

Da quando Dolly ha dimostrato che la clonazione dei mammiferi è una realtà, si cercano le possibili strade per sfruttare in modo utile questa nuova tecnologia

Nell'estate del 1995 la nascita di due agnellini nell'Istituto di ricerca in cui lavoro, il Roslin Institute nei pressi di Midlothian in Scozia, diede il via a una stagione che, a detta di molti scienziati, promette di essere ricca di opportunità rivoluzionarie per la biologia e la medicina. Megan e Morag, entrambe date alla luce da una madre surrogata, non sono nate dall'unione di uno spermatozoo e di una cellula uovo: il loro materiale genetico proveniva da cellule in coltura prelevate originariamente da un embrione di 9 giorni. Questo fa sì che Megan e Morag siano due copie genetiche, o cloni, dell'embrione originale.

Prima di questo risultato, i ricercatori erano già in grado di ottenere pecore e altro bestiame attraverso copie geneticamente identiche di cellule ricavate da embrioni nei primi stadi dello sviluppo. Il nostro lavoro avrebbe reso molto più pratico il processo di clonazione, dato che è relativamente semplice lavorare con le cellule in coltura. Megan e Morag dimostravano che, al contrario di quello che si riteneva sino ad allora, anche cellule parzialmente specializzate, o differenziate, potevano essere geneticamente riprogrammate e funzionare come cellule di un embrione precoce.

Continuammo il nostro lavoro cercando di clonare animali a partire da cellule in coltura prelevate da un feto di 26 giorni e da una pecora adulta. Nacque così Dolly, il primo mammifero mai clonato a partire da un individuo adulto. L'annuncio della sua nascita, nel febbraio del 1997, suscitò enorme scalpore, forse perché apriva la strada alla possibilità teorica di clonare esseri umani, un evento che, secondo me, non dovrebbe mai verificarsi. D'altra parte, la possibilità di ottenere cloni di cellule in coltura derivanti da tessuti facilmente manipolabili potrebbe avere numerose ricadute positive in ambito zootecnico e medico, e potrebbe aiutare a chiarire alcune questioni fondamentali della biologia.

Come si esegue la clonazione

La clonazione si basa sul trasferimento del nucleo da una cellula donatrice a una cellula ricevente, la stessa tecnica che gli scienziati hanno adottato per alcuni anni allo scopo di ottenere cloni da cellule prelevate da embrioni. Questo trasferimento richiede l'impiego di due cellule, una delle quali, la ricevente, è una cellula uovo, od ovulo, non fecon-



John Chadwick Photographic e PPL Therapeutics

data, prelevata da una femmina subito dopo l'ovulazione. Questi ovuli sono pronti a svilupparsi se opportunamente stimolati. La cellula donatrice, invece, è quella che verrà copiata. Un operatore, con l'aiuto di un potente microscopio, immobilizza la cellula ricevente aspirandone un'estremità con un finissimo capillare di vetro e con una micropipetta ne estrae i cromosomi, i corpuscoli che incorporano il DNA della cellula (a questo stadio i cromosomi non sono ancora racchiusi in un nucleo distinto). Poi, di solito, la cellula donatrice - assieme al suo nucleo - viene inserita nella cellula ricevente con la quale si fonde. Alcune cellule risultanti dalla fusione iniziano a svilupparsi come un embrione normale e, se vengono impiantate nell'utero di una madre surrogata, possono dare vita a una discendenza perfettamente sana.

Nei nostri esperimenti con le cellule in coltura abbiamo preso particolari precauzioni per far sì che la cellula donatrice e quella ricevente fossero compatibili. In particolare, abbiamo cercato di coordinare i cicli di duplicazione del DNA e di produzione dell'RNA, la molecola che viene copiata dal DNA e regola la sintesi delle proteine. Abbiamo quindi scelto di utilizzare cellule donatrici il cui DNA non fosse già stato duplicato al momento del trasferimento. Per questo, prima di utilizzare le cellule, le abbiamo rese quiescenti riducendo la concentrazione di nutrienti nel mezzo di coltura. Inoltre, dopo il trasferimento abbiamo sottoposto la cellula uovo a scariche elettriche, allo scopo di favorire la fusione delle cellule, simulando così gli stimoli che normalmente vengono forniti dagli spermatozoi.

