



Нобелевская премия по медицине 2007 года

8 октября 2007 г. Нобелевская Ассамблея при Королевском институте в Стокгольме объявила о присуждении Нобелевской премии года по физиологии или медицине пионерам «стрельбы по генам» Марио Капекки, Мартину Эвансу и Oliverу Смитису за открытие «принципов специфической модификации генов у мышей путем использования стволовых клеток». Лауреаты совершили открытия в области эмбриональных стволовых клеток и рекомбинации ДНК у млекопитающих. Их открытия привели к созданию технологии «модификации генов» («gene targeting»), применяемой сегодня почти во всех областях биомедицинских исследований – от фундаментальной науки до разработки новых видов лечения.

Модификацию часто используют для того, чтобы инактивировать конкретный ген. Это называют «нокаутом» гена. С помощью нокаута была выяснена роль многих генов в эмбриональном развитии, физиологии взрослого организма, старении, патогенезе болезней. Более 10000 генов (около половины генома млекопитающих) уже подвергали нокауту. Скоро, наверное, будет изучен нокаут всех известных генов мыши.

С появлением этой технологии стало возможным модифицировать почти любую ДНК в мышином геноме, что позволяет ученым выяснять значение отдельных генов для функционирования здорового организма и развития болезней. Уже получено свыше 500 мышиных моделей различных видов патологии человека, включая сердечно-сосудистые и нервно-дегенеративные заболевания, диабет и рак.

Модификация генов путем гомологичной рекомбинации

Информация о развитии и функционировании организма заложена в ДНК. ДНК упакована в хромосомы, причем в каждой паре хромосом одна наследуется от отца, другая от матери. Внутри пар может происходить обмен участками ДНК между хромосомами — гомологичная рекомбинация. Такой обмен повышает генетическое разнообразие популяции. Этот процесс был открыт в 1958 г. нобелевским лауреатом Дж. Ледербергом. Этот принцип и использовали Марио Капекки и Oliver Смитис для целенаправленной модификации генов.

Капекки показал, что гомологичная рекомбинация может происходить между хромосомой и экзогенной ДНК. Он показал, что с помощью внешней ДНК можно исправлять дефектные гены. Смитис начал с того, что попытался исправить мутантные гены в клетках человека. Он считал, что наследственные болезни крови можно вылечить, исправив болезнетворные мутации в стволовых клетках костного мозга. Работая в этом направлении, Смитис открыл, что эндогенные гены поддаются модификации независимо от их активности. Это означало, что путем гомологичной рекомбинации можно изменить любой ген.

Эмбриональные стволовые клетки — носители зародышевой линии

Капекки и Смитис начинали с клеток, с помощью которых нельзя создать генномодифицированных

животных. Нужен был другой тип клеток, со стволовым потенциалом, только тогда измененная ДНК наследовалась бы.

Мартин Эванс работал с клетками мышиной эмбриональной саркомы, которые как раз обладали свойствами стволовых клеток. Он решил использовать их для введения генетического материала в зародышевую линию мыши. По началу ничего не получалось, т. к. из-за наличия аномальных хромосом клетки не образовывали зародышевую линию. Ища им замену, Эванс обнаружил, что культуры с нормальным числом хромосом можно вывести прямо из ранних эмбрионов мыши. Эти клетки сегодня и называют эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК).

Нужно было показать, что ЭСК способны давать зародышевую линию. Эмбрионам мышей одного генотипа ввели ЭСК другого генотипа. Эти мозаичные эмбрионы, состоящие из клеток двух разных генотипов, имплантировали суррогатным матерям, в организме которых они вызревали. Как оказалось, родившиеся мышата несли гены ЭСК и могли передавать их потомкам по законам Менделя.

Эванс взялся модифицировать гены ЭСК с помощью ретровирусов, т. к. гены ретровирусов встраиваются в хромосомы. Он показал, что ДНК таких ретровирусов переходит из ЭСК в организм мозаичной мыши и дальше наследуется как генетический материал зародышевой линии. Эванс использовал ЭСК для получения мышей, которые несут новый генетический материал.

