

Hvorfor mutasjoner gir sykdom – et proteinkjemisk perspektiv

Mutasjoner er grunnlaget for genetisk mangfold og nødvendig for evolusjon, men kan også forårsake sykdom og død. Selv blant friske mennesker finnes det tallrike genetiske polymorfismer, og i løpet av livet oppstår det stadig nye somatiske mutasjoner. Selv om de fleste mutasjoner er «tause», kan noen være dødelige. Nesten uansett mutasjonstype eller lokalisering finnes det ingen gode metoder for a priori å forutsi de funksjonelle konsekvensene (fenotype) av en gitt mutasjon.

Ettersom hovedfunksjonen av DNA er å kode for proteiner, er det naturlig å studere følgene av mutasjoner på proteinenes struktur og funksjon. I denne artikkelen gir vi en kortfattet oversikt over sammenhengen mellom mutasjoner og proteinstruktur.

Vi argumenterer for at studier av proteiners kinetiske og termodynamiske stabilitet kan gi nyttig informasjon om effekten av mutasjoner, og vi beskriver prosedyrer for å kunne studere effekten av mutasjoner eksperimentelt. En slik analyse vil ofte omfatte både de native, de denaturerte og de aggregerte tilstander av villtypeproteinene samt dets muterte former. Fenylylketonuri (Føllings sykdom) er en arvelig metabolsk sykdom som oftest er assosiert med mutasjoner i genet for fenylalaninhydroksylase. Det beskrives hvordan ulike molekylære mekanismer kan inaktivere dette enzymet. Vi konkluderer med at vår kunnskap om sammenhengen mellom mutasjoner og proteinfunksjon fremdeles må betraktes som meget ufullstendig, men at dette forskningsfeltet forventes å utvikle seg raskt i de nærmeste år.

Vår kunnskap innen molekylærbiologi og genetik har i løpet av få år gjennomgått en revolusjon som gradvis er i ferd med å forandre medisinsk diagnostikk og behandling. I april 2000 annonserte det private selskapet Celera at de hadde sekvensert nesten hele det humane genom. I februarnummeret av *Science* ble disse resultatene publisert (1). Denne informasjonen, sammen med dataene

Rune Kleppe

Institutt for biokjemi og molekylærbiologi
Universitetet i Bergen
Årstadveien 19
5009 Bergen

Per M. Knappskog

Senter for medisinsk genetik og
molekylærmedisin
Haukeland Sykehus
5021 Bergen

Jan Haavik

Jan.Haavik@pki.uib.no
Psykiatrisk klinikk
Haukeland Sykehus
5021 Bergen

Kleppe R, Knappskog PM, Haavik J.

Why do mutations cause disease? A protein chemical approach.

Tidsskr Nor Lægeforen 2001; 121: 2717–20.

Background. Mutations are of fundamental importance for genetic diversity and evolution, but are also associated with diseases and death. Genetic polymorphisms are common even among healthy individuals and somatic mutations develop in large numbers throughout life. Although most mutations are classified as silent, others may be fatal. No universal procedures exist for the prediction of mutation phenotype.

Material and methods. As the main function of DNA is to code for proteins, it is logical to examine the impact of mutations on protein structure and function. On the basis of available databases and our own studies on mutations, protein structure and disease, we present a brief overview of their relationship. The phenylketonuria-associated mutations in human phenylalanine hydroxylase are discussed in more detail, as phenylketonuria is often considered a model system for other inherited metabolic diseases.

Results and interpretation. We argue that studies of the kinetic and thermodynamic stability of proteins are important in order to understand the effects of many mutations, and we describe such studies. Knowledge about native, denatured and aggregated forms of proteins is essential to the understanding of how mutations can affect protein stability. We conclude that much of our knowledge in this area is still rudimentary, but we expect that this field of research will evolve rapidly over the next few years.

fra de akademiske institusjoner som ble publisert dagen før i *Nature* (2), åpner helt nye muligheter for søk etter årsak til arvelige komponenter for alvorlig sykdom. De fleste medisinske tidsskrifter trykker nå artikler

