


Πανεπιστήμιο Αθηνών - Τμήμα Βιολογίας
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Αναπλ. Καθηγητής
Σταύρος Λ. Κουσουλάκος



Ο όρος «κλωνοποίηση» έγινε εκτεταμένα γνωστός το 1997, όταν δημοσιεύθηκε από τον Ian Wilmut η «γέννηση» ενός προβάτου (Dolly) από σύντηξη αποπυρηνωμένου ωαρίου προβάτου με ένα σωματικό κύτταρο (μαστού) ενήλικου (θηλυκού, έγκυου) προβάτου. Στο ευρύ κοινό η έννοια της κλωνοποίησης συνδυάστηκε τότε με την ταχύτατη δημιουργία ομοίων αντιτύπων κάποιου ανθρώπου,συνήθως πολύ κακού ανθρώπου!!!!].



Η Dolly φαίνεται να ήταν ένα φυσιολογικό πρόβατο, αφού γέννησε (με φυσιολογική μέθοδο) ένα κανονικό άτομο (Bonnie)

Σήμερα, ως «κλωνοποίηση»
χαρακτηρίζουμε την

τεχνητή δημιουργία πιστών γενετικών
αντιτύπων

τμημάτων DNA,
γονιδίων,
κυττάρων,
οργάνων και
οργανισμών.

Αυτά τα πιστά γενετικά αντίτυπα ονομάζονται «κλώνοι»

- Σήμερα, την κλωνοποίηση τη διακρίνουμε σε

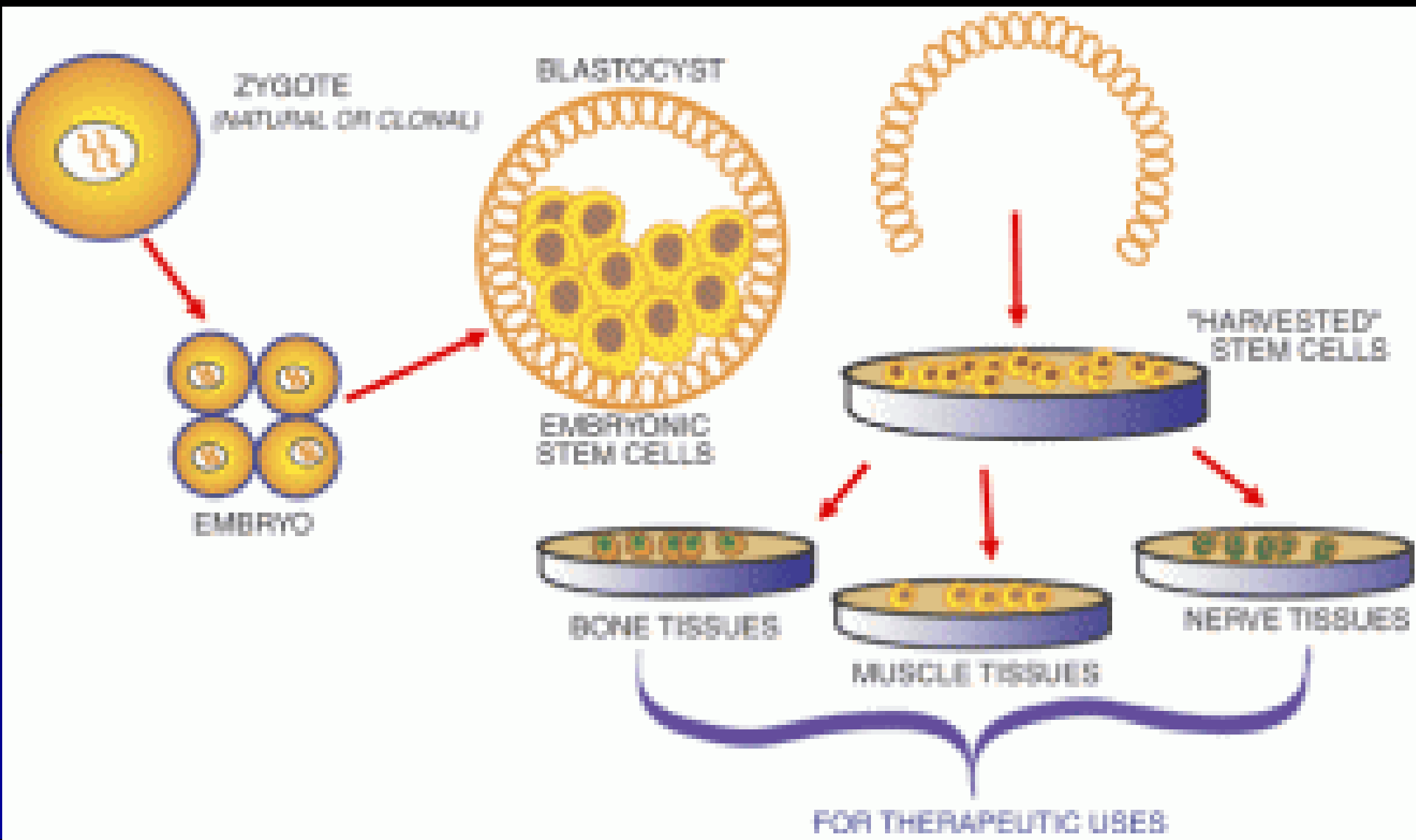
- Αναπαραγωγική

- (Στην πραγματικότητα, εδώ δεν έχουμε απόλυτη γενετική ταύτιση διότι το σωματικό κύτταρο-δότης ίσως φέρει κάποιες μεταλλάξεις).
- - (Θεωρείται από πολλούς ηθικά ανυπόφορη)
- - (Αμφισβητείται η σημασία της για αναπαραγωγή απειλούμενων ειδών).
- - (Σχεδόν θεωρείται αδύνατη η «αναπαραγωγή» εξαφανισμένων ειδών).

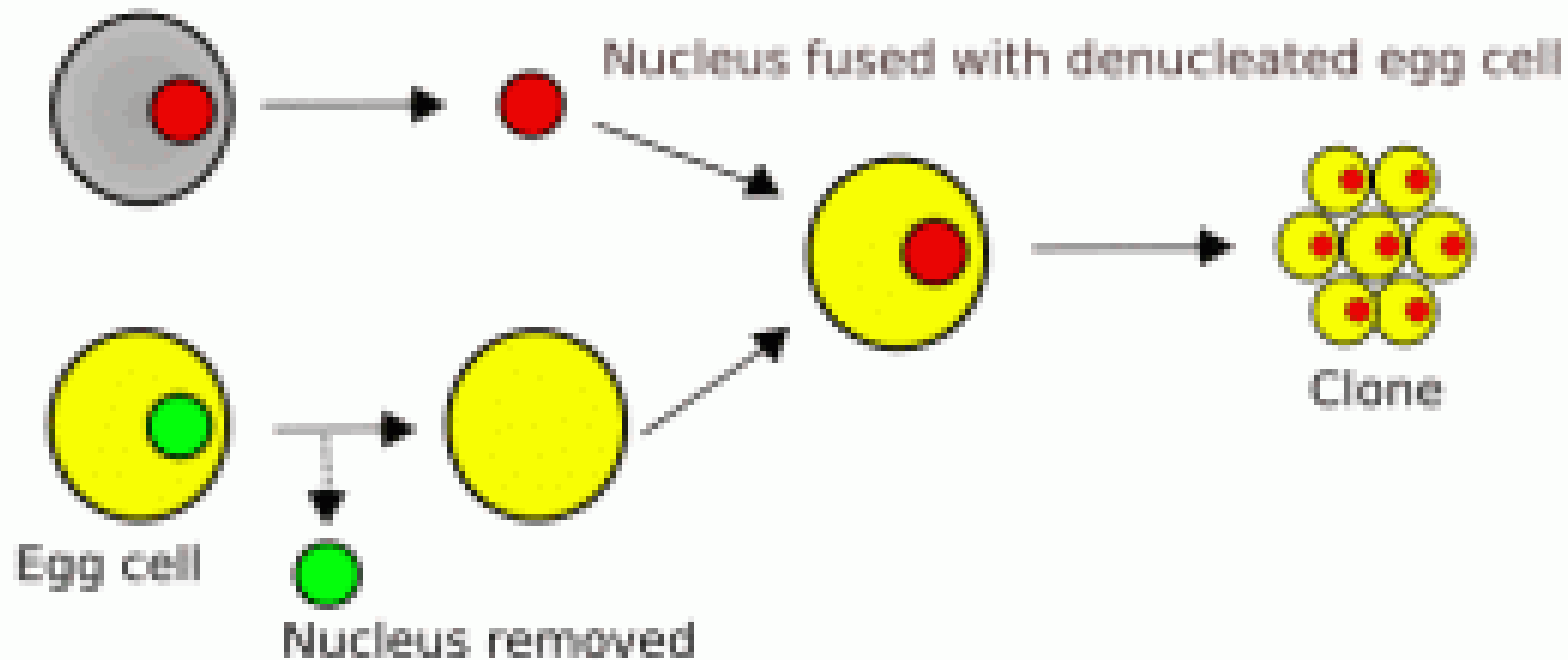
- Θεραπευτική

- (π.χ., εισαγωγή γονιδίων σε βακτήρια προς παραγωγή ινσουλίνης, ενεργοποιητή πλασμινογόνου, ιντερφερόνης), (κύτταρα-κλώνοι προς έλεγχο νέων φαρμάκων), (βλαστοκύτταρα), (μεταμόσχευση οργάνων)

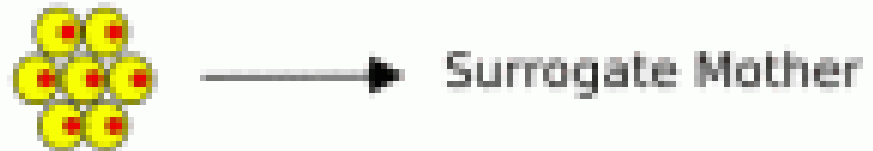
Θεραπευτική κλωνοποίηση: Βλαστοκύτταρα κλωνοποιούνται, πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται στοχευμένα, και χρησιμοποιούνται



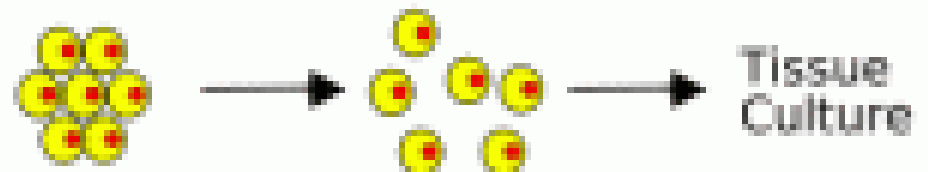
Somatic body cell with desired genes



REPRODUCTIVE CLONING



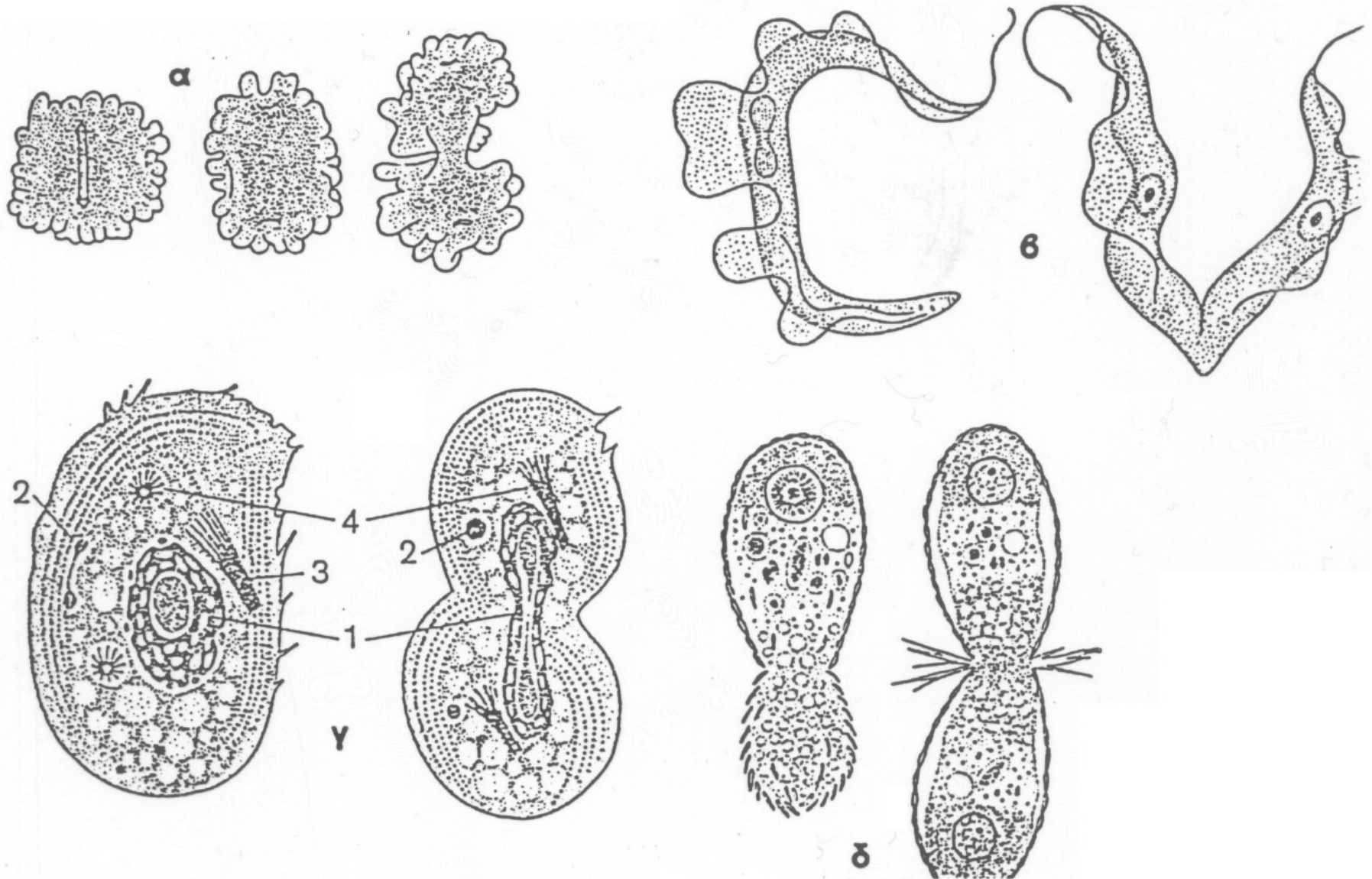
THERAPUTIC CLONING



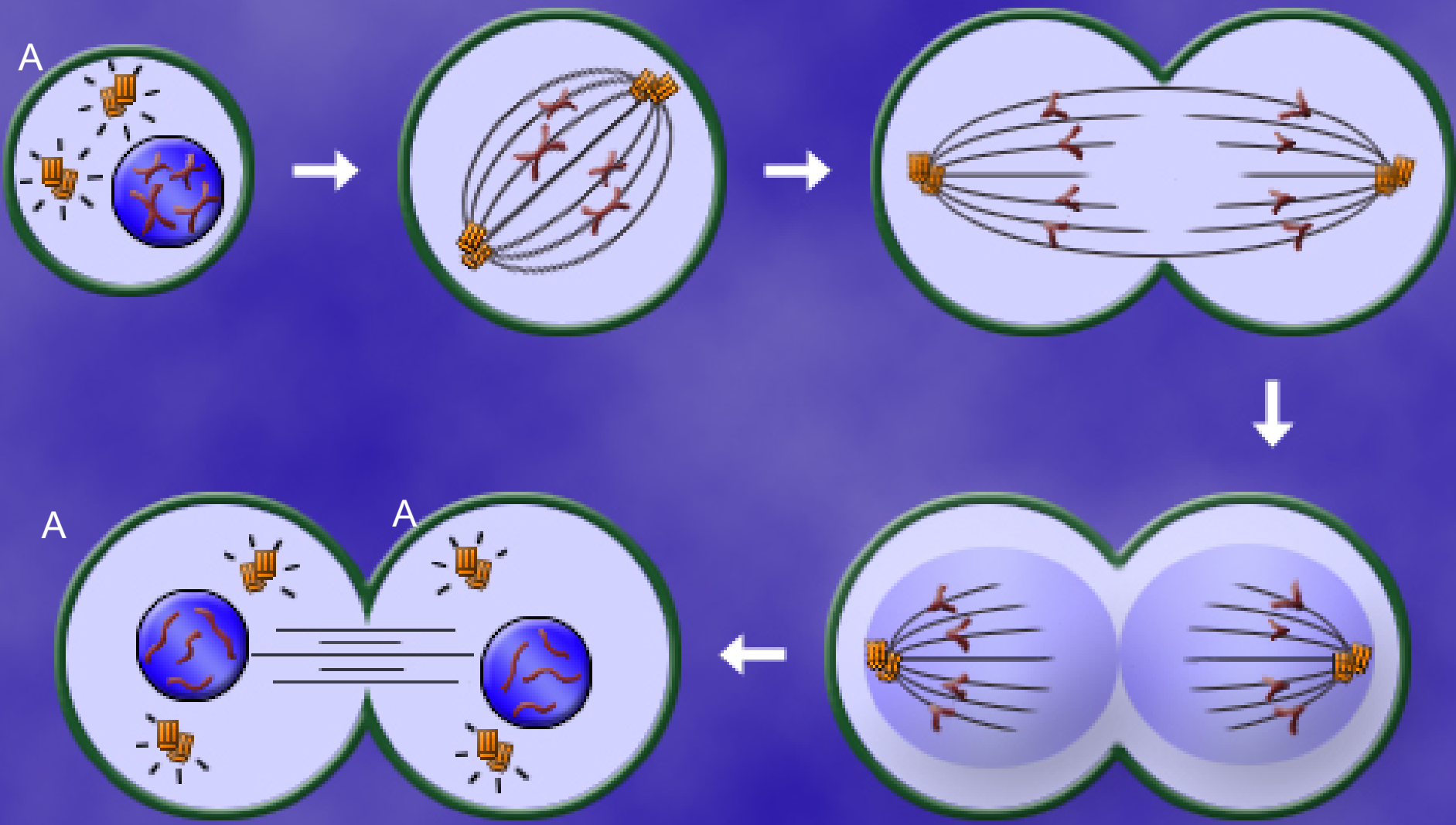
Η αυθόρμητη δημιουργία «κλώνων» από φυτά είναι γνωστή στον άνθρωπο εδώ και εκατοντάδες χρόνια



