

NOBELPRISET I FYSIOLOGI ELLER MEDICIN 2006

gemensamt till

ANDREW FIRE och CRAIG MELLO

”för deras upptäckt av RNA-interferens

– utsläckning av geners uttryck med dubbelsträngat RNA”

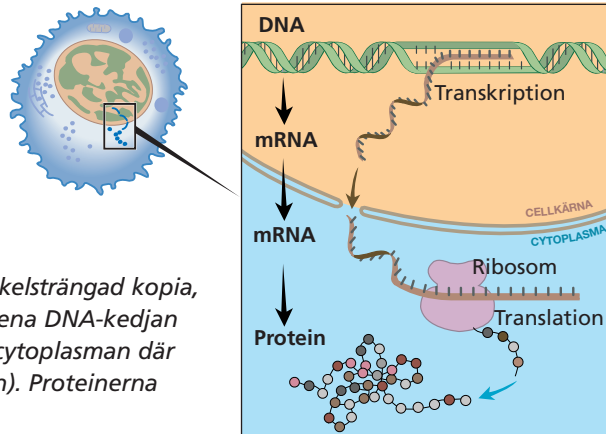
Årets Nobelpristagare i fysiologi eller medicin, de amerikanska forskarna Andrew Fire och Craig Mello, har upptäckt en central mekanism för reglering av gener. De har visat att RNA-molekyler i dubbelsträngad form kan tysta gener genom att eliminera det mRNA som motsvarar respektive gen. Detta kallas RNA-interferens (RNAi) och förekommer hos såväl växter som djur inklusive människan.

Så bildas proteiner

En vuxen människa består av cirka 100 000 miljarder celler. Varje cellkärna innehåller hela vår arvs massa – det totalt två meter långa DNA:t med omkring 30 000 gener. När generna uttrycks (aktiveras) överförs den genetiska informationen från DNA till budbärarmolekylen mRNA (messenger RNA), som sedan dirigerar bildningen av proteiner. Proteinerna svarar för livsprocesserna i alla organismer.

Uttrycket av gener styrs av det maskineri som omskriver DNA till mRNA (s k transkription). I vår kropp finns ett par hundra olika typer av celler. Bildningen och förnyelsen av cellerna regleras genom att geners aktivitet slås på och av.

Alla gener uttrycks inte i varje cell; olika uppsättningar av gener är aktiva i olika typer av celler. I en nervcell uttrycks andra gener än i en hjärtcell eller en levercell. Vilka gener som ska vara aktiva vid en given tidpunkt styrs bl a av transkriptionsfaktorer, proteiner som kontrollerar genavläsningen.



När ett protein ska bildas görs en enkelsträngad kopia, budbärarmolekylen mRNA, av den ena DNA-kedjan (transkription). mRNA vandrar ut i cytoplasman där informationen översätts (translation). Proteinerna bildas i ribosomerna.

Hur fungerar RNA-interferens?

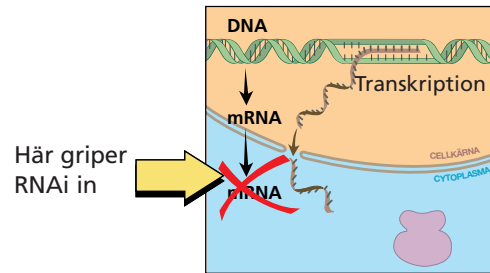
Andrew Fire och Craig Mello publicerade sin upptäckt av RNA-interferens år 1998. Den oväntade upptäckten visade att dubbelsträngat RNA (dsRNA) spelar en mycket aktiv roll i styrningen av geners aktivitet. Dessa RNA-molekyler dirigerar nedbrytningen av mRNA-molekyler med hjälp av ett biokemiskt maskineri. På så sätt kan uttrycket av den gen som kodar för (ger upphov till) ett visst protein släckas ut, s k gene silencing. Resultatet blir att bildningen av detta protein stängs av.

RNA-interferens är en naturlig mekanism som har stor betydelse vid regleringen av våra geners aktivitet. Den har också blivit ett mycket användbart forskningsverktyg. Inom grundforskningen används RNA-interferens framför allt för att studera enskilda geners funktion. Man hoppas också att RNA-interferens i framtiden ska kunna användas för att behandla olika sjukdomar.

