

ATT KLONA ELLER INTE KLONA ...

Nyheten om att Ian Wilmut och medarbetare vid Roslin Institute och PPL Therapeutics i Edinburgh [1] lyckats klona ett vuxet däggdjur, i det här fallet ett får, slog ner som en bomb och ledde till en mediastorm av sällan skadat slag. Det som vi hittills har betraktat som ren science fiction har nu blivit verklighet. Upptäckten upplevs bland gemene man som både fascinerande och skrämmande.

Tyvär har väl mediebevakningen till stor del fokuserats på olika former av missbruk av denna teknik. Krav har också höjts att man måste lagstifta mot tillämpningar av kloning främst på människa. Det torde vara ett stort antal etiskt och juridiskt sakkunniga runt om i världen som nu sitter och grubblar på hur man skall hantera frågan. Det är dock viktigt att den handläggs med omsorg, så att en dylik lagstiftning ej kommer att förhindra viktig forskning och eventuella etiskt acceptabla tillämpningar av denna vetenskapliga upptäckt.

Syftet med denna artikel är att beskriva hur kloningen gick till och att diskutera såväl möjliga som olämpliga tillämpningar av tekniken.

Kloningen av får ett stort vetenskapligt genombrott

Med några få kända undantag innehåller alla somatiska celler samma uppsättning arvsanlag som finns i en befruktad diploid äggcell. Det som skiljer en differentierad somatisk cell som t ex en levercell från en odifferentierad embryonal cell är således inte uppsättningen av arvsanlag utan deras uttrycksmönster. Vi säger att en tidig odifferentierad embryonal cell är totipotent, vilket innebär att den kan utvecklas till alla olika celltyper som finns hos en vuxen individ.

Det har länge varit känt att vi kan klona däggdjur genom att dela tidiga embryon eller genom att föra över cellkärnor från odifferentierade embryoceller till enukleerade obefruktade äggceller. På mus har man se-

dan mer än tio år tillbaka haft tillgång till embryonala stamcellslinjer (ES) som är totipotenta [2] och skulle kunna användas för att ta fram många individer av samma klon. Försök med kloning på mus har lyckats när man använt cellkärnor från odifferentierade embryoceller men inte när man använt cellkärnor från somatiska celler från en vuxen individ.

Det finns också en rad klassiska försök på groda utförda av Gurdon [3] på 1960-talet med kärntransplantationer från somatiska celler till enukleerade äggceller. Gurdon lyckades med att ta cellkärnor från en vuxen groda och få dem att utvecklas till ett grodyngel men

Författare

LEIF ANDERSSON
professor, institutionen för husdjursgenetik, Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala

KARL-HENRIK GUSTAVSON
professor, avdelningen för klinisk genetik, Akademiska barnsjukhuset, Uppsala.

inte till en fullt utvecklad vuxen individ. Därför har det varit en allmän uppfattning att differentieringen av somatiska celler hos högre vertebrater är så rigid

Dolly har hittills utvecklats normalt, men ännu vet man inte om hon är fertil.

att de inte är totipotenta. Detta antagande kan nu förkastas mot bakgrund av de nyligen publicerade resultaten [1].

Epitelceller från juvervävnad

Kloningen av Dolly gick till så att man isolerade epitelceller från juvervävnad på ett vuxet får (Figur 1). Cellerna odlades en kort tid i laboratoriet och utsattes då för »serumsvält», vilket fick dem att gå in i en G0/G1 vilofas. Detta innebär att transkriptionen och replikationen av DNA går ner på sparlåga. Dessa »nollställda» epitelceller blandades med obefruktade äggceller på vilka man hade avlägsnat cellkärnan och dess arvs massa. Cellerna utsattes för en elektrisk strömpuls som fick dem att fusera och aktivera äggcellen att börja dela sig. De fuserade cellerna odlades en kort tid i laboratoriet och de celler som såg ut att utvecklas normalt fördes över till en fostermamma. Ett av dessa utvecklades till ett till synes normalt lamm som idag är en världskändis med namnet Dolly.

Effektiviteten var låg, endast ett av 277 försök med cellkärnor från ett vuxet djur ledde fram till födseln av ett klonat får. Vidare rapporterade Wilmut och medarbetare att de lyckats få fram tre klonade lamm från 178 försök med kärnor från fetala fibroblaster, samt fyra klonade lamm när kärnan togs från differentierade embryoceller.

