

Kloningstekniker för mitokondriellt nedärvda sjukdomar och fosterdiagnostik

STATUSARTIKEL

Charles Hanson & Jan Wahlström

Mitokondriellt nedärvda sjukdomar är sällsynta och har en speciell form av nedärvning. Detta innebär bland annat att traditionell fosterdiagnostik vanligen inte går att använda för att hjälpa kvinnor som bär på anlag för denna typ av sjukdom. För män som bär på anlaget är detta inget problem eftersom mitokondrie DNA vanligen endast överförs via ägget och inte via spermien. I denna artikel presenteras mitokondriedonation som en framtida möjlighet för att kunna hjälpa kvinnor som är anlagsbärare för en mitokondriellt nedärvd sjukdom att få egna friska biologiska barn.

Bakgrund

Mitokondrie DNA (mtDNA) fungerar på samma sätt som kärn DNA men nedärvs efter andra principer. Det är cirkulärt och omfattar 16 600 baspar som kodar för bland annat 13 proteiner, alla involverade i cellens andningskedja. Dessutom kodar mtDNA för 2 rRNA och 22 tRNA.

Det finns 5-10 mtDNA kopior i varje mitokondrie och upp till 1000 mitokondrier i en cell. Det är framförallt vävnader med hög energiomsättning som har många mitokondrier. Det betyder att i enstaka celler 1% av allt DNA kan finnas i form av mtDNA. Äggceller innehåller vanligen mer mtDNA än vanliga celler medan spermier innehåller lite mtDNA. En viktig skillnad vid jämförelse med kärn DNA är att mtDNA inte rekombineras i samband med gametbildning.

Transmissionen av mtDNA sker i praktiken endast från ägget även om i sällsynta fall paternell transmission har observerats (1). Regeln är att mutationer i mtDNA överförs från en sjuk moder till barnen medan en sjuk fader nästan aldrig överför mutationer i sitt mtDNA.

Heteroplasm

Om mer än en typ av mtDNA förekommer i en cell kallas det för heteroplasm. Detta fenomen motsvarar heterozygot tillstånd hos kärn DNA. Heteroplasm används för att beskriva andelen muterat mtDNA i förhållande till normalt DNA. Andelen muterat mtDNA kan variera från en kopia till nästan alla kopior i en specifik cell. Variationer i graden av heteroplasm kan finnas mellan celler i samma vävnad men även mellan olika vävnader. Vanligen finns ett gränsvärde för heteroplasm. Ligger andelen muterat mtDNA under gränsvärdet så fungerar cellen eller vävnaden normalt och individen är frisk. Passeras gränsvärdet påverkar det cellens funktion och passeras gränsvärdet för många celler i en vävnad får individen symptom. Den kliniska betydelsen kan även variera när gränsvärdet har passerats så att symptomen blir allvarigare när en större andel av mtDNA har mutationen än när en mindre andel har samma mutation. Celler med hög energiomsättning får oftare symptom än cel-

ler med lägre energiomsättning vilket innebär att CNS, alla typer av muskler, lever och njure är organ som ofta uppvisar symptom vid mitokondriella sjukdomar.

Mitokondriesjukdomar och reproduktion

Det är svårt att använda sedvanlig fosterdiagnostik vid risk för mitokondriesjukdomar eftersom graden av heteroplasm kan variera över tiden. Dessutom varierar penetransen även för homoplastiska sjukdomar. En analys av ett prov på moderkaka eller ett prov tagit i samband med preimplantatorisk fosterdiagnostik ger därför en mycket osäker riskbedömning.

För en kvinna som bär på anlag för en mitokondriell sjukdom och som är utan symptom kan problemen lösas genom donation av ägg från en frisk kvinna. Paret kan genom en sådan åtgärd bli gravida med försumbara risker att fostret i framtiden kommer att drabbas av en mitokondriellt nedärvd sjukdom. Om paret emellertid vill ha ett biologiskt eget barn finns idag ingen bra metod att erbjuda. Det är mot denna bakgrund som möjligheterna att använda sig av mitokondriedonation genom cytoplasmatransfer eller kärntransfer skall diskuteras.

