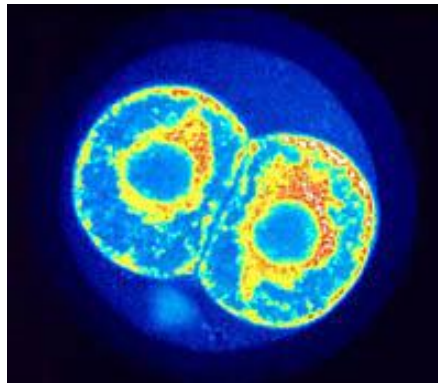




REPRODUCTIVE CLONING

Implications for Ageing and Health



Ian von Hegner

Aarhus University

Advisor: Volker Loeschke

Censor: Suresh Rattan

Indholdsfortegnelse:	
Problemformulering	3
Indledning.....	3
Embryogenesis	5
Kloning	5
Fåret Dolly.....	6
Klonede arter	7
Mulige anormaliteter grundet kloning	7
Senescence.....	8
Teorier	9
Telomerere.....	10
Telomere teorien for ældning	11
Telomere forkortelse hos klonede dyr	13
Øvrige defekter.....	15
Diskussion	17
Referencer.....	20

Problemformulering

Progressiv forkortelse af telomere ved DNA replikation er blevet sat i forbindelse med cellulær ældning. Hvad vil der ske med dyr, fremkommet ved somatisk kerneoverførsel, hvis differentierede celler fra voksne dyr med forkortede telomerelængde benyttes til at starte embryo udvikling? Vil de forkortede telomere påvirke deres livslængde eller udvikling, eller er de forkortede telomere fra donerceller blevet rekonstrueret til fuld længde i klonede dyr?

Indledning

Somatisk cellekloning er blevet en banebrydende teknologi, men termen kloning har hyppigt været indhyllet i uklarheder i den offentlige debat. Men egentlig er definitionen af kloning forholdsvis simpel! Ifølge Campell, en af pionererne bag Dolly, verdens første pattedyr klon fra et voksent individ, kan kloning defineres som: "a population of cells or organisms derived from a single cell or organism through the process of asexual reproduction" [5]. En næsten tilsvarende populær definition er: "Cloning is the process of producing similar populations of genetically identical individuals that occurs in nature when organisms reproduce asexually" [34].

Identiske enæggede tvillinger er faktisk kloner af hinanden, hvor deres kloning er sket ved den naturlige reproduktionsproces. Omvendt er såkaldt reproduktiv kloning en kunstig måde til at frembringe tvillinger, som adskiller sig fra hinanden på grund af en tidsperiode. Det er ikke mere end to årtier siden, at sidstnævnte teknik, dvs. det at kunne klonе dyr fra celler fra voksne individer, blev anset for ikke at kunne lade sig gøre. Det har nu ændret sig [13].

Kloning førend 1996 blev foretaget ved brug af cellekerner fra embryoer, idet genetisk materiale fra disse celler kunne indsættes i æg, der var blevet tømt for deres eget genetiske materiale, og således kunne give ophav til et levedygtigt individ. Der var dog ambitioner om, at kunne bevæge sig videre fra sådanne celler [5]. Et afgørende gennembrud fandt sted i 1996, da Wilmut et al. publicerede en artikel, hvori de annoncerede de havde klonet et pattedyr, fåret Dolly, ved anvendelsen af kerneoverførsel fra et seks år gammelt får [30]. Denne succesfulde frembringelse demonstrerede, at den differentierede tilstand i kernen hos en somatisk celle fra et voksent doner pattedyr, ikke var låst fast en gang for alle, men faktisk kunne vende tilbage til et tidligere udifferentieret stade, og lede til embryo udvikling igen [30].

Dollys eksistens blev startskuddet til en sensation, siden hun var verdens første klonede pattedyr fra en voksen celle. Det blev ikke alene en medie sensation, men også en åbnet dør for videnskabelige muligheder, og for en hidtil uset etisk debat. Mulighederne for kloning indenfor forskning i embryologi, stamceller og medicin blev nu åben for spekulation [20].

Den succesfulde produktion af levedygtigt genetisk identisk afkom, har åbnet op for mange muligheder i forskningen. Somatisk kerneoverførsel giver nye muligheder i studiet af embryogenese, genaktivation og udvikling, for bevarelsen af truede arter, og måske til udviklingen af transgene stamceller [13]. Men udviklingen af kloningsteknologien har måske også åbnet nye muligheder op for udforskningen af en anden af biologiens mysterier, nemlig, hvad der forårsager ældningsprocessen [26]. Ældningsprocessen spiller en rolle for os alle, og dog er mekanismerne bag den ikke særligt godt forstået eller undersøgt. Benyttelsen af dyremodeller spiller en vigtig rolle i denne sammenhæng, og muligheden for, at benytte klonede dyr kan vise sig at blive et vigtigt værktøj [16]. Således er vigtige spørgsmål i kølvandet på Dolly blevet rejst om, hvorvidt klonede dyr arver deres genetiske alder fra deres doner, og altså bliver født ældre end umiddelbart

antaget.

Det vigtige spørgsmål er således, om kloning tilbagefører den cellulære ældning, som deres ophav havde. Telomerene er enheder for enden af kromosomerne, og det er dem, der til at starte med blev stillet spørgsmål til [25]. Telomere hos cellerne forkortes både i in vitro kultur, og også, mens et givet individ ældes som følge af talrige celledelinger. Hos kønscellerne bliver telomerene dog takket være telomerase genskabt til deres fulde længde [1]. Forkortelse af telomere menes nemlig at have betydning for ældningsprocessen, og et klonet dyrs celler kan derfor måske reflektere deres virkelige alder [21].

Det var derfor hurtigt et åbenlyst spørgsmål at stille, at hvis disse klonede dyr vitterligt arvede forkortede telomere, så ville deres egen livslængde måske ligeledes være kortere end den, der ellers ville være gældende for deres art [5].

Kloning ved anvendelsen af somatiske voksne celler gør det muligt at producere dyr, der er blevet til uden at kønscellerne har spillet en rolle [30]. Dette kan have den konsekvens, at de klonede embryoer ikke burde have genskabt telomerne, og i de klonede dyr vil de derfor blive yderligere forkortet, og før eller senere blive for korte [36]. Dette gør det muligt at studere hvor omfattende telomere forlængelse er hos kønscellerne vs den hos set hos klonede dyr, og dermed også studere telomere teorien for ældning [25].

Som formuleret af Shield et al. så vil det at kunne producere pattedyr, mens man samtidig kan omgå kønscellerne, gøre det muligt at teste teorier der kæder forkortede telomere med ældning, idet det giver nye værktøjer til at studere forholdet mellem fænotype og genotype, mellem fysiologisk alder og cellulær alder [26]. Spørgsmålene der kunne blive besvaret var altså dels, om hvorvidt de eroderede telomere i somatiske celler kan blive genskabt gennem kloningsprocessen, eller om klonede dyr vitterligt er gamle, og altså kan tillægge dette til forkortede telomere. Fremkomsten af Dolly, som var klonet med kerneoverførsel fra en voksen kerne fra et seks år gammelt dyr, giver for første gang muligheden for at teste disse modeller i en in vivo sammenhæng [30]. Shields et al. viste faktisk, at Dolly, som var klonet fra cellen hos et seks år gammelt får, havde kromosomer, der var kortere end dem fra andre i hendes alder. Denne forkortelse kom sig altså af, at hun var udledt fra en celle fra et dyr i midten af sit liv [25].

Dolly blev faktisk aflivet blot seks år gammel i 2003, hun havde en lungesygdom og havde også arthritis [20]. Da får ellers kan blive op til 12 år gamle, syntes det at pege på, at kloning vitterligt fører til acceleret ældning. Dette førte til fornyet debat om kloning, især om de ældnings problemer, som klonede dyr kunne have [32]. Der er stadig dem der mener, at klonede dyr vil ældes hurtigere end deres art ellers vil. Får udledt ved kerneoverførsel synes dog fysiologisk normale. Mere forskning er nødvendig for at adressere dette vigtige spørgsmål [25].

Det hurtige fremskridt i kloningsforskning sammen med dens mange anvendelser, vil snart have en betydelig påvirkning på basal forskning, landbrug og medicin. Kloning var egentlig først anvendt som en måde til at studere cellers totipotential hos embryogenese i starten af forrige århundrede [15], og potentialet for kloning til ansvarlig dyreproduktion afhænger af, hvorvidt proceduren kan genskabe telomerelængde og tilbageføre cellulær ældning, og genskabe somatiske celler til en fænotypisk ung tilstand [14]. Det vides nu, at kloning er vanskeligt, dyrt og farligt for de involverede dyr. For ikke alene tyder det på, at dyr fødes med kortere telomere, de fødes også med overvægt og diverse helbreds problemer, hvis de overhovedet overlever fødslen. Disse observationer blev bemærket, da det var klart, at Dolly havde udviklet arthritis, hvilke skulle være usædvanligt for får i hendes alder [20]. Som Yang et al. konkluderer, så er ”det nødvendigt for at kloningsteknologien kan nå sit fulde potentiale, at forstå hvorvidt kloning kan tilbageføre cellulær ældning og frembringe kloner med normal genetisk og fysiologisk alder, som er ens med dem produceret fra naturlig

reproduktion” [31].