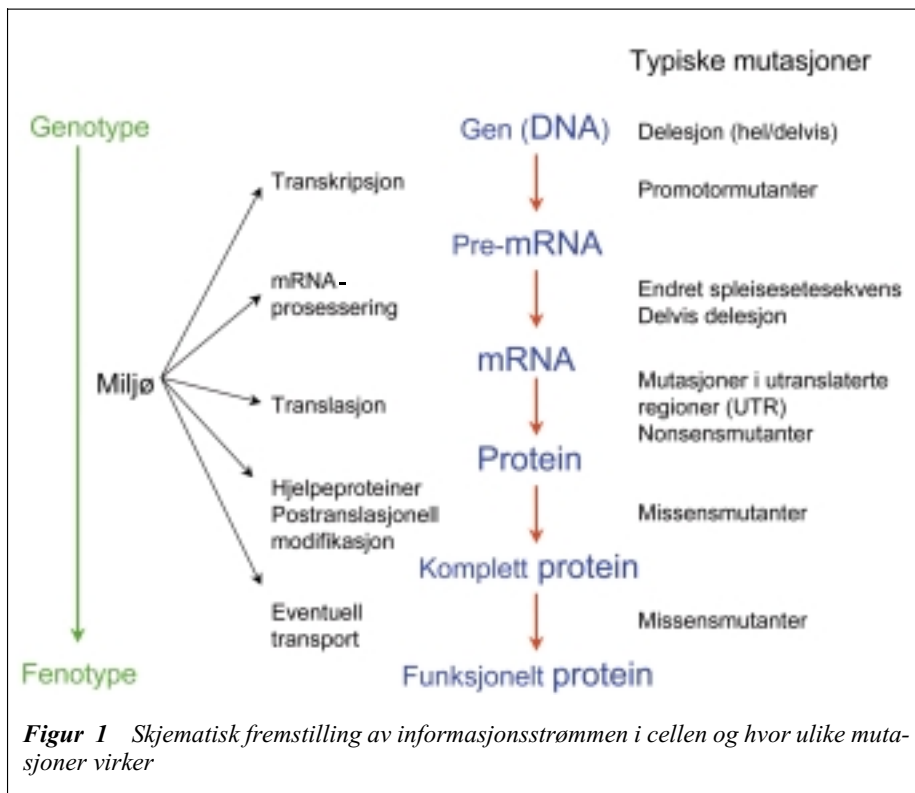
der det beskrives sykdomsassosierte mutasjoner.

Basert på denne massive flommen av nye data omkring mutasjoner og sykdom kan man lett konkludere med at «mutasjoner gir sykdom» og at «årsaken» til en sykdom er funnet straks man har påvist en mutasjon i et spesifikt gen. Denne antakelsen vil ofte være feil, fordi mutasjoner kan gi effekter på en rekke ulike nivåer, og fordi man for de færreste mutasjoner kjenner de molekylære mekanismer som eventuelt forårsaker sykdom. I denne artikkelen gir vi en kortfattet oversikt over forholdet mellom mutasjoner og funksjonelle endringer i genproduktene, belyst med eksempler fra andres og egen forskning.

Mutasjoner kan enten oppstå ved eksponering for ulike miljøfaktorer (mutagene kjemikalier, stråling etc.) eller ved at DNA-polymerasene gjør feil ved replikasjonen av DNA i forbindelse ved celledeling. Mutasjoner er kilden til genetisk variasjon hos alle levende organismer, inkludert mennesker. Hos mennesker er det så langt påvist enkelt-nukleotidpolymorfismer (SNP) i gjennomsnittlig hvert 1250. basepar, dvs. totalt over to millioner polymorfismer i hele genomet (1). Denne genetiske variasjonen kan trolig forklare en stor del av den normale fenotypiske heterogenitet i befolkningen. Mutasjoner kan imidlertid også føre til alvorlige sykdommer, herunder både de tallrike klassiske «genetiske» sykdommene og de store folkesykdommene med større eller mindre arvelige komponenter. Ervervede somatiske mutasjoner har stor betydning for utvikling av nevrodegenerative sykdommer og noen typer kreft. Noen mutasjoner fører altså til sykdom, andre kan ha positive effekter, mens majoriteten tilsynelatende er «tause». Hvordan kan man forklare dette, og er det mulig å forutsi hvilke følger (fenotype) en gitt mutasjon (genotype) har? Denne problemstillingen blir stadig mer aktuell, etter som metodene for påvisning av mutasjoner forbedres og den tilgjengelige genetiske informasjon vokser eksponentielt.

