

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

Korrespondance: *Edvard Marinovskij*, MR-Centret, Billeddiagnostisk Afdeling, Århus Universitetshospital, Skejby, DK-8200 Århus N.
E-mail: mailto:aem@sks.aaa.dk

Antaget: 17. april 2008
Interessekonflikter: Ingen

Artiklen bygger på et større antal referencer. En fuldstændig litteraturliste kan findes sammen med artiklen på www.ugeskriftet.dk.

Litteratur

1. Ascher SM, Takahama J, Jha RC. Staging of gynaecologic malignancies. Topics in Magnetic Resonance Imaging 2001;12:105-29.
2. Akin O, Mironov S, Pandit-Taskar N et al. Imaging of uterine cancer. Radiol Clin N Am 2007;45:167-82.
5. Kinkel K, Yasushi K, Yu KK et al. Radiologic staging in patients with endometrial cancer: a meta-analysis. Radiology 1999;212:711-8.
8. Hricak H, Chen M, Coakley FV et al. Complex adnexal masses: detection and characterization with MR imaging – multivariate analysis. Radiology 2000;214:39-46.
9. Forstner R. Radiological staging of ovarian cancer: imaging findings and contribution of CT and MRI. Eur Radiol 2007;17:3223-46.
12. Frate CD, Girometti R, Pittino M et al. Deep retroperitoneal pelvic endometriosis: MR imaging appearance with laparoscopic correlation. Frate CD, Girometti R, Pittino M et al. Radiographics 2006;26:1705-18.
20. Dueholm M, Lundorf E, Hansen ES et al. Accuracy of magnetic resonance imaging and transvaginal ultrasonography in the diagnosis, mapping, and measurement of uterine myomas. Am J Obstet Gynecol 2002;186:409-15.
21. Ascher SM, Jha RC, Reinhold C. Leiomyomas and adenomyosis. Topics in Magnetic Resonance Imaging 2003;14:281-304.
22. Troiano RN. Magnetic resonance imaging of mullerian duct anomalies of the uterus. Topics in Magnetic Resonance Imaging 2003;14:269-80.
23. Webb JAW, Thomsen HS, Morcos SK et al. The use of iodinated and gadolinium contrast media during pregnancy and lactation. Eur Radiol 2005;15:1234-40.

Associationsstudier af hele genomet

Statistiker Bjarke Feenstra, epidemiolog Heather Allison Boyd & professor Mads Melbye

Statens Serum Institut, Afdeling for Epidemiologisk Forskning, København

Det genetiske associationsstudium er et vigtigt redskab til afdækning af genetiske risikofaktorer for sygdom. I sin simpleste form sammenligner metoden hyppigheden af en genvariant blandt personer med en given sygdom med hyppigheden i en gruppe af raske kontrolpersoner. Man kan derved afgøre, om genvarianten er associeret med sygdommen.

Indtil for nylig er associationsstudier primært blevet benyttet til undersøgelser af kandidatgener, hvor et eller flere gener udvælges med baggrund i deres funktion og en formodet sammenhæng med den givne sygdom. Derpå undersøges man, om en målbar genetisk markør, f.eks. en enkeltnukleotidpolymorfi (*single nucleotide polymorphism, SNP*), har forskellig allelfrekvens hos patientgruppen i forhold til kontrolgruppen.

Tusindvis af associationer mellem genvarianter og komplekse folkesygdomme er publiceret i tidens løb, men til stor frustration for forskerne er stort set ingen af disse associationer konsekvent genfundet i efterfølgende uafhængige undersøgelser [1] – indtil for nylig.

I 2007 skete der et nybrud inden for den genetiske epidemiologi. Teknologiske landvindinger har gjort det muligt at foretage associationsstudier med 100.000-vis af SNP'er fordelt over hele genomet (såkaldte *genome-wide association studies, GWA-studier*). I modsætning til kandidatgenstudier opstilles

ingen a priori-hypoteser om, at SNP'er i bestemte udvalgte gener har betydning for sygdommen. I stedet lader man data tale ved at undersøge SNP'er over hele genomet – og kan derved identificere SNP'er i hidtil upåagtede gener eller i regulatoriske områder uden for noget gen. Et uset stort antal genetiske risikofaktorer er blevet identificeret og eftervist for komplekse sygdomme som f.eks. prostatakræft, brystkræft, kardiovaskulær sygdom, diabetes, inflammatorisk tarmsygdom, grøn stær og leddegigt inden for det seneste år. I denne statusartikel ser vi på baggrunden for denne udvikling, nogle af resultaterne og de fremtidige perspektiver.

