyczne musi przejść wiele skomplikowanych i kosztownych

¹⁹ *Schnieke A., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K.H.S.*: Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, 278, 2130-2133



Ryc. 2. Klonowanie i farmacja
 Fig 2. Cloning and pharmacology

testów laboratoryjnych i klinicznych zanim zostanie zarejestrowane jako lek dopuszczony do stosowania u ludzi. Każdy produkt uzyskiwanego *de novo* zwierzęcia transgenicznego powinien przejść tę procedurę, jeżeli zostało ono uzyskane jedną ze wspomnianych wyżej metod. Jeżeli jednak lek już został dopuszczony do stosowania, to somatyczne klonowanie osobnika, który go produkuje, zapewni – przynajmniej teoretycznie – jednorodność leku uzyskiwanego od następnych generacji sklonowanych zwierząt. Procedurę tę zastosowała amerykańska firma *Genzyme Transgenic Corporation*, która uzyskała tradycyjną metodą iniekcji DNA do przedjądrzy zygoty transgeniczne kozy produkujące w mleku ludzką antytrombinę III. Produkt ten przeszedł już wszystkie etapy badań wymaganych przez *Food and Drug Administration*. Firma przeprowadziła więc udane próby somatycznego sklonowania transgenicznych kóz produkujących to białko²⁰. Zapowiedziała ona również rozpoczęcie badań nad uzyskaniem metodą transplantacji jąder zmodyfikowanych genetycznie komórek somatycznych, transgenicznych krów produkujących w mleku albuminę surowicy krwi ludzkiej.

Osobnym zagadnieniem, budzącym wielkie zainteresowanie medycyny, jest uzyskanie transgenicznych świń (przede wszystkim ze znokautowanym genem α -1-3 transferazy galaktozyli; α -1-3 GT), które mogłyby być dawcami narządów (ksenotransplantów) dla ludzi oczekujących na przeszczep nerki, wątroby czy serca. Również komórki wysepek trzustkowych pochodzących ze zmodyfikowanych genetycznie świń stosowane by być mogły w terapii osób cierpiących na cukrzycę. Narządy i komórki świń ze znokautowanym genem α -1-3 GT odzaczałyby się znacznie podwyższoną odpornością na reakcję odrzucenia przeszczepu przez biorcę. Uzyskano już linie komórek świńskich ze znokautowanym genem α -1-3 GT¹². Udało się również przeprowadzić somatyczne klonowanie świń¹². Czy połączenie obu tych technik zaawocuje zastosowaniem ksenotransplantów w praktyce medycznej pokaże zapewne najbliższa przyszłość.

Pewne obawy budzą jednak wyniki badań opublikowane ostatnio przez *van der Laana i wsp.* wykazujące możliwość międzygatunkowej infekcji endogennymi retrowirusami świńskimi (PERV; ang. porcine endogenous retroviruses)²¹. Wykazano, że po przeszczepieniu do myszy NOD/SCID (ang. non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice) komórek świńskich wysp trzustkowych (z tego typu zabiegiem wiązano duże nadzieje w terapii cukrzycy młodzieńczej) dochodzi do zakażenia przez PERV większości mysich tkanek. Wykazano również, że PERV zakażać mogą także hodowane *in vitro* komórki ludzkie. Obserwacje *van der Laana i wsp.* budzą obawy, że transplantacje narządów świńskich przyczynić się mogą do rozprzestrzenienia w populacji ludzkiej obcogatunkowych patogenów. Obawy te są tym poważniejsze, że PERV są zbliżone do retrowirusów typu C wiązanych z powstawaniem złośliwych nowotworów komórek układu krwiotwórczego.

