

Sigurður Ingvarsson, Alfreð Árnason

Norrænn PCR-lyklabanki til rannsókna á erfðamengi mannsins

Til að rannsaka erfðamengi mannsins og erfðasjúkdóma er nauðsynlegt að geta greint einkenni gena og litninga. Erfðamörk* gefa upplýsingar um breytilegar litnisgerðir* og hvernig þær erfast milli kynslóða. Með greiningu slíkra marka fæst mynstur sem er sérkennandi fyrir hvern einstakling. Áður fyrr urðu menn að styðjast við svipgerð, en eftir því sem tækni hefur fleygt fram er unnt orðið að leita að upplýsingum um arfgerð millilíðalaust, það er beint í erfðaeftnið. Leitað er að þekktum röðum núkleótíða*, sem erfast og gefa því vísbendingu um til dæmis skyldleika og tengsl við sjúkdóma. Erfðamörk eru af ýmsum gerðum en eftir því sem erfðamengi mannsins er betur rannsakað hafa verið skilgreind ný erfðamörk sem gefa miklar upplýsingar um erfðir og erfðasjúkdóma. Eitt það markverðasta sem gerst hefur á seinni árum er að fundist hafa erfðamörk út frá tveggja basa* (eins, þriggja og fjögurra basa eru einnig þekkt) endurteknum röðum í erfðamenginu; microsatellite erfðamörk

Vegna mikils fjölbreytileika í litnisgerðum gefa microsatellite erfðamörk miklar upplýsingar þegar verið er að rannsaka fjölskyldur með erfðasjúkdóma. Öryggi í greiningu arfgerða í fjölskyldum með sjúkdómssögu hefur aukist verulega með tilkomu þessara erfðamarka. Auðveldara er en áður að greina hvort einstaklingar beri áhættugen sjúkdóms.

Microsatellite erfðamörk eru einnig mikilvæg við kortlagningu á genamengi í sjúkum frumum til dæmis æxlisfrumum. Úrfellingar á erfðaeftni má greina með því að meta tap á arfblendni*. Óstöðugleika og stökkbreytingar í erfðaeftninu má ákvarða með greiningu afbrigðilegra stærða á erfðaeftnisbútum. Sumar

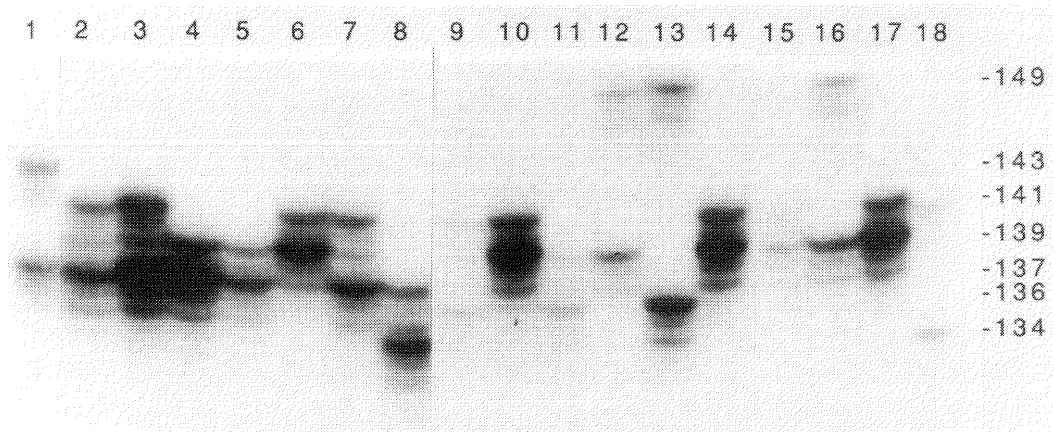
þessara breytinga endurspeglar líffræðilega eiginleika æxlisins, svo sem vaxtarhraða, tilhneigingu æxlisfruma til að sá sér í fjarlægja vefi og þar með sjúkdómshorfur. Því er mikilvægt að kortleggja erfðamengi í æxlum með tilliti til slíkra breytinga. Flest eða öll æxli hafa fleiri en eina slíka breytingu. Því er mikilvægt að þekkja mynstur þeirra, en það gefur miklar upplýsingar um hvernig æxli hegða sér. Óhætt er að fullyrða að þessi erfðamörk muni einnig nýtast við frekari rannsóknir á öðrum fjölgema sjúkdómum.