Dopo che la nascita di Megan e Morag aveva dimostrato la nostra capacità di produrre individui sani a partire da

Associated Press

i con la clonazione

di Ian Wilmut



DOLLY (al centro), MEGAN E MORAG,
i primi mammiferi clonati da cellule in coltura,
vengono presentate al pubblico il 25 febbraio
1997 al Roslin Institute. Questa tecnica
ha consentito la creazione di cloni di pecore
portatrici di geni umani. Esse producono
un latte che viene raccolto e lavorato (a sinistra)
per ricavarne proteine umane di uso terapeutico.

colture embrionali, presentammo domanda di brevetto e iniziammo una serie di esperimenti per cercare di ottenere individui partendo da colture di cellule completamente differenziate. In collaborazione con la PPL Therapeutics, sempre vicino a Edimburgo, eseguiamo una serie di prove che utilizzavano fibroblasti (le normali cellule del tessuto connettivo) e cellule prelevate dalla mammella di una pecora gravida di tre mesi e mezzo. La scelta era dovuta al fatto che, a quello stadio della gravidanza, le cellule mammarie si moltiplicano rapidamente e questo ci faceva sperare che potessero fare altrettanto una volta messe in coltura. Inoltre queste cellule possiedono cromosomi stabili, e perciò presumibilmente conservano intatte le informazioni genetiche. Il successo della clonazione

di Dolly a partire da colture di cellule mammarie e quella di altri agnelli ottenuti da fibroblasti hanno dimostrato che il protocollo adottato al Roslin era valido e affidabile.

Tutti gli individui clonati nei nostri esperimenti avevano caratteristiche simili alla razza della pecora che aveva donato il nucleo di partenza, piuttosto che a quella della donatrice della cellula uovo o della madre surrogata. I test genetici hanno dimostrato che Dolly è effettivamente il clone di un adulto. È molto probabile che Dolly derivi da una cellula mammaria completamente differenziata, anche se non può essere stabilito con certezza, perché la coltura di provenienza conteneva anche alcune cellule meno specializzate, sempre presenti in piccola percentuale nella ghiandola mammaria. Altri labora-

La quiescenza: una chiave per la clonazione?

Le cellule utilizzate come donatrici nei nostri esperimenti di trasferimento nucleare erano quiescenti, cioè non fabbricavano RNA messaggero. Normalmente, durante quasi tutto il ciclo cellulare, le cellule copiano le sequenze di DNA in RNA messaggero, che a sua volta regola la produzione delle proteine. All'inizio scegliemmo di lavorare con cellule quiescenti perché è facile mantenerle in uno stato uniforme per diversi giorni. Poi Keith H. S. Campbell, del nostro gruppo, scoprì che queste cellule potevano essere adatte alla clonazione.

Egli partì dall'idea che per trasferire con successo i nuclei bisogna anzitutto inibire la produzione naturale di RNA nei nuclei donatori. Questo perché le cellule degli embrioni nei primi stadi dello sviluppo

sono controllate da proteine e da RNA fabbricati dai precursori delle cellule uovo. Solo tre giorni circa dopo la fertilizzazione l'embrione comincia a produrre il proprio RNA. Dato che normalmente i cromosomi della cellula uovo non producono RNA, i nuclei di cellule quiescenti avrebbero avuto maggiori possibilità di svilupparsi dopo il trasferimento. Inoltre, è anche possibile che i cromosomi dei nuclei quiescenti si trovino in uno stato fisico particolarmente favorevole. Noi riteniamo che alcune molecole regolatrici presenti nell'uovo ricevente abbiano l'effetto di riprogrammare il nucleo trasferito. Anche se non sappiamo quali siano queste molecole, è possibile che i cromosomi di cellule quiescenti siano più facilmente accessibili a esse.

tori hanno poi utilizzato una tecnica analoga per creare cloni perfettamente riusciti di bovini e topi partendo da cellule in coltura, non necessariamente prelevate da femmine gravide.

