

# Nobelpriset i kemi 2008

## Manetens gröna ljus revolutionerade biovetenskapen

När japanen **Osamu Shimomura** under 60-talet började studera den självlysande maneten *Aequorea victoria* hade han inte en aning om vilken vetenskaplig revolution det skulle leda till. Trettio år senare tog **Martin Chalfie** hjälp av manetens grönt fluorescerande protein för att studera livets minsta byggsten, cellen. Idag följer forskare tidigare osynliga biologiska förlopp med hjälp av **Roger Y. Tsien**s proteiner, som lyser i alla regnbågens färger.

När forskare utvecklar metoder som hjälper dem att se tidigare osynliga saker, har forskningen alltid tagit ett språng framåt. När, till exempel, Anton van Leeuwenhoek på 1600-talet uppfann mikroskopet öppnades en helt ny värld. Dåtidens vetenskapsmän kunde plötsligt se bakterier, spermier och blodceller. Sådant som de tidigare inte ens visste fanns.

Årets Nobelpris i kemi gäller en liknande effekt på vetenskapen. Det grönt fluorescerande proteinet, *GFP*, har under det senaste decenniet bokstavligen fungerat som en ledstjärna för biokemister, biologer, medicinare och andra forskare. Proteinets starka, klargröna färg framträder i UV-lampans sken. Det hjälper bland annat forskare att följa hur cancertumörer växer och sprider sig, hur Alzheimers sjukdom breder ut sig i hjärnan och hur sjukdomsframkallande bakterier förökar sig i kroppen.

Än mer intressant för forskarna är att kunna följa förlopp inuti enskilda celler. Kroppen består av många miljarder celler – allt ifrån pumpande hjärtmuskelceller, till insulinproducerande betaceller eller makrofager som oskadliggör ovälkomna bakterier. Ju mer forskarna vet om en celltyp – hur den utvecklas och fungerar – desto större är chansen att de kan utveckla välfungerande läkemedel med minimala biverkningar.

Men att studera cellmaskineriet är svårt. Celler går visserligen att se i ett mikroskop; de är cirka 0,02 millimeter stora. Däremot är det omöjligt att i ett vanligt ljusmikroskop detaljstudera cellens byggstenar: proteiner, fetter, kolhydrater och andra molekyler. Än svårare är det att följa de kemiska förloppen i cellen. Men det är på den detaljnivån som forskarna måste jobba. Till exempel – först när forskarna på molekylnivå förstår hur celler påbörjar nybildningen av blodkärl, kan de också hindra cancertumörer från att bilda ett närande och syregivande kärlsystem.

Cellens kemiska förlopp är noggrant reglerade och de flesta styrs av proteiner – det finns tiotusentals olika proteiner med olika funktioner. Genom att koppla GFP till något av dessa kan forskarna skaffa sig avgörande kunskaper om just det proteinet; i vilka slags celler det finns; hur det vandrar och vilka andra proteiner det växelverkar med. Tack vare det gröna ljuset kan forskarna nu följa proteinets rörelser med hjälp av mikroskop.

### Shimomura fiskar efter lysande material

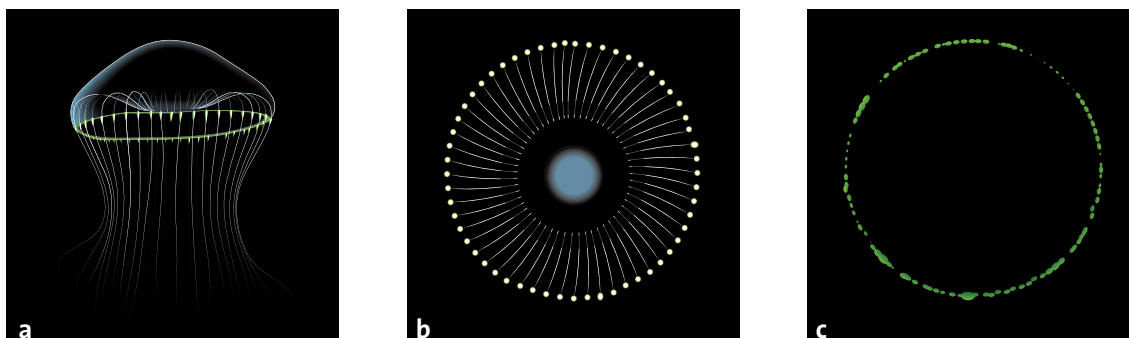
GFP är idag ett standardverktyg för tusentals forskare världen över. Vägen fram till dagens omfattande användning av GFP börjar egentligen i Japan decenniet efter andra världskriget.