Embryogenesis

Før en diskussion af kloningsprocessen kan påbegyndes, og før en gennemgang af defekter i klonede dyr, som kloningsprocessen tilsyneladende frembringer, er det nødvendigt først at se nærmere på selve udviklingen af et embryo, siden det er her, at udviklingen af kerneoverførsel har bidraget med ny indsigt i en ellers gammel disciplin.

Hos dyr såsom pattedyr finder reproduktion sted ved, at sperm fra en han befrugter et æg fra en hun, og embryogenese betegner derefter den proces, i de tidlige stader af prænatal udvikling, hvor embryoet eller zygoten formes og udvikles ind til et afkom [5]. Ifølge Jaenisch et al. kan embryo udvikling deles ind i fire overordnede faser: 1. gametogenese; 2. kløvning; 3. postimplantation; 4. Postnatal udvikling [9].

1. Gametogenese er den proces, hvor diploide celler gennemgår celledeling og differentiation for dermed at blive til gameter [5]. I gametogenese finder en vigtig epigenetisk omprogrammering sted, hvor genomerne fra både oocyte og sperm bliver epigenetisk kompetente for forestående befrugtning. En aktivering gener vigtige for udvikling bliver gjort i dette stade [9].

2. Kløvning er delingen af celler i den tidlige zygote. Denne zygote består af de kombinerede enkelt genomer fra moderen og faderen, og fra dette kombinerede materiale plus organeller fra det førend ubefrugtede æg opstår et embryo. Ved kløvning forøges antallet af celler uden dog at forøge massen af zygoten, som bibeholder den samme størrelse [34]. Det er også i dette stade, at en demethylation finder sted, der fjerner den epigenetiske modifikation hos zygoten, således at blastocystens DNA er fri for methylation [9]. Faktorer i ooplamaet styrer disse begivenheder, og giver regulative komponenter til processen [15].

3. Postimplantation er det stade, hvor blastocysten sætter sig fast på væggen af uterus, og påbegynder at vokse og dele sig for at frembringe alle de celler der udgør embryoet [24]. Cellerne begynder i dette stade også at differentiere og blive forskellige grupper af de celler, der udgør de forskellige organer [5].

4. Postnatal udvikling referer til den periode der begynder efter at afkommet er blevet født, og derefter efterfølgende vækst de følgende uger, hvilke kan variere alt efter dyrearten [24].

Som Campell formulerede det: “The controls of the processes which determine this specialization termed differentiation, form one of the most fundamental questions in developmental biology” [5]. Talrige studier har vist, at ikke alene kan DNA funktionen modificeres af oocytten efter befrugtning, men den kan også kontrollere kernen fra en somatisk celle, og dermed påvirke omprogrammeringen af kernens information ind til en udvikling af et embryo [15].

Fremkomsten af muligheden for somatisk kerneoverførsel i pattedyr, har givet nye værktøjer til at studere disse mekanismer, da det ændrer på forståelsen af udvikling og celle differentiation hos væv, og giver muligheden for at studere epigenetiske forandringer som æggets cytoplasma står for. Alt i alt giver kloningsteknikken muligheden for at studere dedifferentiation og differentiation i forskelligt væv gennem embryogenese [9].

Kloning

Ifølge Campell, en af pionererne bag Dolly, verdens første pattedyr klon fra et voksent individ, kan kloning defineres som “a population of cells or organisms derived from a single cell or organism through the process

of asexual reproduction” [5].

Aseksuel reproduktion er et almindeligt fænomen hos en del arter, især hos planter og visse insekter. Denne form for reproduktion er også længe blevet benyttet indenfor plantedyrkning. Omvendt forekommer kloner hos dyrearter såsom vertebrater kun naturligt som identiske enæggede tvillinger, idet der tidligt i udviklingen af et embryo er sket en kløvning, resulterende i to genetisk set identiske monozygotiske individer (som i modsætning til reproduktiv kloning også besidder de samme organeller såsom mitokondrier) [5].

Spemann et al. eksperimenterede med somatisk celle kerneoverførsel i 1928, ved anvendelsen af amfibium embryoer, markerende starten på den første rigtige kerneoverførsels teknologi. Disse eksperimenter demonstrerede eksistensen af hvad der nu kaldes embryonisk induktion, dvs. induktion, der styrer udviklingen af cellegrupper ind i på forhånd bestemte væv. Disse forsøg viste, at cellerne bevarede deres genetiske materiale, hvilke indtil da ikke havde været klart, og Spemann foreslog derfor naturligt nok at flere forsøg, især hvor den embryonale udvikling var længere fremme, og også hvor det genetiske materiale var fjernet [5]. Det næste store skridt kom først i 1952, hvor Briggs og King i deres studier af differentiation succesfuldt klonede leopardfrøer, hvor de frembragte frøer efter at have foretaget kerneoverførsel fra frøembryoer i deres tidlige stadier og ind i æg [5].

For pattedyrenes vedkommende fremkom succesfulde teknikker ikke før meget senere (en medvirkende grund var den, at æg hos pattedyr ikke, som sammenlignet med f.eks. amfibier, er ret store, hvilke bl.a. kræver mere forfinede teknikker). Men et gennembrud kom i 1984, hvor de første levedygtige pattedyr der blev klonet var får, da Steen Willadsen var i stand til at frembringe levende lam, der var et resultat af kerneoverførsel af 8 til 16 celleembryoer ind i oocytter [5].

Et afgørende gennembrud fandt sted i 1996, da Campell et al. fik succes med at klonе levende pattedyr gennem kerneoverførsel fra en etableret cellelinje [4]. Som Campell et al. selv formulerede det: Rather than try to isolate a ‘pluripotent’ ES-like cell line we followed the ability of blastocyst-derived cells to produce live offspring when placed into culture and used as donors of genetic material for nuclear transfer [4].

Således blev levende lam til med celler fra fåre embryoer, som var blevet kultiveret 6 til 13 passager. Campell havde gjort den banebrydende opdagelse, at disse celler ville blive induceret ind i en quiescent tilstand ved at ”sulte” dem for serum, og derefter ville de være modtagelige overfor en overførsel. Disse donerkerner blev overført til MII oocytterne på hhv. tidspunktet for aktivation, forud for aktivation, og så efter aktivation. Resultatet af disse var 5 lam i alt, hvoraf de 3 efterfølgende omkom som følge af en række anormaliteter. De overlevende lam var sunde, og har sidenhen vist sig at være fertile [4]. Forskningsteamet har selv spekuleret på, hvorledes dette forsøg blev kronet med held, og mener, at induktionen af quiescence i donercellerne måske modificerer donercellens kromatinstruktur. Dette skulle så bidrage til reprogrammering af kernen, så den kan igangsætte en udvikling [4]. Dette gennembrud tillod forskerne at fortsætte, og dette førte til Dolly.

Fåret Dolly

Verdens første klon fra et voksent individ, Dolly, et Finn-Dorset får, blev født i 1996. Wilmut et al. rapporterede, at klonen kom fra flere mødre: en epitelcelle fra et pattedyr på seks år leverede DNA’et, et æg kom fra yderligere et pattedyr, og endelig blev en surrogatmoder brugt til at bære og give fødsel til det klonede embryo [30].

Dolly blev produceret ved den teknik, der nu kaldes for somatisk celle kerneoverførsel, en teknik der var en forsættelse fra et tidligere studie [4] [30]. Ved denne teknik bliver det ubefrugtede ægs, eller oocyte,

genetiske materiale først fjernet, hvorefter en kerne med genetiske materiale fra en anden "quiescent" celle blev indsat. Denne hybridcelle bliver derefter stimuleret til at påbegynde deling af et elektrisk stød, og hvis dette er succesfuld, bliver cellen indsat i surrogatmoren. Der finder altså ingen befrugtning sted i klassisk forstand, og hverken DNA fra en fader eller moder er til stede i zygoten [30]. Mere teknisk, så har Wilmut et al. vist, at et stop i G₀ fasen i cellecyklussen er nødvendig for at opnå en normal udvikling af et klonet dyr fra differentierede celler, opnået ved at sulte cellen [30].

