

PRESSMEDDELANDE 2007-10-08

Nobelforsamlingen vid Karolinska Institutet har beslutat att

Nobelpriset i Fysiologi eller Medicin år 2007

gemensamt tilldelas

Mario R. Capecchi, Martin J. Evans och Oliver Smithies

för deras upptäckter av

“principer för att introducera specifika förändringar av gener i möss med användning av embryonala stamceller”

SAMMANFATTNING

Årets Nobelpristagare har gjort en serie grundläggande upptäckter om embryonala stamceller och DNA-rekombination i däggdjur. Upptäckterna har möjliggjort en ny och synnerligen kraftfull teknik – *riktad genmodifiering i möss* – som nu appliceras inom så gott som all biomedicinsk forskning, från grundforskning till utveckling av ny sjukdomsterapi.

Riktad genmodifiering används oftast för att inaktivera funktionen av enskilda gener. Sådan utslagning (”gene knockout”) har klargjort funktionen av ett stort antal gener för utveckling, hälsa, åldrande och sjukdom. Till dags dato har mer än tiotusen gener (ungefär hälften av alla gener hos däggdjur) slagits ut i möss. Pågående internationella projekt kommer att göra knockoutmöss för samtliga gener tillgängliga för forskning och läkemedelsutveckling inom en nära framtid.

Med riktad genmodifiering är det nu möjligt att framställa i princip vilken typ av DNA-modifiering som helst i musens arvs massa. Forskare kan därigenom fastställa betydelsen av enskilda gener i hälsa och sjukdom. Tekniken har redan resulterat i mer än femhundra djurmodeller för mänskliga sjukdomar, såsom hjärt-kärlsjukdomar, neurodegenerativa sjukdomar, diabetes och cancer.

Modifiering av gener med hjälp av homolog rekombination

Informationen om hur våra kroppar utvecklas och fungerar livet igenom är inskriven i vårt DNA. DNA-molekylerna är packade i kromosomer, vilka förekommer i par – den ena ärvd från mamman och den andra från pappan. Utbyte av DNA-sekvenser mellan par av kromosomer ökar den genetiska variationen inom populationen och sker med hjälp av *homolog rekombination*. Det är en process som är bevarad genom evolutionen och som påvisades i bakterier redan för mer än 50 år sedan av Nobelpristagaren Joshua Lederberg (Nobelpris 1958).

Mario Capecchi och Oliver Smithies hade båda visionen att homolog rekombination skulle kunna utnyttjas för att introducera förutbestämda genmodifieringar i däggdjursceller, och de arbetade systematiskt mot detta mål.

Capecchi visade att homolog rekombination kunde ske mellan DNA som införts i däggdjursceller och cellernas kromosomer. Han fann vidare att detta kunde utnyttjas för att reparera defekta gener i kromosomerna. Smithies var inriktad på att försöka reparera skadade gener i mänskliga celler. Han tänkte sig att det borde gå att behandla ärftliga blodsjukdomar genom att korrigera sjukdomsalstrande gener i stamceller från benmärgen. Under sina experiment upptäckte Smithies att en sådan gen kunde modifieras med hjälp av homolog rekombination, oavsett om den var aktivt uttryckt eller ej. Detta antydde att alla gener sannolikt var tillgängliga för riktad genmodifiering.

Embryonala stamceller – vägen till det nedärvda genomet

De celltyper som initialt användes av Capecchi och Smithies kunde inte ge upphov till genmodifierade möss. Detta krävde en annan celltyp som kunde ge upphov till könsceller. Bara då kunde introducerade genmodifieringar nedärvas.

Martin Evans hade arbetat med embryonala carcinomceller (EC-celler) som trots att de kom från tumörer kunde ge upphov till nästan alla celltyper. Han hade visionen att använda EC-celler som bärare av nytt DNA in i musens nedärvda genom (könslinjen). Hans försök misslyckades då EC-cellerna bar på så kraftiga kromosomförändringar att bildningen av könsceller förhindrades. I sökandet efter alternativ upptäckte Evans att det gick att etablera kromosomalt intakta cellkulturer från tidiga musembryon. Dessa celler är idag kända som *embryonala stamceller* (ES-celler).

Nästa steg var att visa att ES-cellerna kunde bidra till könslinjen (se figur). Embryon från en musstam injicerades med ES-celler från en annan musstam. Resulterande *mosaik*-embryon (uppbyggda av celler från båda stammarna) utvecklades och framföddes av surrogatmodrar. Avkomman – mosaikmössen – avlades därefter och gener från ES-cellerna kunde påvisas hos några av ungarna (se figur). Dessa gener ärvdes sedan vidare i enlighet med Mendels lagar.

Evans tog nu steget att genetiskt modifiera ES-cellerna och valde för detta ändamål retrovirus som integrerar sina gener i kromosomerna. Han visade att retroviralt DNA fördes över från ES-celler, via mosaikmöss till könslinjen. Evans hade därmed använt ES-cellerna för att erhålla möss som bar på nytt genetiskt material.

Forskningslinjerna går samman – homolog rekombination i ES-celler

År 1986 fanns alla pusselbitar på plats för att göra riktade genmodifieringar i ES-celler. Capecchi och Smithies hade visat att gener kunde förändras på ett förutbestämt sätt med hjälp av homolog rekombination och Evans hade bidragit med den nödvändiga vägen till könslinjen – ES-cellerna. Nästa steg var att kombinera de två.

Både Smithies och Capecchi valde hprt-genen för sina initiala experiment då förändringar i denna gen var lätta att identifiera. Hprt-genen är också inblandad i en sällsynt sjukdom hos människa – Lesch-Nyhan's sjukdom. Capecchi förfinade strategierna för riktad genmodifiering och utvecklade nya och generellt användbara metoder (se illustration).