Í réttarlæknisfræði hefur mikilvægi erfðamarka aukist á seinni árum vegna þess hve góðar upplýsingar þau gefa og hversu lítinn efnivið þarf til að framkvæma greininguna. Hægt er að nota erfðamörk í fadernismálum, en þá eru borin saman erfðamörk móður, barns og meints föður. Einnig er hægt að nota þau í ýmsum sakamálum til dæmis nauðgunum, þar sem hægt er að bera saman erfðamörk í sæðisfrumum teknum úr þólanda nauðgunar, við þau sem greinast í einstaklingum sem hugsanlega eiga hlut að máli.

Þegar byrjað var að kortleggja erfðamengi mannsins með tengslaggreiningu* (human genetic linkage maps) var í upphafi byggt á fjölbreytileika **próteinerfðamarka** sem mæld eru með ýmsum aðferðum; blóðvökvaþrófi, rafdrætti, ensímþrófi og fleira. Próteinerfðamörk eru hins vegar tiltölulega fá, en stórfelld aukning hefur orðið á nýjum erfðamörkum með tilkomu DNA aðferðafræði. Fjölbreytileiki (polymorphism) milli einstaklinga byggir á stærðarmun skerðibúta* (RFLP*; restriction fragment length polymorphism) eða endurtekkinna raða í erfðamenginu (VNTR*; variable number tandem repeat). Áður nefnd microsatellite erfðamörk, sem upp á síðkastið hafa rutt sér til rúms í erfðarannsóknum, taka RFLP og VNTR fram um fjölbreytileika og gefa því meiri upplýsingar. Þau byggja á endurteknum

Frá Rannsóknastofu Háskólans í meinafræði. Fyrirspurnir, bréfaskipti: Sigurður Ingvarsson, pósthólf 1465, 121 Reykjavík.

* Sjá orðaskrá aftast í greininni.



Mynd Dæmi um greiningu erfðamarka á litningi 16q í 18 einstaklingum úr sömu fjölskyldu. Erfðæfni hefur verið einangrað úr blóðfrumum með próteínasa meðhöndlun. Sérhæfir microsatellite lykjar (sem eru geislamerktir) hafa verið notaðir til að magna upp stuttar endurteknar raðir í erfðamenginu með PCR efnahvarfi. Bútararnir eru raðregnir í raðgreiningargeli, ljósnæm filma lögð á og eftir framköllun er hægt að lesa stærð þess erfðæfnis sem magnað var. Sjö mismunandi stærðir af bútum greinast í þessu dæmi (frá 134-149 núkleótíða). Tveir bútar greinast í hverjum einstaklingi, sem sérkenna hvorn litning í litningapari, einn frá föður og einn frá móður. Í þessu dæmi er um að ræða einstaklinga í sömu fjölskyldu og því eru margir þeirra með sömu búta stærð. Ef um óskylda einstaklinga væri að ræða yrði fjölbreytileikinn meiri. Tölurnar ofan við myndina eiga við hvert blóðsýni, en tölur til hliðar sýna fjölda núkleótíða í bútinum.

röðum fárra núkleótíða (eitt, tvö, þrjú eða fjögur núkleótíð); einkum eru notaðar endurteknirar á tveimur núkleótíðum eða AC endurteknirar. Talið er að að minnsta kosti 30.000 slíkar endurteknar DNA raðir séu dreifðar um erfðamengi mannsins. Um það bil 2.000 þeirra hafa verið skilgreindar sem erfðamörk en í því felst að aðstæður eru þekktar fyrir mögnun þeirra með PCR* (polymerase chain reaction) og helstu búta stærðir þeirra eru þekktar. Með PCR tækni er hægt að magna upp ákveðin svæði í erfðamenginu sem gerir frekari rannsókn á þeim mögulega. Á mynd sjást erfðamörk greind með PCR og raðgreiningargeli.