Anche se la clonazione per trasferimento di nuclei è una tecnica riproducibile, presenta indubbiamente alcuni limiti. Bovini e pecore clonati sono spesso più grandi del normale, ma lo stesso effetto si osserva quando gli embrioni vengono coltivati «in provetta» prima della gestazione. Un limite forse più importante è costituito dal fatto che il trasferimento nucleare non è ancora molto efficiente. Circa 30 anni fa, John B. Gurdon, che adesso lavora all'Università di Cambridge, nell'eseguire esperimenti di trasferimento nucleare sulle rane scoprì che il numero di embrioni che sopravviveva fino allo stadio di girino era minore quando le cellule donatrici provenivano da animali in stadi più avanzati di sviluppo. Anche i primi studi sui mammiferi, da noi effettuati, mostrano risultati simili. In tutti gli esperimenti di clonazione finora eseguiti solo l'1-2 per cento degli embrioni è sopravvissuto fino alla nascita e, purtroppo, anche alcuni cloni che sono arrivati alla nascita sono morti poco dopo.

Cloni sì, ma con una differenza

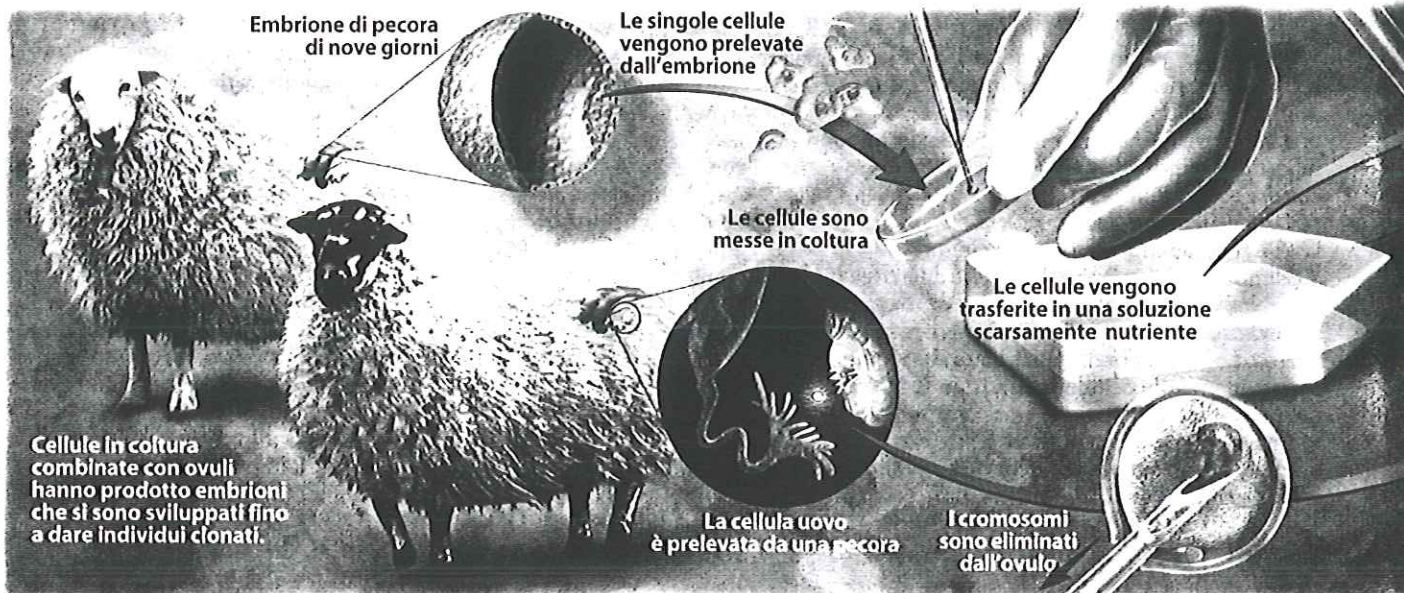
La causa di queste morti è tuttora sconosciuta, ma potrebbe derivare dalla necessità di una complessa riprogrammazione genetica, indispensabile per la nascita di un individuo adulto. Il fatto che un solo gene esprima o no una proteina cruciale in un momento sensibile dello sviluppo potrebbe avere conseguenze fatali; inoltre, la stessa riprogrammazione implica probabilmente la regolazione di migliaia di geni diversi, in un processo che potrebbe essere in parte ca-