Grunnleggende begreper

Effekten av mutasjoner avhenger om de forekommer i kodende del av DNA (eksoner) eller i ikke-kodende DNA (utenfor gener, i genenes introner eller i deres regulatoriske områder). De mest sårbare delene finnes i de proteinkodende deler av genet (eksoner), som hos mennesker utgjør bare 1,1–1,4 % av



Figur 1 Skjematisk fremstilling av informasjonsstrømmen i cellen og hvor ulike mutasjoner virker

den totale DNA-sekvens (1, 2). Her vil en missens (engelsk: missense) punktmutasjon føre til en endret aminosyre, men effekten avhenger av hva slags endring som skjer og hvor i proteinet endringen forekommer. En nonsensmutasjon fører til et stoppkodon og at translasjonen stopper for tidlig, noe som gir et trunkert protein. Mutasjonene kan imidlertid også være «stille» punktmutasjoner, typisk 3. base i et kodon som ikke forandrer aminosyresekvensen i proteinet. Punktmutasjoner i den ikke-kodende del av et gen (intron) vil kunne føre til endret prosessering av mRNA dersom mutasjonen er lokalisert i områder som benyttes for spleising av ekson/intron. Tilsvarende vil mutasjoner i utranslaterte regioner (UTR) av RNA kunne påvirke effektiviteten av proteinsyntesen og RNA-stabiliteten (fig 1). Deleksjoner eller insersjoner kan omfatte alt fra en enkelt til tusenvis av baser og kan også medføre endret leseramme, noe som oftest har dramatiske konsekvenser for struktur og funksjon av proteinproduktet. I noen tilfeller kan effekten av en mutasjon oppheves ved reversjon. Det finnes ikke noe klart skille mellom genetiske polymorfismer og mutasjoner, men polymorfismene defineres ofte som mutasjoner som ikke gir funksjonelle forandringer.

Fra gen til funksjonelt protein

Den kvantitativt viktigste funksjon av DNA er å kode for proteiner, som kan fungere som enzymer, strukturproteiner, reseptorer, transportproteiner, transkripsjonsfaktorer etc. Overføringen av den genetiske informa-

sjon i DNA-molekylet til et funksjonelt protein omfatter mange trinn, der både miljøfaktorer og genetiske faktorer kan påvirke det endelige resultat (fig 1). Ettersom de fleste humane gener består av en rekke fragmenter av kodende sekvenser (eksoner), avbrutt av lange regioner med introner, må det primære transkript både modifiseres og transporteres ut av cellekjernen i intakt tilstand før proteinsyntesen kan starte.

Effekt av mutasjoner

For å kunne fastslå om en DNA-endring i et gen er en uskyldig polymorfisme eller om den har funksjonelle konsekvenser, er det vanlig å sammenlikne frekvensen av mutasjonen i en normalpopulasjon og hos pasientmaterialet. Dette viser dog ikke om DNA-endringen er den direkte årsaken til endret genfunksjon, eller om den bare er en «markør» som er koblet til endret funksjon. Det vil heller ikke si noe om de biologiske mekanismer som ligger til grunn for endret genfunksjon. For å få svar på dette må det utføres funksjonelle studier både på RNA- og proteinnivå, ev. i intakte organismer. Det mest vanlige i dag er å uttrykke rekombinante proteiner i bakterier eller cellekultur for å kunne karakterisere villtypeproteiner og mutante proteiner, men in vitro-transkripsjon-translasjon-systemer er også benyttet. En rekke gener er dessuten undersøkt i dyremodeller ved hjelp av såkalt knockoutteknologi. Ettersom mange sykdomsassosierte mutasjoner har påviselige effekter på proteinnivå, vil vi her konsentrere oss om funksjonelle studier av normale og muterte proteiner.

