

Ulf Landegren, professor, Rudbecklaboratoriet, institutionen för genetik och patologi, Uppsala Universitet

Genteknologier och biobanker förklarar sjukdomsmekanismer

II Förutsättningar för genetiska analyser inom forskning och i sjukvården har förbättrats dramatiskt under senare år. Vi har omfattande, nästan totala kunskaper om människans arvs-massa, om de gener som där finns kodifierade samt om genetisk variation mellan olika människor. Vidare påvisas i snabb takt genetiska faktorer av diagnostiskt värde vid olika sjukdomar. Slutligen förbättras analysmetoder snabbt så att allt större antal genetiska faktorer kan undersökas till lägre kostnader [1].

Storskaliga genetiska undersökningar av insamlat patientmaterial – biobanker – får därför ökad aktualitet för att förklara sjukdomsmekanismer och möjliggöra förbättrad diagnostik och terapi. Det blir också i ökande grad möjligt att erbjuda genetiska analyser till patienter, till exempel för att förutsäga sjukdomsrisker eller för att välja individanpassad terapi.

Ökande insikter i genetiska riskfaktorer i förening med förbättrade tekniker har redan möjliggjort ett allt mer omfattande utnyttjande av DNA-diagnostik inom kliniska specialiteter såsom internmedicin, pediatrik, transplantationsmedicin, infektionssjukvård och rättsmedicin. Det så kallade cancer-genomanatomiprojektet (CGAP), som har lanserats av nationella cancerinstitutet i USA, har som ett viktigt syfte att etablera molekylära kriterier vid tumördiagnostik och kommer att få viktiga konsekvenser inom onkologi. Nedan beskrivs kort olika typer av metoder som utnyttjas för genanalyser samt insamlandet av patientmaterial i form av biobanker för dessa studier.

Former för genanalyser

Genetiska analyser kan vara inriktade på enstaka sekvensförändringar eller mer globala effekter på kromosomnivå; de kan syfta till att påvisa en individs genetiska förutsättningar eller undersöka hur generna utnyttjas i en viss vävnad vid en given tidpunkt. I situationer där en viss gen kan antas vara förändrad på grund av de symtom patienten uppvisar, men då mutationens natur är okänd, söks genen igenom förutsättningslöst genom resekvensning varvid eventuella avvikelser från normalsekvensen kan påvisas.

I många fall finns det varianter av gener med kända effekter på till exempel läkemedelsmetabolism, eller som man vet kan orsaka sjukdom. I dessa fall talar man om att man »genotyper« patienten med avseende på dessa kända sekvensvarianter. Den vanligaste typen av sekvensvariation mellan olika versioner av människans arvs massa gäller utbyten av en-

Tema: Genetisk populationscreening

staka nukleotider. Sådana singelnukleotidpolymorfismer (SNP) är också lovande som redskap för kartläggning av sjukdomar i större patientpopulationer [2].

Det blir också allt vanligare att undersöka i vilken mån gener kommer till uttryck i olika vävnader genom genexpressionsanalys. Detta kan ge värdefulla insikter i pågående sjukdomsprocesser i en vävnad och ge underlag för en finare diagnostik av tumörsjukdomar.

Den genetiska rutinscreeningen av nyfödda som görs i landet utförs helt på proteinnivå, vilket har den fördelen att man därvid värderar om de berörda proteinernas funktioner är påverkade av mutationer utan att först behöva söka efter eventuella mutationer på DNA-nivå, och därefter försöka leda i bevis huruvida sådana sekvensavvikelser kan orsaka sjukdom. Betydelsen av studier på proteinnivå kommer att öka kraftigt i och med att förfinade analysmetoder utvecklas, samtidigt som kunskaperna om de individuella proteinernas funktioner expanderar.

Diagnostiska teknologier

Rutindiagnostik av mänskliga gener blev för första gången möjlig i och med utvecklandet av Southern blot-tekniken i mitten av 1970-talet. Möjligheterna förbättrades på ett dramatiskt sätt tio år senare med utvecklandet av polymeraskedjereaktionen (PCR), som tillgodoser de höga krav på specificitet och känslighet som behövs för att effektivt kunna studera enskilda DNA-sekvenser bland de 13 miljarder nukleotider som bygger upp arvs massan i var och en av våra celler.

Sedan mitten av 1990-talet utförs allt fler genetiska analyser med hjälp av DNA-mikroarrays [3]. På dessa ytor finns stora antal DNA-hybridiseringsprober utplacerade i ett mikroskopiskt mönster. Genom att tillsätta DNA- eller RNA-molekyler från patientprov till sådana ytor kan proverna undersökas med avseende på många olika gensekvenser samtidigt. Bland genetiska test som anpassats till DNA-mikroarrayformat märks resekvensning, genotypning och mätningar av genexpression samt undersökningar av förlust eller ökning av antal kopior av genetiska regioner, till exempel vid tumör-



I Sverige, som har unika förutsättningar för att upprätta biobanker, finns uppskattningsvis cirka 80 miljoner prover med insamlad patientmaterial. Biobankerna gör det möjligt att utnyttja proverna för framtida forskning.

sjukdomar, genom komparativ genomhybridisering.