Dolly var et gennembrud i forskningen, men hun var også resultatet af mere end 277 forsøg, og efterfølgende forsøg på kloning fik ikke succes. Der var derfor tvivl om, hvorvidt hun var en ægte klon, eller om et befrugtet æg alligevel var blevet brugt. Men året efter hendes fødsel blev vellykkede kloninger foretaget, hvilke gav evidens for, at somatisk kerneoverførsel fra vokse pattedyr var en realitet [13]. En nøgleingrediens i kloningsprocessen er, at æg og sperm ikke bidrager ligeligt, men at ægget ved siden af DNA også indeholder andre faktorer, som er vigtige ved udvikling af embryoet. Ved somatisk kloning gælder det således, at ægcellen bidrager med sine vante funktioner, men at den reagerer overfor den modtagne cellekerne på samme som en spermcelle, der altså her afgiver sin rolle [15].

Som bemærket af Jaenisch et al., så demonstrerede Dollys fødsel, at "least some cells within an adult organism retain totipotency and are able to direct development of a new animal," hvilket jo var et af de oprindelige forskningsobjektiver for forskningen i kloning [9].

Klonede arter

Siden fremkomsten af Dolly er en del andre arter blevet til ved kloning gennem benyttelsen af somatiske celler fra voksne dyr. Disse er dog næsten alle, ligesom i Dollys tilfælde, sket ved en ret lav effektivitet, kun omkring 0.5 – 10 % af embryoene udvikles til levedygtige individer [9]. Blandt disse andre arter der er fremkommet gennem somatisk celle overførsel er: kvæg, 2001; mus, grise; katte; 2001; rotte, 2003; hare; muldyr, 2003; hest, 2003; hund, 2005; ulv, 2005; tyr; vandbøffel, 2009; kamel, 2009; ged, 2012 [34].

Mulige anormaliteter grundet kloning

Lanza et al. rapporterer, at spørgsmålet om, hvorvidt dyr der er blevet til gennem kerneoverførsel vil opleve for tidlig ældning, har været rejst [14]. Som tidligere gennemgået bliver en somatisk celle med forkortede telomere igennem kerneoverførsels processen overført til en oocyte, der er blevet tømt for sit eget DNA og derefter kickstartet til at påbegynde embryogenese [30]. Somatiske celler har et begrænset antal celledelinger i in vitro, og et interessant spørgsmål er derfor, om donercellens forkortede telomere vil opnå deres fulde længde igen gennem embryogenese [14]. Rapporten efter Dolly tydede på, at kloningsprocessen ikke genskaber længden på telomere, og at dyrenes celler måske derfor vil opleve et mere begrænset antal celledelinger end forventet [14].

Og faktisk, så havde Dolly, som blev klonet fra cellen hos et seks år gammelt får, kromosomer, der var kortere end dem hos får på hendes alder [25]. Dolly blev faktisk aflivet da hun var kun seks år gammel, kun i ca. det halve af den livslængde, som får ellers kan nå. Dolly blev behandlet tidligt for arthritis, og led til sidst også af en lungesygdom. Disse hændelser støttede derfor tilsyneladende postulatet om, at klonede dyr vil blive til med diverse sundheds problemer [20].

Det har vist sig, at på trods af, at det nu er muligt at producere dyr gennem kloning, så har somatisk kerneoverførsels teknikken stadig en ret lav effektivitet [11]. Hovedparten af kloner, hvertfald i de første år efter Dolly, omkommer faktisk allerede i drægtighedsperioden, og effektiviteten af kloning er blevet rapporteret at være så lav som blot 0.1–2.0%. Foruden talrige aborter ses der også en del, der omkommer efter at fødselen har fundet sted [28]. Det har også vist sig, klonede dyr kan virke tilsyneladende raske og sunde som andre af deres artsfæller, men at de på trods af dette, alligevel udtrykke anormaliteter i deres genom senere hen i deres liv [28].

Senescence

Den biologiske ældningsproces hører til en af de største og vigtigste fænomener indenfor ikke alene biologien, men også i menneskehedens historie. Der er næppe noget andet område, der i den grad præger vores tilværelse. Men skønt ældningsprocessens vigtighed, er de mekanismer der underligger den, stadig i det store hele ikke kendt. Meget vides dog om det, således er senescence den tilstand eller proces af ældning, som selv kan defineres som en forøgelse i molekylært kaos eller afgivelse af molekylær reparation over tid [26]. Den kan for klarhedens skyld blive opdelt i to overordnede beskrivelser: organismal senescence, og cellulær senescence [34].

Organismal senescence er ældningen af en organisme som helhed. Det er velkendt, at fra fødsel og op til omkring alderen 25-30 år (hos mennesker) er organismen i en næsten vedvarende vækst, og celler og væv bliver fornyet. Men efter denne alder begynder der at ske et fald i kapaciteten til at forny sig, og aldersrelaterede forandringer sætter ind, hvilke gør organismen mere sårbar overfor stress, hjerte sygdomme osv. Denne serie af ændringer vil, efter en for arten veldefineret tid, føre til, at organismen omkommer [34].

Disse forandringer i fænotypen medfører, som beskrevet af Gompertz, en eksponentiel forøgelse i sandsynligheden for dødsfald (fordobles hvert 8. år efter alderen 30). De cellulære årsager til disse forandringer er kun indenfor de seneste årtier begyndt at blive forstået [26].

Cellulær senescence er det fænomen, hvor individuelle celler dyrket i en kultur, kun har et begrænset antal celledelinger, hvilke kendes som Hayflick grænsen [7]. Hayflick et al.s demonstration af replikativ ældning in vitro var et vigtigt gennembrud indenfor ældningsforskningen, da den gjorde det muligt at fokusere på de molekylære mekanismer for ældningsprocessen [26]. Den viste, at fibroblaster dyrket in vitro under ensartede betingelser fri fra ydre stress faktorer, fremviser et endeligt antal celledelinger på 40 – 60 delinger, som er specifik for den pågældende art [7].

Det er velkendt, at arter som helhed har deres egne individuelle livslængder, hvor stor variabilitet i ældningsprocessen imellem arterne kan påvises, også på det cellulære niveau mht. celledelinger, som sandsynligvis er genetisk funderet [27]. Touissaint et al. mener således, at celleældningen overordnet set kan siges at være en fortsættelse af differentiationsprocessen [27]. Således har Bayreuther et al. påvist, at der i in vitro ældende fibroblaster kan findes en differentiationssekvens på syv specifikke cellestadier, gående fra mitotisk til postmitotisk, endende med degenerative cellestadier, der ikke længere kan dele sig [27].

Det kan diskuteres, om ældning er en uundgåelig egenskab ved livet, et resultat af ovenstående mekanismer, eller om ældningsprocessen kan modificeres eller undgås. En del arter fremviser faktisk kun ringe ældning, såsom hummere, og et få antal arter viser ingen ældning, såsom *nutricula* [34]. Celler kan bekæmpe ophobningen af de fejl, der tilsyneladende finder sted over tid, ved to mekanismer, gennem beskyttende systemer og gennem mitose [27]. Førstnævnte kan gøre dette gennem f.eks. effektiv proof reading og reparation ved DNA replikation, og ved høje niveauer af telomerase, der kan forlænge enderne af telomere.

Dette vil sænke mængden af fejl [34]. Den anden mekanisme er ved gennem celledeling så at sige at fortynde de ophobede fejl fra en celle over i to celler, således som f.eks. cancerceller gør det, og sandsynligvis også encellede organismer som bakterier, med hvilke f.eks. bakterier opnår deres koloniale udødelighed [27].

Videre har modelorganismer også vist, at ændringer i specifikke gener kan forlænge livslængden i nematoder såsom *Caenorhabditis elegans* ganske afgørende, hvilke giver indsigt i, hvilke gener der spiller en rolle i ældningsprocessen på celleniveau [26]. Ældningen hos længelevende pattedyr er ikke helt så studeret, grundet deres længere livslængde, om end kloning måske nu kan være med til at kaste lys over dette.

Teorier

Der findes en meget stor og broget samling af teorier og hypoteser, som helt eller delvis søger at forklare hvordan og hvorfor ældningsprocessen finder sted, og inkorporere alle de tilgængelige eksperimentelle data. Disse teorier kan meget groft blive delt ind i to overordnede grupper, kaldet stokastiske teorier og programmerede teorier [27].

Stokastiske teorier har som udgangspunkt, at miljømæssige tilfældige hændelser er de afgørende determinanter for hvad der sker i cellen eller organismen, og at disse efterhånden fører til skadelige ændringer i biologiske systemer. Der findes en del data og observationer, som støtter denne ide, såsom, at akkumuleringen af skader i DNA, eller ophobningen af fejl i cellen, resulterer i ældningsprocessen. Skader på DNA, som styrer cellestruktur og organismens korrekte funktionering, kan altså føre til forfald og død [27]. Blandt disse mange teorier kan bl.a. kort nævnes: Wear-and-Tear teorien; Somatic Mutation teorien; Error Accumulation teorien; Accumulative-Waste teorien; Free Radical teorien; Entropi teorien [34].