Vegna þess hve microsatellite DNA er hentugt og gefur miklar upplýsingar eru þetta helstu erfðamörkin sem notuð eru við kortlagningu gena og erfðasjúkdóma í dag. Talið er að innan skamms náist það mark að skilgreina erfðamörk með tveggja til fimm centi-Morgan (cM)* millibili yfir allt erfðamengið. Heildarstærð erfðamengis í karlmönnum mælist 2.650 cM og 3.900 cM í konum, en munurinn stafar af hærri tíðni litningavíxlana í rýriskiptingu kvenna. Að meðaltali verða 1,5 víxlanir á litningapari og því er meðalstór litningur 150 cM að stærð. Það þarf því 660 lyklopör* sem dreifast jafnt um erfðamengið til að fá erfðamörk á fimm cM bili, en vegna

þess að sum svæði eru erfiðari en önnur þarf fjöldinn að vera talsvert meiri. Microsatellite DNA erfðamörk þykja einkum hentug til að bera saman erfðakort (genetic map; þar sem mæld eru cM með tengsagreiningu) og eðliskort (physical map; þar sem mæld eru litningabönd eða basar einræktaðs (klónaðs) DNA). Nýlega hefur verið birt greinargott eðliskort af erfðamenginu þar sem notaðir voru gervilitningar úr gerfrumum (1).

Norræna ráðherranefndin styrkir norðurlandasamstarf vegna alþjóðlegs samvinnuverkefnis um könnun á erfðamengi mannsins, HUGO (HUman Genome Organization). Styrkurinn hefur verið nýttur til að kosta vísindaráðstefnur um rannsóknirnar, til tölvuvæðingar og í því skyni að koma á fót sameiginlegum norrænum banka erfðalykla, það er að segja safni PCR-lykla. Þess er vænst að lyklabankinn nýtist til að kortleggja gen sem valda erfðasjúkdómum og erfðabreytileika. Kostir bankans eru þeir að samnýting er milli Norðurlandanna, án kostnaðar fyrir rannsóknarstofurnar. Bankinn leggur höfuðáherslu á lykla sem gefa fjölbreytilegt mynstur (microsatellite lykjar). Í bankanum eru nú þegar til 490 lyklopör sem eru dreifð víðsvegar um erfðamengið. Upphaflega var áætlað að safna lykllum sem dreifðust með 5-10 cM bili að jafnaði

Tafla Fjöldi PCR microsatellite lykla* í lyklabankanum í Uppsölum. Heildarfjöldi 490 pör.

Litningur	Fjöldi lykklapara	Litningur	Fjöldi lykklapara
1	42	13	11
2	31	14	19
3	26	15	15
4	37	16	15
5	37	17	14
6	21	18	12
7	20	19	12
8	20	20	10
9	23	21	23
10	24	22	5
11	29	x	24
12	13	y	7

um erfðamengið, en betur hefur gengið að skilgreina lykla frá sumum svæðum en öðrum. Við nákvæmari kortlagningu geta menn svo leitað til annarra lyklabanka (til dæmis Généthon) sem stækka ört (1-3).

Á töflu sést efniviður sem til er í Norræna lyklabankanum í Uppsölum. Stækka þarf lyklasafnið fyrir viss litningasvæði; til dæmis eru ekki til erfðamörk fyrir stór svæði á litningi 12 (29 og 32 cM) og litningi 20 (48 cM). Á öðrum litningum hefur tekist að skilgreina erfðamörk sem eru jafndreifð til dæmis á litningi 21.

Vísindamenn á Norðurlöndunum eiga aðgang að þessum lyklabanka sér að kostnaðarlausu. Bankinn mun láta í té upplýsingar og efnivið til rannsókna á erfðasjúkdómum. Umsjón með lyklabankanum hefur Claes Wadelius**. Nánari upplýsingar um erfðamörkin geta menn sótt í tölvubanka til dæmis GDB (Genome Data Base) tölvubankann á John Hopkins í Baltimore. Íslenskar rannsóknarstofur hafa tengst þessum tölvubanka með tölvuneti.