Две идеи соединились — гомологичная рекомбинация в эмбриональных стволовых клетках

К 1986 г. в наличии было уже все, чтобы приступить к получению генномодифицированных ЭСК. Капекки и Смитис показали, что гены можно подвергать гомологичной рекомбинации в культивируемых клетках, а Эванс указал на ЭСК как на подходящий тип клеточного носителя. Оставалось совместить одно с другим.

Для первых опытов Смитис и Капекки выбрали ген (*hprt*), который было легко выявлять. Он был причиной редкого наследственного заболевания человека (синдрома Леша — Найхена, недостаточности гипоксантин-гуанин-фосфори-

бозилтрансферазы). Капекки усовершенствовал подход к генной модификации и разработал новый удобный метод позитивно-негативной селекции.

Рождение нокаутной мыши — начало новой эры в генетике

Первые публикации об использовании гомологичной рекомбинации в ЭСК для получения генномодифицированных мышей появились в 1989 г. С тех пор число мышиных нокаутных линий растет экспоненциально. Модифицирование генов стало распространенной технологией. Сейчас можно ввести такие мутации, которые будут активироваться в определенное время или в определенных клетках или органах — как в период эмбрионального развития, так и во взрослом состоянии.

Модификация генов помогает понять, что такое здоровье и что такое болезнь

С помощью модификации генов можно изучать любой аспект физиологии млекопитающих. Наблюдается взрыв работ с применением этой технологии. Ее применяют для решения столь большого числа задач, что уже невозможно даже кратко суммировать результаты.

Модификация генов помогла понять роль многих сотен генов в развитии плода млекопитающих. Капекки установил роль генов в развитии органов млекопитающих и всего строения тела. Его работа пролила свет на причины нескольких врожденных уродств человека.

Эванс использовал модификацию генов для моделирования человеческих болезней у мышей. Он разработал несколько моделей кистозного фиброза человека и на них изучил механизмы развития заболевания и испытал эффект генной терапии.

Путем модификации генов Смитис также получил ряд мышиных моделей болезней человека — кистозного фиброза, талассемии, гипертонии и атеросклероза.

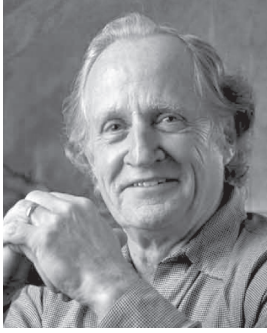
Модификация генов у мышей заполонила все области биомедицинской науки. Влияние этого подхода на понимание функции генов и приносимая им польза человечеству будет расти и расти.

Биографии лауреатов

Марио Капекки (Mario Renato Capecchi). Родился 6.10.1937 г. в Вероне, в семье летчика Лучано Капекки, который погиб вскоре в Ливии, и Люси Рамберг, дочери американской художницы-импрессионистки Люси Д. Рамберг [9]. Во время 2-й мировой войны мать Капекки попала в конц-

лагерь в Дахау. Перед арестом она успела продать все вещи и на вырученные деньги поручила крестьянской семье близ Больцано присматривать за сыном. Через год деньги кончились, и четырехлетний Марио оказался на улице. Несколько лет он жил беспризорником, кочуя из города в го-

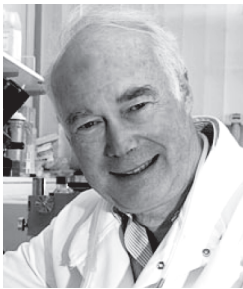
род с группой бездомных детей, чуть не умер от голода. Когда мать освободилась из Дахау, она нашла его, чуть живого, в больнице г. Регио-Эмилия. Мать забрала его в Рим, где он вымылся первый раз за шесть лет. В 1946 г., родственник, работавший в Радиокорпорации Америки,



помог им перебраться в США, где они поселились в Пенсильвании в коммуне квакеров. Здесь Капекки окончил школу. В 1961 г. он получил степень бакалавра по химии и физике, в 1967 г. — степень PhD по биофизике. Диссертацию в Гарвардском университете он выполнял под руководством Джеймса Д. Уотсона. В 1967–1969 гг. Капекки — младший научный сотрудник в том же университете, с 1969 г. — ассистент, с 1971 г. — доцент Отдела биохимии Гарвардской медицинской школы. С 1973 г. он работает в Университете штата Юта [8]. С 1988 г. он также исследователь Медицинского института им. Г. Хьюза [2, 6]. В настоящее время Капекки ведет курс генетики и геномики в Университете им. Дж. Б. Дьюка. Когда было опубликовано сообщение о присуждении Нобелевской премии [11], в Австрии нашлась родная сестра, о судьбе которой он не знал со времен военного детства [13].