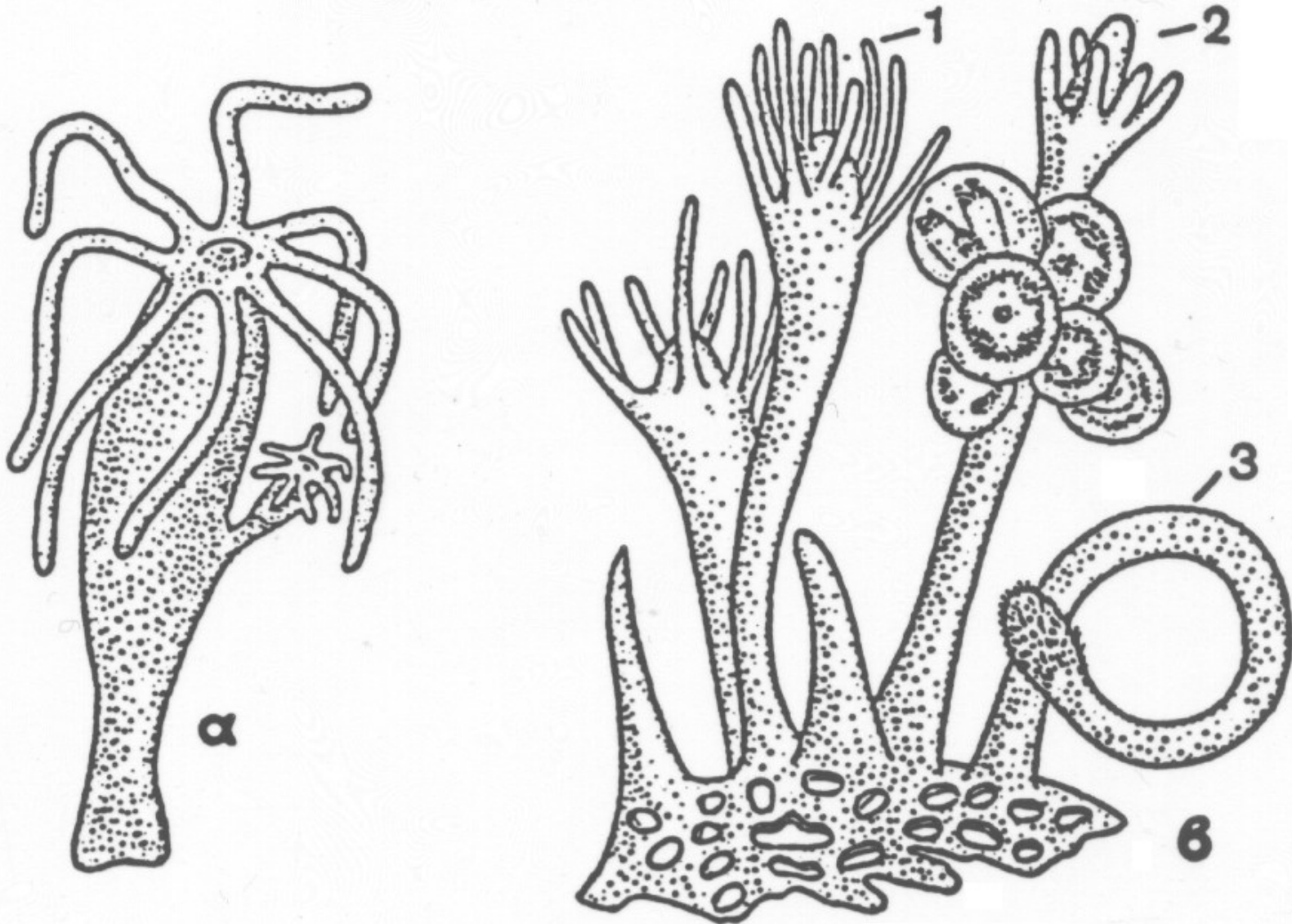
Στη φύση η δημιουργία πιστών γενετικών αντιτύπων είναι λίαν διαδεδομένη. Π.χ., η μιτωτική διαίρεση και η μονογονική αναπαραγωγή αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα φυσικής κλωνοποίησης



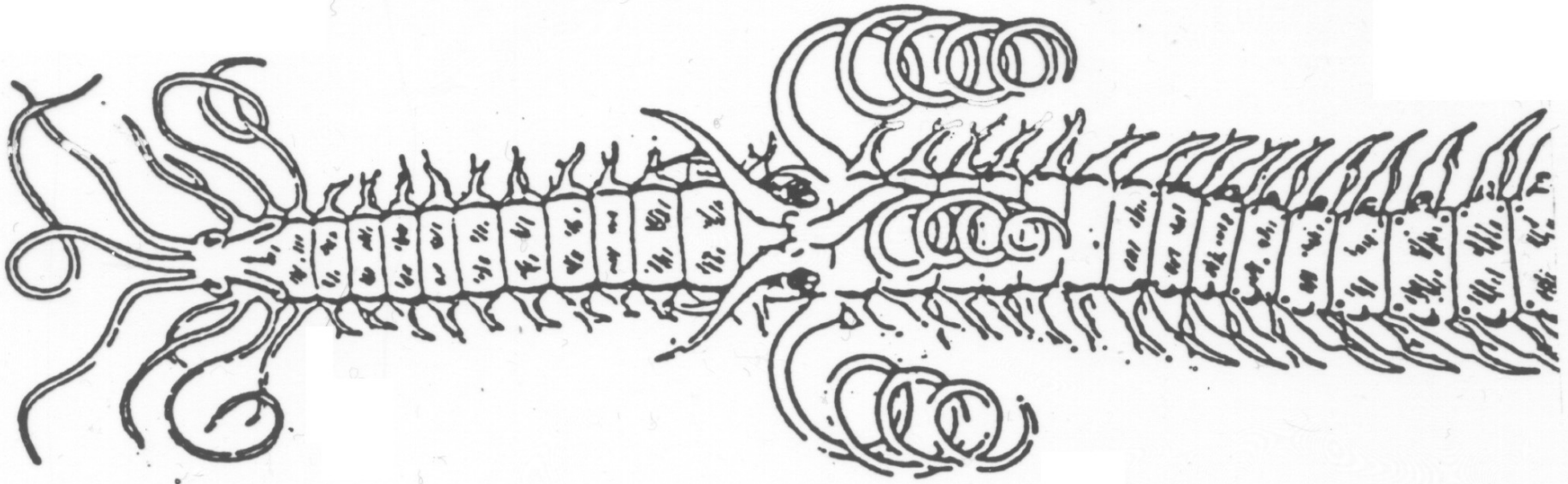
Από ένα «πατρικό» κύτταρο (A) παίρνουμε με μίτωση 2 πανομοιότυπα (κλώνους)



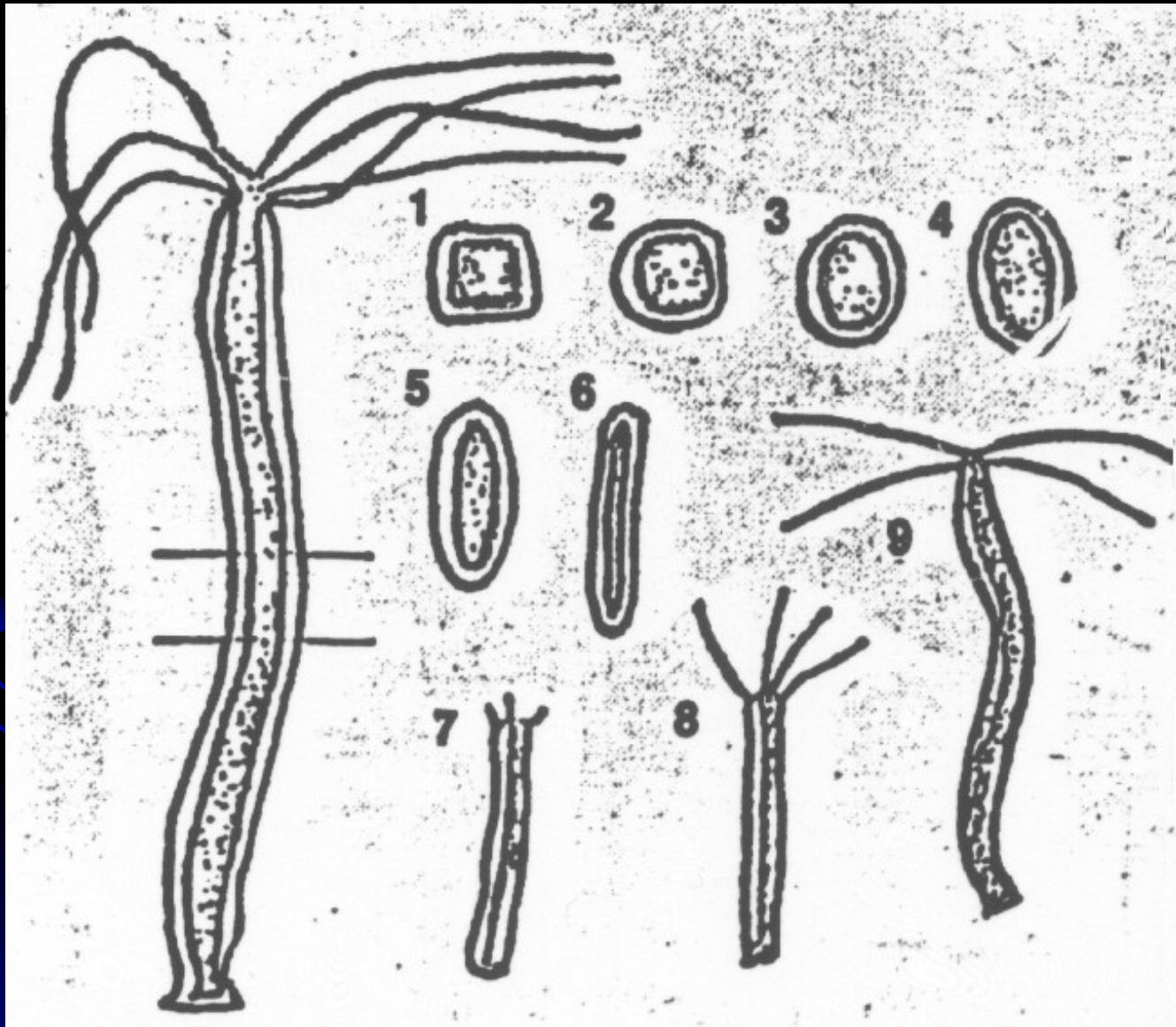
Πάρα πολλοί οργανισμοί (στο παράδειγμα η Hydra) δημιουργούν με εκβλάστηση κλώνους (οι οποίοι μπορεί να μην μοιάζουν εξωτερικά!)



Ορισμένοι πολύχαιτοι δακτυλιοσκήλες δίδουν κλώνους με μορφήλαξη και παρατομία



Η αναγέννηση οργανισμών (εδώ η Hydra) είναι μια κλασική περίπτωση κλωνοποίησης



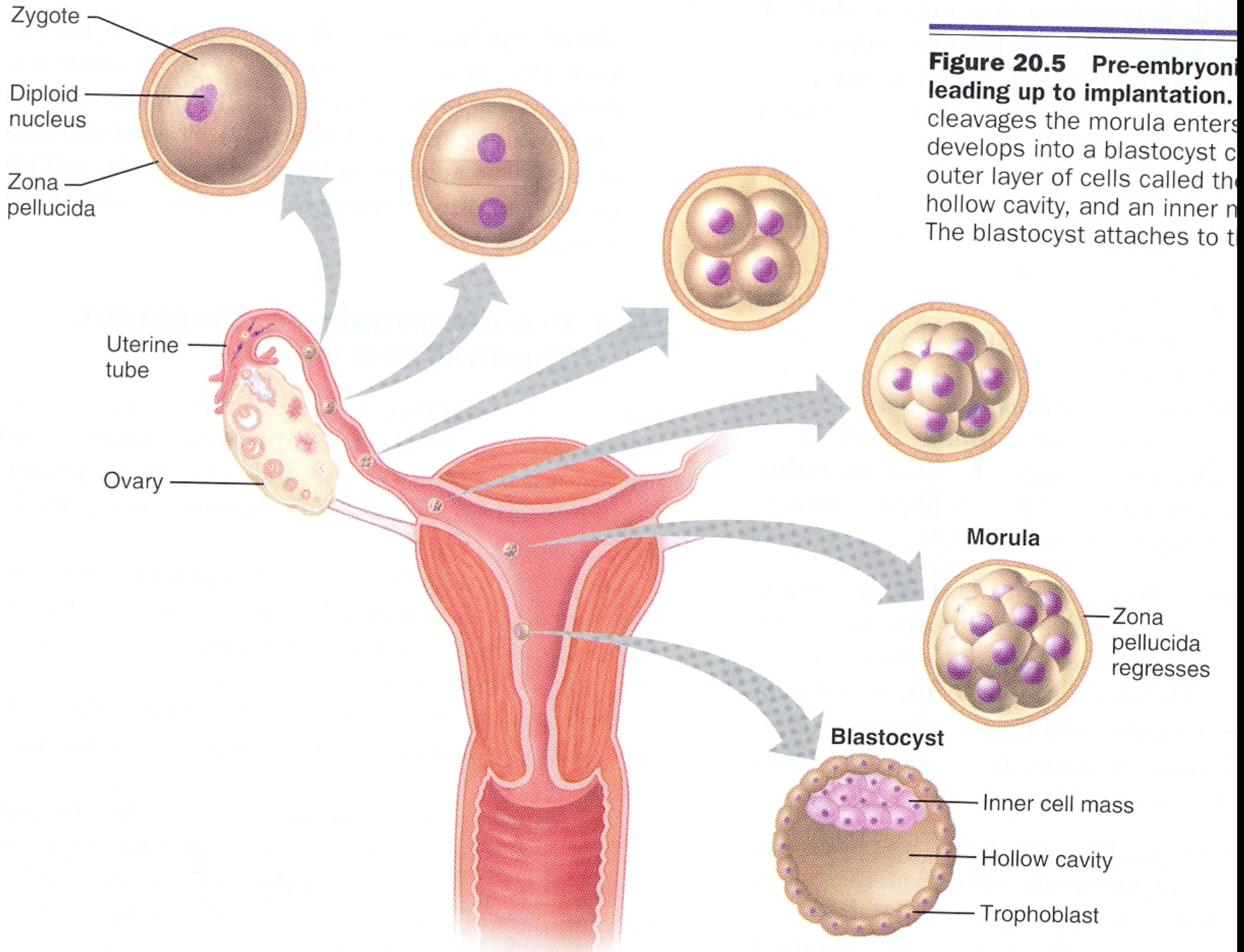
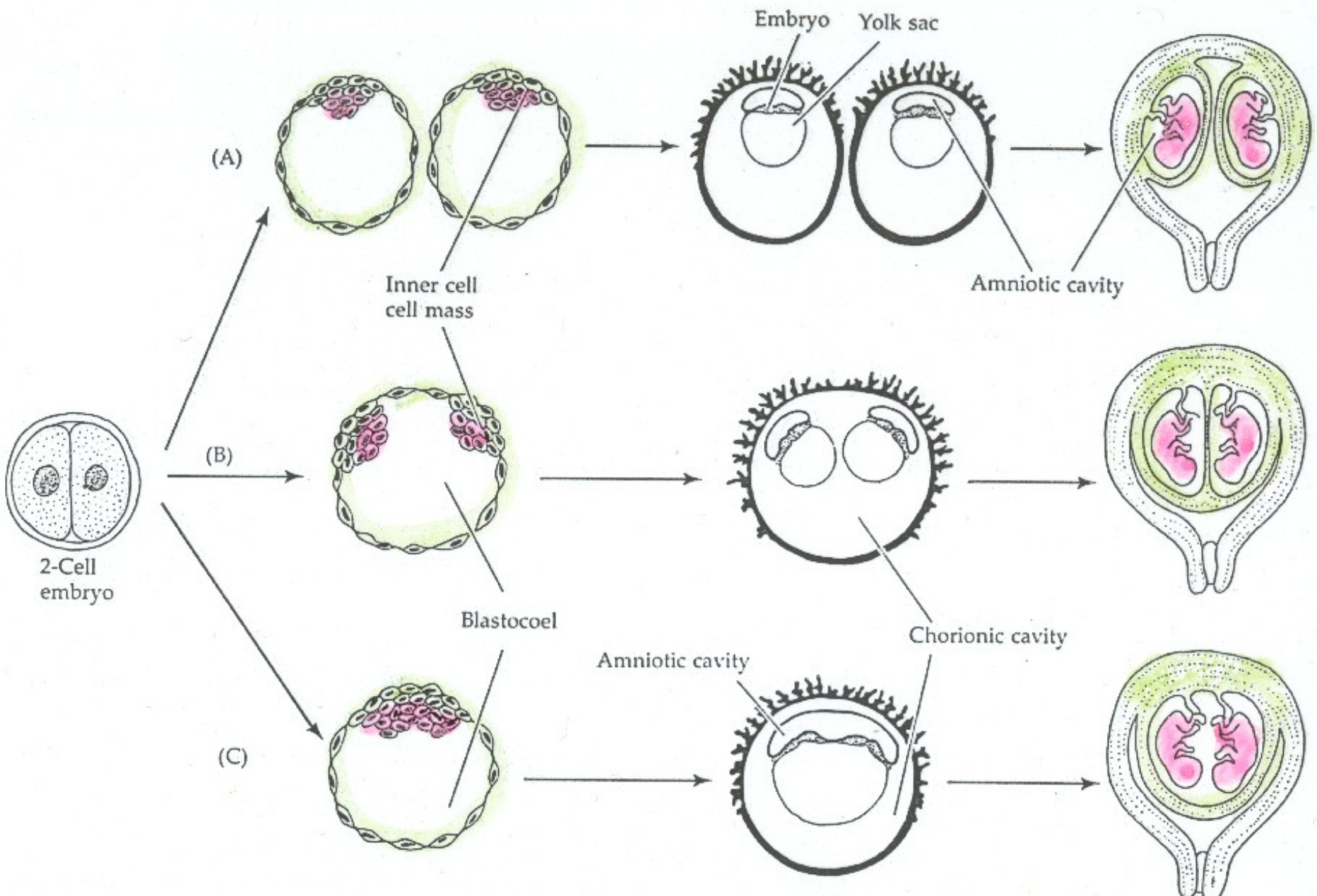


