



# NOBELPRISET I FYSIOLOGI ELLER MEDICIN 2007

gemensamt till

**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”*

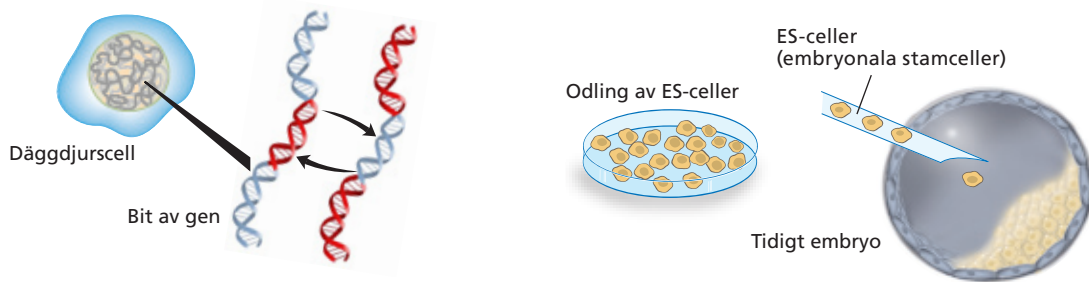
Årets pristagare har upptäckt hur man med hjälp av embryonala stamceller kan skapa bestående och exakta förändringar i arvsmassan hos möss. De resulterande mössen är kända som ”knockout-möss”, eftersom en typ av förändring kan vara att en viss gen slås ut.

## **Ett tudelat problem**

Att kunna skapa riktade genetiska förändringar som kan ärvas är ett tudelat problem.

En del är den stora utmaningen att lyckas hitta och sedan på önskat vis förändra den speciella gensekvens man är ute efter bland alla de tre miljarder baspar som arvsmassan är uppbyggd av. Detta problem lyckades Mario Capecchi och Oliver Smithies lösa, när de kunde visa att det sker så kallad homolog rekombination även i däggdjursceller. Denna process var tidigare känd i andra organismer och innebär i korthet att gener eller genbitar i en cell kan byta information med varandra.

Sedan återstår det andra problemet. Det är att få den riktade förändringen att löpa vidare till alla celler i nästa generation för att få fram genetiskt förändrade möss. Här var Martin Evans arbete med så kallade embryonala stamceller, ES-celler, avgörande. Han fann och kunde odla dessa celler som bygger upp det tidiga embryot och som har unik förmåga att utvecklas till vilken cell som helst i kroppen. Evans upptäckte att om man kan föra in en förändring i en sådan cell, kommer denna förändring att kunna återfinnas i hela det djur som den embryonala stamcellen utvecklas till.



### Det tudelade problemet

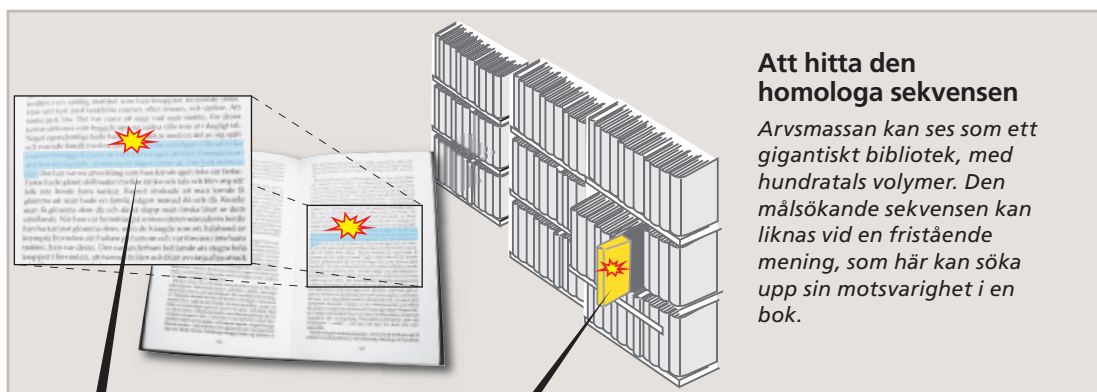
Capecchi och Smithies lyckades visa att det även i däggdjursceller förekommer så kallad homolog rekombination, som gör att hela gener eller genbitar kan byta plats.

Evans visade att om en genetisk förändring förs in i ES-celler och dessa sedan bildar en ny individ, kan förändringen återfinnas i den nya individens alla celler.

## Homolog rekombination

All information som behövs för att våra kroppar ska utvecklas och fungera i samverkan med miljön finns lagrad i vår arvs massa redan när vi är ett befruktat ägg. Arvsmassan är förpackad i cellkärnan där den två meter långa DNA-strängen är insorterad i 23 par kromosomer. Från vardera föräldern har vi ärvt den ena kromosomen i paret. När cellen delar sig kan kromosompar byta genetisk information med hjälp av homolog rekombination.

Capecchi och Smithies arbetade båda med målsättningen att denna typ av genetiskt utbyte borde kunna användas för att på ett riktat vis föra in önskade genförändringar i däggdjursceller.