suale. Gli accorgimenti tecnici, come l'uso di diverse cellule donatrici, potrebbero contribuire a limitare questo grave inconveniente. La possibilità di produrre individui partendo da cellule in coltura apre nuove prospettive, relativamente semplici da realizzare, per la produzione di animali geneticamente modificati, o transgenici, importanti sia per la ricerca sia per la produzione di proteine umane di interesse terapeutico.

La tecnica classica per ottenere animali transgenici è complessa, lunga e poco efficiente. Essa consiste nel microiniettare un costrutto genetico - cioè una sequenza di DNA che include il gene desiderato - in un gran numero di cellule uovo fecondate. Alcune di queste cellule incorporano nel loro materiale genetico il DNA che è stato introdotto, che verrà così espresso dalla progenie. Questi animali verranno poi incrociati per trasmettere il nuovo gene alla discendenza (si veda l'articolo *Animali transgenici per la produzione di farmaci* di William Velander, Henryk Lubon e William Drohan in «Le Scienze» n. 346, giugno 1997).

A differenza di quanto si deve fare con la cellula uovo, per introdurre il DNA estraneo in cellule in coltura è sufficiente un semplice trattamento chimico. Se queste cellule vengono poi utilizzate come donatori per il trasferimento nucleare, il costrutto desiderato si trasmette a tutta la discendenza. Il Roslin Institute e la PPL Therapeutics hanno già utilizzato questa tecnica per produrre animali transgenici in modo più efficiente rispetto alla microiniezione. Abbiamo così incorporato nelle pecore il gene umano del fattore IX, una proteina che interviene nella coagulazione sanguigna e che viene utilizzata per curare l'emofilia di tipo B. L'esperimento prevedeva il contemporaneo trasferimento del

Così sono nate Megan e Morag



gene per la resistenza all'antibiotico neomicina in modo che, aggiungendo una dose tossica di questo antibiotico alla coltura, abbiamo potuto uccidere tutte le cellule che non avevano incorporato il DNA estraneo. Questa procedura non è però valsa a far variare la percentuale di embrioni che si sono sviluppati dopo il trasferimento nucleare.

La prima pecora transgenica ottenuta con questa tecnica, Polly, è nata nell'estate del 1997 e ha poi dimostrato di produrre, così come fanno altri cloni transgenici, un latte che contiene il fattore IX umano. Queste osservazioni suggeriscono che, una volta perfezionate le tecniche per il prelievo degli ovuli nelle varie specie, con la clonazione si potranno introdurre precise modificazioni genetiche in qualunque mammifero e si potrà creare una discendenza con le identiche caratteristiche.