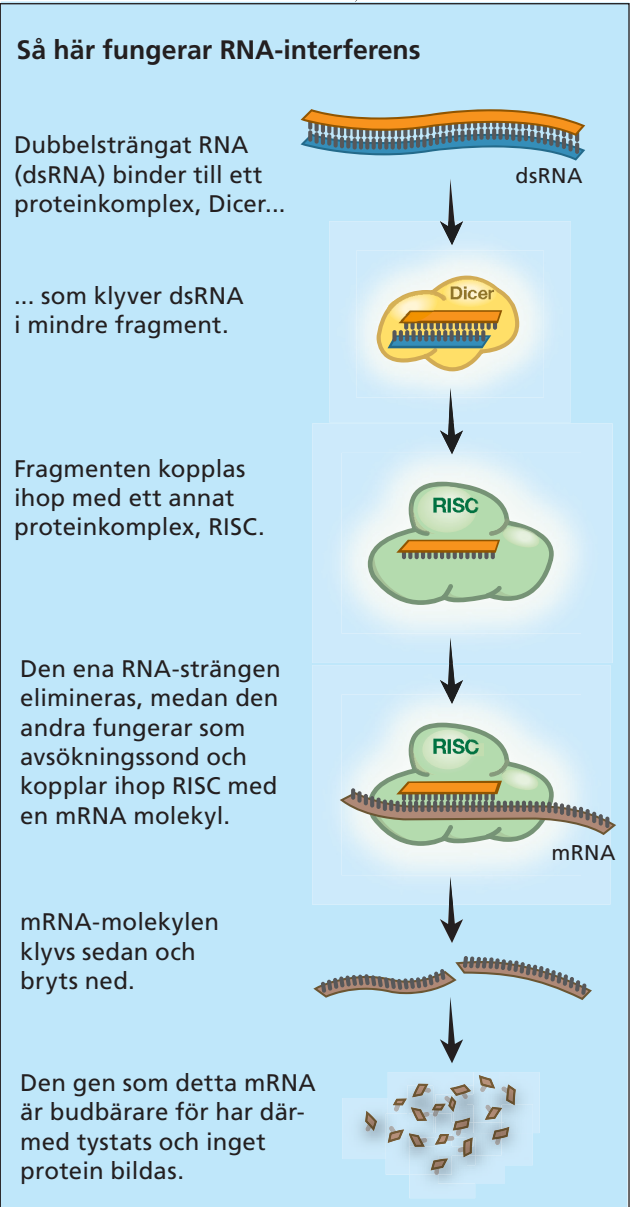
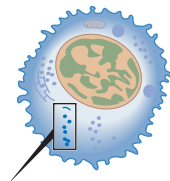
Antisens- och växtförsök förbryllade

RNA-molekyler ansågs länge vara enbart förmedlare av den genetiska informationen från DNA. Men i början av 1980-talet upptäckte man att enkelsträngade RNA-molekyler i bakterien *Escherichia coli* kan binda till budbärarmolekylen mRNA. På så sätt inaktiveras mRNA och kan inte föra vidare den genetiska informationen. Därmed stoppas bildningen av det protein som detta mRNA kodar för. Senare upptäckte man att sådana antisensmolekyler även finns hos rundmasken *Caenorhabditis elegans*.

Dessa fynd väckte stora förhoppningar om att antisens-RNA skulle kunna användas som en form av genterapi. Att med "skraddarsydda" antisensmolekyler blockera bildningen av felaktiga proteiner sågs av många som en ny möjlighet att behandla exempelvis vissa ärftliga sjukdomar och cancer.



RNA-interferens innebär att RNA i dubbelsträngad form kan bryta ner mRNA för en viss gen och därmed stoppa bildningen av protein.



Det visade sig att antisensstekniken fungerade bra på växter. En genförändrad tomatsort som mognar långsammare än normalt har exempelvis framställts på detta sätt. Däremot har försöken med antisens-RNA i djurförsök varit mindre lyckade. Metoden har ibland fungerat, ibland inte, och det har varit svårt att få samma resultat vid upprepade försök.

