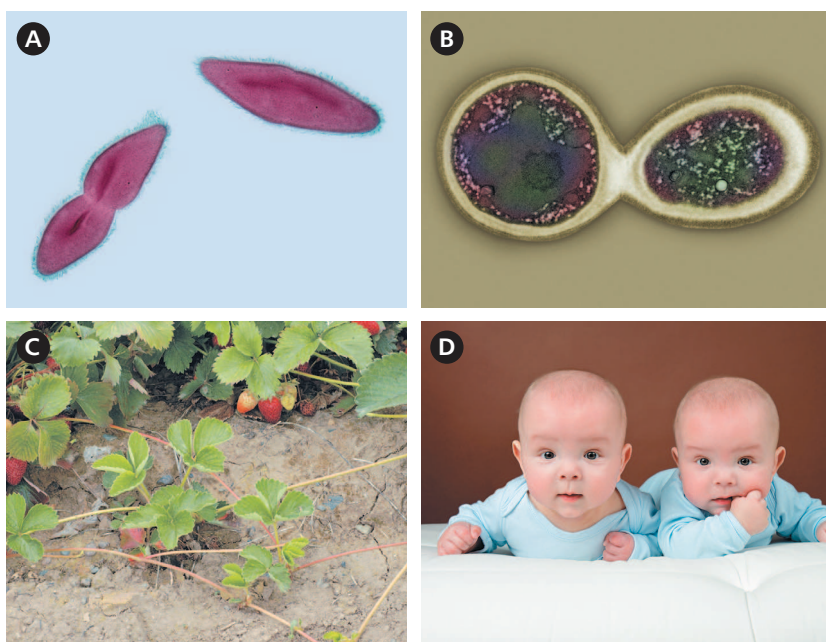


# 15

klon jako genetyczna kopia zbioru komórek lub organizmu

## 15. Klonowanie organizmów

Słowo *clone* w języku angielskim w XIX wieku oznaczało roślinę wyhodowaną z ukorzonej gałązki. Termin **klon** używany obecnie oznacza zbiór komórek lub organizm identyczny pod względem genetycznym z innym organizmem (będący jego genetyczną kopią). Klony mogą powstawać w sposób naturalny lub w wyniku sztucznego zabiegu. Naturalnymi klonami są bliźnięta jednojajowe oraz potomstwo organizmów rozmnażających się bezpłciowo (np. przez podział, pączkowanie czy rozłogi).

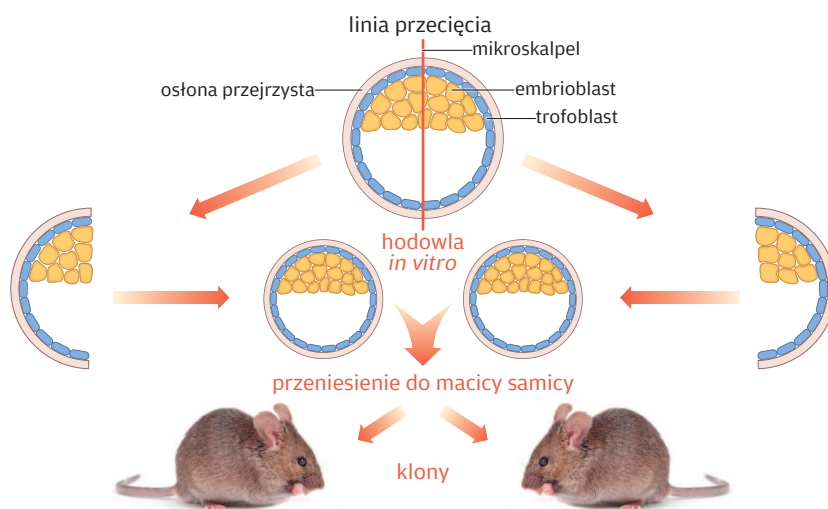


**Ryc. 15.1.** Naturalne klony powstają przez podział organizmu wyjściowego (A - pantofelek, B - drożdże, C - truskawka) lub przez podział zygoty (D - bliźnięta jednojajowe).