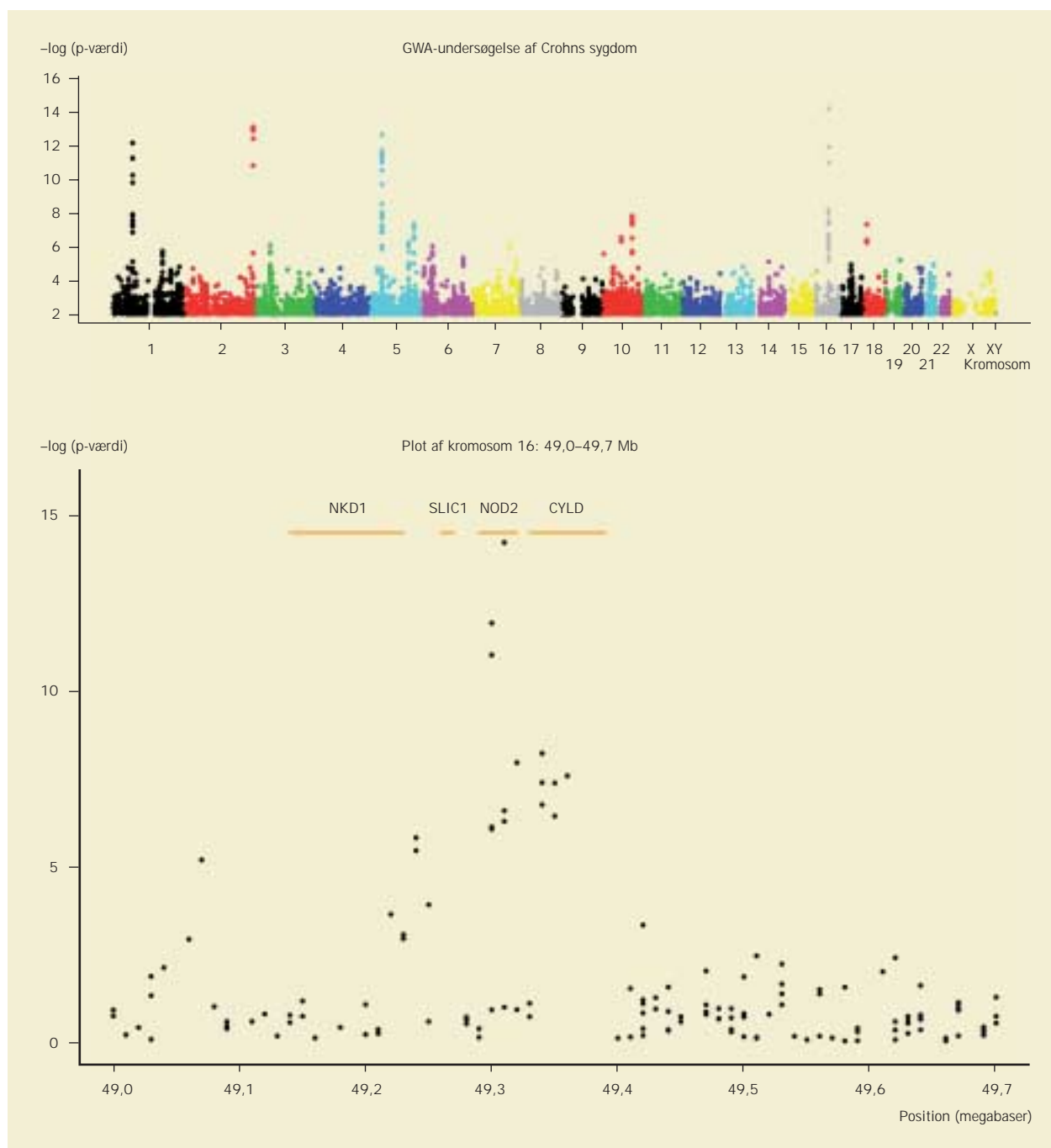
Metoder til genkortlægning

Klassiske familie- og tvillingestudier har etableret, at der er en betydelig genetisk prædisponering både for sjældne lidelser som cystisk fibrose, seglcelleanæmi og blødersygdom samt for almindelige komplekse sygdomme som cancer, hjerte-kar-sygdom, diabetes, psoriasis og fedme.