²⁰ *Baguisi A., Behboodi E., Melican D.T., Pollock J.S., Destrempe M.M., Cammuso C., Williams J.L., Nims S.D., Porter C.A., Midura P., Palacios M.J., Ayres S.L., Denniston R.S., Hayes M.L., Ziomek C.A., Meade H.M., Godke R.A., Gavin W.G., Overstrom E.W., Echelard Y.*: Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17, 456-461

²¹ *Van der Laan L.J.W., Lockey C., Griffith B.C., Frasier F.S., Wilson C.A., Onions D.E., Hering B.J., Long Z., Otto E., Torbutt B.E., Salomon D.R.*: Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature*, 2000, 407, 90-94

Klonowanie terapeutyczne. Sukcesy somatycznego klonowania ssaków wiążą się nie-
rozzerwalnie z dyskusją na temat możliwości klonowania człowieka. Pod uwagę brane są
dwa rodzaje klonowania: klonowanie reprodukcyjne i klonowanie terapeutyczne. Choć
pierwszy typ klonowania budzi powszechny sprzeciw i jest w większości krajów zakazany,
to rozważane są możliwości jego stosowania w wyjątkowych przypadkach niepłodności, w
których (z powodu całkowitego braku męskich komórek rozrodczych) nie można zastoso-
wać ani klasycznego zapłodnienia *in vitro* ani zapłodnienia mikrochirurgicznego metodą
iniekcji plemników (ICSI; ang. intracytoplasmic sperm injection), jąder spermatyd (ELSI;
ang. elongated spermatid injection i ROSI; ang. round spermatid injection), a nawet sper-
matocytów II rzędu. Przeprowadzenie takiego zabiegu polegałoby na wprowadzeniu jądra
komórki somatycznej (np. skóry) pochodzącej od mężczyzny do enukleowanego oocytu
pobranego od jego partnerki.

Znacznie mniejszy sprzeciw budzi klonowanie terapeutyczne, w którym blastocysty,
które rozwinęły się z rekonstruowanych oocytów używane by były do wyhodowania pier-
wotnych komórek zarodkowych^{22, 23, 24}. Celem tego zabiegu byłoby wytworzenie komór-
kowych autotransplantów dla indywidualnych pacjentów wymagających terapii komórko-
wej. Od chorego pacjenta pobierane byłyby komórki somatyczne (np. fibroblasty), a na-
stępnie ich jądra wprowadzane by były do enukleowanych ludzkich oocytów MII. Rozwój
rekonstruowanych zarodków zachodziłby *in vitro* do stadium blastocysty. Z węzłów zarod-
kowych blastocyst wyprowadzane by były linie pierwotnych komórek zarodkowych, które
następnie – metodami sterowanego różnicowania – zmuszane by były do przekształcenia
się w żądany typ komórek (Ryc. 3).

Chociaż uzyskanie linii ludzkich pierwotnych komórek zarodkowych jest już możli-
we^{25, 26}, klonowanie terapeutyczne, jeżeli nawet zostanie zalegalizowane, nieprędko będzie
miało szansę na powszechne stosowanie. Podstawowym problemem jest dostępność ludz-
kich oocytów. Z kalkulacji opartych na efektywności klonowania innych gatunków ssaków,
częstotliwości występowania aneuploidii w zarodkach ludzkich oraz odsetka ludzkich blas-
tocyst, z których udaje się wyprowadzić linie komórkowe wynika, że do uzyskania jednej,
indywidualnej linii pierwotnych komórek zarodkowych wymagane jest użycie przynajmniej
280 ludzkich oocytów. W chwili obecnej jest to oczywiście niemożliwe.

Nie można jednak wykluczyć, że udoskonalenie metod dojrzewania ludzkich oocytów
in vitro pozwoli na ich pobieranie z niedojrzałych pęcherzyków jajnikowych. Wtedy, jeżeli
zostaną stworzone odpowiednie akty prawne, oocyty mogłyby być pobierane z jajników
uzyskiwanych *post mortem*. Alternatywą jest użycie biorców obcogatunkowych.

