

Hanna Sormunen

TUMANSIIRTOTEKNIikka

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatintyö
Tammikuu 2020

TIIVISTELMÄ

Hanna Sormunen: Tumansiirtotekniikka

Tampereen yliopisto

Biotekniikka

Kandidaatintyö

Tammikuu 2020

Tumansiirtotekniikassa somaattisen solun perimä siirretään tumattomaksi tehtyyn munasoluun. Näin saatu yhdistelmäsolu asetetaan valeraskaaksi tehdyn naaraan kohtuun kehittymään syntymään asti. Tumansiirtotekniikka voidaan jakaa lisääntymistarkoitteiseen kloonaukseen ja terapeuttiseen kloonaukseen. Lisääntymistarkoitteisella kloonauksella tumansiirtotekniikalla on tuotettu monia eri eläinlajeja. Ihmistä ei ole kloonattu ja se on nykyään vielä mahdotonta eettisten vastalauseiden ja lainsäädännön takia. Terapeuttinen kloonaus tarkoittaa alkion luomista tarkoituksena eristää potilaan solujen kanssa identtisiä alkion kantasoluja. Koska solut ovat samanlaisia kuin potilaan solut, eivät ne aiheuta hylkimisreaktiota elimistössä ja soveltuvat korvaushoidoissa käytettäväksi. Tumansiirtotekniikka avaa uusia mahdollisuuksia myös genetiikan tutkimukselle.

Tumansiirtotekniikka sisältää nykyään vielä monia ongelmia, joita ei ole onnistuttu ratkaisemaan. Metodi on kuitenkin kehittynyt viime aikoina runsaasti. Ongelmat liittyvät suurimmaksi osaksi somaattisen solun genomien uudelleenohjelmointiin alkion kantasolun genomien tasolle. Uudelleenohjelmointi epäonnistuu vielä nykypäivänä suurella todennäköisyydellä johtaen alkionkehityksen pysähtymiseen tai kehityshäiriöisen yksilön syntymään. Tumansiirron onnistumistodennäköisyyttä on kuitenkin saatu parannettua runsaasti muokkaamalla solun epigeneettisiä tekijöitä. Tieto uudelleenohjelmoitumisen mekanismeista ja epigeneettisten tekijöiden vaikutuksesta lisääntyy jatkuvasti, ja sen myötä metodi kehittyy eteenpäin.

Tumansiirtotekniikalla tehtävän kloonauksen etiikka herättää nykypäivänä paljon keskustelua. Asenteet erityisesti lisääntymistarkoitteista kloonauksta kohtaan ovat melko kriittiset. Epäeettisyyttä perustellaan metodin luonnottomuudella ja elävälle yksilölle aiheutuvilla haitoilla. Terapeuttinen kloonaus katsotaan yleisesti hyväksyttävämmäksi. Molempia rajoitetaan kuitenkin lainsäädännöllä, joka on valtiokohtainen niin eri puolella Eurooppaa kuin maailmallakin. Suomessa lisääntymiskloonaus on laissa täysin kielletty. Terapeuttista kloonauksta koskee lainsäädäntö, joka on tehty alkion tutkimustarkoituksessa tuottamista varten.

ALKUSANAT

Tämä kandidaatintyö on tehty osana bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan kandidaatin tutkielmaa Tampereen yliopistolla. Työn aihe valikoitui oman mielenkiinnon mukaan ja ohjaaja työlle löytyi Kaupin kampuksen puolelta.

Kiitän ohjaajaani Leena Viiriä. Sain häneltä ohjeita työn sisältöön sekä hyviä korjausehdotuksia. Lisäksi osoitan kiitokseni kandidaatintyöseminaarin vastuuhenkilölle Juha Nousiaiselle.

Tampereella 23.1.2020

Hanna Sormunen

SISÄLLYSLUETTELO

| | | |
|-----|---|----|
| 1. | JOHDANTO | 1 |
| 2. | ELÄINTEN KLOONAUUS TUMANSIIRTOTEKNIKALLA | 3 |
| 2.1 | Historiaa..... | 3 |
| 2.2 | Ensimmäinen kloonattu nisäkäs | 4 |
| 2.3 | Eläinten kloonaus ja sen haitat..... | 6 |
| 2.4 | Nisäkäsalkion tuottaminen tumansiirtotekniikalla käytännössä | 7 |
| 3. | TUMANSIIRROTEKNIIKAN ONGELMAT JA RATKAISUJA | 10 |
| 3.1 | Tumansiirron epäonnistumiseen johtavat syyt..... | 10 |
| 3.2 | Tumansiirtotekniikkaan liittyvät epigeneettiset modifikaatiot | 11 |
| 3.3 | Kromatiinirakenne ja transkriptiotekijät tumansiirtotekniikassa | 12 |
| 4. | SOLUJEN UUELLEENOHJELMOINTI..... | 15 |
| 4.1 | Teoria uudelleenohjelmoinnin taustalla | 15 |
| 4.2 | Paranneltu uudelleenohjelmointitekniikka..... | 18 |
| 4.3 | Mahdollisuudet ja käyttökohteet | 19 |
| 5. | ETIIKKA JA LAINSÄÄDÄNTÖ | 22 |
| 6. | YHTEENVETO..... | 24 |
| | LÄHTEET | 26 |

KUVALUETTELO

| | | |
|----------------|---|-----------|
| Kuva 1. | <i>Dolly on esillä Skotlannin kansallismuseossa.....</i> | 5 |
| Kuva 2. | <i>Tumansiirtotekniikan päävaiheet.....</i> | 8 |
| Kuva 3. | <i>Luonnollinen kloonauus, lisääntymiskloonauus ja terapeuttinen kloonauus.....</i> | 17 |
| Kuva 4. | <i>Solun uudelleenohjelmointiin vaikuttavat tekijät.....</i> | 20 |

LYHENTEET JA MERKINNÄT

| | |
|-------------------------------------|---|
| DNA | deoksiribonukleiinihappo |
| RNA | ribonukleiinihappo |
| mRNA | lähetti-RNA |
| X-kromosomi | toinen ihmisen sukupuolikromosomeista |
| H3K9me3 | eukaryoottisolun histonin epigeneettinen modifikaatio |
| OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 JA ESRRB | hiiren alkion kantasoluissa ilmeneviä transkriptiotekijöitä |
| iPS-solu | indusoitu pluripotentti kantasolu |

1. JOHDANTO

Kloonaus on nykypäivänä hyvin kiistelty puheenaihe. Kloonaus voi tarkoittaa geneettisen kopion tuottamista yksilöstä, yhden solun kloonausta tai tietyn geenin monistamista. Esimerkiksi identtisten kaksosten synty tai suvuton lisääntyminen on kloonausta. Vajaa vuosisata sitten keinotekoisesti tehtävää kloonausta pidettiin täysin mahdottomana. Vuonna 1997 uutisointi Dollysta, tumansiirtotekniikalla kloonatusta lampaasta, aiheutti suurta kohua maailmalla ja mullisti vallitsevan käsityksen tekniikan mahdottomuudesta. Tietoisuus onnistuneesta kloonauksesta herätti myös pelkoa mahdollisuudesta kloonata ihminen tulevaisuudessa ja sen seurauksista. [1]

Tumansiirtotekniikka on menetelmä, jossa somaattisen solun tuma siirretään hedelmöittymättömään munasoluun. Tämän jälkeen saatu alkio siirretään sijaisemon kohtuun kasvamaan. Menetelmää voidaan käyttää esimerkiksi eläinyksilön kloonamiseen. [2] Tumansiirtotekniikalla on onnistuttu kloonamaan 23 nisäkäslajia, kuten lammas, hiiri, sika, kissa, koira, rotta ja nauta [3]. Tumansiirtotekniikka voidaan jakaa terapeuttiseen kloonaukseen ja reproduktiiviseen eli lisääntymiskloonaukseen. Terapeuttinen kloonaus tarkoittaa solujen kloonamista lääketieteellisiä hoitomenetelmiä varten. Lisääntymiskloonaus tarkoittaa uuden geneettisesti samanlaisen yksilön tuottamista. Tekniikkaa on käytetty muun muassa tuotantoeläinten kloonaukseen, uhanalaisten lajien elvyttämiseen sekä lääketieteellisiin tarkoituksiin. [2] [5]

Tumansiirron onnistumisprosentti on edelleen hyvin alhainen, vaikka keinoja sen parantamiseen on tutkittu paljon. Tehokkuuteen voidaan kuitenkin vaikuttaa lukuisin keinoin. Erityisesti epigeneettisten tekijöiden vaikutusta on tutkittu paljon. Vaikka prosessia ei vielä ymmärretä aivan täysin, on tumansiirtotekniikka kehittynyt viime aikoina paljon. Tulevaisuudessa voidaankin odottaa tumansiirtotekniikasta tulevan yhä vaivattomampaa, jolloin se tarjoaa uusia mahdollisuuksia lääketieteellisiin sovelluksiin ja lisääntymiskloonaukseen. Käytännön sovellusten lisäksi tumansiirtotekniikka tarjoaa pohjan epigenetiikan tutkimukselle. Sen avulla on saatu valtavasti tietoa geenien aktiivisuudesta ja siihen vaikuttavista tekijöistä. [2]

Tässä työssä käsitellään tumansiirtotekniikan erilaisia käyttökohteita, metodin kulkua käytännössä, tumansiirtotekniikkaan liittyviä ongelmia ja ratkaisuja sekä aihetta koskevia eettisiä kysymyksiä. Tumansiirtotekniikan käyttökohteita eritellään sekä lisääntymistarkoitteiseen kloonaukseen että lääketieteellisiin sovelluksiin liittyen. Metodin kulkua käytännössä käsitellään erityisesti uuden eläinyksilön tuottamisen näkökulmasta. Työssä tarkastellaan tumansiirtotekniikan epäonnistumiseen liittyviä tekijöitä ja kuvataan mahdollisia menetelmiä metodin parantamiseksi. Lisäksi tumansiirtotekniikkaan liittyviä eettisiä kysymyksiä tarkastellaan metodilla tuotetun uuden yksilön, sijaisemona toimivan yksilön ja yleisesti menetelmään liittyvän keinotekoisien alkionluomisen näkökannalta.