På molekylært niveau benyttes to centrale værktøjer i jagen på kausale genvarianter: genetiske koblingsanalyser og associationsstudier. Koblingsanalyse indebærer, at familier med to eller flere afficerede personer undersøges. De afficerede og eventuelt nogle raske slægtninge genotypes for op til et par tusinde genetiske markører (mikrosatellitter) fordelt over hele genomet, og man undersøger, om de afficerede genetisk set ligner hinanden mere, end man skulle forvente ud fra deres familiære relation.

Koblingsanalyse og efterfølgende finkortlægning er med succes blevet benyttet i studiet af mendelske sygdomme, hvor et enkelt defekt gen er impliceret, og hvor den relative risiko for at udvikle sygdommen for bærere af sygdomsallelen er

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL



Figur 1. Resultater fra Wellcome Trust Case Control Consortium GWA-studiet af Crohns sygdom [8]. Hvert punkt svarer til resultatet for en *single nucleotide polymorphism* (SNP) og viser $-\log$ af p-værdien for associationstestet plottet mod genomposition. Øverst ses resultater for hele genomet med kraftige signaler på kromosom 1, 2, 5, 10, 16 og 18. Nederst ses et detaljeret billede af regionen fra 49,0 til 49,7 megabaser på kromosom 16. Der er fire gener, NKD1, SLIC1, NOD2 og CYLD, i området, og tre SNP'er i genet NOD2 har p-værdier $< 10^{-10}$. I dette tilfælde bekræfter resultatet en allerede kendt association mellem varianter af NOD2 og Crohns sygdom. Data fra studiet samt en oversigt over involverede forskere kan hentes på <http://www.wtccc.org.uk>. Studiet blev støttet af Wellcome Trusts bevilling 076113.

høj. Når det gælder almindelige komplekse sygdomme, som influeres af mange gener og af miljøfaktorer, har stort set ingen påståede fund dog kunnet eftervises senere.

En fremsynet artikel i 1996 af *Risch & Merikangas* [2] omhandlede denne observation. Forfatterne viste ved hjælp

af styrkeberegninger, at koblingsanalyse ikke var velegnet til at finde gener for komplekse sygdomme med mange gener involveret, og hvor hvert gen har lille effekt. Det ville kræve titusinder af familier i hver undersøgelse. Den nødvendige prøvestørrelse ved associationsstudier er derimod langt

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

mindre, og *Risch & Merikangas* forudså, at GWA-studier ville blive fremtidens genkortlægningsmetode. To forudsætninger måtte dog opfyldes. Det var nødvendigt med detaljeret viden om mønstre for variation i det humane genom, og det skulle være teknisk muligt rutinemæssigt at genotype 100.000-vis af SNP'er per person.

Den første præmis er blevet opfyldt gennem massiv grundforskning; den anden ved at biotekfirmaer som Affymetrix, Illumina og Perlegen i skarp konkurrence har udviklet og kommercialiseret DNA-mikrochips, som giver op til 1 mio. SNP-genotyper pr. person med meget lille fejlrate.

Haplotypevariation og dækning af genomet

Et centralt krav til GWA-studier er, at så meget som muligt af den genetiske variation i genomet dækkes. Det humane

genomprojekt fastslog rækkefølgen af de 3 mia. basepar og placeringen af de 25.000 gener i genomet, men det var ikke designet til at belyse genetiske variationer inden for og mellem forskellige etniske grupper.

Det internationale HapMap-projekt fokuserer på denne opgave. I alt 270 individer fra fire forskellige etniske grupper (hvide, vestafrikanere, kinesere og japanere) er blevet genotyperet for flere end 3 mio. ud af de ca. 11 mio. kendte SNP'er, svarende til en gennemsnitlig tæthed på 1 SNP pr. 1.000 basepar [3].

HapMap projektet har ikke blot givet information om allelfrekvenser for enkelte SNP'er, men også om korrelationer mellem SNP'er, der sidder tæt ved hinanden på samme kromosom, dvs. om hyppigheder af forskellige haplotyper. Det har vist sig, at haplotypediversiteten er langt mindre end forventet. Hvis man f.eks. forestiller sig fem SNP'er ved siden af hinanden, vil der være $2^5 = 32$ mulige haplotyper i populationen, men ofte ses kun et par stykker. Det skyldes, at rekombinationer fortrinsvis sker i bestemte områder af genomet (hotspots). På populationsniveau er der således en struktur af haplotypeblokke, hvor SNP'er inden for hver blok er højt korrelerede [4].