Under senare år har tekniker för genotypning kommit att bli lite av en svensk specialitet, genom att flera metoder att undersöka kända genetiska varianter har utvecklats av forskare verksamma i landet, till exempel metoder som oligonukleotidligeringstesten, minisekvensning, hänglåsprober, pyrosekvensning, dynamisk allelspecifik hybridisering och Light-Up-prober. Vi kan se fram mot en fortsatt utveckling mot allt effektivare metoder att undersöka stora antal gensekvenser i minimala DNA-prover.

Allt bättre och effektivare metoder utvecklas också för att undersöka de proteiner som generna kodar för, vanligen genom någon form av elektroforetisk separation följt av identifikation med hjälp av masspektrometri. Databaser har upprättats där de förväntade masspektrometriska mönstren för givna proteiner listas. På så sätt är det möjligt att identifiera proteiner vilkas uttrycksnivå förefaller avvika på ett intressant sätt i patientprov. Starkt förbättrade metoder blir också tillgängliga för att undersöka specifika proteiner, till exempel för att studera i hur många kopior de föreligger, vilka modifieringar de undergått, var de är belägna i ett vävnadsprov samt vilka andra proteiner de interagerar med.

Biobanker

Förutsättningarna är alltså goda för att kombinera de snabbt ökande kunskaperna om de komponenter som bygger upp våra celler, med allt effektivare metoder att studera dessa för att belysa viktiga biologiska frågor. I många fall väljer man att utföra dessa studier på modellorganismer, som till exempel jäst, rundmask, bananflugor eller mus, vilket ger utmärkta möjligheter att på ett riktat sätt undersöka biologiska processer genom genetiska eller andra experimentella modifieringar.

Emellertid kommer det också vara av stort värde att utföra studier i insamlad material av mänsklig vävnad för att påvisa faktorer av betydelse vid specifika sjukdomar eller som styr specifikt mänskliga egenskaper. Det är därför angeläget att planera för effektiva biobanker där provmaterial omhändertas, förvaras och görs tillgängligt för forskningen. Genom att etablera sådana biobanker kan forskningsresurser tillvaratas mer effektivt, prover blir tillgängliga för framtida studier och kunskaper om enskilda prover ackumuleras, vilket ökar värdet av påföljande studier.

Det är dock inte okomplicerat att arrangera insättningar och uttag i biobanker, eftersom insamlandet måste anpassas till forskning som kommer att utföras i framtiden. Inför varje uttag bör man betänka att man troligen vid en senare tidpunkt skulle kunna studera samma fråga genom en mer riktad frågeställning, och därvid förbruka en mindre mängd av det insamlade provet. Prover som ska analyseras med avseende på DNA- och RNA-sekvenser måste innehålla kärnförande celler. Proteinanalyser kan utföras från en mängd vävnader och kroppsvätskor, men liksom för RNA-analyser är det naturligtvis en förutsättning att genprodukten uttrycks i den aktuella vävnaden, och det är viktigt att prover tas om hand så att de skyddas mot nedbrytning. Det är också möjligt att samla in och förvara patientceller på sådant sätt att det är möjligt att anpassa dem för vävnadsodling, vilket kan möjliggöra kvalificerade funktionella analyser och ge i princip obegränsad tillgång till till exempel DNA.

Sverige har utmärkta, i vissa fall unika förutsättningar att upprätta och utnyttja biobanker av patientmaterial. Aspekter som underlättar insamlandet av kvalificerade biobanker i Sverige inkluderar följande:

- Det är en fördel ur genetisk forskningssynvinkel att delar av Sverige grundats av ett begränsat antal individer. Det är också viktigt att befolkningsunderlaget har en viss omfattning för att möjliggöra studier av ovanliga sjukdomar.
- Utnyttjandet av personnummer, kyrkoböcker och andra register kan göra det möjligt att belysa släktskapsförhållanden.
- En hög sjukvårdsstandard ökar förutsättningarna för att patienter diagnostiseras korrekt, och olika hälso- och sjukvårdsregister är en viktig resurs som i kombination med födelsenummer kan tillåta samutnyttjande av olika patientregister.
- Det föreligger redan en mycket stor mängd insamlade prover och befolkningen kan sägas ha en positiv grundattityd till att lämna prover och hälsouppgifter för att bidra till forskningen. Detta är en central förutsättning för etablerande av biobanker, och det understryker nödvändigheten av att etiska och legala aspekter beaktas [4].

Sammanfattningsvis kan man säga att kombinationen av detaljerade kunskaper om biomolekyler, speciellt om deras roll i olika sjukdomsprocesser, i förening med kraftfulla metoder för DNA, RNA och proteinanalyser och riklig tillgång till välkarakteriserat patientmaterial, kommer att ge värdefulla förutsättningar för att förstå biologiska processer och att påvisa patofysiologiska mekanismer. Därmed kan möjligheterna radikalt förbättras för att diagnostisera sjukdom och att utveckla läkemedelsterapier.

Referenser

1. Sander C. Genomic medicine and the future of health care. *Science* 2000;287:1977-8.
2. Kwok PY, Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol Med Today* 1999;5:538-43.
3. Lander ES. Array of hope. *Nat Genet* 1999;21(1 Suppl):3-4.
4. Hansson MG, editor. *The use of human biobanks. Ethical, social, economical and legal aspects.* Uppsala: Uppsala Universitet; 2001.