

Hvordan laver man en genekspressionsanalyse?

Af: *Kresten Cæsar Torp, Aalborghus Gymnasium*

Genekspressionsanalyse (Gene Expression Analysis) er en metode til at sammenligne hvilke gener der udtrykkes under forskellige forhold. Et gens ekspression vil sige, hvor meget det udtrykkes. Dvs. hvor meget RNA eller protein der dannes fra genet.

Man kan fx undersøge:

- Udtrykkes nogle gener mere eller mindre hos personer med en bestemt lidelse, sammenlignet med personer en rask kontrolgruppe?
- Udtrykkes nogle gener mere eller mindre i bestemte væv i kroppen end i andre? Det kan fx være i forskellige dele af hjernen, eller i kræftvæv.
- Sker der en ændring i hvilke gener der udtrykkes, hvis man indtager en bestemt medicin eller udsættes for bestemte giftstoffer?

Undersøgelsen udføres ved at man sammenligner hvordan gener udtrykkes hos mennesker med en bestemt lidelse, sammenlignet med en kontrolgruppe uden lidelsen. Det gør man ved hjælp af en såkaldt microarray-analyse. Herefter undersøger man statistisk, hvilke gener der udtrykkes anderledes.

Ved at undersøge nærmere hvilke funktioner de gener der udtrykkes anderledes har i kroppen, kan man fx blive klogere på *årsagssammenhænge* der er mellem bestemte gener og en lidelse eller virkningen af et medicinsk præparat.

- Lav evt. opgaven: "Hvad er genekspression?"

Metodedesign

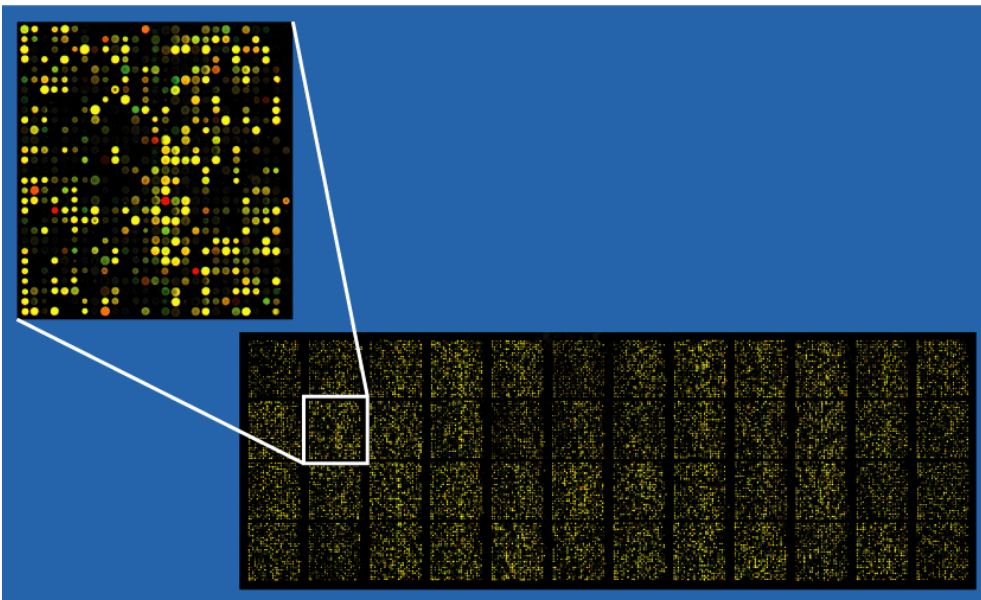
For at lave en ekspressionsanalyse må man have mindst to grupper at sammenligne. Det kan fx være en patientgruppe og en rask kontrolgruppe, eller en patientgrupper der modtager medicin og en kontrolgruppe, som modtager placebo. Man skal overveje, hvilke parametre man anvender til at kategorisere de to grupper. Nogle lidelser kan fx optræde i forskellig grad. Lidelser kan også være afhængige af alder eller køn.