Det er denne blokstruktur, som gør GWA-studier mulige. I stedet for at skulle genotype alle 11 mio. SNP'er for hver person i et studium kan man nøjes med et par SNP'er i hver haplotypeblok, svarende til 300.000-500.000 SNP'er i alt, og stadig fange størstedelen af den genetiske variation.

Hvis der reelt set er en kausal genvariant i en blok, og man har fanget signalet, kan det således skyldes to ting. Man kan have været heldig, at den SNP, der viser kraftigst association til sygdommen, er en funktionelt betydningsfuld variant. Som oftest vil man dog i stedet have genotyperet en SNP, der er i såkaldt koblingsuligevægt med den kausale variant, dvs. at der er høj korrelation mellem de to loci. Det at prædikere et individs genotype for en SNP ud fra kendte genotyper af en eller flere omkringliggende SNP'er kaldes imputation og er et vigtigt statistisk redskab til analyse af associationsstudier af hele genomet [5].

Fundne associationer

Efter tilløb i 2005 og 2006 med succesfulde GWA-studier af aldersrelateret makulær degeneration [6] og Crohns sygdom [7] tog sagerne for alvor fart i 2007.

I juni måned blev verdens hidtil største GWA-studium publiceret af det britiske Wellcome Trust Case Control Consortium [8]. Studiet inkluderede 14.000 patienter fordelt på syv forskellige sygdomme (bipolar sygdom, koronararteriesygdom, Crohns sygdom, kronisk leddegigt, hypertension, type 1- og type 2-diabetes) og resulterede i 24 signifikante varianter. Halvdelen heraf bekræftede tidligere fund, og af den anden halvdel er ti varianter blevet eftervist i uafhængige case-kontrol-studier. **Figur 1** illustrerer resultaterne fra GWA-studiet af Crohns sygdom.

Faktaboks

Allel: Et individ har to kopier, såkaldte alleller, af hvert gen/markør, en fra hver forælder. De to alleller kan være identiske eller forskellige. I befolkningen kan der godt findes flere end to mulige alleller; for SNP'er er der dog næsten altid kun to alleller.

Fænotype: Et observerbart eller måleligt træk ved et individ, f.eks. højde eller tilstedeværelse af en sygdom.

Genetisk markør: Et locus med to eller flere alleller i populationen, som kan måles (genotypes). GWA-studier udnytter, at markører på grund af koblingsuligevægt kan give information om kausale genetiske varianter, som ikke er genotyperet.

Genotype: Et individs to specifikke alleller på et bestemt locus.

Haplotype: Kombination af alleller for forskellige gener eller markører, som er placeret tæt ved hinanden på det samme kromosom (dvs. kommer fra samme forælder).

Koblingsuligevægt: Når en bestemt haplotype forekommer oftere i populationen, end man ville forvente, hvis allellerne på de involverede loci blev nedarvet uafhængigt af hinanden.

Locus (pl. loci): En specifik position i genomet, f.eks. af et gen eller en markør.

Mikrosatellit: En genetisk markør, der består i et variabelt antal gentagelser af små DNA-blokke (f.eks. ACACAC). Mikrosatellitter er velegnede til koblingsstudier og retsgenetik.

SNP (single nucleotide polymorphism): En enkelt variabel baseposition i en DNA-streng. SNP'er er de hyppigste genetiske markører i genomet og benyttes blandt andet til GWA-studier.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

Tabel 1. Eksempler på fund i GWA-studier i 2007.

Fænotype	SNP	Kromosom	Bemærkninger	Odds-ratio	p-værdi
Prostatakræft	rs6983267	8q24	Mere end 100 kb fra nærmeste gen; også risikovariant for tyktarmskræft	1,26	9×10^{-13}
	rs4430796	17q12	I intron 2 af genet TCF2; beskytter også mod type 2-diabetes	1,22	1×10^{-11}
Brystkræft	rs2981582	10q26	I intron 2 af genet FGFR2	1,26	2×10^{-76}
Myokardieinfarkt	rs10757278	9p21	I samme haplotypeblok som tumor-suppressorgenerne CDKN2A og CDKN2B	1,28	1×10^{-20}
Type 2-diabetes	rs4402960	3q27	I intron 2 af genet IGF2BP2	1,14	9×10^{-16}
Atrieflimren	rs2200733	4q25	Ingen gener i samme haplotypeblok; nærmeste gen er PITX2 i den ene tilstødende haplotypeblok	1,72	3×10^{-41}
Leddegigt	rs10499194	6q23	Mere end 150 kb fra nærmeste gen	0,75	2×10^{-8}
Grøn stær	rs2165241	15q24	I intron 1 af LOXL1; opfølgende fin-kortlægning viste, at signalet skyldtes to SNP'er i exon 1 af genet, som giver forskellige aminosyresekvenser	3,62	1×10^{-27}