2. ELÄINTEN KLOONAUS TUMANSIIRTOTEKNIKALLA

2.1 Historiaa

Ajatus tumansiirtotekniikasta nousi esille ensimmäistä kertaa vuonna 1928 saksalaisen tutkijan Hans Spermannin kokeillessa siirtää salamanterin alkion solun tumaa munasoluun. Spermann esitti myös idean tuman siirtämisestä aikuisen somaattisesta solusta munasoluun, jonka tuma on poistettu. Kokeilu jäi kuitenkin toteuttamatta, sillä mikrokirurginen välineistö tumanpoistoon perimää vahingoittamatta ei ollut vielä tarpeeksi kehittyntä. Lisäksi uskottiin alkionkehityksen olevan mahdollista vain totipotenteista soluista, joilla on kyky erilaistua vielä minkä tahansa elimistön kudoksen soluiksi. Spermannia pidetään kuitenkin kloonauksen keksijänä. 1950-luvulla amerikkalaiset tutkijat Robert Briggs ja Thomas King onnistuivat kloonamaan nuijapäitä käyttämällä tumansiirrossa sammakon alkiorakkulan soluja, jotka olivat jo menettäneet osan totipotenteista ominaisuuksistaan. Myöhemmin samalla vuosikymmenellä brittiläinen tutkija John B. Gurdon raportoi nuijapäiden kloonauksesta käyttäen aikuisen sammakon erilaistuneita suoliston soluja. Tämä osoitti ensimmäistä kertaa, että jo erilaistuneen solun tuma pystyttiin siirtämään munasoluun ja tuottamaan siitä uusi alkio. Mekanismia ei kuitenkaan vielä ymmärretty. Gurdon sai saavutuksestaan Nobelin palkinnon vuonna 2012. [4]

Tutkimuksia sammakkoeläimillä jatkettiin, mutta merkittäviä tuloksia saatiin vasta 1970-luvun loppupuolella. Monet hiirillä tehdyt kokeet johtivat toistuvasti epäonnistumisiin ja alkionkehityksen pysähtymiseen. Nisäkkäiden kloonauksen tumansiirtotekniikalla ajateltiin olevan biologisesti mahdotonta. Aikakauden tutkijat olettivat aikuisen nisäkässolun olevan lopullisesti erilaistunut tietyksi solutyypiksi. Somaattisen solun uudelleenohjelmoinnin alkion kantasoluksi ajateltiin olevan mahdotonta. Teoriaa tukivat kokeet, joissa hiiren alkion kaksisolusteesta eristetystä solusta onnistuttiin tuottamaan elävä jälkeläinen tumansiirtotekniikalla, mutta nelisolusteesta eristetyllä solulla sama ei enää onnistunut. Myös muilla nisäkäslajeilla suoritetuilla kokeilla päästiin samaan lopputulokseen. 1980-luvulla lampaiden sekä nautojen alkioita onnistuttiin kloonamaan 16-soluusteesta. Lampeilla ja naudoilla tämä

kehitysvaihe on samankaltainen kuin hiirillä kaksisoluaste. Kehitysvaiheessa alkio alkaa tuottaa omaa siirtäjä-RNA:ta sekä omia proteiineja. [4]

Teoria erilaistuneiden solujen kelvottomuudesta nisäkkäillä tehtävään tumansiirtoon kumottiin 1990-luvun puolivälissä, kun naudan alkion sisämassan soluista onnistuttiin tuottamaan aikuinen elävä yksilö. Saavutuksen jälkeen alkoi Keith Campbellin johtama projekti, jossa kasvatettiin soluja kasvualustalla ja annettiin niiden erilaistua 28 päivän ajan. Käyttämällä kasvualustalta eristettyjä erilaistuneita soluja onnistuttiin tuottamaan tumansiirtotekniikalla elinkelpoisia jälkeläisiä. Solujen kasvuolosuhteet tehtiin kuitenkin tarpeeksi ravintoköyhiksi, jotta niiden solusykli hidastui. Tämän huomattiin olevan edellytys onnistuneelle tumansiirrolle. [4]

2.2 Ensimmäinen kloonattu nisäkäs

Toistuvat epäonnistumiset nisäkkäiden kloonauksessa saivat tutkijat pohtimaan solujen erilaistumisprosessin ja sen ajoituksen merkitystä nisäkäsolun kehityksessä. Erityisen kiinnostuneita oltiin muutoksista ilmenevissä geeneissä alkionkehityksen edetessä ja solujen erilaistuessa omiin tehtäviinsä. Yleisen käsityksen mukaan muutosten ajateltiin edelleen olevan peruuttamattomia, kunnes tutkijat onnistuivat tuottamaan elävän lampaan. [1] [4]

Ensimmäinen kloonattu nisäkäs oli lammas nimeltä Dolly, jonka tuottivat brittiläinen biologi Ian Wilmut ja hänen kollegansa Skotlannissa vuonna 1996. Muun muassa sammakoita, nautoja ja lampaita oli siis jo onnistuttu tuottamaan tumansiirtotekniikalla, mutta erona aikaisempiin kloonauksiin Dolly tuotettiin aikuisesta yksilöstä otetusta solusta. Tutkimusryhmä suhtautui skeptisesti kokeen onnistumiseen, ja yritys kloonata elävä yksilö somaattisesta solusta tehtiin täysin kokeilumielessä. Kokeen onnistuminen oli suuri yllätys, ja uutisointi Dollyn syntymästä saavutti maailmanlaajuisen huomion. Tapaus myös herätti valtavasti keskustelua mahdollisuuksista ja huolista koskien nisäkkäiden kloonauksia. [1] [4]



Kuva 1. *Dolly on esillä Skotlannin kansallismuseossa [1].*

Dolly kloonattiin aikuisen Finn-Dorset-rotuisen uuen rintarauhasesta otetusta solusta. Solu oli peräisin Campbellin johtaman projektin eräästä soluviljelmästä. Rykelmä soluviljelmän soluja yhdistettiin sähköpulsilla hedelmöittymättömiin munasoluihin, joista oli poistettu tumat. Sähköpulssi sai solut sulautumaan yhteen ja aikuisen lampaan solun tumen siirtymään munasolun tumaksi. Jotta aikuisen lampaan solun tuma saatiin toimimaan munasolun sisällä, vähennettiin solujen ravinnonsaantia varmuuden vuoksi. Tämän avulla niiden normaali kasvu sekä jakautumissykli hidastuivat ja solut saatiin lepotilaan. Välivaiheen tarpeellisuudesta ei ollut edelleenkään varmaa tietoa, mutta tutkijat olivat todenneet sen aikaisemmissa kokeissa hyödylliseksi. Munasolujen annettiin kasvaa ja jakautua, jolloin onnistuttiin saamaan joukko alkioita. Alkioita siirrettiin sijaisemona toimineen Skotlannin Blackface -rotuisen lammasnaaraan kohtuun. Kolmestatoista käytetystä lampaasta yksi tuli tiineeksi, ja 148 päivää myöhemmin syntyi Dolly. [1]

Dolly eli seitsemän vuoden ikäiseksi terveenä ja normaalilla sydämellä, aivoilla, keuhkoilla ja muilla elintoiminnoilla. Geneettisesti Dolly oli täysin samanlainen kuin lammas, jonka rintarauhasen solusta viljelmä oli tehty. Dolly lopetettiin vuonna 2003 etenevän keuhkosairauden vuoksi ja ruumis asetettiin esille Skotlannin kansallismuseoon. Myös Dolly-tekniikaksi kutsuttu metodi tunnetaan nykyään tumansiirtotekniikkana ja sillä on tuotettu suuri määrä kloonattuja nisäkkäitä erilaisia aikuisen nisäkkään soluja käyttämällä. Tekniikan toimivuuden toteamisen jälkeen sitä on kuitenkin rajoitettu tiukasti lainsäädännöllä. [1] [4]

