

# Verktyg för molekylär medicin

## Ny teknik ger framtida möjligheter



**ULF LANDEGREN**, med dr, professor i molekylärmedicin  
 ulf.landegren@genpat.uu.se  
**MASOOD KAMALI-MOGHADDAM**, fil dr, forskare, apotekare

**MATS NILSSON**, fil dr, docent i molekylärmedicin; samtliga från Rudbecklaboratoriet, Uppsala Universitet

Molekylärmedicin, det vill säga ansatsen att undersöka och behandla sjukdomar på molekylär nivå, har vuxit fram under en följd av år – begreppet kan sägas ha lanserats av den dubbla Nobelpristagaren Linus Pauling när han 1949 identifierade sickle-cellanemi som en molekylär sjukdom [1]. Ämnet har kommit i fokus i och med den avslutade sekvensundersökningen av människans totala arvsmassa, vilken nu tillåter oss att överblicka alla arvsanlag och andra betydelsefulla element som föreligger i kodform i arvsmassan [2]. Tillgången till sekvensinformation gör det möjligt att räkna ut vilka RNA-molekyler och vilka proteiner våra celler skulle kunna producera. Den har också möjliggjort en kartläggning av den genetiska variation mellan olika människor [3]. De molekylära verktyg som nu utvecklas ger därför helt nya förutsättningar att angripa den majoritet av sjukdomar som fortfarande inte har fått någon tillfredsställande förklaring. Verktøygen och de nya medicinska kunskaperna kommer också att möjliggöra nya former av diagnostik och terapi.

### Teranostik

Det är för övrigt troligt att begreppen diagnostik och terapi alltmer kommer att blandas ihop, inte bara genom att tidig diagnostik dramatiskt kan förbättra möjligheterna till framgångsrik behandling, utan också genom att det troligen blir allt viktigare att terapi intimt kombineras med diagnostik. Begreppet »personalized medicine« – individualiserad behandling – avser just detta att man väger in en individs genetiska förutsättningar för att kunna välja rätt behandling. Det kan gälla undersökningar av de enzymssystem som påverkar hur ett läkemedel metaboliseras, men det kan också vara viktigt att undersöka genetisk variation av de proteiner läkemedlen avses påverka terapeutiskt.

Under senare år har det framkommit en rad monoklonala antikroppar riktade mot speciella molekyler på olika tumörceller. Kostnaden för att behandla patienter med denna typ av läkemedel är sådan att det blir angeläget att testa i förväg om patientens tumörceller verkligen uttrycker det aktuella proteinet och därmed kan förväntas svara på behandlingen, en kombination av diagnostik och terapi som ibland betecknas teranostik. Dessa tendenser bidrar till att öka intresset för molekylär diagnostik.

### Ett svenskt intresse

Det är värt att notera att utvecklandet av verktyg för att studera biomolekyler har en mycket stark tradition i Sverige. Under

första halvan av 1900-talet fanns tidvis nära nog ett svenskt monopol inom proteinstudier. Forskare i Sverige har utvecklat en mängd grundläggande metoder för karakterisering och rening av proteiner, till exempel genom ultracentrifugering, elektrofores, olika former av kromatografi, isoelektrisk fokusering, proteinsekvensering och mätningar av interaktioner med hjälp av processer såsom ytplasmonresonans. Fundamentala proteindiagnostiska metoder som »sandwich«-immuntester och ELISA är också svenska uppfinningar, och alla dessa tekniker har utgjort viktiga förutsättningar för framsteg inom grundbiologisk och medicinsk forskning, likaväl som inom läkemedels- och bioteknikindustrin.

Under senare år har forskare verksamma i Sverige också utvecklat ett antal centrala principer för undersökningar av DNA-molekyler. Exemplet inkluderar DNA-ligeringsbaserad genanalys i form av ligeringsprober (padlock probes) som bildar länkade DNA-cirklar genom att ändarna fogas ihop då proben hybridiserar till en målmolekyl [4], minisekvensering där DNA-polymeraser används för att identifiera nukleotider i en viss position utefter en DNA-sträng [5], dynamisk allelspecifik hybridisering som löser samma uppgift genom att undersöka hur en DNA-prob hybridiserar till den undersökta sekvensen när man ändrar temperaturen [6] och pyrosekvenseringsmetoden som med hjälp av en raffinerad serie enzymsteg gör det möjligt att en efter en identifiera nukleotiderna utefter en DNA-sträng [7].