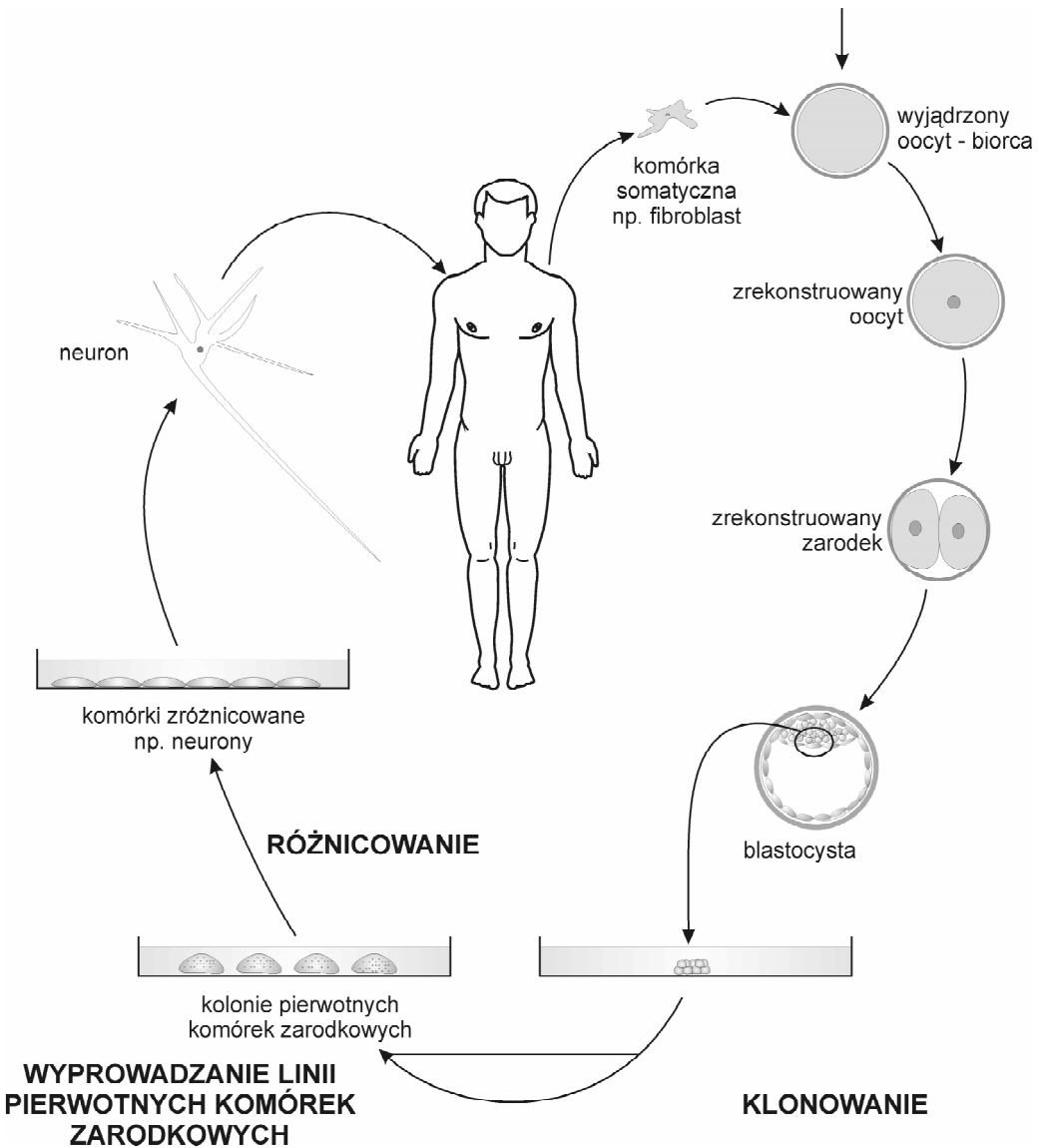
²² Kind A., Colman A.: Therapeutic cloning: needs and prospects. *Seminars in Cell and Dev Biol.* 1999, 10, 279-286

