

# Biomarkörer vid celiaki

## Bakgrund

Glutenintolerans (celiaki) är en kronisk sjukdom där gluten som finns i vete, råg och korn ger inflammation och skadar tunntarmen. Personer med celiaki bör undvika gluten för att tarmen ska läka, men prover som visar att det är celiaki måste tas innan start med glutenfri kost. Därför är det viktigt att provtagning och analys kan utföras snabbt och ge säkra svar.

I dagens celiakidiagnostik mäter man antikroppar mot framför allt vävnadstransglutaminas i blodet och en patolog kan bedöma prover från tunntarmsväggen för att hitta skador som vid celiaki. En gradering av skadorna i tarmen kan göras med Marshskalan (förenklad beskrivning ses i Tabell 1 och exempel i Figur 1). När tarmproverna är svåra att bedöma eller visar mindre förändringar som inte är specifika för celiaki, eller när antikropps nivåerna är låga kan en säker diagnos vara svår att ställa. I ett försök att komplettera och förbättra diagnostiken vid celiaki undersökte vi om genuttryck, i form av nivåer av proteiner och/eller ribonukleinsyra (RNA), i tunntarmsprover och blod kunde användas som diagnostisk metod.

## Metod

Barn och ungdomar som genomgick tunntarmsbiopsi på grund av misstänkt celiaki tillfrågades om deltagande i studien. Individer utan celiaki användes som referenspopulation, förutom i delarbete I, där individer med Marsh grad 0 användes som referens oavsett diagnos. Individer med celiaki undersöktes både vid aktiv celiaki under gluten-innehållande kost och vid uppföljning under glutenfri diet. Tunntarmsbiopsier och blod samlades in. Från biopsierna renades RNA fram, och från blodet DNA, RNA, samt plasma. Till analys av RNA-nivåer i blod användes ett särskilt provtagningsrör där blodcellerna lyseras och RNA-nivåerna stabiliseras direkt vid provtagning. Resultat från patologens bedömning av tunntarmsbiopsier som provtagits för rutindiagnostik samt information om nivåer av autoantikroppar mot vävnadstransglutaminas (anti-

TG2) och antikroppar mot deamiderat gliadin och nativt gliadin samlades in för alla individer som deltog i studien.

## Tunntarm

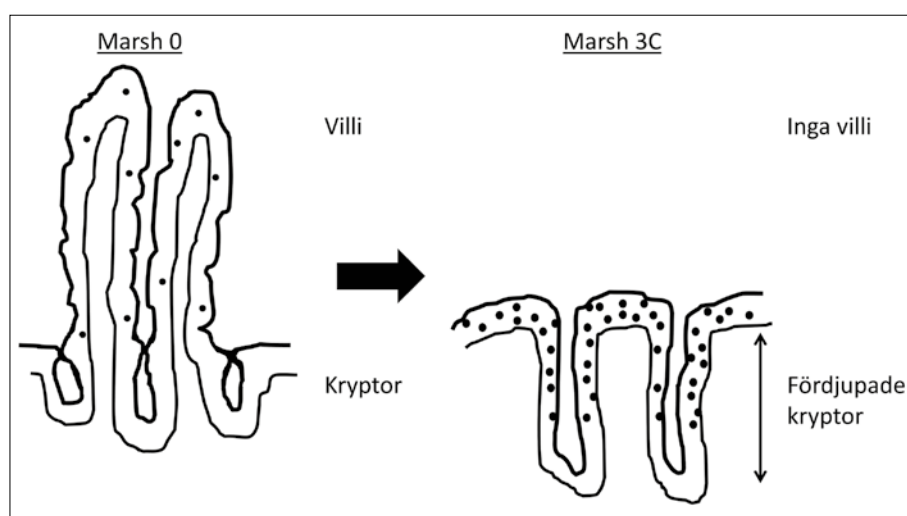
I delarbete I [1] analyserades RNA-nivåer från utvalda gener med hjälp av realtids-PCR. Generna valdes för att reflektera villushöjd, kryptdjup, immunrespons och tarmens barriärfunktion, och RNA-nivåer från totalt 109 gener analyserades i tunntarmsbiopsier med Marsh 0 (n = 4) och Marsh 3A-3C (n = 10) från individer med och utan celiakidiagnos, tillsammans med referensgener för normalisering. Femtiotvå gener med skilt uttryck mellan grupperna