2.3 Eläinten kloonaukseen ja sen haitat

Eläinten jalostuksessa käytetään tumansiirtotekniikkaa nykypäivänä jonkin verran. Kloonattuja eläimiä tuotetaan lähinnä tutkimustarkoitukseen. Geneettisesti samanlaisilla eläimillä on helpompi vertailla esimerkiksi eri lääkeaineiden vaikutuksia. Tumansiirtotekniikkaa käytetään muun muassa siirtogeenisten eläinten tuottamiseen tutkimuksia varten. Lisäksi eläimiä kloonataan tautimalleiksi. Esimerkiksi kloonattuja sikoja on käytetty Tanskassa Alzheimerin taudin tutkimiseen. [5] Myös hiiriä on yritetty tuottaa ihmisen tautimalliksi, mutta ongelmaksi on muodostunut hiiren ja ihmisen fysiologiset erot. Tautimalleiksi soveltuisivatkin parhaiten kädelliset eläimet. [6] Tuotantoeläintarkoituksessa muun muassa ravihevosiä, keinosiemennyssonneja ja muita perinnöllisesti arvokkaita eläinyksilöitä on kloonattu. Tuotantoeläinten kloonaukseen katsotaan taloudellisessa mielessä hyödyllisemmäksi kuin lemmikkien kloonauksen prosessin kalliiden kustannusten vuoksi. On siis hyödyllistä kloonata vain eläimiä, joiden perinnöllinen arvo on korkea. Myös tuotantoeläinten kloonaukseen on kuitenkin nykyään vielä vähäistä. Yksilön ominaisuuksiin vaikuttavat perimän lisäksi myös kasvuolosuhteet, joten kloonattu eläin ei ole välttämättä täysin samanlainen kuin alkuperäinen yksilö. [5] Vuonna 2018 apinoilla tehdyssä kokeessa onnistuttiin kloonamaan ensimmäistä kertaa kädellinen nisäkäs. Dolly-lampaan syntymän jälkeen tekniikan piti siis kehittyä vielä 20 vuotta, että onnistuttiin kloonamaan ensimmäinen kädellinen. [6]

Ongelmallista tumansiirtotekniikalla tehtävässä kloonauksessa on sen korkea hinta. Korkeat kustannukset johtuvat alhaisesta onnistumisprosentista. Yksi kloonattu eläin maksaa noin 10000 €, kun otetaan huomioon onnistumiseen vaadittavat yrityskerrat. Sijaisemon kohtuun siirretyistä kasvualustalla tuotetuista alkioista syntymään asti kehittyvät vajaa 10 %. Lisäksi on todettu, että osalla kloonatuista yksilöistä ilmenee kehityshäiriöitä, jotka johtavat kuolemaan nopeasti syntymän jälkeen. [5]

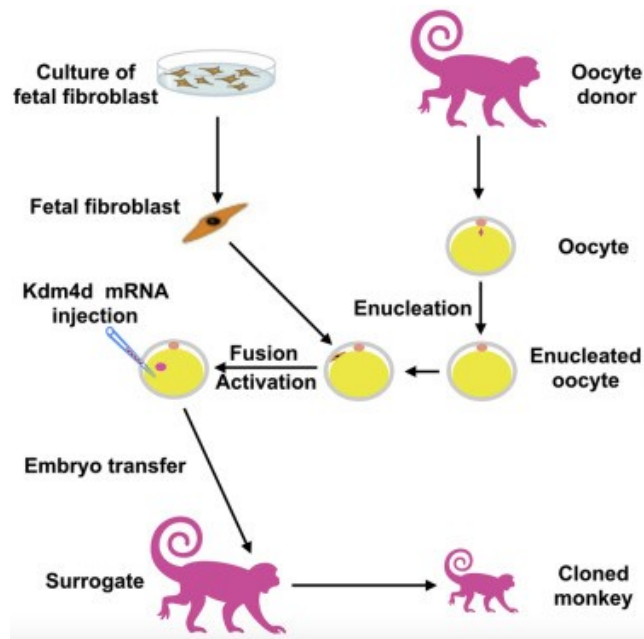
Eläinyksilöiden tuottamisessa kloonamalla nähdään mahdollisena ongelmana myös perinnöllisen biodiversiteetin väheneminen. Jos kloonaukseen käytetään arvokkaan jalostuseläimen kopioiden tuottamiseen, kaventaa se geenipoolia huomattavasti. Tällöin tietyn yksilön alleelit runsastuvat ja muut geenimuodot vähenevät ja harvinaisemmat mahdollisesti jopa katoavat. Geneettisesti mahdollisimman erilaisten yksilöiden olemassaolo on tärkeää, jotta myös jatkossa saadaan erilaisia

ominaisuusyhdistelmiä. Tämä vähentää perinnöllisten sairauksien ilmenemisen riskiä. Lisäksi uusien ominaisuusyhdistelmien synty mahdollistaa tulevaisuudessa yhä kelpoisempien yksilöiden synnyn. Tuotantoeläinten kloonauksen on tällä hetkellä niin vähäistä, että lajien perinnöllinen biodiversiteetti ei ole vielä vaarassa kaventua. [5]

Kloonattuihin eläimiin kohdistuvia terveysvaikutuksia on tutkittu vähän. Tumansiirtotekniikalla tehdyn kloonauksen on kuitenkin todettu aiheuttavan terveysriskejä sekä kloonatulle yksilölle että sijaisemolle. Esimerkiksi lampailta ja naudoilla on ilmennyt istukan toiminnan muutoksia kloonatun alkion kehityksen aikana. Kloonattua alkioita kanatavat sijaisemot saavat keskenmenon todennäköisemmin kuin perinteisesti tiineeksi tulleet yksilöt. Lisäksi kloonattujen sikiöiden on todettu olevan tavallista sikiötä useammin ylisuuria, minkä takia ne joudutaan keisarileikkaamaan. [5] Jopa alkion soluista tuotetuista vasikoista on todettu kasvavan suurella todennäköisyydellä normaalipainoista suurempia [4]. Normaalin kokoisten sikiöiden syntymässä ei kuitenkaan ole huomattu eroa tavallisen sikiön syntymään verrattuna. Esimerkiksi kloonattujen sikojen syntymäpainon on huomattu olevan tavallista alhaisempi ja kloonattujen nautojen kuolleisuuden ensimmäisinä elinkuukausina huomattavan korkea. [5] Lisäksi kloonatuilla eläimillä on havaittu hengitysongelmia, liikalihavuutta ja puutteita immunologisen järjestelmän toiminnassa [6]. Aikuisiksi eläneiden kloonattujen sikojen tai nautojen terveydentilassa ei ole huomattu eroa kloonamattomiin yksilöihin verrattuna. Kloonattujen yksilöiden jälkeläisten elintoiminnoissa tai terveydentilassa ei ole havaittu kloonauksen aiheuttamia muutoksia muihin saman lajin yksilöihin verrattuna. [5] Tutkimukset ovat myös osoittaneet, että koska kloonatut eläimet eivät poikkea geneettisesti toisistaan, ovat alttiut kehityshäiriöille ja metodin heikko tehokkuus epigeneettisiä tekijöitä [4].

2.4 Nisäkäsalkion tuottaminen tumansiirtotekniikalla käytännössä

Tumansiirtotekniikka sisältää kolme päävaihetta, jotka ovat tuman poisto munasolusta, solujen yhdistäminen sekä aktivaatio. Kun munasolusta on poistettu tuma, somaattisen solun tuma joko injektoidaan munasolun sisään tai yhdistetään solut toisiinsa. Tämän jälkeen saatu alkio aktivoidaan toimimaan. [6]



Kuva 2. Tumansiirtotekniikan päävaiheet [3].

Kun somaattisen solun tuma on siirretty munasolun sisään, hajoaa sen tumakotelo nopeasti. Tumakotelon sisällä olleet kromosomit tiivistyvät samoin kuin tumanjakautumisen metafaasi-vaiheessa. Kromosomien tiivistyminen tapahtuu munasolun solulimassa olevien proteiinien vaikutuksesta. Tämä on välttämätön vaihe tumansiirrossa, sillä ilman kromosomien tiivistymistä muodostuvan alkion on huomattu johtavan kehityshäiriöön. Tiivistymisen aikana myös suurin osa kromatiiniin sitoutuneista somaattisesta solusta peräisin olevista proteiineista irtoaa. Kromosomien tiivistymisvaihe kestää siihen asti, että yhdistelmäsolu aktivoidaan. [6]

Perinteisessä hedelmöityksessä siittiön mukana välittyvä fosfolipaasi C -entsyymi katalysoi munasolun aktivoitumisen. Entsyymi kuitenkin puuttuu tumansiirrolla hedelmöitetystä solusta, joten solu on aktivoitava keinotekoisesti. Esimerkiksi hiirellä tehdyissä kokeissa käytetään usein strontiumkloridikäsittelyä yhdistelmäsolun aktivoimiseksi. Kädellisillä tehokkaammaksi on huomattu sähköpulsilla tai kalsiumionoforilla tehty aktivaatio. [6]

Nisäkkäiden munasolut ja siittiöt ovat transkriptionaalisesti inaktiivisia. Hedelmöityksen jälkeen tsygootin genomi aktivoidaan toimimaan, mikä tapahtuu eri lajeilla eri aikaan alkionkehityksessä. Tällöin munasolusta peräisin oleva RNA hajotetaan

ja korvataan tsygootissa tuotetulla RNA:lla. Myös tumansiirtotekniikalla tuotetuissa alkioiden mekanismi tapahtuu samalla lailla. [6]

Tumansiirrolla tuotetun alkion genomi on peräisin somaattisesta solusta. Somaattinen solu on jo erilaistunut toimimaan tietyn kudoksen soluna. Genomi täytyy siis uudelleenohjelmoida alkion kantasolun genomiksi, jotta solu voi aloittaa jakautumis- ja erilaistumisprosessin. Uudelleenohjelmointiin ei ole vielä nykyään vakiintunutta tekniikkaa, mutta se tapahtuu pääasiassa epigeneettisiä tekijöitä muokkaamalla. Epigeneettisiä tekijöitä ja niiden vaikutuksia tumansiirron onnistumiseen on tutkittu viime aikoina paljon. Tiedon lisääntyessä uudelleenohjelmointitekniikat paranevat jatkuvasti. [4] [6] [7]