²³ Colman A., Kind A.: Therapeutic cloning: concepts and practicalities. *Trends in Biotechnol.* 2000, 18, 192-196

²⁴ Karasiewicz J., Modliński J.A.: Komórki macierzyste ssaków: potencjalne źródło zróżnicowanych komórek do transplantacji. *Post. Biol. Kom.*, 2001, 28: 219-242

²⁵ Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282, 1145-1147

²⁶ Shambloott M.J., Axelman J., Wang S., Bugg E., Littlefield J., Donovan P.J., Blumenthal P.D., Huggins R.G., Gearhart J.D.: Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 13726-13731



Ryc. 3. Klonowanie terapeutyczne

Schemat ilustruje teoretyczną możliwość somatycznego klonowania człowieka w celu uzyskania zarodka, z którego wyprowadzone pierwotne komórki zarodkowe posłużą jako materiał do otrzymania zróżnicowanych komórek do przeszczepu. Prawa strona rysunku przedstawia kolejne etapy klonowania, lewa – hodowle komórek.

Fig. 3. Therapeutic cloning

Schematic illustration of the theoretical possibility of human somatic cloning aimed at obtaining embryonic stem cells for autotransplants. Right side of the figure represents subsequent steps of cloning. Cell culture is illustrated on the left.

Badania *Mitalipovej i wsp.* wykazały, że jądra komórek somatycznych kilku gatunków ssaków po ich wprowadzeniu do enukleowanych oocytów bydłęcych mogą pokierować rozwojem rekonstruowanych zarodków do stadium blastocysty²⁷. *Lanza i wsp.* wykazali zaś, że możliwy jest pełny rozwój zarodka uzyskanego w wyniku międzygatunkowego klonowania somatycznego²⁸. Jądra komórek skóry gaura (*Bos gaurus*) wprowadzone były do enukleowanych oocytów bydłęcych. Narodziny pierwszego osobnika, nazwanego Noe, nastąpiły na początku tego roku²⁹. Stosowanie jednak międzygatunkowego klonowania w odniesieniu do człowieka jest ryzykowne. Po pierwsze, na skutek niezgodności jądrocytoplazmatycznych wiele międzygatunkowych komórek cybrydowych nie rozwija się prawidłowo. W cybrydach takich stwierdzono, między innymi, zmienione wzorce ekspresji wielu genów. Po drugie, obecność obcogatunkowych białek powierzchniowych w komórkach przeznaczonych do transplantacji spowodować może powstanie reakcji immunologicznej, co oczywiście jest zaprzeczeniem podstawowego celu stosowania tej techniki.

Wątpliwości. Klonowanie somatyczne pozostaje nadal – z biologicznego punktu widzenia – wielką niewiadomą. Nic prawie nie wiadomo o mechanizmach warunkujących przeprogramowanie w cytoplazmie oocytu wprowadzonych jąder somatycznych, jak również bardzo słabo poznane są zmiany morfologiczne i funkcjonalne, jakie związane są z ich przemodelowaniem. Około połowa cieląt urodzonych w Japonii w wyniku klonowania somatycznego, padła w czasie porodu lub wkrótce po urodzeniu. Jedną z przyczyn była niewątpliwie ich nadmierna (w przypadku rasy Holstein nawet dwukrotnie większa) masa urodzeniowa. Anomalia ta, występująca również u sklonowanych owiec i określana jako „large calf-lamb syndrome” powoduje ciężkie porody. Nie jest to jednak jedyna przyczyna zwiększonej śmiertelności cieląt, gdyż padały również cielęta o normalnej lub nawet nieco niższej masie ciała. U sklonowanych zwierząt występują często zaburzenia w funkcjonowaniu układu oddechowego i układu krążenia, a w rozwoju płodowym zaobserwowano nieprawidłowości w budowie błon płodowych oraz łożyska. Obserwuje się również skrócenie żuchwy oraz, wprawdzie znacznie rzadziej, inne rodzaje deformacji trzewioczaszki. Zagadnienia te omówione są szerzej w publikacji *Hilla i wsp.*³⁰.

