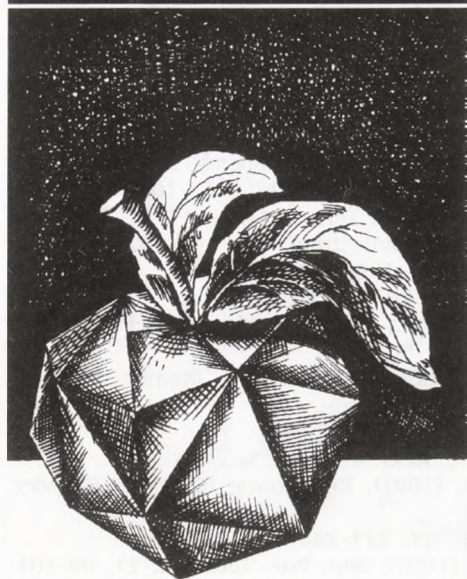


Owieczka Dolly — wielki sukces czy wielki bluff?



Pod koniec lutego 1997 r. świat obiegnęła sensacyjna wiadomość o narodzinach owieczki Dolly. Grupa naukowców ze szkockiego Instytutu Roslin pod kierownictwem Iana Wilmuta sklonowała owieczkę rasy Finn Dorset z komórki somatycznej dorosłej owcy.

Każda komórka, jak wiadomo, zawiera pełen zestaw genów potrzebnych do rozwoju danego osobnika. Jednak komórki zróżnicowane (a do takich należą dorosłe komórki) wykorzystują tylko niewielką część genów, konieczną do wykonywania ich specyficznej funkcji, reszta natomiast jest wyłączona i komórka jak gdyby o nich zapomina.

Z gruczołu mlecznego 6-letniej owcy rasy Finn Dorset pobrano komórki, które następnie głodzono. W wyniku tego procesu uległy one przeprogramowaniu i stały się znowu totipotencjalne (jakby przypomniały sobie swoje możliwości). Od drugiej owcy (tym ra-

zem rasy Scottish Blackface) pobrano oocyty, z których następnie usunięto jądra komórkowe. Kolejnym etapem eksperymentu była fuzja jąder „z odzyskaną pamięcią” z oocytami pozbawionymi jąder, jednakże zawierającymi „własne” inne organelle, przede wszystkim mitochondria. Pod wpływem odpowiedniej pożywki te sztucznie skomponowane zygoty rozpoczęły swój rozwój. Po 8 dniach hodowli zarodki implantowano do macic zastępczych matek (również rasy Scottish Blackface). Jeden z tych zarodków dał początek Dolly, która urodziła się w lipcu 1996 r. Do tej pory uważano, że różnicowanie komórek jest procesem nieodwracalnym, w związku z tym eksperyment ten uznano niemalże za epokowe wydarzenie w dziedzinie biologii (10,11).

Ostatnio jednak sukces Wilmuta spotyka się z coraz większą krytyką. Prawdziwą burzę wokół Dolly wywołał list do „Science” (9) napisany przez dwóch naukowców: Nortona Zindera z Rockefeller University i Vittorio Sgarrella z University of Calabria, którzy uznali Dolly za „aneddotę”, a nie rezultat. Postawili oni Wilmutowi szereg zarzutów. Oto niektóre z nich:

1. Osiągnięto tylko jeden sukces na 277 prób klonowania, mogła zatem nastąpić jakaś pomyłka, np. zamiana kultur komórkowych.

2. Charakterystyka komórek gruczołu mlecznego, które były donorami jądra, była bardzo słaba, niewykluczone zatem, że Dolly nie powstała z dorosłej komórki, lecz z komórki embrionalnej, która mogła się przedostać do organizmu matki. W czasie pobierania komórek do eksperymentu owca, będąca dawcą jąder, była bowiem w ciąży. Poza tym owce posiadają pewną specyficzną cechę — mianowicie w ich gruczołach mlecznych istnieją komórki, które choć dorosłe, są niezróżnicowane (czyli jak gdyby embrionalne).

3. Nie wyjawiono także powodu, dla którego komórki mające dostarczyć materiał genetyczny zostały pobrane od ciężarnej owcy.