Programmerede teorier har som udgangspunkt, at ældningsprocessen er programmeret i organismen, dvs. at et internt genetisk ur eksisterer, der afgør, hvornår organismen skal påbegynde sit forfald og nå frem til sin afslutning. Et sådant ur kan være genetisk kontrolleret, eller komme fra det endokrine system eller nervesystemet. Cellelær ældning er efter denne opfattelse altså en fortsættelse af det program, der i organismen står for differentiation og udvikling [27]. Urværksteorien for ældning postulerer altså, at ældningsprocessen er indbygget i organismer, og interessant nok, så kunne forkortelsen af telomerelængden hos delende somatiske celler være et sådant ur [7].

Blandt disse mange teorier og hypoteser kan bl.a. kort nævnes: Gene regulation teori; Antagonistisk pleiotropi teori; DNA damage teori; Autoimmune teori; mTOR teori; Telomere teori [34].

Den sidste teori, telomere teorien for ældning, er af særlig interesse for os her. Denne model for ældningsprocessen har hidtil været baseret på in vitro data, og er baseret på den ide, at de observerede forkortelser af telomerer fungerer som et molekylært ur [21]. Modelorganismer er vigtige i udforskningen af de mekanismer, der spiller en rolle for ældningsprocessen, og de er især vigtige til at søge at manipulere ældningsprocessen for at se, om det er stokastiske eller programmerede, teorier, der spiller en rolle, og i så fald hvilke af disse grupper individuelle teorier, der spiller en rolle. Genetiske manipulationer kontra miljøet kan kaste afgørende lys over dette [16].

Udviklingen af somatisk kerneoverførsel fra somatiske celler, har givet helt nye muligheder for at studere ældningsprocessen. Skabelsen af Dolly var vigtigt, da donercellen kom fra et voksent får, og dermed gav mulighed for at se, hvad rolle telomere forkortelse kan have [26]. Kloner gør det muligt at studere hele

organismen baseret på en genetisk ensartet baggrund, og studere forskelligartede miljøer overfor ensartet genetik og visa versa. De gør det især muligt at studere forudsigelserne fra telomere urværksteorien [26].

Telomerere

Telomerene er betegnelsen på specialiserede DNA-protein strukturer, som er lokaliseret for enden af eukaryotiske kromosomer, og hvis formål er at beskytte kromosomenderne fra at degradere eller fusionere med hinanden. Telomererne er derfor af stor betydning for genomisk integritet [2]. Hos mennesker og øvrige vertebrater refererer telomerne altså til særlige, gentagne DNA sekvenser og bindende proteiner for enden af kromosomerne. DNA sekvenserne er ikkekodende DNA indeholdende tandem gentagelser af den seks-nukleotid enhedssekvens 59-TTAGGG-39. Disse sekvenser er vel bevarede, og er de samme hos alle vertebrater. Disse sekvenser rækker tusindvis af baser hos kromosomenderne, med et gennemsnit på 10 kb hos nyfødte børn [2].

Shiels et al. opsummerer 3 vigtige roller, som telomererne spiller med hensyn til opretholdelsen af kromosom integritet og struktur: ” (1) protection of DNA ends from fusion, recombination, and degradation; (2) attachment of the chromosome to the nuclear envelope; and (3) facilitation of the complete replication of chromosome ends” [25].

Med andre ord er en tilstrækkelig lang telomerelængde altså vigtig til beskyttelsen af kromosomender fra skader såsom nedbrydning, recombination eller fusion kromosomerne imellem. Men grundet det såkaldte “end-replication problem” hos DNA polymerase, så bliver disse vigtige telomere faktisk forkortet et stykke for hver celledeling. Således sker der forkortelse med op til 50 til 200 basepar hver gang en celle deler sig. Dette gælder dog ikke for kønscellerne, og for ”udødeliggjorte” cancerceller [31].

På et tidspunkt bliver telomerene for korte, og DNA skader begynder at opstå, idet telomerne nu begynder at miste deres beskyttelses funktioner. Der er klar evidens for, celledeling nu begynder at gå i stå, hvilke er starten på det såkaldte ”senescence stadie,” hvor ældning og aldersrelaterede sygdomme opstår, måske som følge af forringet regenerative evner hos væv, som følge af telomernes manglende beskyttelse [24]. Telomerelængden kan opretholdes af et enzym kaldet telomerase, og graden af forlængelse er meget sensitivt overfor telomerase niveauerne [24]. Processen vides at være reguleret af forskellige telomere bindende proteiner, der styrer aktiviteten af telomerene. Men selv hos celler med forøgede niveauer af telomerase, såsom haematopoietiske stamceller, bliver telomerene alligevel kortere med stigende alder [2].

Telomerase vides at være aktiv hos embryogenese, og bliver almindeligvis undertrykt postalt hos somatiske celler, mens det stadig kan være til stede i højere grad hos kønscellerne, leukocyterne, og også hos talrige cancerceller, men altså ikke hos somatisk væv hos mennesket. Dette har også det resultat, at i fraværet af telomerase vil telomerelængden hos somatiske celler også blive en anelse kortere med hver celledeling [31]. De mekanismer hvormed telomerelængde bliver bevaret hos kønscellerne, som har høj telomerase aktivitet, er ikke helt forstået, men det har længe været klart, at en eliminerings eller fald i telomerase aktivitet hos somatiske celler vil gøre, at disse celler vil have et begrænset antal celledelinger, den såkaldte Hayflick grænse, på ca. 50 til 60 celledelinger, hvorefter cellerne indtræder i aldringsfasen [24].

Forkortelsen af telomererne er også blevet sat i forbindelse med cancer, som regnes for at være den første menneske sygdom hvor længden af telomererne har betydning. Således har telomerase en forøget aktivitet i de fleste former for cancer, og naturligt nok har telomerase som behandlingsform været et aktivt forskningsfelt [2]. Der er også en række sygdomme, der har vist sig at være forbundet med telomere, de såkaldte monogeniske telomere sygdomme. Disse inkluderer: barndoms - udbruds telomere sygdom; voksen

- udbruds manifestationer af telomere-formidlet sygdom. Disse syndromer er eksempler på velkendte tidlige ældnings syndromer, idet disse defekter, som fremkommer fra forkortede telomere, bliver mere og mere udtalt med stigende alder hos mennesker [2].

Som omtalt, så kan et fald i telomerase spille en rolle i ældningsprocessen, idet de stedse forkortede telomerelængder kunne have indflydelse på vævenes evne til at forny sig eller regenerere, og således fremvise ældnings fænotypen [24].

Telomere teorien for ældning

Telomere teorien for cellulær ældning blev formuleret af Olovnikov i 1973 [21], og dens tese er den, at den stedse gentagende ukomplette replikation med hver celledeling, hvor der mistes et stykke telomerisk DNA hver gang, kan blive set på som et mitotisk ur, som er et signal om celleældning, og altså ultimativt fører til at individet omkommer [21]. Længden af telomere er derfor dette molekylære ur, som tidligt blev formuleret af Hayflick. Så snart et kritisk punkt i afgivelse af telomerisk DNA er opnået, så er cellens replikative formåen ikke længere god, og cellen vil omkomme [26].

Som grundlæggeren af teorien Olovnikov selv formulerede det, så er: "A theory of marginotomy been proposed to explain the limitation of the cell doubling potential of clones of normal somatic cells. Marginotomy of DNA is the shortening of the replica with respect to the template. Marginotomy causes the appearance, in the daughters of dividing cells, of more and more shortened end-genes, the so-called telogenes, with every new mitosis. The telogenes function as the starting points of end-replicons in chromosomes and also as "buffers", being sacrificed during successive mitoses. After the exhaustion of telogenes the cells become aged and are eliminated due to the loss of some vitally important genes localized in end-replicons. Marginotomy is therefore responsible for the loss with age of various cell clones of the body, including some endocrine cell clones. Therefore marginotomy may be the primary cause of various disorders of age of the ageing of multicellular organisms" [21].

Telomere hypotesen er meget populær blandt de efterhånden talrige forslag for, hvad der fremkalder ældningsprocessen, og mange eksperimenter har da også peget kraftigt i retning af dens merit [32]. Der er dog stadig betydelig debat om, hvor stor betydning telomere forkortelse har for ældningsprocessen, men der er dem, der tillægger dem den overvejende betydning, og siger, at telomere forkortelse er den eneste årsag til ældningsprocessen [17]. Mikhelson et al. argumenterer således for, at f.eks. fraværet af den "exact inverse correlation between residual telomere length and the donor age are explained within the frames of the telomere theory"[17].