### Att hitta den homologa sekvensen

Arvsmassan kan ses som ett gigantiskt bibliotek, med hundratal volymer. Den målsökande sekvensen kan liknas vid en fristående mening, som här kan söka upp sin motsvarighet i en bok.

TGCTATCATTGCCGATCCGGTTACCTA  
ACGATAGTAACGGCTAGGCCAATGGAT

Målsökande sekvens

TGCCATCATTGCCAATCCGGTTACGTA  
ACGGTAGTAACGGTTAGGCCAATGCAT

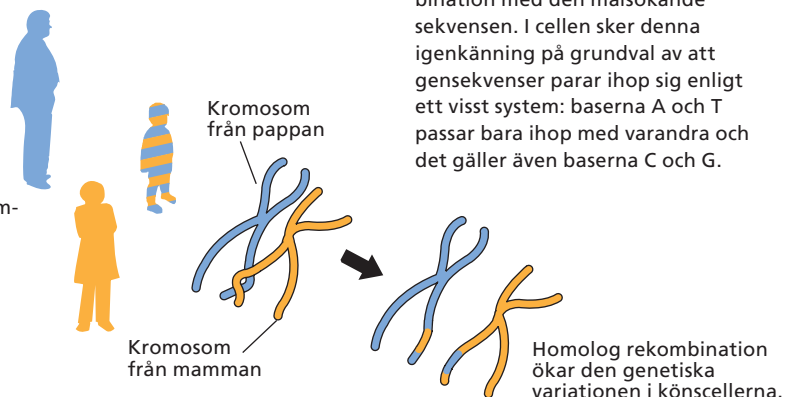
Målsekvens

TGCCATCATTGCCGATCCGGTTACGTA  
ACGGTAGTAACGGCTAGGCCAATGCAT

Målsekvens efter homolog rekombination med den målsökande sekvensen. I cellen sker denna igenkänning på grundval av att genssekvenser parar ihop sig enligt ett visst system: baserna A och T passar bara ihop med varandra och det gäller även baserna C och G.

### Homolog rekombination sker normalt under köns-cellernas bildning

Vi ärver en kromosom i kromosom-paret från pappa och den andra från mamma, och kromosomerna finns i cellens kärna. När köns-celler bildas kan DNA-sekvenser byta plats mellan de två kromosomerna med hjälp av homolog rekombination.



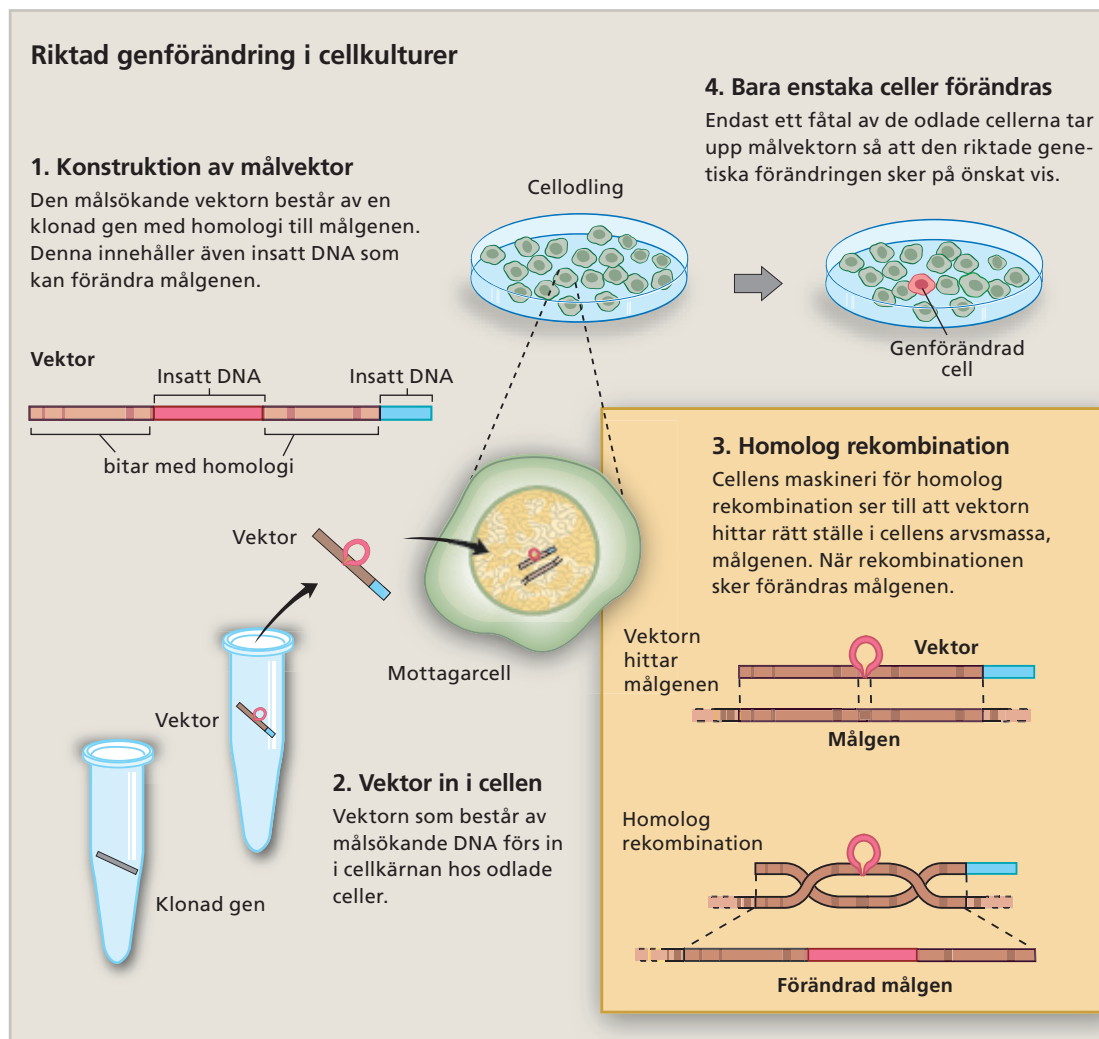
Homolog rekombination ökar den genetiska variationen i köns-cellerna.

