

Molekylær tarmdiagnostik – hvornår kan man få sin gastroenterologiske vejrudsigt?

Lektor Jørgen Olsen

Københavns Universitet, Institut for Medicinsk Biokemi & Genetik

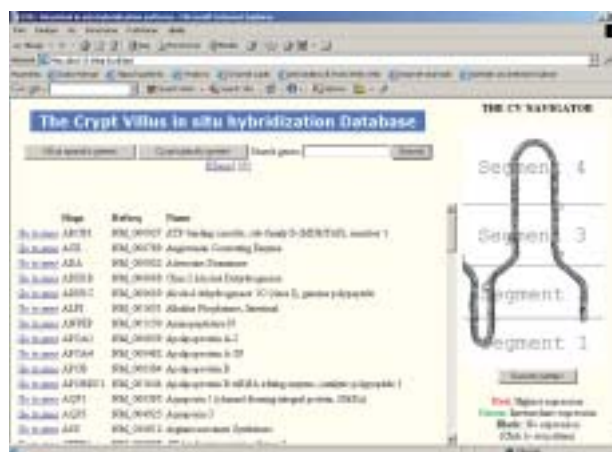
Aften efter aften kan man se præsentationen af femdøgnsvejrudsigten i TV-avisen. Præsentationen bygger på tusindvis af målinger af tryk, temperatur, vind m.m. indsamlet fra utallige målestationer suppleret med satellitovervågningsdata. Pointen er, at vejrudsigten er baseret på matematiske modeller, som kan simuleres på computere ved fodring med de mange data. Resultatet er forudsigelser dvs. sandsynlige angivelser af tryk, temperatur osv. over forskellige geografiske regioner. I disse år, hvor kendskabet til menneskets gener daglig forøges betragteligt, er en tilsvarende modelbaseret tankegang begyndt at vinde indpas i biologien og medicinen. Det er efterhånden blevet klart, at en mere systembaseret beskrivelse af biologiske og medicinske problemstillinger vil egne sig bedst til håndtering af de mange kvantitative biologiske data, som nu produceres [1]. I nærværende artikel vil jeg med udgangspunkt i tarmsygdomme argumentere for, at især målinger af *messenger*-RNA (mRNA)-koncentrationer vil komme til at indtage en central rolle i fremtidens medicin, og redegøre for den nuværende status for mRNA-koncentrationsmålinger netop for tarmsygdomme.

mRNA-forekomst i det normale tarmepitel

DNA-*array*-teknik (for en nylig oversigt over DNA-*array*-teknologi se [2]) bygger på det simple og fundamentale baseparingsprincip, der muliggør, at to enkeltstrengede og komplementære nukleinsyremolekyler (DNA eller RNA) kan organiseres i et fælles spiralsnoet og kemisk stabilt dobbeltstrengt molekyle. Processen hvor to komplementære nukleinsyrer parres med hinanden benævnes ofte hybridisering. Ved DNA-*array*-teknik befinder det ene nukleinsyremolekyle sig forankret til en fast overflade, som f.eks. kan være en glasplade. Det andet og komplementære molekyle findes derimod i opløsning og er i en enzymkatalyseret proces mærket f.eks. med et fluorescerende molekyle. Når de to komplementære molekyler forenes ved hybridisering, fastholdes det mærkede molekyle derved på den faste overflade, og bindingen kan efterfølgende detekteres og kvantificeres efter principper svarende til dem, der er kendt fra fluorescensmikroskopien. Det elegante ved DNA-*array*-teknik er, at mange tusinde nukleinsyrer kan fastsættes på den samme faste overflade i et veldefineret mønster (typisk et gittermønster og deraf den engelske betegnelse *array*). Herved kan tilstedeværelsen af mange forskellige komplementære nukleinsyrer detekteres i den samme opløsning med det samme hybridiseringsforsøg.

Anvendelse af sådan DNA-*array*-teknik af flere tusinde gener, der er aktive i musens tarm, har givet os information om generelle ændringer i mRNA-forekomsterne langs krypt/villus-aksen i tyndtarmen [3]. Der tegner sig et billede, hvor man ser et fald i antallet af forskellige mRNA'er, når man går fra umodne enterocytter til de modne og differentierede enterocytter. Dette viser, at den udifferentierede celle understøtter produktionen af en bred vifte af gener, hvilket giver denne celle et stort udviklingspotentiale. Omvendt fokuserer den specialiserede enterocyt sit »RNA-synteseapparat« på færre gener, hvis tilhørende mRNA-molekyler så til gengæld kan produceres i større mængder.