Detta arbete måste betraktas som ett stort vetenskapligt genombrott som visar att cellkärnorna från åtminstone vissa somatiska celler är totipotenta och kan omprogrammeras så att de kan styra en normal embryo- och fosterutveckling.

Omprogrammering

Hur gick då denna omprogrammering till, och hur generaliserbart är detta fynd? Äggcellen är fylld med proteiner och budbärar-RNA (mRNA), som behövs för den tidiga embryoutvecklingen. Hos får startar inte transkriptionen av kärnans DNA förrän efter tre celldelningar, dvs på åttacellsstadiet [4]. En tolkning är därför att detta förhållande gör att äggcellen har haft tid att omprogrammera cellkärnan från juvervävnad till att kunna fungera som en cellkärna i en embryocell. Wilmut och medarbetare menar att en nyckel till deras framgång var att de fick juvercellerna att gå i vilofas; på så sätt synkroniserade de den somatiska cellen med den vilande äggcellen som väntar på ett startskott (dvs befruktning med en spermiecell) för att börja dela sig.

Hos mus börjar transkriptionen av cellkärnan i ett embryo redan efter en celldelning, på tvåcellsstadiet, vilket innebär att det kanske är betydligt svårare att tillämpa denna teknik på mus [4]. Människan är intermediär i detta avseende och transkriptionen startar på fyrcellsstadiet [4]. Det är således inte helt självklart att denna teknik kommer att fungera på människa. Det är också oklart vilka celltyper som kan användas för denna typ av kloning. Det är möjligt att juvervävnad är särskilt lämpad för detta, eftersom den är anpassad att slå om från vilofas till aktiv fas (hos en digivande däggdjursmoder) och därefter återgå till vilofas. Framtida forskning får klargöra dessa viktiga frågor.

En klon är inte en kopia

Dolly är en klon av den tacka från vilken man isolerade juvercellen, dvs de har samma uppsättning nukleära arvsanlag men Dolly är inte en kopia eftersom individens egenskaper bestäms av ett samspel mellan arv och miljö. Dolly och hennes »moder» kommer därför att vara mindre lika varandra än ett par enäggstvillingar som utvecklats i samma livmoder och växt upp under mer lika miljöförhållanden. Dessutom har ett par enäggstvillingar utvecklats från en gemensam befruktad äggcell, medan Dolly och hennes »mor» förvisso har samma nukleära arvs massa, men har utvecklats från helt olika äggceller vilka kan skilja sig åt beträffande bl a innehåll av proteiner, budbärar-RNA, mitokondriellt DNA och organeller.

Originalen och en klonad avkomma kan också uppvisa genetiska skillnader

som beror på somatiska mutationer i den cellkärna som användes för kloning (se nedan). Det är således en missuppfattning att denna teknik kan användas för att framställa exakta kopior av människor. För att undvika missförstånd bör man kalla Dolly för en klon av sin »mamma», inte en kopia.

Dolly har hittills utvecklats normalt

Dolly är idag drygt 6 månader. Enligt de publicerade rapporterna har hon utvecklats normalt, men man vet ännu inte om hon är fertil. En annan intressant fråga är huruvida hennes livslängd kommer att vara normal. Det faktum att hennes arvs massa togs från en somatisk juvercell som redan torde ha genomgått ett stort antal celldelningar kanske innebär att hennes livslängd blir kortare. Detta visar på ett område där försök med klonade djur skulle ge oss ny kunskap om en central biologisk frågeställning.

En annan viktig fråga är om klonade djur kommer att uppvisa en förhöjd frekvens av utvecklingsstörningar/missbildningar, eller en förhöjd frekvens av nya mutationer som uppstått under den somatiska cellens utveckling. Man kan likna den arvs massa som finns i de somatiska cellerna vid en arbetskopiering av det original som finns i köns cellerna och som nedärvs till nästa generation. Vi vet att mutationer uppstår i somatiska celler; dylika förvärvade mutationer är en vanlig orsak till cancer. De somatiska mutationerna nedärvs förstås inte till nästa generation, men det skulle bli fallet om man använder kärnan från en somatisk cell för kloning. Vi förväntar oss att antalet mutationer man kan finna i en somatisk cell är betydligt större än i en köns cell, eftersom den somatiska cellen har genomgått minst tiotals gånger fler celldelningar. Vidare befinner sig de flesta somatiska celler i en mindre skyddad miljö än vad köns cellerna gör.