4. Nie dokonano analizy genotypów płodu — przyszłej Dolly i „matki” (dawcy jądra). Badanie to mogłoby wykluczyć zarzut, że Dolly powstała z komórki embrionalnej, a nie ze zróżnicowanej komórki somatycznej.

5. Nie została także przeprowadzona analiza DNA mitochondrialnego Dolly, która mogłaby dostarczyć ważnych wskazówek na temat jej pochodzenia.

6. Natomiast stwierdzenie, że można „na oko” odróżnić rasę Finn Dorset od Scottish Blackface nie jest wystarczającym dowodem na to, że Dolly jest klonem powstałym z komórki somatycznej.

Z zarzutami tymi zgadzają się także inni naukowcy: m.in. Richard Gardner z University of Oxford i laureat Nagrody Nobla — Walter Gilbert z Harvard University (1).

Najważniejszym jednak zarzutem jest to, że jak dotąd nikomu nie udało się powtórzyć eksperymentu Wilmuta. Co prawda, Angelika Schnieke z PPL Therapeutics i jej koledzy sklonowali sześć jagniąt stosując metodę transferu jądra — technikę zastosowaną do wygenerowania Dolly. Jednej z tych młodych owiec — imieniem Polly — dodatkowo stransformowano materiał genetyczny. Wszczepiono jej gen ludzkiego faktora IX — produkującego białko krzepliwości krwi, którego brak u ludzi chorych na hemofilię B. Znów wielkie osiągnięcie inżynierii genetycznej. Jednak do „produkcji” Polly i jej sióstr Schnieke użyła fibroblastów płodu jako dawców jąder, a nie zróżnicowanych,

dorosłych komórek. W związku z tym Polly to nie Dolly (4,5,8). Ron James z PPL Therapeutics natomiast doniósł o narodzinach pierwszego cielaka nazwanego Mr. Jefferson, który był „wyprodukowany” tą samą techniką co Dolly i Polly. Jakkolwiek Mr. Jefferson nie jest zwierzęciem transgenicznym (jądro nie było genetycznie zmieniane przed wprowadzeniem go do oocyty) jest jednak pierwowzorem krów mających produkować w swoim mleku ludzką albuminę surowicy krwi (3). W połowie stycznia natomiast w Texas Transgenic Nuclear Transfer Calves urodziły się dwa zdrowe cielęta — Charles i George. Aby je wykreować, James Robl i Steven Stice hodowali bydłecę fibroblasty płodu, które następnie transformowali markerowym genem oporności na antybiotyki. Do fuzji użyli tylko jąder tych komórek, które przetrwały ekspozycję na szkodliwy antybiotyk. 40% „skonstruowanych” embriónów kontynuowało rozwój wewnątrz matek zastępczych. Dwa z nich „przekształciły się” w Charlesa i Georga. Są to pierwsze sklonowane cielaki niosące obcy gen i to jest wspaniałe! Nie są one jednak wynikiem eksperymentu będącego repliką „stworzenia” Dolly (6,7). Czyżby rzeczywiście eksperyment ten był niepowtarzalny? Dopiero w marcu br. Jean-Paul Renard z National Agricultural Research Agency Center koło Paryża ogłosił, że udało mu się w pełni powtórzyć sukces Iana Wilmuta. W jego laboratorium przyszła na świat Marguerite — ciele sklonowane z komórki mięśniowej 60-dniowego płodu. W drodze są cztery następne (zaawansowane ciąży), w tym jedno „powstałe” z komórek skóry dwutygodniowego cielaka (który jak podkreśla Renard, z pewnością nie był w ciąży w czasie pobierania komórek do eksperymentu). Francuscy naukowcy bardzo dokładnie scharakteryzowali komórki będące donorami jąder. Użyli oni jako markera przeciwciała:

- przeciw vimentynie występującej tylko w fibroblastach,
- przeciw cytokeratynie 3/18 występującej tylko w komórkach epitelialnych,
- przeciw blaszce typu A/C obecnej tylko w jądrach zróżnicowanych komórek (nie ma jej natomiast w komórkach embrionalnych).

Renard wyklucza zatem jakkolwiek możliwość użycia komórek embrionalnych do sklonowania cielaka mającego wkrótce przyjść na świat. W jego mniemaniu eksperyment ten w pełni potwierdził zdolność klonowania zwierząt z dorosłych, somatycznych komórek. Według Renarda możliwość przeprogramowania już zróżnicowanych komórek somatycznych, aby stały się znów totipotencjalne, jest fenomenem niezależnym od gatunku organizmu (2).