valdes ut och uttrycket analyserades i 40 tunntarmsbiopsier (Marsh 0-3C) från individer med och utan celiakidiagnos. Genuttrycket i en av dessa biopsier som enligt patologutlåtande skulle vara en Marsh 3 liknade mer genuttrycket hos Marsh 0 biopsierna, och den exkluderades därför från alla gruppjämförelser.

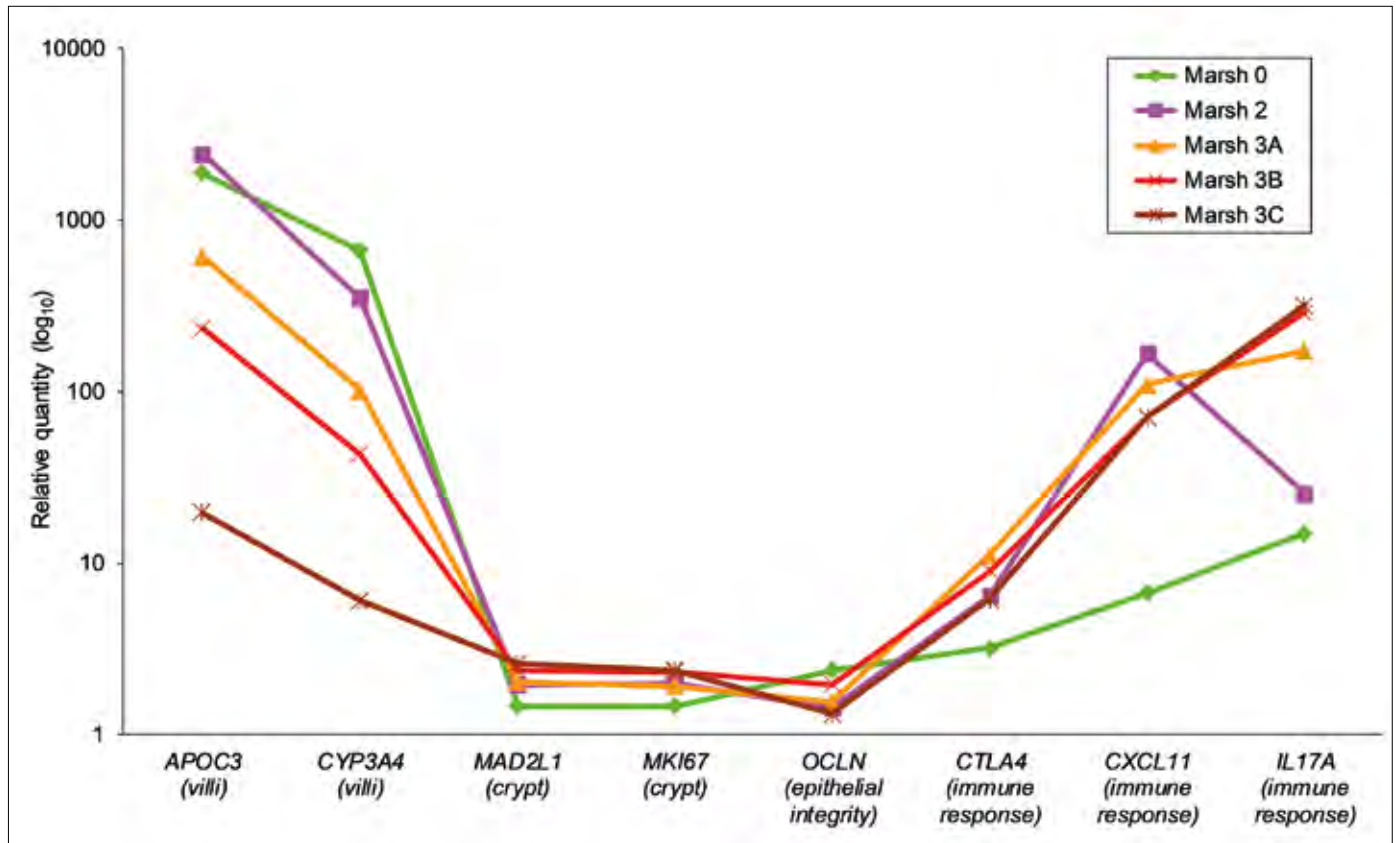
I delarbete III [2] analyserades total-RNA-nivåer med hjälp av RNA-sekvensering i 20 individer utan celiakidiagnos (Marsh 0) samt 20 individer med aktiv celiaki (Marsh 3A-3C). En individ i gruppen utan celiakidiagnos exkluderades senare från alla gruppjämförelser då genuttrycket i tunntarmsbiopsin liknade genuttrycket hos