In situ-hybridisering er en teknik, som kan sammenlignes med DNA *array*-teknik. Her udgør mRNA, der er fikseret i et vævssnit, de fastforankrede nukleinsyrer. Som komplementær nukleinsyre anvendes et enzymatisk fremstillet og mærket molekyle. Dette molekyle er fremstillet, så det er komplementært til et specifikt kendt mRNA, som man ønsker at lokalisere i et væv. Efter hybridisering vil signalet fra det mærkede og fastholdte nukleinsyremolekyle således vise, hvor i vævet det specifikke mRNA befinder sig. Denne teknik er unik med hensyn til opløsningsevne, idet man kan lokalisere et specifikt mRNA til en enkelt celle i et vævssnit. Der er for nylig blevet oprettet en offentlig tilgængelig database over tarm-in situ-hybridiserings-studier rapporteret i litteraturen [4] (Figur 1). Ved søgning i denne database kan man overbevise sig selv om, at hovedparten af de mRNA-molekyler, der findes i høj koncentration i villus-enterocytter, typisk koder for specialise-



Figur 1. På internetadressen www.pc113.imbg.ku.dk/ps er der etableret et gratis og offentligt tilgængeligt søgeværktøj for sammenligning af relative mRNA-koncentrationer i tarmmukosaen baseret på in situ-hybridiserings-arbejder rapporteret i den videnskabelige litteratur.

rede proteiner, der er involveret i fordøjelse og transport af lavmolekylære forbindelser. DNA-array-forsøg har også leveret en del specifik information om ændringer i mRNA-forekomster langs tarmens orale-anale akse [5]. Ventrikel til duodenum og ileum til colon er de grænser, hvor der sker massive ændringer i genudtrykket, mens der synes at være overraskende lille forskel i forekomsten af mRNA-molekyler, hvis man sammenligner de orale og de anale dele af enten tyndtarm eller tyktarm. Der er dog forskelle, hvilket for ganske nylig er blevet grundigt undersøgt for så vidt angår colon ascendens versus colon descendens [6], der blev identificeret i alt 49 gener, der udviste mere end trefold forskel i deres koncentration mellem henholdsvis højre og venstre halvdel af colon.

mRNA-forekomst i det patologiske tarmepitel

Fokus har her været på tyktarmskræft og de inflammatoriske tarmsygdomme. Under anvendelse af en populær type af DNA-arrays, de såkaldte GeneChip-arrays fra firmaet Affymetrix, kunne der rapporteres om de mest fremtrædende generelle ændringer i mRNA-forekomsten, når man bevæger sig fra normal colonmukosa til colonkræftvæv [7]. For eksempel blev det bemærket, at kræftvævet har et højere udtryk af en række mRNA, der koder for ribosomale proteiner, end normalt colonvæv. I et nyere dansk arbejde [8], der også bygger på Affymetrix-arrays, defineres 226 kendte gener og 157 genfragmenter – såkaldte *ekspressed sequence tags* (ESTs), som synes at være særligt relevante for beskrivelsen af forskelle i genudtryk mellem normal colonmukosa og kræftvæv stadietinddelt i henhold til Dukes' klassifikation.

For de inflammatoriske tarmsygdomme har man koncentreret sig om at beskrive afvigelserne i colonmukosa under den aktive inflammationsproces [9]. Der ses markante forskydninger i colonmukosaens forekomst af mRNA-kodende for histokompatibilitetsantigener og andre immunfunktionsproteiner som f.eks. immunoglobuliner og kemokiner. De histologiske forskelle mellem colitis ulcerosa og mb. Crohn viser sig f.eks. ved, at immunfunktionsgenerne især er opreguleret i tyktarmsvæv fra patienter med colitis ulcerosa. En samlet opgørelse af antallet af gener, som var forskelligt udtrykt i colonmukosaen fra enten colitis ulcerosa- eller mb. Crohn-patienterne sammenlignet med colonmukosaen fra kontrolpersoner afslørede, at 19% af generne havde samme udtryk i begge patientkategorier, 64% af generne havde et unikt udtryk hos patienter med ulcerøs colitis, mens 17% havde et unikt udtrykt hos mb. Crohn-patienter.