Genetiska forskare gjorde omkring år 1990 en rad vetenskapliga fynd som tedde sig svår-förklarliga. Det mest förbryllande resultatet fick växtbiologer som försökte förstärka den röda färgen i petunior. De förde in en gen som styr bildningen av rött färgpigment – men resultatet blev i vissa fall att blommorna helt tappade färgen! Det visade sig då att mRNA för färggenen hade försvunnit. Hur sådana oväntade effekter kunde uppstå förblev en gåta tills den fick sin lösning genom Andrew Fires och Craig Mellos upptäckt.



Växtforskarna ville göra petunior ännu vackrare genom att förstärka den röda färgen. Men resultatet blev att blommorna ibland tappade färgen!

Nycklexperimentet

Det nycklexperiment som ledde fram till upptäckten av RNA-interferens gjordes med rundmasken *Caenorhabditis elegans*, en cirka en millimeter lång modellorganism som spelat en viktig roll vid många biomedicinska upptäckter.

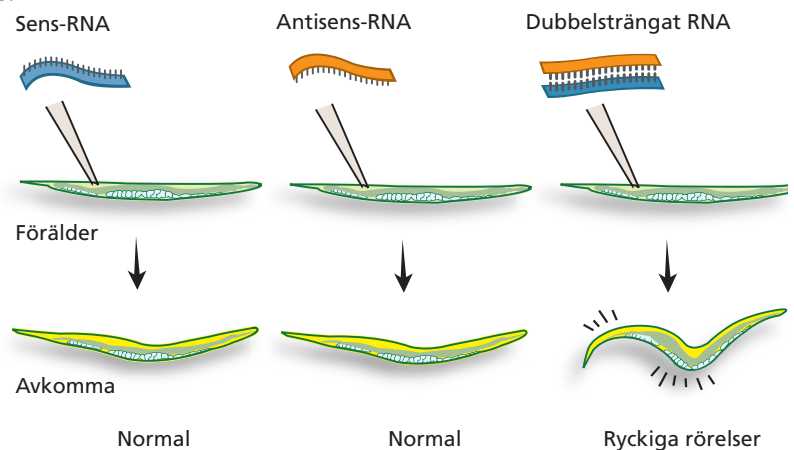


C. elegans

Under 1990-talet undersökte Andrew Fire och Craig Mello hur uttrycket av gener regleras i *C. elegans*. De studerade bl a mRNA som kodar för ett protein som har betydelse för maskens rörelseförmåga. I maskens könskörtlar sprutade de in sens-RNA (dvs en molekyl som överensstämmer med en del av mRNA). Man såg dock inga effekter, varken hos de maskar som injicerats eller deras avkomma. Fire och Mello injicerade i andra maskar antisens-RNA som kunde binda till motsvarande mRNA för muskelproteinet, men inte heller då hände något. När de sprutade in en blandning av sens-RNA och antisens-RNA blev resultatet att maskens avkomma rörde sig på ett besynnerligt, ryckande sätt. Ett liknande rörelsemönster förekom hos maskar som hade en defekt gen för muskelproteinet. Hur kunde detta oväntade fynd förklaras?

Varken injektion av sens-RNA för muskelproteinet eller motsvarande antisens-RNA gav några effekter.

Men när man sprutade in både sens-RNA och antisens-RNA (som binder till varandra och bildar dubbelsträngat RNA) uppvisade maskens avkomma samma ryckiga rörelsemönster som maskar som har en defekt gen för muskelproteinet.