## Att skapa riktade förändringar

I början av 1980-talet gjorde ett forskarlag lett av Capecchi upptäckten att DNA-sekvenser, som injicerades direkt i cellkärnan hos däggdjursceller, kan infogas i den mottagande cellens arvs massa genom just homolog rekombination. Experimentet lade grunden för hans idé om att tekniken skulle kunna nyttjas för att specifikt förändra alla slags gener i däggdjursceller.

Ivrig att få prova denna nya tanke ansökte han om forskningsbidrag från National Institutes of Health. Ansökan avlogs dock eftersom man ansåg att det var alltför osannolikt att det införda DNA:t skulle kunna finna sin rätta plats i målcellens arvs massa. (Det kan nämnas att Evans ungefär samtidigt fick avslag på en ansökan med liknande innehåll. Även UK Medical Research Council ansåg att idén var överambitiös!).

Smithies önskade också skapa riktade förändringar, men arbetade främst med att försöka reparera skador i mänskliga blodceller. Han upptäckte att den gen som utgör mall för globindelen i blodproteinet hemoglobin kunde förändras med hjälp av homolog rekombination. Övrigt kunde förändringen komma till stånd oavsett om genen var påslagen eller vilande. Ett sådant resultat tydde på att det vid varje tidpunkt var möjligt att påverka vilken som helst av arvs massans gener.



## Förändringar som kan bevaras i arvsmassan

Att det gick att föra in nya förändringar i princip i vilken gen som helst öppnade för nya idéer. Capecchi insåg att tekniken inte bara kunde nyttjas för att reparera skadat DNA, utan också för att stänga av gener.

Problemet med både Smithies och Capecchis resultat var dock att de celltyper som de kunnat förändra inte gav upphov till könsceller. Och utan könsceller var det omöjligt att skapa genetiska förändringar som kan ärvas.

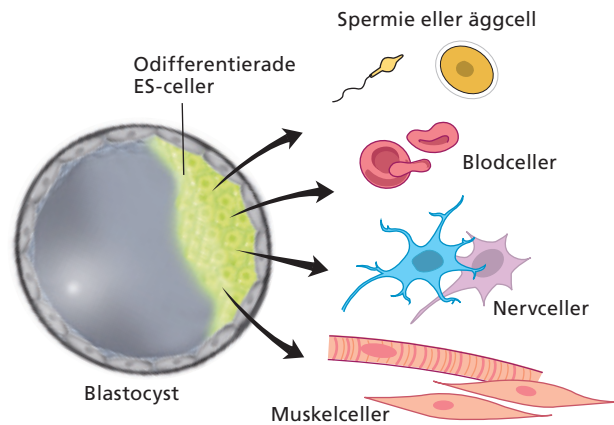
Men under tiden hade Evans publicerat just sådana forskningsresultat. En rad försök i hans laboratorium med en speciell typ av embryonala tumörceller hade inte lett till målet. Då upptäckte han att det gick att odla fram kulturer av celler med intakta kromosomer från musembryon.

Han fann att dessa ES-celler kan utvecklas till alla de cellslag som bygger upp kroppen. Det skiljer dem från så kallade vävnadsstamceller. Dessa ligger vilande i olika vävnader och utvecklas när det behövs till nya vävnadsspecifika celler, men de kan inte bilda vilken celltyp som helst, såsom ES-cellerna kan.

### Embryonala stamceller

Ett tidigt embryo kallas blastocyst. Cellerna i det yttre cellagret (grå) kommer att bilda moderkakan. Den inre cellmassan består av celler (gröna) som under en normal graviditet utvecklas till ett embryo.

