

- disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med* 2000; 6:337-42.
5. Shan L, Molberg O, Parrot I et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002;297:2275-9.
  6. Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;119:234-42.
  7. Novak P, Man P, Tuckova L et al. Monitoring of in vitro deamidation of gliadin peptic fragment by mass spectrometry may reflect one of the molecu-

lar mechanisms taking place in celiac disease development. *J Mass Spectrom* 2002;37:507-11.

Ovenstående statusartikel bygger på en større litteraturgennemgang end literaturlistens syv numre. Oplysninger om denne baggrundslitteratur kan fås fra forfatterne.

## Tuberkulose og molekylærbiologi

### STATUSARTIKEL

Åse Bengård Andersen, Troels Lillebæk, Christian Søborg, Isik Somuncu Johansen & Vibeke Østergaard Thomsen

Mykobakterier er besværlige at arbejde med. I særdeleshed de sygdomsfremkaldende eksemplarer af arten *Mycobacterium tuberculosis* og de nært beslægtede medlemmer af det såkaldte *M. tuberculosis*-kompleks. Det er langsomt voksende bakterier med en fedtholdig væg, der er vanskelig at lysere, bakterierne vokser i pseudosyncytier – dvs. i »klumper«, og de skal håndteres i særlige sikkerhedslaboratorier på grund af deres smittefarlighed. *M. lepra* kan stadig ikke dyrkes in vitro. Molekylærbiologiske metoder var derfor velkomne og oplagte redskaber i tuberkulose- og lepraforskningen, og har siden begyndelsen af 1980'erne været anvendt inden for næsten alle discipliner. Det viste sig at være forholdsvis ukompliceret at klon og udtrykke mykobakterielle gener i andre prokaryote organismer, mens det at konstruere ændringer i mykobakteriers genom er mere kompliceret.

Hovedformålet med tuberkuloseforskning er ultimativt at bremse stigningen i nye tuberkulosestilfælde og at bringe sygdommen under kontrol. Sygdommen hærger med størst kraft i de dele af verden, som har færrest ressourcer (Asien, Afrika, Sydamerika og Østeuropa), og problemer med samtidig hiv-infektion og stigende forekomst af behandlingsresistent tuberkulose gør ikke problemet mindre. Overskriften på disse tiltag er derfor ikke overraskende: bedre diagnostika til hurtigere diagnoser og hurtigere behandling af smittefarlige patienter, nye antibiotika til behandling af resistente bakterier og supplement af de eksisterende (få) tilgængelige antibiotika samt en bedre og mere effektiv vaccine til erstatning for Calmette-vaccinen, der dels er vanskelig at producere og administrere og tilsyneladende heller ikke er effektiv nok. En række basale spørgsmål vedrørende sygdomsopstigning kræver fortsat belysning. Hvad skal der til for at gøre et individ immun over for tuberkulose? – Man kan jo godt få tuberkulose to gange. Hvorfor er det ikke alle, der smittes med tuberkulose, der bliver syge?

De molekylærbiologiske metoder var initialt forbeholdt de ressourcerstærke lande, men tuberkulose er et eksempel

på et sundhedsproblem, hvor teknologiudviklingen er på vej med enkle assays, der kan anvendes i teknologisk mindre veludrustede laboratorier. Påvisning af DNA fra mykobakterier med akkrediterede metoder har siden midten af 1990'erne været anerkendt i tuberkulosedagnostik både her i landet og i USA. Mikroskopi er fortsat uovertruffen med hensyn til pris og hurtighed, men sensitiviteten er selv i gode laboratorier højst 50% i forhold til sensitiviteten ved dyrkning. DNA-baserede diagnostiske test var i flere år domineret af Roches patent på området, men der konkurreres til stadighed om at udvikle andre diagnostiske assays. Analyserne er dog fortsat teknologikrævende. Selv om smitterisikoen for laboratoriepersonalet minimeres, når der arbejdes med varmedenatureret DNA, er der behov for faciliteter, der beskytter prøverne mod krydskontamination. Tendensen går alt i alt mod hurtigere og mere brugervenlige analyser, og nu venter vi blot på, at prisen skal falde.