Kb = kilobaser; fysisk afstandsmål. Introner er ikkekodende dele af gener; exoner er kodende dele.
SNP = *single nucleotide polymorphism*.

En lang række yderligere GWA-studier har fundet og bekræftet genvarianter for sygdomme som prostatakræft, brystkræft, tyktarmskræft, myokardieinfarkt, diabetes, atrieflimren, dissemineret sklerose, galdesten, grøn stær og fedme, samt andre fænotyper som højde og pigmentering af hår, øjne og hud (Tabel 1).

Perspektiver

Den første bølge af GWA-studier har givet et væld af overbevisende resultater, og den indhøstede viden og erfaring giver et fingerpeg om feltets udvikling. Det er kendetegnende, at de fundne genvarianter sjældent er i formodede kandidatgener og ofte ikke engang i nærheden af noget gen. Mekanismerne bag associationerne mellem genvarianter og sygdom er derfor som oftest fuldstændig ukendte, og en stor kommende udfordring bliver at belyse dette nærmere ved hjælp af funktionelle studier i dyremodeller, celle- og molekylærbiologisk forskning samt kliniske forsøg.

To yderligere fællestræk ved GWA-studier understreger, at samarbejde på tværs af forskningsgrupper er yderst vigtigt. For det første er den relative risiko for at udvikle sygdom ofte kun let forhøjet for bærere af en genvariant. Det er derfor nødvendigt med meget store studier, f.eks. i form af konsortiesamarbejder, for at opnå god statistisk styrke. En tommelfingerregel siger, at man har brug for minimum 1.000 cases og 1.000 kontroller for at kunne finde genvarianter med relativ risiko på 1,5. For det andet er potentialet for falsk-positive resultater enormt med 300.000 eller flere tests. Der stilles derfor skrappe krav fra bevillingsgivere og tidsskrifter om, at associationssignaler skal bekræftes i en eller flere uafhængige case-kontrol-populationer [9], hvilket igen fordrer samarbejde.

En række resurser bliver udviklet med henblik på at mulig-

gøre deling af data. National Institute of Health (NIH) i USA har som det fremmeste eksempel skabt en database (dbGaP), hvor fænotype- og genotypedata fra alle NIH-finansierede GWA-studier vil blive lagret og stillet til rådighed for øvrige forskere [10]. Som forsker kan man dermed kombinere sine egne GWA-data med publicerede data for den samme sygdom og få ekstra statistisk styrke. Eller man kan vinde styrke ved at tilføje data fra etnisk matchende kontrolpersoner til sin egen kontrolgruppe. Med 1.000 cases og 4.000 kontroller får man eksempelvis omtrent lige så stor styrke som med 2.000 cases og 2.000 kontroller.

Et fra en dansk synsvinkel spændende aspekt ved den næste bølge af GWA-studier er, at der lægges vægt på også at inddrage miljøfaktorer og gen-miljø-vekselvirkninger. Her giver de danske sundhedsregistre samt eksistensen af store epidemiologiske kohortestudier med tilhørende biobanker unikke muligheder for detaljeret og præcis information om fænotyper og kovariater. Dette afspejles allerede af, at 4.000 individer fra kohorten *Bedre sundhed for mor og barn* er blevet udvalgt til et GWA-studium af præterm fødsel under NIH-programmet Genes, Environment and Health Initiative.

Associationsstudier af hele genomet har vist sig som et uovertruffet redskab til identifikation af genetiske risikofaktorer for komplekse sygdomme. Ultimativt set må værdien af anstrengelserne dog måles i vore fremskridt i forebyggelse og behandling af sygdom. For at nå dertil forestår der i de kommende år et stort forskningsarbejde med afklaringen af de kausale mekanismer, som ligger bag associationerne mellem genetiske varianter og sygdom.