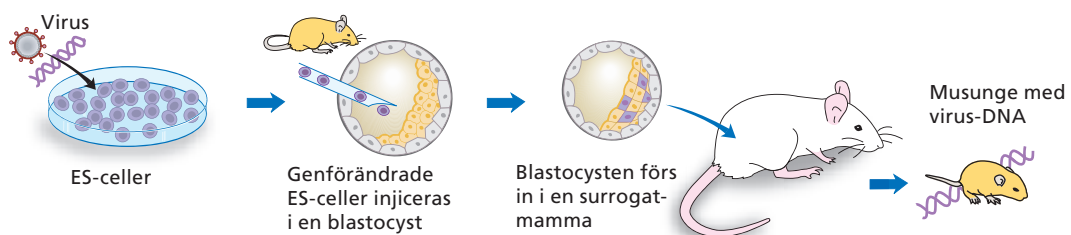
Dessa embryonala stamceller, ES-celler, är ännu odifferentierade. Det betyder att de har potential att utvecklas till alla slags celler som bygger upp den nya individen.



## Virusgener i möss

Om det gick att föra in den förändrade genen i ES-celler, innan dessa började differentieras, borde förändringen kunna synas i alla de celler som bygger upp en organism.

För detta viktiga experiment använde Evans några dagar gamla musembryon, så kallade blastocyster. I dessa injicerade han ES-celler som tidigare hade infekterats med DNA från ett virus. Dessa embryon sattes sedan in i en surrogatmammans livmoder där de utvecklades som vanliga musungar. När de föddes gick det att i arvsmassan hos vissa av ungarna återfinna virus-DNA. Resultatet bevisade att införd arvsmassa faktiskt kunde föras vidare och genombrottet publicerades i tidskriften *Nature* i oktober 1986.

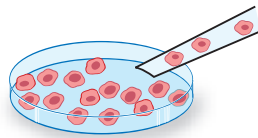


## Dags att kombinera resultaten

År 1985 hade Capecchi visat att homolog rekombination faktiskt förekommer i däggdjurs-celler och Smithies hade också använt denna metod för att föra in förändrat DNA i en mänsklig cell. Detta arbete var utfört i cellkulturer.

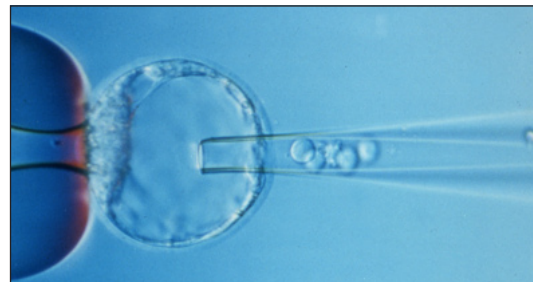
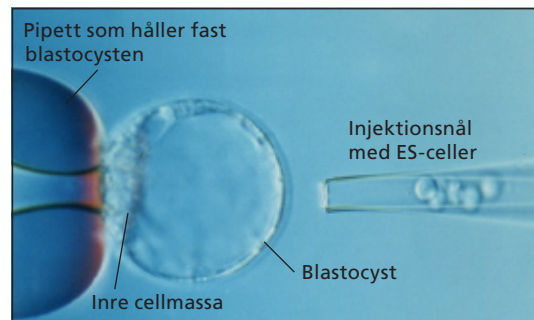
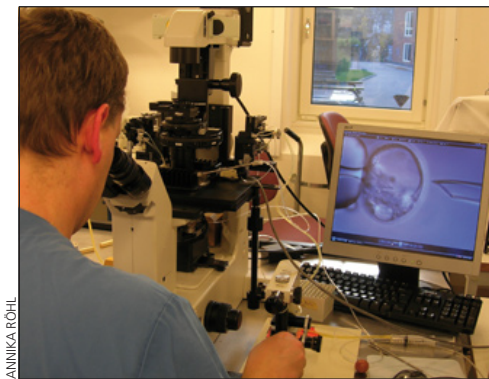
När Evans så publicerade sina ovan nämnda resultat om överfört virus-DNA fanns alla pusselbitar på plats för att göra riktade, genetiska förändringar i möss. Här skedde arbetet på flera fronter samtidigt. Evans var expert på ES-celler och Capecchi besökte hans laboratorium över en julhelg för att lära sig hantera dessa speciella celler, medan Evans personligen levererade stamceller till Smithies.

Både Smithies och Capecchi valde att skapa riktade förändringar i en gen som utgör mall för ett enzym kallat hypoxantin-guanin fosforibosyltransferas. Denna så kallade hprt-gen är skadad vid en ovanlig sjukdom, Lesch-Nyhans syndrom. Den ärvs på X-kromosomen. Det innebär att kvinnor blir anlagsbärare, men det är bara män som blir sjuka.



### En användbar teknik

I dag används ES-celler från mus i många slags medicinska experiment. De förändrade ES-cellerna suggs här upp ur odlingskålen med en fin glasnål.