Mutasjoner og proteinstruktur

For noen typer mutasjoner er det åpenbart at det vil bli produsert defekte proteiner (endret leseramme, nonsensmutasjoner, der store deler av proteinet mangler, og punktmutasjoner, som påvirker spleisingen av RNA). Den biologiske effekten av mutasjonene vil igjen avhenge av proteinets funksjon i organismen, om det finnes multiple kopier av genet, om de finnes på X- eller Y-kromosomet og hvor stort tap av aktivitet man tåler.

Basert på studier av proteiner fra ulike arter er man kommet frem til en del kriterier for å kunne fastslå om en gitt mutasjon gir effekter på proteinets funksjon. Således er fylogenetisk konserverte aminosyrer og proteindomener gjerne mer kritiske enn variable regioner. Aminosyrer med spesielle funksjoner, som f.eks. inngår i aktivt sete, i fosforyleringsseter eller i protein-protein-interaksjoner, er også følsomme for substitusjoner. Videre er aminosyrer i den sentrale, hydrofobe kjerne av proteiner ofte konserverte, og mutasjoner som forstyrrer pakkingen av den hydrofobe kjerne, er ofte kritiske. For det store flertall av mutasjoner finnes det imidlertid ikke slike åpenbare forklaringer på en eventuell effekt på organismen, og dataprogrammer som er utviklet for å forutsi effekten av mutasjoner, bommer ofte. For å forstå årsaken til dette er det nødvendig med mer kunnskap om hvordan en proteinstruktur oppstår og stabiliseres.

Hvordan oppstår en proteinstruktur?

Et protein kan beskrives i et hierarki fra primær, sekundær, tertiær til (eventuelt) kvartærstruktur, der en kombinasjon av kovalente og ikke-kovalente bindinger bidrar til stabiliseringen. I globulære, vannløselige proteiner vil de fleste hydrofobe aminosyrer være pakket i en hydrofob kjerne, mens polare, vannløselige aminosyrerester dominerer på overflaten. Et stort antall vannmolekyler inngår som en integrert del av proteinstrukturen, og konformasjonen bestemmes delvis av hvilke aminosyrerester som kan inngå hydrogenbindinger med vannmolekyler. Christian B. Anfinsen og medarbeidere viste allerede i 1950–60-årene at noen denaturerte proteiner spontant kunne refoldes til en biologisk aktiv struktur, med identiske egenskaper som den «native» tilstanden (3). Likeledes blir proteiner i utgangspunktet syntetisert som aminosyrekjeder uten ordnet struktur, men danner spontant sekundærstrukturer og mer kompliserte strukturer som er energimessig gunstigere enn tilfældige strukturer.

Selv om det meste av proteinstrukturen oppstår spontant, finnes det spesielle enzymer (f.eks. isomeraser) og andre hjelpeproteiner («chaperons», inkludert de såkalte «heat shock»-proteiner) som binder til ufullstendig foldede polypeptidkjeder og assisterer i danningen av den ferdige proteinstrukturen. Dette er delvis en energikrevende prosess, som innebærer at proteiner kan gjen-

nomføre foldingen i et miljø som forhindrer dannelse av premature hydrofobe interaksjoner. Selv for villtypeproteiner vil en viss andel av de syntetiserte proteiner foldes unormalt og raskt bli nedbrutt ved endogen proteinkatabolisme.

Det har lenge vært kjent at et protein teoretisk kan forekomme i så mange ulike konformasjoner at det umulig kan «prøve ut» alle for finne den energetisk gunstigste. Det må derfor foreligge foretrukne foldingsveier som raskere fører frem til den endelige struktur. For noen modellproteiner har man studert rekkefølgen av de konformasjonsendringer som er nødvendige for dannelse av en komplett struktur, og de fysiske krefter som bestemmer deres stabilitet er kartlagt.