Förre ordföranden för nationella vetenskapsakademien i USA, Bruce Alberts, gav i förbigående ett perspektiv på detta svenska intresse för teknikutveckling i en hyllningskrift riktad till DNA-spiralens ene upptäckare James Watson: »You seemed to believe my approach was too much like »Swedish science«, meaning that it focused on developing a method, instead of being a direct attack on an important biological mechanism« [8]. Trots olika smakriktningar inom forskning torde betydelsen av nya undersökningsmetoder ändå vara uppenbar för alla.

### Storskaliga molekylära analyser

Numera är teknikutvecklingen i hög grad en internationell angelägenhet. Tillgången till total genomsekvensinformation har aktualiserat behovet att i stor skala följa flödet av information från genom, över de transkriberade mRNA-sekvenserna och till de translaterade proteinerna och deras olika funktioner i cellen och organismen (Figur 1).

En överblick över dagens storskaliga teknologier för molekylära analyser och samtidigt en inblick i den förväntade utvecklingen följer här:

**DNA-sekvensering.** Behovet att avläsa DNA-sekvenser har ändrat karaktär i och med att vi nu i princip vet hur människans

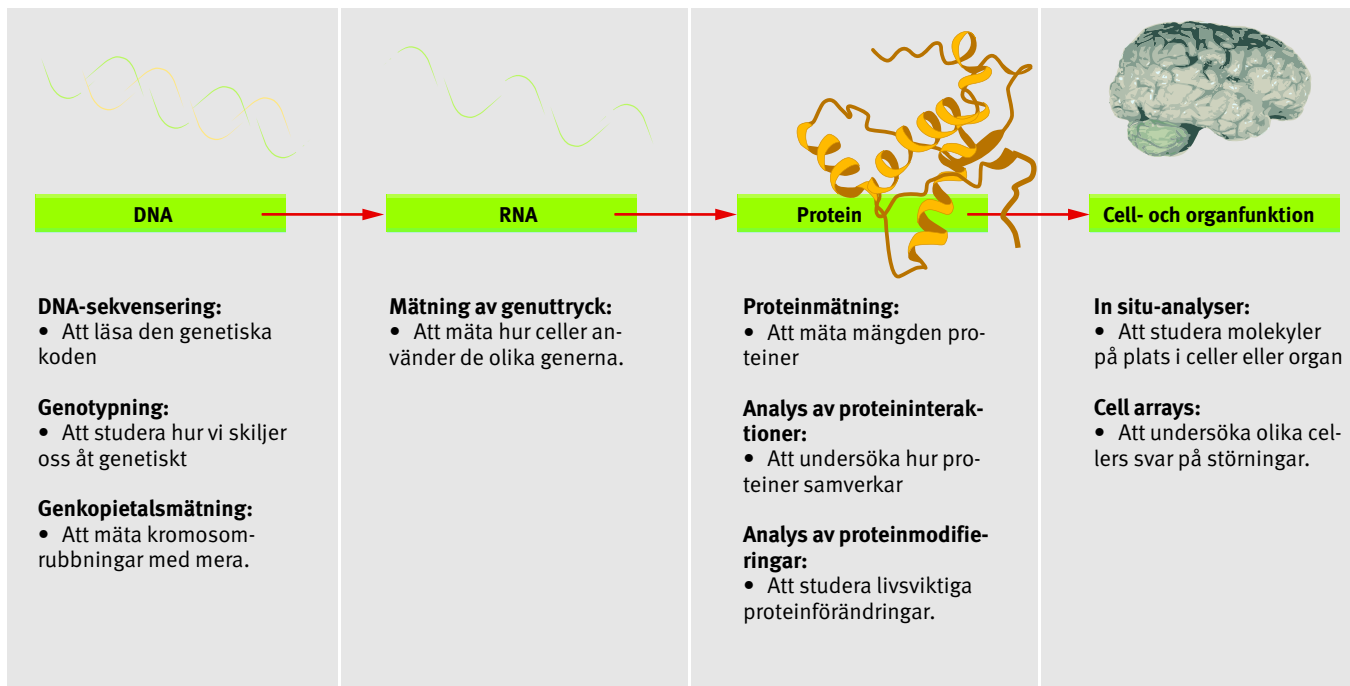
### SAMMANFATTAT

**Käändedom** om människans totala arvsmassa i kombination med allt effektivare undersökningsmetoder sätter molekylär medicin alltmer i fokus.

