

Databaserade analyser av proteinstrukturer, proteininteraktioner och proteiners cellulära och subcellulära funktioner får en central roll i den postgenoma eran. »Med lätthanterliga interaktiva visualiseringsmjukvaror kan man skapa den överblick som krävs för att dra långtgående biologiska slutsatser redan vid dataskärmen», säger professor Stefan Ståhl.

I HUGOs kölvatten

Kartläggning av proteinerna blir den verkliga utmaningen

Efter kartläggningen av människans arvsmassa står den verkliga utmaningen för dörren: att försöka förstå genprodukternas, proteinernas, funktioner och interaktioner med varandra.

Den postgenoma eran är här och i den har även svenska forskargrupper goda möjligheter att placera sig i forskningens frontlinje.

TEXT

PETER ÖRN

Redan i juni i år kommer sekvensbestämningen av hela det mänskliga genomet att vara klar i grova drag, uppgav chefen för US National Human Genome Research Institute, Francis Collins, i slutet av mars.

Men kartläggningen av arvsmassan innebär inte att människan som biologisk varelse har blivit så mycket mer begriplig än vad den var 1990, det år då human genome project, HUGO, officiellt inleddes. HUGO har gett en grov karta över kroppens biologiska styrsystem. Fortfarande fungerar liknelsen »som att hänga en mikrofon över jorden, lyssna på alla språk och utifrån dessa försöka förstå hur samhällena fungerar».

Den stora utmaningen blir att kartlägga proteinernas strukturer, funktioner och interaktioner med varandra i de celler och vävnader där de förekommer naturligt. Med utgångspunkt från att det kanske finns mellan 100 000 och 140 000 gener, och varje gen kan ge upphov till flera sorters proteiner, handlar det om ett gigantiskt projekt.

Det är frågan om en helt ny vetenskaplig disciplin, som av det internationella forskarsamfundet också har fått sin egen benämning: proteomics. I Sverige kallas den i bland även för funktionsgenomik.

Medan genomforskarna sadlar om från gensekvensering till att söka genetisk variabilitet och liknande, lämnar

många proteinforskare nu grundforskningen kring enskilda proteiner för att i den postgenoma eran studera de komplexa sammanhangen.

Svensk forskning i frontlinjen

HUGO tarvade en enorm ekonomisk uppbackning under en intensiv och relativt kort tidsperiod, vilket gav inte minst amerikanska forskargrupper ett stort försprång. Proteomfasen är betydligt mer långsiktig. Ett tidsintervall som ibland nämns är 50 år från nu. Det handlar om en stadigt uppåtgående kunskapskurva och för svenska forskargrupper ger det bättre förutsättningar att lägga sig i forskningens frontlinje än vad HUGO gav.

En av de satsningar som redan kommit till stånd är ett nationellt forskningsprogram kallat Cell factory for functional genomics. I programmet, som finansieras av Stiftelsen för strategisk forskning, ingår ett nätverk av forskargrupper i hela Sverige. Varje år antas ett tiotal nya doktorander till programmet som ska pågå fram till år 2002.

I styrelsen för Cell factory for functional genomics finns representanter från såväl industrin som akademien. Koordinator är Stefan Ståhl, professor i molekylär bioteknik på institutionen för bioteknik, Kungliga Tekniska högskolan i Stockholm.

– HUGO var en sådan gigantisk satsning att Sverige aldrig kunde bli någon huvudspelar, även om också vi har byggt upp egna genomcentra.

– I fråga om proteomics har vi definitivt en möjlighet att vara med; det handlar ju inte minst om att hitta måltavlor för nya läkemedel och det är lättare att rikta in sig på specifika projekt än vad det var inom HUGO. Det passar svenska forskargrupper, säger Stefan Ståhl.

Otillräcklig teknik

Den mycket stora informationsbank som genomprojektet bidragit till har tillsammans med förbättrad teknologi, inte minst inom masspektrometri, lett till att takten på proteinidentifiering accelererat dramatiskt.

Idag kan forskarna göra den första grova karakteriseringen av ett 100-tal proteiner per vecka, medan det för tio år sedan tog ett år att identifiera två till tre olika proteiner.

Men fortfarande är kunskapsluckorna stora.

– Jag har själv arbetat en hel del med vaccinforskning, och det är ett exempel på områden där genomprojektet ännu inte bidragit till att öka förståelsen speciellt mycket. I dag känner vi bara till ett fåtal av de proteiner en parasit som exempelvis malaria uttrycker, säger Stefan Ståhl.

– Vi famlar fortfarande i mörker och jag tror att vi i framtiden kommer att se tillbaka på den här tiden som en tid då vi i stort sett fortfarande inte visste något om proteiner.