Korrespondance: *Bjarke Feenstra*, Afdeling for Epidemiologisk Forskning, Statens Serum Institut, Artillerivej 5, DK-2300 København S. E-mail: fee@ssi.dk

Antaget: 24. marts 2008
Interessekonflikter: Ingen

Litteratur

1. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E et al. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002;4:45-61.
2. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996;273:1516-7.
3. The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007;449:851-61.
4. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002;296:2225-9.
5. Marchini J, Howie B, Myers S et al. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet* 2007;39:906-13.
6. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:385-9.
7. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461-3.
8. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661-78.
9. NCI-NHGRI Working Group on Replication in Association Studies. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* 2007;447:655-60.
10. Mailman MD, Feolo M, Jin Y et al. The NCBI dbGaP database of genotypes and phenotypes. *Nat Genet* 2007;39:1181-6.

Pensionering af kreatininkinase myocardial band

Overlæge Pal Bela Szecsi

Gentofte Hospital, Klinisk Biokemisk Afdeling

Nye og bedre analyser er ofte overraskende længe om at vinde indpas i dagligdagen. Tilsvarende har forældede analyser svært ved at gå i graven. For eksempel forespørges der stadig med mellemrum om sure fosfater nu snart 20 år efter, at afløseren prostataspecifikt antigen har vundet indpas.

I starten af min karriere blev leukocytter, sænkning, lactatdehydrogenase, aspartattransaminase og kreatininkinase (CK) anvendt som biokemisk støtte til klinik og elektrokardiogram med henblik på påvisning af myokardieskade. I slutningen af 1970'erne fremkom de mere hjertespecifikke isoenzymer kreatininkinase B (CK-B), lactatdehydrogenase-1 og krea-

tininkinase *myocardial band* (CK-MB). Da CK-MB blev tilgængelig på automatisk udstyr, blev forhøjet CK-MB nærmest et synonym for akut myokardieinfarkt, selv om det tog en del tid at få analysen indført alle steder.

Allerede sidst i 1970'erne blev der publiceret rapporter om de kardiiale varianter af de tynde filamentproteiner troponin I (TnI) og troponin T (TnT). I modsætning til CK-MB udtrykkes troponiner stort set udelukkende i myokardiet, og udslip til blodbanen er derfor mere specifikt og sensitivt for hjertemuskelskade [1]. Troponinanalyserne fik dog først klinisk betydning, da der blev udviklet tilgængelige målemetoder [2-4], og de er inden for de seneste år indført overalt her i landet. Implementering af troponinanalyser blev mange steder mødt med en vis skepsis, og det medførte ikke, at man afstod fra CK-MB. I mange år er begge typer af analyser udført sideløbende på mange sygehuse.

Nu i 2007 er der endelig fra både international biokemisk og kardiologisk side publiceret kliniske retningslinjer, der blandt andet er trykt i *Clinical Chemistry* og *European Heart Journal* [5, 6], hvori det anbefales at anvende troponin som markør og kun at anvende CK-MB, hvis troponin ikke er til rådighed. Måling af troponiner kan også anvendes ved mistanke om reinfarkt eller procedurerelateret perkutan koronarintervention og koronar bypass myokardieinfarkt [6-8]. Tolkning af troponiner ved reinfarkt kan være lettere med TnI end TnT på grund af den hurtigere eliminationshastighed og det manglende difasiske forløb [4]. De kliniske retningslinjer anbefaler desuden, at total CK ikke længere anvendes.

Dansk Kardiologisk Selskab anfører stadig i deres vejledning om akut koronart syndrom noget forsigtigt »Biokemiske markører for myokardieiskæmi (CKMB masse og/eller troponin I/T) ved indlæggelse og efter 6-9 timer og eventuelt også efter 12-24 timer«. Flere sygehuse i Danmark er dog allerede helt ophørt med at måle CK-MB og anvender kun analysen i

Faktaboks

Pensionering af kreatininkinase myocardial band (CK-MB)

- Nye analyser er ofte længe om at vinde indpas; tilsvarende har forældede analyser svært ved at gå i graven.
- Internationale biokemiske og kardiologiske, publicerede kliniske retningslinjer anbefaler nu at anvende troponin som markør og kun at anvende CK-MB, hvis troponin ikke er til rådighed. På trods heraf måler man på 23 af 46 danske laboratorier stadig CK-MB. Dette bevirker på landsplan en merudgift på flere millioner kroner (og minutter).
- Det anbefales at følge de internationale kliniske retningslinjer og pensionere CK-MB (og CK) til diagnostisering af akut koronart syndrom.