Może jednak nie należy chwalić dnia przed zachodem słońca? Skąd pewność, że ciele pochodzące z komórek skóry w ogóle przyjdzie na świat?

Ian Wilmut próbuje odpierać postawione mu zarzuty. Utrzymuje, że pomyłka w kulturach komórkowych jest mało prawdopodobna, gdyż w czasie prowadzenia eksperymentu w laboratorium była tylko jedna owca rasy Finn Dorset, a tej rasy jest także Dolly. Poza tym uważa za wysoce nieprawdopodobne, że Dolly mogła powstać z komórki płodowej, wzięwszy pod uwagę, że łożysko zawiera wiele tkanek odseparowujących płód od krwi matki. Deklaruje jednak, że zamierza powtórzyć eksperyment. Z kolei James Ron, który sponsorował prace Wilmuta, przyznaje, że należało lepiej scharaktery-

zować materiał użyty do eksperymentu. Dodaje jednocześnie, że nie zrobiono tego, ponieważ nie spodziewano się, że eksperyment ten zakończy się takim sukcesem (1,9). Natomiast David Wells z Ruakara Agriculture Research Centre w Nowej Zelandii, który próbował powtarzać doświadczenie Wilmuta, uważa, że zarzuty Zindera i Sgaramella są przedwczesne. Stwierdza: „To nie fair oczekiwać szybkiego powtórzenia i potwierdzenia rezultatów Wilmuta biorąc pod uwagę czas i pieniądze potrzebne na takie eksperymenty oraz długi okres ciąży zwierząt hodowlanych i sezonowość ich rozrodu”. Jest przekonany, że prędzej czy później komuś się powiedzie i jest to tylko kwestia czasu (1).

Jednak jedyną wiarygodną odpowiedzią na większość wątpliwości byłaby bezpośrednia analiza porównawcza DNA Dolly i owcy, która była dawcą jądra. Niestety, owca ta zakończyła swój żywot trzy lata przed narodzeniem Dolly (komórki przechowywano w ciekłym azocie). Analiza jest zatem niemożliwa. Co prawda Wilmut twierdzi, że dysponuje zamrożonymi komórkami pochodzącymi od „matki” Dolly i zamierza zlecić taką analizę.

Czy Dolly rzeczywiście jest klonem powstałym ze zróżnicowanej (dorosłej) komórki somatycznej, czy też kompletnym niewypałem? Na to pytanie z pewnością znajdziemy odpowiedź w najbliższej przyszłości. Jak na razie pod koniec kwietnia br. pojawiła się kolejna „sensacyjna” wiadomość. Nasza bohaterka doczekała się potomstwa (tym razem już nie klonu). Wiadomość ta jednak nie wstrząsnęła tak światem, jak narodziny sławnej mamy.

Joanna Smól

Literatura:

1. Butler D., (1998), *Nature*, 391, 825-826.
2. Butler D., (1998), *Nature*, 392, 113.
3. Fox S., (1998), *Genetic Engineering News*, 18 (7), 22, 43.
4. Mitchell A., (1998), *Nature*, 391, 21.
5. Pennisi E., (1997), *Science*, 278, 2038-2039.
6. Pennisi E., (1998), *Science*, 279, 646-648.
7. Robl J., Stice S., (1998), *Genetic Engineering News*, 18 (3),
8. Schnieke A. E. i wsp., (1997), *Science*, 278, 2130-2133.
9. Sgaramella V., Zinder N. D., (1998), *Science*, 279, 635-636.
10. Wilmut I. i wsp., *Nature*, 385, 810-813.
11. Modliński J. A., Karasiewicz J., (1998), *Biotechnologia*, 2(41), 86-100.

Notatka aktualizująca, dodana w trakcie druku tego numeru:

Na podstawie analizy satelitarnych DNA (informacje opublikowane w czerwcu i lipcu br.) stwierdzono, że Dolly jest faktycznie klonem. [Por. Solter D., (1998), *Nature*, 394, 315-316 oraz Ashwort A., et al., (1998), *Nature*, 394, 329].