

## Kan möss hjälpa människor?

I Lund arbetar ett 30-tal forskare och doktorander under ledning av Rikard Holmdahl för att försöka förstå varför människor drabbas av reumatoid artrit. De har valt att använda djurmodeller för detta arbete eftersom det ofta kan vara den enda vägen om man ska kunna studera riktigt komplexa sjukdomar, och reumatoid artrit är en sådan komplex sjukdom (se faktaruta 1).

Dagens mediciner har huvudsakligen tagits fram med gissningar och

slumpens hjälp och det har varit svårt att få fram sådana som verkligen bromsar sjukdomens förlopp. När man väl fått fram sådana, har det ofta visat sig att de har biverkningar som kan vara svåra att kontrollera. Det faller självfallet tillbaka på att forskarna fortfarande inte vet varför sjukdomen bryter ut hos vissa människor, och varför den ibland får ett så destruktivt förlopp.

Det har inte saknats ansträngningar – det har publicerats mer än

70.000 vetenskapliga artiklar om reumatoid artrit de senaste 35 åren – och bakom varje artikel ligger noggrant genomförda undersökningar. Problemet är att man ofta blivit tvungen att begränsa sig till att beskriva ett förlopp, utan att kunna i detalj förstå sjukdomsmekanismer.

Den grundläggande forskningen har dock öppnat nya möjligheter. Dels har man med genetiska landvinningar gjort det möjligt att bestämma olika arvsanlag (gener) och framförallt vilka

### FAKTARUTA 1

## Reumatoid artrit är en komplex sjukdom som vi inte vet orsaken till

Reumatoid artrit (RA) (= ledgångsreumatism) är en av våra stora folksjukdomar, uppskattningsvis är 1% av befolkningen drabbad av sjukdomen. Den förekommer över hela jordklotet och är följaktligen en av de riktigt stora sjukdomarna. Den kan drabba en när som helst i livet, men debuterar oftast i medelåldern. Förloppet är varierande men oftast blir den kronisk och leder till invaliditet.

Trots att sjukdomen är så vanlig, trots att den förekommer över hela jordklotet, trots att den är svår och invalidiserande, trots att vi känt till den och diagnostiserat den så länge så vet vi ännu inte vad som orsakar den och det finns ingen behandling som på ett effektivt sätt kan förhindra eller stoppa sjukdomen. Visst har det forskats. Huvuddelen av forskningen har dock varit klinisk och deskriptiv och inte inriktad på att klarlägga sjukdomens orsaker. Visst har detta lett till att behandlingen har förbättrats och att lidandet minskat, men några avgörande framsteg vad det gäller att stoppa

sjukdomsprocessen har inte uppnåtts.

Samtidigt har förväntningarna på snabba och konkreta forskningsresultat från patienter, anhöriga och allmänhet varit stora och man kan ibland få intrycket att man nu löst "gåtan" och att nya effektiva behandlingar står för dörren. Så är dock inte fallet och vi vet fortfarande inte vilka de grundläggande orsakerna är. Det har funnits många svårigheter i arbetet att uppnå en djupare kunskap om sjukdomens orsaker.

#### 1) RA är en diagnos som sätts på grundval av en rad kliniska kriterier.

Kliniska kriterier är subjektiva kriterier, som kan variera mellan olika läkare och mellan olika länder. Detta innebär sannolikt att RA egentligen är ett flertal olika sjukdomar som alla manifesterar sig med samma symptombild.

#### 2) RA är delvis ärftlig men det finns ingen enkel ärftlighetsgång.

Många gener är av betydelse, och sannolikt även olika uppsättningar

av gener i olika individer. Detta innebär att det inte finns någon enstaka "defekt" gen som skulle kunna orsaka sjukdomen på ett liknande sätt som vissa andra sjukdomar till exempel cystisk fibros. Istället är det en sjukdom där många olika gener samverkar med varandra och med miljöfaktorer på ett komplext sätt.