Osamu Shimomuras gymnasieutbildning spolierades mer eller mindre av kriget, och efterverkningarna av atombomben som fälldes över Nagasaki förstörde mycket av hans universitetsutbildning. Men 1955 fick han anställning som assistent hos professor Yoshimasa Hirata vid Nagoyauniversitetet. Hirata satte honom på ett högriskprojekt – att förstå vad som får resterna av det krossade blötdjuret *Cypridina* att lysa när de fuktas med vatten.

Det kan tyckas märkligt att Hirata gav en oerfaren assistent ett så svårt jobb. Men risken att misslyckas var stor. En ledande amerikansk forskargrupp hade under lång tid utan framgång försökt isolera materialet. Hirata ville därför inte sätta en doktorand, som var beroende av lyckade forskningsresultat för att nå doktorstiteln, på uppgiften.

1956 hade Shimomura mot alla odds materialet i sin hand. Det visade sig vara ett protein som lyste 37 000 gånger starkare än det krossade blötdjuret. Efter att ha publicerat resultaten rekryterades Shimomura till toppuniversitetet Princeton i New Jersey, USA, av en imponerad professor, Frank Johnson. I avskedspresent såg professor Hirata till att Shimomura förärdades en doktorsgrad – en ovanlig händelse då han egentligen inte var antagen som doktorand vid universitetet.

Efter en lång resa över Stilla havet och den amerikanska kontinenten tog Shimomura 1960 itu med nästa naturligt självlysande material. Denna gång från maneten *Aequorea victoria*, vars yttersta kant lyser i grönt när maneten skakas om.



(a) Maneten *Aequorea victoria* lever i havet utanför den amerikanska västkusten. (b och c) Manetens självlysande organ ligger längs den paraplyformade kroppen.

Hela sommaren 1961 samlade Shimomura och Johnson maneter i Friday Harbor på den amerikanska västkusten. De klippte av maneternas kanter och pressade dem genom ett filter till en flytande vätska. En dag när Shimomura hällde ut lite filtrerad vätska i vasken flammade den till i en stark blix. Snart insåg han att det var havsvatten i vasken och att kalciumjoner från det orsakade den kemiska reaktionen. Men, förvånande nog, var blixten inte grön som manetens kanter. Istället var den blå.

Johnson och Shimomura samlade råmaterial hela sommaren. Med sig hem till Princeton hade de extrakt från cirka 10 000 maneter. Det tog dem några månader att, från vätskan, rena fram några blygsamma milligram av det blålysande materialet; ett protein som de döpte till *aequorin*.

## Fluorescerar grönt i UV-ljus

I den vetenskapliga publikation där Shimomura och Johnson år 1962 beskriver framställningsprocessen av aequorin nämner de också att de har isolerat ett protein som är lätt grönaktigt i solljus, gulaktigt i skenet av en glödlampa och grönfluorescerande under UV-ljus. Det är första gången som någon beskriver GFP. Shimomura och Johnson kallar det för grönt protein, men det döps senare om till *grönt fluorescerande protein*.

Det grönt fluorescerande proteinet, GFP, består av 238 aminosyror som sitter sammankopplade i en lång kedja. Den veckar sig till formen av en ölburk. Inne i ölburksstrukturen formar aminosyrorna 65, 66 och 67 den kemiska grupp som absorberar blått och ultraviolett ljus och fluorescerar i grönt.



Under sjuttioalet tittade Shimomura närmare på GFP:s fluorescens. Han visade att GFP innehåller en speciell kromofor, en kemisk grupp som absorberar och skickar ut ljus. När UV-ljus eller blått ljus träffar GFP-kromoforen suger den upp energin i ljuset, vilket kallas för att den exciteras. I nästa steg gör kromoforen sig av med energin. Den sänder ut ljus, men nu i det gröna våglängdsområdet.

Det här är förklaringen till varför maneten och aequorin lyser i olika färger. I maneten omvandlar helt enkelt GFP:s kromofor det blå ljuset från aequorin till grönt ljus.

Det som är så revolutionerande med GFP är att proteinet inte behöver några tillsatser för att lysa, till skillnad från aequorin och andra självlysande proteiner, som kräver ständig tillförsel av energirika molekyler. Det räcker att bestråla GFP med UV-ljus eller blått ljus. Ljuset går in i cellen och träffar GFP, som lyser grönt. Hade forskarna behövt tillsätta en kemikalie hade de behövt spruta in den i cellen – en process som både kan störa cellen och som är svår att genomföra med tanke på den mikroskopiska skalan.