Kun alkiota on kasvatettu kasvualustalla muutaman päivän ajan, siirretään se valeraskaaksi tehdyn naaraan kohtuun kasvamaan. Saman naaraan kohtuun siirretään varmuuden vuoksi useampi alkiota. Jos tumansiirto on täysin onnistunut, synnyttää naaras elävän ja terveen jälkeläisen. Jälkeläinen on geneettinen kopio solun luovuttaneesta eläimestä. [5]

3. TUMANSIIROTEKNIIKAN ONGELMAT JA RATKAISUJA

3.1 Tumansiirron epäonnistumiseen johtavat syyt

Tumansiirtotekniikalla tehtävä kloonaminen luovuttajan solutyypistä riippumatta sisältää ongelmia kaikissa yksilönkehityksen vaiheissa. Yksilönkehitys voi keskeytyä ennen alkion implantaatiota kohdun seinämään, alkion- tai sikiönkehityksessä tai syntymän jälkeen. Yksilönkehityksen keskeytymiseen johtavia tekijöitä on monia, mutta syyt voidaan jakaa neljään pääryhmään. Keskenmenoon johtavia syitä ovat solun vahingoittuminen mikromanipulaatiossa, munasolun kelvottomuus, viljelmässä ilmenevät poikkeamat sekä luovuttajan genomien epäonnistunut uudelleenohjelmointi. Tumansiirtotekniikan onnistumisessa on huomattavia eroja tutkimusryhmien välillä riippuen koeolosuhteista. Onnistuneen tumansiirron aikaansaamiseksi kaikki yksilönkehitykseen vaikuttavat tekijät on otettava huomioon. Alan tieteellisissä julkaisuissa raportoidaan erilaisista onnistumisasteista, mutta korkeintaan 5-10 % sijaiskohtuun siirretyistä alkioista kehittyi elinkelpoisiksi jälkeläisiksi. [4]

Tutkimuksissa on huomattu geenien ilmenevän eri lailla riippuen siitä, miten DNA:n kromatiinin fysikaalisia ja biokemiallisia ominaisuuksia muokataan. DNA:n metylointia ja histonien muokkausta tutkitaan koko ajan lisää ja niiden asema tumansiirron onnistumisessa muuttuu jatkuvasti tiedon lisääntyessä. Niihin liittyy lisäksi suuri joukko erilaisia ympäristötekijöitä. Epigeneettiset tekijät muodostuvat alkionkehityksen muutaman ensimmäisen päivän aikana. Näiden päivien aikana tapahtuva epigeneettinen uudelleenohjelmointi on merkittävässä roolissa alkionkehityksen etenemisessä elävän yksilön syntymään asti. Ensimmäisten päivien aikana tapahtuva epigeneettisten tekijöiden muokkaus on todettu kaikilla nisäkäslajeilla välttämättömäksi onnistuneen uuden yksilön tuottamisen kannalta. [4] [6]

Suurimpana syynä tumansiirtotekniikan epäonnistumiselle pidetään genomien uudelleenohjelmoinnin epäonnistumista. Kaikissa epänormaaliksi kehittyneissä alkioissa tai syntymään asti kehittyneissä yksilöissä on todettu geenien virheellinen aktivaatio. Solun geeniekspressio syntyy alkionkehityksen muutaman ensimmäisen päivän aikana munasolun ja luovuttajan solun yhdistyttyä. Virheellisen geeniekspression muodostumista on tutkittu esimerkiksi seuraamalla kloonattujen vasikoiden X-

kromosomissa tapahtuvaa inaktivoitumista. Inaktivaatiota on havaittu vain isältä peräisin olevassa X-kromosomissa. On huomattu, että riittämätön epigeneettisten tekijöiden muokkaus aiheuttaa geenien ilmenemisen epänormaalilla tavalla ja johtaa siis kehityshäiriöihin. [6] [4]

Epigenomin kehitys tapahtuu ennen tsygootin implantaatiota kohdunseinämään. Kehitys tapahtuu ja siihen liittyvät tekijät sijaitsevat munasolun sytoplasmassa. Vaikka tumansiirtoon liittyvät kokeet osoittavat, että joissain tapauksissa epigenomin uudelleenohjelmointi saattaa onnistua, ei munasolu yksin ole kehittynyt ohjaamaan geenien ilmentymistä. Tästä syystä on ymmärrettävää, miksi tumansiirtotekniikalla tehtävä kloonauus onnistuu melko pienellä todennäköisyydellä. Myös tämä teoria tukee ajatusta siitä, että solun epäonnistunut uudelleenohjelmointi on pääsyy alkioden suureen kuolleisuuteen. [4]

3.2 Tumansiirtotekniikkaan liittyvät epigeneettiset modifikaatiot

DNA:n metylaatio on eräs ensimmäisistä ja laajimmin tutkituista epigeneettisistä tekijöistä. DNA:n metylaatio geenien promoottorialueilla on tärkeässä roolissa transkription säätelyssä. Metylaation tärkeys korostuu somaattisissa soluissa, joissa kaikki geenit eivät ole toiminnassa, ja transkriptiota tapahtuu vain osassa geneeistä. Tämän takia somaattisissa soluissa transkriptiota täytyy rajoittaa enemmän totipotentteihin tai pluripotentteihin soluihin verrattuna. Tumansiirtotekniikalla tuotetun alkion DNA täytyy ensin demetyloidä, eli metyyliiryhmät irrotetaan promoottorialueilta. Somaattisen solun DNA on usein voimakkaasti metyloitunut, joten demetylaatiolla saavutetaan alkion kantasolun metylaatiotaso. Demetylaation jälkeen DNA:n annetaan metyloitua uudelleen. Näiden vaiheiden seurauksena lopputulos on yleensä kuitenkin normaalista poikkeava. Onkin huomattu, että tumansiirtotekniikalla tuotetun alkion metylaatio tapahtuu virheellisesti. Tämä johtuu siitä, että osa metylaation aiheuttavista proteiineista puuttuu tumansiirtotekniikalla tuotetusta alkioista. [6] [4]

Alkion kantasolun demetylaation tapahtumiseen tarvittavia tekijöitä ovat muun muassa DNA:n deaminaatio ja solun omat korjausmekanismit vaurioituneelle DNA:lle. Solun omat korjausmekanismit tarkoittavat esimerkiksi väärin laskostuneen DNA-jakson poistoa ja uudelleenrakennusta tai virheellisten nukleotidien korvausta. Tämänkaltaiset tekijät saavat alkion kantasolun hypometyloituneeseen tilaan, jossa

geenit ovat aktiivisia. Somaattinen solu puolestaan on normaalisti hypermetyloituneessa tilassa. Tutkimuksissa on huomattu, että somaattisen solun genomien hypometylointi ennen tumansiirron suorittamista tehostaa alkion kantasolujen tuottamista. Tämä ei kuitenkaan ole järkevää, jos halutaan tuottaa eläviä jälkeläisiä. [4]

On todettu, että tumansiirron jälkeen luovuttajan solun histonit korvautuvat munasolusta peräisin olevilla histoneilla. Tämä on välttämätöntä, jotta kromatiini pakkautuu oikein ja toimii yhdistelmäsolussa. Epigeneettiseen uudelleenohjelmointiin ja transkription säätelyyn vaikuttavat myös histonien modifikaatiot. Modifikaatiot tarkoittavat esimerkiksi histonien kovalenttista asetylaatiota, fosforylaatiota tai metylaatiota. Modifikaatioita käytetään tumansiirtotekniikassa histonien muokkaamiseen siten, että niistä saadaan samankaltaisia kuin alkion kantasolun histonit. Erityisesti histonien somaattisissa soluissa ilmenevää kovalenttista modifikaatiota H3K9me3 on tutkittu paljon ja sillä on huomattu olevan yhteys useaan genomien uudelleenohjelmoinnin epäonnistumiseen liittyvään tapahtumaan. H3K9me3 modifikaation poistamisen on huomattu tehostavan tumansiirtoa. Poistaminen on suoritettu esimerkiksi injektoimalla soluun KDM4A-mRNA:ta, joka koodaa H3K9me3-demetylaasia. Lisäksi muun muassa histonien asetylaation on todettu parantavan tumansiirron onnistumistodennäköisyyttä merkittävästi. Asetylaatio liittyy geenien aktivoitumiseen, mutta geenin aktiivisen muodon saavuttamiseksi vaaditaan myös muita tekijöitä. Lisäksi tarvitaan oikeanlainen DNA:n konfiguraatio, jotta transkriptio on mahdollinen. Histonien modifikaatioilla siis pyritään myös muokkaamaan histoneita siten, että niiden asetylaatiota on mahdollista lisätä. Näin genomi muuttuu muokattavammaksi sekä soveltuvammaksi uudelleenohjelmointiin. [4] [6]

3.3 Kromatiinirakenne ja transkriptiotekijät tumansiirtotekniikassa

Alkionkehityksen aikana tapahtuvat morfologiset ja toiminnalliset muutokset johtavat elintoimintojen asteittaiseen kehitykseen ja yksilön fysiologisen järjestelmän muodostumiseen. Prosessia ohjaavat muutokset geenien ilmenemisessä. Muutoksia aiheuttavat geenien inaktivoitumista säätelevät transkriptiotekijät ja kromatiinirakenteen muutokset. Kromatiinin epigeneettiset ja rakenteelliset muutokset alkavat pian hedelmöityksen jälkeen ja jatkuvat koko kehityksen ajan aikuisikään asti. Tumansiirtoa tehtäessä on luovuttajan somaattisen solun geenien inaktivaatio purettava ja

kromatiinirakenne muutettava alkion solun kromatiinirakenteen kaltaiseksi. Muutokset saa aikaan munasolussa ilmenevät tekijät. Vastaanottajan munasolun on siis sisällettävä transkriptiotekijät, jotka aloittavat alkion geenien aktivaation säätelyn. Lisäksi luovuttajan solun kromatiinirakenteen on oltava muovattavissa. Kromatiinin rakenteen onnistunutta muovausta pidetään määrävänä tekijänä alkion normaalin kehityksen kannalta. [4] [6]