М. Капекки приобрел известность благодаря работам по модификации генов в мышинных эмбриональных стволовых клетках, давшим начало многим трансгенным методам, включая клонирование [16]. Он много сделал по изучению генного семейства *Nox* у мышей, которое играет ключевую роль в регуляции эмбрионального развития у всех многоклеточных животных.

Награды: премии Бристоль-Майерс Скивбб (1992), Фонда Герднера (1993), Альберта Ласкера (2001), Альфреда П. Слоуна (Фонд изучения рака Джeneral Моторс) (1994), Киото (1996), Германская Премия по молекулярной биоаналитике (1996), премии Розенблатта (1998), Бакстера (1998), Массри (2002), Вольфа (2002/3), фонда «Марша даймов» (2005) и много других наград. М. Капекки член Национальной академии наук США.

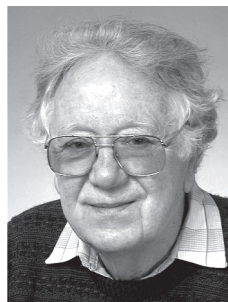


Сэр Мартин Дж. Эванс (Sir Martin John Evans). Родился 01.01.1941 г. в Великобритании, британский подданный [10, 14]. Окончил Christ's College Кембриджского университета. Степень PhD получил в University College London (1969). В 1966–1978 гг. преподаватель кафедры анатомии и эмбриологии в University College London, занимается исследованиями, руководит научной работой студентов и соискателей. В 1978–1999 гг. работает в отделе генетики в Кембриджском университете. С 1999 г. профессор генетики млекопитающих и директор Школы биологических наук, в Кембриджском университете. Женат, имеет дочь и двух сыновей. Жена, Джудит Эванс, медсестра. В связи с присуждением Нобелевской премии, ставшей признанием его исследований в области модификации генов, английская газета «The Independent» назвала Эванса «одним из десяти британцев, изменивших мир».

В 1950 г. приобрел известность благодаря усовершенствованию геле-электрофореза. С 1953 по 1960 г. Смитис работал в Университете Торонто, Канада, а с 1960 по 1988 гг. — ассистентом и профессором генетики и медицинской генетики имени Леона Дж. Коула и Хиллдейла в Университете Висконсина-Медисона, США. С 1988 г. он — Excellence Professor патологии и лабораторной техники Университета Северной Каролины в г. Чэпел-Хилл. Смитис работал также в Институте геномных исследований и политики Университета им. Дьюка.

В 1981 г. он предложил метод выделения из бластоцист мышей и культивировании *in vitro* эмбриональных стволовых клеток [4, 5]. Доступность культивирования этих стволовых клеток позволяла вводить изменения в зародышевые гены и создавать трансгенных мышей. Эвансу и его сотрудникам удалось ввести новый ген в культивируемые эмбриональные стволовые клетки и затем использовать эти генетически трансформированные клетки для создания химерных эмбрионов [1]. У части химерных зародышей генетически измененные стволовые клетки образовывали гаметы, что обеспечивало передачу искусственной мутации потомству этих мышей. Были получены трансгенные мыши с индуцированными мутациями фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (ген *hprt*) [7]. Мутации *hprt* вводились с помощью ретровируса, но авторы высказали уверенность, что, когда научатся делать генетическую рекомбинацию между нормальным геном *hprt* и искусственными последовательностями, добавляемыми в культуру эмбриональных стволовых клеток, «станет возможно вызывать нужные изменения генов путем гомологической рекомбинации с клонированными копиями, модифицированными *in vitro*». Получение трансгенных мышей этим путем было достигнуто в лабораториях О. Смитиса и М. Капекки.