Trots en markant teknikutveckling är den i många avseenden otillräcklig för den postgenoma fasen. Inom proteomics handlar det om att snabbt och med hög känslighet identifiera när, hur och var gener uttrycks, och proteinerna aktiveras såväl cellulärt som subcellulärt.

Enligt vissa bedömare befinner sig tekniken för proteomics på samma nivå som sekvenseringstekniken för genomet befann sig 1986, då idén om HUGO för första gången väcktes.

Klarar inte membranproteiner

Den kanske mest använda tekniken för närvarande för att separera enskilda proteiner ur ett proteinkomplex är tvådimensionell gelelektrofores, 2-DE.

Men begränsningarna är uppenbara; förutom att den är en ren in vitro-teknik som inte ger svar på proteiners egenskaper i den naturliga miljön så fungerar separationen inte för de kanske intressantaste proteinerna ur läkemedelsindustrins synvinkel: membranproteinerna. Dessa utgör sannolikt uppemot 25 procent av de proteiner som är kända idag.

En annan teknik är att använda sk transcriptomics: mRNA, dvs steget mellan genexpression och proteinsyntes, identifieras i en given tid och på en given plats i organismen. Transcriptomics kräver en förhållandevis enklare teknik och kartläggningen kan därför utföras med ganska hög effektivitet.

Men ett mRNA kan ge upphov till flera proteiner, på så sätt att vissa proteiner modifieras även efter det att de överförs från genen via mRNA.

Transcriptomics är därför mest användbart för att ta fram information om när och var en specifik gen uttrycks, även om transcriptomicsteknikerna kommer att vara ett värdefullt stöd för proteomicsforskarna.

Ett tredje sätt är att använda sk in

situ-hybridisering, då man med hjälp av en probe kan bilda sig en uppfattning om proteiners vävnadsspecificitet. Där emot ger tekniken inget svar på hur eller när en gen kodar för ett specifikt protein, eller var proteinet utövar sin funktion subcellulärt.

Medvetna finansierare

Svenska forskningsfinansierare är inte främmande för behovet av förbättrad teknik. Exempelvis så beslutade Knut och Alice Wallenbergs stiftelse i mars i år att satsa 800 miljoner kronor fördelade på fem år, till bland annat utveckling av teknologiplattformar inom området postgenomforskning.

Totalt har Knut och Alice Wallenbergs stiftelse bidragit med omkring 1 miljard kronor till forskning kring genomets funktion, pengar som fördelats till två forskarkonsortier som innefattar universitet i hela landet.

Även det av Stiftelsen för strategisk forskning finansierade forskningsprogrammet Cell factory for functional genomics premierar forskargrupper som i första hand satsar på att utveckla nya teknologier.

– Ett nytt forskningsfält kan inte utvecklas innan man har de rätta teknologierna, i annat fall fortsätter man att arbeta på sina traditionella sätt. Därför försöker vi i första hand stödja projekt där målsättningen är att ta fram generellt användbara teknikplattformar i stället för projekt som syftar till att studera specifika proteiner, säger Stefan Ståhl.

Stefan Ståhl sitter också med i en av NUTEKs styrgrupper, som fördelar medel till små och medelstora läkemedelsföretag.

– Även i den rollen upplever jag att man förstått att det är nu racet går; bioinformatik och företag som arbetar med det är något man talar mycket om.

Bioinformatik ett nyckelord

Bioinformatik kommer att spela en helt central roll i den postgenoma forskningen, menar Stefan Ståhl. Det framgår också genom den nu beslutade satsningen av Knut och Alice Wallenbergs stiftelse, som bland annat ska finansiera uppbyggnaden av lokala bioinformatikcentra. Även prioriteringarna inom programmet Cell factory for functional genomics talar för det.

I bioinformatiken möts IT, medicin och bioteknologi. Området har utvecklats från att handla om relativt triviala problemlösningar med hjälp av datateknik till avancerade mjukvarupaket med specifika egenskaper för specifika frågeställningar.

Även om termen »bioinformatik» existerat i snart tio år är dess betydelse fortfarande något diffus. I grova drag

handlar det om att tolka biologisk information med hjälp av sofistikerade databaserade matematiska och statistiska beräkningsmetoder.

Det ställs allt högre krav på att programmen ska vara så logiskt uppbyggda att de är lätta att använda även för forskaren på laboratoriet. Det ska gå snabbt att ta hem information från olika centrala databanker, som exempelvis GenBank eller DNA Database of Japan, och använda den utifrån de egna analysbehoven.