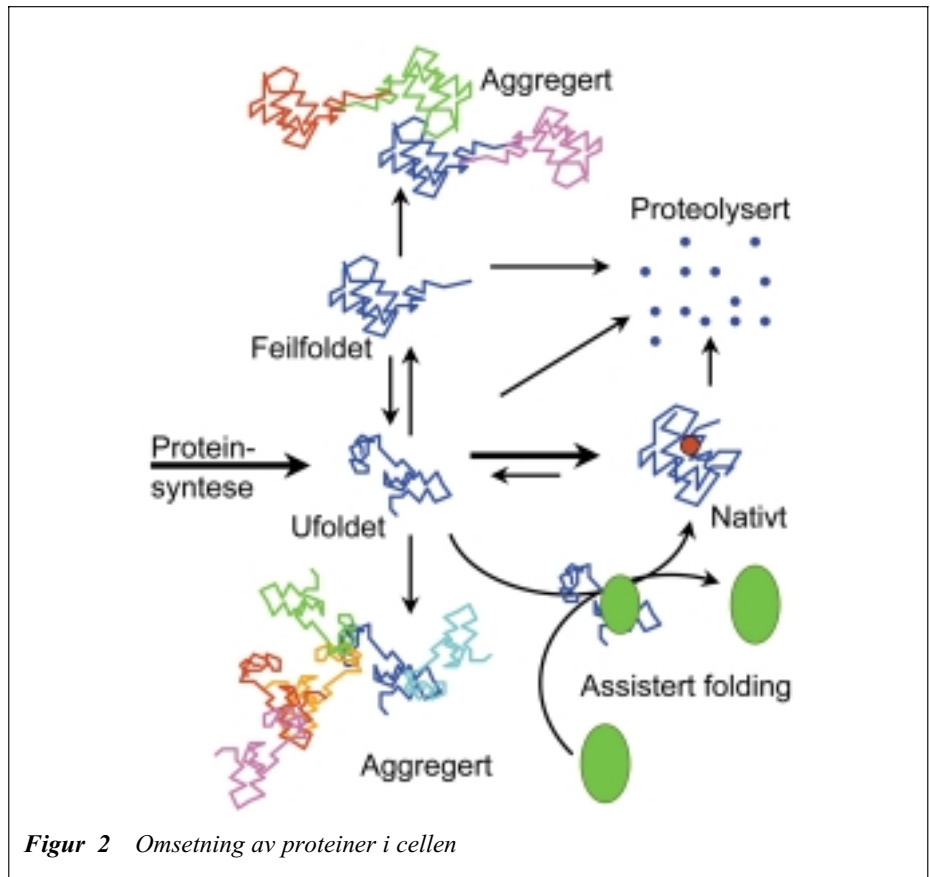
Hvordan studere proteinestabilitet?

Den native konformasjon av et protein kan endres reversibelt eller irreversibelt ved oppvarming, som i et kalorimeter, eller ved endring av løsemiddel eller pH. Den relative andel av nativt eller denaturert protein under ulike betingelser blir så målt, f.eks. med spektroskopi eller kalorimetri, og vil etter en termodynamisk eller kinetisk analyse gi et mål på proteinestabiliteten. Disse metodene er nyttige for å sammenlikne ulike mutasjoner i proteinet og hvorvidt disse gir endret stabilitet.

De denaturerte proteiner har oftest opphevet funksjon og endret løselighet, og vil *in vivo* ofte nedbrytes raskt, *ev.* danne uløselige aggregater (fig 2). Ved å studere proteiner under denaturerende betingelser kan man måle de stabiliserende krefter for en gitt proteinstruktur og f.eks. sammenlikne stabiliteten av ulike muterte proteiner (4). Ved slike målinger er det vist at mange proteiner er marginalt stabile, de denatureres raskt og ofte tilnærmet irreversibelt ved en temperatur like over kroppstemperaturen. Energi i størrelsesorden 50 kJ/mol er nok for å denaturere proteiner fullstendig, ikke så imponerende når man tenker seg at en enkel hydrogenbinding har energi i størrelsesorden 2–10 kJ/mol. Dette kan forklare at selv moderate endringer av en gitt aminosyresekvens kan endre balansen mellom stabiliserende og destabiliserende krefter og dermed ødelegge den native folding av proteinet.