## Chalfie får en lysande idé

Årets andra Nobelpristagare i kemi, Martin Chalfie, fick för första gången höra talas om det grönljysande proteinet år 1988 under ett seminarium om självlysande organismer vid Columbia-universitetet i New York, där han jobbade. När Chalfie fick reda på att det fanns ett protein som lyste i sig själv blev han exalterad.

Till vardags arbetade Chalfie med den millimeterstora rundmasken *Caenorhabditis elegans* – en av världens mest studerade organismer. Trots att den bara består av totalt 959 celler har den en hjärna, den åldras och den parar sig. Dessutom är en tredjedel av rundmaskens gener besläktade med människans gener. Sist men inte minst är *C. elegans* genomskinlig. Därför är det lätt för forskarna att studera rundmaskens organ i ett vanligt ljusmikroskop.

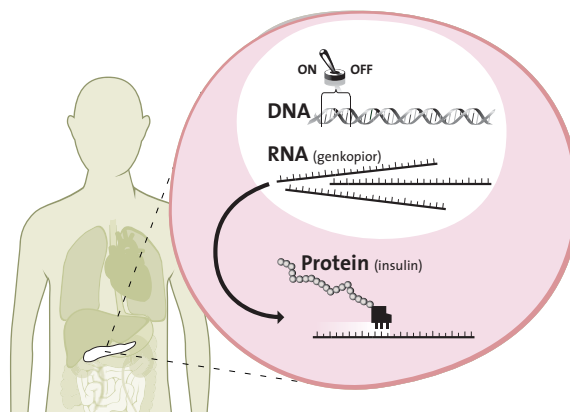
Under seminariet 1988 insåg Chalfie att det gröntfluorescerande proteinet skulle vara ett fantastiskt verktyg i kartläggningen av rundmasken; det skulle kunna fungera som en grönljysande signal för olika händelser i rundmaskens olika celler.

För att förstå Chalfies tankegång fullt ut behöver man veta några grundläggande saker om cellbiologi. Som vi skrev tidigare så utför olika proteiner nästan allt arbete i en cell och det finns tiotusentals proteiner i kroppen. Trots att de fyller så många olika funktioner, är alla proteiner uppbyggda på samma sätt. De består av 20 olika typer av aminosyror som sitter sammankopplade i långa kedjor. Det som skiljer proteinerna åt är längden på kedjan, ordningsföljden på aminosyrorna och hur kedjan veckar sig.

Ritningen för hur ett protein ska se ut – i vilken ordning de olika aminosyrorerna ska sammanfogas och hur lång kedjan ska vara – finns i generna. Varje gen är i regel en beskrivning av ett protein. När ett protein behövs i en cell slås genen på, vilket leder till att cellen tillverkar det önskade proteinet.

Till exempel, när du har ätit en stor påse godis och får en blodsockerchock, aktiveras insulingenen i bukspottkörtelns betaceller. Alla celler i kroppen har insulingenen i säkert förvar inuti sin cellkärna. Men det är bara betacellerna som reagerar på sockerhalten och börjar producera insulin. Strömbrytaren för genen, som kallas promotorn och sitter i närheten av genen i arvsmassan, slås på. När promotorn är aktiv börjar insulingenen att kopieras. Det är som att kopiera en värdefull gammal bok som ligger i ett brandsäkert förvaringsutrymme. Kopiering behövs för att cellen ska få tillgång till genritningen och kunna läsa den.

*Arvsmassan, allt vårt DNA, ligger väl skyddad inuti cellens kärna. När en gen slås på kopieras genens information. Kopiering utgörs av en molekyl som heter RNA. Kopiering förs ut i cytoplasman, cellens verkstad, där ett komplicerat maskineri, ribosomen, läser av informationen steg för steg. Utifrån vad ribosomen "läser", kopplar den ihop aminosyror till ett protein.*



Kopiering av insulingenen förs från cellkärnan ut i cellens verkstad, cytoplasman. Där används genkopiering som en mall för att sammanfoga aminosyror så att de bildar proteinet insulin. Insulinet skickas sedan ut i blodet där det bland annat fastnar på muskel- och fettceller, som tar upp socker ur blodet och lagrar det i sina depåer.