Kloning kan få stor betydelse för forskning på djur

Det råder inget tvivel om att kloning kan komma att få stor betydelse för forskning både på experimentorganismer och på husdjur, under förutsättning att man kan bemästra tekniken så att det går att ta fram klonade djur till rimliga kostnader. Forskning inom detta område kommer att ge ny kunskap om differentieringsprocessen och dess reglering, om genetisk prägling och dedifferentiering av celler, exempelvis tumör-

Översikt eller medicinsk kommentar?

Många av Läkartidningens läsare följer utvecklingen inom olika områden i internationella specialtidningar och böcker. Om nya rön är av så stor betydelse att stora läkargrupper i Sverige borde informeras om dem kanske en medicinsk kommentar eller kort översikt i Läkartidningen är motiverad.

Redaktionen sätter stort värde på artiklar där flera aktuella arbeten jämförs och sammanfattas så att kliniskt viktiga slutsatser kan dras, likaså på översikter som speglar spännande utveckling inom en specialitet eller ett ämnesområde.

Skriv eller ring gärna innan du skriver en artikel av denna typ!

celler. Som ovan nämnts skulle man också kunna använda tekniken för att öka kunskapen om åldrandets biologi.

På husdjur skulle kloning fylla samma funktion som inavlade linjer av experimentdjur som mus och råtta. Genom att jämföra grupper av genetiskt identiska individer skulle vi med större precision kunna avgöra i vilken utsträckning arv respektive miljö påverkar en viss egenskap.

Denna teknik kan också komma att väsentligt förbättra tillgängliga metoder för att ta fram transgena husdjur. Alla transgena försök som hittills har gjorts på husdjur baseras på mikroinjektionstekniken, där man injicerar arvsanlag direkt in i kärnan på nybefruktade äggceller. Denna procedur är mycket resurskrävande på husdjur, eftersom man måste använda ett ganska stort antal donatorer och recipienter för att få fram en enda transgen avkomma.

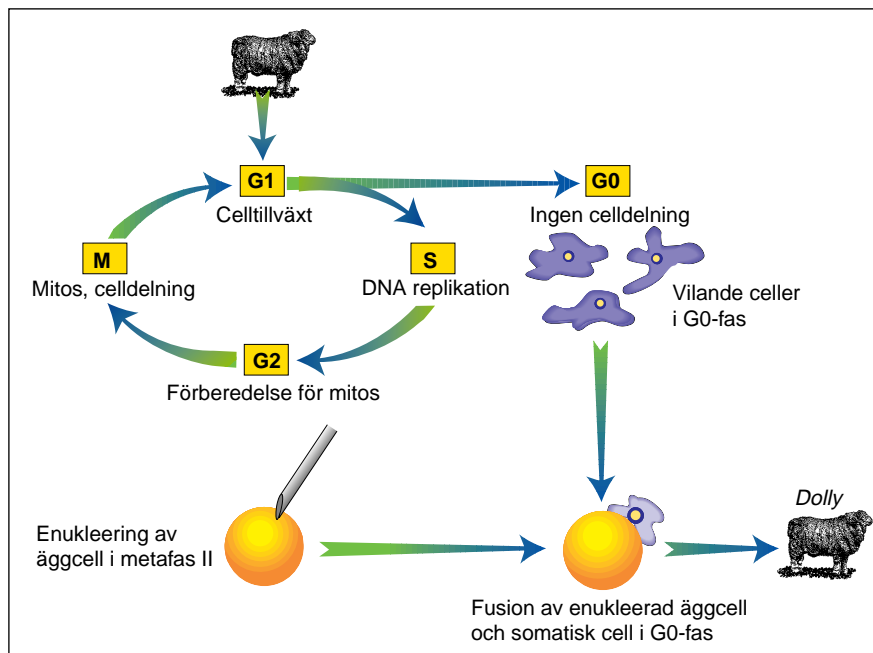
Vidare saknar mikroinjektionstekniken precision, eftersom man inte kan kontrollera var det nya arvsanlaget inkorporeras i arvsmassan. Fördelen med den nu beskrivna tekniken är att man skulle kunna göra genöverföringen medan man odlar de somatiska cellerna före fusionen med en äggcell.

Tekniken borde kunna utvecklas till att bli en motsvarighet till ES-celler på mus som tillåter att man utnyttjar homolog rekombination [5]. Denna teknik gör det möjligt att förändra ett specifikt arvsanlag, och har således en betydligt bättre precision än mikroinjektionstekniken.