#### 3) RA påverkas av miljöfaktorer.

Att miljöfaktorer är viktiga härrör från studier av enäggstvillingar där sjukdomsriskerna är långt från 100%. Hittills har ingen miljöfaktor kunnat påvisas, sannolikt för att miljöpåverkan är variabel och svår att kontrollera.

#### 4) RA är en kronisk sjukdom som går i skov.

Egna kurer upplevs ofta som verkningfulla eftersom de påbörjas när skovet är som värst. Detta ger svårigheter för testning av rationellt baserade behandlingar.

## FAKTARUTA 2

### Djurmodeller behövs

RA är en komplex sjukdom och för att förstå dess basala orsaker så måste väl definierade djurmodeller användas. Försöksdjur har många fördelar. Deras miljö kan kontrolleras. De kan göras inavlade och därmed kan även genernas inflytande på komplexa sjukdomar analyseras. Man kan också göra kontrollerade experiment på dem, vilket självklart inte bör göras på människor.

De försöksdjur som används är framförallt speciella stammar av möss och råttor. Ur genetisk syn-

punkt står de tillräckligt nära människan för att de basala biologiska sjukdomsmekanismerna ska kunna studeras - över 90% av den genetiska koden är identisk och arvsanlagen ligger samlade i samma ordning som hos människan.

En förutsättning för studierna är dock att RA förekommer i försöksdjuren. Efter många decenniers arbete har ett antal mer eller mindre bra modeller för RA hos möss och råttor beskrivits. De modeller som idag är de mest använda är modeller i vilka vissa

mus- och råttstammar utvecklar artrit efter att de blivit immuniserade med protein från ledbrosk. Vanligen använder man då kollagen typ II som är det dominerande proteinet i ledbrosk. En immunreaktion mot kollagen uppkommer i djuret vilket i sin tur leder till att ledbrosket attackeras. En sjukdom som är mycket lik den hos människa uppkommer. Denna sjukdom kallas för kollagen inducerad artrit (collagen induced arthritis; CIA).

varianter olika individer bär på. Dels har man utvecklat allt bättre djurmodeller för sjukdomen (se faktaruta 2).

Detta har gjort att det idag finns helt andra möjligheter än tidigare att studera sjukdomens orsaker och mekanismer vilket redan börjat bära frukt i form av nya läkemedel. Exempelvis utvecklades de s.k. TNF-alfa blockerarna först i djurmodeller, och det amerikanska läkemedelsverket ger nu för första gången i praktiken bindande restriktioner för läkemedelsbolagen att nya läkemedel och läkemedelsidéer måste testas i relevanta djurmodeller. Gruppen i Lund har varit en av de ledande för att etablera de djurmodeller som rekommenderas och är nu utvald av EU till att vara "training site" för blivande forskare i Europa för att lära dem djurmodeller för reumatoid artrit.

Vad kan man då göra med försöksdjur som man inte kan göra direkt på sjukdomen hos människor? För att riktigt förstå hur en komplex sjukdom kan utvecklas måste man både kunna reproducera den och testa olika behandlingar i grupper som får olika behandlingar. Man vet ofta inte i

förväg resultatet. Sådana risktagningar vill vi naturligtvis inte göra på människor.

Med försöksdjur öppnar sig dessutom ytterligare möjligheter, som vi kanske inte vanligtvis tänker på. De kan göras inavlade, vilket betyder att individer av en stam kan vara genetiskt identiska, och kanske ändå viktigare, vi kan kontrollera deras miljö. Det innebär att kontrollerade studier kan göras där man kan få svar på en fråga i taget. I takt med att vi vet allt mer om gener och om miljöfaktorer så ökar också respekten för hur komplicerat allt samverkar för att vår kropp ska fungera på ett optimalt sätt. Det har naturen lärt oss under miljoner år – en träning som både möss och människor har fått gå igenom. I verkligheten är vi – biologiskt sett – mycket närstående arter – och de flesta biologiska mekanismer förefaller fungera på ett mycket likartat sätt.