Gener tystas genom att mRNA elimineras

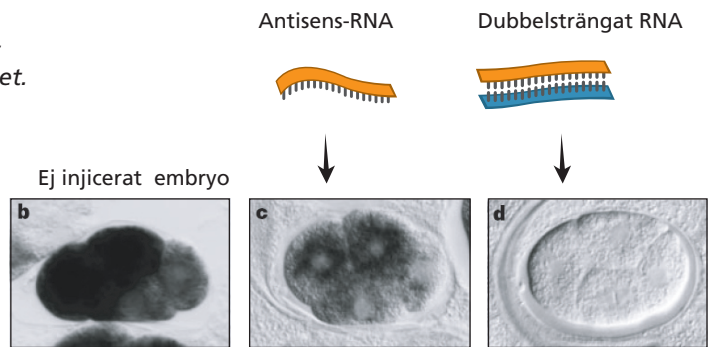
Tillsammans bildade sens-RNA och motsvarande antisens-RNA dubbelsträngat RNA, och det verkade alltså som om detta kunde tysta genen för muskelproteinet. Men hur gick det till? Dubbelsträngade RNA-molekyler har ju ingen fri kedja som kan binda till och inaktivera mRNA-molekyler. Man hade snarare förväntat sig att enbart enkelsträngat antisens-RNA skulle binda till motsvarande mRNA och på så sätt tysta genen.

Andrew Fire och Craig Mello gick vidare genom att spruta in dubbelsträngat RNA med genetisk kod för några andra gener hos masken *C. elegans*. Med hjälp av en speciell färgningsteknik påvisade man mRNA:t för en gen som var aktiv i maskens embryo. När genen uttrycks kan embryot färgas eftersom mRNA:t finns i cellerna. Antisens-RNA som band till mRNA för denna gen hade viss effekt och minskade färgbarheten. Men motsvarande dubbelsträngat RNA (sens-RNA plus antisens-RNA) gjorde att färgbarheten helt försvann – mRNA:t hade försvunnit och genen hade tystats.

I alla försök som Fire och Mello gjorde med maskgener blev resultatet att dubbelsträngat RNA för just den gen vars kod man använt släcktes ut. Därmed upphörde bildningen av det protein som genen kodar för. Dubbelsträngat RNA kunde alltså störa – interferera med – genernas uttryck, därav begreppet RNA-interferens.

Aktiviteten hos en gen i embryon hos rundmasken C. elegans kan studeras i laboratoriet. När genen uttrycks blir maskens embryon färgbara.

Då Fire och Mello injicerade antisens-RNA för denna gen minskade färgbarheten något. Men när de sprutade in motsvarande dubbelsträngat RNA (sens-RNA plus antisens-RNA) försvann färgbarheten.



Fires och Mellos slutsatser

I artikeln i tidskriften *Nature* den 19 februari 1998 drog Andrew Fire och Craig Mello en rad slutsatser av sina enkla men eleganta experiment med *C. elegans*-gener:

- Utsläckningen av gener var mycket effektiv när de injicerade dubbelsträngat RNA men svag eller obefintlig när de sprutade in enkelsträngat RNA (sens-RNA eller motsvarande antisens-RNA för respektive gen).
- Det mRNA som påverkades av det dubbelsträngade RNA:t försvann – det tycktes brytas ned och elimineras.
- Det dubbelsträngade RNA som sprutades in måste motsvara den mogna, ”trimmade”, mRNA-sekvensen för genen. Denna mekanism kunde inte utlösas av intronsekvenser (dvs delar av molekyler som inte innehåller kodande information). Detta tydde på att effekten utövades efter transkriptionen och snarare i cytoplasman än i cellkärnan.
- Bara det mRNA som överensstämde med sens-RNA-kedjan i insprutat dubbelsträngat RNA tystades – inget annat mRNA i cellerna påverkades. RNA-interferens var alltså specifik för den gen vars kod överensstämde med mRNA-molekylens.
- Endast några få dubbelsträngade RNA-molekyler per cell räckte för att fullständigt tysta en gen. Effekten var så stark att Fire och Mello föreslog att enzymer deltog i processen.
- Effekten av dubbelsträngat RNA kunde spridas mellan celler och vävnader och till och med ärvas till avkomman.

Förklarade tidigare resultat

Andrew Fire och Craig Mello s fynd klargjorde en del tidigare förbryllande resultat, bl a det märkliga försöket med petunior som helt förlorade sin röda färg när de tillfördes en gen som istället skulle förstärka den röda färgen. I slutet av sin artikel i *Nature* spekulerade Fire och Mello i att organismer kan använda dubbelsträngat RNA som en naturlig mekanism för att tysta gener.