### Najczęściej wykorzystywane metody klonowania

Podstawowe metody sztucznego klonowania to dzielenie zarodków i transfer jąder komórek somatycznych do pozbawionych jąder komórek jajowych lub zygot. Pierwsza metoda polega na tym, że zarodki ssaków w stadium blastocysty (tzn. składające się z trofoblastu, czyli warstwy komórek otaczającej blastocystę, i węzła zarodkowego, czyli komórek, z których rozwija się ciało zarodka) **klonuje się poprzez podział na dwie części**. Za pomocą mikroskalpela przecina się węzeł zarodkowy na pół i hoduje podzielone zarodki do momentu, gdy osiągną stadium, z którego zostały uzyskane (stadium blastocysty). Następnie przenosi się je do dróg rodnych samic.

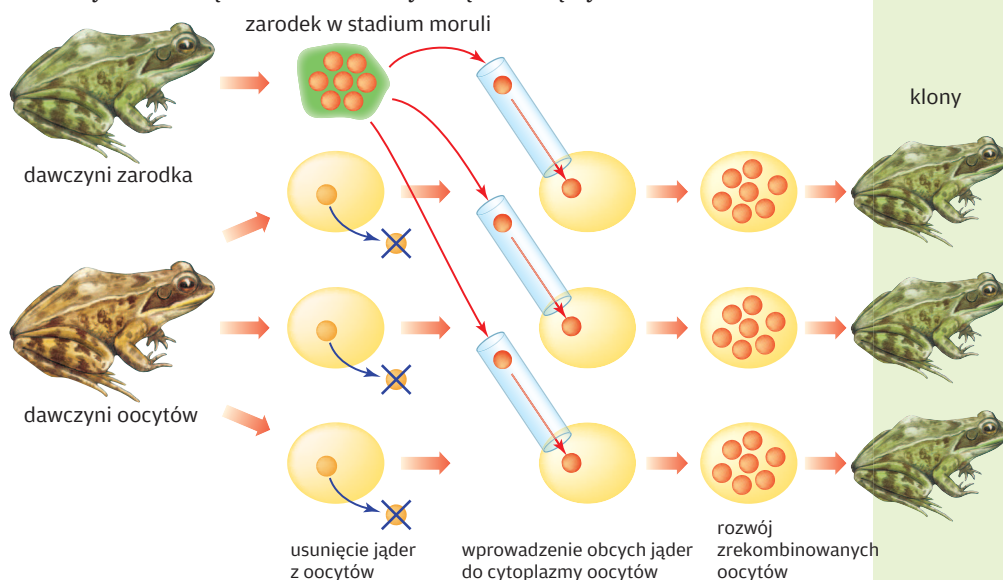
klonowanie przez podział zarodków



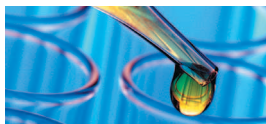
**Ryc. 15.2.** Metodą klonowania poprzez dzielenie zarodków uzyskano klony myszy, królika, owcy, świni i konia.

**Klonowanie poprzez transfer jąder**, nazywane też **klonowaniem somatycznym**, polega na pobraniu jądra komórkowego z komórki somatycznej zarodka lub dorosłego organizmu. Następnie przenosi się je do pozbawionych wcześniej własnych jąder, dojrzewających komórek jajowych bądź zygoty tego samego gatunku. Komórki te pobudza się do rozwoju, a po osiągnięciu stadium blastocysty przenosi się do układu rozrodczego samicy. Pierwszym zwierzęciem sklonowanym tą metodą była żaba.

● klonowanie somatyczne – przez transfer jąder komórkowych



**Ryc. 15.3.** Klonowanie zarodka żaby metodą transferu jąder komórkowych. Za pomocą mikropipety komórkę jajową żaby pozbawiono materiału genetycznego i na to miejsce wprowadzono jądra komórkowe z komórki zarodka. W ten sposób uzyskano kilkanaście kijanek, które były klonami zarodka.

