



# Den nya biologin – inte längre science fiction

Text och ill: Erik Bongcam-Rudloff,  
Institutionen för husdjursgenetik, SLU och  
Institutionen för immunologi, genetik och patologi,  
Uppsala universitetet.

*Biologisk forskning genomgår nu en revolution motsvarande den Internet genomgått under de senaste tio åren.*

Ny storskalig sekvenseringsteknologi har revolutionerat biomedicinsk forskning och har expanderat till många nya forskningsfält. Den nya storskaliga sekvensteknologin ger bland annat forskarna möjlighet att förstå arvsmassans betydelse för sjukdomars uppkomst hos djur, växter och människa. Frågor kan ställas på helt nya sätt med mer storskaliga metoder. Teknologin gör det till exempel möjligt att kartlägga alla bakterier i tarmen på en ko ("mikrobiomet") och se vilka skillnader i mikrobiomet som gör att en ko får en viss sjukdom och en annan inte. Metoderna gör det möjligt att studera hur olika bakterier, som är inblandade vid uppkomsten av sjukdomar, anpassar sig för att undvika kons immunförsvar.

Snabba metoder för att kartlägga DNA Enkelt uttryckt är den nya storskaliga sekvens-teknologin, som ofta kallas "Next Generation Sequencing" (NGS), en samling av nya avancerade, snabba och billiga metoder för att sekvensera nukleotider. Till exempel har NGS använts för att sekvensa flera nya genom, alltså kartlägga en organisms hela arvs massa. När man för några decennier sedan började sekvensera genom tog detta oftast flera år. En första kartläggning av människans genom tog till exempel cirka tio år

till en kostnad av många hundra miljoner kronor. Med nuvarande NGS-metoder kan samma arbete göras på någon vecka och kostar endast några tiotusental kronor. Forskarna räknar med att inom kort kunna sekvensera en människas genom på en dag till en kostnad under 10 000 kronor.

## Kraftfullt verktyg för livsvetenskap

Tack vare genomsekvensering ges nya möjligheter att studera olika livsvetenskapliga problem i intressanta organismer, från virus och bakterier och vidare i utvecklingskedjan; växter, fiskar, människa och andra däggdjur. Evolutionsbiologerna har fått ett synnerligen kraftfullt verktyg till sitt förfogande.

1. Den här teknologin ger bland annat forskarna möjlighet att förstå arvs massans betydelse för uppkomst av olika folksjukdomar. Frågor kan ställas på nya sätt när man har tillgång till mer storskaliga metoder.

2. Teknologin gör det möjligt att kartlägga arvs massan även för utdöda arter och vi kan få svar på frågor som vi bara kunnat fantisera om. Forskargrupper har kunnat läsa arvs massan på neanderthalmänniskan och den utdöda mammuten. Många frågor som rör folkvandringar, kulturella gåtor och andra ämnen som förr bara diskuterats av historieforskare eller paleontologer kan numera få svar med hjälp av biologiska analysmetoder.

3. Det kan också handla om att katalogisera alla

DNA-förändringar i en cancercell. De senaste åren har forskare hittat en rad olika regioner i arvsmassan som ökar risken för olika folksjukdomar såsom cancer, diabetes, fetma och autoimmuna sjukdomar. Dessa regioner har identifierats med så kallade Single Nucleotide Polymorfism (SNP)-chips. Kunskap inom detta område kan leda till nya typer av diagnostik och även nya läkemedel och vacciner.

### Stora datamängder

Eftersom mycket stora datamängder genereras vid sådana studier krävs det helt nya lösningar för att kunna hantera och analysera all data som produceras. Detta har gjort att biologerna blivit mer och mer beroende av datorvetenskapliga metoder och att de numera är stordatoranvändare av samma magnitud som partikelfysikerna vid CERN.

### Traditionella vetenskapsgränser rivs

De flesta biologiska forskningsprojekt innebär nu samarbete över de traditionella vetenskapsgränserna. Vetenskapsövergripande metoder behövs för att förstå till exempel hur man kan lösa aktuella problem som klimatförändringar, hur vi kan producera mer mat med bättre näringsinnehåll eller hur vi kan lösa problemet med att fler och fler sjukdomsalstrande bakterier blir resistenta mot antibiotika. För att lösa liknande problem bildar forskare inom många områden som humanmedicin, husdjurshälsa, växtförädling och datavetenskap internationella nätverk som spränger gamla gränser mellan vetenskapliga discipliner. Ett exempel är det nystartade COST Action nätverket "Next Generation Sequencing data analysis network".