Der er en del evidens til støtte for ovenstående hypotese. Således falder mængden af telomerisk DNA hos kultiverede celler som en funktion af celledeling in vitro. Yderligere vides det, at hovedparten af udødeliggjorte celler, såsom cancerceller, har en høj telomerase aktivitet, der åbenbart gør det muligt for dem at have ubegrænsede celledelinger in vitro [22].

Der er således adskillige studier, der har påvist en forkortelse af telomere med stigende alder hos væv og organer, og der synes at være et link mellem forkortelsen af telomererne og forøgede rater af cellers turnover. Der er også adskillige studier der peger på, at forkortelsen af telomererne også påvirker de regenerative egenskaber hos en ældende organisme in vivo [24]. Der er dog også evidens for, at telomere forkortelse finder sted i væv, der besidder en relativt lav celledelings aktivitet, såsom leveren, hvilke viser, at det ikke kun er celle turnover der spiller en rolle for telomerernes forkortelse [24].

Det er også vigtigt at holde sig for øje, at telomerelængden kan opleve kraftige forkortelser igennem vigtige perioder i livet. Telomere forkortelse synes således ikke at være lineært gennem det postaltale liv, og hos de første 2 leveår. Således vil meget forkortelse være hændt, førend voksenalderen hos f.eks. mennesker er blevet nået. Hos mennesker er telomererne således forkortet fra 8.6 kb hos et fetus, og til 7.3 hos nyfødte, nående et plateau hos ældre børn, og endelig til 6.9 hos voksne i alderen 24 år, hvorefter der syntes at være en forholdsvis langsom rate af telomere forkortelse [31]. Således omtaler Yang et al. at en kurve for relationen mellem alder og telomerelængde hos får er blevet opstillet, ihvilke et gennemsnitlig fald i telomerernes længde blev påvist at være 0.59 kb pr. år for får i alderen 1 til 6 år [31].

Telomeres rolle hos forskelligartede degenerative sygdomme har også længe været klart. Således har det vist sig, at Hutchinson-Gilford Progeri patienter, dvs. dem der lider af tidlig ældning grundet defekter hos DNA helicases, faktisk har kortere telomere sammenlignet med deres aldersgrupper. Videre kan telomere syndromer omfatte idiopathisk pulmonary fibrosis [2].

Der er dog forvirrende nok også studier, der går imod en kausal forbindelse imellem ældning og telomere forkortelse. Således er det påvist, at længden af telomerene er forskellig blandt forskellige pattedyrsarter, og åbenbart ikke nødvendigvis kan siges at korrealere med pågældende arts livslængde. Således har f.eks. musen, med en gennemsnits livslængde på ca. 3 år, telomerelængde på 150 kb, mens mennesket overraskende nok kun har op til 5 til 15 kb, skønt mennesket gennemsnitligt kan blive op til 80 år [31].

Så overordnet set, så er telomere teorien for ældning stadig ret omdiskuteret, med resultater pegende i forskellige retninger. Tilbage står, at mere forskning behøves for at demonstrere en relation imellem ældningsprocessen og forkortelsen af telomere. En sådan forskning kan komme fra studiet af klonede dyr, hvis donercelle har kortere telomere end en befrugtet celle.

Teleomere forkortelse hos klonede dyr

Da telomerelængde som gennemgæet menes at have betydning på cancer og ældningsprocessen, så er det også et godt spørgsmål at stille, om hvorvidt klonede dyr bliver født med den genetiske alder af deres doner, siden de jo bliver til fra en somatisk cellekerne med forkortede telomere, eller om deres telomere ligefrem ligesom hos kønsceller bliver genforlænget til normal funktionel længde igen. Men analyser af længden på telomere har vist sig, som det vil blive gennemgået, at have forskelligartede resultater. Disse spørgsmål om klonede dyr blev først stillet af Shiels et al., der gennemførte et studie af fåret Dollys telomere [25].

Dollys DNA kom fra et cellekerne fra et får, der på det tidspunkt var seks år gammel [30]. Dette kunne således betyde, at Dollys virkelige alder var den, hun havde siden fødslen, plus hendes genetiske moder. Shiels et al. studerede telomerelængden på Dolly samt to andre kloner, hvor de benyttede sig af, som de skrev: "a (TTAGGG) oligonucleotide probe to demonstrate that ovine telomeres are composed of (TTAGGG) repeat arrays and to compare the terminal restriction fragment lengths of sheep derived by natural mating and nuclear transfer" [25]. Deres undersøgelse viste, at somatiske telomere som det kunne forventes, bliver kortere med alderen, og at Dollys telomere rent faktisk var kortere end kontroldyrene på samme alder i forholdet 19 kb vs. 23 kb. Deres undersøgelse viste videre, at hendes telomere viste forkortede terminal restriktion fragment længder, svarende til omkring samme længde som den hos vævet hos hendes genetiske doner [25]. Deres undersøgelser benyttede også celler taget fra den samme population som donercellen, samt fra aldersbeslægtede kontrolfår. En anden klon var blevet produceret med en donercelle fra et embryo der var 9 dage gammelt, og den viste også en kortere telomerelængde. En tredje klon var blevet til ved brug af fetalt væv, og denne syntes at have normale teleomere svarende til kontrollerne. Shield et al. mente, at denne undtagelse kom fra den kortvarige kulturdyrkning af disse celler, og ikke fra en forskel i cellerne selv [25]. Deres konklusion var derfor, at den genskabelse af teleomere set hos kønscellerne ikke havde fundet sted for Dollys telomere, og altså heller ikke for de øvrige kloner, som tilsammen repræsenterede cellekerner fra tre forskellige udviklingsstadier, nemlig embryo, fetus, og voksen.

Dette betød, at Dolly begyndte sit liv med samme alder som den cellekerne, hun blev klonet fra. Interessant nok, så var Dolly tilsyneladende ellers fænotypisk sund og normal for et får. I alderen to år var der ingen fysiologisk forskel på hende og kontroldyrene. Hun har også gennemgået to graviditeter og født sunde lam. Disse lam blev født med normale telomerelængder på 17.9 kb, som er det forventede. Dette viste, at i disse tilfælde er telomere blevet tilbageført til deres fulde længde hos kønscellerne [25].

Men Dollys forkortede telomere fortsatte altså med at rejse spørgsmål om, hvor gammel klonede dyr egentlig kan blive, dvs. hvad deres sande alder er. Og der blev spekuleret på, om Dolly ville komme have en fuld normal livslængde. Dolly blev faktisk aflivet i 2003 efter at have fået en lungesygdom samt arthritis. Et Finn Dorset får kan ellers groft blive 12 år, men hun blev kun seks år gammel [20].

Dette syntes således at støtte Olovnikovs telomere teori for ældningsprocessen, da man ud fra den kunne have fremlagt det regnestykke, at da Dolly blev klonet fra et seks år gammelt får, så ville hendes fulde livslængde blive nået når hun var seks år gammel, og dermed genetisk set 12 år gammel. Men senere undersøgelser har dog sat spørgsmålstegn ved, om Dollys korte telomere var en undtagelse fra reglen, eller et faktum hos alle klonede dyr.

Wakayama et al. valgte at studere telomerelængden i klonede mus, og ikke alene i en generation, men i seks på hinanden følgende generationer, hvor kloner kom fra andre kloner [29]. Det viste sig i deres forsøg, at telomerelængden fra blod lymfocytter forblev ca. i den samme længde hos musene, hvilket var på 48 kb.

Wakayama et al. frembragte altså fire og seks generationer af klonede mus fra to uafhængige linjer. Tankegangen i deres eksperimenter var den, at hvis anvendelsen af somatiske celler resulterer i kortere telomere, så skulle kloner der stammer fra kloner, også have telomere, der bliver drastisk kortere i hver ny generation. Men overraskende nok, dataene fra Dolly taget i betragtning, så demonstrerede ingen af de klonede mus tegn på tidlig ældning. Sandt at sige, så lod det til, at telomerene faktisk blev forlænget yderligere for hver generation, skønt forskningsteamet ikke kunne vise, at dette var statistisk betydningsfuldt [29].

På næsten tilsvarende måde har Lanza et al. vist i deres studie af seks klonede kvæg, at telomerelængden fra cellekerner fra voksne dyr eller fra fetal fibroblaster, enten havde den samme længde som observeret fra naturligt produceret kvæg, eller endog var en anelse forlænget, hvis aldrende fibroblaster blev anvendt [14]. Lanza et al. anvendte somatiske donerceller, som de havde kultiveret næsten til deres Hayflick grænse, dvs. de blev dyrket i kultur indtil ca. 95 % af deres forventede celledeling var opbrugt. Seks sunde kvæg blev resultatet af disse forsøg, og skønt de kom fra aldrende somatiske cellekerner, hvor telomerene havde et gennemsnit på 15.2 kb, så viste telomerene fra kalvene sig faktisk at være længere med 20.1 kb end artsfæller i kontrolgruppen, som var 18.3 kb [14].