Figure 20.5 Pre-embryonic development leading up to implantation.

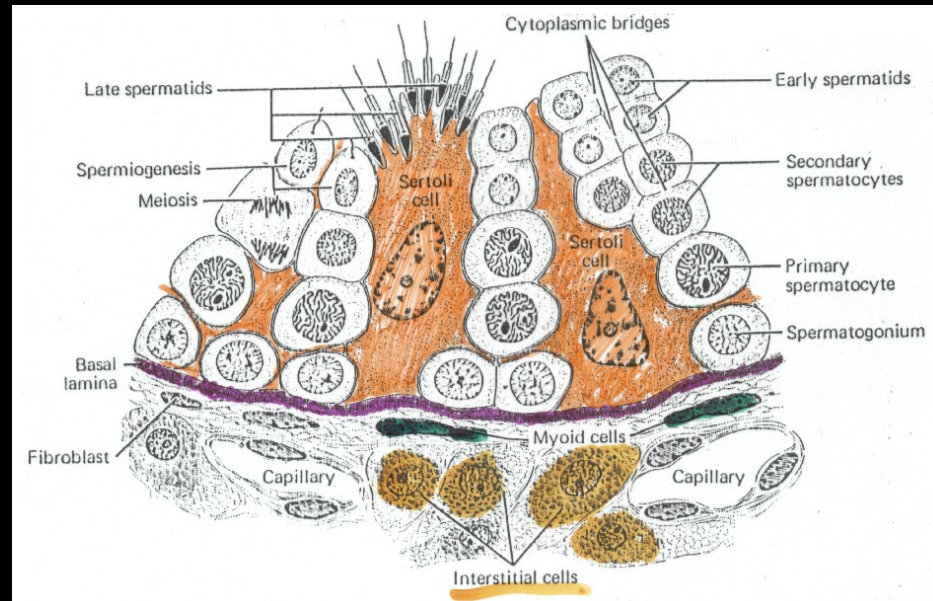
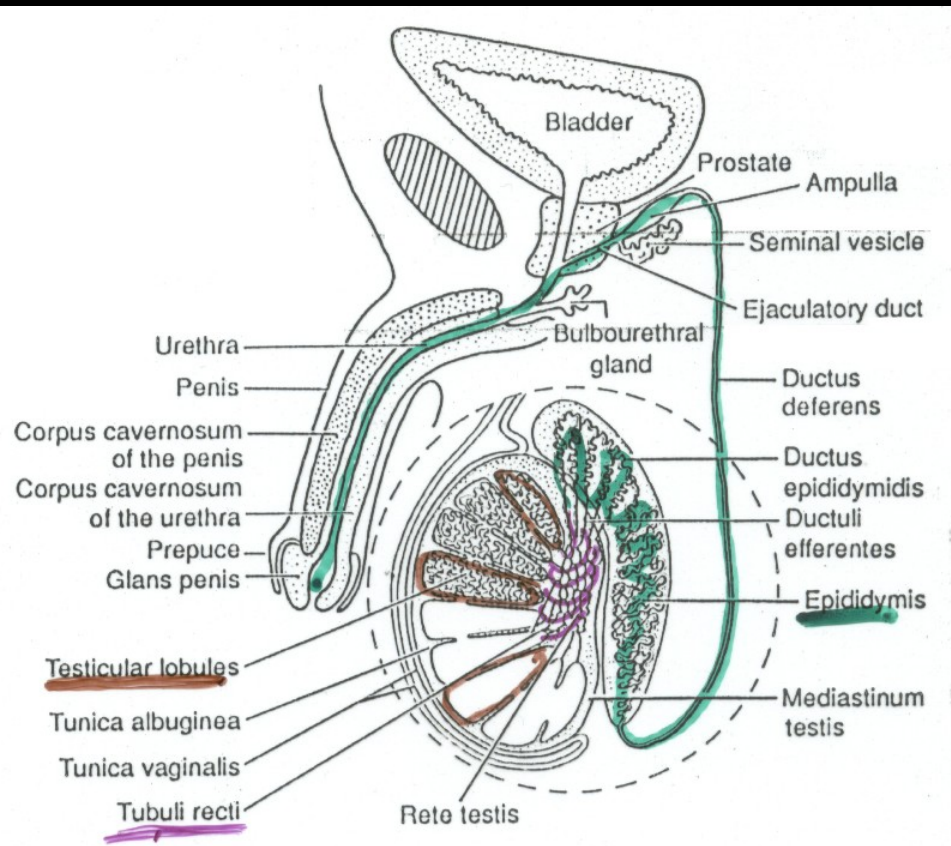
cleavages the morula enters the uterus and develops into a blastocyst consisting of an outer layer of cells called the trophoblast and a hollow cavity, and an inner cell mass. The blastocyst attaches to the uterine wall.

«Αυθόρμητη» κλωνοποίηση παρατηρείται και στα μονοζυγωτικά δίδυμα του ανθρώπου. [Σε αρκετές περιπτώσεις τα μονοζυγωτικά



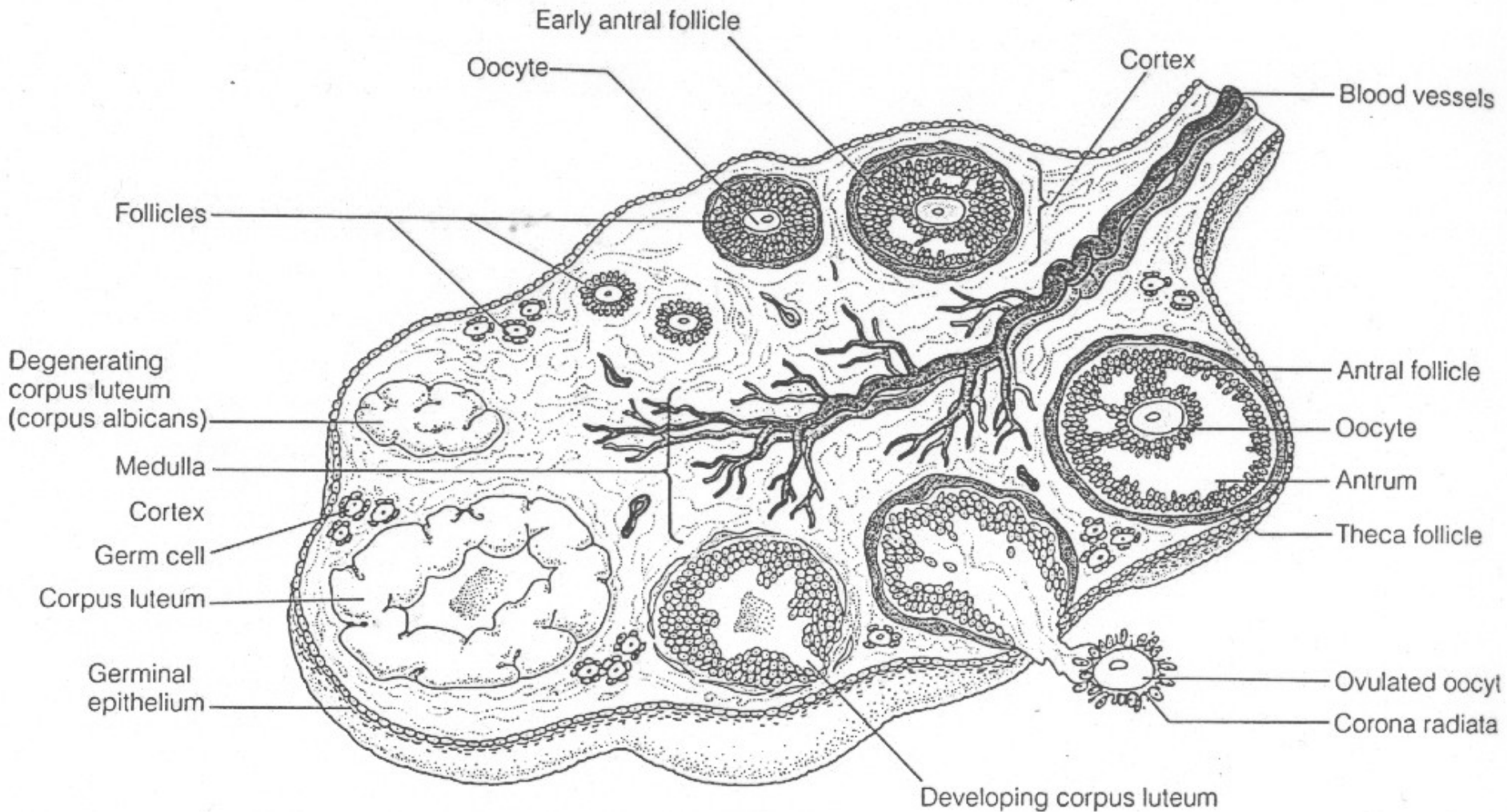
Η σπερματογένεση είναι κλωνοποίηση;;;;;

Όχι, αλλά γιατί;



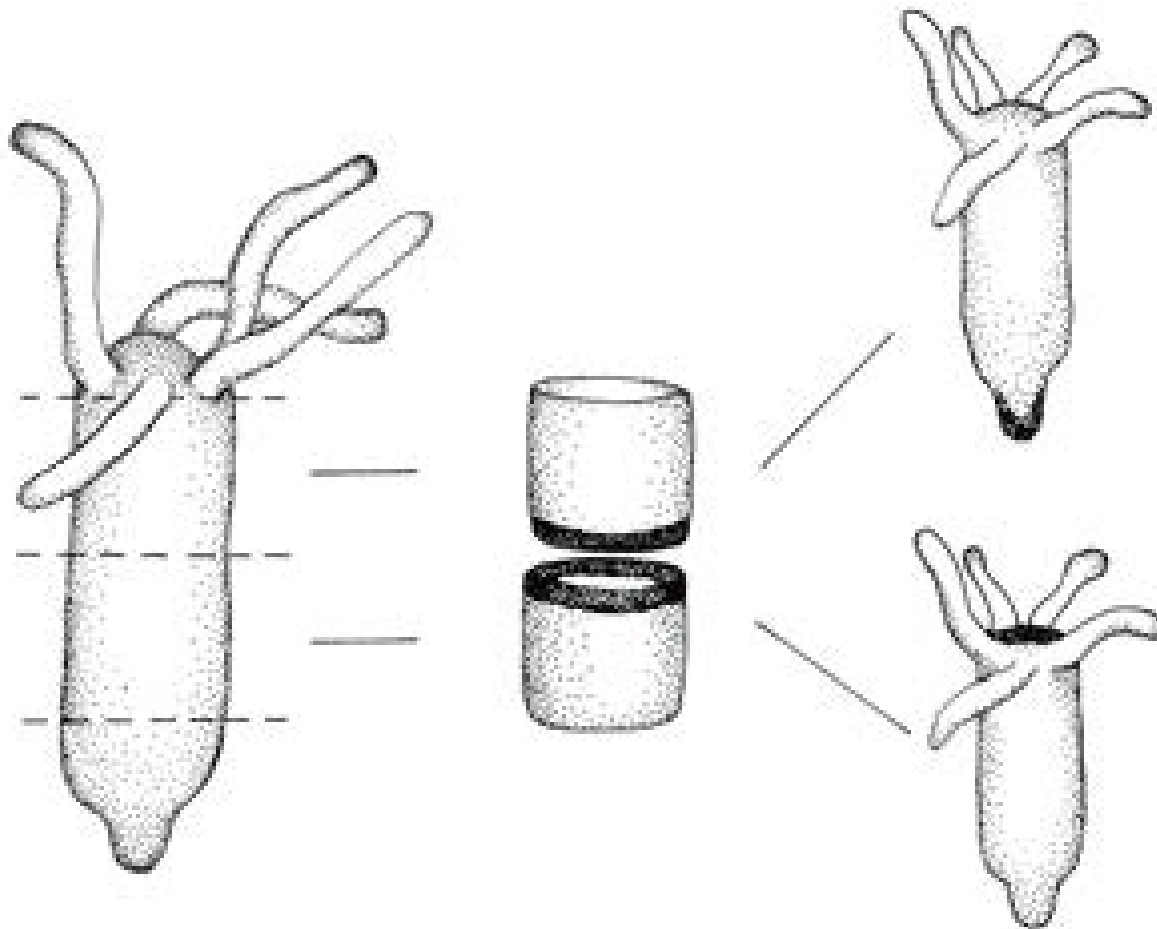
Η ωογένεση είναι κλωνοποίηση;;;;;;

Όχι, αλλά γιατί;



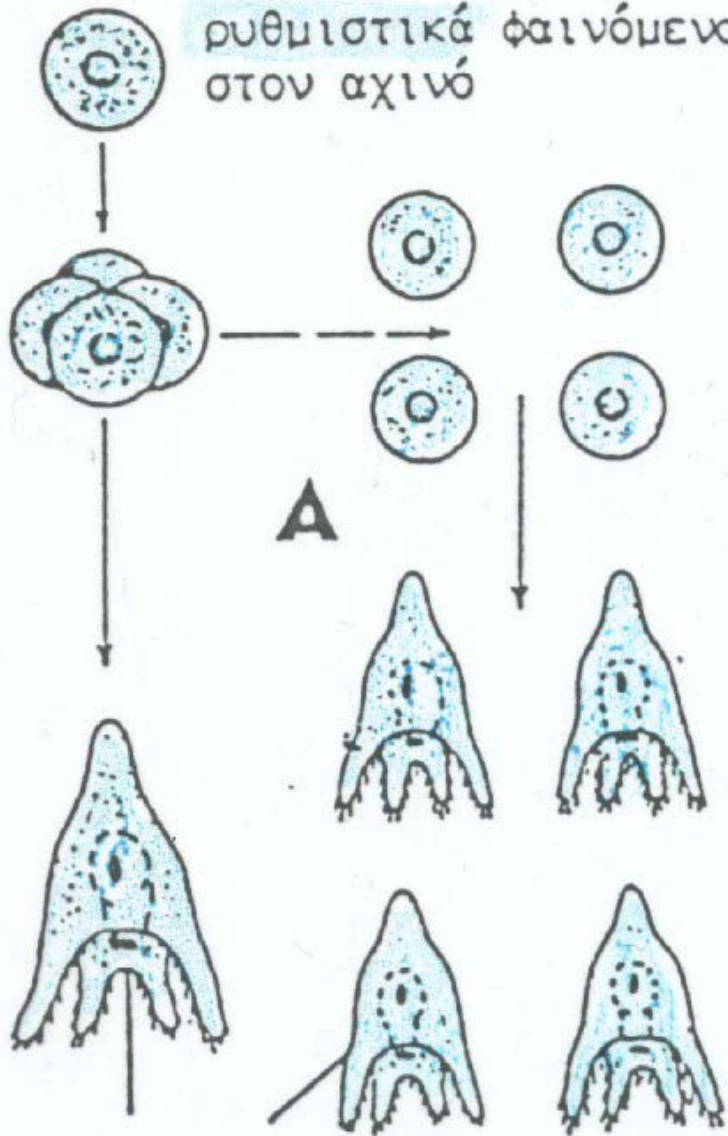
-Η πρώτη, καταγεγραμμένη επιστημονική περίπτωση (τυχαίας) τεχνητής κλωνοποίησης αποδίδεται στο Ελβετό Φυσιολόγο Abraham Trembley ο οποίος το 1744 δημοσιεύει τα αποτελέσματά του, ότι δηλαδή έκοψε έναν μικροοργανισμό (τον οποίο ονόμασε Hydra) σε πολλά κομμάτια, και κάθε ένα από αυτά έδωσε έναν πλήρη οργανισμό, ίδιο με τον αρχικό. {Αργότερα, αποδείχθηκε και η πολικότητα της αναγέννησης, γεγονός που αποκάλυπτε την παρουσία μορφογενετικών παραγόντων}.