Det riktigt nya i dagens forskning är dock att vi för första gången börjar kunna studera den genetiska kodens betydelse för uppkomst av sjukdom. Människans genetiska kod är nyligen kartlagd och det öppnar helt nya

möjligheter. Fortfarande kommer det att vara enorma svårigheter att förstå komplicerade folksjukdomar som RA men kombinationen med djurmodeller kan leda till nya genombrott. Försöksmöss har i stort sett samma gener som människan, även om de bär på olika varianter och att det i mössen finns betydligt större möjligheter att kunna identifiera enskilda gener som är av betydelse för sjukdom (se faktaruta 3).

Gruppen i Lund arbetar hårt med dessa genetiska metoder och man har nått flera genombrott publicerade i ansedda vetenskapliga tidskrifter som "Nature Genetics" där man kunnat identifiera inom vilka områden på kromosomer sådana gener finns och också i vilka faser av sjukdomen de har betydelse.

Ett problem inom forskningen är dock ofta att exakt lokalisera sjukdomsgenerna och därefter direkt kunna undersöka deras roll i sjukdomsprocessen. Visserligen kan man nästan dagligen läsa om upptäckten av olika gener som orsakar sjukdomar. Detta har dock gällt medfödda sjukdomar och ej sjukdomar som kan tyckas drabba människor av en slump

## FAKTARUTA 3

Fötter från två möss som endast skiljer sig med avseende på Ab-genen. Den högra (med transgen Ab gen av q-typ) har utvecklat CIA.



## Sjukdomsgener kan definieras hos möss

Försöksdjur kan vara mycket användbara för att identifiera gener som styr komplexa sjukdomar. Det är bara vissa, men inte andra, inavlade mus- och råttstammar som är känsliga för utveckling av CIA, även om de utsätts för likartad miljö och induceras på samma sätt. Vilka gener har då de känsliga stammarna som de resistent inte har? Detta har hittills inte varit så lätt att ta reda på. Musen, liksom människan, har mer än 60.000 gener och den genetiska koden har hittills inte bestämts i någon enda individ av varken mus eller människa.

Det görs stora insatser för att sekvensbestämma hela DNA-koden och en första preliminär sekvens av hela det mänskliga genomet har sannolikt publicerats när du läser detta. Det kommer dock att ta tid att förstå dess budskap och för att underlätta har man nu också påbörjat arbetet med att sekvensa musens genom. Det beräknas bli klart år 2003. Man måste kunna bestämma hur generna fungerar och hur de samverkar för att förstå hur de kan tillåta immunsystemet att göra ett så ödesdigert misstag som att tillåta en attack mot de egna lederna. Tekniker har dock utvecklats de senaste åren och därmed har nya möjligheter för sådana studier öppnats.

För att enstaka gener ska kunna identifieras så måste de först blandas

Detta görs genom att inavla musstammar korsas. I en inavlad stam har alla individer samma gener. Det innebär att den kromosom som ärvs från honan är lika den kromosom som kommer från hanen. Om två inavlade stammar korsas med varandra så kommer kromosomerna att bli olika eftersom honan och hanen i föräldragenerationen (P) är olika. Kromosomerna finns i par och alla individer har en dubbel uppsättning. Resultatet blir att alla individer i denna första generation (F1) kommer att bli genetiskt lika. Med dessa blir det svårt att se hur individuella gener beter sig. Det kommer vi att kunna göra om vi korsar mössen med varandra. Avkomman (F2) kommer då att ha generna från "mamman" och "pappan" blandade.

Detta har man vetat sedan Mendel beskrev ärftlighetslagarna. Vad man inte kunde då, och som man lyckats med först under de senaste åren, är att kunna identifiera var olika gener från "mamma" respektive "pappa" hamnat hos "barnbarnen". Den mest effektiva identifikationsmetoden har visat sig vara att identifiera repeterande sekvenser av baser i DNA-koden. Sådana repeterande sekvenser kallas för "mikrosatelliter" och de har olika längd i olika individer och förekommer på flera hundra tusen ställen i genomet - både i mus och i människa.