Utnyttjande av kloningstekniken för produktion av transgena husdjur kan därför få stor betydelse i framtida försök att producera vissa läkemedel i t ex färmjolk [6] eller för att modifiera grisar för xenotransplantation [7]. I det senare fallet skulle en extra bonus vara möjligheten att uppföröka kloner av transgena grisar vars genetiska bakgrund är särskilt väl lämpad för xenotransplantation.

Kloning kan komma att användas i praktisk husdjursavel

Möjligheten att använda kloning i praktisk husdjursavel är ett scenario som är i högsta grad kontroversiellt. Tanken att man kan ha en besättning av kor som är kloner av en enda individ upplevs som motbjudande. Men detta bör ändå tänkas igenom noga, eftersom kloning skulle kunna få stor betydelse inom praktisk husdjursavel under förutsättning att tekniken kan effektiviseras



Figur 1. Kloningen av Dolly (figuren modifierad efter Colin Stewart i Nature 1997; 385: 769).

så att ett utnyttjande blir ekonomiskt möjligt.

Husdjursavel bedrivs genom att man väljer ut de bästa avelsdjuren på grundval av djurens egenskaper och hur de nedärver egenskaper till sina avkommor (s k avkommeprövning). För varje generation förändras populationen något, och imponerande förbättringar i t ex mjölkavkastning har åstadkommit genom traditionell avel. I varje generation finns det en betydande spridning i djurens produktionsegenskaper. Som exempel kan nämnas att de bästa korna i landet ger mer än 9 000 liter mjölk per år, jämfört med genomsnittskon som ger ca 7 000 liter mjölk. Dessa skillnader beror inte enbart på ärftliga skillnader utan också på miljöfaktorer.

Kloning skulle kunna användas för att föröka individer som bär på särskilt gynnsamma kombinationer av arvsanlag. Egenskaperna behöver ju inte vara produktionsnivån, utan skulle kunna vara produktkvalitetsegenskaper (t ex djur som ger mjölk som är särskilt bra för ostproduktion) eller förbättrad sjukdomsresistens. Man skulle samtidigt kunna ha kontroll över andra egenskaper som t ex kön. En bonde som bedriver mjölkproduktion vill ju helst ha kvigkalvar, som senare kan producera mjölk.

Det är uppenbart att kloning skulle kunna bli intressant inom animalieproduktionen. Kloning i sig är dock inte en uthållig strategi, eftersom populationens genetiska utveckling skulle frysas. Tekniken skulle emellertid kunna användas

i kombination med ett traditionellt avelsarbete för att producera bruksdjur som sedan inte används i avel. På så sätt kan man förhindra att användningen av kloning urholkar den biologiska mångfalden. Om man inte använder de klonade djuren för vidare avel undviker man också risken att introducera nya genetiska defekter som beror på somatiska mutationer.

Varför skulle man avstå?

Vilka skäl finns då för att avstå ifrån eller förbjuda en eventuell tillämpning av kloning på livsmedelsproducerande djur? Ett skäl skulle vara att det utarmar den biologiska mångfalden. Det bör man dock kunna hantera genom att bevara ärftlig variation i avelspopulationen. Det skulle dock bli en minskad genetisk mångfald inom populationen av bruksdjur, och man kan spekulera i att detta skulle kunna gynna spridningen av infektionssjukdomar och parasiter. En eventuell tillämpning av kloning skulle knappast innebära att man använder några få kloner, utan snarare hundratals olika kloner. Den ärftliga mångfalden inom respektive besättning skulle därför inte behöva påverkas drastiskt.

Det kan också finnas veterinärmedicinska skäl för att avstå ifrån kloning om tekniken leder till ökad sjukdom eller lidande hos djuren. Framtida studier får visa huruvida klonade djur kommer att visa upp en förhöjd frekvens av de-

fekter. Ett annat skäl att avstå skulle vara livsmedelshygieniska, om livsmedel från klonade djur skulle visa sig hälsofarliga i något avseende; detta förefaller dock föga sannolikt.

Det starkaste motståndet mot användning av denna teknik torde emellertid vara emotionella och etiska, dvs kloning av husdjur upplevs som ett brott mot naturen. I detta sammanhang är det värt att påpeka att kloning är ganska vanligt inom växtförädling. Det är väl knappast någon som oroar sig för att äta äpplen eller potatis på grund av att dessa förökats genom kloning. Det är dock viktigt att dessa farhågor och känslor tas på största allvar. En självklar utgångspunkt måste vara att man inte skall introducera en ny teknik om den väcker etiskt tvivel och upplevs oacceptabel av många människor.