Z somatycznym klonowaniem ssaków wiąże się także wątpliwości dotyczące rzeczywistego wieku sklonowanych zwierząt w momencie ich narodzin. Wiadomym jest, że u wielu gatunków zwierząt wraz z liczbą przebytych przez komórki cykli komórkowych, a więc wraz z liczbą replikacji DNA dochodzi do skracania się telomerów (końcowych fragmentów chromosomów stabilizujących ich strukturę w czasie replikacji), co uważane jest za jeden z przejawów starzenia się zarówno komórki, jak i całego organizmu. Jeżeli zjawi-

²⁷ *Mitalipova M., Dominko T., Haley B., Beyhan Z., Memili E., First N.*: Bovine oocyte cytoplasm reprograms somatic cell nuclei from various mammalian species. *Theriogenology*, 1998, 49, 389

²⁸ *Lanza P., Cibelli J.B., Diaz F., Moraes C.T., Farin P.W., Farin C.E., Hammer C.J., West M.D., Damiani P.*: Cloning of endangered species (*Bos gaurus*) by interspecies nuclear transfer. *Cloning*, 2000, 2, 79-90

²⁹ *Vogel G.*: Cloned gaur a short-lived success. *Science*, 2001, 291:409

³⁰ *Hill J.R., Rousset A.J., Cibelli J.B., Edwards J.F., Hooper N.L., Miller M.W., Thompson J.A., Looney C.R., Westhusin M.E., Robl J.M., Stice S.L.*: Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*, 1999, 51, 1451- 65

ska to byłoby nieodwracalne, to pochodzące od dorosłych osobników komórki dawcy jąder byłyby już wyjściowo komórkami starymi, co mogłoby wywierać niekorzystny wpływ zarówno na rozwój sklonowanych osobników, jak również ograniczać długość ich życia. Badania *Shielsa i wsp.* przeprowadzone na chromosomach Dolly w wieku trzech lat wykazały, że długość telomerów jej chromosomów była znacznie mniejsza niż u zwierząt kontrolnych będących w tym samym wieku³¹. Kiedy Dolly miała około jednego roku, długość jej telomerów zbliżona była do długości telomerów jej „matki” (klonowanego osobnika), która miała sześć lat, gdy pobrano od niej komórki gruczołu mlekowego, użyte później jako dawcy jąder. Tak więc, kiedy Dolly miała trzy lata, jej wiek „telomerowy” odpowiadał wiekowi 9-letniej owcy. Obecnie Dolly ma około czterech lat i urodziła czworo jagniąt, a więc jej zdolności rozrodcze nie są, jak na razie, upośledzone. Nie wiadomo oczywiście jak długo będzie żyła. Skróceniu, i to w szybkim tempie, ulegają również telomery chromosomów owczych fibroblastów hodowanych *in vitro*. Już po czterech pasażach, a więc po kilku tygodniach hodowli, długość telomerów ich chromosomów odpowiada długości telomerów chromosomów owcy w wieku jednego roku. Z kolei, w kwietniu 2000 r. opublikowana została w „*Science*” praca *Lanza i wsp.*, która problem związku długości telomerów z wiekiem komórek stawia w zupełnie nowym świetle³². Badacze ci wykazali, że u bydła, po wprowadzeniu do enukleowanych oocytów jąder fibroblastów, w których chromosomach – w wyniku długotrwałej hodowli *in vitro* – doszło do niemal całkowitego zaniku telomerów, dochodzi w czasie rozwoju rekonstruowanych (sklonowanych) zarodków do odtworzenia normalnej (a nawet czasami ponadnormalnej) długości telomerów. Na marginesie warto dodać, że u myszy nie dochodzi w czasie ontogenezy do skracania się telomerów. Nokaut genu telomerazy, enzymu zapobiegającego skracaniu się telomerów (gen ten jest również aktywny w komórkach nowotworowych), nie wpływa negatywnie na rozwój myszy aż do 5 pokolenia. Trudno w tej chwili jednoznacznie określić, czy w grę wchodzi tu tylko różnice międzygatunkowe, co przeczyłoby ogólnie przyjętej roli telomerów, czy też wpływają na to jakieś inne czynniki i mechanizmy.