**Tabell 1.** Förenklad beskrivning av Marshskalan. Marsh 2-3C är kompatibla med en celiakidiagnos.

	Intraepiteliala lymfocyter	Kryptor	Villushöjd
Marsh 0	Enstaka	Opåverkade	Opåverkad
Marsh 1	Ökat antal	Opåverkade	Opåverkad
Marsh 2	Ökat antal	Fördjupade	Opåverkad
Marsh 3A	Ökat antal	Fördjupade	Partiellt reducerad
Marsh 3B	Ökat antal	Fördjupade	Subtotalt reducerad
Marsh 3C	Ökat antal	Fördjupade	Totalt reducerad



**Figur 1.** Förenklad illustration av de karakteristiska förändringarna i Marsh 0 och Marsh 3C tunntarm. Figur från [4].



**Figur 2.** Medianvärdet av genuttrycket (normaliserat mot två referensgener och relativt till den biopsi som uppvisat lägst genuttryck) presenterat per Marshgrad baserat på 39 tunntarmsbiopsier och åtta utvalda gener. Figur från [4].

individerna i gruppen med aktiv celiaki. Baserat på resultaten valdes 29 gener ut för uppföljande studier med realtids-PCR, och två referensgener inkluderades för normalisering. Genernas uttryck analyserades i tunntarmsbiopsier från individer utan celiakidiagnos (Marsh 0,  $n = 10$ ) och individer med aktiv celiaki (Marsh 3A-3C,  $n = 26$ ), där åtta av individerna inkluderades från grupperna för RNA-sekvensering för att kontrollera metodernas överensstämmelse. Dessutom inkluderades 15 ytterligare individer för att undersöka genuttryck vid olika scenarier, exempelvis gruppen kallad "CD later" där tunntarmsbiopsin som inkluderades i denna studie visade Marsh 0-1 enligt patologen och en ytterligare biopsiprovtagning behövde göras innan en celiakidiagnos kunde fastställas ( $n = 4$ ). Mer detaljerad information om alla individer och grupper återfinns i Bragde *et al* [2].

### Blod

I delarbete II [3] analyserades RNA-nivåer i stabiliserat helblod från utvalda gener ( $n = 49$ ) med hjälp av realtids-PCR, samt proteinnivåer i plasma från utvalda gener ( $n = 22$ ) med hjälp av Luminex xMAP-

teknologi eller ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). RNA och proteinnivåer analyserades i blod respektive plasma från 20 individer med aktiv celiaki (Marsh 2-3C), 15 individer med celiaki där tunntarmen normaliserats (Marsh 0-1) och 14 individer utan celiakidiagnos (Marsh 0-1). Dessutom inkluderades tre individer (Marsh 0-1) under fortsatt utredning för misstänkt celiaki.

I delarbete IV analyserades total-RNA-nivåer i blod från tio individer med aktiv celiaki (Marsh 3B-3C), tio individer med celiaki där tunntarmen normaliserats på glutenfri diet (Marsh 0) samt tio individer utan celiakidiagnos (Marsh 0) med hjälp av RNA-sekvensering.

