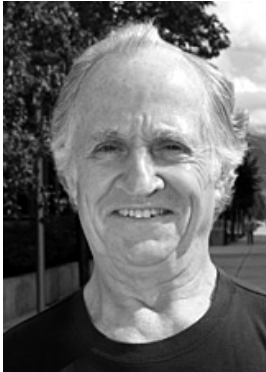


Nobeli auhind füsioloogias ja meditsiinis 2007

Aavo-Valdur Mikelsaar – TÜ üld- ja molekulaarpatoloogia instituut

2007. aastal anti Nobeli auhind füsioloogias ja meditsiinis ühiselt kolmele teadlasele Mario R. Capecchile, Martin J. Evansile ja Oliver Smithiesile nimetuse all „Hiire organismi embrüonaalsete tüvirakkude abil spetsiifiliste geenimodifikatsioonide sisseviimise printsiibid”. Oma töödes ühendasid need kolm teadlast imetajatel embrüonaalsed tüvirakud ja DNA rekombinatsiooni, mis viis äärmiselt võimsa bioloogilise tehnoloogia loomiseni, mida nimetatakse geeni märgistamiseks hiirel (*gene targeting in mice*). Praeguseks on see tehnoloogia jõudnud rakenduseni tegelikult kõigil biomeditsiini aladel, niihästi alusuuringutes kui ka uute ravimeetodite ja ravimite väljatöötamisel.



Mario R. Capecchi

Üksikute individuaalsete geenide rolli organismis saab uurida tõhusalt siis, kui me kas välistame nende toime täiesti või viime funktsioneeriva geeni organismi, kus teda ei ole või ta mingil põhjusel ei tööta. Esimesel juhul nimetatakse selliseid märgistatud geenidega loomi „**knockoutideks**”, teisel juhul **transgeenseteks**. Just selliste organismide loomise põhiprintsiipide loojateks on tänavused Nobeli auhinna laureaadid.

„*Knockout*” eksperimentide abil on juba loodud kümme tuhat hiireliini, kellel on konkreetne indivi-

duaalne geen n-ö välja lülitatud („*knocked out*”). See on võimaldanud paljudel juhtudel selgitada nende rolli embrüonaalses arengus, täiskasvanueas, vananemises ja haiguste tekkes ning arengus. On ilmne, et lähitulevikus luuakse ühiste jõupingutustega sellised hiired kõigi tema geenide suhtes.

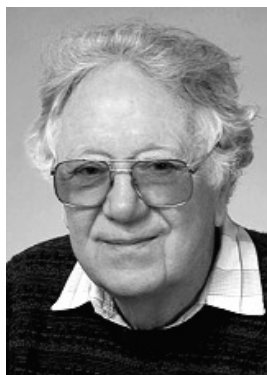
Geenide märgistamine võimaldab luua praktiliselt lõpmatu hulga erinevalt modifitseeritud geenidega katseloomi ja uurida geenide rolli ka mitmesuguste inimese haiguste korral. Juba on loodud üle 500 inimestel esineva haiguse hiiremudeli, haarates kasvaja, suhkurtõve, kardiovaskulaarsed ja neurodegeneratiivsed haigused.

Millised on siis need konkreetsed avastused, mille eest kolmele mehele ühiselt Nobeli auhind anti? Lühidalt öeldes avastasid nimetatud teadlased, et geene saab modifitseerida homologse rekombinatsiooni teel ning embrüonaalsete tüvirakkude abil saab rekombineeritud geenid viia hiire sugurakkudesse ja luua nende abil loomad, kellel see märgistatud (modifitseeritud) geen on kõigis keharakkudes.