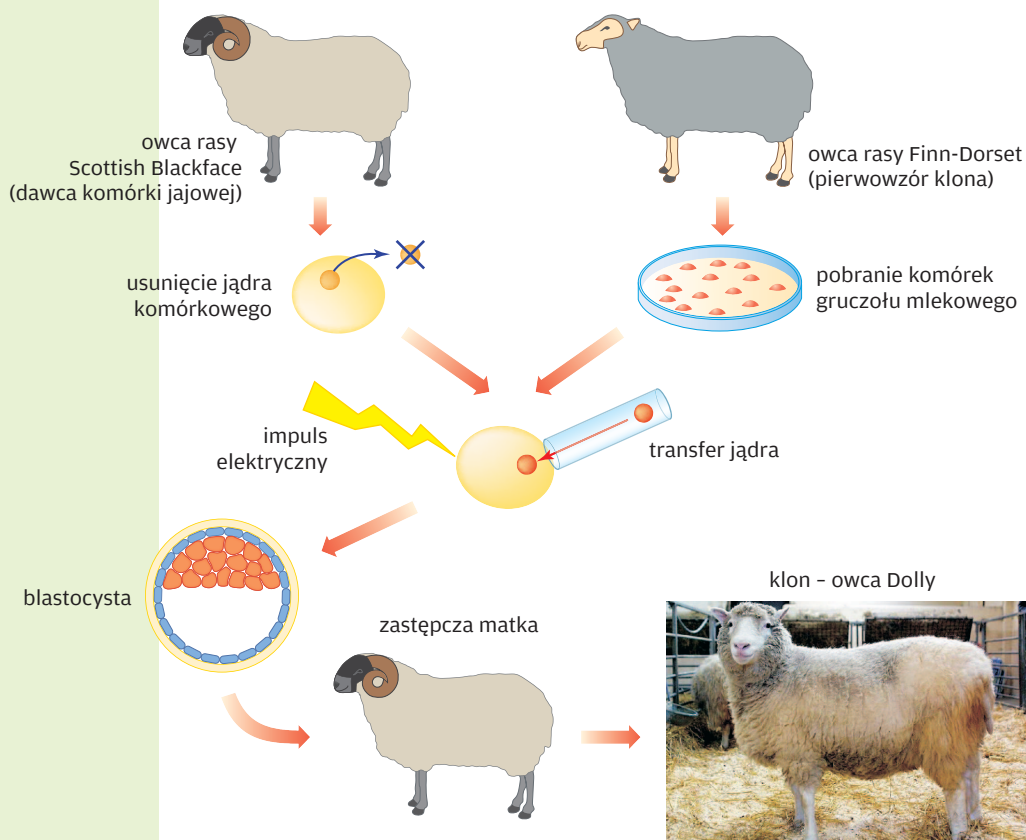


## II. BIOTECHNOLOGIA I INŻYNIERIA GENETYCZNA

W klonowaniu somatycznym komórki jajowe lub zygoty, które mają przyjąć obce jądra, nakłuwa się z użyciem mikropipety i wsysa z nich materiał genetyczny wraz z niewielką ilością cytoplazmy. Przenoszone jądro może pochodzić z komórek zarodków, komórek somatycznych płodów lub organizmów dojrzałych. Następnie jądra, również za pomocą mikropipety, przenosi się do komórki jajowej biorcy, pobudza do rozwoju i hoduje poza organizmem do momentu osiągnięcia przez nie stadium blastocysty. Po tym etapie przenosi się je do dróg rodnych samicy.