Jo 1970-luvulla tehdyt tutkimukset osoittivat, että geneettinen DNA on kierretty histoniproteiinien ympärille. Histoniyksikkö muodostaa oktameerin, jonka ydin koostuu neljästä eri proteiinista. Histonien ympärille kiertynyt DNA muodostaa nukleosomeja. [4] Nukleosomi on siis kromatiinin toistuva yksikkö, joka sisältää 147 emäsparia DNA:ta. [6] Nykyään tiedetään, että DNA asettuu histonien ympärille siten, että transkriptionaaliset osat ovat ulompana ja muu DNA ytimen alueella. DNA:n kiertymisellä histonien ympäri on suuri vaikutus geenien ekspressioon ja solujen erilaistumiseen. Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että kromatiinin kiertyminen histonien ympärille on merkittävämpi tekijä solun erilaistumisessa kuin pelkästään geenien ekspressio. Tällöin myös tumansiirron jälkeen kromatiinin täytyy kiertyä uudelleen oikealla tavalla, jotta lopputulos on onnistunut. [4] [6]

Eri solutyypeissä ilmenee erilaisia transkriptiotekijöitä. Transkriptiotekijöinä toimivat proteiinit ovat ensimmäisiä, jotka aloittavat geeniekspression luomisen sitoutumalla kohdepaikkaansa DNA-ketjussa. Ne indusoivat genomien uudelleen järjestäytymistä mahdollistaen muiden proteiinien ja ryhmien kiinnittymisen DNA:han. Esimerkiksi hiiren alkion kantasolun transkriptiotekijät OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 ja ESRRB ovat yleisesti käytössä pioneeritranskriptiotekijöinä tumansiirrossa. Näillä proteiineilla on kyky ohjata kasvualustalla kasvatetut solut takaisin pluripotentiin tilaan. Tumansiirrossa käytettävälle solulle voidaan määrittää pioneeritranskriptiotekijät ja saada näin DNA järjestäytymään ja kiertymään oikealla tavalla histoniproteiinien ympärille. [4]

Nykytekniikan avulla pystytään erottamaan lukuisia eri transkriptiotekijöitä soluista. On todettu, että kaikilla solutyypeillä suurin osa DNA:n sitovista kohdista on vapaina, mikä johtuu luultavasti vastinjuosteen asettumisesta sitoutuvien proteiinien ulottumattomiin. Aktiivisesti sitoutuneet kohdat ovat asettautuneet pieneen rykelmään, joka käsittää vain noin 0,8 prosenttia koko genomista. Tämänkaltaiset havainnot ovat johtaneet päätelmään, että jokaiselle solutyypille ominaiset transkriptiotekijöiden yhdistelmät sitoutuvat oikeisiin kohtiin DNA:ssa määräten DNA:n kolmiulotteisen

laskostumisen. Kolmiulotteisen laskostumisen myötä määräytyy siis myös geenien ekspressio. Pioneeritranskriptiotekijät sitoutuvat ensimmäisenä DNA-juosteesta 0,8 prosenttia käsittäville sitoutumisalueille mahdollistaen muiden proteiinien kiinnittymisen. Kromatiinirihman kolmiulotteisen rakenteen muodostuttua kohesiini-proteiinien sitoutuminen stabiloi sen. Tällöin DNA jakautuu alueisiin, joihin proteiinit pystyvät sitoutumaan ja alueisiin, jotka ovat niiden ulottumattomissa. Kohesiini-proteiinien sitoutuminen on tärkeää erityisesti DNA:n replikoituessa, jotta sitoutumiskohtien konformaatio säilyy stabiilina. Kaikkien muiden transkriptiotekijöiden on nimittäin todettu eliminoituvan jakautumisen aikana. Tämä kohesiini-proteiinien ylläpitämä konformaatio säilyy läpi solun jakautumisen emosolulta tytärsoluille. Tumansiirrossa rakenne on ensin rikottava ja sen jälkeen palautettava myöhemmin alkionkehityksen aikana. [4]

4. SOLUJEN UDELLEENOJELMOINTI

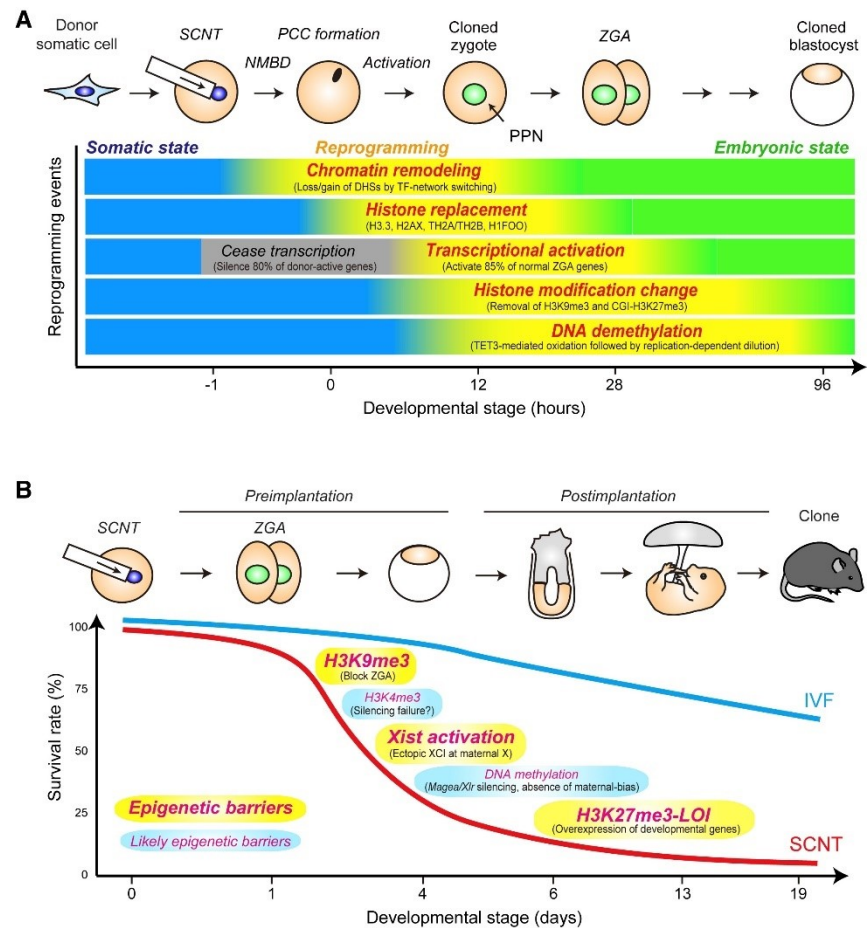
4.1 Teoria uudelleenohjelmoinnin taustalla

Eräs tumansiirtotekniikan merkittävä käyttökohde on alkion kantasolujen tuottaminen somaattisista soluista. Somaattisen solun uudelleenohjelmointi alkion kantasolun tilaan on hidas prosessi. Uudelleenohjelmointi voidaan suorittaa joko tumansiirtotekniikalla tai indusoimalla somaattinen solu pluripotenttiin tilaan tuottaen iPS-soluja. [4] Tumansiirtotekniikalla saadaan totipotentteja soluja ja iPS-solu-tekniikalla pluripotentteja soluja. Tumansiirtotekniikalla tehtävä uudelleenohjelmointi kestää muutamia tunteja, kun taas iPS-solujen tuottaminen vie aikaa muutamasta päivästä viikkoihin. [6] Uudelleenohjelmointi vaatii kromatiinirakenteen toistuvaa purkamista ja uudelleenkokoamista. Lähes kaikkien somaattisten solujen katsotaan olevan uudelleenohjelmoitavissa alkion kantasoluiksi, kunhan olosuhteet ovat sopivat ja uudelleenohjelmoitumiselle annetaan tarpeeksi aikaa. Solujen uudelleenohjelmoitumista voidaan arvioida blastokystien tuotantonopeuden, kyvyn tuottaa alkion kantasoluja tumansiirrolla tuotetuista alkiosta sekä eläväksi yksilöksi kehittyvien alkioiden osuuden perusteella. Paras mittari uudelleenohjelmoinnin täydelliselle onnistumiselle on eläväksi yksilöiksi kehittyvien alkioiden prosentuaalinen määrä. [4]

Vastaanottajan munasolu ei ole transkriptionaalisesti aktiivinen tumansiirtoa suoritettaessa. Tällöin kaikki solun toimintaan ja somaattisen solun tumauudelleenohjelmoimiseen tarvittavat proteiinit on oltava munasolussa valmiina. Onnistuneeseen uudelleenohjelmointiin tarvitaan munasolussa olevia transkriptiotekijöitä, nukleosomaalisia komponentteja sekä kromatiinin muokkaukseen käytettäviä entsyymejä. Uudelleenohjelmoinnin onnistuminen perustuu siihen, kuinka hyvin komponentin löytävät oikean paikkansa DNA:ssa ja toimivat transkription eri vaiheissa. Myös transkription oikeanlainen säätely vaaditaan solujen toimintaan ja erilaistumiseen alkion kehittyessä. Kloonattuja alkiota tutkittaessa on todettu, että aikuisiksi asti kehittyneillä kloonilla transkriptio toimii täysin samanlailla normaaleihin yksilöihin verrattuna. Variaatiot kloonien geeniekspressioissa ovat korkeat, mutta epänormaalin transkriptionaalisien toiminnan omaavat yksilöt eivät yksinkertaisesti selviä syntymään asti. [4]