**Stora mängder** molekylära data kan nu insamlas, och allt känsligare undersökningsmetoder tillåter att till och med enstaka molekyler studeras i celler och vävnader.

**De nya kraftfulla** molekylära

verktygen får effekter i första hand för förståelsen av sjukdomsmekanismer, men de möjliggör också diagnostik allt tidigare i sjukdomsförloppet samt bättre riktad behandling. **Vi beskriver här** översiktligt en serie storskaliga molekylära tekniker med vilkas hjälp man kan studera och diagnostisera sjukdomar på DNA-, RNA- och proteinnivå.



**Figur 1.** Bilden visar flödet av genetisk information, från DNA via transkription till RNA, och vidare via translation till proteiner, som sedan ingår i bildandet av celler och organ. Den visar också de storskaliga undersökningar som kan utföras för att kunna studera biologi och sjukdomsmekanismer på dessa olika nivåer med hjälp av effektiva molekylära verktyg.

arvsmassa ser ut och därmed intresserar oss mer för vilka genetiska varianter som kan finnas hos en viss individ, eller till exempel vilka mutationer och rearrangemang som möjligen inträffat inom en tumör. Det var den berömda Sangermetoden för att bestämma ordningsföljden av de fyra nukleotiderna utefter en DNA-sträng som gjorde det möjligt att genom en omfattande och samlad forskningsinsats bestämma den totala DNA-sekvensen i människans arvsmassa. Nu arbetar flera forskargrupper och företag med siktet inställt på att utveckla nya metoder som skall göra det möjligt att sekvensbestämma en individs totala arvsmassa för en kostnad av 1 000 euro eller dollar [9]. Detta är mindre än en miljondel av kostnaden för det nu avslutade humana genomprojektet. Under 2005 presenterades ett antal lovande nya sekvenseringsmetoder. Bland annat utnyttjar företaget 454 den ovannämnda pyrosekvenseringsprincipen för att samtidigt sekvensbestämma hundratusentals olika DNA-molekyler [10]. Kostnaden för sekvensering med dessa metoder ligger fortfarande långt över det uppsatta målet, men det är ändå tydligt att DNA-sekvensinformation fortsätter att utvecklas till en allt överkomligare resurs inom både forskning och sjukvård.

**Genotypning.** Eftersom vi redan känner till miljontals platser där man finner att arvsmassan från två individer ofta skiljer sig åt i form av så kallade singel-nukleotid-polymorfier, så kan det vara effektivt att inrikta undersökningar av genetiska förklaringar till sjukdomar på dessa kända varianter. Kunskaperna om DNA-sekvensvarianter och i vilka kombinationer (haplotyper) de tenderar att nedärvas inom olika mänskliga populationer är nu mycket omfattande [3]. Med tekniker som nyligen blivit tillgängliga är det möjligt att i ett slag studera 500 000 platser i arvsmassan hos var och en av ett stort antal individer, om man bara har råd <<http://www.affymetrix.com>>, <<http://www.illumina.com>>.

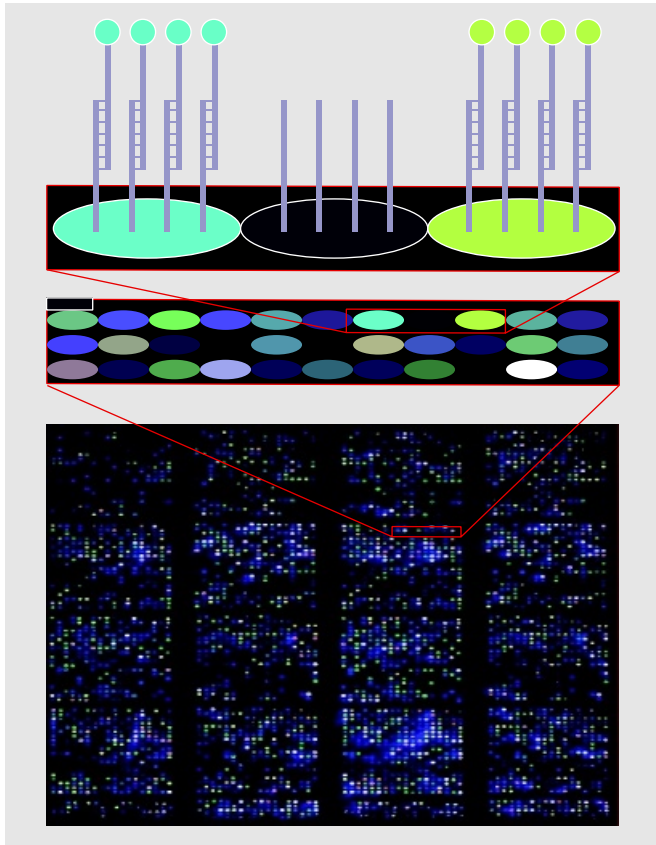
De närmaste åren kommer vi att få se ett stort antal sådana undersökningar där genetisk variation hos grupper av individer