Artsbestemmelse af mykobakterier ved klassiske mikrobiologiske metoder er begrænset af bakteriernes langsomme vækst. Nu foregår al rutinetypebestemmelse her i landet ved probeteknik, hvor DNA fra de isolerede mykobakterier *polymerase chain reaction* (PCR)-amplificeres og hybridiseres i et *dot-blot-assay* til et panel af de 90% hyppigst forekommende mykobakterier i et kommercielt tilgængeligt assay (1). Selve analysen er tilendebragt i løbet af få timer, og de resterende 10% identificeres ved sekventering af genet, der koder for 16S-RNA. Et mikro-chip-assay til påvisning og samtidig artsidentifikation af PCR-amplificeret materiale direkte fra patientprøven er under udvikling.

Resistensundersøgelser er på vej i samme retning. I de seneste år er den molekylærbiologiske basis for de fire standardantituberkulose stoffer: rifampicin, isoniazid, ethambutol og pyrazinamid blevet kortlagt. Virkningsmekanismerne er forskellige og resistensmekanismerne ligeså. Indtil videre er kun rifampicinresistensbestemmelse som PCR-baseret analyse kommercielt tilgængelig, men forslag til påvisning af resistensgivende mutationer for de tre andre stoffer er blevet publiceret.

Gennem årene har man fået delvis indblik i mykobakteriers genom gennem kloning og sekventering af stadig større fragmenter. I 1998 blev den komplette genomsekvens fra *M. tuberculosis* publiceret: laboratoriestammen H37Rv

(2) og senere et klinisk isolat fra USA (Oshkosh isolatet = CDC1551) takket være to målrettede sekventeringsprogrammer. Siden er genomsekvensen for *M. lepra*, *M. bovis* og *M. smegmatis* blevet tilgængelig og sekventeringen af *M. avium* og *M. paratuberculosis* forventes afsluttet i løbet af 2002. Adgang til disse data giver helt nye muligheder for at få indblik i, hvor mykobakterier adskiller sig fra andre mikroorganismer. *M. tuberculosis*-genomet er på størrelse med *E. coli*-genomet ( $4,4 \times 10^6$  basepar), og der er fundet ca. 4.000 åbne læserammer dvs. mulige genprodukter. 15% af disse har homologi med genprodukter med en kendt funktion i andre bakteriearter, mens 42% af disse ikke umiddelbart minder om noget, man kender. En stor del af genomet koder for enzymer, der har betydning for cellevægssyntese og lipogenese eller lipolyse. Studier af metaboliske *pathways* giver forhåbentlig ideer til nye antituberkuløse midler.

Repetitive elementer med forskellige kendetegn findes spredt over hele det mykobakterielle genom. Nogle er tilsyneladende unikke for mykobakterier, mens andre har lighed med transposons- eller insertions (IS)-elementer, som de kendes fra andre prokaryote organismer. Selv om disse repetitive elementer bidrager til den genetiske evolution, og transposons i deres natur har evnen til at »transposere« – dvs. flytte sig til et andet sted på kromosomet eller give anledning til duplikationer eller deletioner – er et af disse IS-elementer, IS6110, så stabilt, at det er praktisk anvendeligt som genetisk markør. IS-elementernes relative placering på kromosomet kan erkendes visuelt ved restriktionsfragmentanalyse med efterfølgende probning med et mærket IS6110 fragment (*southern blot*-teknik). Herved frembringes et såkaldt DNA-fingeraftryk af de enkelte bakterieisolater. Analysen har vundet stor udbredelse internationalt, og det er muligt elektronisk at udveksle disse data med andre laboratorier (3). I Danmark er der foretaget DNA-typning af alle nye tuberkulosestilfælde siden 1992, hvilket har givet en ny vinkel til den klassiske epidemiologi. Metoden har kunnet bekræfte gamle teorier, men også sat spørgsmålstejn ved andre. DNA-profilerne har dokumenteret velkendte smitteveje mellem f.eks. familiemedlemmer, men de har også påvist nye og uventede smitteveje f.eks. efter meget kortvarig kontakt med smitekilden. Det er dermed vist, at man ikke nødvendigvis skal dele husstand for at blive smittet. Ældre patienter, hvis sygdom ofte opfattes som forårsaget af reaktivering af tidligere erhvervet tuberkulose, har i overraskende høj grad vist sig at være nysmittede. For nylig er der dog også fundet molekylærbiologisk evidens for reaktivering årtier efter den primære infektion. Metoden anvendes i populationsbaserede studier til at beskrive sygdommens udvikling, og myten om, at indvandrere udgør en risikofaktor for danskere, er afkræftet ved denne metode. Overvågning af stammer med særlige kendetegn f.eks. den såkaldte Beijingstamme, der ofte er multiresistent, kan ske med denne metode. Ud over de konkrete epidemiologiske oplysninger belyser disse resultater sygdommens naturhistorie og har dermed også interesse for vaccinforskningen.