Klonowanie somatyczne jest mało wydajne, ponieważ wiele klonów umiera w trakcie rozwoju płodowego, a po urodzeniu żyją zwykle krócej niż klony naturalne (np. klony świń umierają około 6. roku życia). Uzyskanie jednego klonu wymaga podjęcia setek prób. Pierwszym sklonowanym ssakiem (1996 r.) uzyskany z zastosowaniem metody transferu jąder była owca Dolly. W eksperymencie, w wyniku którego przyszła na świat, wykorzystano aż 277 zygot. Co więcej, Dolly była jedynym jagnięciem, które się w tej próbie urodziło. Ze względu na chorobę płuc oraz oznaki postępującej starości po sześciu latach została uśpiona.

pierwszy na świecie sklonowany ssak



Ryc. 15.4. Schemat metody klonowania, którą wykorzystano do uzyskania owcy Dolly.



### Ciekawe fakty

Zwierzęta transgeniczne klonuje się w celu pozyskania biofarmaceutyków (np. produkowanych w mleku bydła). Klonowanie można też wykorzystać do kopiowania odmian zwierząt o cechach wartościowych dla rolników (np. mlecznych krów czy świń o dużej masie ciała). Podejmowane są także próby klonowania zwierząt wymarłych i zagrożonych wyginięciem (np. sklonowanie Lady – ostatniej żyjącej krowy rasy Enderby Island na Nowej Zelandii).

W tym samym roku co Dolly urodziły się także owce Polly i Molly. Były one pierwszymi klonami ssaków transgenicznych (w swoim genomie posiadały gen warunkujący wytwarzanie czynnika krzepnięcia krwi). Kolejnymi sklonowanymi ssakami były myszy, bydło, świnie, muflon europejski, muł, kot, jeleń, wilk i pies.

W wypadku zwierząt wolno żyjących lub wymarłych stosuje się tak zwane **międzygatunkowe klonowanie somatyczne**. Materiał genetyczny danego zwierzęcia wprowadza się wówczas do organizmów matek zastępczych należących do innego gatunku. Sklonowano w ten sposób zagrożonego wyginięciem gaura. Jego materiał genetyczny wprowadzono do komórek jajowych krów, matką zastępczą również była krowa. Urodzone cielę żyło kilka dni, lecz zmarło na skutek poważnej infekcji. W rok później sklonowano muflona, a następnie banteng (gatunek dzikiego bydła). Trwają prace nad klonowaniem górskiej odmiany antylopy bongo, kozy bucardo, azjatyckiego geparda, pandy wielkiej oraz wombata (australijskiego torbacza).

● klonowanie międzygatunkowe



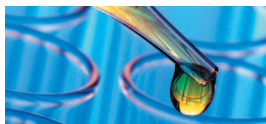
**Ryc. 15.5.** Za pomocą międzygatunkowego klonowania somatycznego udało się sklonować gaura.

### Ciekawe fakty

Naukowcy z Japonii sklonowali myszy poprzez pobranie jąder komórkowych z mysich tkanek zamrożonych przez 16 lat. Metoda ta daje nadzieje na odtworzenie gatunków zwierząt, których szczątki dotrwały do dziś w postaci zamrożonej (np. mamutów syberyjskich). Mamuta można byłoby przywrócić do życia, na przykład zapładniając *in vitro* komórkę jajową słonia plemnikiem wyizolowanym z zamrożonej spermy mamuta lub wykorzystując międzygatunkowe klonowanie somatyczne (matką zastępczą mogłaby być słonica).

Prowadzone są również prace nad klonowaniem człowieka. Jednak z przyczyn etycznych działania zmierzające do uzyskiwania w ten sposób ludzkich zarodków są wstrzymywane (w 1998 r. w Seulu uzyskano pierwszy czterokomórkowy klon człowieka, lecz prace przerwano ze względu na kodeks lekarski, a w 2001 r. w USA zatrzymano rozwój sklonowanego zarodka na stadium ośmiokomórkowym). Klonowanie człowieka wzbudza ogromne kontrowersje. W Stanach Zjednoczonych dopuszcza się wykorzystanie tego procesu w leczeniu i terapii (np. do uzyskiwania komórek macierzystych czy organów do transplantacji).