Solun erilaistumiseen liittyvät vaiheet tapahtuvat aina samanlailla tietyn kaavan mukaisesti. Vakiintuneesta prosessista huolimatta tumansiirrolla tuotetut alkiot ovat hyvin usein epänormaaleja ja niiden geeniekspressio on luovuttajan somaattisen solun ja vastaanottajan munasolun välimuoto. Lisäksi ne usein keskeytyvät jossain kohtaa raskauden aikana, sillä tumansiirrolla tuotetut alkiot eivät pysty kunnolla vastaanottamaan ulkopuolelta tulevia signaaleja ja reagoimaan niihin. Vaikka yhdistelmäsolu pystyisikin suorittamaan kaikki normaalin solun perustoiminnot, voi sen geeniekspressio olla silti välimuoto. On myös huomattu, että tietyt alueet genomista uudelleenohjelmoituvat helpommin kuin toiset ja että munasolu ei pysty aina estämään tiettyjen aktiivisten geenien transkriptiota. Jos somaattisessa solussa sijaitsevaa aktiivista geeniä ei onnistuta sammuttamaan uudelleenohjelmoinnissa, saattaa kohesiini-proteiini kiinnittyä siihen ja vaikuttaa koko kromatiinin kiertymiseen. Tutkimukset ovat osoittaneet, että poikkeavan geeniekspression muodostuminen alkaa jo yksisoluaasteella ja jatkuu läpi alkionkehityksen. [4]

Somaattisen solun kromatiinin kolmiulotteisen rakenteen rikkominen ja uudelleenkokoaminen tapahtuu hitaasti luovuttajan munasolun sytoplasmalle altistumisen jälkeen. Uudelleenmuodostuminen kestää useita solusyklejä. Alkion onnistuneen kehityksen ja uudelleenohjelmoinniseen vaadittavien solusyklien määrän välillä on huomattu yhteys. Mitä useamman solunjakautumisen uudelleenohjelmointi kestää, sitä suuremmalla todennäköisyydellä alkiosta kehittyä normaali. Esimerkiksi naudan solu jakautuu kolme kertaa ennen kuin transkriptio alkaa, kun taas hiiren solu jakautuu vain kerran. Naudan jälkeläisten tuotanto on 5-10 kertainen hiiriin verrattuna. Suurempi solusyklien määrä ennen transkription aloittamista tarkoittaa suurempaa todennäköisyyttä sille, että transkriptiotekijät sekä kohesiini-proteiinit löytävät oikeille paikoilleen ja sitovat DNA:n oikeanlaiseen kolmiulotteiseen muotoon. Tumansiirtotekniikalla tuotettavien alkoiden genomien uudelleenohjelmointi tapahtuu kuitenkin edelleen liian nopeasti ja oikeanlainen geeniekspressio ei sen takia yleensä ehdi muodostua. [4]



Kuva 3. Solun uudelleenohjelmointiin vaikuttavat tekijät [6].

Viime aikoina sekvensointitekniikat ovat kehittyneet nopeasti. DNA:n helppo sekvensointi on mahdollistanut solun transkriptomin ja epigeneettisten muutosten tutkimisen uudelleenohjelmoinnin aikana. [6] Tumansiirtotekniikan kannalta merkityksellisiä löydöksiä solun uudelleenohjelmoinnin tutkimisessa on kaksi. Ensimmäiseksi muutokset geenien transkriptiossa eivät indikoi suoraan todellista uudelleenohjelmoinnin onnistumista. Toiseksi DNA:n promoottorien tehostaja-alueiden epigeneettiset muutokset kuvaavat paremmin tumansiirron onnistumista kuin muutokset kromatiinin rakenteessa ja DNA:n metylaatiotasot. [4] Edellä mainitun kaltaiset löydökset ovat tehneet mahdolliseksi myös saavutuksen kloonata kädellinen apina. [6]

4.2 Paranneltu uudelleenohjelmointitekniikka

Vuorovaikutukset proteiinien ja somaattisesta solusta peräisin olevan kromatiinirihman välillä ovat monimutkaisia. Usein somaattinen solu ja munasolu yhdistetään toisiinsa sähköpulsseilla, joten yhdistelmäsolun solulima on yhdistelmä molempien solujen sytoplasmoista. Tällöin saatu solu siis sisältää kummastakin solusta peräisin olevat soluliman proteiinit. Tietysti munasolun solulima on tilavuudeltaan paljon isompi, joten yhdistelmäsolussa on vain murto-osa somaattisen solun proteiineja. Munasolusta peräisin olevien proteiinien on siis muokattava DNA:ta siten, että solusta tulee jälleen totipotenti. Tästä vastaavat proteiinit joutuvat yhdistelmäsolussa vuorovaikutukseen proteiinien kanssa, joita ei normaalisti ole munasolussa. Lisäksi somaattisen solun kromatiinin rakenne ja tila on munasolulle vieras. On tärkeää, että somaattisen solun kromatiini on tietyssä tilassa hetkellä, jona se yhdistyy munasolun kanssa ja kohtaa munasolun soluliman proteiinit. Tämän takia somaattisen solun kromatiinia muokkaamalla ennen sen siirtämistä munasoluun on tumansiirron onnistumistodennäköisyyttä mahdollista parantaa. Aihetta ja sen vaikutuksia alkioiden kehityksen onnistumiseen on tutkittu paljon. [4]

Erilaistuneen somaattisen solun on tarkoitus ylläpitää kromatiinin rakennetta, jotta solu säilyttää toimintansa samanlaisena. Näin sen fenotyyppi siis on koko ajan samanlainen. Lisäksi solussa täytyy ilmetä koko ajan samat epigeneettiset tekijät, jotta sen ilmiö säilyy. Tumansiirtotekniikalla tehtävä uudelleenohjelmointi tapahtuu munasolussa sijaitsevien proteiinien vaikutuksesta. Tällöin on loogista, että altistamalla somaattista solua toistuvasti munasolun solulimalle, saadaan sen DNA:ta muokattua valmiiksi haluttuun suuntaan tumansiirtoa varten. [4]

Erään teorian mukaan siis kromatiinin altistaminen munasolun solulimassa sijaitseville tekijöille parantaa kloonauksen tehokkuutta. Tämä voidaan toteuttaa esimerkiksi inkuboimalla permeabilisoituja somaattisia soluja liuoksessa, jossa on munasolussa sijaitsevia tekijöitä. Tällaisten kokeiden on osoitettu parantavan elävien kloonien syntymistodennäköisyyttä. Menetelmää käyttämällä on kuitenkin huomattu poikkeamia transkriptiossa ja istukan muodostumisessa. Metodi tarvitsee siis vielä lisää kehitystä, ennen kuin se on täysin käyttökelpoinen. Esimerkiksi lampailla tehdyt kokeet ovat osoittaneet, että kromatiinin esikäsitteilyllä elävien jälkeläisten määrä lähes viisinkertaistui. Tuloksia kuitenkin kompensoi korkea synnytyksen jälkeinen kuolema,

jolloin tehokkuus jäi enää 1,9 kertaiseksi. Ei ole varmaa tietoa, johtuuko synnytyksen jälkeinen kuolema kromatiinin esikäsittelystä. [4]

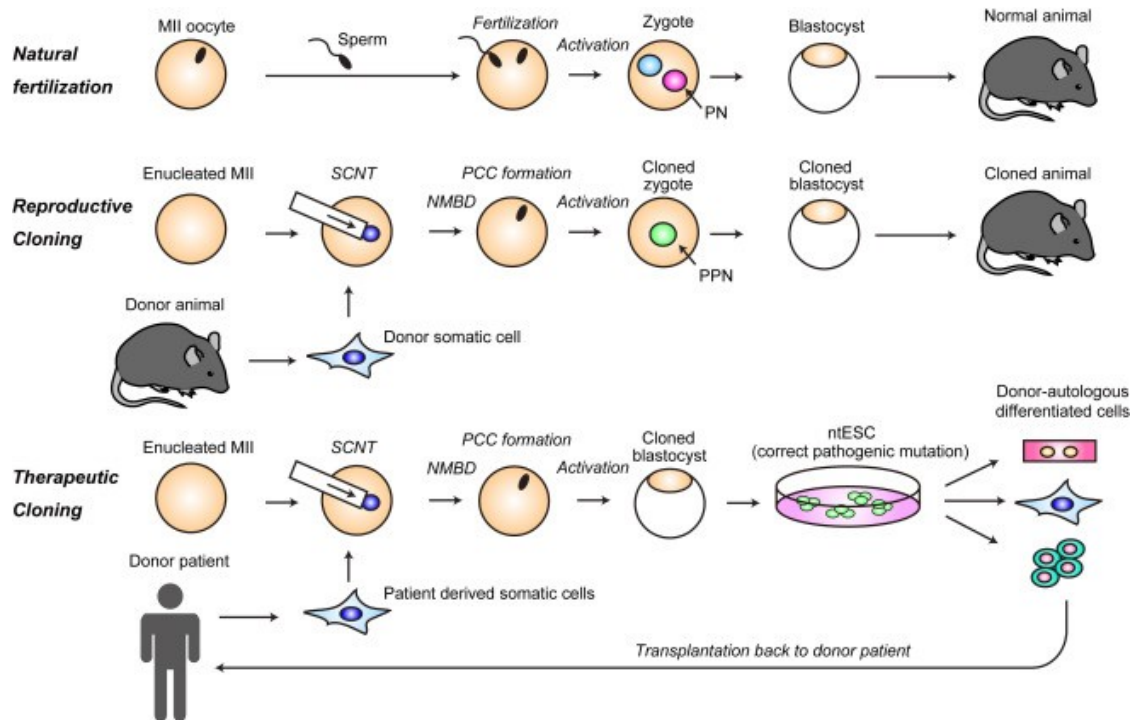
Tutkimuksia kloonauستهokkuuden parantamisesta on tehty myös altistamalla somaattisen solun kromatiini histoni-deasetylaasi-inhibiittoreille ennen tumansiirtoa. Alun perin tarkasteltiin käsittelyn vaikutusta blastokystien kehitykseen. Inhibiittorin käytöstä ei huomattu aluksi olevan merkittävää hyötyä, mutta epäonnistumiset voidaan selittää väärin inhibiittoripitoisuuksien käytöllä. Myöhemmissä tutkimuksissa on nimittäin saatu inhibiittorin pitoisuutta täsmentämällä nostettua kloonattujen jälkeläisten määrää. Laajin esimerkki aiheesta on hiirellä suoritettu sarjakloonaus, jossa saatiin tuotettua klooneja tumansiirtotekniikalla jopa 25 sukupolven verran. Kloonaus suoritettiin käsittelemällä kromatiinia histoni-deasetylaasi-inhibiittoreilla. Kokeita on tehty myöhemmin vielä lisää sekä hiirillä että sioilla ja tulokset osoittavat histonien asetuloinnin parantavan kloonauستهokkuutta. [4]