Reversibel versus irreversibel denaturering

En rekke proteiner er vist å kunne gjenvinne sin originale, native struktur etter denaturering, men en slik reversibel denaturering er ikke en generell egenskap ved proteiner (5). Den irreversible varianten er et mer dagligdags fenomen, som kan observeres f.eks. ved koking av egg. Fullstendig reversibel eller irreversibel denaturering blir to ytterpunkter, mens de fleste proteiner befinner seg et sted imellom. Valg av betingelser for denaturering, som pH, proteinkonsentrasjon, temperatur og denatureringsprosedyre (varmedenaturering, løsemiddeldenature-



Figur 2 Omsetning av proteiner i cellen

ring) bestemmer også hvor reversibel prosessen er.

Likevektstermodynamikk beskriver enkelt og elegant reversible systemer. I de enkleste tilfellene tenker man seg at proteiner kan eksistere i to tilstander, den native og den denaturerte. Fordelingen mellom disse ved likevekt er beskrevet ved differansen i Gibbs frie energi, uavhengig av hvordan proteinet kommer seg mellom tilstandene. Dette forenkler problemet vedrørende hva som skaper proteinestabilitet en del, men ikke fullstendig. Det er viktig å merke seg at begge tilstander er med på å bestemme proteinets stabilitet, og kunnskap om disse tilstandene er derfor nødvendig.

Proteiners native tilstand er normalt assosiert med og sannsynligvis nær den tredimensjonale struktur man finner ved kjernemagnetisk resonans (NMR)-spektroskopi eller krystallografi. Derimot er den denaturerte tilstanden mye vanskeligere å karakterisere. Det var tidligere vanlig å beskrive den som en tilfeldig, fleksibel struktur (random coil), men nyere eksperimenter viser noe annet. Selv under ekstremt denaturerende betingelser finnes strukturer i proteiner, og graden av kompakthet varierer med styrken på denaturanten. Det betyr at den denaturerte tilstanden har mange strukturelle likhetstrekk med den native struktur under fysiologiske betingelser (6, 7).

En vanlig problemstilling kan være at man ønsker å studere et protein der både vill-

type og mutanter kan denatureres reversibelt. For å forstå hvordan mutasjoner påvirker stabiliteten er det altså nødvendig å studere både de native og de denaturerte tilstandene av proteinet.

Flere ulike mekanismer kan føre til destabilisering, f.eks. ved nøytrale endringer i den native tilstand, kombinert med en stabilisering av den denaturerte, med en bedre pakking av hydrofobe aminosyrer. Tilsvarende kan en mutasjon tilsynelatende virke destabiliserende ved inspeksjon av den tredimensjonale strukturen, f.eks. ved tap av hydrogenbindinger innad i strukturen, men i praksis være nøytral eller stabiliserende. Dette kan forklares med en tilsvarende eller større destabilisering i den denaturerte tilstanden, hvor nettverket av hydrogenbindinger kan være mer følsomt for forandringer (8).

Irreversibel denaturering

En vanlig årsak til irreversibel denaturering er at de denaturerte proteinene aggregerer og feller ut (fig 2). Prolinisomerisering, deamidering eller tap av disulfidbroer er andre årsaker til irreversibilitet, og disse endringene skjer vanligvis i den denaturerte tilstanden. Ettersom det er vanskelig å studere aggregererte proteiner, ble dette forskningsfeltet tidligere viet liten interesse, noe som har endret seg dramatisk etter oppdagelsen av proteinaggregater ved amyloidsykdommer, som omfatter mange neurodegenerative lidelser og prionsykdommer.