Vid KTH finns en gemensam bioinformatikgrupp för KTH Center for proteomics och KTH Genom center. Stefan Ståhls forskargrupp vid Center for proteomics har tagit fram ett program som bygger på något som gruppen själva kallar för »ett virtuellt chip».

– För mig som inte är en hacker är det normalt sett svårt att på ett effektivt sätt använda all den geninformation som finns i de internationella offentliga databaserna. Jag kan på sin höjd gå in och söka homologier med en specifik gen som jag studerar, och därigenom få en viss information, säger Stefan Ståhl.

Jämför celltyper på skärmen

I det virtuella programmet arbetar forskargruppen med punktvisa markeringar på dataskärmen, där varje markering motsvarar en känd mänsklig gen.

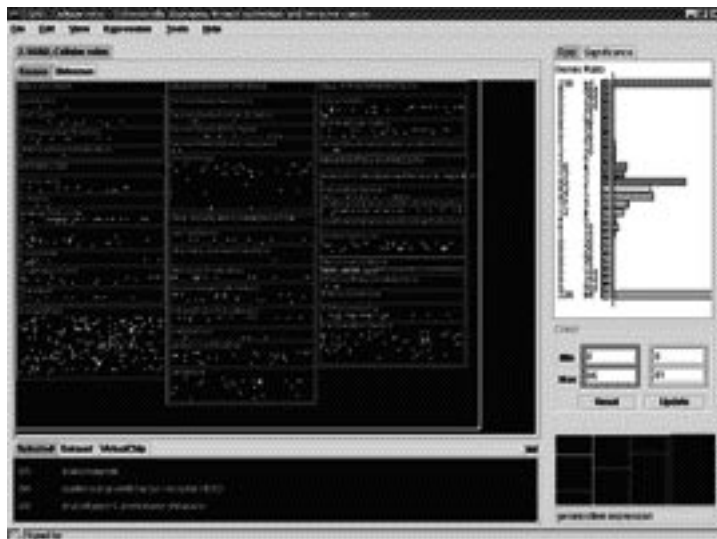
– Transkriberingarna är grupperade enligt ett speciellt schema. Tar vi in gen-data i programmet och färgkodar informationen kan vi se vilka gener som är uttryckta i en viss celltyp genom att visa av markeringarna på skärmen lyser.

– Om vi länkar oss vidare i programmet kan vi dessutom genomföra komparativa analyser, kanske mellan en celltyp som är stimulerad av ett visst läkemedel och en annan celltyp som inte är stimulerad, säger Stefan Ståhl.

I en utvärdering av virtualiseringsprogrammet användes befintlig databaslagrad information rörande dels normala celler från prostata, dels celler från olika stadier av prostatacancer.

Utvärderingen är en del i en avhandling av Magnus Larsson, doktorand hos Stefan Ståhl. Geninformationen i den aktuella databanken är framtagen med hjälp av olika sekvenseringsmetoder, som var och en genererar olika långa nukleotidsekvenser.

En stor del emanerar från den s k



Vid institutionen för bioteknik, Kungliga Tekniska högskolan i Stockholm, arbetar forskarna med bland annat virtuella chips. Bilden visar geners uttrycksnivå i celler från såväl frisk som cancersjuk prostata. Varje punkt representerar en gen och färgen visar skillnader i aktivitetsnivå hos de olika vävnadstyperna. Gröna prickar representerar gener med starkt uttryck i cancervävnad, röda prickar är gener med svagt uttryck och gula prickar är gener som uttrycks lika starkt i frisk vävnad som i cancervävnad. Generna är grupperade i rektanglar, beroende på funktion i cellen. Under det virtuella chipet finns en lista med gener. Genom att klicka på genens namn kommer forskaren åt all information som finns om genen i de stora internationella gendatabaserna.

EST-metoden (Expressed Sequence Tag). EST-metoden är effektiv för att få fram stora mängder information, men för en effektiv analysering krävs kraftfulla verktyg.

– Informationen analyserades och visualiserades snabbt på det virtuella chipet i vårt system, oberoende av vilken sekvenseringsmetod som använts, säger Stefan Ståhl.

– Med lätthanterliga interaktiva visualiseringsmjukvaror kan man skapa den överblick som krävs för att dra långtgående biologiska slutsatser vid dataskärmen.

Protein ett detektionsverktyg

Inom proteomicsforskningen arbetar Stefan Ståhls forskargrupp på institutionen för bioteknik med bland annat s k »high-throughput»-proteinexpression, i syfte att skapa affinitetsreagens för icke-karakteriserade proteiner.