Opgaver

- Forklar, hvad der menes med et kontrolforsøg eller en kontrolgruppe.
- Diskuter, hvilke parametre man kunne sætte op, når man definerer grupper for folk der lider af fx alkoholisme eller depression.

Hvordan virker en DNA-microarray?

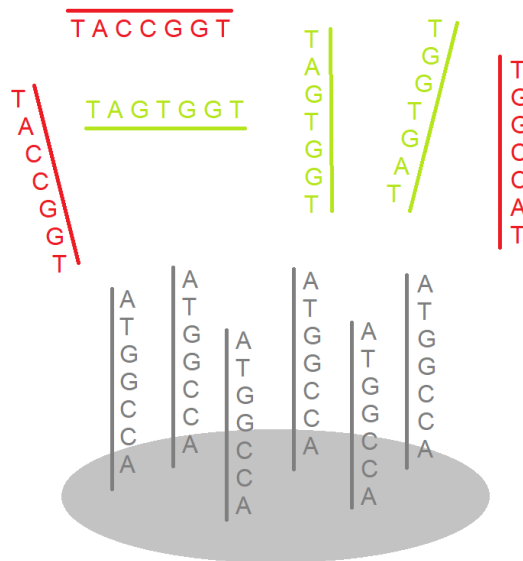
Man undersøger hvor kraftigt gener udtrykkes ved hjælp af en såkaldt DNA-microarray. Den består af en plade, hvorpå der er flere tusinde små felter. I hvert felt er der enkeltstrengede DNA-prober, dvs. små stykker med sekvenser, som er karakteristiske for de gener, man vi undersøge aktiviteten af. De kaldes også markører for genet. Man kan på den måde undersøge aktiviteten af flere tusinde gener ad gangen, principielt for alle kendte gener i en organisme.



Figur 2. Microarray. I hvert felt viser farveudslaget, om der bindes DNA til feltets probe.

Kilde: By Paphrag at English Wikipedia - Transferred from en.wikipedia to Commons., Public Domain,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1612185>

Når man tilsætter en prøve fra en patient, vil enkeltstrengt DNA fra patienten bindes til de felter, hvor markørerne passer ved baseparingsprincippet, som vist i figur 3.



Grafik: Kresten Cæsar Torp

Figur 3. Prøvefelt i en microarray, vist med gråt, som indeholder enkeltstrengede DNA-markører for et bestemt gen. Med farver er vist enkeltstrengede DNA-sekvenser fra hver af de undersøgte prøver.

Opgave

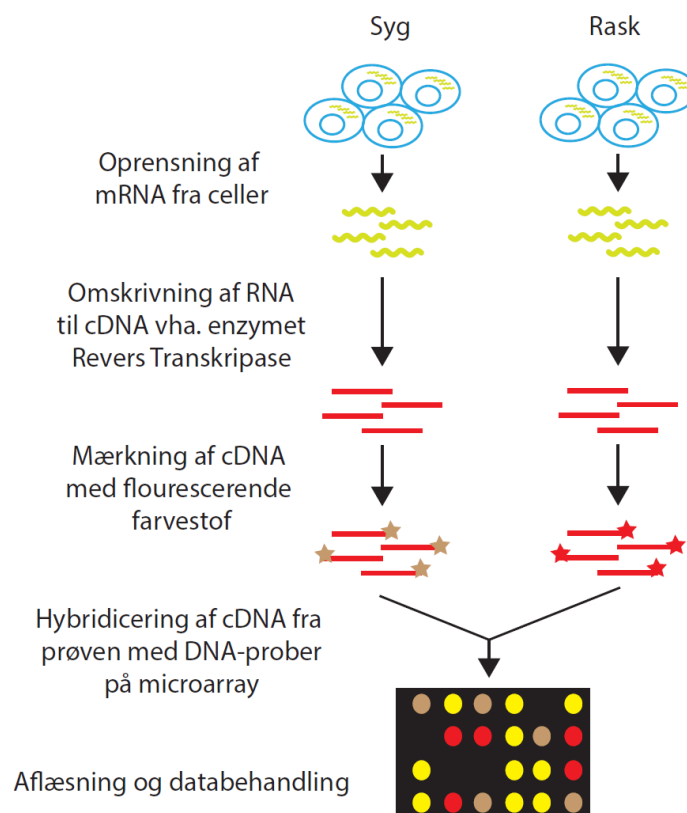
- Hvilken af prøberne i figur 3 vil bindes til sekvenserne på microarray-feltet (markeret med gråt), den grønne eller den røde?