Proteiner denatureres ofte via intermediære, partielt denaturerte tilstander, noe som kan skyldes enkeltdomener med lavere stabilitet og dissosiering av oligomere proteiner. Disse marginalt stabile tilstandene har ofte aggregerende egenskaper, og aggregeringshastigheten kan være avgjørende for proteinets stabilitet under in vivo-betingelser. Aggregering er altså en fundamental egenskap ved proteiner, og man må kjenne mekanismene som styrer denne prosessen for å kunne forstå virkningen av mutasjoner. Ofte er det danning av proteinstrukturer hvor hydrofobe overflater er eksponert som gir opphav til aggregering. De hydrofobe overflatene vil så trekke seg sammen for å unngå kontakt med vann, noe som stabiliserer aggregatet, i tillegg til at proteinkjedene kan bli viklet inn i hverandre. En forutsetning for aggregering synes altså å være at hydrofobe strukturer har tilstrekkelig levetid til å finne en partner å aggregere med. En enkelt mutasjon kan være nok til å forskyve balansen mellom aggregerende og løselige proteinformer.

Det er likevel vanskelig å overføre de observerte egenskapene in vitro til situasjonen in vivo. På den ene side er polymerkonsentrasjonen svært høy i celler, noe som fremmer assosiasjon (aggregering) av makromolekyler, den såkalte ekskludert volum-effekten. På den annen side finnes det cellulære mekanismer som kan motvirke aggregering og denaturering av proteiner, selv om disse viser seg ikke å fungere eller ha høy nok kapasitet ved noen sykdommer. Ved å sammenlikne mengden mRNA for et protein med mengden av intakt eller aggregert protein kan man få et inntrykk av omsetningshastigheten av proteinet og dets mutanter i cellen.

Predikering av proteinstrukturer

Den internasjonale proteinstruktur databasen (PDB) inneholdt 19.6. 2001 hele 15 435 strukturer, hvorav flertallet dog er varianter av nær beslektede proteiner (9). Som et resultat av den eksplosive veksten i tilgjengelige strukturdata er det utviklet en rekke algoritmer for å forutsi proteiners tredimensjonale struktur basert på aminosyresekvensen. Dersom det foreligger stor sekvenshomologi med kjente strukturer, kan disse programmene med relativt stor sikkerhet predikere strukturen av nye aminosyresekvenser. Nøyaktigheten av programmene er imidlertid sjelden tilstrekkelig for å kunne forutsi effekten av enkeltsubstitusjoner på proteinets endelige funksjon og stabilitet. Videre har foldingsalgoritmene fortsatt store problemer med å fastslå en korrekt folding for en «ny» aminosyresekvens. Dette kan skyldes at det er liten forskjell i fri energi mellom alternative proteinkonformasjoner, og at de ulike bindingene ikke virker uavhengig av hverandre og derfor er vanskelig å beregne. Selv «konservative» aminosyre-substitusjoner med tilhørende tilsynelatende

små endringer i foldingsenergi kan derfor føre til alternative proteinkonformasjoner, med dramatiske følger for proteinets funksjon. Omvendt kan hele proteindomener fjernes eller adderes med tilnærnet intakt funksjon av proteinet. For tiden arbeides det intenst med å forbedre disse algoritmene og å kombinere dem med prinsipper og data som er fremkommet gjennom fysikalsk-kjemiske studier av proteinfolding.

Sykdomsassosierte humane mutasjoner

Det er i dag kjent en rekke mutasjoner i mange ulike gener som er assosiert med alvorlig sykdom, hvorav noen få er undersøkt i detalj og fungerer som modellsystemer. Vi har således bl.a. studert genet for human fenylalaninhydroksylase (PAH), der man kjenner til over 300 ulike mutasjoner assosiert med Føllings sykdom (fenylketonuri). Biokjemiske studier har vist at selv om flertallet av mutasjonene «bare» innebærer substitusjon av enkeltaminosyrer, har mange av de muterte proteinene dramatisk nedsatt stabilitet, løselighet og katalytisk aktivitet (7, 10). På den annen side har proteinkjemiske studier vist at PAH-genet tolererer en rekke substitusjoner og delesjoner og at noen mutanter også kan ha større aktivitet enn villtype-PAH. Forsøk på å forutsi den biokjemiske virkningen av enkeltmutasjoner, basert på en analyse av den tredimensjonale struktur av PAH, har bare delvis vært vellykket, og noen av de predikerte aminosyre-substitusjonene er sannsynligvis feil, idet sykdomsmekanismene snarere skyldes endret RNA-prosessering (11).