med en specifik sjukdom jämförs med den hos kontrollgrupper. För närvarande är det dock fortfarande osäkert huruvida man kan förvänta sig att hitta vanliga genetiska varianter som påtagligt ökar risken för viktiga sjukdomar, och som därmed kan bidra till förbättrad diagnostik och terapi [11]. Det är också möjligt att de genetiska bidragen till risken att insjukna i många fall kommer att visa sig vara mindre användbara genom att de är fördelade på ett mycket stort antal olika anlag, vart och ett med obetydlig effekt, och kanske varierande från individ till individ med samma sjukdom [12].

**Mätning av DNA-kopietal.** Tumörer har ofta förändringar av arvsmassan genom att hela kromosomer eller mindre segment deleterats, det vill säga försvunnit, eller tvärtom finns i ökat antal kopior. Vid komparativ genomhybridisering (CGH) [13] liksom vid många andra moderna tekniker utnyttjas DNA-mikroarrayer där stora antal olika DNA-molekyler placerats ut i separata klungor i mikroskopisk skala, så att ett prov samtidigt kan undersökas med avseende på förekomsten av tusentals till hundratusentals olika gensekvenser (Figur 2). CGH-tekniken gör det möjligt att samtidigt undersöka en mängd delar av arvsmassan för att se om dessa finns i ökat eller minskat kopietal i tumörvävnad, och samma teknik är också värdefull för att påvisa kromosomrubbingar vid kliniskt genetiska utredningar.

Det blir också alltmer tydligt att antalet kopior av gener kan variera mellan individer, och att detta kan vara en bidragande orsak till den genetiska mångfalden inom vår art [14].

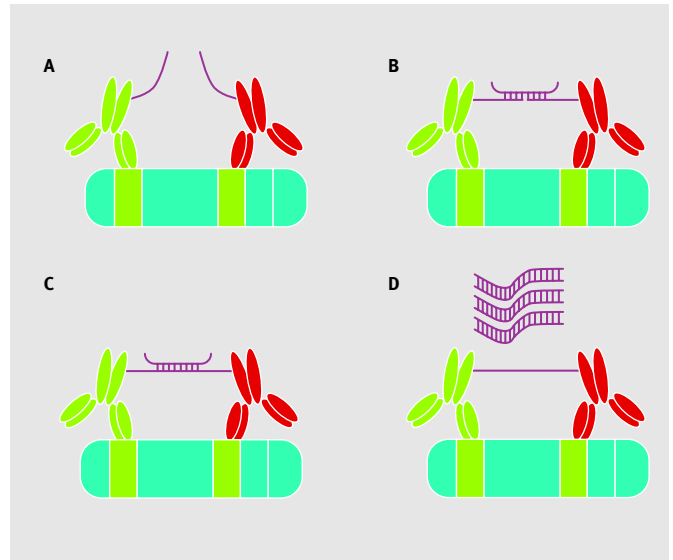
**Analys av genuttryck.** De moderna genetiska teknikerna är inte begränsade till att undersöka våra genetiska förutsättningar. Samma principer kan också utnyttjas för att få ett mått på hur det står till i en vävnad för stunden, genom att undersöka vilka genetiska program som pågår. Detta kan göras genom att mäta hur många RNA-kopior alla mänskliga arvsanlag finns representerade i, det vill säga hur starkt dessa gener uttrycks i



**Figur 2.** En schematisk bild av mikroarray-analys för mätning av genuttryck. RNA från två olika prover (till exempel från sjuk och motsvarande frisk vävnad) märks med olika färger (fluoroforer). De får sedan tillfälle att binda (hybridisera) till olika prober som representerar olika gener och som fästs i ett bestämt mönster i en mikroarray. Denna avläses sedan och förhållandet mellan de olika färgerna ger ett mått på skillnad i uttrycksnivå för olika gener mellan de båda proverna. Mikroarray-bilden är tagen från <http://www.virogenomics.com/news.htm>.