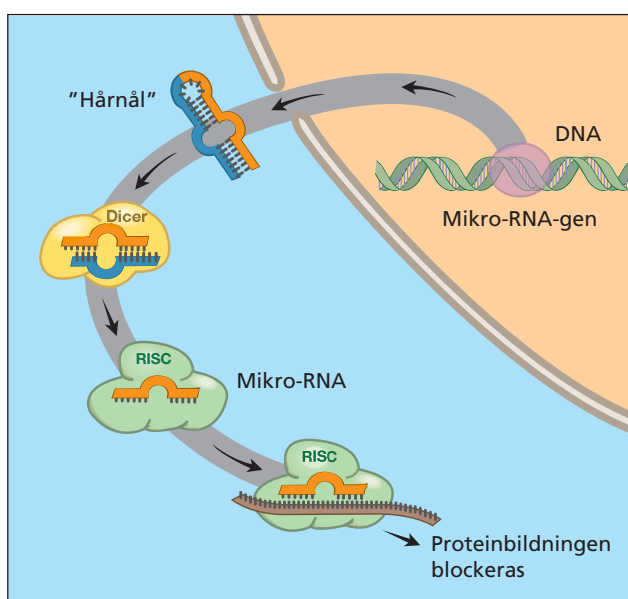
Fires och Mellos upptäckter blev startskottet för ett helt nytt forskningsfält. Under de följande åren identifierades de olika komponenterna i RNA-interferens-maskineriet (se sid 2). Det är en komplicerad process där ett stort antal proteiner och proteinkomplex samverkar. Denna mekanism skiljer sig betydligt från den enkla antisensmekanism som upptäcktes i bakterier i början av 1980-talet.

Ändå kan man förenklat säga att slutresultatet av RNA-interferens blir en sorts antisensmekanism som resulterar i att mRNA bryts ned och elimineras. Motsvarande gen har därmed tystats och kan inte bilda det protein som den kodar för. RNA-interferens har visat sig förekomma hos så gott som alla organismer vars celler har cellkärna.

Reglering av genes uttryck

Vilka naturliga funktioner har RNA-interferens i organismerna? Numera vet man att flera hundra gener i vår arvs massa kodar för små RNA-molekyler som kallas mikro-RNA och som innehåller avsnitt av andra genes kod. Förstadier till dessa mikro-RNA-molekyler bildar en hårnålsstruktur med dubbelsträngat RNA (se figur nedan). Det är dessa molekyler som aktiverar RNA-interferens-maskineriet. Det leder till att mRNA från den gen som har en liknande kod bryts ned eller blockeras så att proteinet inte kan bildas.

Detta sätt att med mikro-RNA-molekyler reglera genes uttryck (aktivitet) har alltså visat sig vara centralt för eukaryota celler – från enkla organismer till människa. RNA-interferens spelar bl a en viktig roll för att stänga av gener under organismernas utveckling och för att styra cellfunktioner.