Hvad vil fremtidens gastroenterologiske vejrudsigt fortælle?

Der eksisterer altså nu en del deskriptiv viden om genudtryk i tarmen, og det må forventes, at denne viden og dens detaljeringsgrad vil øges betydeligt i de nærmeste år. Hvordan kan denne viden omsættes til nyttig information for patienterne? Inden for de inflammatoriske tarmsygdomme må man forvente, at man vha. DNA-array-analyser af tarmmukosa vil kunne begynde at identificere patientgrupper, der egner sig

særlig godt til en bestemt terapi. Når det gælder tyktarmskræft må det forventes, at videreudviklede statistiske analyser af de foreliggende samt kommende data vil kunne eftergøre Dukes-klassifikationen alene baseret på genudtryk og formentligt med tiden erstatte den med en bedre. Et helt andet felt er identificering af patienter, der er i særlig risiko for at få tarmsygdom, baseret på måling af mRNA-koncentrationer i den normale mukosa. I epidemiologiske studier har man vist, at genetisk disposition spiller en vigtig rolle i ætiologien for både tyktarmskræft og de inflammatoriske tarmsygdomme. Den genetiske disposition bygger grundlæggende på forskelle i genomet – de såkaldte polymorfier. Disse er traditionelt arbejdskrævende at kortlægge, men vil, hvis de ligger i et genregulatorisk område, kunne påvirke mRNA-produktionen fra et nærliggende gen, som det eksempelvis kendes fra det tarmudtrykte laktasegen [10]. Koncentrationsmålinger af mRNA repræsenterer derfor potentielt en genvej til detektion af genetisk disposition, som skyldes polymorfier i genregulatoriske områder eller i gener kodende for genregulatoriske proteiner. Endvidere har mRNA-koncentrationsmålinger den store fordel, at de kan udføres med den effektive og relativt billige (målt på kr. pr. gen) DNA-array-teknologi.

En nyttig vejrudsigt for patienten vil f.eks. kunne skelne mellem disposition eller ej for tarmsygdom. Prøven vil så typisk blive taget i forbindelse med en endoskopisk procedure, og fundet af disposition vil følgelig medføre regelmæssige kontrolundersøgelser. Fokus i denne artikel har været tyktarmskræft og inflammatoriske tarmsygdomme, men andre forudsigelser som f.eks. en patients risiko for at få postoperative komplikationer ved tarmkirurgi kunne meget vel blive relevante i fremtiden.

Korrespondance: Jørgen Olsen, Institut for Medicinsk Biokemi & Genetik, Panum Institutet bygning 6.4., Københavns Universitet, Blegdamsvej 3, DK-2200 København N. E-mail: jolsen@imb.gu.dk

Antaget: 12. maj 2004.

Interessekonflikter: Ingen angivet

Litteratur

1. Ideker T, Galitski T, Hood L. A new approach to decoding life: systems biology. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001;2:343-72.
2. Orntoft TF. DNA microarrays (DNA chips) used in molecular medical research. *Ugeskr Læger* 2003;165:786-90.
3. Tadjali M, Seidelin J, Olsen J et al. Transcriptome changes during intestinal cell differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2002;1589:160-7.
4. Olsen L, Hansen M, Ekstrøm CT et al. CVD: The intestinal crypt / villus in situ hybridization database. *Bioinformatics* 2004;20:1327-8.
5. Bates MD, Erwin CR, Sanford LP et al. Novel genes and functional relationships in the adult mouse gastrointestinal tract identified by microarray analysis. *Gastroenterology* 2002;122:1467-82.
6. Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K et al. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:755-62.
7. Alon U, Barkai N, Notterman DA et al. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6745-50.
8. Birkenkamp-Demtroder K, Christensen LL, Olesen SH et al. Gene expression in colorectal cancer. *Cancer Res* 2002;62:4352-63.
9. Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Molecul Gen* 2001;10:445-56.
10. Troelsen JT, Olsen J, Møller J et al. An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology* 2003;125:1686-94.