den undersökta vävnaden. De DNA-mikroarraybaserade teknikerna förfinas allt mer och tillåter undersökningar av allt mindre vävnadsprover. De kan också utvisa vilka kombinationer av genernas delfragment (exoner) som fogats ihop, något som visat sig kunna variera för ungefär hälften av alla gener hos människan. Storskaliga mätningar av genuttryck kan vara värdefulla för att påvisa skillnader mellan snarlika cellpopulationer, och för att till exempel få en bild av vilka gener som upp- eller nedreglerats i en tumör. Detta kan ha stort differentialdiagnostiskt värde, och kan ge inblick i vilka processer som förändrats i den aktuella tumören, och som därför kan angripas terapeutiskt.

Det finns också möjligheter att undersöka hur genomet utnyttjas i en given cell eller vävnad genom att avläsa om celler metylerat specifika DNA-sekvenser, vilket påverkar möjligheten att uttrycka närbelägna gener via så kallade epigenetiska mekanismer [15]. Sådana analyser på DNA-nivå kan erbjuda tekniska fördelar framför RNA-studier, bland annat genom att effektiva genotypningsmetoder kan utnyttjas. Det kan också vara lättare att undersöka DNA, som bevaras bättre i insamlade prover än de instabila RNA-molekylerna. Med ett liknande syfte utnyttjas DNA-mikroarrayer nu för att kartlägga alla de platser i arvsmassan där regulatoriska proteiner kan binda till specifika sekvenser för att styra uttryck av gener eller replika-



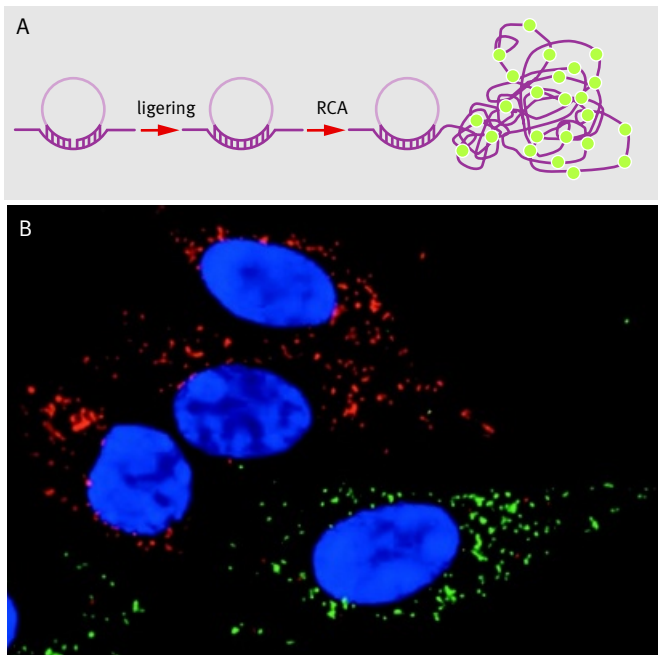
**Figur 3.** Proximitetsligering för proteindetektering. (A) Två antikroppar som binder till samma målprotein gör att DNA-strängar som kopplats till dessa antikroppar hamnar i närheten av varandra. (B) Därefter tillsätts en kort DNA-molekyl som hybridiserar till ändarna av de närbelägna DNA-strängarna, vilket möjliggör för enzymet DNA-ligas att foga ihop dem (C). (D) Den nybildade DNA-molekylen kan sedan mångfaldigas och påvisas med hjälp av PCR, som ett känsligt mått på mängden av det undersökta proteinet i provet.

tion av DNA, etc. Detta ger ett värdefullt perspektiv på genoms funktioner och hur dessa styrs [16].