Der har i mange år været ydet en stor indsats for at definere, hvilke dele af mykobakterier der stimulerer immunsystemet i en retning, der er relevant, for at man kan bekæmpe

disse overvejende intracellulære mikroorganismer. Med adgang til den totale genomsekvens er vejen fra at have fundet et potentielt interessant antigen, til at genet er isoleret, afkortet betydeligt. Mikrosekventeringsteknikker muliggør, at den N-terminale aminosyresekvens kan bestemmes på blot picogramængder (en plet på en 2-D gel). Ud fra aminosyresekvensen kan der konstrueres en række mulige DNA-sekvenser, som enten kan identificeres direkte i genomsekvensen eller bruges til at klonе genet fra et genbibliotek. En gruppe secererede overfladeantigener fra *M. tuberculosis* undersøges i disse år intensivt for deres mulige vaccineegenskaber (4). Konstruktionen af den vaccine, der i en forhåbentlig ikke al for fjern fremtid skal udfordre Calmette-vaccinen, vil ske ved hjælp af molekylærbiologiske teknikker. En mulighed vil være at tilføje ekstra antigener til den eksisterende Calmette-vaccine: *M. bovis*, bacille Calmette-Guérin, ved kloning. En anden mulighed er at sammensætte vaccinen som en 100% rekombinant »komponent«-vaccine af udvalgte immundominante antigener. Hermed ville man være ude over de holdbarheds- og sikkerhedsproblemer, som en levende vaccine har. Endelig ville en såkaldt DNA-vaccine være en mulighed, hvor relevante gener underlægges en promotor, der vil fungere i en eukaryot (f.eks. muskel) celle. En DNA-vaccine vil være stabil og kræver ikke som Calmette-vaccinen en ubrudt kølekæde.

Ikke alle individer kan forventes at genkende alle antigener lige effektivt, så vaccinen skal formuleres som en cocktail af forskellige antigener. Kendskab til individuelle forskelle i vævstyper og de dele af immunforsvaret, der ikke henhører til det erhvervede immunforsvar, udbygges i disse år. Den slags undersøgelser kan nu gennemføres, fordi de teknikker, der er udviklet til identifikation af polymorfier i forskellige gener, kan ske i halvautomatiserede PCR-opsætninger og sekventeringsudstyr, der muliggør, at store populationer undersøges.

Molekylærbiologien er i dag en integreret del af stort set alle forskningsdiscipliner vedrørende tuberkulose. Molekylærbiologien som selvstændig disciplin – hvis den findes – har undergået en kæmpe teknologisk udvikling i den forløbne dekade. På grund af de store spørgsmål og den store sundhedsmæssige trussel, tuberkulose udgør, er teknologierne grebet med det samme og afprøvet i tuberkulosesammenhæng. Inden for det diagnostiske område, kan resultaterne allerede mærkes i daglig praksis, og de andre – nok mere komplicerede discipliner – er stærkt på vej.

#### Summary

**Åse Bengård Andersen, Troels Lillebæk, Christian Søborg, Isik Somuncu Johansen & Vibeke Østergaard Thomsen: Tuberculosis and molecular biology.**

Ugeskr Læger 2003;165:920-2.

*Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis (TB) haunting millions worldwide, is a challenge to work with in the laboratory. Modern molecular biology has provided extremely useful tools which have changed conventional diagnostic procedures in the TB laboratories. Re-

search in molecular epidemiology is currently expanding our knowledge of the natural history of TB. Access to the genome sequence has opened new avenues for research in drug development and new vaccines. However, we are still awaiting the impact of these efforts in the resource-poor TB endemic countries.

Reprints not available. Correspondence to: *Åse Bengård Andersen*, Epidemi-afdeling M5131, H:S Rigshospitalet, Blegdamsvej 9, DK-2100 København Ø. E-mail: bengaard@dadlnet.dk

Antaget den 19. december 2002.  
H:S Rigshospitalet, Epidemiklinikken og Vævstypelaboratoriet, og Statens Serum Institut, Mykobakteriologisk Laboratorium.