Mitokondriedonation

Ett sätt att i det närmaste helt eliminera risken för att få barn med mitokondriellt orsakade sjukdomar skulle kunna vara att ersätta de defekta mitokondrierna med donerade friska mitokondrier (förutsatt att mutationen ej är belägen i kärn-DNA:t). Det finns i dag två föreslagna sätt att utföra mitokondriedonation på (2).

I båda fallen är det en förutsättning att paret genomgår en behandling med in vitro fertilisering (IVF). I det ena fallet överförs en mindre mängd cytoplasma från donerade oocyter till det behandlade parets oocyter. I det andra fallet överförs kärnor från den anlagsbärande kvinnans oocyter till en donators, på sina kärnor tömda, oocyter. Ingreppet utförs under mikroskop med hjälp av en mikromanipulator.

Cytoplasmatransfer

Cytoplasmatransfer har redan utförts på människa som ett försök att öka sannolikheten till en graviditet hos par som har genomgått ett flertal misslyckade IVF-behandlingar (3, 4). I dessa fall har man misstänkt att orsaken till de misslyckade behandlingarna är faktorer i oocytens cytoplasma, bland annat mitokondrier med nedsatt funktion. Tanken är alltså att tillförandet av »frisk» cytoplasma, donerade av en ur reproduktiv synpunkt yngre kvinna, skall »fräscha» upp oocyter med defekta cytoplasmatiska faktorer. Själva cytoplasmatransfern sker i samband med fertiliseringen av oocytten genom att en spermie suggs upp i en tunn injektionspipett som sedan fylls på med cytoplasma med tillhörande mitokondrier från en donatoroocyt. Hela laddningen injiceras sedan i patientens oocyt. Man får väl beteckna detta som en

avancerad form av intracytoplasmatisk spermieinjektion (ICSI). Den injicerade cytoplasman motsvarar mellan 5 till 15% av oocytens totalvolym. Även om det fortfarande diskuteras om detta ingrepp verkligen ökar parens chans att bli gravida, så är det ett faktum att det i dag finns upp mot 30 barn födda efter att denna teknik tillämpats. Uppföljande studier av dessa barn har visat att några har både maternella och donerade mitokondrier i sitt blod.

Kärntransfer

Vid kärntransfer överförs en kärna tillsammans med en mindre mängd cytoplasma (karyoplast) från en oocyt till en på sin kärna tömd donatoroocyt (cytoplast). Även här har försök utförts syftande till att byta ut »äldrad» cytoplasma mot ny, »frisk» cytoplasma (5, 6, 7). Rent tekniskt går det till så att ett hål tas upp i zona pellucida varefter kärnan och en mindre mängd cytoplasma biopseras ut med en tunn mikropipett. Karyoplasten injiceras därefter i det perivitellinära utrymmet hos en tömd donerad oocyt. Karyoplast/cytoplasten placeras nu mellan två mycket tunna elektroder där den stimuleras till fusion med hjälp av elektriska pulser. Efter att den transplanterade oocyten mognat fertiliseras den med en spermie från maken (ICSI). Försök syftande till att utveckla teknik för cytoplasmadonation har utförts på oocyter från människa. Dessa försök avbröts dag 3 efter fertilisering då de embryon som överlevt behandlingen bestod av cirka 5 celler.

Exempel på sjukdomstillstånd för eventuell kärntransfer

Mutationer i mtDNA leder oftast till allvarliga sjukdomar. De kan ur genetisk synpunkt grovt indelas i 3 olika grupper; Stora deletioner, punktmutationer utan heteroplasm och punktmutationer med heteroplasm.