Som Lanza et al. selv formulerede det, så: "extended nuclear transfer the replicative life-span of senescent cells (zero to four population doublings remaining) to greater than 90 population doublings. Early population doubling level complementary DNA-1 (EPC-1, an age-dependent gene) expression in cells from the cloned animals was 3.5- to 5-fold higher than that in cells from age-matched (5 to 10 months old) controls. Southern blot and flow cytometric analyses indicated that the telomeres were also extended beyond those of newborn (<2 weeks old) and age-matched control animals" [14].

Så i disse forsøg blev telomere urværket altså tilbageført igen, og endog forlænget yderligere. Disse fund var overraskende for forskningsteamet, som på det tidspunkt ikke kunne forklare, hvorledes dette kunne lade sig gøre, eller om dyrene ville drage fordel af en længere livslængde på denne måde. De foreslog dog, at forskellen kunne skyldes artsforskelle, de benyttede kvæg, mens Wilmut et al. som gennemgået benyttede får. En forskel kunne også være de teknikker, der var blevet brugt i disse to forskellige forsøg [14].

Yang et al. har ligeledes klonet køer benyttende somatiske donerceller fra aldrende vokse dyr, omend deres forsøg på den ene side viste, at telomerene igen forlænges, men demonstrerede også, ligesom i Dollys tilfælde, at en høj dødeligheds rate eksisterer blandt klonings eksperimenter [31].

I deres forsøg blev ti kalve klonet, omend seks af disse ikke overlevede længe efter fødslen, de overlevende kalve er alle vokset op til sunde og raske køer. Donercellen var en fibroblast fra en 13 år gammel ko. Som hos Lanza et al. demonstrerede telomerelængden af disse kalve ligeledes, at telomererne var blevet genforlænget, og at de faktisk var længere end hos deres doner. De kalve der ikke overlevede fødslen, havde ligeledes forlængede telomere. Yang et al. konkluderer derfor, at de hyppige dødsfald der ses ved kloning, ikke skyldes telomerens længde [31].

Miyashita et al. producerede fjorten klonede kvæg, og fik næsten samme type resultater. Men i deres eksperimenter opnåede de stor variation i telomerelængden imellem de klonede dyr. De benyttede donercellen fra forskelligt væv, såsom muskel, oviduct, samt ørehud. Miyashita et al. fandt således både normale, længere, og kortere telomere [18].

Der syntes dermed at være en variation i telomerens længde imellem forskelligt væv, såvel som mellem forskellige arter, hvilke naturligvis ikke gør det let at vurdere telomere teorien for ældning baseret på disse

resultater.

Dette blev bekræftet i et forholdsvist nyt studie af Jeon et al. hvor grise blev klonet ud fra donerceller fra to typer af fetal fibroblaster, som var forskellige alt efter hvornår fetus blev indhøstet [11]. Jeon et al. fandt, at deres grise havde sunde fænotyper fra fødslen af, og ikke adskilte sig fra deres ikkeklonede artsfæller med hensyn til vægt og hudtype. Men i alderen to år begyndte forskellene at manifestere sig, idet de tre klonede grise begyndte at udvikle rynker, indikerende højere alder end de efter deres alder skulle have, og som altså ikke fandtes hos deres naturligt producerede artsfæller [11].

Som opsummeret af Jeon et al. "The telomeres were longer in the early cloned piglets (mean TRF length = 23.5 ± 1.6 kb) than in donor fetal fibroblasts (mean TRF length = 21.3 ± 1.1 kb); however, telomere length decreased over time in both normal and wrinkled cloned pigs. Normal cloned pigs >1.5-years-old had a mean telomere length of 19.6 ± 2.3 kb, whereas wrinkled cloned pigs at the same age had shorter telomeres (mean TRF length = 18.7 ± 0.6 kb) ($P < 0.05$). Cloned pigs with or without wrinkles had shorter telomeres than age-matched normal pigs" [11].

Disse eksperimenter antyder altså en korrelation imellem telomerelængden og ældning hos de klonede grise, skønt der ingen fænotypiske træk var at finde tidligt i deres liv. Forskellen imellem disse rapporter om varierende telomerelængder og dyrenes ældning efter kerneoverførsel kan komme fra forskellige faktorer, såsom donercelle type, dyrkningstiden og forskelligartede fejl opstået ved selve kerneoverførslen, som alle bliver udtrykt ved dyrenes efterfølgende vækst [11]. De konkluderer dog selv, at: "Because telomere length is strongly influenced by many genetic and other factors, by itself it can be a poor indicator of aging or cell viability" [11].

Der er i skrivende stund blevet klonet flere forskellige dyrearter, såsom kat, rotte, muldyr, hest, hund, ulv, vandbøffel, kamel, ged [34]. Alle disse har også vist varians, og som Kellie et al. har fremhævet, så virker det, som om kloning har forskellig effekt alt efter hvilken art der tales om, og endog imellem forskelligt væv indenfor samme art [13].

Så for at opsummere, så tyder disse observationer på, at kloning ikke nødvendigvis genskaber telomerene, eller, at der ikke nødvendigvis er en relation imellem tidlig ældning og længden på telomerne. Det kunne måske hævdes, at embryoet selv har den egenskab at bestemme længden af telomerene, eller at kerneoverførsels teknikken i sig selv kan fremkalde en forlængelse af dem, måske som følge af donercellen [32]. Det er dog ret sikkert, at telomerase aktivitet spiller en afgørende rolle i disse genforlængelser af telomerne, og dette er set i en del tilfælde, såsom hos embryoer hos kvæg [32]. Så klart nok er mere forskning påkrævet for mere klare svar angående, hvad der er gældende hos klonede dyr.

Øvrige defekter

Til trods for de divergerende rapporter om telomerelængden hos klonede dyr, så har en næsten konstant faktor været, at somatisk kerneoverførsel har haft en meget lav effektivitetsrate. Således var Dolly resultatet af en indsats, hvori indgik 277 æg for at frembringe blot 29 embryoer, af hvilke blot tre nåede frem til at blive født, og kun et overlevede [30].

Der er også blevet fundet anomaliteter hos klonede dyr, hvor de fødes med en tilsyneladende normal fænotype, men alligevel begynder at vise genom relaterede forandringer senere hen i deres liv [11]. Det er således rapporteret, at hovedparten af klonede pattedyr dør enten som embryo, eller bliver født døde, således er succesraten for klonede dyr rapporteret til at være så lav som blot 0.1–2.0 [28]. Fetal

anomaliteterne kan komme i f.eks. placenta udviklingen, hvor disse kan være forstørrede og malfungerende, og fænotyper kan fremvise det, der kaldes for "Large Offspring Syndrome" [11].

Jaenisch et al. studerede placentaer hos klonede mus og fandt, at en ud af 25 gener blev udtrykt unormalt hos musene [9]. Deres undersøgelser viste, at normale dyr måske ikke kunne produceres igennem kloning, siden gener hos klonede og naturligt fødte dyr bliver udtrykt forskelligt. Som Jaenisch et al. formulerede det: "(1) all analyzed clones at birth showed dysregulation of hundreds of genes. The development of clones to birth and beyond despite widespread epigenetic abnormalities suggests that mammalian development can tolerate dysregulation of many genes. (2) Some clones survive to adulthood by compensating for gene dysregulation. Though this "compensation" assures survival, it may not prevent maladies from becoming manifest at later ages" [9].

Så skønt dyrene kan blive født og leve vel ind til deres voksenalder, så kan de alligevel grundet disse beskedne ændringer i genregulation komme til at have skavanker senere i livet, såsom lever svigten, overvægt, tidlig ældning eller tidlig død [9].

Latham et al. gør det også klart i deres studie, at visse af de stadier der finder sted i normal embryogenese, ikke alle bliver gentaget, eller hvertfald ikke bliver gentaget i samme tempo hos klonede embryoer [15]. Forskellen imellem normale og klonede dyr kan således måske findes i forskelle i kromatin hos kromosomerne, hvor der er en forskel i den somatiske celledes kromatin som sammenlignet med kromatinet hos ægcellen eller spermcellen. Forskellen på en somatisk kerne og en spermcelle gør således, at omprogrammeringen vil være langsommere og vil kunne føre til fejl hos det udviklende embryo [15].

Kellie et al. har også rapporteret, at der ses en hyppig overvægt hos klonede dyr som voksne. Således var Dolly overvægtig som voksen, og klonede mus har også vedvarende vist overvægt, og det til trods for, at de ikke spiser mere end mus fra kontrolgrupperne [13]. Kellie et al. pointerede dog, at energiforbrug hos de klonede mus ikke var blevet målt [13].