### Litteratur

1. Suffys PN, da Silva Rocha A, Oliveira M et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2001;39:4477-82.
2. Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393:537-44.
3. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R et al. Comparison of methods based on molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999;37:2607-18.
4. Skjødt RLV, Agger EM, Andersen P. Antigen discovery and tuberculosis vaccine development in the post-genomic era. *Scand J Infect Dis* 2001; 33:643-7.

En supplerende referenceliste kan fås ved henvendelse til forfatterne.

## Retsgenetik

### STATUSARTIKEL

*Niels Morling*

### Resumé

I denne oversigt gives der først en kort status over de molekylærbiologiske metoder, som i dag anvendes ved rets-genetiske undersøgelser i Danmark. I straffesager er der international konsensus om at undersøge *short tandem repeat* (STR)-regioner med polymerasekædereaktion (PCR)-baserede metoder, som er blevet standardiseret gennem internationalt samarbejde. I faderskabs- og familiesammenførings-sager undersøges både STR-regioner med PCR-baserede metoder og *variable number of tandem repeat*-regioner med restriktions-fragment-længde-polymorfi-teknik. Derefter redegøres der kort for nogle af de mest lovende rets-genetiske forsknings- og udviklingsområder, heriblandt undersøgelser af stadig mindre mængder DNA fra biologiske spor, *single nucleotide polymorphism* mhp. identifikation, påvisning af faktorer, som kan bidrage til signalementoplysninger og farmakogenetiske undersøgelser.

Udviklingen inden for molekylærbiologien har revolutioneret retsgenetikken, og i dag foretages stort set alle rets-genetiske undersøgelser med DNA-teknik. I denne oversigt gives der først en kort status over de molekylærbiologiske metoder, som i dag anvendes ved retsgenetiske undersøgelser i Danmark. Derefter redegøres der kort for nogle af de mest lovende retsgenetiske forsknings- og udviklingsområder.

### DNA-undersøgelser i straffesager

I straffesager består den retsgenetiske opgave oftest i at afklare, hvorvidt DNA-undersøgelserne taler for eller imod, at biologisk materiale i et spor (f.eks. sæd, blod eller væv) hidrører fra en given person.

I straffesager er der for tiden international konsensus om

at undersøge repeteret DNA i mikrosatellitregioner – også kaldet *short tandem repeat* (STR). Undersøgelserne foretages med enzymatisk mangfoldiggørelse med *polymerase chain reaction* (PCR)-teknik af STR-regioner og efterfølgende analyse af længderne af STR-regionerne med DNA-sekvensanalysator (1). De undersøgte DNA-områder ligger mellem de kodende regioner i DNA'et og koder ikke for kendte egenskaber. Polymorfien inden for en STR-region består primært i forskelle i antal af repeterede DNA-sekvenser. Polymorfien betyder derfor også variation i den samlede længde af en STR-region fra person til person. PCR-baserede metoder kan anvendes på meget små mængder spormateriale, fordi man med PCR-teknikken kan opnå millioner til milliarder kopier af det DNA, som ønskes undersøgt. PCR-metoderne kræver imidlertid også, at der træffes en lang række særlige forholdsregler ved indsamling af spormaterialet og udførelsen af de PCR-baserede undersøgelser for at sikre mod forurening med uvedkommende DNA. Metoden er blevet standardiseret gennem internationalt samarbejde (1). Retsgenetisk Afdeling foretager for tiden undersøgelser af ti STR-systemer og det kønsspecifikke DNA-område amelogenin.

En velgennemført DNA-undersøgelse er meget effektiv til at udelukke personer, såfremt de ikke er nært beslægtede med den person, som afsatte sporet. Match mellem DNA-typer i spor og en undersøgt person efter en velgennemført DNA-undersøgelse er et meget vægtigt bevis for, at spormaterialet er afsat af den undersøgte person, frem for at sporet er afsat af en tilfældig person. Den præcise vægt af DNA-undersøgelserne beregnes i hvert enkelt tilfælde ud fra kendskab til fordelingen af de undersøgte DNA-egenskaber i befolkningen. DNA-undersøgelserne tillægges sædvanligvis en hertil svarende bevismæssig vægt i straffesager (2).

Det danske DNA-profil-register, som blev oprettet i 2000, består af den ovennævnte type DNA-profiler. Ved udgangen af 2002 indeholdt DNA-profil-registret lidt over 1.000 DNA-