A

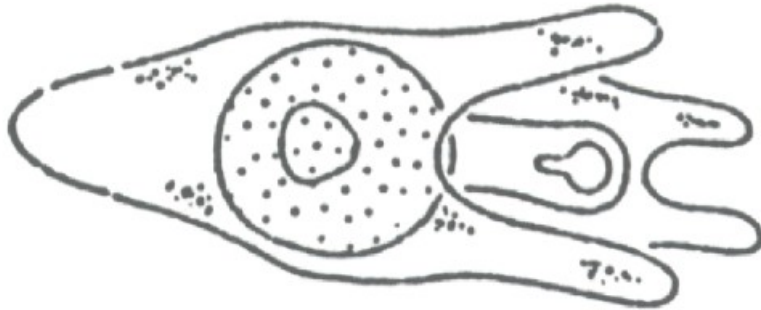
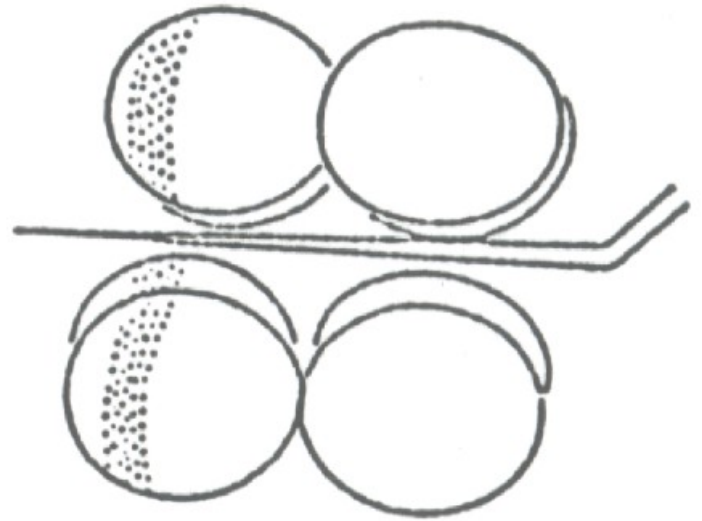
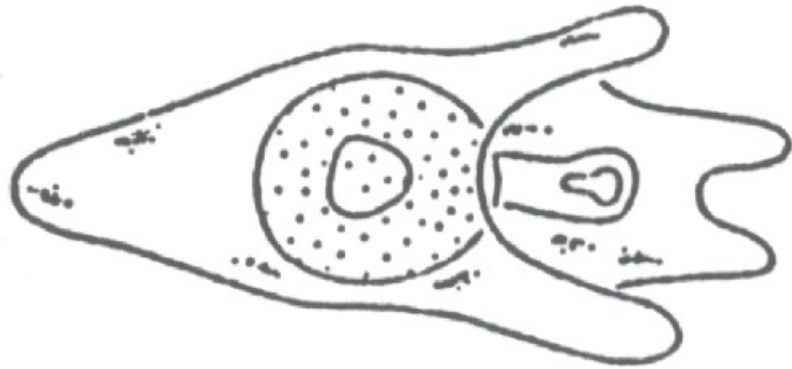


Ο άνθρωπος έχει επιτύχει τεχνητή κλωνοποίηση ζώων και φυτών εδώ και περισσότερα από 100 χρόνια!

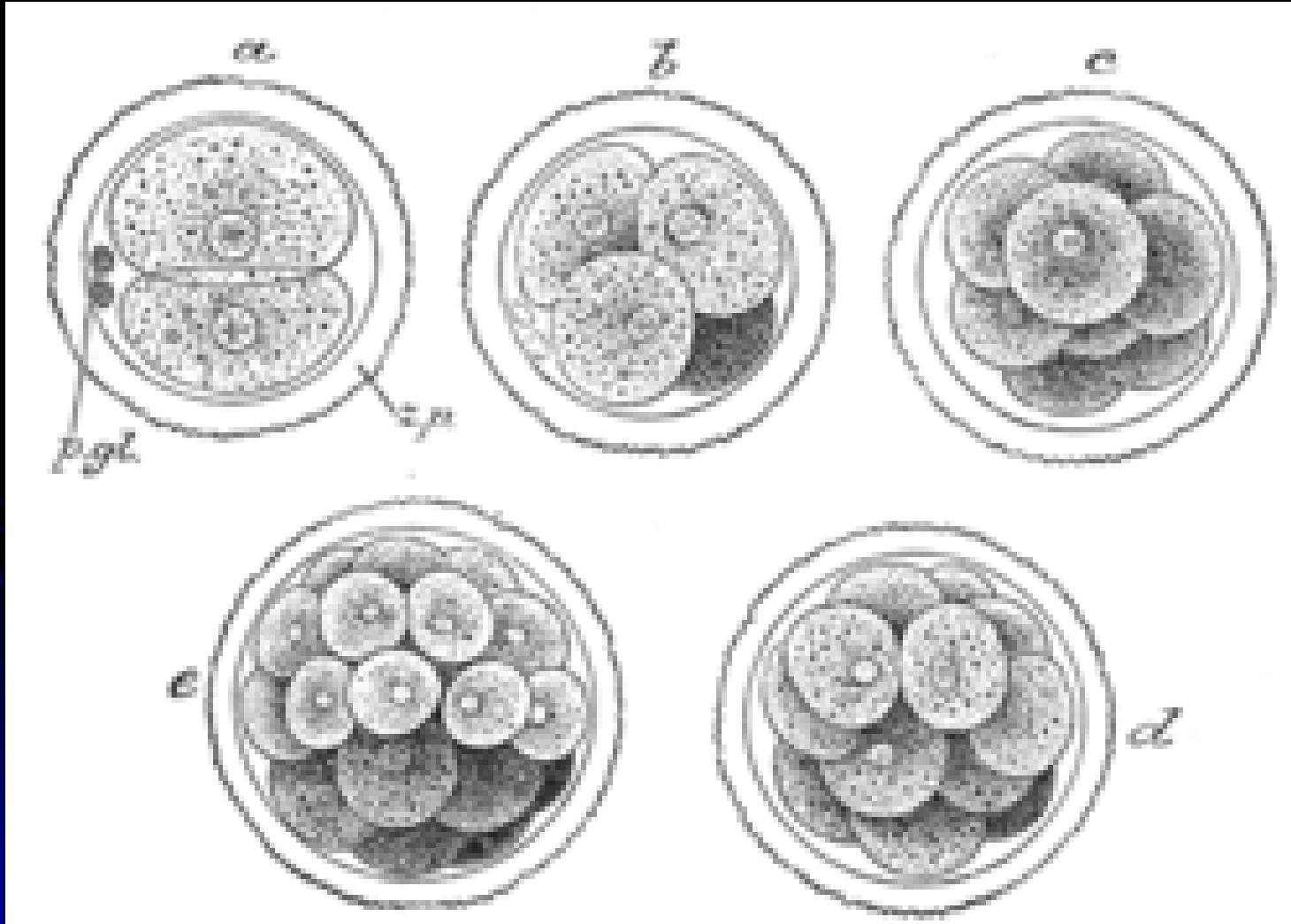
ρυθμιστικά φαινόμενα
στον αχινό



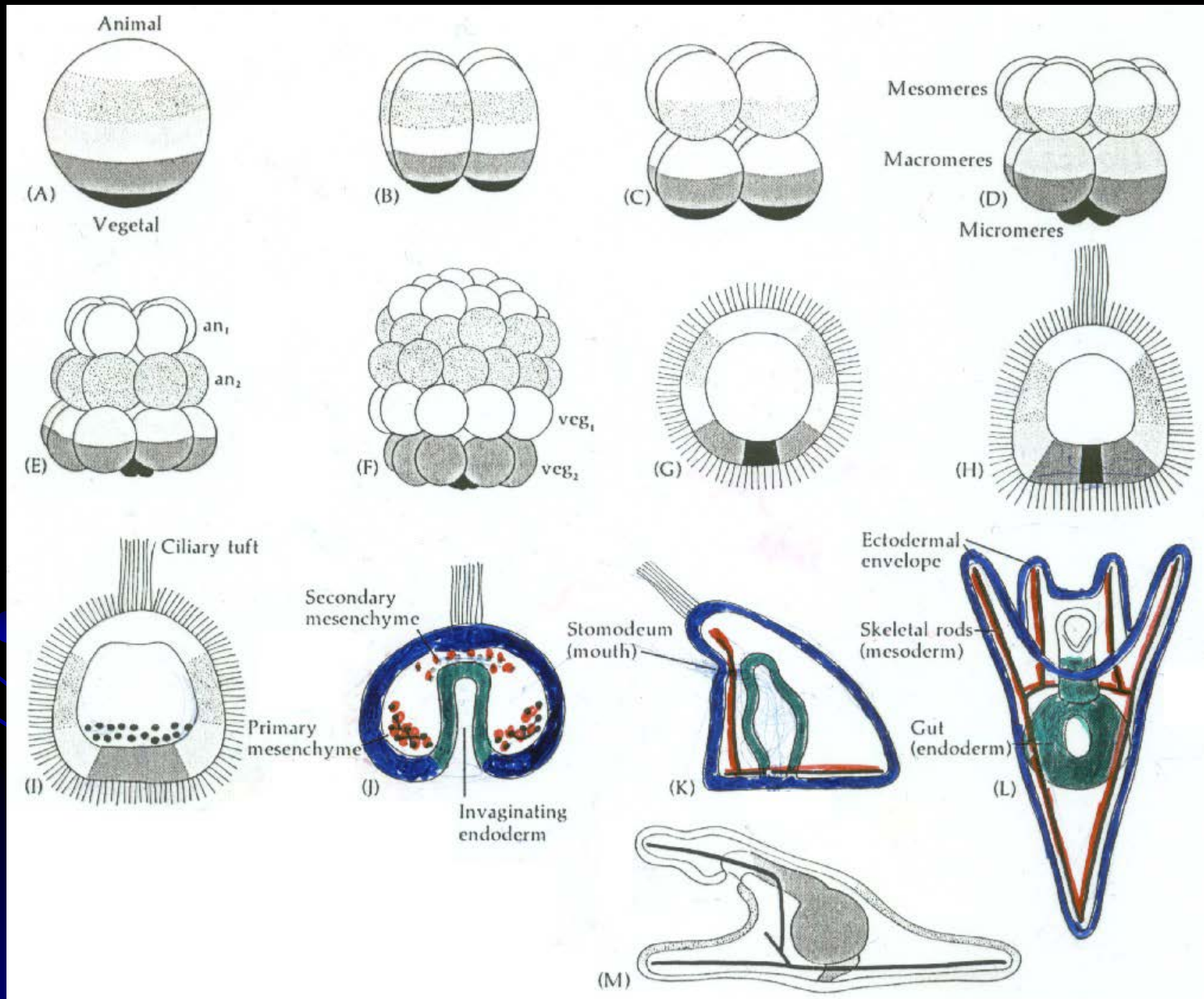
φυσιολογικές
προμήμφες (πλουτείες)



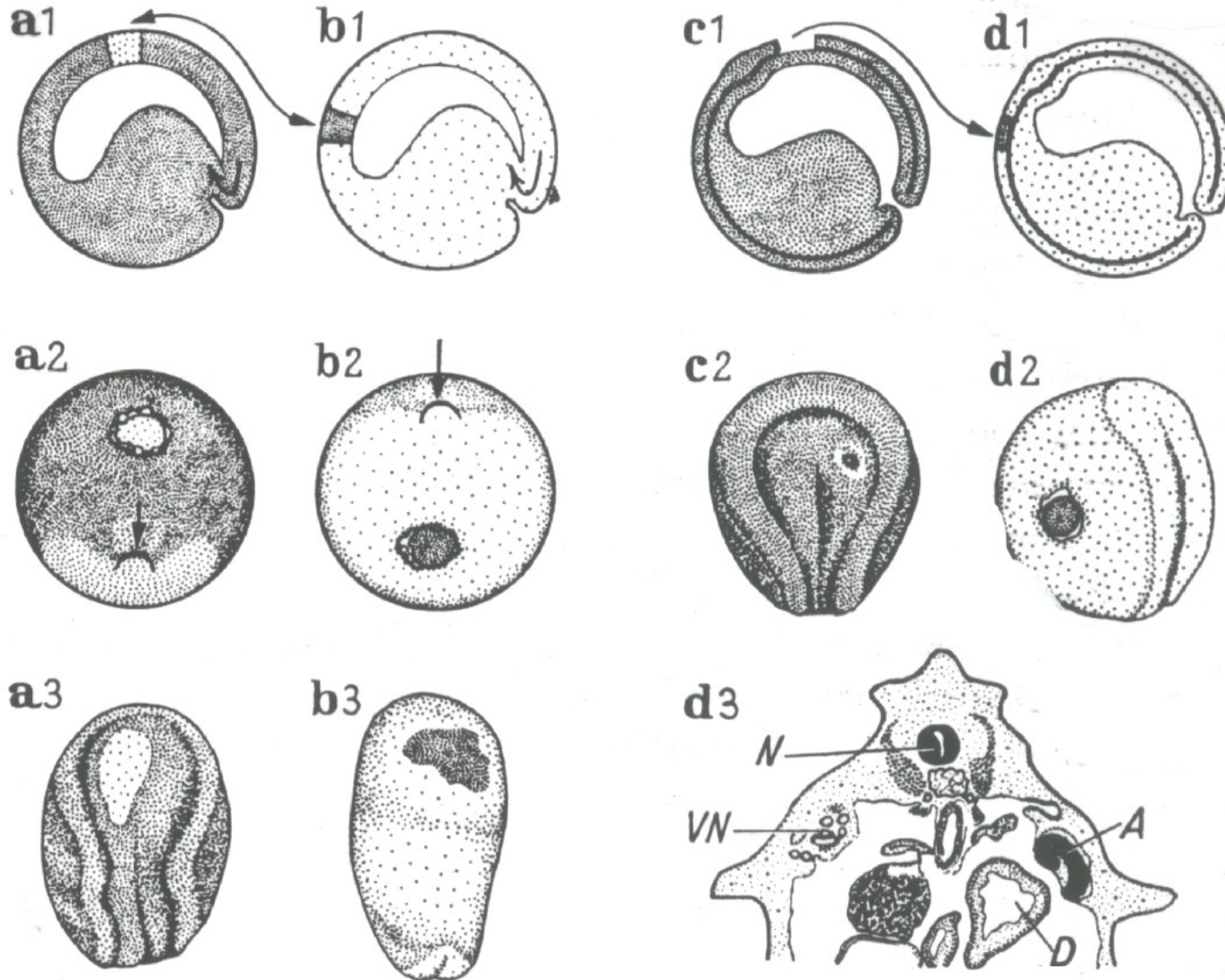
Γύρω στα 1870 αποδείχθηκε η ύπαρξη ωαρίων (στα θηλυκά) και σπερματοζωαρίων (στα αρσενικά) και ότι η δημιουργία κάθε οργανισμού ξεκινούσε από την ένωση ενός ωαρίου με ένα σπερματοζωάριο. Η ανάπτυξη του οργανισμού γινόταν με συνεχείς κυτταρικές διαιρέσεις, ενώ στα αρχικά στάδια τα κύτταρα έμοιαζαν όμοια μεταξύ τους.