Tänkbara tillämpningar inom humanmedicinen

Det är troligt, men inte självklart, att den nu beskrivna kloningstekniken skulle kunna användas för fortplantning av människor. Vi anser dock att en sådan tillämpning av både etiska och medicinska skäl är i högsta grad olämplig och bör förbjudas i lag. Det är svårt att tro att vi inom överskådlig framtid kan lära oss att bemästra denna teknik till den grad att vi kan eliminera risken för medfödda defekter och missbildningar.

Det tycks finnas stor enighet runt om i världen om att man inte skall tillåta kloning på människa. Det är förstås ingen garanti för att tekniken inte kommer att missbrukas någonstans. Det är dock svårt att se att ett sådant missbruk skulle utgöra något större hot mot mänskligheten. Det skräckscenario som valsat runt i pressen – att en galen diktator bestämmer sig för att använda kloning för att ta fram många kopior av sig själv eller för att bygga upp en armé av elitsoldater – låter skrämmande, men är föga realistiskt. En människas personlighet bestäms av samspelet mellan arv och miljö.

Diktatorklonerna kommer aldrig att bli identiska kopior av originalet, eftersom de kommer att påverkas av en annan uppväxtmiljö. Vidare bör man betänka att det kommer att ta 20 år innan de klonade individerna uppnått vuxen ålder. Det är uppenbart att galna diktatorer och totalitära regimer har betydligt enklare och effektivare metoder för att utöva makt och förtryck.

Ett mer realistiskt och därför mer skrämmande scenario är att vi skulle

tillåta användningen av kloning på människa, och att detta skulle leda till en handel med celler från särskilt begåvade personer som idrottsstjärnor, musiker eller Nobelpristagare. Tanken är högst motbjudande, och denna tillämpning skulle vara i konflikt med principen om alla människors lika värde.

Kloning och omprogrammering av somatiska celler

Kloningen av Dolly visar att det åtminstone i vissa fall är möjligt att omprogrammera cellkärnan från somatiska celler. Detta öppnar hisnande perspektiv inom humanmedicinen, eftersom det kan bli möjligt att ersätta celltyper som vid vissa sjukdomar saknas eller är skadade. En tänkbar tillämpning skulle kunna vara vid behandling av leukemier. Leukemi kan man bota genom att först eliminera tumörceller och friska stamceller genom en kraftig strålningdos eller genom cytostatikabehandling. Därefter transplanterar man benmärg från en individ, oftast ett syskon, som är kompatibel med mottagaren för transplantationsantigenerna. Tyvärr finns det inte alltid en lämplig donator. Det kan bli möjligt att lösa detta problem genom att från patienten själva ta och omprogrammera somatiska celler, som sedan återinförs.

En liknande strategi skulle kunna bli möjlig för att bota ungdomsdiabetes. Dessa patienter har förlorat de insulinproducerande öcellerna i bukspottkörteln. Återigen skulle man utveckla teknik för att från patienten själva ta fram nya öceller från andra somatiska celler. Det kanske blir möjligt att starta differentieringsprocesser av icke regenererande celltyper i hjärna, ryggmärg och hjärtmuskel, något som skulle innebära en ny väg för behandling av hjärnskada, ryggmärgsskador, neurodegenerativa sjukdomar och hjärtsjukdomar.

Det kommer att krävas mycket omfattande och intressant forskning innan dessa tillämpningar blir verklighet, men det vore oetiskt om ett förbud mot användning av kloning för reproduktion skulle stoppa även denna viktiga forskning.

Referenser

1. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-3.
2. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
3. Gurdon JB. Transplanted nuclei and cell

differentiation. *Sci Am* 1968; 219: 24-35.

4. Pennisi E, Williams N. Will Dolly send in the clones? *Science* 1997; 275: 1415-6.
5. Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to nonselectable genes. *Nature* 1988; 336: 348-52.
6. Logan JS. Transgenic animals: beyond »funny milk«. *Current Opinion i Biotechnology* 1993; 4: 591-5.
7. White DJG, Yannoutsos N. Production of pigs transgenic for human DAF to overcome complement-mediated hyperacute xenograft rejection in man. *Res Immunol* 1996; 147: 88-94.