Wyniki ostatnich badań porównawczych przeprowadzonych na cielętach urodzonych w wyniku transplantacji do enukleowanych oocytów jąder wielu rodzajów komórek somatycznych pochodzących z tkanek płodów, nowonarodzonych cieląt oraz osobników dorosłych są dość zaskakujące³³. Okazało się, między innymi, że u cieląt uzyskanych po transplantacji jąder komórek ucha pochodzących z 10-letniego buhaja, długość telomerowych odcinków DNA w komórkach ucha jest taka sama jak w komórkach ucha dawcy jąder. Z drugiej jednak strony, długość telomerów w białych ciałkach krwi była znacznie mniejsza, odpowiadała jednak długości telomerów w białych ciałkach krwi u cieląt kontrolnych będących w tym samym wieku. Wskazuje to na to, że skracanie się telomerów (przynajmniej

³¹ *Shiels P.G., Kind A.J., Campbell K.H.S., Waddington D., Wilmut I., Colman A., Schnieke A.*: Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature*, 1999, 399, 316-317

³² *Lanza P., Cibelli J. B., Blackwell C., Cristofalo V. J., Francis M. K., Baerlocher G. M., Mak J., Schertzer M., Chaves E. A., Sawyer N., Landstrop P. M., West M. D.*: Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*, 2000, 288, 665-669

³³ *Kato Y., Tani T., Tsunoda Y.*: Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J. Reprod. Fert.*, 2000, 120, 231-237

u bydła) przebiega różnie w różnych tkankach. Porównując aktywność telomerazy w komórkach pęcherzykowych i we wprowadzonych w stan G0 komórkach nabłonka jajowodu nie stwierdzono aktywności telomerazy w komórkach pęcherzykowych. Tym niemniej jednak, uzyskano podobny odsetek cieląt urodzonych po transplantacji jąder obu typów komórek. Analiza potencji rozwojowych zwierząt uzyskanych po transplantacji jąder komórek w różnym wieku wykazała, że znacznie więcej przypadków spontanicznych poronień oraz znacznie większą liczbę różnego typu anomalii rozwojowych obserwowano u płodów i urodzonych cieląt rozwijających się po transplantacji jąder komórek dorosłych osobników niż po transferze jąder komórek płodowych i z nowonarodzonych cieląt. Jest jednak sprawą całkowicie niejasną, czy ma to jakikolwiek związek ze skracaniem się telomerowych odcinków DNA. Intrygujące jest jednak to, że wiele cieląt urodzonych po transferze jąder komórek pochodzących od 10-letniego buhaja miało, już w momencie narodzin, wiele cech fenotypowych charakterystycznych dla dorosłych osobników, takich jak masywną budowę kości, pomarszczenie skóry oraz sztywne i szorstkie włosy. Znowu oczywiście nie wiadomo, czy ma to związek ze skracaniem się telomerów czy też jest wynikiem mutacji kumulujących się wraz z wiekiem, w komórkach dawcach jąder.

Wnioskiem jaki się nasuwa, jest to, że zanim klonowanie somatyczne wprowadzone będzie do programów hodowlanych, a tym bardziej do terapii komórkowej, niezbędne jest przeprowadzenie jeszcze wielu badań, które umożliwiłyby wyjaśnienie i zrozumienie mechanizmów przeprogramowania jąder somatycznych w cytoplazmie oocytów.

Profesor *Jacek Modliński*
Zakład Embriologii Doświadczalnej
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN
Jastrzębiec, 05-552 Wólka Kosowska