**Proteinmätningar.** Undersökningar av vävnaders tillstånd genom mätning av proteinnivåer kan erbjuda ytterligare fördelar framför studier av genuttryck. Proteiner är förmodligen mer direkt involverade i cellulära funktioner, och viktiga proteinmodifikationer kan inte avläsas på RNA-nivå. Exempel på detta är processning genom klyvning av proteiner och modifieringar genom till exempel fosforylering. Dessutom kan naturligtvis lokalisering av proteiner eller deras inbördes interaktioner endast studeras på proteinnivå. Tillräckligt känsliga proteindetekteringsmetoder kan göra det möjligt att påvisa sjukdomar genom analys av blod eller andra kroppsvätskor även när det inte är möjligt att ta prover från det påverkade organet, eller när man helt enkelt inte vet var i kroppen en sjukdomsprocess pågår. RNA-analyser däremot måste utföras på prover från vävnaden där generna uttrycks. Kanske det därför i framtiden blir möjligt att diagnostisera en mängd sjukdomar genom årliga blodtester medan sjukdomarna ännu befinner sig i ett behandlingsbart stadium, innan omfattande vävnadsskada uppstått.

Under senare år har utvecklingen av avancerade metoder baserade på masspektrometri möjliggjort omfattande proteinanalyser, men det utvecklas också alltmer specifika, känsliga och övergripande metoder för proteinanalys som baseras på antikroppar. I detta sammanhang är det av intresse att forskare i Sverige för närvarande bygger upp en världsunik resurs i form av välkaraktäriserade antikroppar mot alla mänskliga proteiner och information om proteinernas utbredning i olika vävnader inom ramen för den humana proteomresursen (HPR) <http://www.proteinatlas.org/>.

Vid så kallade proximitetsligeringstester, som nyligen utvecklats vid vårt laboratorium, utnyttjas antikroppar som kopplats till DNA-strängar för att påvisa specifika proteiner [17]. När ett par sådana antikroppar bundit till samma proteinmolekyl så förs de fästa DNA-strängarna så nära varandra att de



**Figur 4.** Genanalys med hänglåsprober.

**A)** Schematisk beskrivning av en hänglåsprob. En linjär DNA-sträng konstrueras så att dess ändrar kan hybridisera intill varandra på den DNA-molekyl som skall påvisas. I närvaro av DNA-ligas fogas probens ändrar ihop och bildar en cirkulär DNA-sträng. Den cirkulariserade proben kan mångfaldigas och detekteras genom rullande-cirkel-replikering. Tekniken gör det möjligt att skilja på, det vill säga genotypa, DNA-sekvensvarianter genom att mål-DNA-molekyler som skiljer sig i enstaka nukleotidpositioner inte tillåter DNA-strängarnas ändrar att sammanfogas.

**B)** »In situ«-genotypning av enskilda DNA-molekyler med hänglåsprober och rullande-cirkel-replikering. Bilden visar resultatet av in situ-genotypning av mitokondriellt DNA i två humana cellinjer. Cellkärnorna har färgats blå med ett DNA-bindande fluorescerande ämne. Cellerna har mitokondriella DNA-sekvenser som skiljer sig åt i en enda nukleotid; de röda fläckarna motsvarar mitokondrier där nukleotid nummer 3 243 är ett A, medan de gröna motsvarar ett G i samma position. A är den normala varianten medan G-varianten bland annat är associerad med ett syndrom med diabetes och dövhet. De röda och gröna signalerna har skapats genom att först låta en hänglåsprob för vardera sekvensvarianten söka upp sina respektive målsekvenser och bilda DNA-cirklar. Därefter kopieras de cirkulära DNA-strängarna enzymatiskt genom rullande-cirkel-replikering så att stora DNA-molekyler bildas som innehåller repeterade kopior av probsekvensen. Dessa DNA-molekyler kan sedan lätt påvisas i ett fluorescensmikroskop genom att märka dem med korta fluorescerande prober, en för vardera hänglåsprob.

låter sig fogas samman genom enzymatisk ligation. Den sammansatta DNA-sträng som då uppkommer kan sedan mångfaldigas och mätas med effektiva DNA-tekniker för att bedöma antalet proteiner i provet (Figur 3). Tekniken kan förenkla proteinanalys, och den gör att man kan påvisa proteiner betydligt känsligare än hittills. Varianter av tekniken kan öka känsligheten ytterligare och tillåter studier av interaktioner mellan proteiner eller kemiska modifikationer av dessa såsom genom fosforylering. I preliminära undersökningar har vi också visat att det är möjligt att påvisa små mängder aggregerande proteiner vid Alzheimers sjukdom [Kamali-Moghaddam, opublicerade data]. Principen för proximitetsligering kan också tillämpas för att visa var de sökta proteinerna befinner sig i vävnader eller inom en cell. Denna typ av analyser får nu, som beskrivs nedan, ökande betydelse inom både forskning och klinisk diagnostik.