Le colture di cellule mammarie usate come donatrici potrebbero offrire anche un altro vantaggio. Fino a poco tempo fa esisteva un solo metodo praticabile per verificare se le proteine prodotte da un nuovo costrutto di DNA venissero effettivamente secrete nel latte. Il metodo consisteva nel trasferire il DNA in femmine di topo e nel testare poi il loro latte. Oggi si potrebbero invece testare direttamente le cellule mammarie in coltura. Questo potrebbe accelerare il processo di selezione dei costrutti e delle cellule che hanno incorporato il DNA e che sono in grado di secernere la proteina in modo efficiente.

Ma la clonazione offre numerose altre possibilità. Una di queste è la produzione di organi a partire da animali geneticamente modificati allo scopo di trapiantarli su pazienti umani. Al giorno d'oggi, migliaia di persone muoiono ogni anno prima che siano disponibili un cuore, un fegato o un rene adatti per il trapianto. Se si trapiantasse in un uomo un



Roddy Field, Roslin Institute

DOLLY (a destra nella foto) divenne celebre nel 1997 come il primo mammifero clonato a partire da cellule di adulto. Raggiunta la maturità, da poco Dolly ha dato alla luce un agnellino sano, Bonnie (a sinistra), frutto di un accoppiamento e di una gestazione assolutamente normali.

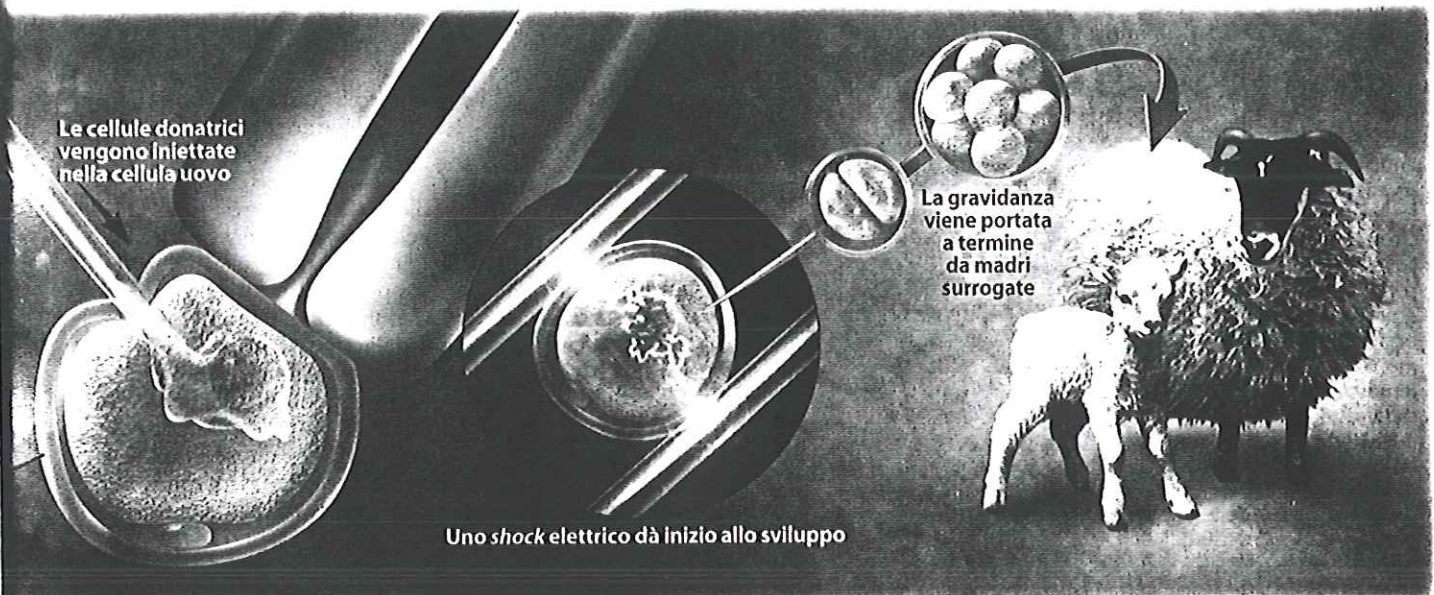
organo normale di maiale, questo verrebbe rapidamente distrutto da una reazione immunitaria «iperacuta». Questa reazione è scatenata da proteine presenti sulle cellule del maiale, che vengono modificate da un enzima chiamato alfa galattosiltrasferasi. È ragionevole pensare che un organo proveniente da un maiale geneticamente modificato in modo da non possedere più questo enzima potrebbe essere ben tollerato se si sopprimessero, con opportuni farmaci, gli altri tipi di reazione immunitaria meno estremi.