### Vad man ser i mikroskopet

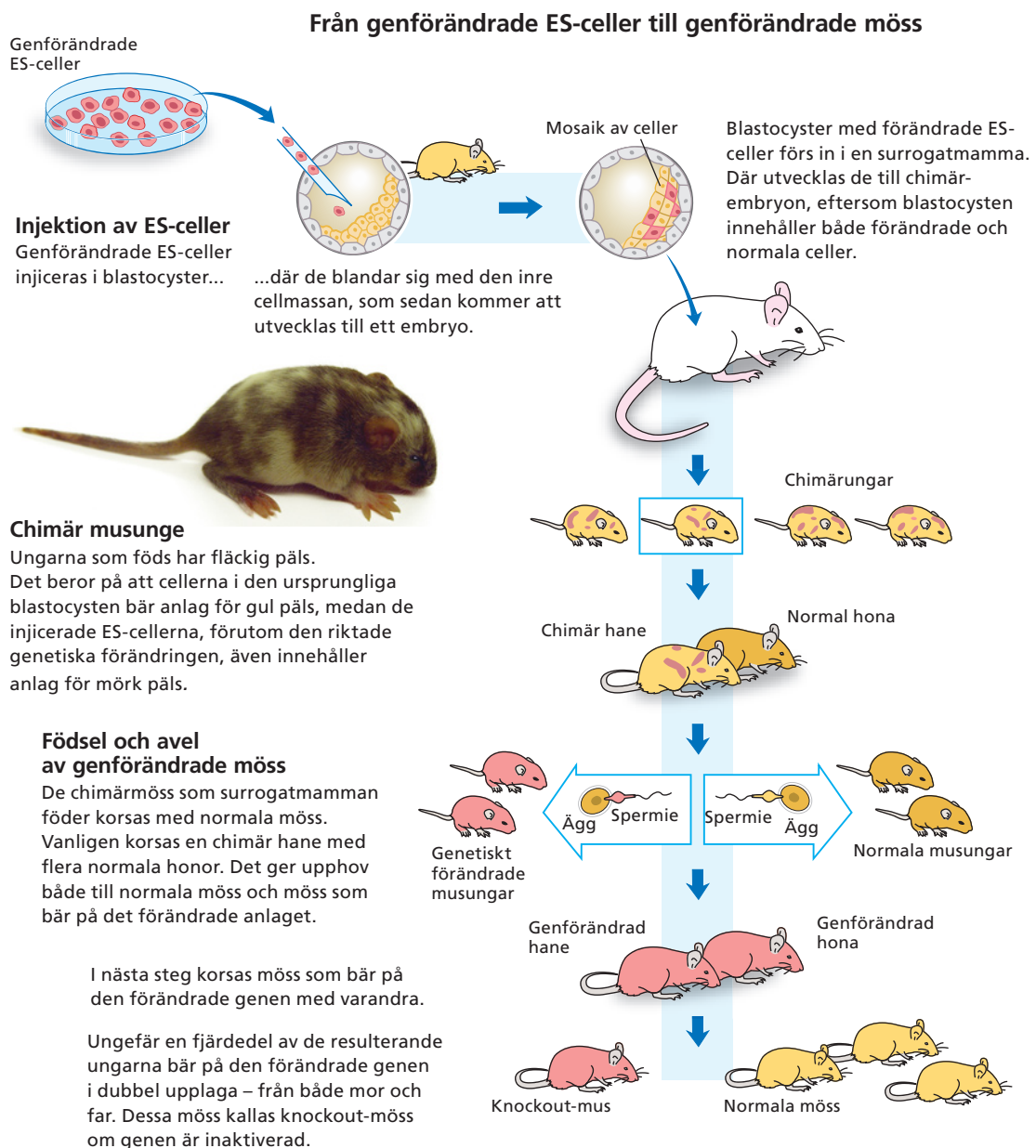
Forskaren använder ett faskontrast-mikroskop för att kunna utföra en så kallad mikroinjektion, när de förändrade ES-cellerna förs in i en blastocyst (ovan).

Bildserien till höger visar hur blastocysten hålls på plats med en glaspipett. De förändrade ES-cellerna sprutas sakta in med hjälp av en ihållig glasnål (th).

## Lyckade försök

Smithies visade år 1987 att en skadad *hprt*-gen hos odlade ES-celler gick att reparera när han förde in ett nytt DNA-fragment, som motsvarar en oskadad gen. Anledningen till att just denna gen användes i experimentet var att det var lätt att se om förändringen hade lyckats, eftersom bara de celler som lyckats ta upp en fungerande gen kunde växa i en särskild odlingslösning.

Samma år lyckades även Capecchi föga in en speciell gensekvens i *hprt*-genen. Denna gav cellerna möjlighet att överleva i odlingslösning tillsatt med antibiotikat neomycin. I tidskriften *Cell* beskriver Capecchi att det var möjligt att med den beskrivna tekniken skapa genetiskt förändrade möss. Många forskargrupper gav sig i kast med den utmaningen och år 1989 publicerades flera rapporter som beskrev förändrade möss. Den nya tekniken hade kommit för att stanna.