Mis on **homoloogne rekombinatsioon**? Homoloogne rekombinatsioon toimub normaalsel viisil imetajate, sealhulgas inimese sugurakkudes I meiotilise jagunemise profaasis isa ja ema homologsete kromosoomide vahel. Äärmiselt täpselt omavahel paardunud üht tüüpi kromosoomid vahetavad homologseid (ühesuguse nukleotiidide järjestusega) DNA järjestusi, mille tulemusena tekivad uued geenivariantide kombinatsioonid ja suureneb populatsiooni geneetiline variaablus. Niihästi Capecchi kui ka Smithies mõtlesid ja töötasid ühes suunas ühe eesmärgiga: kuidas kasutada homologse rekombinatsiooni printsiipi DNA spetsiifiliseks modifitseerimiseks imetajate keharakkudes. Capecchi näitas, et imetajate rakkudes leiab tõepoolest aset homologne rekombinatsioon



Martin J. Evans



Oliver Smithies

sisseviidud DNA ja kromosoomide vahel ning nii saab parandada mutantseid geene. Smithies alustas mutantsete geenide parandamist inimese rakkudes. Eesmärgiks oli teatavate verehaiguste parandamine haigust põhjustavate mutatsioonide korrigeerimise teel, kasutades vereloome tüvirakke. Smithies tegi selle töö juures olulise avastuse, leides, et homologse rekombinatsiooni teel saab mõjustada (märgistada) peaaegu kõiki organismi geene sisseviidava DNA abil, sõltumata nende aktiivsusest.

Mõlemad mehed, Capecchi ja Smithies, kasutasid oma töös imetajate keharakke, mitte sugurakke. Nende tööd näitasid, et keharakkude DNA-d saab modifitseerida homologse rekombinatsiooni teel, geene saab niihästi välja lülitada kui ka uusi DNA järjestusi sisse viia. Meetodika võimaldab konstrueerida mitmesuguste geneetiliste haiguste raviks vajalikke nn DNA *constructe*. Samal ajal aga ei võimaldanud seda tüüpi rakud, mida Capecchi ja Smithies kasutasid, luua märgistatud geenidega loomi.

Selline võimalus avanes tänu töödele, mida tegi Evans hiire tüvirakkudega. Evans töötas alul niisuguse kasvaja uurimisega, mida nimetatakse hiire embrüonaalseks kartsinoomiks (EC). Ta avastas, et selle kasvaja rakud võivad koekultuuris diferentseeruda peaaegu kõigiks erinevateks rakutüüpideks. Evansil oli idee kasutada EC rakke geneetilise info sisseviimiseks hiire sugurakkudesse, kuid takistuseks sai see asjaolu, et EC rakud on kasvajalised ja

kannavad ebanormaalseid kromosoomide, mille tõttu modifitseeritud loomad ei moodustanud normaalseid sugurakke. Edasised muude võimaluste otsingud viisid avastuseni, et kromosomaalselt normaalseid rakukultuure saab valmistada, kasutades allikana hiire mõni päev vana embrüo rakke, mida nimetatakse nüüd embrüonaalseteks tüvirakkudeks (ES, *embryonic stem cells*). Pärast selle avastuse tegemist uuris Evans, kas need embrüonaalsed tüvirakud võiksid osa võtta ka tulevase hiire organismi sugurakkude loomisest, kui neid süstida teise hiire embrüotesse. Katseks kasutati selliseid hiiri, kes nahavärvi poolest omavahel erinesid (näiteks mustad ja valged hiired). Kui nüüd selle idee järgi võeti embrüonaalsed tüvirakud musta värvi hiirelt ja süstiti valget värvi hiire varasesse embrüosse, siis lisandusid doonori rakud retsiipiendi embrüonaalsete tüvirakkude hulka ja sündimise järel tekkisid laigulised musta-valgekirjud mosaiiksed hiired.

Edasi oli vaja uurida, kas embrüo arengu jooksul sattusid ka gonaadidesse doonori rakud ja kas nad võtavad osa sugurakkude moodustumisest. Selleks paaritati mosaiikseid loomi normaalsetega ja tõepoolest õnnestus saada teatav hulk (transgeenseid) järglasi, kes olid omandanud värvigeeni teiselt hiireliinilt. Edasi hakkas Evans geneetiliselt modifitseerima ES rakke enne nende sisseviimist asendus- ehk surrogaatema organismi. Ta kasutas selleks retroviiruseid, mis võimaldavad eksogeenset DNA-d püsivalt n-ö lülitada imetaja kromosoomidesse. Järgnevalt näitas ta, et retroviiruse DNA-d