Chalfies idé var att han, genom att koppla samman genen för GFP med olika genströmbrytare eller med gener för andra proteiner, skulle kunna se under vilka omständigheter och i vilka celler som olika genströmbrytare var aktiva och var olika proteiner tillverkades. Det gröna ljuset skulle fungera som en signal för olika händelser.

## En oväntad upptäckt

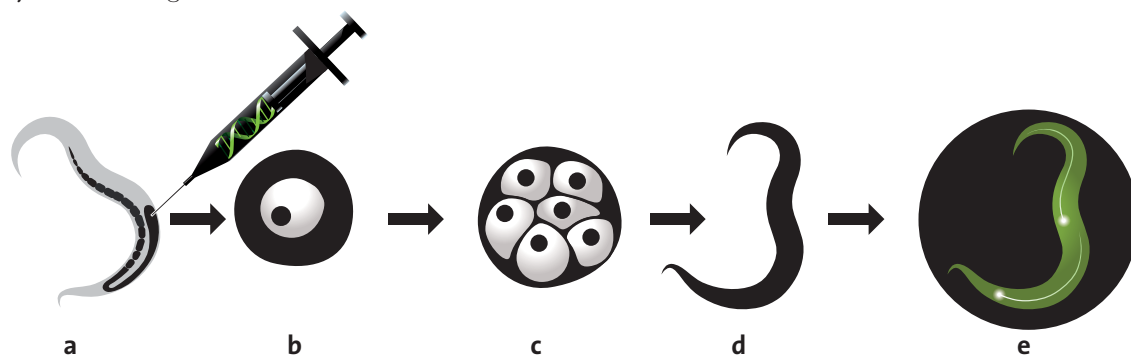
För att prova sina idéer var Chalfie tvungen att ha tag i genen för GFP. Efter lite efterforskning fick han reda på att Douglas Prasher, vid Woods Hole Oceanographic Institution i Massachusetts, redan hade börjat leta efter GFP-genen i arvsmassan hos *Aequorea victoria*. Chalfie kontaktade Prasher och bad honom höra av sig om han lyckades isolera den rätta genen. På forskningsspråk kallas detta för att klonas en gen; forskarna isolerar genen från en organisms arvs massa och sätter, med genteknikens hjälp, in den i en mer lätthanterlig, encellig organism. Vanligtvis använder forskarna en vanlig tarmbakterie som kallas *Escherichia coli*. Sedan kan de förvandla bakterien till en proteinfabrik; de aktiverar den främmande genen så att bakterien tillverkar det främmande proteinet.

Prasher skickade så småningom GFP-genen till Chalfie. Han i sin tur instruerade en doktorand, Ghia Euskirchen, hur hon skulle försöka få *E. coli* att tillverka GFP.

Ungefär en månad senare kallade Euskirchen på Chalfie – hon hade lyckats! I mikroskopet kunde de se bakterier som lyste gröna när de bestrålades med UV-ljus. Upptäckten ligger till grund för dagens revolutionerande användning av GFP. Men den var helt oväntad.

Den vedertagna kunskapen sa nämligen att naturliga fluorescerande molekyler och pigment – de molekyler som ger blommor, fiskar och andra organismer sin färg – tillverkas i flera steg i cellerna. För varje steg krävs ett protein som styr den kemiska framställningen. Många experter trodde därför att det behövdes flera olika proteiner för att tillverka kromoforen i GFP. Men Chalfies och Euskirchens experiment visade att det antagandet var felaktigt – inga andra proteiner än GFP behövdes.

I nästa steg satte Chalfie genen bakom en promotor som framförallt är aktiv i *C. elegans* känselnervceller, som är sex till antalet. Resultaten publicerade han och hans kollegor i den vetenskapliga tidskriften Science i februari 1994. På framsidan av Science den veckan kunde läsarna se en mikroskopibild av *C. elegans*, där känselnervcellernas kroppar och långa utskott lyste starkt i grönt.



Med genteknikens hjälp placerade Chalfie genen för GFP bakom en genströmbrytare som är aktiv i *C. elegans* sex känselnervceller. Sedan sprutade han in DNA-konstruktionen i könskörtlarna på en vuxen mask (a). Masken är hermafrodit och kan befrukta sig själv. I flera av äggen som masken lägger finns GFP-genen (b). Äggen delar sig och formar en ny individ, vars känselnervceller lyser i grönt under UV-lampans sken (c och d). På bilden visas två av dessa (e).

## Tsien ger paletten alla regnbågens färger

Här gör årets tredje nobelpristagare, Roger Tsien, entré. Hans största bidrag till GFP-revolutionen är att han utökade forskarnas fluorescerande palett så att den inkluderar många fler färger, som lyser starkare och längre.