Награды: член Королевского Общества (1993), член-основатель Британской Академии медицинских наук (1998), премии американского благотворительного фонда «Марш даймов» по биологии развития за вклад в изучение эмбриогенеза (вместе с проф. Р. Рарднером из Оксфордского университета) (1999), премия Альберта Ласкера по фундаментальным исследованиям в медицине (с М. Капекки и О. Смитисом) (2001), Почетный доктор Медицинской школы им. Горы Синай, Нью-Йорк, США (2002), рыцарство за службу медицинской науке (2004), почетный доктор Университета г. Бат, Великобритания (2005).



Оливер Смитис (Oliver Smithies). Американский подданный. Родился 23.06.1925 г. в Галлифаксе, Западный Йоркшир, Великобритания [7]. В 1946 г. получил звание бакалавра по химии, в 1951 г. — степень магистра и PhD по биохимии в Оксфордском Balliol College.

Наряду с геле-электрофорезом он разработал генное модифицирование, метод создания мышей с человеческими генами для научно-исследовательских целей.

Одновременно с М. Капекки, но независимо от него пришел к открытию модификации генов и предложил метод гомологической рекомбинации

трансгенной ДНК с геномной ДНК — метод изменения генома млекопитающих, значительно более эффективный, чем применявшиеся ранее [3]. Смитис разрабатывал этот метод в период работы в Висконсинском университете. Смитис внес вклад в изучение кистозного фиброза.

По словам Смитиса, любовь к науке выросла у него из детского увлечения радио и телескопами. Смитис дальтоник, но имеет лицензию частного пилота и владеет тремя самолетами. Его вторая жена, Нобуйо Маэда, — профессор патологии Университета Северной Каролины. В настоящее время Смитис изучает причины артериальной гипертензии у генетически измененных мышей и гемоглобинопатии [12, 15].

Награды: член Академии наук США (1971) и Американской академии искусств и наук (1978), премии Международного фонда им. Гэрднера (1990), Альфреда П. Слоуна (от Фонда Джeneral Моторс), Сиба и Бристоль-Майерс Скивбб, Окамото (от японского Фонда по изучению заболеваний сосудов и приз в один миллион иен на Gion Festival в Японии, 2000); премии Альберта Ласкера (2001, с М. Эвансом и М. Капекки); в США ее называют «американским Нобелем», Массри (2002, с М. Капекки), Вольфа (2003, с М. Капекки и Р.Л. Бринстером), фонда «Марша даймов» (2005, с М. Капекки) и ряд других.

ЛИТЕРАТУРА

- Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines // Nature. — 1984. — Vol. 309, № 5965. — P. 255–256.
- Capecchi M.R. The Making of a Scientist // www.hhmi.org/news/nobel20071008a.html
- Doetschman T., Gregg R.G., Maeda N. et al. Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1989. — Vol. 86, № 22. — P. 8927–8931.
- Evans M., Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature. — 1981. — Vol. 292, № 5819. — P. 154–156.
- Evans M.J. The cultural mouse // Nat. Med. — 2001. — Vol. 7, № 10. — P. 1081–1083.
- Gene Targeting, Homeobox Genes, Development, and Behavior // www.hhmi.org/research/investigators/capecchi.html
- Kuehn M.R., Bradley A., Robertson E.J., Evans M.J. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice // Nature. — 1987. — Vol. 326, № 5819. — P. 295–298.
- Mario Capecchi Laboratory // www.capecchi.genetics.utah.edu/
- Mario Capecchi // www.en.wikipedia.org/wiki/Mario_Capecchi#Life
- Martin Evans // www.en.wikipedia.org/wiki/Martin_Evans
- Nobel Prize 2007 // www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/index.html
- Oliver Smithies's page at University of North Carolina at Chapel Hill // www.pathology.unc.edu/common/smithies.htm
- Popham P. Reunion beckons for Nobel winner and his long lost step-sister / The Independent. — 16 December 2007 // www.news.independent.co.uk/sci_tech/article3070582.ece
- Sir Martin J. Evans' page at Cardiff University // www.cardiff.ac.uk/biosi/research/genetics/staff/evans.html
- Smithies O. A mouse view of hypertension // Hypertension. — 1997. — Vol. 30. — P. 1318–1324.
- Thomas K.R., Deng C., Capecchi M.R. High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors // Mol. Cell. Biol. — 1992. — Vol. 12, № 7. — P. 2919–2923.