Jeon et al. havde som gennemgået i forrige afsnit studeret telomere forskellene hos tre klonede grise, klonet fra to sæt af donerceller [11]. Skønt grisene blev født med normale fænotyper, så begyndte de at fremvise rynkede fænotyper efter alderen to år, hvilke deres kontrolgrupper ikke gjorde, da to år ikke er en høj alder for en gris, og rynker sædvanligvis er en indikation af ældning. Deres undersøgelse havde til formål at studere, hvorvidt de mange rapporter, der postulerede en svigten af omprogrammering af somatiske cellekerner, havde merit, eller om kvaliteten af selve donercellen var det afgørende.

Deres konklusion blev, at en genetisk anomalitet hos donercellen var ansvarlig for grisenes rynker, frem for at komme fra en svigten i omprogrammering, hvilke bringer spørgsmålet om kloning tilbage til den gamle debat om det potentiale, som differentierede somatiske celler kan have ved kloning. Jeon et al. konkluderede, at: "although it is also important that donor cells be accurately reprogrammed to early-stage cells, the selection of good-quality donor cells is the ultimate challenge for successful cloning" [11].

Hvis cellers differentierede tilstande stadig spiller den afgørende rolle for en succesfuld kloning, så bringer det igen det gamle spørgsmål op om, hvorvidt det vil blive muligt at producere sunde individer ved kloningsteknologien. Det vil dæmpe dens anvendelse i landbrugsproduktion, såvel som ambitionerne om at sikre ellers truede arter.

Diskussion

Skønt den moderne forståelse af reproduktiv kloning ikke er særlig gammel, så finder forskningen indenfor somatisk kerneoverførsel i dag sted i et hastigt tempo, og dens indflydelse på forskning, dyreproduktion, medicin og åbenbart også forskningen i ældningsprocessen er stigende. Denne sidste faktor, som er blevet diskuteret i dette projekt, er afgørende at finde svar på, hvis kerneoverførings teknologien skal blive fuldt anvendelig, dvs. om den vitterligt er i stand til at vende cellulær ældning og frembringe sunde levedygtige individer. Som gennemgået i de foregående afsnit, er reproduktiv kloning kendt for at være upålidelig og besidde en fertilitets succes, som lader meget tilbage at ønske. Således tog det jo 277 forsøg førend Dolly blev til, og lignende mønstre er gået igen hos andre arter [20].

Effektiviteten af kloning har siden fremkomsten af Dolly været ret lav, et træk der er gået igen i samtlige klonede arter, men det er dog optimistisk blevet sagt, at disse problemer hos klonede dyr er af hovedsageligt teknisk art og vil blive løst i den nærmeste fremtid, efterhånden som de rette betingelser for dyrkning, sammensmeltning af kerne og æg bliver forbedret [9].

Som gennemgået i et relativt nyt studie af Jeon et al., så er der mange faktorer der gør sig gældende i somatisk kerneoverførsel, såsom doner celletype og alder, cellecyklus fasen og endelig også kloningsteknikkerne selv, såsom klemning af kernen, aktivation og fusion, hvilke kan have indflydelse på reprogrammeringen af cellen [11]. Men stadig ses der defekter hos kloner, også selvom teknikken er blevet betydeligt forbedret.

Et vigtigt spørgsmål i debatten vedrørende kloner og deres helbred er, om det i det hele taget kan lade sig gøre at frembringe sunde klonede dyr ved kerneoverførsel. Som gennemgået er det stadig et åbent spørgsmål, om kloner bliver født med den samme alder som deres genetiske ophav, og som konsekvens deraf ikke kommer til at leve så længe [11]. Som gennemgået vides det endnu ikke, hvad der egentlig er skyld i ældningsprocessen, skønt der er mange hypoteser fremme. Blandt dem er, at telomere forkortelsen fungerer som et molekylært ur i cellen. Men når telomerelængden er blevet studeret hos klonede dyr, så er der ikke blevet fundet klare entydige svar.

Shield et al.s studie af Dolly viste, at skønt hun havde en fænotype svarende til hendes alder, så var hendes telomerer kortere og af samme længde som hendes doner [25]. Kromosomer hos klonet kvæg eller mus havde dog omvendt længere telomerer end deres aldersgruppe, og deres celler syntes dermed at have en længere livslængde end deres kontroldyr [15].

Dette sidstnævnte faktum har faktisk haft en positiv effekt både i den offentlige debat, samt hos forskningen i ældningsprocessen, siden det at kloningsteknikken åbenbart også kunne forlænge telomererne, og hvis telomerelængde har betydning for livslængden, så kunne kloningsteknikken spille en rolle i forståelsen af mekanismen, der hypotetisk kunne være med til at bane vejen for celleforyngelse [32]. Men sagen er dog ikke helt så simpel, og forskellige studier har vist, at telomererne hos klonede dyr kan være kortere hos nogle væv i kroppen, mens de samtidig kan være af passende længde i andre væv. Videre kan telomererne også være af almindelig længde selv hos klonede dyr. Mere vigtigt er måske, at til trods for de forskellige rapporter om telomerelængde, så syntes de fleste kloner siden Dolly at ældes normalt [9]. De første klonede kvæg var sunde og raske, og var op til 2008 stadig med et helbred svarende til deres aldersgrupper. Så alt i alt er det stadig ikke helt klart, hvorfor kloner har forskelle i telomerelængden [19].

Grunde til disse mange forskelle er blevet foreslået, at skyldes årsager såsom forskelle i donerens celletype, dyrkningsbetingelserne, forskellige kilder til DNA anvendt for målingen af telomerelængden osv. Det indtil for nyligt ret beskedne antal dyr anvendt til kloning, samt arts variation, er også blevet nævnt [31]. Det kan dog også argumenteres, at ineffektiviteten af telomerenes længde er overdreven, således har Tin et al.

rapporteret frembringelsen af 4 levende og 6 døde kloner, hvor de levende kloner blev vist at have 15.38 kb, og de døde kloner 15.87 kb telomere, med næsten samme længde som kontroldyrene med 14.73 kb. Det viste sig videre, at de døde kloner også havde abnorm X kromosom inaktivation, hvilke kunne pege på, at dette kunne være en årsag til abnorm genekspression hos embryo udvikling, hvilke således kan være grunden til den forøgede dødeligheds rate observeret hos kloner [32].

Det vides også, som påvist af Shiels et al., at kromosomerne hos får er forholdsvis lange, fra ca. 5 kb og helt op til 48 kb [25], mens kromosomerne hos kvæg er forholdsvis korte, fra 6 kb og op til 23 kb [18]. Dette kunne åbne op for muligheden af, at reguleringen af telomerelængden kan være forskellige imellem kvæg og får. Lanza et al. har også fremsat den ide, at kloningprocessens lave effektivitet kan give muligheden for, at ellers sjældne hændelser kan blive selekteret, eller at en ikketilfældig selektion for celler, der besidder telomere af bestemte længder, kan blive valgt [14].

I årene efter Dolly tydede det på, at sunde levedygtige kloner måske ikke kunne fremkomme af følgende grunde, som opsummeret af Jaenisch et al.: "(1) all analyzed clones at birth showed dysregulation of hundreds of genes. The development of clones to birth and beyond despite widespread epigenetic abnormalities suggests that mammalian development can tolerate dysregulation of many genes. (2) Some clones survive to adulthood by compensating for gene dysregulation. Though this "compensation" assures survival, it may not prevent maladies from becoming manifest at later ages" [9].

Det vides ikke, hvilken grund der er for disse anomaliteter, skønt det er blevet foreslået, at ukomplet reprogrammering, der kan skyldes problemer med imprintede gener, har ansvaret. Forskning i programmerings hændelserne hos telomere eller telomerase, som finder sted hos embryo udviklingen og hos kerneoverførsel, kan således måske give mere klarhed i de mekanismer, der finder sted [5]. Men på baggrund af disse ting, så er kloner forventet at blive født med visse unormaliteter, skønt disse ikke nødvendigvis behøver at medføre skrantende helbred tidligt i livet, men som set hos mus kan fremkalde dem senere i livet. Så forskellige klonede individer kan altså fremvise variationer i deres unormale genekspression, hvilke måske ikke er så overraskende [9].

Men allerede i 2007 havde situationen ændret sig. Mens der 1996, blev brugt 277 æg for at frembringe blot 29 embryoer, hvoraf kun en overlevede og blev til Dolly, så har teknikken allerede udviklet sig så meget, at i 2007 tog det blot 5 embryoer for at frembringe hele 4 levedygtige får, klonet fra Dollys eget væv [36]. Der var således krævet færre forsøg, og mindre laboratorie arbejde. Så blot et årtis forskning havde kraftigt forbedret Wilmut et al.s oprindelige metodologier. Det er således også rapporteret, at de fleste klonede grise og geder nu bliver født sunde og raske, vokser som de skal, og ikke er mere sårbare overfor sygdomme end deres artsfæller [35].