Det är fram för allt för sjukdomar med punktmutationer och heteroplasm som metoden kan komma att användas. Ett tillstånd förkortas NARP beroende på att de mest framträdande symptomen är neuropati, ataxi och retinitis pigmentosa. Tillståndet kan vara varierande i svårighetsgrad och debutålder hos olika släktingar beroende på graden av heteroplasm. Hos de svårast drabbade debuterar den under barnaåren och leder till blindhet och allvarliga neurologiska symptom.

En annan sådan sjukdom förkortas MERRF beroende på att de mest framträdande symptomen är myoklonus epilepsi och att muskelfibrerna får ett speciellt utseende som kallas »ragged-red». Progressiv encephalomyopati är även en del av den kliniska sjukdomsbilden liksom myoklonus med toniskt kloniska kramper, och ataxi, demens samt generell muskelsvaghet. Det rör sig i bägge fallen om sjukdomar med varierande klinik men oftast ett tidigt debuterande progressivt förlopp.

Avslutande synpunkter

De beskrivna metoderna är ännu inte kliniskt användbara och det saknas bland annat djurförsök med långtidsuppföljning av konsekvenserna av de manipulationer som diskuteras. Längst har man kommit med cytoplasmabyte men in-

dikationerna har hittills inte varit att hjälpa kvinnor med mitokondriellt nedärvda sjukdomar att få friska barn. Det är dessutom osäkert om metoden lämpar sig till sådana åtgärder eftersom endast små mängder friska mitokondrier tillförs. Kärntransfer är sannolikt den metod där man kan förvänta sig att andelen kvarvarande mitokondrier med mutation blir så litet att fostret blir friskt. En biologisk barriär passeras emellertid vilket kan öppna för både reproduktiv kloning och genterapi på könsceller vilka kan gå i arv. Bägge dessa åtgärder är förbjudna genom lagstiftning både nationellt och på europeisk nivå. Det finns emellertid anledning att diskutera och etiskt värdera de ny reproduktiva behandlingsmöjligheterna för att kunna göra en risk/nytta bedömning i samband med etiska ställningstaganden.

Summary

Charles Hanson & Jan Wahlström: Cloning techniques for mitochondrial disorders and prenatal diagnosis.

Ugeskr Læger 2003;165:799-800.

Disorders caused by mutation in the mitochondrial DNA are uncommon. Due to the special pattern of inheritance and of the variability of penetrance the options to affected couples to have healthy children are few. So far traditional prenatal diagnosis is of limited benefit. The problems may be overcome by oocyte donation. However, if the couple wants their own biological offspring, no good method is available today. We discuss ooplasmic and nuclear transfer as possible future options for these couples to have healthy biological children.

Reprints: Jan Wahlström, Enheten för klinisk genetik, Sahlgrenska Universitetssjukhuset/Östra, S-416 85 Göteborg, Sverige.

E-mail: jan.wahlstrom@obgyn.gu.se

Antaget den 13. januari 2003.

Göteborgs Universitet, Institutionen för kvinnors och barns hälsa, Enheten för reproduktionsmedicin og Enheten för klinisk genetik.

Litteratur

- Schwartz M, Vising J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 2002;347:576-80.
- Thorburn DR, Dahl HHM. Mitochondrial disorders: genetics counseling, prenatal diagnosis and reproductive options. *Am J Med Genet* 2001;106:102-14.
- Cohen J, Scott R, Alikani, M et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1998;4:269-80.
- Barritt JA, Brenner CA, Malter HE et al. Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation. *Hum Reprod* 2001;16:513-6.
- Zhang J, Wang CW, Krey L et al. In vitro maturation (IVM) of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle (GV) transfer. I: Kempers RD, Cohen J, Haney AF et al, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier Science B V, 1998:629-35.
- Zhang J, Wang CW, Krey L et al. In vitro maturation of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle transfer. *Fertil Steril* 1999;71:726-31.
- Takeuchi T, Cong J, Veeck LL et al. Preliminary findings in germinal vesicle transplantation of immature human oocytes. *Hum Reprod* 2001;16:730-6.