Utvalda cDNA (DNA-kopia som bildats genom omvänd transkription av ett mRNA) förs över till en bakteriell vektor, i det här fallet en kolibakterie. I slutändan får man fram proteiner som immuniseras i försöksdjur.

Med hjälp av tillförda polyklonala antikroppar som binder till proteinet fungerar det som ett effektivt detektionsverktyg.

– Den här modellen ger oss uppgifter om det nativa proteinets storlek, splitsvarianter av ett och samma protein samt en viss uppfattning om proteinmängd. Vi kan sedan gå vidare och med hjälp av klassisk immunfluorescensstek-

nik få lokalisering information på subcellulär nivå.

– Nackdelen med den här tekniken är bland annat kostnaden. Det är dyrt att använda immunisering av försöksdjur och att ta fram stora mängder polyklonala antikroppar, och metoden lämpar sig inte för hela proteomanalyser. Därför har vi, liksom många andra forskargrupper i världen, börjat söka efter möjligheter att utföra liknande studier fast in vitro, säger Stefan Ståhl.

Grundprincipen är då att i stället för att använda antikroppar utnyttja stora kombinatoriska bibliotek av den antikroppsbindande domänen i protein A som källa för att ta fram de affinitetsreagens som behövs för proteinkarakteriseringen.

Fördelarna med att arbeta med affinitetsmole-

kyler i stället för exempelvis tvådimensionell gelelektrofores är, enligt Stefan Ståhl, att även membranproteiner och proteiner som produceras i liten mängd i cellen kan analyseras. Dessutom får man lokalisationsinformation.

In situ-hybridisering ger förvisso information om proteinernas lokalisering. Men den metoden ger inte – så som principen med affinitetsmolekyler – både cellulär som subcellulär information.

Med affinitetsmolekyler finns det även möjlighet att studera hur proteiner interagerar med varandra i större proteinkomplex.

– Vi kan också använda metoden för att blockera proteiner intracellulärt, vilket är intressant för inte minst läkemedelsindustrin.

Jobbar mot industrin

För läkemedelsindustrin innebär proteomicseran att nya diagnostiska verktyg kan upptäckas, liksom nya måltavlor för läkemedel. Ökad kunskap om människans hela proteom skulle exempelvis kunna leda till screeningmöjligheter av patienter som kan förväntas vara mottagliga för ett specifikt läkemedel, och vilka patienter – som om de fick läkemedlet – riskerar att drabbas av besvärliga biverkningar.

Inom programmet Cell factory for functional genomics sitter förvisso representanter från läkemedelsindustrin i styrelsen, men industrin ingår inte i övrigt som en direkt part i forskningsprojektet.

– De flesta projekt jobbar på något sätt även mot industrin. I den postgenoma fasen blir satsningarna ofta så storskaliga att man måste involvera industrin på något sätt, liksom industrin vill få idéer från forskningen inom akademien, säger Stefan Ståhl.

– Samtidigt vore det tråkigt att skapa effektiva teknikplattformar om dessa inte vore medicinskt relevanta och det inte fanns en efterfrågan på tekniken.

Fråga om de delar av proteomics-forskning som handlar om membranproteiner och sekretoriska proteiner som går ut i kroppen, ligger läkemedelsföretagen redan idag långt framme.

– Men det är ändå så att läkemedelsföretagen utnyttjar samarbetet med universitetet och lägger ut mycket av det som handlar om bioinformatik- och sekvenseringsatsningar, säger Stefan Ståhl.

Högeffektiva teknologier

Teknologiplattformarna inom proteomicsforskningen kommer allt mer att anpassas för högeffektiva analysmetoder. Det är i analogi med genomprojektet då sekvenseringsarbetet uppnådde en hög effektivitet bland annat genom att man till stor del satsade på de kodande regionerna och storskalig cDNA-sekvensering.

En teknik som i framtiden blir intressant är proteinchips i någon form, liknande det DNA-chip som redan idag används inom bioinformatiken, tror Stefan Ståhl. När samtliga mänskliga gener är sekvensbestämda kan man förmodligen utveckla reagens som är specifika för varje typ av protein, genom att definiera regioner som skiljer proteiner-na åt med hjälp av bioinformatik.

Parallellt med att högeffektiva teknikplattformar utvecklas för snabba proteinseparationer, kommer dessa plattformar sannolikt även att fungera som bioinformatikverktyg: när proteinseparatören används ska forskaren i nästa steg kunna få all information som finns tillgänglig på Internet om det aktuella proteinet.

– Forskaren ska inte behöva återuppfinna hjulet varje gång han eller hon ska göra ett experiment, säger Stefan Ståhl.