Nu finns det alltså tekniker att

identifiera varje individuell F2-mus; vilka avsnitt av genomet den har ärvt från vilken av far- eller morföräldrar. Därmed kan vi analysera vilka genavsnitt som bäst korrelerar till sjukdom. Med en sådan metod var gruppen i Lund först i världen med att kunna identifiera genregioner hos mus som styr en modell för multiple skleros. MS är en sjukdom vars grundläggande mekanismer sannolikt liknar de hos RA, men immunsystemet angriper det centrala nervsystemet istället för lederna. Med hjälp av denna information kunde vi tillsammans med en finsk forskargrupp identifiera samma genregion hos människa. Samma tekniker har de använt på modeller för RA och kunnat identifiera de viktigaste genregioner i flera av de viktigaste modellerna.

Att man hittar ett ställe där en av sjukdomsgenerna finns innebär inte att genen har identifierats. Till detta är ett stort steg. Det närmaste man kan komma i de ovan beskrivna experimenten är att lokalisera regioner vilka innehåller drygt tusen gener. Vilken av dessa är den väsentliga? Detta har visat sig vara svårt och det finns mycket få exempel där man kunnat identifiera gener i så komplexa sjukdomar som RA och MS, ens i försöksdjur.



senare i livet såsom t ex reumatoid artrit gör.

Studier i försöksdjur visar dock att det är möjligt. Och det är även möjligt att genetiskt förändra försöksdjuren så att genernas betydelse kan studeras. Inte nog med det, man har också kunnat använda de motsvarande mänskliga generna – och de har visat samma sjukdomsframkallande funktion! (se faktaruta 4).

Även sådana studier har gjorts av gruppen i Lund, och även det har varit ett genombrott där svensk reumatologisk forskning har uppmärksammats internationellt.

Professor Rikard Holmdahl, Lunds universitet

## FAKTARUTA 4

### Gener kan förändras hos möss

För flera år sedan lyckades vi, tillsammans med andra forskargrupper, identifiera en genregion som är en av de mer väsentliga för att musen ska utveckla CIA. Denna genregion, som bland annat rymmer gener för olika så kallade transplantationsmolekyler, det vill säga molekyler som finns på ytan av celler och som deltar i immunspecifika reaktioner, har man också länge misstänkt vara av betydelse även i RA. Den innehåller dock tusentals olika gener som kan vara av betydelse.

För att kunna identifiera en sådan gen så strukturbestämde vi några misstänkta gener i denna region och visade att de skiljde mellan en resistent stam och en känslig. Det

visade sig att en sådan kandidatgen, som var en MHC klass II gen av A-typ, endast skiljde sig med 4 aminosyror mellan den känsliga varianten (q-typ) och den resistent varianten (av p-typ). För att bevisa om det var just denna gen så isolerades p-varianten av genen som ett DNA-fragment och muterades in vitro, så att den var identisk med q varianten vad gäller kodningen av de 4 aminosyrorerna. Den muterade genen sprutades in i befruktade ägg från en resistent p-mus och dessa ägg gav sedan upphov till nya transgena möss. Dessa transgena möss skiljde sig därmed med avseende på en enda gen.

När sedan sjukdomskänsligheten studerades så visade det sig att de transgena mössen uppvisade lika hög

känslighet för CIA som möss med q-varianten. Slutsatsen kunde därmed dras att denna gen är väsentlig för utveckling av CIA och det är sannolikt att motsvarande gen hos människans också är viktig för RA. De har sedan gått vidare på den linjen tillsammans med en dansk grupp och inducerat sjukdom hos möss som gjorts transgena med människans variant av samma gen (DR4) och på motsvarande sätt med en gen som man tror vara associerad med MS (7, 8). Det visade sig då att även dessa gener gjorde mössen känsliga för RA respektive MS-liknande sjukdom. Detta öppnar nu helt nya möjligheter att förstå hur dessa gener opererar och varför RA utvecklas.