Till en början kartlade Tsien hur GFP-kromoforen bildas kemiskt i det 238 aminosyror långa proteinet. Forskare hade tidigare visat att det är tre aminosyror i position 65, 66 och 67 som reagerar kemiskt med varandra och formar kromoforen. Tsien visade att den kemiska reaktionen kräver syre och förklarar hur den kan ske utan hjälp från andra proteiner.

I nästa steg bytte Tsien, med genteknikens hjälp, ut olika aminosyror i olika delar av GFP. Det här ledde till att proteinet både absorberade och skickade ut ljus i andra delar av spektrumet. Genom att laborera med aminosyrasammansättningen fördjupade Tsien förståelsen av GFP. Kunskapen använde han sedan för att utveckla nya varianter av GFP som lyser starkare och i helt andra färger, till exempel cyanblått, blått och gult. Därför kan forskare nu märka olika proteiner i olika färger för att se om de samspelar med varandra.

En färg som Tsien dock inte lyckades få fram från GFP var röd. Rött ljus skiner lättare genom biologisk vävnad och är därför särskilt användbart när forskare vill studera celler och organ inne i kroppen.

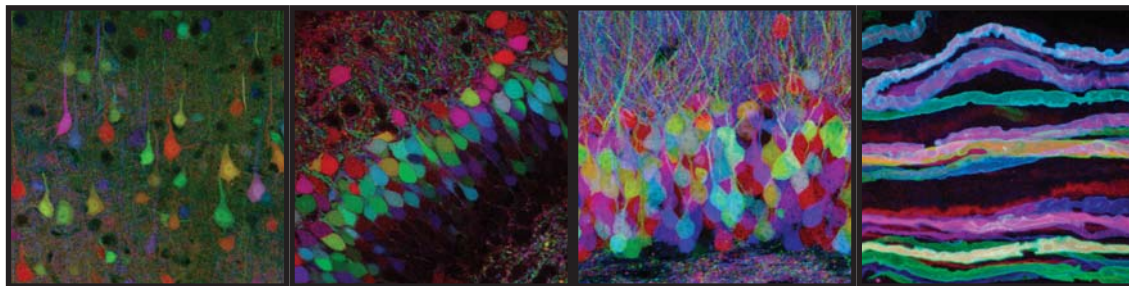
Här fick GFP-revolutionen hjälp på traven av två ryska forskare, Mikhail Matz och Sergey Lukyanov. De började söka efter GFP-liknande proteiner hos fluorescerande koraller och hittade sex olika proteiner. Ett rött, ett gult och resten gröna.

Det mest åtråvärda av dessa var det röda, som döptes till DsRED. Men det röda proteinet var större och klumpigare än GFP. DsRED bestod av fyra aminosyrakedjor, istället för bara en, och var därför inte användbart som fluorescerande markör i biologiska processer. Det problemet löste Tsiens forskargrupp. De förändrade DsRED så att proteinet nu är stabilt och fluorescerar som en enda aminosyrakedja och därför lätt går att koppla till andra proteiner.

Från detta mindre protein har Tsiens forskargrupp också utvecklat proteiner med läskande namn som mPlum, mCherry, mStrawberry, mOrange och mCitrine, allt efter vilken färg de lyser med. Flera andra forskare och företag har också bidragit med nya färgklickar till paletten. Så, idag, 46 år efter att Shimomura för första gången skrev om den grönt fluorescerande proteinlösningen, finns det GFP-liknande proteiner som lyser i alla regnbågens färger.

## The brainbow

I ett spektakulärt experiment har forskare använt tre av dessa proteiner. De genmodifierade möss så att nervceller i deras hjärna tillverkade olika mängder av färgerna gult, cyanblått och rött. Färgkombinationen liknar den som färgskrivare använder. Resultatet blev en mushjärna som lös i regnbågens färger och där forskarna kunde följa trådarna från enskilda nervceller i hjärnans täta nätverk. Forskarna kallade experimentet "the brainbow".



Forskare vid Harvarduniversitet i USA har färglagt nervcellerna i en mushjärna så att de fluorescerar i alla regnbågens färger. Nervcellerna tillverkar olika mycket av tre olika GFP-liknande proteiner som fluorescerar i gult, cyanblått och rött, ungefär samma färger som en färgskrivare använder. På så sätt har forskarna kunnat se hur de enskilda nervcellerna i hjärnan flätar sig samman till ett nätverk. Foto: Livet et al (2007) Nature 450 56-63.