### Ny teknik – nya områden

Det är inte bara i livsvetenskaperna som de nya teknikerna att snabbt sekvensera DNA öppnar nya spännande möjligheter. Det finns många nya applikationer för dessa tekniker. Några tillämpningar är:

"European Cooperation in Science and Technology", COST:

- ett av de äldsta ramverken för forskningsstöd i Europa
- syftar till att bygga ett europeiskt nätverk för analys av data som genereras med hjälp av den nya storskaliga sekvensteknologi som vuxit fram under 2000-talet ([www.seqahed.org](http://www.seqahed.org)).
- består av forskargrupper från 16 länder, däribland fyra svenska. Där ingår Sveriges Lantbruksuniversitet, "Science for Life Laboratory" i Uppsala och Stockholm, Linköpings universitet samt Uppsala universitet med UPPMAX/UPPNEX som är ett nationellt resurscentrum för storskaliga beräkningar och lagring av sekvensdata.

### Medicin

- Skapa metoder för förbättrad diagnos av olika sjukdomar.
- Ta fram tekniker för tidig upptäckt av predisposition för olika sjukdomar (se exempel på detta i [www.23andme.com](http://www.23andme.com)).
- Utveckla farmakogenomik som leder till personanpassade läkemedel och rationell läkemedelsdesign.
- Matcha organ med mottagande patient vid organtransplantationer.

### Lantbruk

- Ta fram sjukdoms-, insekts- och torkresistenta växter.
- Åstadkomma friskare, mer produktiva och sjukdomsresistenta husdjur.
- Ta fram bättre och näringsrikare livsmedel.
- Ersätta kemikalier med biologiska bekämpningsmedel.
- Utveckla tester för att kunna avgöra olika livsmedels ursprung, till exempel vin, kött och kaviar.

### Miljö

- Utveckla nya energikällor (biofuels) utifrån kunskaper om växters genetik.
- Nya metoder att detektera miljöföroreningar kan utvecklas genom att skapa biologiska detektorer.
- Bättre sätt att miljösanera. Många projekt pågår redan där man studerar hur vi kan använda bakterier för att sanera områden kontaminerade med farliga kemikalier eller föroreningar som uppstått vid till exempel gruvdrift.

### Historia

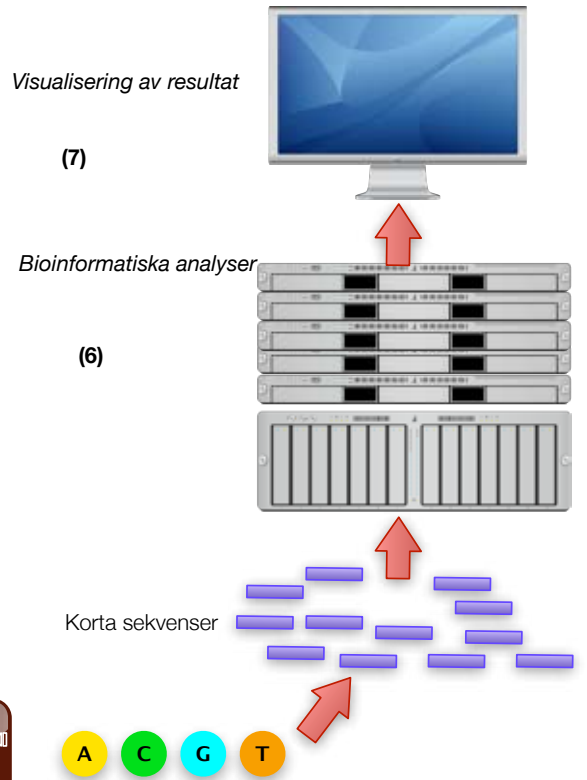
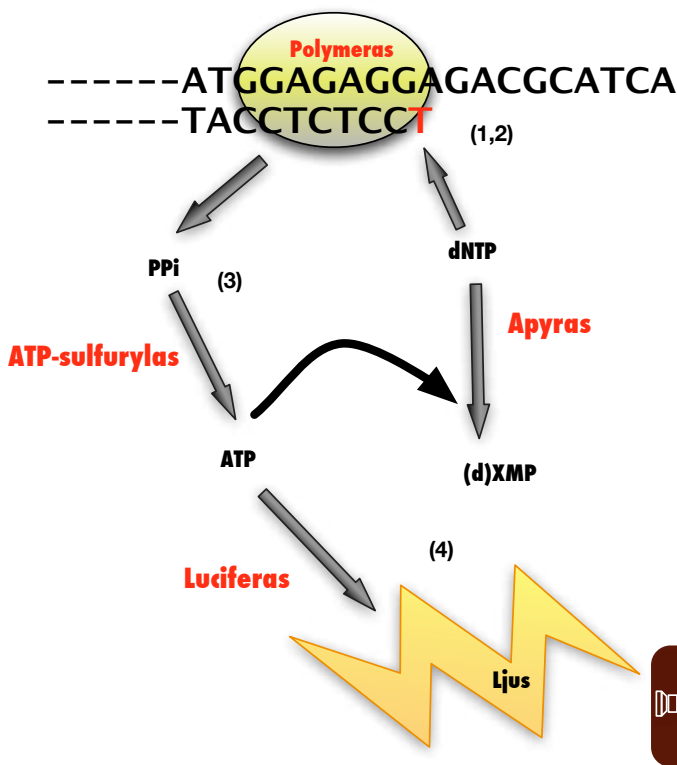
- Utveckling av metoder för att förstå hur evolutionen gått till.
- Studier av folkvandringar och olika folkslags ursprung.