Un altro campo di applicazione promettente è la rapida produzione di mammiferi di grandi dimensioni portatori di difetti genetici simili a quelli che si verificano nelle malattie umane, come la fibrosi cistica. Anche se i topi sono stati utili nello studio di questa malattia, il gene della fibrosi cistica è molto diverso nell'uomo e nel topo. Le pecore costituiscono

presumibilmente un modello di studio più valido, perché i loro polmoni sono più simili a quelli dell'uomo. Inoltre, dato che le pecore vivono più a lungo dei topi, si potrebbero valutare gli effetti a lungo termine di un trattamento.

Anche se l'introduzione di difetti genetici negli animali solleva complesse questioni etiche, sembra chiaro che buona parte della società è a favore della sperimentazione sugli animali a patto che serva a far luce su gravi patologie e che si faccia il massimo sforzo per evitare inutili sofferenze.

La possibilità di ottenere animali provvisti di una costituzione genetica predefinita potrebbe contribuire allo sviluppo di terapie basate sul trasferimento di cellule, utili in gravi malattie come il morbo di Parkinson, il diabete e la distrofia muscolare. Per nessuna di queste malattie esiste attualmente una cura veramente efficace e le popolazioni cellulari che vengono danneggiate sono incapaci di autoripa-



Le cellule donatrici vengono infettate nella cellula uovo

La gravidanza viene portata a termine da madri surrogate

Uno shock elettrico dà inizio allo sviluppo

Come si preparano le cellule per ottenere cloni transgenici

Keith Kasnot



rarsi o di rinnovarsi. Si stanno tentando nuovi approcci terapeutici consistenti nel rimpiazzare le cellule malate con nuove cellule, o prelevate dal paziente stesso e messe in coltura, o donate da altri individui, od ottenute da animali.

Questo tipo di approccio richiede, però, che le cellule da trasferire non trasmettano nuove malattie e rispondano il più possibile alle necessità fisiologiche del paziente. Inoltre, qualsiasi reazione immunitaria deve essere controllabile. Gli animali clonati, in cui siano state introdotte precise modificazioni genetiche che minimizzano la risposta immune dell'uomo, potrebbero costituire un enorme serbatoio di cellule utili. Questi animali potrebbero addirittura servire a produrre cellule dotate di speciali proprietà, anche se ogni modificazione aumenta il rischio di gravi reazioni immunitarie.

La clonazione potrebbe inoltre fornire bovini in cui sia stato eliminato il gene della proteina prionica, che rende suscettibili all'infezione da prioni, gli agenti che causano l'encefalite spongiforme bovina (BSE), meglio conosciuta come «malattia della mucca pazza». Inoltre, dato che molti medicinali contengono gelatina o altri sottoprodotti dei bovini, la clonazione potrebbe anche garantire la sicurezza dei farmaci dal punto di vista della BSE.

La stessa tecnica potrebbe ridurre l'incidenza delle malattie genetiche. Si stanno infatti mettendo a punto terapie in grado di sostituire i geni difettosi nelle cellule dei malati, ma anche i pazienti curati con successo possono trasmettere il

difetto genetico ai loro discendenti. Per esempio, se i genitori volessero sottoporre l'embrione a terapia genica, si potrebbe - una volta corretto il difetto - trasferire i nuclei delle cellule embrionali alla cellula uovo, in modo da dare alla luce bambini assolutamente esenti dalla malattia genetica.