Αρχικά, τα κύτταρα ενός αναπτυσσόμενου οργανισμού φαίνονται ίδια μεταξύ τους, αλλά σιγά-σιγά γίνονται διαφορετικά



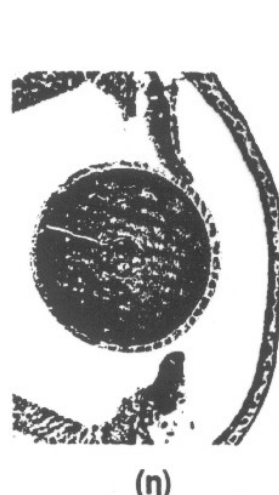
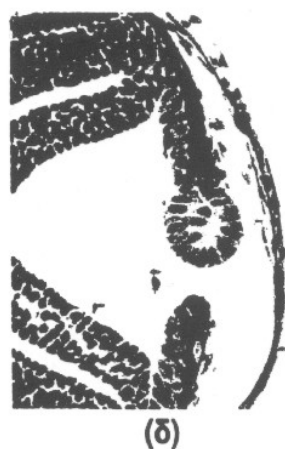
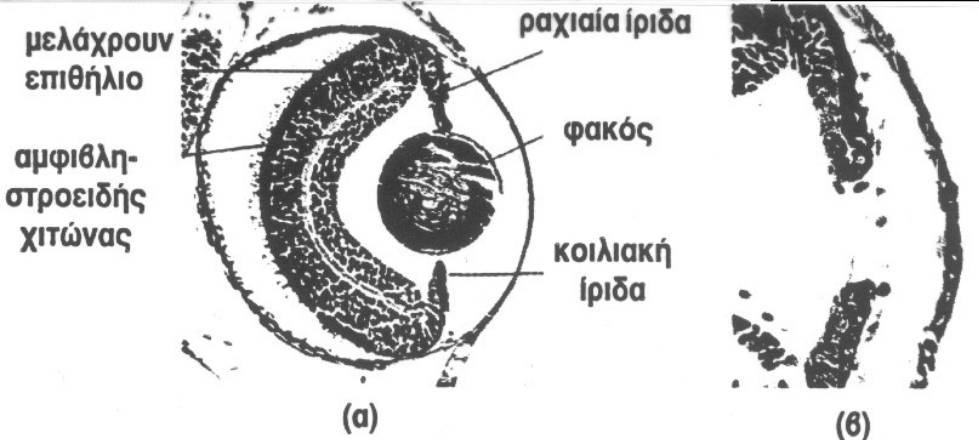
Πειράματα μεταμόσχευσης «ιστών» σε διάφορα εμβρυϊκά στάδια, έδειξαν ότι κατά την πορεία της ανάπτυξης των οργανισμών τα κύτταρα αρχικά επιδεικνύουν πλαστικότητα, στη συνέχεια όμως «καθορίζεται» το πεπρωμένο τους και διαφοροποιούνται.



- Το επιστημονικό ερώτημα που απασχολούσε εκείνη την εποχή τους εμβρυολόγους και το οποίο σχετίζεται άμεσα με αυτό που αντιλαμβανόμαστε σήμερα ως κλωνοποίηση

- **είναι το**

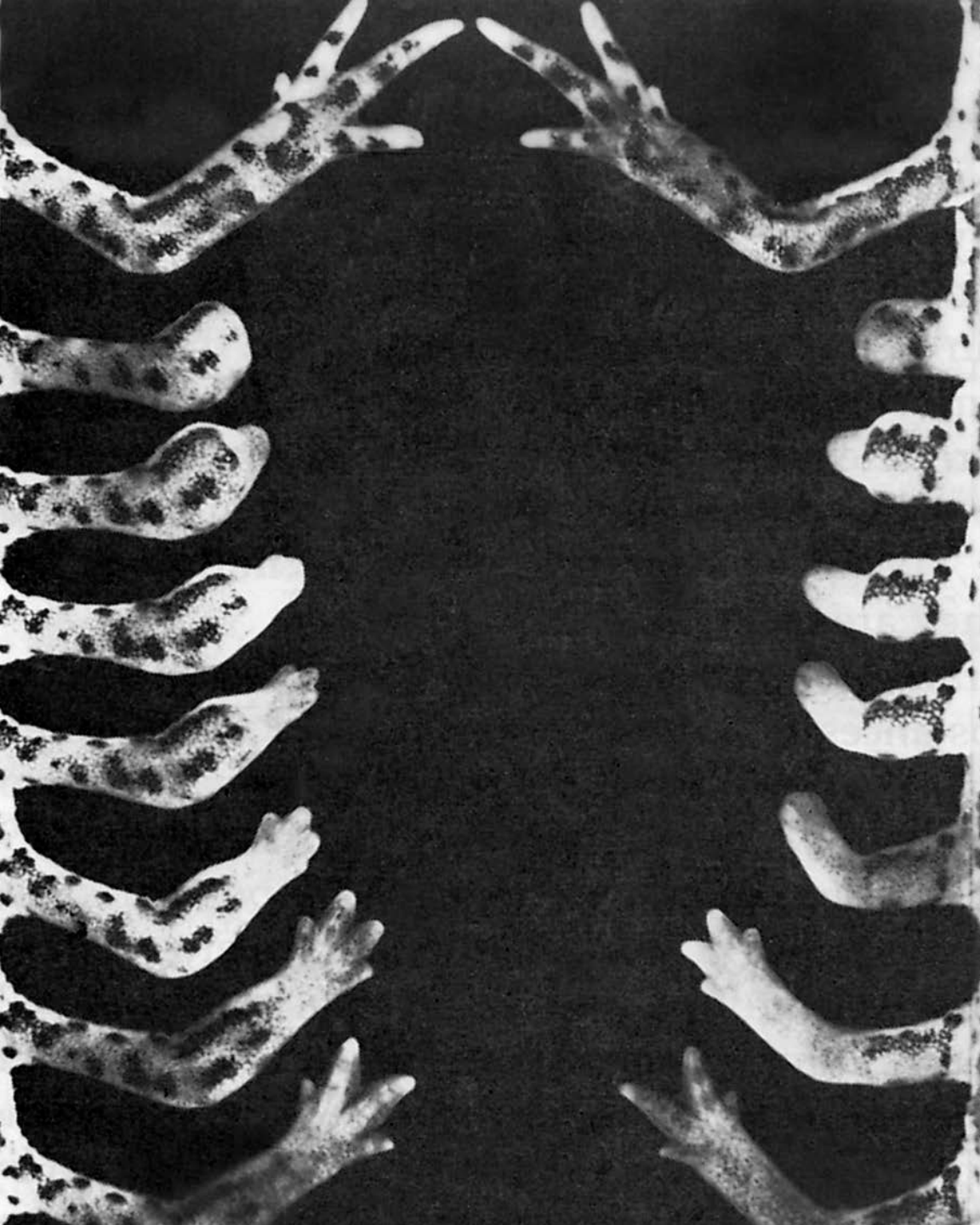
εάν ένα «πλήρως» διαφοροποιημένο κύτταρο μπορεί, κάτω από ποικίλες συνθήκες να αποδιαφοροποιηθεί «πλήρως» έτσι ώστε το γενετικό υλικό του να ξαναεκφραστεί όπως συνέβη και με τον μακρινό πρόγονό του, το ζυγωτό.



Παλαιότερα, η συντριπτική πλειονότητα των επιστημόνων υποστήριζε τη σταθερότητα της διαφοροποιημένης κατάστασης και της αδυναμίας των διαφοροποιημένων κυττάρων προς αποδιαφοροποίηση και επιστροφή σε «εμβρυϊκή κατάσταση».

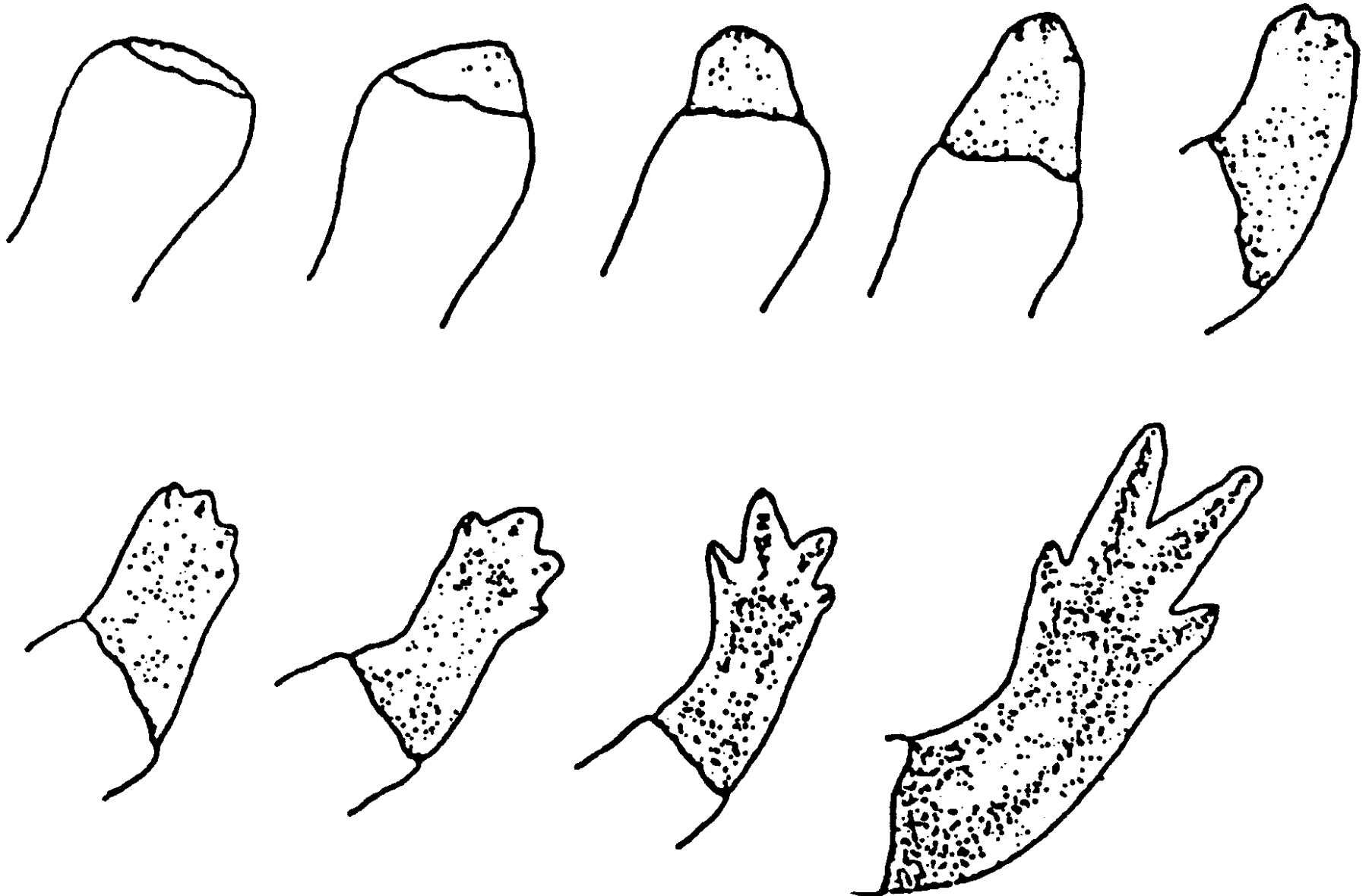
Ωστόσο, σιγά-σιγά άρχισαν να συσσωρεύονται ενδείξεις περί του αντιθέτου.

Για παράδειγμα, (εδώ, αναγέννηση φακού σε ουρόδηλα αμφίβια) γνωρίζουμε αρκετές περιπτώσεις αυθόρμητης, ριζικής αποδιαφοροποίησης και επαναδιαφοροποίησης «πλήρως» διαφοροποιημένων κυττάρων.



Το αναγεννητικό βλάστημα του ακρωτηριασμένου χεριού ουρόδηλων αμφιβίων αποτελεί αδιαμφισβήτητο παράδειγμα αποδιαφοροποίησης διαφοροποιημένων κυττάρων.

Όλα τα διαφοροποιημένα κύτταρα στο σημείο της τομής αποδιαφοροποιούνται και στη συνέχεια επαναδιαφοροποιούνται.

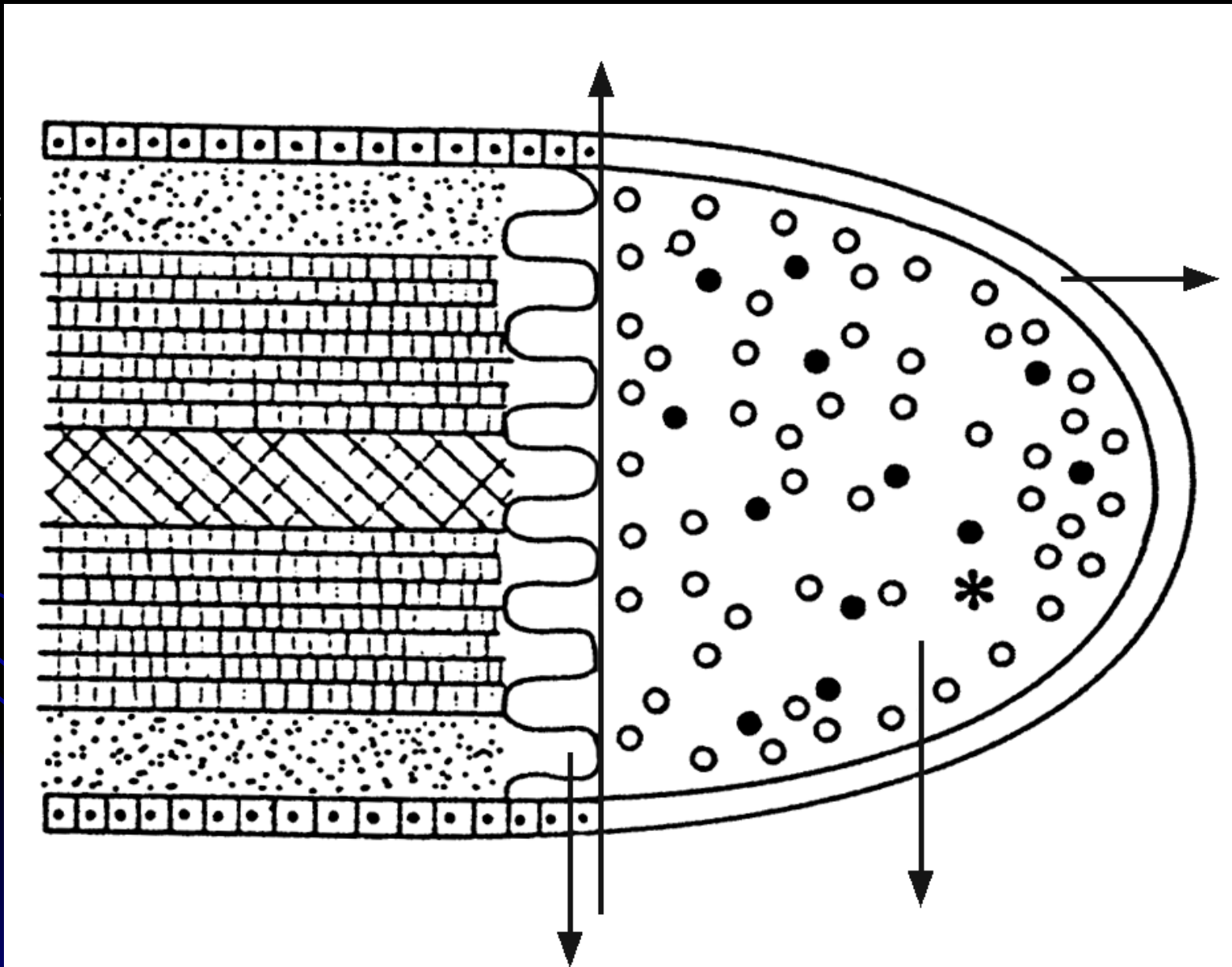


Ποικίλα μεσεγχοματικά κύτταρα, μυϊκά κύτταρα, οστεοκύτταρα, κλπ., αποδιαφοροποιούνται προς «εμβρυϊκή» μορφή και επαναδιαφοροποιούνται