På [www.bioresurs.uu.se](http://www.bioresurs.uu.se) under Bi-lagan 3 2011 finns länkar till mer information om dessa spännande tekniker.

### Koppling till styrdokumentet för gymnasiet

Några exempel från det centrala innehållet i biologikurserna på gymnasiet som är relevant för innehållet i artikeln:

Kursen Biologi 1 handlar bland annat om "Genetikens användningsområden. Möjligheter, risker och etiska frågor". Biologi 2 innehåller exempelvis punkterna "Evolutionärt perspektiv på molekylärbiologi", "Cell- och molekylärbiologins användningsområden" och "Användning av genetiska data för studier av biologiska sammanhang". Dessutom finns kursen Bioteknik, som ger många möjligheter att arbeta vidare med det som artikeln berör.



## Pyrosequencing

– en metod för sekvensering

En teknik som används i en variant av storskalig sekvensering är pyrosequencing. Denna teknik utvecklades i mitten av 1990-talet av forskare på Kungliga Tekniska Högskolan, KTH i Stockholm, bland andra professor Pål Nyrén. Tekniken är nu licensierad till företaget Roche som producerar de maskiner som används vid pyrosequencing (454-maskinerna).

Metoden har använts för att sekvensera exempelvis DNA från mammut och neanderthalmänniska. När den vetenskapliga tidskriften Science år 2006 publicerade sin lista med de största vetenskapliga upptäckterna under året var pyrosequencing nummer två. Det specifika projekt som uppmärksammades var kartläggningen av DNA hos neanderthalmänniska som genomfördes av den svenske forskaren Svante Pääbo.

Figuren visar en förenklad bild av hur pyrosekvensering går till. Vid sekvenseringen tar man reda på i vilken ordning nukleotiderna finns i en DNA-sträng. Tre enzym används vid reaktionerna: sulfurylas från jäst, luciferas från eldfluga och apyras från potatis.

1, 2. Överst syns det enkelsträngade DNA-fragmentet som man vill sekvensera. Pyrosequencingreaktionen börjar med att en primer binds komplementärt till denna DNA-sträng. Primern fungerar som startsekvens och komplementära nukleotider byggs efterhand på i en växande kedja med hjälp av enzymet DNA-polymeras. Resultatet blir en DNA-sträng som är komplementär till den ursprungliga DNA-strängen.

En första deoxyribonukleotidtrifosfat (dNTP) sätts till – en av A, T, C eller G. DNA-polymeras katalyserar bindningen av molekylen till DNA-fragmentet om den är komplementär till den nukleotid som står på tur i DNA-fragmentet. Varje gång som en eller flera nukleotid(er) binds till DNA-strängen frigörs difosfat (= pyrofosfat,  $\text{PPi}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ) i motsvarande molförhållande.