● klonowanie człowieka



komplikacje  
prawne związane  
z prowadzonymi  
eksperymentami

Zabronione jest natomiast, podobnie jak w większości krajów, klonowanie ludzi w celu uzyskania potomstwa. Przeciwnicy klonowania w celach reprodukcyjnych wysuwają ważne argumenty. Na przykład taki, że dziecko uzyskane w wyniku klonowania byłoby identyczne tylko z jednym z rodziców, co mogłoby stanowić poważne utrudnienie w sprawach sądowych (np. rozwodowych lub spadkowych). Ponadto w klonowaniu somatycznym wykorzystuje się jednocześnie wiele komórek jajowych, więc uzyskanie ich w wystarczającej ilości od jednej kobiety nie jest możliwe. Obawy budzi także konieczność uśmiercania nieprawidłowo rozwijających się klonów.

#### Ciekawe fakty

Celem klonowania ludzi może być chęć urodzenia dziecka podobnego do utraconego (DNA pobrane od zmarłego) bądź chęć posiadania zdrowego dziecka przez pary bezpłodne lub takie, w których jeden partner ma wadę genetyczną (DNA pobrane od drugiego partnera). Decyzję o klonowaniu mogliby podjąć rodzice chcący zachować lub przekazać dzieciom wyjątkowe cechy genetyczne (np. DNA pobrane od osób wybitnych), bądź też pragnący zapewnić materiał do leczenia (np. by pozyskać organy do transplantacji).

### Klonowanie terapeutyczne z użyciem komórek macierzystych

wykorzystanie  
komórek  
macierzystych  
w procesie  
klonowania

Komórki macierzyste (ang. *stem cells*) to komórki zachowujące zdolność do podziałów przez całe życie organizmu. Drugą ważną ich cechą jest umiejętność różnicowania się w inne typy komórek. Ze względu na źródło pochodzenia wyróżnia się: **embrionalne (zarodkowe) komórki macierzyste** (ES; ang. *embryonic stem cells*) pochodzące z zygota lub węzłów zarodkowych, **płodowe komórki macierzyste** uzyskiwane z krwi pępowinowej i **somatyczne komórki macierzyste** znajdujące się w tkankach dorosłego organizmu (m.in. w szpiku, jelitach, naskórku, tkance nerwowej, krwi, siatkówce oka). Ze względu na możliwości różnicowania i autoodbudowy komórki macierzyste dzieli się na: totipotencjalne, pluripotencjalne, multipotencjalne oraz unipotencjalne.

#### Podział komórek macierzystych ze względu na pochodzenie i zdolność transformacji

Typy komórek macierzystych		
Embrionalne komórki macierzyste	totipotencjalne (tworzące zygotę)	Mają zdolność transformacji do każdego typu komórek, w tym komórek łożyska.
	pluripotencjalne (tworzące węzeł zarodkowy)	Różnicują się we wszystkie typy komórek, ale nie mogą powrócić do stanu komórek totipotencjalnych (nie są w stanie utworzyć łożyska).
Płodowe komórki macierzyste	multipotencjalne	Mają możliwość przekształcenia się we wszystkie typy komórek w obrębie danego listka zarodkowego.
Somatyczne komórki macierzyste	unipotencjalne	Transformują się do jednego typu dojrzałych komórek.



Liczne badania prowadzone na zarodkowych komórkach macierzystych pozwoliły poznać geny i białka odpowiadające za ich pluripotencję. Wiadomo także, w jaki sposób doprowadzić w warunkach *in vitro* do tego, aby komórki te przekształciły się w określony typ komórek (np. w neurony czy włókna mięśniowe). Trwają badania nad porównaniem komórek uzyskanych w wyniku różnicowania się komórek macierzystych z komórkami pobranymi z prawidłowych tkanek. Celem porównań jest sprawdzenie, czy komórki macierzyste mogłyby zastępować uszkodzone tkanki. Zarodkowe komórki macierzyste można pozyskać dwoma sposobami: w wyniku zapłodnienia *in vitro* lub w wyniku klonowania techniką transplantacji jąder komórkowych (pierwsze zarodkowe komórki macierzyste uzyskano z zarodków myszy).