saab ES rakkude kaudu viia mosaiiksete hiirte iduliini rakkudesse. Niiviisi näitas Evans esimest korda, et ES rakkude abil saab luua modifitseeritud või uute geenidega hiiri. 1985. aastaks oli Capecchi näidanud, et homoloogne rekombinatsioon esineb sagedasti imetajate keharakkudes ja Smithies oli kasutanud homoloogset rekombinatsiooni, et viia plasmiidse DNA järjestus inimese raku kromosoomidesse. Mõlemad mehed olid kuulnud Martin Evansi töödest embrüonaalsete tüvirakkudega ja nad otsustasid temaga kontakti võtta. 1985. aasta lõpp viiski kokku kõik kolm meest (ja 22 aastat hiljem Nobeli auhinnani). Smithiesile tõi tema telefonitsi esitatud palvel Evans (kes on temast 16 aastat noorem) ise embrüonaalsed tüvirakud tema laboratooriumisse ja näitas, kuidas neid kasvatada, aga Capecchi (4 aastat Evansist vanem) omandas selle kogemuse veidi aega hiljem pärast telefoni teel kokkuleppimist Evansi enda juures tema laboris.

Smithies kasutas homoloogset rekombinatsiooni, et korrigeerida mutantset hiire HPRT (hüpoksantiinifosforibosültransferaasi) geeni kultiveeritud embrüonaalsetes tüvirakkudes. (Inimesel põhjustab see geen rasket vaimset mahajäämust, haigust nimega Leschi-Nyhani tõbi.) Geeni parandamine õnnestus ja rakud olid võimelised kasvama selektiivses söötmes, mis nõudis aktiivse HPRT olemasolu. Smithies ja tema kaastöölised kirjutasid oma 1987. aastal Nature's avaldatud artiklis ajaloolise lause: „See valitud geeni modifikatsioon mitmekülgset arenguvõimelistes embrüonaalsetes tüvirakkudes näitab selle meetodi kasutatavust manipuleerimaks imetajate genoomi ettemääratud viisil.” Capecchi ja tema kaastöölised valisid samuti oma algses

töodes embrüonaalsete tüvirakkudega manipuleerimiseks HRPT geeni, kuna selle geeni defektidega rakkude kasvatamiseks olid juba varem olemas standardsed kasvatamismeetodid selektiivsetes söötmetes, mida kasutati hiire hübriidomide loomisel monokloonsete antikehade tootmise eesmärgil. Thomas ja Capecchi avaldasid samal 1987. aastal ajakirjas Cell töö, milles nad näitasid, et neil õnnestus embrüonaalsetes tüvirakkudes HPRT geeni sisse viia neomütsiini resistentsuse geen neo^R , milles tulemusena HRPT kaotas oma ensümaatilise aktiivsuse, aga säilitas sisseviidud neomütsiini geeni aktiivsuse. Ka need autorid kirjutasid oma töös ajaloolise lause: „On loota, et see embrüonaalsete tüvirakkude kui retsipientrakuliini kasutamine kombinatsioonis geeni mürgistamise abil saavutatud lookus-spetsiifilise mutageneesiga annab meetodi, et luua igasuguse soovitud genotüübiga hiiri.” Mõlemad ajaloolised laused olid prohvetlikud.

Mitmes maailma teaduslaboris alustati modifitseeritud geenidega hiirte loomist. Ja juba 1989. aastal ilmusid esimesed tööd, milles kirjeldati homoloogse rekombinatsiooni teel loodud mürgistatud geenidega hiirte saamist. Pärast seda on selliste tööde hulk kasvanud eksponentsiaalselt ja mürgistatud geenidega hiiri kasutatakse peaaegu kõikidel biomeditsiini aladel. Uusi tõhusaid meetodeid on juurde loodud, kuid nii või teisiti põhinevad nad nende kolme mehe epohhiloovatel töödel või on nendest ajendatud. Kõik kolm Nobeli auhinna laureati – Martin J. Evans, Mario R. Capecchi ja Olivier Smithies – töötavad aktiivselt ka praegu. Evans töötab Cardiffi Ülikoolis Inglismaal, Capecchi Utah Ülikoolis ja O. Smithies Põhja-Karoliina Ülikoolis USAs.

Aavo-Valdur.Mikelsaar@ut.ee