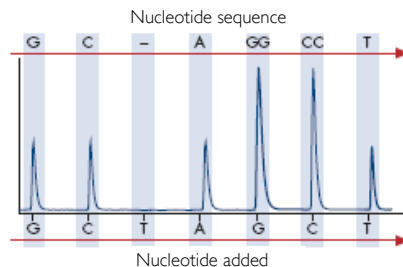
3. Ett enzym (ATP- sulfurylas) omvandlar det frigjorda py-

rofosfatet (och ett ämne som kallas adenosine 5' fosfosulfat, APS) till ATP.

4. ATP är en energirik molekyl som används av enzymet luciferas för att omvandla luciferin till oxyluciferin. Reaktionen frigör energi i form av synligt ljus. Fenomenet kallas bioluminescens.

Ett enzym (apyras) bryter kontinuerligt ner ATP och nukleotider som inte bundits till DNA-strängen till (d)XMP. Det är nödvändigt att nedbrytningen görs innan en ny nukleotid sätts till.

5. Ljussignalen mäts med en enkel kamera som omvandlar optiskt ljus till elektriska signaler och resultatet syns som toppar i ett diagram. Eftersom man vet viken nukleotid som satts till och om den bundits till DNA-sekvensen kan man avgöra ordningen på nukleotiderna. Höjden på en topp i diagrammet visar om det är en eller flera nukleotider av samma slag som bundits in samtidigt. Diagrammet kan därmed översättas till en sekvens av DNA-baser.



Figur från [www.pyrosequencing.com](http://www.pyrosequencing.com). Här finns också en informationsfilm som beskriver tekniken, välj "Technology" i vänstermarginalen.

6. Den nya tekniken producerar miljontals sekvenser på mycket kort tid, data som måste analyseras och lagras i kraftfulla datasystem.

7. Efter digital lagring är nästa steg att producera resultat användbara för forskare inom olika livsvetenskaper. Här används speciella bioinformatiska metoder och verktyg för analys och visualisering.

## Alexanders sjukdom – en monogen avvikelse

Många sjukdomar orsakas av mutationer i en gen, antingen i själva den kodande sekvensen eller i de regulatoriska sekvenser som styr hur mycket och när genen uttrycks. De avvikelser som beror på en enda gen kallas monogena avvikelser. Ett stort antal sådana avvikelser är kända, men de flesta är mycket ovanliga.

### Alexanders sjukdom

Alexanders sjukdom är en allvarlig fortskridande hjärnsjukdom som främst drabbar småbarn. Den vita substansen i hjärnan (myelinet) förändras genom en kraftig inlagring av proteiner i storhjärnans stödjeceller (gliacellerna) med en bildning av så kallade Rosenthalfibrer. Under lång tid har förekomsten av Rosenthalfibrer använts för att bekräfta diagnosen. (Myelin är den vävnad som omger och isolerar alla nervtrådar.)

Sjukdomen orsakas av en mutation i GFAP-genen (glial fibrillary acidic protein). Genen finns på den långa armen av kromosom 17. Mutationen gör att hjärnans stödjeceller, gliacellerna, fungerar sämre på grund av den kraftiga bildningen och inlagringen av en defekt variant av GFAP. Detta leder till att gliacellerna inte klarar att stödja hjärnans nervceller och myelinet. Vanliga mutationer som ger upphov till sjukdomen är att aminosyran R i position 79 har bytts ut mot C, H eller G och/eller att aminosyran R i position 239 har ändrats till aminosyror H eller C.

Övningsuppgiften går ut på att analysera proteinsekvenserna från fem patienter (1-5) och jämföra med den vanliga icke muterade varianten (A) för att se om någon av patienterna bär på en mutation i GFAP-genen. Övningen i sin helhet, inklusive de sex DNA-sekvenserna som behövs till uppgiften, finns på Bioresurs webbplats (se Tema Bioteknik, gymnasiet eller i anslutning till Bi-lagan 1 2011).