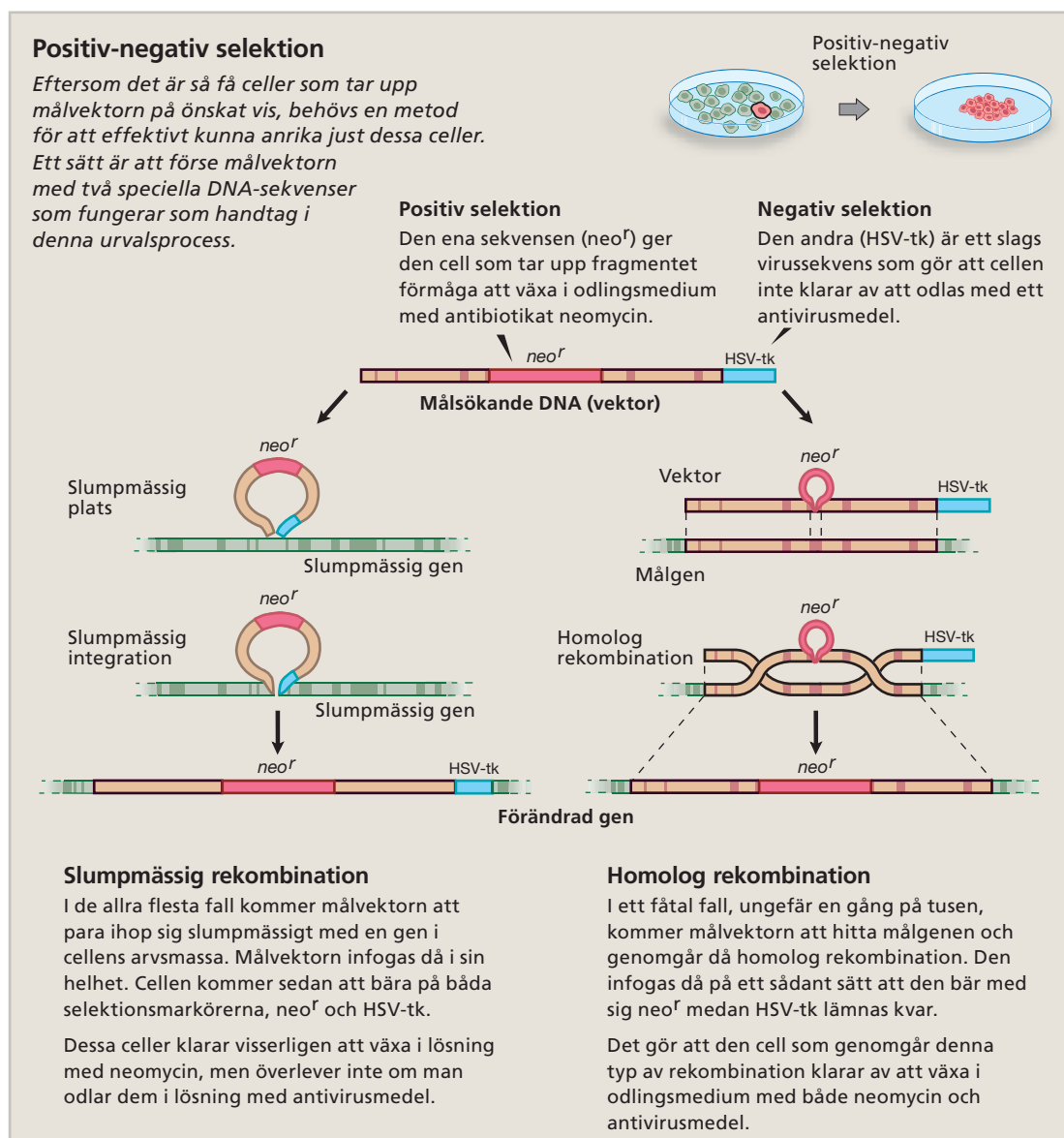


## Nytt sätt att anrika celler

Några år före detta genombrott, år 1986, rapporterade Evans grupp att de lyckats sätta in en speciell gen som gör det möjligt att få de ES-celler som tagit upp genen att växa i odlingar där man tillsatt neomycin. Detta var en viktig upptäckt, eftersom det gav en fingervisning om hur man med en speciell urvalsmetod, positiv selektion, kunde anrika just de fåtaliga ES-celler som på ett framgångsrikt vis tagit upp den nya genen.

Riktigt elegant blev anrikningsmetoden när Capecchi insåg att det också behövdes negativ selektion. Med denna går det att välja bort de vektorer som visserligen bär på resistensgenen, men som istället för att ha rekombinerat med målgenen, har parat ihop sig rent slumpmässigt.

Denna metod för att utföra positiv-negativ selektion publicerade Capecchi år 1988 i *Nature*. Den var viktig, eftersom homolog rekombination sker tusen gånger mer sällan än slumpmässig rekombination. Med en fungerande selektionsmetod går det att ur cellodlingen få fram och anrika de fåtal celler som infogat den förändrade genen på ett korrekt vis.



## Drygt 10 000 gener har förändrats

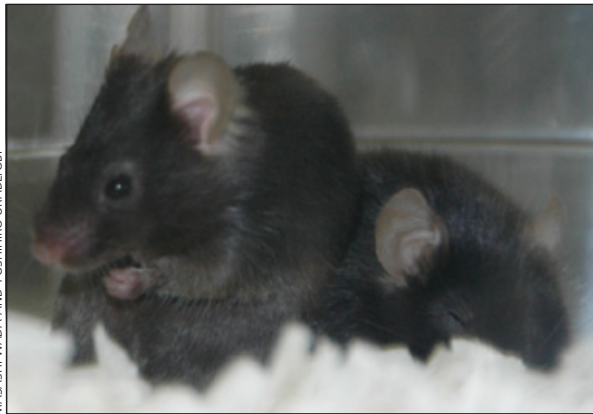
Tekniken att skapa riktade förändringar i möss har finslipats med hjälp av många forskares bidrag och används i dag inom all biomedicinsk forskning.