Fra i progetti più ambiziosi della medicina che vengono oggi presi in considerazione, alcuni prevedono di produrre linee cellulari umane in grado di fungere da donatori universali. Oggi gli scienziati sono in grado di isolare da embrioni precocissimi di topo cellule staminali indifferenziate, in grado di svilupparsi in qualunque tessuto adulto. L'equivalente di queste cellule si può ottenere anche per altre specie, e probabilmente l'uomo non costituisce un'eccezione in questo senso (mentre l'articolo andava in stampa nell'edizione americana, due gruppi di ricerca statunitensi, guidati rispettivamente da John D. Gearhart e James A. Thomson, annunciavano di avere prodotto cellule staminali a partire da embrioni umani; si vedano «PNAS» vol. 95, p. 13 726 e «Science», vol. 282, 6 novembre 1998 p. 1145; n.d.t.). Si stanno anche sviluppando metodi per differenziare le cellule staminali in coltura, cosicché un giorno sarà possibile fabbricare cellule in grado di riparare o sostituire i tessuti danneggiati da eventi patologici.

Cellule staminali umane su misura

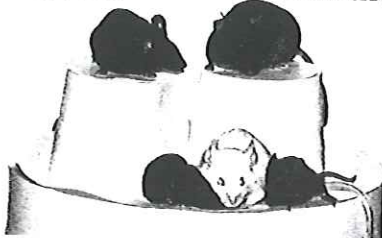
Una tecnica per ottenere cellule staminali adatte al singolo paziente potrebbe essere quella di creare un embrione tramite trasferimento nucleare, usando una cellula del paziente come donatore e un ovulo umano come ricevente. All'embrione risultante verrebbe permesso di svilupparsi solo fino allo stadio necessario per estrarre, separare e mettere in coltura le cellule staminali che potrebbero servire a curare numerose gravi malattie tra cui l'AIDS, il morbo di Parkinson, la distrofia muscolare e il diabete. (Si tenga presente che, a questo stadio dello sviluppo, l'embrione è formato da poche centinaia di cellule, che non hanno ancora iniziato a differenziarsi. In particolare, lo sviluppo del sistema nervoso non è ancora iniziato, e perciò l'embrione non può provare dolore o ricevere alcuna sensazione dall'esterno.)

La prospettiva di far crescere un embrione per poi prelevare le cellule risulta estremamente preoccupante per alcuni, per il fatto che gli embrioni hanno la potenzialità di diventare persone. L'opinione di coloro che considerano sacra la vita fin dal concepimento deve essere rispettata, ma personalmente suggerisco un altro punto di vista. L'embrio-

E adesso ci sono anche i topi clonati

Recentemente, Ryuzo Yanagimachi e i suoi colleghi dell'Università delle Hawaii a Honolulu hanno clonato con successo alcuni topi trasferendo nuclei donatori - e non cellule intere - nelle cellule uovo. I nuclei sono stati prelevati da cellule del cumulo ooforo, una struttura che circonda l'ovaio. Queste cellule sono per loro natura quiescenti. Attualmente, a quanto ne sappiamo, nessuno ha mai dimostrato che si possano ottenere individui a partire da cellule differenziate che non siano quiescenti.

TOPO DONATORE DELL'OVULO TOPO DONATORE DEL NUCLEO



La madre ricevente (al centro) fotografata fra i giovani cloni del donatore.

ProBio America



ne è un ammasso di cellule che diventa un essere senziente solo molto più tardi nello sviluppo, e per questo non lo si può considerare una persona. Tuttavia, dato che la creazione di un embrione per curare ogni singolo paziente è probabilmente un'opzione troppo costosa, sarebbe più pratico stabilire linee permanenti e stabili di cellule staminali a partire da embrioni clonati, le cui cellule si potrebbero poi far differenziare a seconda delle necessità. Una volta trapiantate, queste cellule non sarebbero perfettamente compatibili dal punto di vista genetico, ma la reazione immune potrebbe essere controllabile. A lungo termine si potrebbero addirittura sviluppare metodi per ottenere da un paziente cellule staminali perfettamente compatibili, «dedifferenziando» direttamente, senza dover utilizzare alcun embrione.