Kloningsteknikken kan måske dermed sammenlignes med den ældre traditionelle dyreproduktion. Her blev den såkaldte LOS tit observeret, dvs. at dyrene blev født meget store og ofte med diverse sundhedsdefekter. Disse "large offspring syndromes" er også set hos klonede dyr, og både hos traditionel såvel som klonet produktion er disse effekter blevet mindre i takt med, at teknikken og forståelsen er forøget [35].

Det eneste rigtige mål for effektiviteten af kerneoverførsels teknikken er, som påpeget af Campell, produktionen af levedygtigt afkom [5]. Han påpeger som også andre har gjort, at induktionen og opretholdelsen af graviditeten afhænger af flere faktorer, såsom embryoen selv, men også af alder, sæsonen, samt hormon status hos surrogaten [5]. Således er status for kloner tilsyneladende den, at i de fleste tilfælde vil klonede dyr med fødsels abnormaliteter have helbreds problemer de første måneder i deres liv, men derefter vil de, hyppigst efter alder 6 måneder fremvise de samme fænotyper som deres ikke klonede artsfæller [35].

Men stadig, skønt kloners fænotype og helbred er forbedret, og således måske kan anvendes til praktiske formål, så er der stadig spørgsmålet om deres genotype og deres telomere. Kloner er derfor stadig vigtige for forskningen. Der er stadig vigtige spørgsmål, såsom ældningsprocessen, hvorfor klonede mus er svære at frembringe, mens klonede kvæg er lette at frembringe osv. [18]. Det er som gennemgået sandsynligt, at en forbedring af dyrkningsbetingelserne, en forbedring af kernens betingelser, og en bedre forståelse af de faktorer der spiller ind ved kloningsprocessen, såsom f.eks. faktorer fjernet ved kromosomernes spindlet kompleks, kan forbedre fertilitetsraten, og så kan den forøgede effektivitet der allerede er observeret, blive yderligere forbedret [15].

Men op til nu har forståelsen af relationen imellem ældningsprocessen og telomerernes længde været begrænset af antal klonede dyr, og dermed af begrænset indsigt i telomerase aktivitet, dyrkningstid, celletyper osv. [32]. Således må systematiske longitudinale studier af klonede dyr inddrage passende kontrolgrupper [13].

Så det er stadig til debat, hvor vigtige telomerelængden er for ældningsprocessen, og antallet af klonede dyr er stadig for begrænset til at være statistisk signifikant. Men antallet er stigende, og mange arter, køer, mus, geder, grise, og heste m.m. er blevet klonet siden Dolly, så det hidtil så beskedne antal af kloner tilgængelige for forskning og statistisk analyse er stedse stigende.

Kloning ved brug af kerner fra somatiske celler, har ledt til vigtig ny indsigt til områder såsom celletype commitment igennem differentiation og dedifferentiation, samt interessante spørgsmål om epigenetikens rolle for dyrs udvikling. Alle disse områder kræver mere forskning, førend kloning kan finde fuld praktisk anvendelse i dyreproduktion [28]. Således mener Trounson, at oocytten fortsat spiller en rolle for reprogrammeringen af somatiske celler, og at ooplasmens proteiner med deres betydning for kromatin ommodulering og DNA transcription, skal have et forskningsfokus fremover [28].

Dolly levede ikke så længe som et får ellers kan, men det behøver ikke nødvendigvis at være relateret til det, at hun var en klon. Hun døde af en lungeinfektion, der er relativt almindeligt for får, der tilbringer en del af deres tid inden døre [33]. Telomerelængde svarer heller ikke nødvendigvis til et dyrs livslængde, og det er derfor ikke let at svare på, hvad et dyrs alder er baseret kun på telomererne. Men telomererne er klart vigtige, og der er mange spørgsmål om både dem, såvel som deres betydning for kloningsteknikken [32].

Så overordnet set må det konkluderes, at der er behov for mange flere klonede dyr, som videre skal have lov til at leve deres fulde livslængde, førend vi mere sikkert kan sige, hvad effekterne af reproduktiv kloning er. Men indtil da lader det ikke til, at en korrelation imellem tidlig ældning, og så kloning af dyr fra celler fra voksne dyr, entydigt kan opstilles.

Referencer

1. Allen John F., Allen Carol A. A Mitochondrial Model for Premature Ageing of Somatically Cloned Mammals IUBMB Life Volume 48, Issue 4, pages 369–372, October 1999
2. Armanios, M; Blackburn, EH (2012). "The telomere syndromes". *Nature Reviews Genetics* 13 (10): 693–704.
4. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I (1996). "Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line". *Nature* 380 (6569): 64–6.
5. Campbell Keith A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine* *J Anat.* 2002 March; 200(3): 267–275.
7. Hayflick L. (1965). "The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains". *Exp. Cell Res.* 37 (3): 614–636.
9. Jaenisch R, Hochedlinger K, Eggan K (2005). "Nuclear cloning, epigenetic reprogramming and cellular differentiation". *Novartis Found. Symp. Novartis Foundation Symposia* 265: 107–18; discussion 118–28.
11. Jeon Hyun Yong et al. Senescence is accelerated through donor cell specificity in cloned pigs *International Journal of Molecular Medicine* august 2012 Volume 30 Issue 2
13. Kellie L.K et al. Developmental, Behavioral, and Physiological Phenotype of Cloned Mice Somatic Cell Nuclear Transfer, edited by Peter Sutovsky. ©2007 Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
14. Lanza Robert P. et al. Extension of Cell Life-Span and Telomere Length in Animals Cloned from Senescent Somatic Cells *SCIENCE VOL 288 28 APRIL 2000*
15. Latham, K. E. (2005). "Early and delayed aspects of nuclear reprogramming during cloning". *Biology of the Cell.* pp. 97, 119–132.
16. Magalhães João Pedro de, Jose Cabral and Domingos Magalhães The Influence of Genes on the Aging Process of Mice A Statistical Assessment of the Genetics of Aging *Genetics*, 2005 vol. 169 no. 1 265-274
17. Mikhelson, VM.; Gamaley, IA. (2012). "Telomere shortening is a sole mechanism of aging in mammals.". *Curr Aging Sci* 5 (3): 203–8.
18. Miyashita Norikazu 2., et al. Remarkable Differences in Telomere Lengths among Cloned Cattle Derived from Different Cell Types¹ *Biology of Reproduction* June 1, 2002 vol. 66 no. 6 1649-1655
19. Niemann H, Tian XC, King WA, Lee RS (2008). "Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning". *Reproduction* 135 (2): 151–63.
20. Nigel Williams (2003). "Death of Dolly marks cloning milestone". *Current Biology* 13 (6): 209–210.
21. Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* 41, 181–190.
22. Philippi C, Loretz B, Schaefer UF, Lehr CM. (April 2010). "Telomerase as an emerging target to fight cancer - Opportunities and challenges for nanomedicine". *Journal of Controlled Releases* 146 (2): 228–40.
24. Schaetzlein S., Rudolph K. L. Telomere length regulation during cloning, embryogenesis and ageing *Reproduction, Fertility and Development* 17(2) 85–96, 2004
25. Shiels PG, Kind AJ, Campbell KH, et al (1999). "Analysis of telomere length in Dolly, a sheep derived by nuclear transfer". *Cloning* 1 (2): 119–25.
26. Shiels Paul G. Somatic cell nuclear transfer as a tool for investigating ageing processes in mammals *Gene Therapy and Molecular Biology* Vol 4, 11-22. December 1999.
27. Toussaint, O., Raes, M. & Remacle, J. (1991) Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stage. *Mech Ageing Dev* 64, 45-64.
28. Trounson AO (2006). "Future and applications of cloning". *Methods Mol. Biol. Methods in Molecular Biology* 348: 319–32.
29. Wakayama et al.: Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394 369–374. 1998.
30. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997). "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells". *Nature* 385 (6619): 810–3.
31. Yang Xiangzhong and Tian X. Cindy. Cloning Adult Animals - What is the Genetic Age of the Clones? *Cloning.* November 2000, 2(3): 123-128. Volume: 2 Issue 3: July 5, 2004
32. Xu Jie and X Yang iangzhong Will cloned animals suffer premature aging – The story at the end of clones' chromosomes *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 1: 105.
33. Was Dolly already 'old' at birth? Roslin Institute, Accessed 4 April 2010
34. Wikipedia.
35. genome.gov
36. Sheep clones 'in better health' than original Dolly BBC news. 2010.