Mutanter med endret funksjon

De fleste proteiner hos mennesker (og andre levende organismer) fungerer som enzymer, og muterte enzymer er hyppig assosiert med sykdom. Vi kan derfor tenke oss at mutasjoner oftest virker ved å nedsette enzymenes katalytiske aktivitet. Selv om man har påvist mange sykdomsassosierte mutante enzymer med nedsatt aktivitet, ser dette ikke ut til å være et vanlig funn. Tvert imot synes det å være langt vanligere å finne mutasjoner som primært påvirker enzymenes stabilitet og bare sekundært gir opphav til nedsatt aktivitet. Aggregater av det muterte enzym kan også være cytotoxisk eller eventuelt kan mutasjonen endre den katalytiske profilen av enzymet, noe som kan resultere i produksjon av toksiske reaksjonsprodukter (12, 13). I begge tilfeller har mutanten fått en ny biologisk funksjon («gain of function»-mutasjon). Dette illustrerer en molekylær mekanisme som kan gi opphav til dominantnegative mutanter.

Genotype og fenotype

I perioden 1995–2001 har man helt eller delvis sekvensert genomene fra en rekke organismer, herunder mennesket. Den enorme datamengden som er generert gjennom dette

arbeidet, har resultert i helt nye forskningsfelt og utfordringer, gjerne symbolisert med slagordet «den postgenome æra». Det er en stor utfordring å bestemme proteinstrukturene som kodes av alle de publiserte gensekvensene og å fastslå forholdet mellom genstruktur og funksjon. I jakten på sykdomsfremkallende mutasjoner vil man ofte treffe på sekvensvarianter som enten kan være årsak til sykdom eller uskyldige polymorfismer.

Selv i situasjoner der man med rimelig sikkerhet kan fastslå effekten av en mutasjon på et protein, er denne informasjonen som oftest utilstrekkelig for å forutsi den endelige biologiske effekten i en intakt organisme (fenotypen). Mutasjoner er derfor ikke ensbetydende med «patologi», men må i utgangspunktet oppfattes som genetiske markører. Basert på vår nåværende viten er det sjelden klart hvilke konsekvenser en tilfeldig mutasjon har for proteinfunksjonen og, i enda mindre grad, hva slags fenotype mutasjonen er assosiert med. Utvikling av nye behandlingsmåter, herunder genterapi, er i stor grad avhengig av økt innsikt i proteiners struktur og dynamikk i intakte organismer. Dette forskningsfeltet kan klassifiseres som «funksjonell genomforskning» (FUGE), et felt som nylig har fått stor oppmerksomhet både i Norge og i utlandet.

Litteratur

1. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304–51.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860–921.
3. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 1973; 181: 223–30.
4. <http://www.rtc.riken.go.jp/jouhou/Protherm/protherm.html>.
5. Plaza del Pino IM, Ibarra-Molero B, Sanchez-Ruiz JM. Lower kinetic limit to protein thermal stability: a proposal regarding protein stability in vivo and its relation with misfolding diseases. *Proteins* 2000; 40: 58–70.
6. Dill KA, Shortle D. Denatured states of proteins. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 795–825.
7. Kleppe R, Uhlemann K, Knappskog PM, Haavik J. Urea-induced denaturation of human phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem* 1999; 274: 33251–8.
8. Shortle D. The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *FASEB J* 1996; 10: 27–34.
9. <http://www.rcsb.org/pdb/>.
10. <http://www.mcgill.ca/pahdb/>.
11. Ellingsen S, Knappskog PM, Apold J, Eiken HG. Diverse PAH transcripts in lymphocytes of PKU patients with putative nonsense (G272X, Y356X) and missense (P281L, R408Q) mutations. *FEBS Lett* 1999; 457: 505–8.
12. Haavik J, Toska K. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 1998; 16: 285–309.
13. Liu D, Wen J, Liu J, Li L. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB J* 1999; 13: 2318–28.

○