När tekniken först presenterades trodde många att den var alltför sofistikerad och svår-bemästrad och att den därför bara skulle kunna användas för att besvara ett fåtal frågeställningar. Det var en pessimistisk syn. I dag finns det en uppsjö av olika sorters knockout-möss, och sammanlagt har mer än 10 000 olika gener förändrats. Detta antal motsvarar nära hälften av de 22 400 gener som är kända hos oss och hos möss.

Förändringarna behöver inte alltid handla om att gener slås ut, utan de kan istället slås på (knock-on), förändras i sin funktion eller ersättas med en annan gen (knock-in).

Tekniken är i dag mycket förfinad och går att styra på så vis att den insatta genen bara slås av eller på i vissa vävnader, exempelvis i blodkärl, i nervsystemet eller i någon av de celltyper som samverkar i immunsystemet.

Forskarna kan också bestämma precis när under utvecklingen en viss gen ska vara aktiv eller slås av. Detta sinnrika system bygger på att den insatta genen har försetts med en speciell startsekvens, i en så kallad promotorregion, som kräver tillförsel av ett ämne för att genen ska läsas av och i förlängningen bilda protein. Denna tillsats kan exempelvis vara ett antibiotikum som musen får vid en bestämd tidpunkt.



*Möss sover vanligen på dagtid, men om de får koffein så blir de, liksom människor, pigga (musen tv). Om man däremot slår ut den gen som ligger bakom koffeinets effekt, hjälper inte koffeinat musen att hålla sig vaken (sovande mus th).*

## Inte vanliga transgener

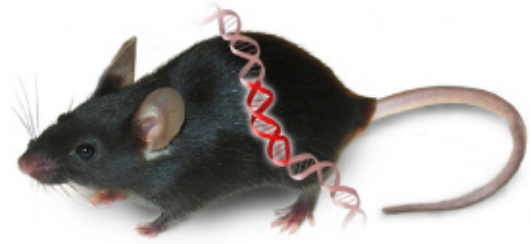
Det är viktigt att betona att den nu belönade tekniken skiljer sig från så kallade transgena möss som framställs genom att DNA sprutas in i ett befruktat ägg. Även hos dessa är vissa gener förändrade. Skillnaden är att det med denna, äldre teknik inte går att skapa riktade förändringar. Det beror på att när förändrat DNA förs in i befruktade ägg fogas det oftast in slumpmässigt i arvsmassan. Det gör att det inte i förväg går att styra var förändringen ska hamna, och inte heller hur många kopior av den nya genen som kommer att fogas in i arvsmassan.

Denna transgenteknik har bland annat använts för att studera vad som händer i kroppen om det finns extra kopior av en gen, något som ger upphov till att det tillverkas mer än vanligt av just det protein som genen utgör mall för. Att varken antalet infogade gener eller deras placering kan styras begränsar dock denna tekniks användbarhet.



## Verklighetstroga modeller

Med hjälp av genetiskt förändrade möss har forskare kunnat studera hur olika gener fungerar och samverkar, exempelvis under fosterutvecklingen. Men tekniken är kanske ännu viktigare inom medicinsk forskning där det nu går att göra modeller av en rad mänskliga sjukdomar. Förr var man i genetiska studier hänvisad till att studera celler i odling, men enstaka celler drabbas inte av högt blodtryck eller diabetes. För att få inblick i hur sådana vanliga sjukdomar utvecklas och hur de skulle kunna behandlas krävs mer verklighetstroga modeller. Till dags dato finns mer än femhundra olika slags genförändrade möss, som avspeglar viktiga mänskliga sjukdomar som exempelvis åderförkalkning, högt blodtryck eller diabetes.

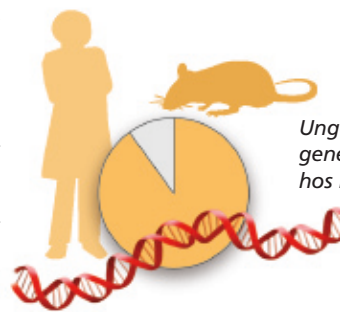


*Med den belönade tekniken går det att förändra de flesta av musens gener. Den vanligaste förändringen är att "slå ut" en viss gen och skapa en knockout-mus.*

Ett annat exempel är nya musmodeller för att studera cancer. Nu går det att hos möss slå ut vissa gener som vanligen motverkar att tumörer bildas, såsom genen p53. Hos dessa djur kan forskare följa sjukdomens framfart och se vilken behandling som är mest effektiv beroende på vilken form av cancer det handlar om, och även i vilket stadium den upptäckts.