**Avbildande analyser.** För att bedöma utbredningen av specifika molekyler vid mikroskopisk undersökning av vävnadsprov utnyttjas ett växande batteri av så kallade in situ-tester. Med hjälp av DNA-prober är det möjligt att påvisa var utefter kromosomerna som specifika sekvenser är belägna, eller att visa om gener har deleterats i en tumör. Liknande metoder kan också utnyttjas för att studera vilka RNA-molekyler som uttrycks i celler. In situ-metoder kan inte mäta sig med DNA-mikroarraytekniker i fråga om hur många olika slag av molekyler som kan studeras samtidigt eftersom man är hänvisad till att utnyttja ett begränsat antal särskiljbara färger, men teknikerna utvecklas efter många linjer. Till exempel gör de tidigare nämnda hänglåsproberna det möjligt att för första gången genotypa individuella DNA-molekyler in situ genom högspecifik molekylär igenkänning i kombination med signalförstärkning via så kallad rullande-cirkel-replikering [18] (Figur 4).

Man kan också utnyttja antikroppar för att påvisa var i vävnader och i vilka celler specifika proteiner är belägna med hjälp av immunhistokemi och flödescytometri. Teknikerna gör det möjligt att på ett mer precist sätt studera utbredningen av sjukdomsprocesser, och att studera samspel mellan olika cellslag i en vävnad. Också dessa typer av analyser utvecklas nu mycket snabbt. Vi har nyligen visat att den ovannämnda proximitetsligeringsmetoden i kombination med rullande-cirkel-replike-

ring gör det möjligt att påvisa enstaka proteinmolekyler i celler eller vävnadsprov, och att studera hur olika proteiner interagerar med varandra. Vi tror detta kan få stor betydelse både i forskningssammanhang och för att diagnostisera sjukdomar patologiskt-anatomiskt [19].

### Trender och tendenser vid biologiska undersökningar

Principen att biomedicinsk information nu inskaffas i allt större skala, ofta med utnyttjande av mikroarrayteknik, är tydlig inom många områden. Till exempel har man börjat arbeta med tekniker som kan göra det möjligt att mäta uttrycksnivåer av mycket stora antal proteiner samtidigt genom bindning till proteinmikroarrayer, men dessa metoder behöver förbättras för att kunna hantera det flertal proteiner som finns i mycket låga koncentrationer [20]. Också undersökningar av celler kan utföras i form av mikroarrayer där varje position upptas av en liten klunga levande celler. På detta sätt är det möjligt att samtidigt undersöka hur till exempel celler med en rad olika genetiska förändringar reagerar på behandling med cytostatika.

Storskaliga molekylära studier av den typ som diskuteras här utnyttjas ofta för att påvisa molekylära mönster, till exempel upp- och nedreglering av genuttryck, som kan vara av differentialdiagnostiskt värde. Först i andra hand kommer ambitionen att gå från observationer av sådana mönster till mekanistisk förståelse av de molekylära processer som är inblandade vid hälsa och sjukdom.

Röster höjs nu för att tiden är mogen att verkligen försöka förstå celler och vävnader som molekylära system vilkas dynamik går att beräkna matematiskt – vilket sedan länge har varit målet med molekylärbiologi. Ambitionen är att utifrån omfattande analyser på många nivåer (RNA, protein, metaboliter) försöka bygga upp en förståelse av hur olika molekyler samverkar i syfte att modellera molekylära processer, något som brukar betecknas systembiologi. Det är ett viktigt led i systembiologiska ansatser att förbättra undersökningsmetoder så att data kan insamlas för enskilda celler för att genom single-cell-studier påvisa olika cellers roller i vävnader.

Som ovan berörts förväntas det omfattande molekylära kartläggningsarbete som nu pågår påverka sjukvården på många sätt. Läkemedelsindustrin är intresserad av att använda de nya

verktygen för att hitta nya målmolekyler för läkemedelsbehandling, och att utnyttja storskaliga metoder för att ringa in de läkemedelskandidater som är värda att undersöka mer i detalj.