Uzyskiwanie komórek macierzystych z ludzkich zarodków budzi wiele kontrowersji natury etycznej, dlatego trwają prace nad pozyskiwaniem ich z innych źródeł.

#### Ciekawe fakty

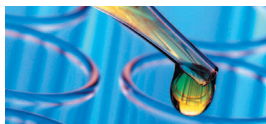
Opracowano metodę uzyskiwania komórek macierzystych z komórek zróżnicowanych (np. fibroblastów, a także komórek wątroby i nabłonka oraz neuronów). Z użyciem wektorów wirusowych do fibroblastów wchodzących w skład tkanki łącznej właściwej wprowadzono geny, które odpowiadają za pluripotencję komórek. Następnie doprowadzono do przekształcenia się fibroblastów w tak zwane **indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste** (iPS, ang. *induced pluripotent stem cells*). Są one obecnie wykorzystywane do sprawdzania działania leków, a także poznawania mechanizmów schorzeń genetycznych.

Prowadzone są intensywne badania nad wykorzystaniem komórek macierzystych występujących w krwi pępowinowej. Istnieją **banki krwi pępowinowej**, w których jest ona przechowywana. Obecnie próbuje się ją stosować w leczeniu białaczek i innych chorób nowotworowych, anemii sierpowatej oraz ciężkich niedoborów odporności. Z użyciem komórek macierzystych przeprowadza się również zabiegi mające na celu regenerację mięśnia sercowego, który obumarł (np. w wyniku zawału), lecz się także uszkodzenia rdzenia kręgowego i mózgu spowodowane chorobami neurodegeneracyjnymi (np. chorobą Alzheimera, Parkinsona czy stwardnieniem rozsianym), a także uszkodzenia trzustki u chorych na cukrzycę.

● nadzieje związane z komórkami macierzystymi



**Ryc. 15.6.** Pobraną od noworodka krew pępowinową przechowuje się w specjalnych bankach.



Badania te prowadzi się na modelach zwierzęcych. Jak dotąd dokładny mechanizm działania terapeutycznego komórek macierzystych nie jest znany.

#### Ciekawe fakty

W Wielkiej Brytanii w 2001 roku zezwolono na klonowanie ludzkich zarodków na potrzeby badań nad komórkami macierzystymi. W 2006 roku zgodę na klonowanie terapeutyczne i badanie ludzkich zarodków wydał parlament Australii. Tego typu badania są także prowadzone w Stanach Zjednoczonych oraz w Singapurze. Ustalenia Unii Europejskiej z 2006 roku dopuszczają dofinansowywanie badań nad komórkami macierzystymi.



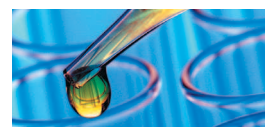
**Ryc. 15.7.** Terapię z użyciem komórek macierzystych popierał zmarły w 2004 roku amerykański aktor Christopher Reeve (odtwórca roli Supermana), który w 1995 roku został sparaliżowany po upadku z konia.

Klonowanie terapeutyczne

W 2002 roku przeprowadzono doświadczenie, w którym z ogona transgenicznej myszy pobrano komórki skóry właściwej (fibroblasty). W genomie zablokowano gen warunkujący powstawanie limfocytów. Jądro fibroblasty za pomocą mikropipety wprowadzono do komórki jajowej uprzednio pozbawionej własnego jądra. Komórkę jajową pobudzono do rozwoju i otrzymano z niej zarodek. Z zarodka tego uzyskano zarodkowe komórki macierzyste pozbawione genu odpowiedzialnego za produkcję limfocytów. Wprowadzono do nich ten gen, przekształcono je w komórki krwi i wstrzyknięto myszy, od której pobrano fibroblasty. Po tym zabiegu w krwi myszy pojawiły się limfocyty. Wyniki tego doświadczenia rozbudziły nadzieje na stosowanie podobnych zabiegów u ludzi cierpiących na choroby dziedziczne. Metodę tę nazwano **klonowaniem terapeutycznym**.