När samtliga mänskliga gener så småningom är sekvensbestämda och lätt tillgängliga för snabba analyser blir det möjligt att screena en bestämd celltyp, exempelvis tumörceller, för att karakterisera viktiga proteiner som påverkar cellen.

Men det finns alltid svaga länkar. För att stärka en viss hypotes kommer därför olika analysmetoder att användas parallellt – som transcriptomics, då genuttrycket identifieras med hjälp av mRNA, och proteomics.

Projektet med kartläggningen av genomet, HUGO, fick relativt snabbt en privat konkurrent; det USA-baserade företaget Celera Genomics. Nu har samma företag även annonserat en satsning på proteomics. Ett industriellt Human proteome project.

För detta syfte har Celera Genomics förhandlingar med bland annat GeneBio, en kommersiell gren av Swiss Institute of Bioinformatics som är ett av världens ledande centra för proteinforskning. Celera Genomics målsättning är att effektivisera proteomforskningen med hjälp av den senaste teknologin och lagra informationen i en privat proteomdatabank.

Det är dock tveksamt om ett privat företag ensamt skulle klara karakteriseringen av hela proteomet, eftersom det handlar om en betydligt större mängd och avsevärt mer varierande information. Det är en av de stora skillnaderna mellan proteomics och genomprojektet.

Celera Genomics planer har dock väckt farhågor hos företrädarna för den offentliga forskningen, även om det också finns de som menar att den privata konkurrensen faktiskt var gynnsam då det handlade om att effektivisera kartläggningen av genomet.

Gemensamma riktlinjer

Allt fler talar nu om gemensamma internationella riktlinjer inom proteomics och värdet av att skapa ett offentligt Human proteome project – med HUGO som förebild. Det skulle kunna vara ett sätt att effektivisera proteomforskningen och även möta eventuella hot från privata initiativ.

Det finns dock de som anser att en sådan satsning kommer för tidigt, att teknologiplattformarna ännu är för otillräckliga och bristen på skickliga bioinformatiker för stor.

– En gemensam satsning är inte otänkbar, åtminstone inte på ett europeiskt plan. Jag kan föreställa mig ett europeiskt konsortium som sätts ihop för att kanske främst ta fram immunreagens eller affinitetsreagens, vilket skulle vara tillgängligt för olika forskargrupper, säger Stefan Ståhl.

– Tittar man på genomprojektet har samordningen varit oerhört teknologidrivande. På det sättet vore en stor gemensam satsning något bra.

I fråga om bioinformatikkompetens tror Stefan Ståhl att Sverige står sig väl i den internationella konkurrensen.

– Sverige har en framskjuten position inom såväl medicin och informationsteknologi som bioteknologi. Finns det några problem i dag så handlar det nog mer om en förskjutning av resurser, än att det skulle saknas kompetens, säger Stefan Ståhl. •

Finns på nätet



Sök i arkivet

När du skall logga in dig i arkivet får du frågor om användarnamn och lösenord. Ditt namn/name alternativt användar-ID är ditt efternamn (om du är prenumerant) eller det namn som står som prenumerant på Läkartidningen, dvs första raden i adressen på Läkartidningens baksida. Det kan till exempel vara Vårdcentralen Hunnebostrand, Apoteket Älgen eller Hudkliniken. Då utgör dessa namn användar-ID.

Lösenordet/password är sex-siffrigt och finns även det på adressetiketten. Ibland följs de sex första siffrorna av S90. Glöm det! Det är en beteckning som har betydelse enbart för tryckeriets distribution.

Kommer du ändå inte in på arkivet kan det bero på problem för din browser att läsa å, ä och ö. Ersätt med a och o; t ex Vardcentralen.

Artiklar finns i digital form från och med 1996.

Fullständig referenslista

till artiklar i papperstidningen finns på sajten. På nättidningens sida Denna vecka – www.lakartidningen.se/html/denna_vecka.htm – ligger länk till Fullständiga referenslistor. Dessa listor kommer också, med 3 veckors fördröjning, att finnas på arkivet, klickbara från respektive artikel.

Innehållet via e-post

Information om innehållet i veckans nummer av Läkartidningen kan du beställa på nätet. Varje onsdag sänder vi dig ett e-postmeddelande med klickbar länk till veckans innehåll. Anmäl ditt intresse på www.lakartidningen.se/LT/default.htm

Nytt och kort

Notiser – ibland med klickbara länkar till artiklar, myndigheter, organisationer, m m. Länk finns på vår hemsida www.lakartidningen.se Marita Önneby

PS. Jag tar tacksamt emot era notisförslag!
marita.onneby@lakartidningen.se
Tel 08-790 34 98