Knockoutmusens födelse – början på en nya era inom genetiken

De första publikationerna i vilka homolog rekombination i ES-celler använts för att framställa möss med riktade genmodifieringar publicerades 1989. Dessa följdes av en lavin av nya knockoutmöss, och antalet vetenskapliga rapporter inom området har ökat exponentiellt sedan dess. Riktad genmodifiering har utvecklats till en brett användbar metod. Det är nu även möjligt att introducera mutationer som kan aktiveras i specifika celltyper och vid valda tidpunkter i livet.

Riktad genmodifiering i möss till nytta för människors hälsa

I princip alla fysiologiska processer i möss studeras idag med hjälp av riktad genmodifiering. Vi har bevittnat en explosion av forskning där tekniken används. Riktad genmodifiering har använts av så många forskare och i så många sammanhang att en kortfattad summering är svår att göra. Några av de senare bidragen från årets Nobelpristagare presenteras nedan.

Riktad genmodifiering har hjälpt oss att förstå funktionen hos hundratals gener under fosterutvecklingen. Capecchis forskning har avslöjat funktionerna för många gener som styr utvecklingen av organ och bestämmer kroppens anatomi. Hans arbete har också hjälpt till att belysa orsakerna till vissa medfödda missbildningar hos människa.

Evans använde riktad genmodifiering för att utveckla musmodeller för mänskliga sjukdomar. Han utvecklade flera modeller för den ärftliga sjukdomen cystisk fibros och har använt dessa för att studera sjukdomsmekanismer och pröva effekterna av genterapi.

Smithies använde också riktad genmodifiering för att utveckla musmodeller för ärftliga sjukdomar såsom cystisk fibros och blodsjukdomen talassemi. Han har även utvecklat många musmodeller för vanliga sjukdomar såsom högt blodtryck och åderförkalkning.

Sammanfattningsvis har riktad genmodifiering hos möss genomsyrat i princip all biomedicinsk forskning. Dess betydelse för förståelsen av geners funktion och dess nytta för mänskligheten kommer att fortsätta att öka under många år framöver.

Mario R. Capecchi, född 1937 i Italien, amerikansk medborgare, PhD i biofysik 1967 vid Harvard University, Cambridge, MA, USA. Howard Hughes Medical Institute Investigator och professor i humangenetik och biologi vid universitetet i Utah, Salt Lake City, UT, USA.

Sir Martin J. Evans, född 1941 i Storbritannien, brittisk medborgare, PhD i anatomi och embryologi 1969 vid University College, London, UK. Director vid School of Biosciences och professor i mammal genetik, Cardiff University, UK.

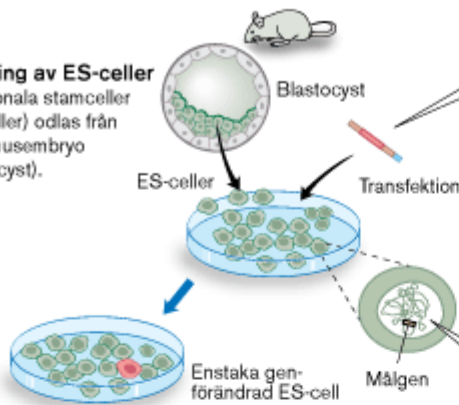
Oliver Smithies, född 1925 i Storbritannien, amerikansk medborgare, PhD i biokemi 1951 vid Oxford University, UK. Professor i patologi och laboratoriemedicin vid universitetet i North Carolina at Chapel Hill, NC, USA.

Generell strategi för riktade genförändringar i möss

Steg 1 Riktad genförändring i ES-celler

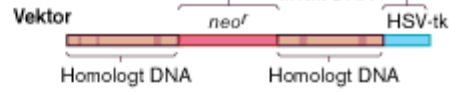
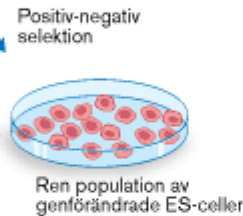
1. Odling av ES-celler

Embryonala stamceller (ES-celler) odlas från tidigt musembryo (blastocyst).



4. Förökning av genförändrad ES-cell

Selektion för närvaro av *neo^f* och frånvaro av HSV-tk under odlingen anrikar ES-celler som genomgått homolog rekombination.

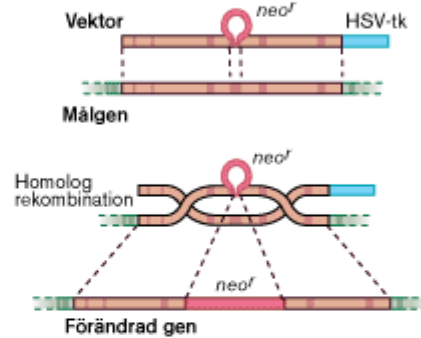


2. Konstruktion av målsökande DNA (vektor)

Vektorn består av DNA-bitar med homologi till målgenen samt insatt DNA som förändrar målgenen och medger positiv-negativ selektion.

3. Transfektion av ES-celler

Det cellulära maskineriet för homolog rekombination gör att vektorn finner och rekombinerar med målgenen.



Steg 2 Från genförändrade ES-celler till genförändrade möss

5. Injektion av ES-celler i blastocyster

Genförändrade ES-celler injiceras i blastocyster...

...där de blandar sig till en mosaik med den inre cellmassan från vilken embryot utvecklas.

Injicerade blastocyster förs in i surrogatmödrar och utvecklas till mosaikembryon.



6. Födelse och avel av mosaikmöss

Mosaikmöss korsas med normala möss och ger upphov till både genetiskt förändrad och normal avkomma.