## Hela arvsmassan behövdes

Årets pris går till tre forskare som gjorde sina banbrytande insatser mellan år 1981 och år 1989. Hur kommer det sig då att de belönas för knockout-tekniken just i år? Avgörande för att tekniken skulle kunna användas på ett för mänskligheten viktigt sätt är att det i möss ska gå att förändra gener vars funktion möss och människor delar. Vi är trots allt två mycket olika däggdjur. Ett viktigt steg inom den genetiska forskningen kom år 2001 när hela den mänskliga arvsmassan – genomet – var avläst. Vid slutet av år 2002 fanns också en första analys av musens genom. Med tillgång till denna tidigare fördolda information kunde forskarna till fullo jämföra generna hos mus och hos människa och utnyttja denna nyvunna kunskap i sin forskning.



*Ungefär 90 procent av våra gener har motsvarigheter hos musen.*

## Etiska ställningstaganden

Årets pris öppnar också för diskussioner om huruvida det är lämpligt att överhuvudtaget använda försöksdjur. Varje experiment som inbegriper djur bedöms av statligt tillsatta etiska kommittéer som tar hänsyn till och försöker vikta djurens eventuella lidande mot den förväntade framtida nyttan. Men frågan kvarstår: är det etiskt försvarbart att skapa förändrade möss med andra metoder än vanlig avel? Ett starkt argument är att det med riktat förändrade möss går att få fram bra modeller av mänsklig sjukdom, vilket kan rädda människoliv. Dessutom leder bättre djurmodeller till att det krävs färre försöksdjur för att komma fram till resultat eftersom resultaten blir säkrare.

Förändrade möss som fått en mänsklig variant av en gen infogad kan även göra läkemedelstester mer informativa. Det gäller exempelvis när man vill undersöka de för depressionssjukdomar så viktiga mänskliga mottagarmolekylerna för signalämnet serotonin. Dessa skiljer sig från motsvarande mottagare hos både möss och råttor. Tidigare hade inte forskarna några bra djurmodeller. Nu går det att studera hur nya substanser fungerar hos möss som fått mänskliga serotoninmottagare.

## Pristagarna

**Mario R. Capecchi** är född 1937 i Italien, men är amerikansk medborgare. År 1967 disputerade han i biofysik vid Harvard University, Cambridge, MA. I dag är han Howard Hughes Medical Institute Investigator och professor i humangenetik och biologi vid University of Utah, Salt Lake City, USA.

Sedan 1989 har Capecchi i sin forskning bland annat undersökt vilka gener som är aktiva under fosterutvecklingen, och kunnat visa vilka gener som styr anatomin och hur olika organ utvecklas.



**Sir Martin J. Evans**, född 1941 i Storbritannien och brittisk medborgare. Han disputerade i anatomi och embryologi 1969 vid University College, London. I dag är han Director vid School of Biosciences och professor i mammalgenetik, vid Cardiff University.

Evans har inriktat sig på att skapa modeller för mänskliga sjukdomar, bland annat flera musmodeller för sjukdomen cystisk fibros.

**Oliver Smithies** föddes år 1925 i Storbritannien, men är i dag amerikansk medborgare. År 1951 disputerade han i biokemi vid Oxford University, UK. I dag är han professor i patologi och laboratoriemedicin vid University of North Carolina at Chapel Hill, NC.

Smithies har liksom Evans använt tekniken för att göra sjukdomsmodeller för cystisk fibros, för blodsjukdomen talassemi och även modeller för högt blodtryck och åderförkalkning.



## Tidigare Nobelpris inom forskningsområdet

Årets pris har beröringspunkter med flera tidigare Nobelpris, som belönat forskning om hur arvsmassan är organiserad, hur gener utbyter information med varandra och även de molekylärbiologiska tekniker som möjliggör tillverkningen av specifika DNA-sekvenser.

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

År 1958: **Joshua Lederberg** ”för hans upptäckter rörande genetisk rekombination samt arvsmassans organisation hos bakterier”.

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

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

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

År 2006: **Andrew Fire och Craig Mello** ”för deras upptäckt av RNA-interferens – utsläckning av genes uttryck med dubbelsträngat RNA”.

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

År 1980: **Paul Berg** ”för hans grundläggande arbeten över nukleinsyorns biokemi, särskilt avseende hybrid-DNA” samt **Walter Gilbert och Frederick Sanger** ”för deras insatser rörande bassekvensbestämning i nukleinsyror”.

År 1993: **Kary Mullis och Michael Smith** ”för insatser för metodutvecklingen inom DNA-baserad kemi”, till **Kary Mullis** ”för hans uppfinning av PCR-metoden (Polymerase Chain Reaction)”, och till **Michael Smith** ”för hans grundläggande insatser vid tillkomsten av den oligonukleotidbaserade riktade mutagenesen och dess utveckling för proteinstudier”.

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

**Christer Betsholtz, Bertil Fredholm, Göran K. Hansson, Hans Jörnvall och Nils-Göran Larsson**

Text: **Lotta Fredholm**, vetenskapsjournalist och medicinredaktör på Forskning & Framsteg

Illustrationer: **Bengt Gullbing** och **Annika Röhl**

© 2007 Nobelkommittén för fysiologi eller medicin, Karolinska Institutet, 171 77 Stockholm