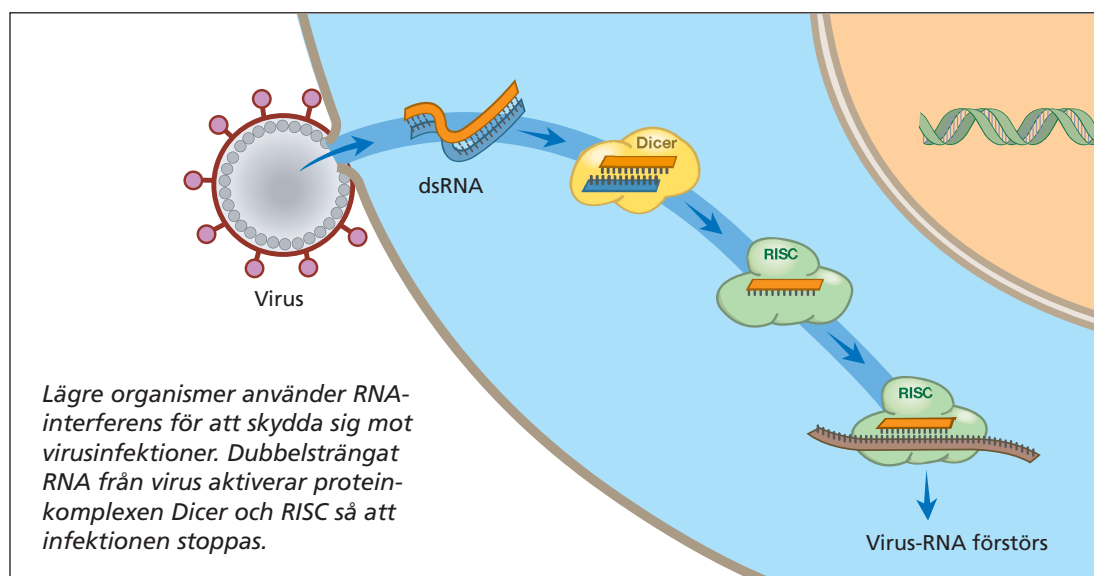
Vi har hundratals olika gener som kodar för små RNA-molekyler, mikro-RNA, vars förstadier kan bilda dubbelsträngat RNA. Dessa kan aktivera RNA-interferensprocessen och på så sätt stänga av olika genes aktivitet.

Försvar mot virus

Vi människor och andra högre organismer har ett mycket avancerat immunsystem som försvar mot främmande mikroorganismer. I försvaret mot virusinfektioner medverkar bl a interferoner och olika typer av T-celler.

Men hos lägre organismer som saknar ett sådant effektivt immunsystem har RNA-interferens visat sig vara en viktig mekanism för att skydda mot virusinfektioner. En del virus har en arvs massa som består av dubbelsträngat RNA, och många virus med enkelsträngat RNA bildar dubbelsträngat RNA någon gång under sin livscykel när de förökar sig inne i cellerna.

Vid en virusinfektion kommer virus-RNA in i cellen (se figur nedan). Dubbelsträngat virus-RNA binds då till Dicer och kapas till mindre fragment. Det leder till att RISC-komplexet aktiveras så att virus-RNA bryts ner och cellen överlever infektionen.



Skyddar mot hoppande gener

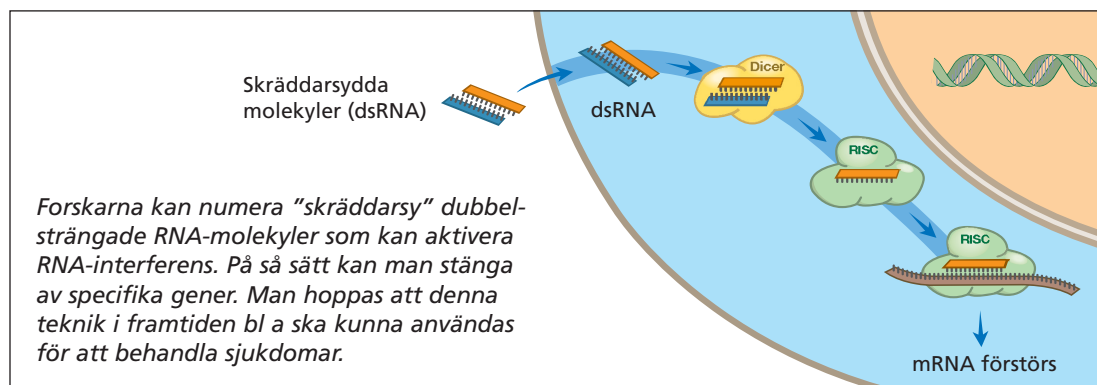
Hos de flesta organismer finns rörliga delar av arvs massan, transposoner. Dessa DNA-sekvenser kallas även hoppande gener eftersom de i sällsynta fall kan flytta runt i arvs massan. Transposoner bidrar (liksom mutationer) till evolutionen genom att öka den genetiska variationen. Men om en transposon hamnar på en olämplig plats i arvs massan, t ex i en viktig gen, kan den åstadkomma skada.