μεσέγχυμα

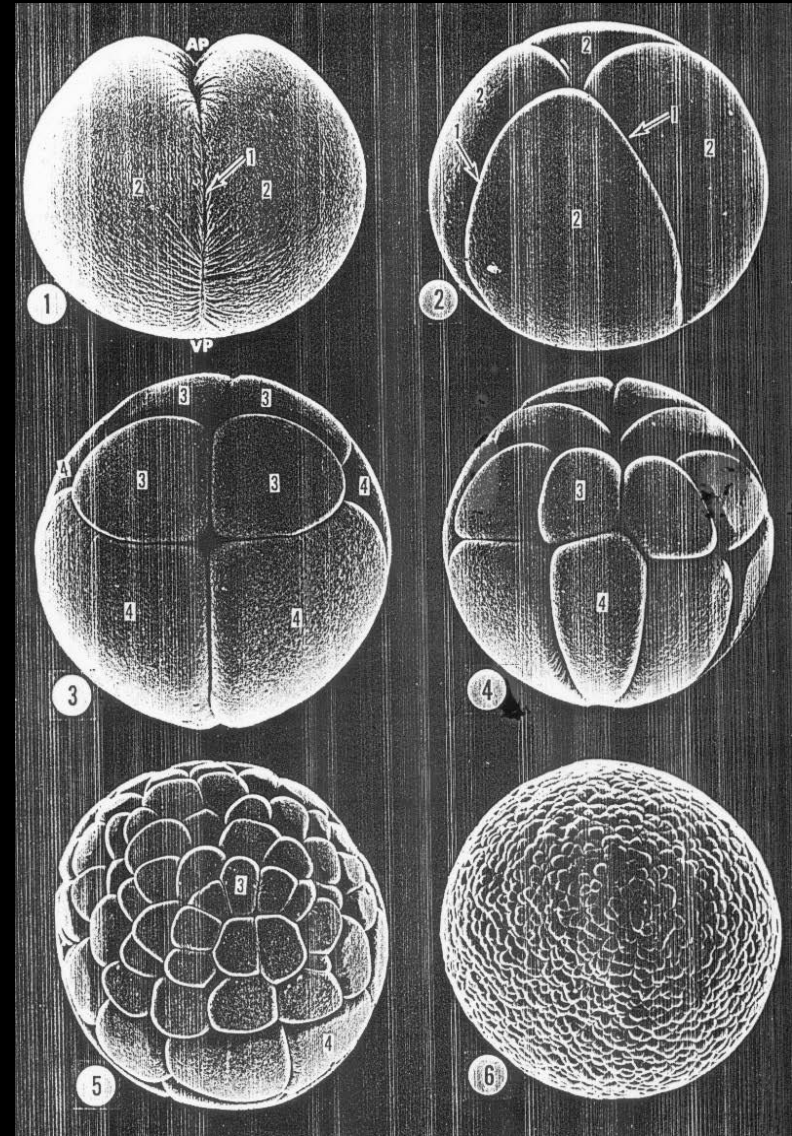
μυς

οστό

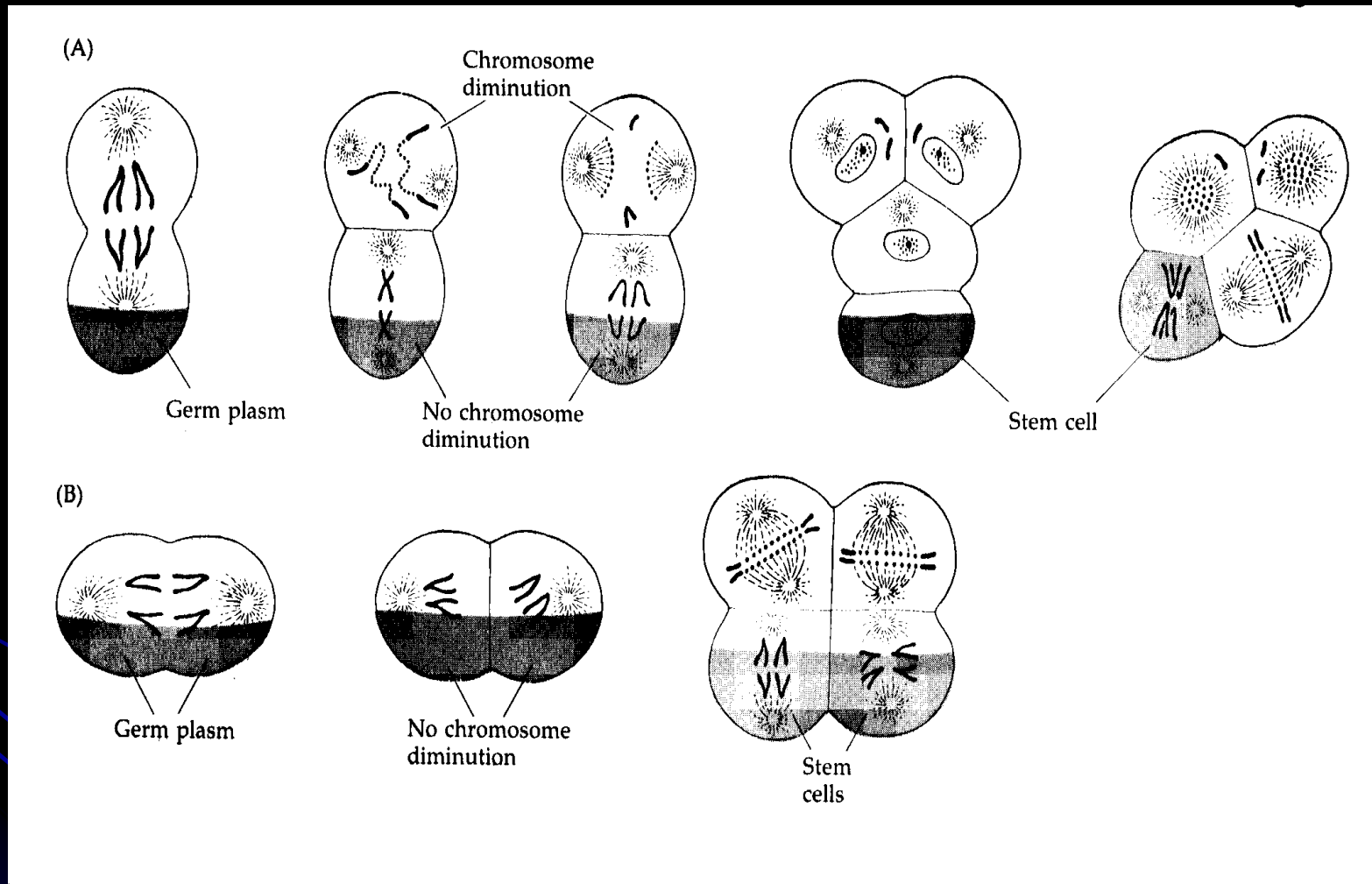


- Η μεθοδολογία της κλωνοποίησης οφείλει την ανάπτυξή της σε επιστημονικά ερωτήματα του 19ου αιώνα. Οι εμβρυολόγοι της εποχής παρακολουθούσαν την ανάπτυξη των εμβρύων διαφόρων οργανισμών (εδώ, αμφίβιο) και παρατήρησαν ότι από ένα φαινομενικά αδιαφοροποίητο κύτταρο, το ζυγωτό, δημιουργούνται με μιτώσεις χιλιάδες άλλα κύτταρα, τα οποία σταδιακά καθίστανται διαφορετικά μεταξύ τους.

- Γιατί;

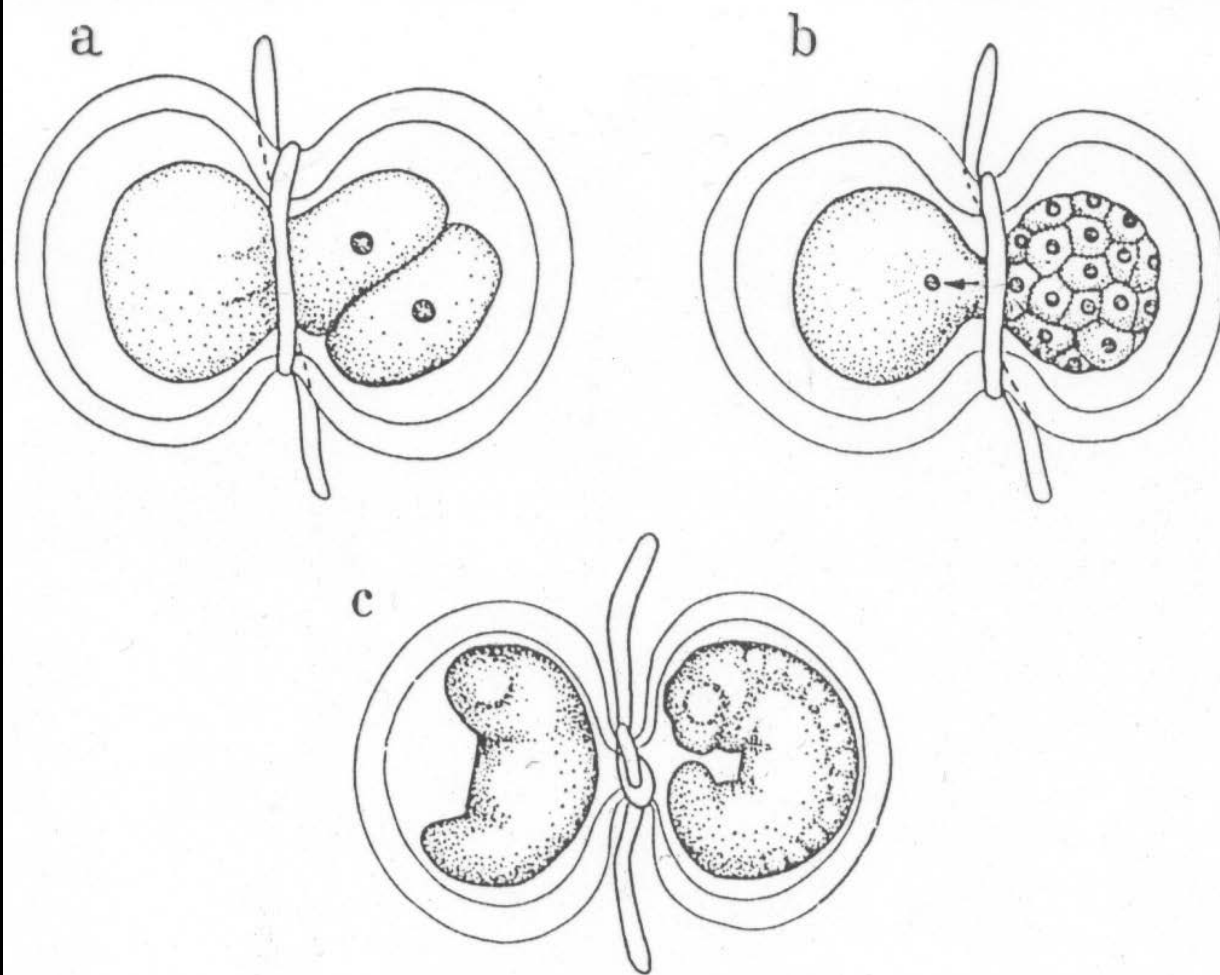
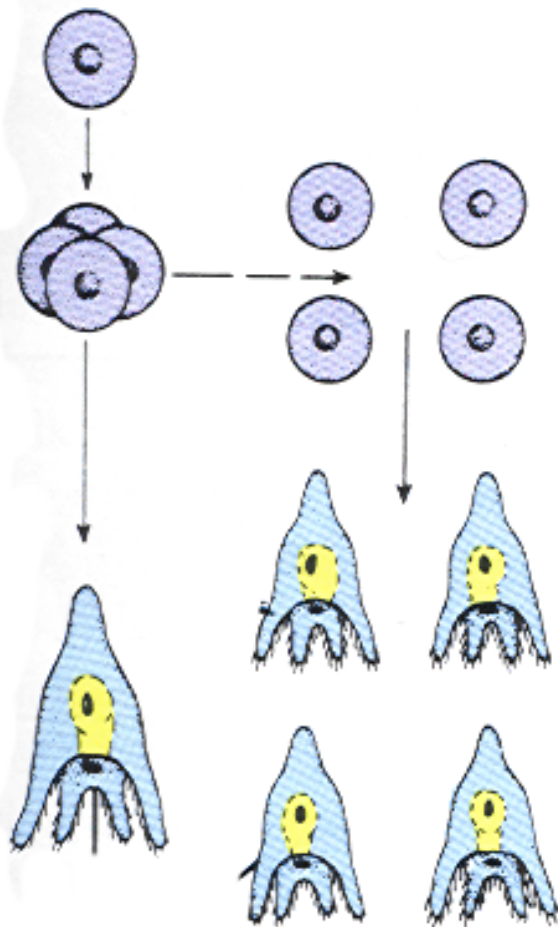


Την εποχή εκείνη (περίπου 1880) επικρατούσε η περί διαφοροποίησης άποψη του August Weismann ο οποίος παρατήρησε ότι, κατά την πορεία της αυλάκωσης, κάθε βλαστομερίδιο εγκλείει διαφορετική ποσότητα κληρονομικού υλικού, οπότε καθορίζεται η μελλοντική του πορεία (πεπρωμένο).

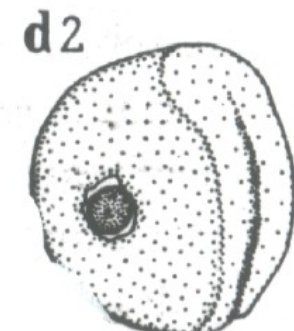
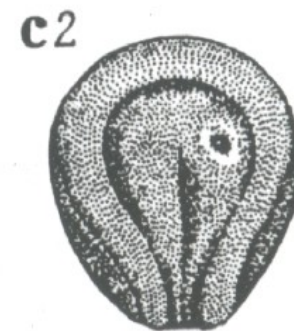
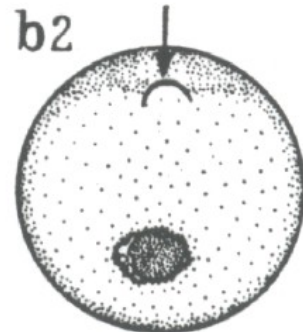
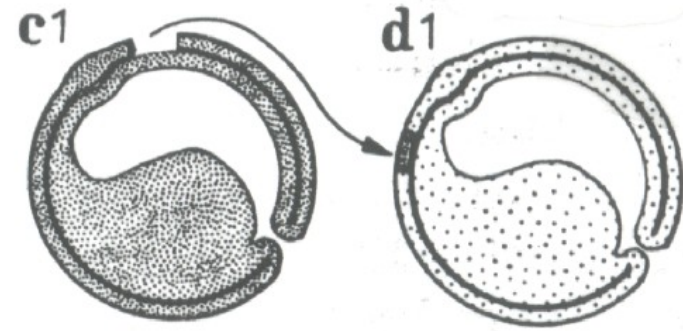
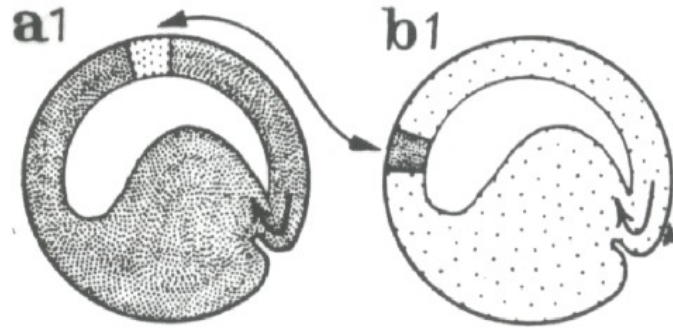


Αν υποθέσουμε ότι η άποψη του Weismann ήταν ορθή, τότε, απομονωμένα βλαστομερίδια θα εξελίσσονταν (στην καλύτερη περίπτωση) σε τμήματα του ολόκληρου οργανισμού, αλλά ποτέ προς ακέραιο οργανισμό.

- Τα πειράματα του Hans Driesch το 1892 (αριστερά) και του Spemann το 1904 (δεξιά) έδειξαν ότι τα αρχικά βλαστομερίδια ενός αναπτυσσόμενου οργανισμού και οι αρχικοί πυρήνες εμπεριέχουν όλες τις κληρονομικές πληροφορίες του είδους (ολοδυναμικότητα)

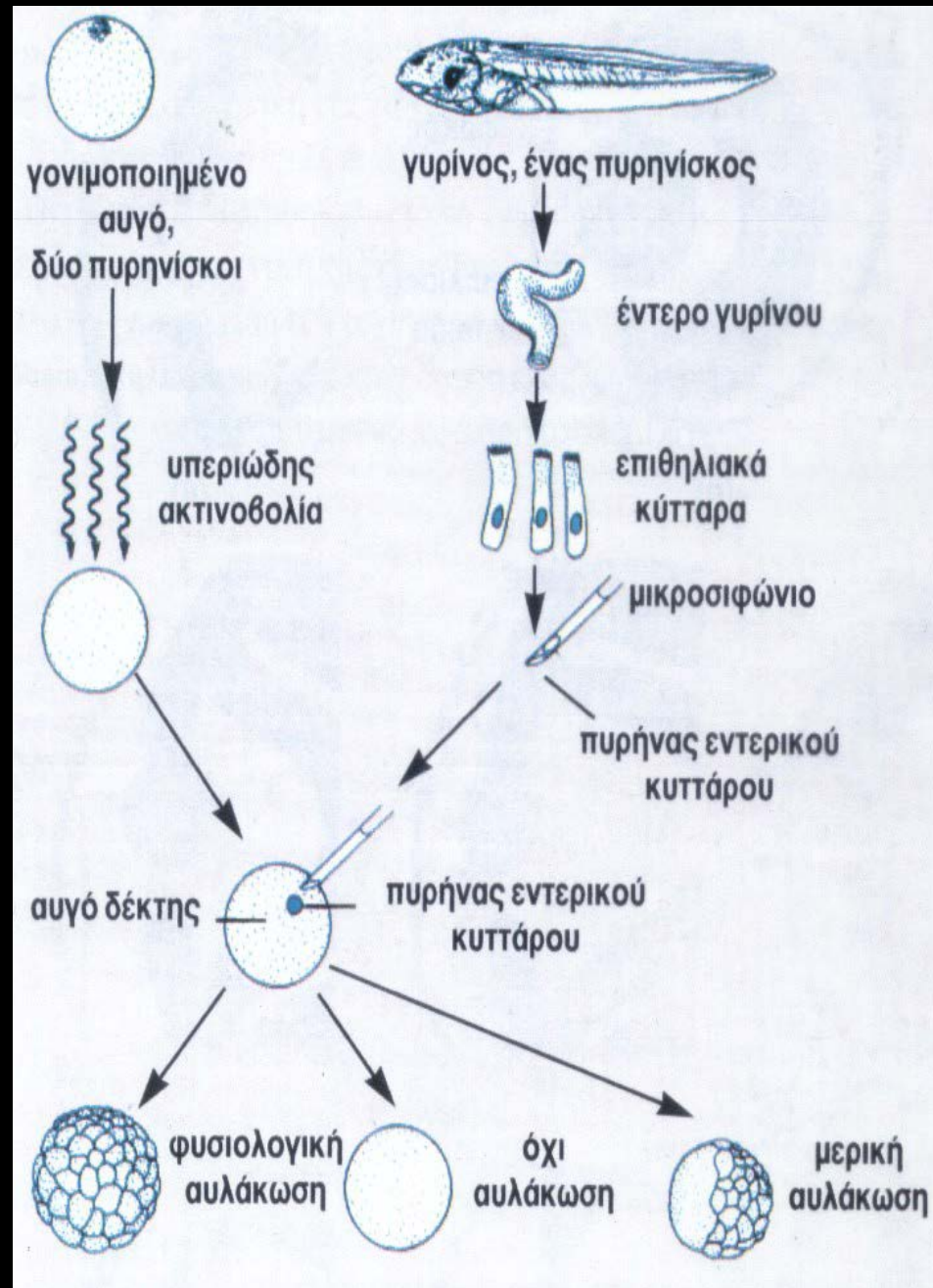


Όμως, αυτή η πλαστικότητα εκφραζόταν μόνο κατά τα πρώτα εμβρυϊκά στάδια, ενώ αργότερα (μετά το στάδιο του ώριμου γαστριδίου) χανόταν