DNA:n muokkaamisessa on myös kääntöpuolensa. Kaikki muutokset, jotka vaikuttavat positiivisesti tiettyjen geenien transkriptioon, voivat vaikuttaa negatiivisesti joihinkin toisiin geeneihin. Tämän takia DNA:han tehtävät muutokset täytyy suorittaa varoen. Tumansiirtotekniikalla tehtävää kloonausta ei pystytä hyödyntämään kunnolla ennen kuin ongelmat solun uudelleenohjelmoinnissa ymmärretään täysin. Lisäksi vielä kukaan ei ymmärretä kunnolla mekanisme, joka tapahtuu tumansiirron onnistuessa. On myös hämmästyttävää, että somaattisen solun kromatiinille tehtävän runsaan käsittelyn jälkeen se edes toimii munasoluun siirrettynä. Solut on luotu selviytymään geneettisten tai epigeneettisten poikkeamien ilmetessä. Tämän takia somaattisen solun geeniekspression purkamisen ei tarvitse tapahtua täydellisesti, jotta kloonattu alkio selviytyy ja kehittyy syntymään asti. [4]

4.3 Mahdollisuudet ja käyttökohteet

Solujen uudelleenohjelmointi tarjoaa pohjan monelle epigenetiikan alan tutkimukselle sekä mahdollisuuden erilaisiin lääketieteellisiin sovelluksiin. [7] Tumansiirtotekniikka nähdään potentiaalisena keinona lääketieteessä tuottaa potilaan soluille identtisiä alkion kantasoluja erilaisia korvaushoitoja varten. Tätä kutsutaan terapeuttiseksi kloonaukseksi. [6] Tuottamalla potilaan solujen kanssa identtisiä soluja päästään eroon elimistön mahdollisista hylkimisreaktioista. Metodi on edelleen kokeiluasteella ja tuloksia

on saavutettu muun muassa hiirillä tehdyillä kokeilla. Kädellisillä ongelmaksi on muodostunut heikko kantasolujen tuotto ja alkionkehityksen aikainen pysähtyminen. Kokeita on suoritettu kuitenkin myös esimerkiksi apinoille ja onnistuttu saamaan tuloksia, jotka osoittavat metodin olevan potentiaalinen. [7]



Kuva 4. Luonnollinen kloonauus, lisääntymiskloonauus ja terapeuttinen kloonauus [6].

Alkion kantasolut eli totipotentit solut voivat erikoistua miksi tahansa elimistön kudostyyppin soluiksi. Totipotentteja soluja ovat esimerkiksi hedelmöittyneen alkion solut ensimmäisten jakautumiskertojen ajan. Tavallisessa hedelmöityksessä munasolussa sijaitsevat tekijät muokkaavat siittiön jo erilaistuneen perimän takaisin totipotentiksi. [6] Tämä tarkoittaa, että jos potilaan solujen kanssa identtisiä totipotentteja soluja pystyttäisiin tuottamaan biotekniikan keinoin, voitaisiin soluja käyttää korvaamaan elimistön kudosten sairastuneita tai vaurioituneita soluja. [7]

Potilaan somaattinen solu on mahdollista siirtää munasolun sisään ja saada sen perimä ohjelmoitua jälleen alkion kantasolun tasolle. Tämän jälkeen kehittyvästä blastokystistä eristetään potilaan solujen kanssa identtisiä soluja. Potilaan soluissa ilmenevät mahdolliset mutaatiot voidaan poistaa, jolloin saadaan terveitä soluja

korvaushoitoa varten. Myös mahdollisuudesta hoitaa aineenvaihduntasairauksia tumansiirtotekniikalla tuotetuilla soluilla on esitetty teorioita. Aineenvaihduntasairaudet johtuvat mitokondrion toimintahäiriöistä. Tumansiirtotekniikalla tuotetuissa soluissa mitokondriot ovat peräisin munasolusta eivätkä potilaan somaattisesta solusta. Solumekanismeja ei ymmärretä vielä täysin, joten kädellisillä tehdyissä tutkimuksissa korvaushoidoissa käytetyt solut saattavat lisääntyä hallitsemattomasti ja muodostaa kasvaimia. Korvaushoitojen lisäksi potilaasta johdettuja uudelleenohjelmoituja soluja voidaan käyttää myös tautimalleina lääkkeiden seulontaan ja arviointiin. [7] [6]

5. ETIIKKA JA LAINSÄÄDÄNTÖ

Tumansiirtotekniikkaa koskevia eettisiä kysymyksiä voidaan tarkastella lisääntymiskloonaukseen tai terapeuttiseen kloonaukseen liittyen. Lisääntymiskloonauksessa on siis tarkoitus tuottaa uusi yksilö jo olemassa olevan yksilön genomista. Terapeuttinen kloonauus taas tarkoittaa tumansiirtotekniikan käyttöä muuhun kuin uuden yksilön tuottamistarkoitukseen. [8]

Lisääntymiskloonauksen eettisestä hyväksyttävyydestä ei ole yhdenmukaista mielipidettä. Erään näkökannan mukaan lisääntymiskloonauus on moraalitonta kaikissa tilanteissa, toiset näkevät sen hyväksyttävänä riippuen tarkoituksesta ja kolmannet odottavat vielä tiedon määrän kloonaukseen liittyen lisääntyvän ennen eettisen mielipiteen muodostamista. Lisääntymiskloonauksen ehdottomaan moraalittomuuteen vetoavat perustelevat mielipidettään luonnottomuudella ja perinteisten arvojen loukkaamisella. Luonnollisessa lisääntymisessä kahden eri yksilön genomit sekoittuvat aina, mutta kloonauksessa genomi on peräisin vain yhdeltä yksilöltä. Kloonauksella tuotetun lisääntymisen ajatellaan siis olevan luonnollisten prosessien vastainen. Toinen näkökulma katsoo lisääntymiskloonauksen olevan hyväksyttävää lääketieteellisissä tarkoituksissa edellyttäen, että metodin turvallisuus voidaan todeta. [8]

Suhtautuminen nykypäivänä tehtävään eläinten kloonaukseen on yleisesti kriittinen. Sekä tuotantoeläimien, lemmikkien ja koe-eläinten kloonauksessa keskustelua herättävät eläinten elinolosuhteet ja kohtelu. Erityisesti tuotantoeläinten ja koe-eläinten kloonauksessa kustannukset pyritään minimoimaan. Tämä tarkoittaa elintilan pienentämistä, virikkeiden vähentämistä ja terveydenhoitokulujen minimoimista. Lisäksi tuotantoeläimistä pyritään tekemään mahdollisimman nopeasti kasvavia ja lihaksikkaita aiheuttaen samalla terveyshaittoja eläimille. Moni taho suhtautuu eläinten käyttöön koetarkoituksessa kriittisesti. Tätä perustellaan sillä, että ihmisellä ei ole oikeutta käyttää muita tunteita ja aistimuksia omaavia lajeja hyödykkeenä. Tällaisissa kysymyksissä joudutaan pohtimaan ihmiselle aiheutuvaa hyötyä ja eläimille aiheutuvaa haittaa vastakkain. [5]

Kun tietoisuus tumansiirtotekniikasta levisi Dolly-lampaan syntymän myötä, nousi esille huoli myös ihmisen kloonauksen mahdollisuuksista. Ihmisen kloonauksen esteenä on kuitenkin nykypäivänä monia tekijöitä, kuten lainsäädäntö, metodin turvallisuus ja

tehokkuus sekä voimakkaat eettiset vastalauseet. Tulevaisuuden mahdollisuutena keskustelua herättää erityisesti mahdollisuus käyttää tumansiirtotekniikkaa avustettuna lisääntymiskeinona hedelmättömillä pareilla. Geneettisten sairauksien periytyminen voitaisiin estää, jos jälkeläinen tuotettaisiin vain terveen vanhemman genomista. [8] Vaikka jälkeläinen olisi geneettisesti samanlainen kuin vanhempansa, on tumansiirrolla tuotettu yksilö silti ainutlaatuinen, sillä myös ympäristö vaikuttaa yksilön ominaisuuksiin. Lisäksi mitokondrioiden DNA ei ole peräisin luovuttajan solusta vaan munasolusta. [3]