Också förutsättningarna för diagnostik kommer att förbättras drastiskt genom nya metoder. Dramatiskt ökad känslighet och förmågan att undersöka stora antal molekyler samtidigt kan förväntas leda till att en mängd diagnostiskt informativa molekyler identifieras, även om den utvecklingen fortfarande är överraskande långsam [20]. Vi kommer sannolikt att behöva mäta flera olika molekyler samtidigt för en säker diagnos. Helt nya klasser av analyter kan också komma att visa sig betydelsefulla, såsom till exempel interagerande proteiner eller proteiner som modifierats på olika sätt. Nya diagnostiska metoder kan som nämnts komma att få omfattande konsekvenser för sjukvården genom att göra det möjligt att sätta in terapi i mycket tidiga stadier, till exempel genom att identifiera och operera mycket små tumörer, eller kanske att tidigt sätta in behandling mot den långsamma ackumuleringen av skadliga proteiner vid Alzheimers sjukdom.

Avslutningsvis finns det alltså anledning att förvänta sig betydelsefulla effekter på sjukvården av framsteg inom molekylärmedicin. Vad det gäller Sverige har vi förutsättningar att fortsätta vår framgångsrika tradition av teknikutveckling med viktiga medicinska tillämpningar. Till exempel kan kombinationen värdefulla, i vissa fall världsunika samlingar patientprover i form av

biobanker, omfattande repertoarer av antikroppar mot mänskliga proteiner och helt nya, extremt känsliga och specifika molekylära tekniker visa sig utgöra en värdefull samlad resurs inom forskning och på längre sikt också för sjukvården.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Ulf Landegren och Mats Nilsson har grundat företaget Olink AB som har kommersiella rättigheter till hänglås- och proximitetsprober. I övrigt: Inga uppgivna.*

## REFERENSER

1. Pauling L, Itano HA, et al. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science*. 1949;110:543-8.
2. Consortium. IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431:931-45.
3. Altshuler D, Brooks LD, Chakravarti A, Collins FS, Daly MJ, Donnelly PA. Haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437:1299-1320.
4. Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, Kwiatkowski M, Chowdhary BP, Landegren U. Padlock probes: Circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science*. 1994;265:2085-8.
5. Syvänen AC, Aalto-Setälä K, Harju L, Kontula K, Söderlund HA. Primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. *Genomics*. 1990;8:684-92.
6. Howell WM, Jobs M, Gyllensten U, Brookes AJ. Dynamic allele-specific hybridization. *Nat Biotechnol*. 1999;17:87-8.
7. Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén PA. Sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998;281:363-5.
8. Alberts B. What I have learned from Jim. In: Inglis JK, Sambrook J, Witkowski JA, editors. *Inspiring*

annons

halv stående annons

- Science: Jim Watson and the age of DNA. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2003. p. 429-34.
9. Shendure J, Mitra RD, Varma C, Church GM. Advanced sequencing technologies: methods and goals. *Nat Rev Genet.* 2004;5:335-44.
  10. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005;437:376-80.
  11. Reich DE, Lander ES. On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet.* 2001;17:502-10.
  12. Weiss KM, Terwilliger JD. How many diseases does it take to map a gene with SNPs? *Nat Genet.* 2000;26:151-7.
  13. Mantripragada KK, Buckley PG, de Stahl TD, Dumanski JP. Genomic microarrays in the spotlight. *Trends Genet.* 2004;20:87-94.
  14. Fredman D, White SJ, Potter S, Eichler EE, Den Dunnen JT, Brookes AJ. Complex SNP-related sequence variation in segmental genome duplications. *Nat Genet.* 2004;36:861-6.
  15. Ohlsson R, Göndör A. Epigenetik - cellens minne -påverkar utvecklingen av sjukdom. *Läkartidningen.* 2006;103:919-25.
  16. Horak CE, Snyder M. ChIP-chip: a genomic approach for identifying transcription factor binding sites. *Methods Enzymol.* 2002;350:469-83.
  17. Gustafsdottir SM, Schallmeiner E, Fredriksson S, Gullberg M, Soderberg O, Jarvius M, et al. Proximity ligation assays for sensitive and specific protein analyses. *Anal Biochem.* 2005;345:2-9.
  18. Larsson C, Koch J, Nygren A, Janssen G, Raap AK, Landegren U, et al. In situ genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes. *Nat Meth.* 2004;1:227-32.
  19. Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstråle K, Leuchowius KJ, Jarvius J, et al. Direct observation in situ of individual endogenous protein complexes by proximity ligation. *Nature Meth.* In press.
  20. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1:845-67.

**Dela med dig  
av dina erfarenheter**  
Kommentera artiklarna  
i *Läkartidningen* direkt på  
[www.lakartidningen.se](http://www.lakartidningen.se)

Utmanande saklig

**Läkartidningen**