Klonowanie terapeutyczne zastosowane u modelowych myszy z chorobą Parkinsona spowodowało znaczną poprawę ich zdrowia. Stosując tę metodę, można byłoby od chorego pobrać komórki, wprowadzić je do komórek jajowych, uzyskać zarodki, a z nich zarodkowe komórki macierzyste. W komórkach macierzystych wadliwy gen byłby zastępowany prawidłowym, następnie komórki macierzyste różnicowałyby się w pożądaný rodzaj komórek i wprowadzano do chorej tkanki pacjenta. Ponieważ są to komórki pobrane pierwotnie od pacjenta, nie byłyby odrzucane.

Taka terapia, choć możliwa, jest bardzo trudna do przeprowadzenia. Aby uzyskać zarodkowe komórki macierzyste, trzeba byłoby wielu komórek jajowych, co wymagałoby współpracy wielu kobiet.



Ponadto wykorzystanie ludzkich zarodków dla zdobycia komórek macierzystych budzi wiele wątpliwości natury etycznej. Bardzo istotnym problemem jest także brak metody dającej pewność, że wszystkie komórki macierzyste przekształcą się w odpowiedni sposób (np. w komórki trzustki czy mięśnia sercowego). Jeśli choć jedna komórka macierzysta wszczepiona przez przypadek pacjentowi zaczęłaby się różnicować w jego organizmie, stanowiłaby olbrzymie zagrożenie. Mógłby powstać guz (tzw. **potworniak**) będący mieszaniną komórek wszystkich tkanek. Konieczne jest opracowanie metody pełnego różnicowania zarodkowych komórek macierzystych, która będzie gwarantowała, że żadna z tych komórek nie zostanie przeszczepiona choremu.

### Podsumowanie



1. Klon to organizm lub zbiór komórek identycznych pod względem genetycznym z innym organizmem.
2. Klon może powstać w sposób naturalny (np. w wyniku rozmnażania wegetatywnego) lub sztuczny (przez podział zarodków lub transfer jąder).
3. Najczęściej wykorzystuje się technikę klonowania poprzez transfer jądra komórkowego z komórki somatycznej do komórki jajowej uprzednio pozbawionej jądra.
4. Pierwszym sklonowanym zwierzęciem była żaba, a pierwszym sklonowanym ssakiem - owca Dolly.
5. Zwierzęta klonuje się w celu pozyskania zwierząt transgenicznych produkujących biofarmaceutyki lub powielania odmian zwierząt o cechach wartościowych dla rolników, a także by chronić gatunki zagrożone wymarciem lub przywrócić zwierzęta już wymarłe (np. mamuta).
6. Klonowanie ludzi w celach reprodukcyjnych jest zabronione. W niektórych krajach klonuje się ludzkie zarodki w celu prac nad komórkami macierzystymi.
7. Wyróżnia się embrionalne, płodowe i somatyczne komórki macierzyste. Te ostatnie występują w tkankach dorosłego organizmu (szpiku kostnym, jelitach, naskórku, krwi i siatkówce oka).
8. Embrionalne komórki macierzyste mogą być totipotencjalne (komórki zygoty) lub pluripotencjalne (komórki węzła zarodkowego). Oznacza to, że mogą różnicować się w dowolne komórki organizmu.
9. Klonowanie terapeutyczne polega na pobraniu od pacjenta jąder komórkowych, wprowadzeniu ich do komórki jajowej pozbawionej jądra, uzyskaniu w ten sposób komórek macierzystych, „naprawieniu” ich, przekształceniu w wyjściowe komórki i wprowadzeniu z powrotem do organizmu pacjenta.
10. Aby klonowanie terapeutyczne oraz komórki macierzyste można było wykorzystać podczas leczenia, musi zostać opracowana metoda ich pełnego różnicowania, tak aby nie dochodziło do powstawania nowotworów - potworniaków.