Tumansiirtotekniikalla tehtävän kloonauksen siis katsotaan usein olevan epäeettistä lisääntymiskloonauksen tapauksessa, mutta terapeuttisen kloonauksen etiikka on edelleen kiistanalainen. Lisääntymiskloonauksessa somaattisesta solusta johdetut alkiot usein joko kuolevat ennen syntymää tai syntyvät kehityshäiriöisinä. Syntyvälle yksilölle siis tuotetaan todennäköisesti kehityshäiriö. Terapeuttisessa kloonauksessa tumansiirrolla tuotettu alkio ei kehity sikiövaiheeseen asti. Tällöin terapeuttista kloonausta käytettäessä ei myöskään aiheuteta yksilölle kehityshäiriöitä. Myös terapeuttisessa kloonauksessa kuitenkin luodaan ihmisalkio, jolla on pieni mahdollisuus kehittyä eläväksi ihmiseksi. Tämä voidaan mieltää epäeettiseksi. Lisäksi jotkin tahot katsovat jo hedelmöittyneen munasolun elämän aluksi, jolloin sen luominen koetarkoituksiin on moraalitonta. [8]

Euroopassa tuotetaan tumansiirtotekniikalla kloonamalla eläimiä lähinnä tutkimustarkoituksessa. Kloonaus katsotaan siis eläinkokeeksi ja sitä rajoittaa sen mukainen lainsäädäntö. Tanska on ainoa EU-maa, jossa kaikki kloonaminen on laissa täysin kielletty ja sitä saadaan harjoittaa vain hyvin perustein tutkimus- tai opetustarkoituksessa. [5] Suomessa lisääntymiskloonaus on täysin kielletty laissa. Terapeuttisen kloonauksen lainsäädännössä taas on aukkoja, sillä alkion luominen tutkimustarkoitukseen on kielletty. Tumansiirtotekniikalla tuotettua solujoukkoa ei kuitenkaan määritellä alkioiksi. Keskustelua herättää, onko Suomen alkioita koskeva lainsäädäntö puutteellinen, sillä myös tumansiirtotekniikalla tuotettu solujoukko voidaan mieltää elämän aluksi. Sekä terapeuttista että lisääntymiskloonauksista koskeva lainsäädäntö vaihtelee paljon sekä Euroopassa että maailmalla. Kloonauksen etiikasta ei ole päästy vielä yksimielisyyteen, joten se on jätetty toistaiseksi ratkaisematta. [9]

6. YHTEENVETO

Tumansiirtotekniikalla tehtävä kloonauus on kehittynyt paljon kahden viimeisen vuosikymmenen aikana. Sen avulla on onnistuttu kloonamaan monia nisäkäslajeja, kuten tuotantoeläimiä, lemmikkejä ja myös kädellisiä. Tumansiirtotekniikkaa voidaan käyttää lisääntymistarkoituksessa tai terapeuttisessa tarkoituksessa. Terapeuttinen kloonauus nähdään potentiaalisena keinona lääketieteessä tuottaa potilaan soluille identtisiä alkion kantasoluja. Tumansiirtotekniikka avaa mahdollisuuksia myös genetiikan tutkimukselle. Tällä hetkellä metodin käyttö on yleisesti vielä melko vähäistä johtuen sen tehottomuudesta ja yhteiskunnan asenteista kloonauusta kohtaan. On kuitenkin mielenkiintoista nähdä, millaisia saavutuksia tumansiirtotekniikan ja sen turvallisuuden kehittyessä tulevaisuudessa saadaan aikaan.

Tumansiirtotekniikan suurimpana ongelmana pidetään geneettisen uudelleenohjelmoinnin epäonnistumista. Somaattisesta solusta siirretty genomi täytyy saada toimimaan yhdistelmäsolussa alkion kantasolun perimän tavoin. Somaattisessa solussa ilmenevä tiettyjen geenien inaktivaatio on siis purettava, minkä jälkeen perimä on saatava toimimaan läpi alkionkehityksen ja solujen erilaistuessa tietyn kudostyyppin soluiksi. Koko prosessissa ilmenee lukemattomia haasteita, joita tutkijat ovat pyrkineet ratkaisemaan. Tekniikka onkin parantunut runsaasti viime aikoina. Merkittävimmäksi asiaksi tumansiirron onnistumisen kannalta on todettu epigeneettisten tekijöiden muokkaus. Esimerkiksi DNA:n metylaation, histonien ja transkriptiotekijöiden muokkauksella sekä kromatiinin esikäsittelyllä on saatu nostettua tumansiirron onnistumistodennäköisyyttä merkittävästi. Epäonnistumiset uudelleenohjelmoinnissa johtavat alkionkehityksen pysähtymiseen tai kehityshäiriöisen yksilön syntymään.

Tumansiirtotekniikassa nähdään monia eettisiä ongelmia, jotka koskevat sekä tuotettua yksilöä että sijaisemona käytettyä eläintä. Etiikasta ei ole kuitenkaan päästy yhdenmukaiseen mielipiteeseen. Metodin epäeettisyyttä perustellaan sen luonnottomuudella, puutteellisella turvallisuudella ja koe-eläinten käytön moraalittomuudella. Myös terapeuttisessa mielessä tehtävälle kloonaukselle löytyy vastustajia. Koska tumansiirtotekniikan eettisyydestä ei ole tehty yhdenmukaista linjausta, koskee sitä joka maassa erilainen lainsäädäntö. Suomessa

lisääntymiskloonauks on täysin kielletty, mutta terapeuttisen kloonauksen tapauksessa lainsäädäntö on puutteellinen.

LÄHTEET

- [1] M. García-Sancho. Animal breeding in the age of biotechnology: The investigative pathway behind the cloning of dolly the sheep. Springer International Publishing, 2019. Vol. 37:3. P. 282–304. ISSN 1742-6316 (sähköinen). ISSN 0391-9714 (painettu). Saatavissa: <https://doi-org.libproxy.tuni.fi/10.1007/s40656-015-0078-6>.
- [2] N. Beaujean, H. Jammes, A. Jouneau. Nuclear Reprogramming: Methods and Protocols. 2nd ed. New York, USA: Springer Science + Business Media, 2015. 288 p. Methods in Molecular Biology 1222. ISBN 978-1-4939-1593-4. Saatavilla: <https://link-springer-com.libproxy.tuni.fi/content/pdf/10.1007%2F978-1-4939-1594-1.pdf>.
- [3] Z. Liu, Y. Cai, Y. Wang, Y. Nie, C. Zhang, Y. Xu, X. Zhang, Y. Lu, Z. Wang, M. Poo, Q. Sun. Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. Cell, 2018. Vol. 172:4. P. 881-887. Saatavilla: <https://www-sciencedirect-com.libproxy.tuni.fi/science/article/pii/S0092867418300576>.
- [4] M. Golding, M. Westhusin, C. Long. Reshaping the transcriptional frontier: Epigenetics and somatic cell nuclear transfer. Wiley Online Library, 2013. Vol. 81:2. P. 183-193. Saatavilla: <https://onlinelibrary-wiley-com.libproxy.tuni.fi/doi/full/10.1002/mrd.22271>.
- [5] E. Aaltola, L. Mannonen, S. Ahlström, A. Marniemi, M. Mikkola, V. Puurula, J. Vilkki. Tuotantoeläinten kloonaminen. Helsinki, Suomi: Biotekniikan neuvottelukunta, 2008. 18 s. Biotekniikan neuvottelukunnan julkaisuja 2008. ISBN 978-952-00-2688-2 (sähköinen). ISBN 978-952-00-2718-6 (painettu). Saatavilla: http://www.btnk.fi/files/pdf/elainkloonaus_verkko.pdf.
- [6] S. Matoba, Y. Zhang. Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming: Mechanisms and Applications. Cell Stem Cell, 2018. Vol. 23:4. P. 471-485. Saatavilla: <https://www-sciencedirect-com.libproxy.tuni.fi/science/article/pii/S193459091830300X#sec1>.

[7] J. Byrne, D. Pedersen, L. Clepper, M. Nelson, W. Sanger, S. Gokhale, D. Wolf, S. Mitalipov. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. Nature; London, 2007. Vol. 450: 7169. P. 497-502. ISSN 00280836. Saatavilla: <https://search-proquest-com.libproxy.tuni.fi/docview/204562544/fulltextPDF/FF265118D51A40B9PQ/1?accountid=14242>.

[8] R. Jaenish. Human Cloning - The Science and Ethics of Nuclear Transplantation. Perspective Publishing, 2004. Vol. 351:27. P. 2787-2791. Saatavilla: http://www.precaution.org/lib/cloned_animals.nejm.041230.pdf.

[9] Ihmisen kantasolut, kloonaus ja tutkimus. Helsinki, Suomi: Biotekniikan neuvottelukunta, 2003. 20 s. Biotekniikan neuvottelukunnan julkaisuja 2003. ISBN 952-442-678-1. Saatavilla: <http://www.btnk.fi/files/pdf/kantasolu.pdf>.