I vissa skeden av transposonernas ”hoppande” i arvs massan kopieras transposon-DNA till RNA-molekyler. RNA som bildas kan vara dubbelsträngat och kan då brytas ner genom RNA-interferens. På så sätt kan RNA-interferens skydda arvs massan mot transposonernas skadliga effekter.

Skräddarsydda molekyler i laboratoriet

Förutom de naturliga funktioner som RNA-interferens svarar för har Fires och Mellors upptäckt öppnat spännande möjligheter för genteknologin. RNA-interferens har redan utvecklats till ett viktigt forskningsverktyg inom biologi och medicin och har t ex fått stor användning som en kraftfull metod för att kartlägga geners funktioner.

I laboratoriet skräddarsyr man RNA-molekyler, s k silencing RNA, som kan aktivera nedbrytning av kroppseget mRNA (se figur nedan). Silencing RNA-molekyler förs in i cellen och aktiverar RNA-interferens. De kroppsegna mRNA-molekyler som kan binda till tillfört RNA förstörs. Forskarna hoppas att denna princip ska kunna få en mängd tillämpningar, t ex inom växtförädlingen och på sikt vid behandling av svåra sjukdomar (se nedan).



Medicinska tillämpningar?

Upptäckten av RNA-interferens har skapat förhoppningar om förbättrad behandling av en rad olika sjukdomar, exempelvis virusinfektioner, hjärt- och kärlsjukdomar, cancer och ämnesomsättningssjukdomar. Vid många tillstånd är vissa gener överuttryckta (har för hög aktivitet), och sådana sjukdomar skulle kunna behandlas genom att specifika geners aktivitet dämpas.

Teoretiskt sett är det tilltalande att utnyttja RNA-interferens vid behandling av sjukdomar eftersom RNA-interferens är en naturlig mekanism och dubbelsträngat RNA är en kroppsegen substans. RNA-interferenstekniken har också – i motsats till antisensstekniken – visat sig vara mycket reproducerbar. Dessutom är dubbelsträngade RNA-molekyler enkla att framställa.

Än så länge finns inget färdigt läkemedel som är baserat på RNA-interferens, men det har gjorts framgångsrika djurförsök och flera substanser testas nu på patienter i kliniska prövningar. Det pågår t ex försök att med dubbelsträngat RNA behandla en form av åldersförändring av gula fläcken i ögat (s k våt makuladegeneration). Sjukdomen är vanlig bland äldre människor och leder till kraftig synnedsettning på grund av att blodkärl växer in i och skadar den del av näthinna som svarar för det skarpa seendet. En viktig orsak till denna kärlinväxt är en tillväxsfaktor som kallas VEGF (vascular endothelial growth factor). Genom att i ögat spruta in dubbelsträngat RNA som motsvarar mRNA för VEGF hoppas man slå ut denna tillväxsfaktor och på så sätt förhindra inväxten av blodkärl i gula fläcken.

Lovande försök

RNA-interferenstekniken prövas också som behandling mot RS-virus, som kan orsaka svåra luftvägsinfektioner hos små barn. Avsikten är att när man andas in dubbelsträngat RNA inaktiveras viruset i lungorna och infektionen stoppas. Hittills har en första studie genomförts på friska försökspersoner, och inga allvarliga biverkningar av behandlingen förekom.

Det pågår också en mängd djurförsök och cellodlingsexperiment med RNA-interferens. Nyligen har man i försöksdjur (gnagare och apor) lyckats att med dubbelsträngat RNA tysta en gen som leder till hög kolesterolhalt. Det har även gjorts experiment med mänskliga celler där man med RNA-interferens lyckats hämma aktiviteten hos aidsviruset HIV.

Även om många försök med RNA-interferens har gett lovande resultat återstår en rad problem att lösa för att få denna behandlingsmetod att fungera på önskat sätt. Det gäller t ex att få in de dubbelsträngade RNA-molekylerna i rätt typer av celler och i lämpligt antal celler. Man måste också kunna styra behandlingen så att dubbelsträngat RNA verkar under lagom lång tid.

Andrew Fire och Craig Mello belönas för att de upptäckt en central mekanism för genreglering. Framtiden får utvisa om deras fynd kan bidra till att det utvecklas nya behandlingsmetoder – det ser lovande ut.