Alcuni ritengono che in certi casi sarebbe eticamente accettabile clonare individui viventi. Una prospettiva, per esempio, sarebbe quella di creare un sostituto di un parente che sta per morire. Qualunque sia lo scenario, comunque, il problema è che il clone sarebbe probabilmente vittima delle aspettative dei familiari, che conoscerebbero il passato del «gemello» genetico. Io ritengo però che qualsiasi aspettati-

va sarebbe priva di senso perché la personalità umana è solo in parte determinata da fattori genetici. Per esempio, cloni di atleti, imprenditori o scienziati potrebbero intraprendere carriere del tutto diverse a causa di eventi verificatisi nell'infanzia. Secondo alcuni le coppie in cui un solo individuo è sterile potrebbero decidere di mettere al mondo una copia dell'uno o dell'altro partner. Ma la società dovrebbe preoccuparsi del fatto che sarebbe difficile trattare in modo naturale un figlio che è una copia di uno dei due «genitori». Dato che esistono altri metodi per trattare l'infertilità, mi sembra più appropriato ricorrere a strategie più convenzionali.

A mio avviso, nessuna delle applicazioni della clonazione aventi lo scopo di ottenere copie di persone esistenti è eticamente accettabile, perché nessuna è nell'interesse del nascituro. È superfluo aggiungere che mi oppongo decisamente alla possibilità di lasciare che embrioni umani diventino donatori di tessuti. Tuttavia, è chiaro che la clonazione di cellule in coltura potrà offrire numerose opportunità terapeutiche. Le previsioni sulle nuove tecnologie sono spesso errate: l'attitudine della società cambia e spesso avvengono sviluppi inaspettati. Solo il tempo potrà quindi dare una risposta.



John Chadwick Photographic e PPL Therapeutics

Polly (a sinistra nella foto) è il clone transgenico di una pecora di razza Poll Dorset. Il gene per una proteina umana, il fattore IX, è stato aggiunto alle cellule che hanno dato origine al patrimonio ereditario dell'agnello: perciò Polly possiede il gene umano. La femmina ricevente che ha dato alla luce Polly (a destra) è di razza Scottish Blackface.

IAN WILMUT svolge ricerche sulle applicazioni dell'ingegneria genetica in campo zootecnico al Roslin Institute vicino a Edimburgo. Dopo aver conseguito il dottorato all'Università di Cambridge, ha iniziato a lavorare sulle tecniche di congelamento di embrioni animali. In seguito Wilmut ha studiato i fattori fisiologici e dello sviluppo che sono responsabili della morte prenatale nelle pecore e nei maiali, prima di dedicarsi allo studio dei metodi per migliorare le specie animali più importanti dal punto di vista economico.

CAMPBELL K. H. S., LOI P., OTAEGUI P. J. e WILMUT I., *Cell Cycle Co-ordination in Embryo Cloning by Nuclear Transfer* in «Reviews of Reproduction», 1, n. 1, gennaio 1996.

DI BERARDINO MARIE, *Genomic Potential of Differentiated Cells*, Columbia University Press, 1997.

CAMPBELL K. H. S., McWHIR J., RITCHIE W. A. e WILMUT I., *Sheep Cloned by Nuclear Transfer from a Cultured Cell Line* in «Nature», 385, pp. 810-813, 27 febbraio 1997.

SCHNIEKE E. (e altri), *Human Factor IX Transgenic Sheep Produced by Transfer of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblasts* in «Science», 278, 19 dicembre 1997.