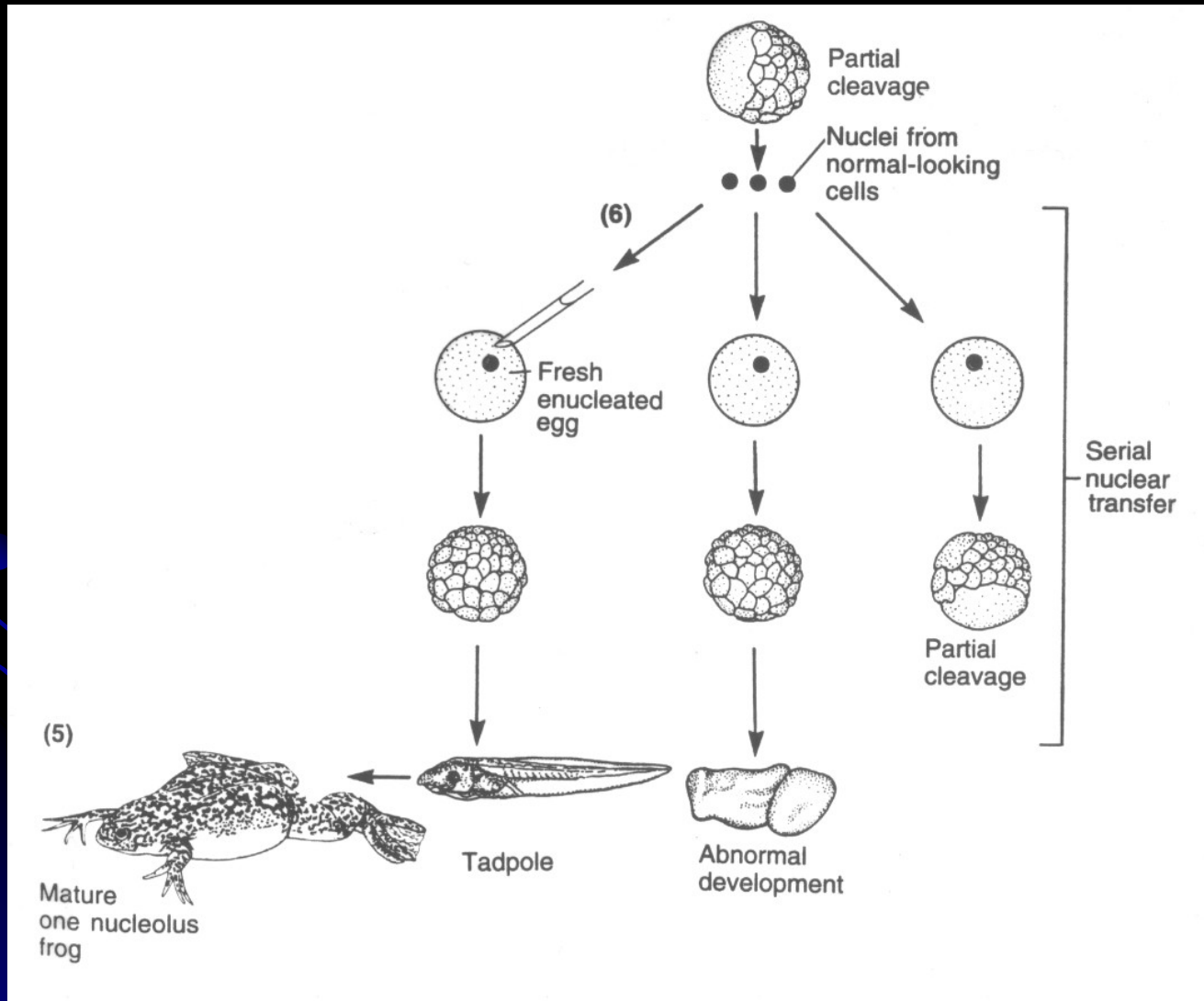


. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονισθεί ότι κατά τα αρχικά στάδια της αυλάκωσης, τα βλαστομερίδια διαθέτουν μεγάλο ποσό κυτταροπλάσματος σε σχέση με το πυρηνόπλασμα. Μετά την επιβεβαίωση από τον Theodor Boveri του ρόλου των χρωμοσωμάτων για την κληρονομικότητα το 1902 και του κυτταροπλάσματος για την ανάπτυξη το 1910, άρχισε να γεννάται η υποψία ότι, για την έκφραση της ολοδυναμικότητας των κυττάρων σημαντικό ρόλο ίσως διαδραματίζει και το κυτταρόπλασμα. Τότε, ο Hans Spemann έδωσε τη θεωρητική λύση, την οποία ανέλαβε να πραγματοποιήσει ο μαθητής του, Otto Mangold. Αυτός έκανε τα πρώτα πειράματα «κλωνοποίησης» και ανακοίνωσε το 1911 τη δημιουργία ορισμένων γυρίνων.

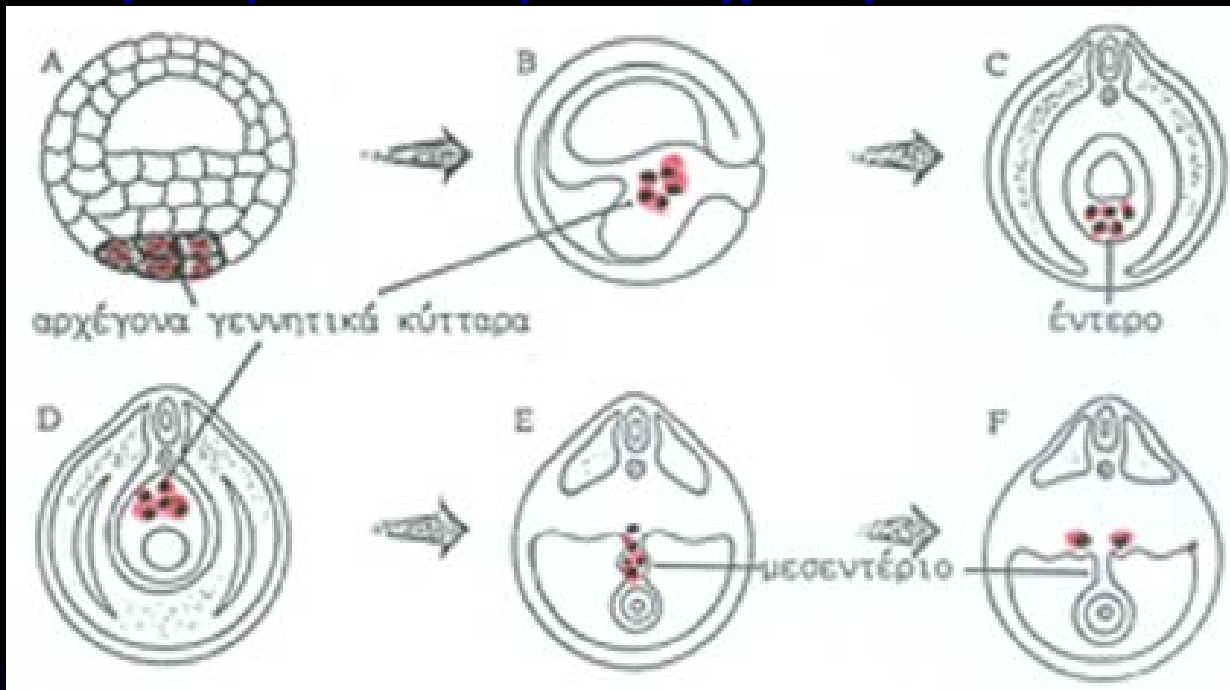
- Οι Briggs και King, το 1952 ανέφεραν 60% επιτυχία όταν ο μεταμοσχευόμενος πυρήνας προερχόταν από πρώιμο βλαστίδιο. Το 1962 ο Gurdon, παρότι χρησιμοποιεί ένα σχετικά πρωτόγονο αμφίβιο (*Xenopus*) ανακοινώνει μόλις 1.5% επιτυχία όταν ο πυρήνας προέρχεται από έντερο γυρίνου.



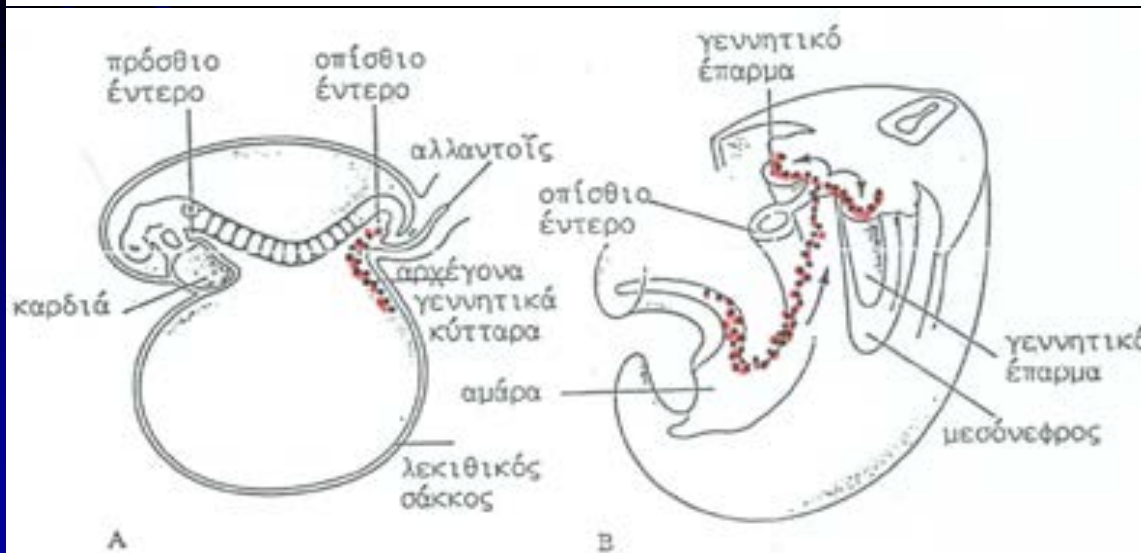
Όταν ο πυρήνας που χρησιμοποιούμε για την «κλωνοποίηση» λαμβάνεται από διαδοχική λήψη από διαδοχικές αναπτύξεις βλαστιδίων, τότε το ποσοστό επιτυχίας της κλωνοποίησης αυξάνεται, γεγονός που ίσως σημαίνει ότι ο πυρήνας (τα χρωμοσώματα, τα γονίδια) χρειάζονται περισσότερο χρόνο «ωρίμανσης»



- Το επίτευγμα αυτό τότε δεν είχε μεγάλο αντίκτυπο. Το κυριότερο αντεπιχείρημα ήταν η πιθανότητα να έχουν ληφθεί κατά λάθος γεννητικά κύτταρα και όχι σωματικά.

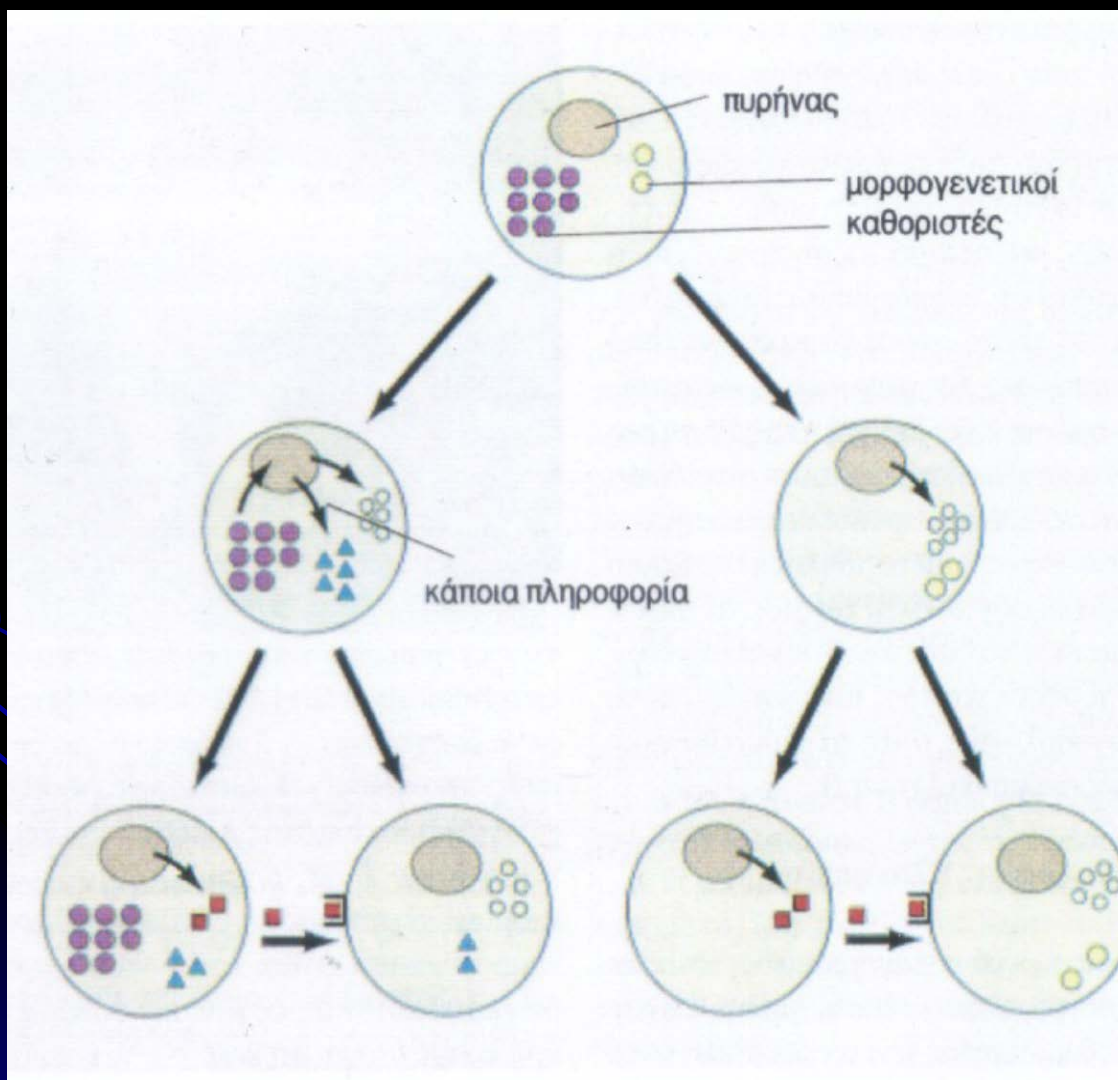


αμφίβιο



θηλαστικό

- Στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου πολλών οργανισμών ευρίσκονται μητρικής προέλευσης **mRNAs** με συγκεκριμένη κατανομή. Αυτοί οι «μορφογενετικοί καθοριστές» διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του οργανισμού.