Man kan med en microarray dels undersøge, hvilke gener der udtrykkes hos en enkelt person eller celletype, dels lave en direkte sammenligning mellem to personer.

- Hvis man undersøger genekspressionen hos en enkelt person eller celletype sammenligner man ekspressionen af de enkelte gener med ekspressionen af et gen der udtrykkes konstant med en kendt styrke i cellerne. Sådant et gen kaldes et husholdningsgen. Man kan nu sammenligne farveintensiteten af de enkelte felter med dette, og se, hvilke gener der overudtrykkes, og hvilke der underudtrykkes i forhold til husholdningsgenet. Det kalder man for en *normalisering* af resultaterne, dvs. at de korrigeres i forhold til en fælles fastsat norm eller "nullinje". Hermed kan man sammenligne resultaterne fx fra flere forsøgspersoner.
- Hvis man sammenligner to personer, fx en syg og en rask, farver man de to prøvers DNA med hver sin farve, fx rød og grøn. Felter hvor person 1's gen overudtrykkes bliver nu rødt. Felter hvor person 2's gener overudtrykkes bliver grønne og gener der udtrykkes uafhængigt af om man er syg eller rask vil optræde som gule felter. Figur 2 viser en sådan microarray.
 1. Bestem for den øverste række i microarray-en i figur 2, hvilke af generne der udtrykkes mest hos patienten (rødt), den raske kontrolprerson (grønt), dem begge (gult) eller ingen af dem (uden farve).

Forsøgsprocedure

En DNA-microarray reagerer på enkeltstrenget DNA. Ved genekspressionsforsøg ønsker man imidlertid at undersøge for forekomsten af mRNA. Derfor skal man først forberede prøverne ved proceduren vist i figur 4. Først oprenser man mRNA fra cellerne. Derefter omskriver man dem til DNA. En DNA-kopi af en mRNA kaldes en copy-DNA eller cDNA. Man får herved et cDNA-bibliotek, som viser, hvilke mRNA der var i cellen.



Grafik: Kresten Cæsar Torp

Figur 4. Laboratorieprocedure for genekspressionsforsøg.

Opgave

- Måske har du selv prøvet at oprense DNA i undervisningen. Giv forslag til hvilke behandlinger og kemikalier der kan indgå i at oprense RNA fra cellerne.
- Enzymet Revers Transkriptase stammer fra en gruppe RNA-virus kaldet retrovirus. HIV tilhører fx denne gruppe af virus. Genomet hos retrovirus består af RNA. Når de inficerer en celle skal de have deres genom integreret i cellens DNA. Giv forslag til hvorfor det er nødvendigt for dem at medbringe enzymet Revers Transkriptase til dette.

Boks 1: Hvorfor bliver rød + grøn = gul på microchippet?

Det kan måske virke underligt, at et felt på microchippet lyser gult, hvor der er både grønt og rødt farvestof tilstede. Forklaringen er, at der er tale om fluorescerende farvestoffer, der begge udsender lys af en bestemt bølgelængde, og dermed af en bestemt farve. Det betyder også at de er additive, dvs. at farverne "lægges sammen". Lyser man med et grøn og en rød lampe på en hvid væg, vil overlappet mellem dem fremstå gult, som vist på figuren øverst. Hvis man tænker på farverne som bølgelængder af lys, som vist i diagrammet nederst på figuren, giver det god mening. De to kurver på figuren viser det lys de to farvestoffer udsender hver for sig. Optræder de sammen, må de to kurver lægges sammen, og man får kurven i midten. Her bliver lysintensiteten i de gule bølgelængder højst.