## GFP-sensor för arsenik och tungmetaller

Det grönt fluorescerande proteinet kan också användas för rena biotekniktillämpningar – bland annat för att detektera arsenik i vattenbrunnar. Det är ett gigantiskt problem i stora delar av Sydostasien, där naturligt förekommande arsenik orsakar världens största just nu pågående giftkatastrof. Forskarna har genmodifierat arsenikresistenta bakterier så att bakterierna i närvaro av arsenik börjar lysa grönt. Forskare har också modifierat andra organismer så att de fluorescerar grönt i närvaro av sprängämnet trinitrotoluene (TNT) eller tungmetallerna kadmium eller zink.



## Ett mysterium kvar att lösa

När Osamu Shimomura började studera självlysande organismer i haven ville han förstå vad som fick dem att lysa. Det är ett typexempel på hur förutsättningslös grundforskning kan leda till en oväntad vetenskaplig revolution.

Trots allt vi vet idag om GFP så finns det fortfarande ett mysterium kvar att lösa – varför lyser maneten *Aequorea victoria*? Många havslevande organismer använder ljuset från självlysande proteiner för att förvillia fienden, för att locka till sig föda eller för att attrahera en partner. Men ingen vet vad som under evolutionens gång har drivit *Aequorea victoria* att utveckla aequorin och GFP. Den frågan återstår.

### LÄNKAR OCH LÄSTIPS

Mer information om årets priser, bland annat en vetenskaplig bakgrundsartikel på engelska, finns på Kungl. Vetenskapsakademiens webbplats, [www.kva.se](http://www.kva.se), och på <http://nobelprize.org>. Där kan man också se presskonferensen som webb-TV. Mer information om utställningar och aktiviteter kring Nobelpriset finns på [www.nobelmuseum.se](http://www.nobelmuseum.se).

### Böcker (på engelska)

Pieribone, V., Gruber D. F., *A Glow in the Dark*. 2005, Cambridge, Massachusetts, och London, England, The Belknap Press, Harvard University Press  
Zimmer M., *Glowing Genes*. 2005, Amherst, New York, Prometheus Books

### Vetenskapliga översiktsartiklar (på engelska)

Shimomura, O. (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy* **217** 3-15  
Shaner, N.C. et al. (2008) Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature Methods* **5** 545-551

### Länk

En hiv-infekterad cell som tillverkar GFP-märkta viruspartiklar (gröna prickar), film:  
[www.nature.com/nature/journal/v454/n7201/supinfo/nature06998.html](http://www.nature.com/nature/journal/v454/n7201/supinfo/nature06998.html)  
Webbplats om GFP-revolutionen: [www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm](http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm)

### PRISTAGARE

#### OSAMU SHIMOMURA

Marine Biological Laboratory (MBL)  
7 MBL Street  
Woods Hole, MA 02543  
USA  
*och*  
Boston University Medical School  
School of Medicine  
715 Albany Street  
Boston, MA 02118  
USA  
[www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/shimomura.html](http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/shimomura.html)

Japansk medborgare. Född 1928 i Kyoto, Japan. F.D. i organisk kemi 1960 vid Nagoyauniversitetet, Japan. Professor emeritus vid Marine Biological Laboratory (MBL), Woods Hole, MA, USA och Boston University Medical School, MA, USA.

#### MARTIN CHALFIE

Columbia University  
Biological Sciences  
1012 Fairchild Center, M.C. 2446  
New York, NY 10027  
USA  
[www.columbia.edu/cu/biology/faculty-data/martin-chalfie/faculty.html](http://www.columbia.edu/cu/biology/faculty-data/martin-chalfie/faculty.html)

Amerikansk medborgare. Född 1947 i Chicago, IL, USA. F.D. i fysiologi 1977 vid Harvard University, USA. William R. Kenan, Jr. Professor of Biological Sciences vid Columbia University, New York, NY, USA, sedan 1982.

#### ROGER Y. TSIEN

Howard Hughes Medical Institute  
University of California, San Diego  
9500 Gilman Dr  
CMM West 310  
La Jolla, CA 92093-0647  
USA  
[www.tsienlab.ucsd.edu](http://www.tsienlab.ucsd.edu)

Amerikansk medborgare. Född 1952 i New York, NY, USA. F.D. i fysiologi 1977 vid Cambridge University, Storbritannien. Professor och Investigator vid Howard Hughes Medical Institute, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA, sedan 1989.