Aðstæður á Íslandi til mannerfðafræðirannsókna eru að ýmsu leyti fýsilegar. Íbúaskráning er nákvæm, skráning sjúkdóma ítarleg, fólksflutningar til landsins eru litlir og ættfræði er vel þekkt. Þessi sérstaða Íslands gæti gert hlutverk okkar afar mikilvægt í alþjóðlegum erfðamengisransóknum.

Á Rannsóknastofu Háskólans í meinafræði, rannsóknarstofu Krabbameinsfélags Íslands og í Blóðbankanum eru stundaðar rannsóknir

***) Department of Clinical Genetics, University Hospital, S-751 85 Uppsala, Svíþjóð, sími 46-18 66 59 40 eða 66 58 64, bréfsími 46-18 55 40 25.

sem felast í tengslagreiðingum á ýmsum erfðasjúkdómum. Það er erfitt fyrir litlar íslenskar rannsóknarstofur að kortleggja stór svæði en verið er að kortleggja hluta af ákveðnum litningum, sem taldir eru bera áhættugen fyrir sjúkdóma. Þróun rannsókna á erfðamengi mannsins á Norðurlöndunum og hjá öðrum Evrópuþjóðum hefur verið hröð á síðustu misserum og víst má telja að þær muni stórukast á komandi árum, til dæmis er gert ráð fyrir stórum fjárframlögum til slíkra rannsókna hjá Evrópubandalagsþjóðum. Til þess að fylgja þessari þróun þyrfti að styrkja þær rannsóknarstofur á Íslandi sem fást við erfðarannsóknir.

Þeir sem óska nánari upplýsinga um Norræna lyklabankann geta haft samband við Sigurð Ingvarsson, sími 60 19 06, eða Alfreð Árnason, sími 60 19 15, á Rannsóknastofu Háskólans í meinafræði, bréfsími 60 19 43.

HEIMILDIR

1. Cohen D, Chumakov I, Weissenbach J. A first generation physical map of the human genome. *Nature* 1993; 366: 698-702.
2. Weissenbach J, Gyapay G, Dib C et al. A second generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992; 359: 794-801.
3. Butler D. French move past Genethon to gene-therapy research. *Nature* 1993; 361: 671.

ORÐASKRÁ:

- Basi: Einkennandi byggingarhlutar erfðafnis (DNA).
cM (centi-Morgan): Mælieining á yfirvíxlun erfðafnis milli litninga í litningapari í rýriskiptingu.
Erfðamark: Prótein eða erfðafni sem gefa upplýsingar um arferð einstaklings.
Litnisgerð (haplotype): Samsetning litnings greind með erfðamörkum.
Lykill (primer, vísir, spoti): Stuttur tilbúinn DNA bútur sem þekkir ákveðna DNA röð í erfðamenginu. Í PCR efnahvarfi er magnað upp erfðafni milli tveggja slíkra lykla, svokallaðs lykklapars.
Lyklapar: Sjá lykil.
Microsatellite lykill: Greinir breytileika sem byggir á mjög stuttum endurteknum DNA röðum.
Núkleótíð: Byggingareiningar erfðafnis (basi+sykur+fosfat).
PCR (polymerase chain reaction): Mögnun á erfðafni með fjölliðunarsími, fjölföldunar ensímhvarf.
RFLP (restriction fragment length polymorphism): Breytileiki sem greinist með stærðarmun skerðibúta.
Skerðibútur: Lengd DNA keðju milli ákveðinna basaraða sem skerðiensím þekkir og rýfur.
Tap á arfblendni (loss of heterozygosity): Erfðafni frá öðrum litningi litningapars hefur tapast.
Tengslagreiðing (linkage analysis): Tengsl ákveðinna erfðamarka innbyrðis eða tengsl erfðamarka við svipgerð.
VNTR (variable number tandem repeat): Breytileiki sem byggir á endurteknum DNA röðum.