Ανάστροφο μικροσκόπιο. Σου δίνει χώρο για χειρισμούς. Μπορείς να δεις τα κύτταρα με μεγάλη μεγέθυνση, μέσα στην καλλιέργειά τους



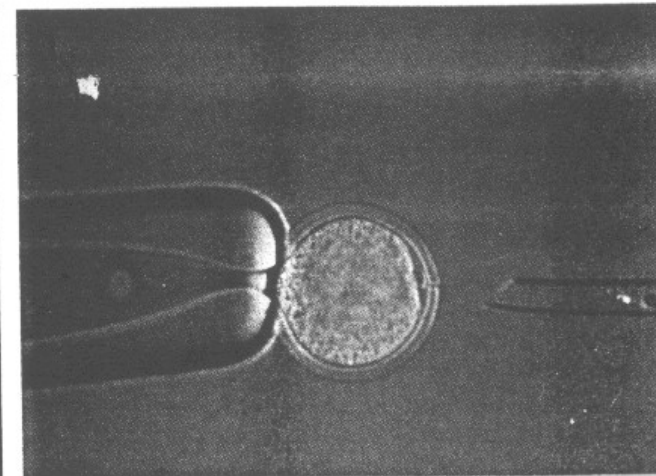
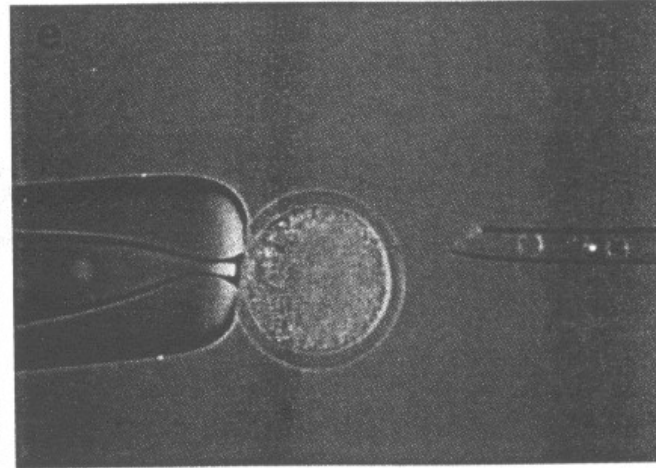
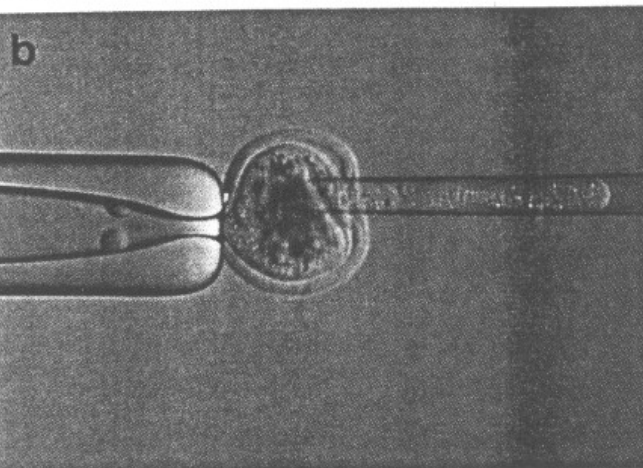
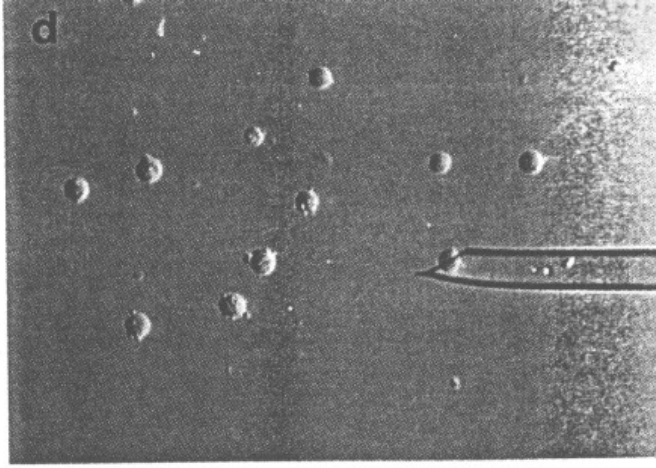
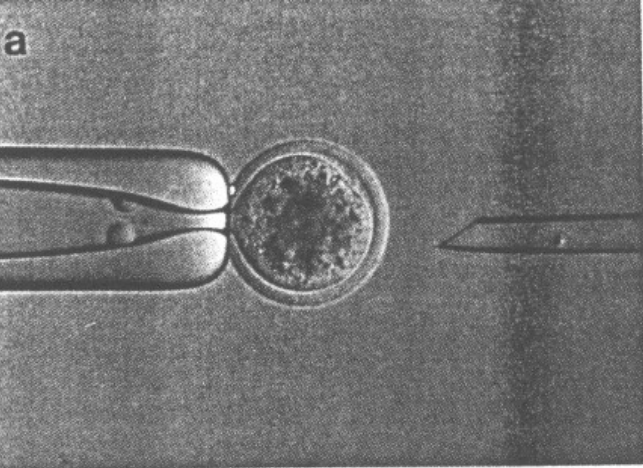
Τμήμα μικροχειριστή για ενέσεις σε κύτταρα



Η μεθοδολογία της κλωνοποίησης είναι απλή. Από το ωοκύτταρο ενός είδους αφαιρούμε το γενετικό υλικό του «πυρήνα». Στο «απύρηνο» κύτταρο εισάγουμε το γενετικό υλικό του πυρήνα από ένα άλλο, διπλοειδές κύτταρο του ιδίου (;) είδους.







(a) Ακίνητοποιούμε το ωάριο με το σιφώνιο αναρρόφησης, έτσι ώστε η πλευρά που είναι το πολικό σωματίο («κάτω» από το οποίο ευρίσκεται η μιτωτική άτρακτος με τα χρωμοσώματα) να είναι αντιδιαμετρική του σιφωνίου .

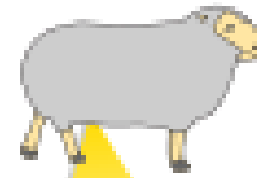
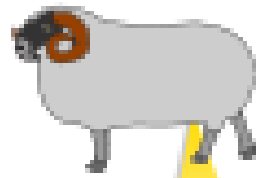
(b) Αναρροφούμε το πολικό σωματίο και τα χρωμοσώματα

(c) Διαπιστώνουμε με UV και κατάλληλα φίλτρα την απορρόφηση πολικού σωματίου και χρωμοσωμάτων.

(d), (e), (f) Εισαγωγή κυττάρου-δότη του DNA

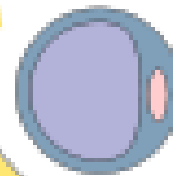
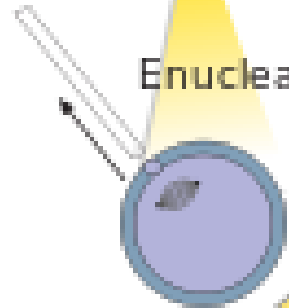
Scottish Blackface
(Cytoplasmic Donor)

Finn-Dorset
(Nuclear Donor)



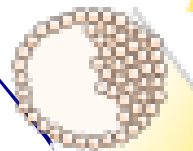
Enucleation

Mammary Cells

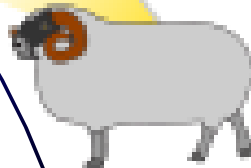


Direct Current Puls

Blastocyst



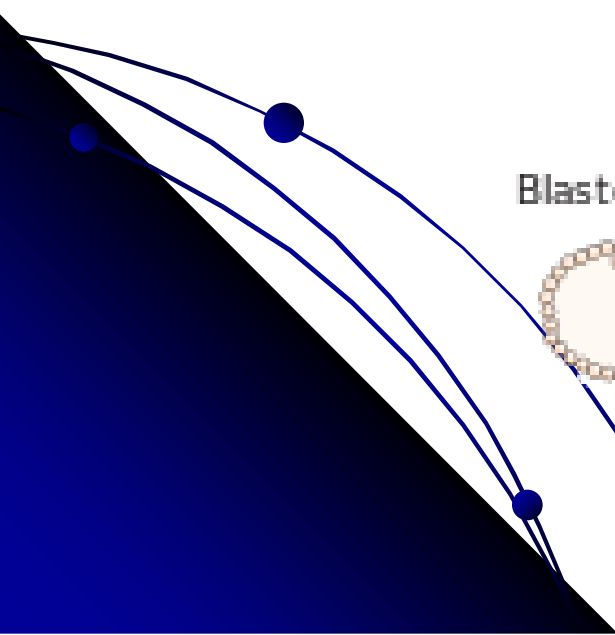
Surrogate
ewe



Dolly

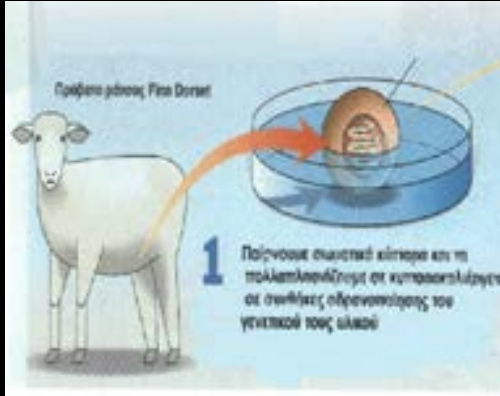


Όπως θεωρητικά αναμένεται, το ζώο που γεννιέται μοιάζει στον δότη του πυρήνα



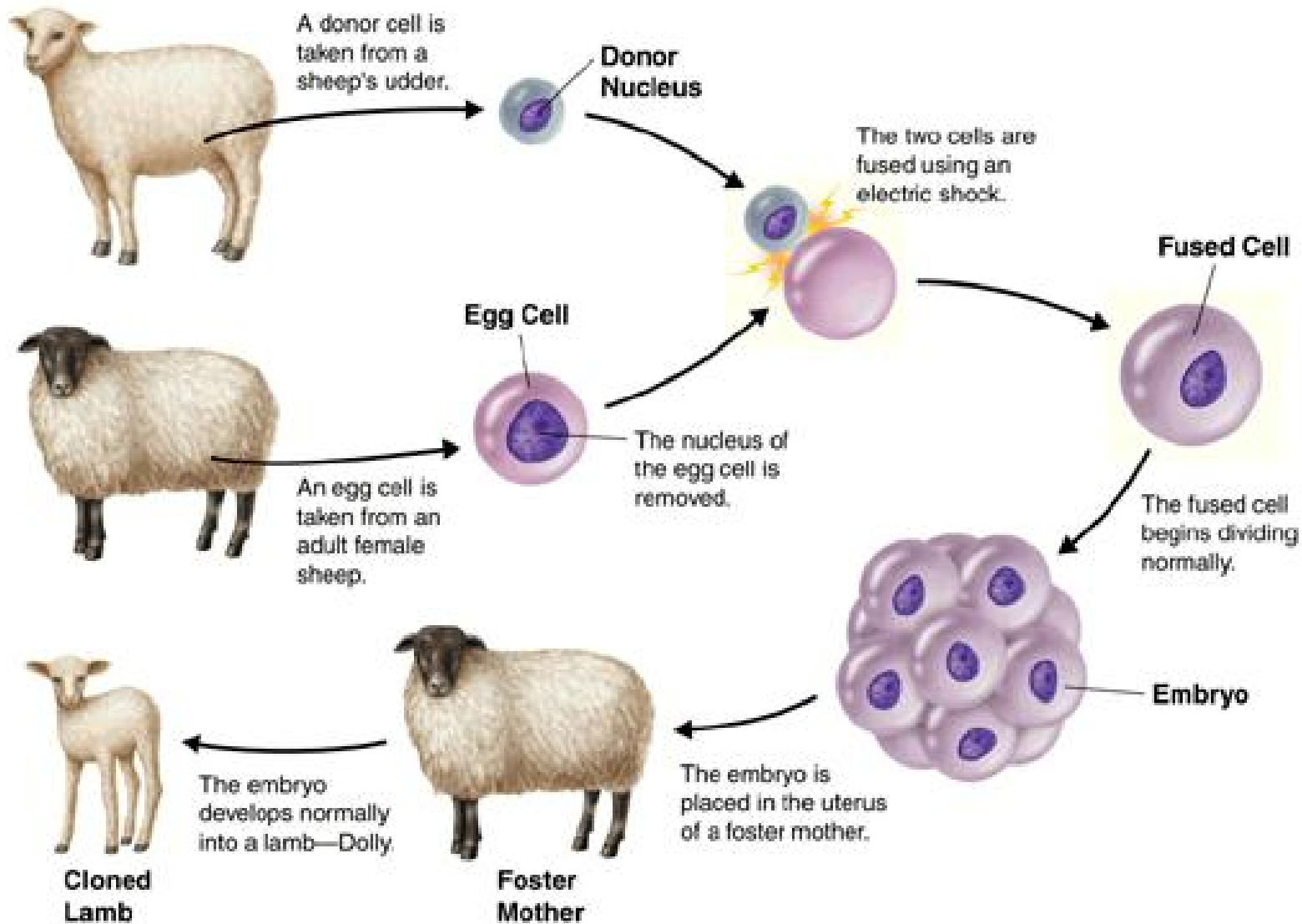
- 1986: γέννηση προβάτων με την τεχνική της κλωνοποίησης από πυρήνα βλαστομεριδίου του σταδίου των οκτώ κυττάρων.

- 1996: γέννηση της Dolly από πυρήνα «διαφοροποιημένου;» κυττάρου. Έκτοτε, κλωνοποίηση έχει επιτευχθεί σχεδόν σε όλα τα γνωστά είδη θηλαστικών, όμως σε καμιά περίπτωση δεν έχει αποδειχθεί ξεκάθαρα ότι η λήψη του γενετικού υλικού έγινε από διαφοροποιημένο κύτταρο.





Dolly Parton



- Αμέσως μετά τη γέννηση της Dolly ξεσηκώθηκε θύελλα εναντίον της κλωνοποίησης του ανθρώπου. Πολλές κυβερνήσεις απαγόρευσαν τα πειράματα κλωνοποίησης (αφήνοντας όμως και κάποια παράθυρα). Όμως, έχω την αίσθηση ότι ένα σημαντικό, επιστημονικό επίτευγμα καταδικάστηκε χωρίς να διερευνηθούν διεξοδικά οι πιθανές θετικές πλευρές του, ενώ αντίθετα υπήρξε υπέρμετρη υπερβολή στα εναντίον του επιχειρήματα.

Τα κυριότερα από αυτά τα επιχειρήματα είναι τρία:

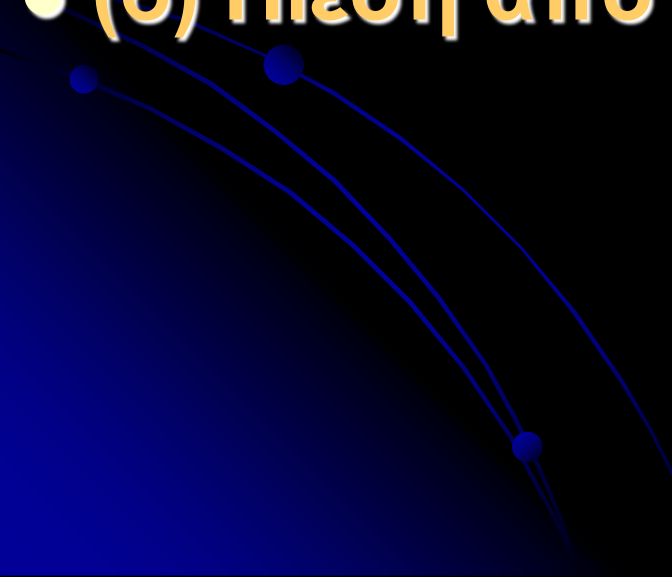
- i. η «ηλικία» του κλώνου,
- ii. κάποιες πιθανότητες προβλημάτων υγείας και ανωμαλιών
- iii. η δυνατότητα ακούσιας κλωνοποίησης.

- Το πλέον σοβαρό είναι το (i) [η «ηλικία» του κλώνου], η δε επιστήμη δεν είναι σε θέση να το αντικρούσει αυτή τη στιγμή. Πρέπει να γίνουν πάρα πολλές παρατηρήσεις σε πολλά θηλαστικά (ιδίως σε πρωτεύοντα) πριν καν αρχίσει να συζητείται το ενδεχόμενο της αναπαραγωγικής κλωνοποίησης του ανθρώπου. Η κατάσταση εδώ είναι συγκεχυμένη αφού υπάρχουν αντιφατικά, ερευνητικά αποτελέσματα.

- Από τα μέχρι σήμερα πειράματα σε ζώα φαίνεται ότι το (ii) [προβλήματα υγείας] είναι πολύ ασθενές επιχείρημα, τα δε προβλήματα είναι μάλλον τεχνικής φύσεως τα οποία θα επιλυθούν σύντομα.

- Πολύ σοβαρό, όμως, είναι το επιχείρημα (iii) [ακούσια κλωνοποίηση] το οποίο θεωρούμε ότι είναι αδύνατο να αντιμετωπισθεί. Για παράδειγμα, ο κομμωτής της Αντριάνα Σκλεναρίκοβα θα μπορούσε να κάνει χρυσές δουλειές!!!!

ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΑ ΥΠΕΡ ΤΗΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

- (α) Απαντήσεις σε βιολογικά ερωτήματα
 - (β) Θεραπευτικές εφαρμογές
 - (γ) Τεκνοποίηση
 - (δ) Πίεση από οικονομικούς κύκλους
- 

- **Δεν έχω ακόμα πεισθεί από τα εναντίον της αναπαραγωγικής κλωνοποίησης επιχειρήματα.**
- **Κάθε ένα από αυτά (καθώς και από άλλα, σημαντικά επιχειρήματα) έχει φυσικά τη δική του αξία και βαρύτητα. Πιστεύω όμως ότι τα προβλήματα που τονίζονται ήδη τα γνωρίζει η κοινωνία και τα αντιμετωπίζει είτε ιατρικά είτε νομικά. Θα χρειασθεί ίσως μια καινούργια, παγκόσμια νομολογία.**