Pristagarna

Andrew Fire (f 1959) är amerikansk medborgare och sedan år 2003 professor i patologi och genetik vid Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA.

År 1983 blev han PhD i biologi vid Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA. Han påbörjade sin forskning på rundmasken *C. elegans* när han var gästforskare i Cambridge i England, i ett laboratorium som leddes av Sydney Brenner (Nobelpristagare år 2002). När Fire tillsammans med Mello gjorde de avgörande upptäckterna om RNA-interferens var han verksam vid Carnegie Institution of Washington.



L. CICERO/STANFORD



R. CARLINI/UMMAS

Craig Mello (f 1960) är amerikansk medborgare och professor i molekylärmedicin. Sedan år 1994 är han verksam vid Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, USA. Han är även Howard Hughes Medical Institute Investigator.

År 1990 blev han PhD i Cellular and Developmental Biology, Harvard University, Boston, Massachusetts. Innan han kom till University of Massachusetts Medical School i Worcester arbetade han vid Fred Hutchinson Cancer Research Center.

Tidigare Nobelpris inom forskningsområdet

Mekanismerna för hur informationen i cellkärnans DNA resulterar i bildning av proteiner och hur våra gener regleras har steg för steg kartlagts av ett stort antal forskare. Årets pris har därför beröringspunkter med flera tidigare Nobelpris i fysiologi eller medicin.

1933: **Thomas Morgan**, USA, ”för hans upptäckter rörande kromosomernas ärftlighetsbärande funktioner”.

1959: **Severo Ochoa** och **Arthur Kornberg**, båda USA, ”för deras upptäckter av mekanismen vid den biologiska syntesen av ribonukleinsyra och deoxiribonukleinsyra”.

1962: **Francis Crick**, Storbritannien, **James Watson**, USA, och **Maurice Wilkins**, Storbritannien, ”för deras upptäckt av nukleinsyrornas molekylära uppbyggnad och dess betydelse för informationsöverföring i levande materia”.

1965: **François Jacob**, **André Lwoff** och **Jacques Monod**, samtliga Frankrike, ”för deras upptäckter rörande genetisk styrning av enzym- och virussyntes”.

1968: **Robert Holley**, **Har Gobind Khorana** och **Marshall Nirenberg**, samtliga USA, ”för deras upptäckter rörande tolkningen av den genetiska koden och dennas funktion vid proteinsyntes”.

1978: **Werner Arber**, Schweiz, **Daniel Nathans** och **Hamilton Smith**, båda USA, ”för upptäckten av restriktionsenzym och deras användning inom den molekylära tekniken”.

1983: **Barbara McClintock**, USA, ”för hennes upptäckt av rörliga strukturer i arvsmassan”.

1993: **Richard Roberts**, Storbritannien, och **Phillip Sharp**, USA, ”för deras upptäckt av diskontinuerligt uppbyggda gener”.

Förutom ovan nämnda Nobelpris i fysiologi eller medicin har forskning inom detta område resulterat i Nobelpris i kemi.

1989: **Sidney Altman** och **Thomas Cech**, båda USA, ”för deras upptäckt av katalytiska egenskaper hos RNA”.

2006: **Roger Kornberg**, USA, ”för hans studier av den molekylära grunden för eukaryot transkription”.

Mera läsning

A. Fire, S.Q. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver & C.C. Mello: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391:806-811.

G. Wagner. RNA – molekylen som kan stänga av gener. *Forskning & Framsteg* 2005 (nr 1); 40:16-20.

Information på internet: <http://nobelprize.org>

Redaktionskommittén för årets populärvetenskapliga presentation av Nobelpriset i fysiologi eller medicin har utgjorts av följande professorer vid Karolinska Institutet, tillika ledamöter av Nobelförsamlingen:

Bertil Daneholt, Göran K. Hansson, Hans Jörnvall och Nils-Göran Larsson

Text: **Anders Nystrand**, leg läkare och medicinskribent

Illustrationer: **Annika Röhl**, grafisk redaktör

© 2006 Nobelkommittén, Karolinska Institutet, 171 77 Stockholm