Uppgiften kan genomföras med hjälp av verktyg på olika webbsidor exempelvis:

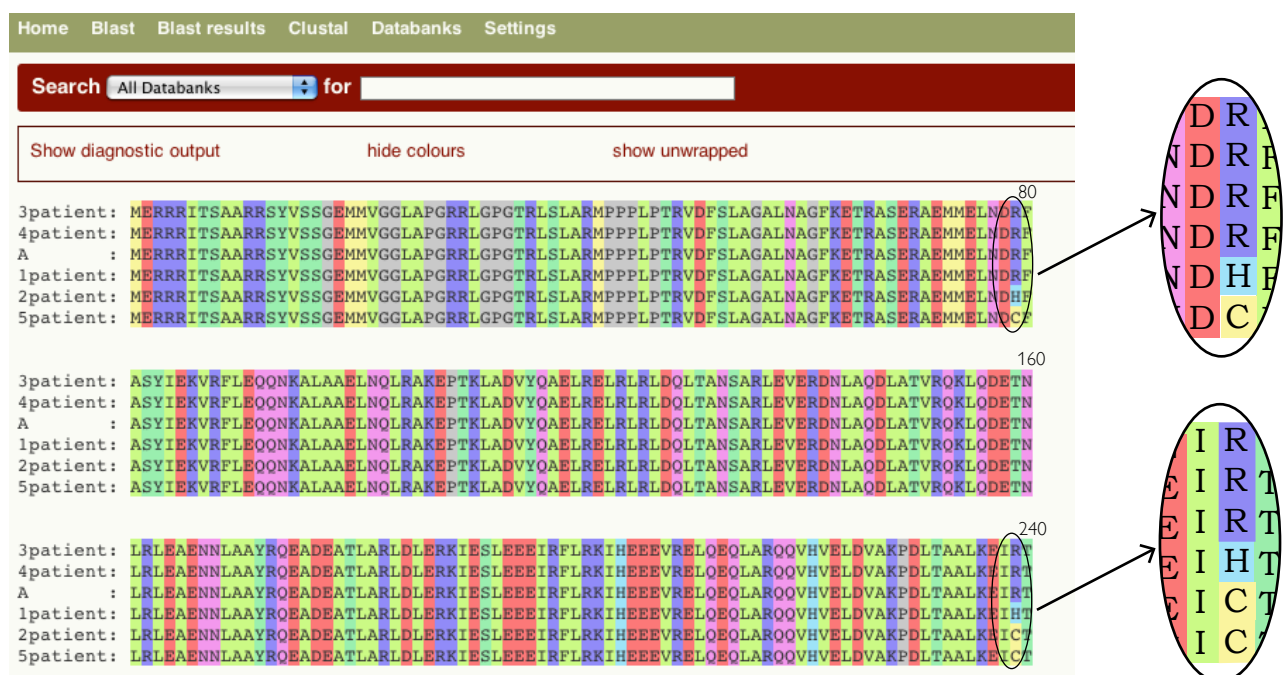
<http://ebiokit.hgen.slu.se/mrs>

<http://mrs.cmbi.ru.nl/mrs-web/>

Sekvenseringen görs på DNA men i uppgiften har sekvenserna översatts till proteiner för enkelhets skull. I övningen används ClustalW, ett av de mest vanliga bioinformatiska verktygen för jämförelser av DNA- och proteinsekvenser.

På startsidan väljs flicken Clustal högst upp på sidan. En ny sida öppnas med en tom ruta där alla sex DNA-sekvenserna ska klistras in samtidigt. Ändra inte några parametrar på sidan. Tryck sedan på Run ClustalW. Resultatet bör se ut som i figuren nedan (tryck på show wrapped för bättre översikt). Vilken/vilka av patienterna bär på en mutation som kan orsaka Alexanders sjukdom? (Se svar nedan.)

Övningen har utarbetats av Erik Bongcam-Rudloff, Institutionen för husdjursgenetik, SLU och Institutionen för immunologi, genetik och patologi, Uppsala universitetet. Den anknyter till föregående artikel.



Med hjälp av gratisprogrammet ClustalW jämförs aminosyrasekvenser från flera patienter. Denna procedur kallas alignment. Figuren visar att patienterna 1,2,5 har mutationer relaterade till Alexanders sjukdom, se uppförstorade partier till höger.