### Resultat från studien

#### Tunntarm

Resultaten från delarbete I visade att RNA-nivåer i tunntarmen kunde spegla viktiga delar av patologens bedömning av tunntarmsproverna, och att nivåerna varierade med graden av skada i tarmen. Baserat på resultaten valdes åtta gener ut (Figur 2) som i en diskriminantanalys kunde särskilja mellan två grupper (Marsh 0 och Marsh

2-3C), men även tre grupper (Marsh 0, Marsh 2-3B, samt Marsh 3C). Dessa geners uttryck analyserades i biopsier från en oberoende grupp individer ( $n = 27$ ) och resultaten visade på en god förmåga för diskriminantanalys att klassificera biopsierna utifrån genuttryck. I de fall där patologutlåtande och diskriminantanalys skilde sig åt mellan Marsh 0 och Marsh 2-3C rapporterades patologen fläckvisa förändringar i tarmen ( $n = 2$ ), eller att biopsierna var suboptimala för bedömning ( $n = 2$ ). Två ytterligare skillnader återfanns när man delade upp Marsh 2-3C i grupperna Marsh 2-3B och Marsh 3C.

I delarbete III identifierades ett stort antal gener ( $n = 1177$ ) med differentiellt uttryck mellan aktiv celiaki och icke-celiaki, och 29 gener valdes ut för uppföljande studier varav 2 gener uteslöts på grund av att de inte kunde detekteras med utvalda realtids-PCR-assays. Vid analys av överensstämmelse mellan resultat från RNA-sekvensering och realtids-PCR uppvisade en gen en något lägre korrelation, medan resterande 26 gener uppvisade en hög korrelation. Vidare analys av de 27 detekterade generna visade att genuttrycket varierade

med Marshgrad, och att fem gener visade en nivåskillnad hos celiakipatienter redan innan de typiska celiakirelaterade tarmskadorna kunde fastställas av patologen ("CD later", Figur 3). Då detta resultat är baserat på mycket få individer ( $n = 4$ ) är det av intresse att undersöka genuttryck hos en större grupp med liknande patienter innan några slutsatser dras. Analysens utformning gav även möjlighet att titta på vilka biologiska processer i tunntarmen som påverkades vid celiaki, och resultaten inkluderade bland annat inflammation, infektion, tarmens barriärfunktion och metabolism.

### Blod

Blod innebär en enklare provtagning än en tunntarmsbiopsi vilket skulle innebära en fördel i en analysmetod för diagnos och uppföljning av celiaki. Att använda stabiliserat helblod har fördelar vid diagnostik på så vis att RNA-nivåerna hålls intakta från provtagning. Ett RNA (från *IL25*) i delarbete II kunde inte detekteras med utvalda reagens och exkluderades från fortsatta analyser. Resultaten från delarbete II visade att proteinnivåer från genen *CXCL11* och RNA-nivåer från genen *TNFSF13B* var högre i blod från individer med aktiv celiaki jämfört med icke-celiaki. RNA-nivåer från *TNFSF13B* var högre även hos individer med normaliserad celiaki. RNA-nivåer från

*TNFSF9* var högre hos individer med normaliserad celiaki jämfört med både icke-celiaki och aktiv celiaki. Men baserat på resultaten från delarbete II såväl som delarbete IV kunde inte någon enstaka markör identifieras som kunde matcha den diagnostiska förmågan hos de antikroppar som idag används för celiakidiagnostik. Resultaten från delarbete IV indikerade dock att biologiska processer som t.ex. inflammation, negativ kontroll av virusförökning, samt blodcellers tillväxt, förflyttning, specialisering och överlevnad kan vara påverkade vid celiaki. Att använda skillnader i biologiska processer istället för skillnader mellan enstaka RNA som verktyg i en diagnostisk metod kan ge ökad stabilitet till metoden.

### Slutsats

Resultaten från studien visar att analys av ett fåtal RNA i tunntarmsbiopsier kan användas som ett tillägg till dagens diagnostiska metoder för celiaki. Genuttrycksanalys med realtids-PCR är en relativt snabb och objektiv analys med bra reproducerbarhet och kan utföras med instrumentation som idag finns tillgänglig på de flesta kliniska laboratorier. Vid hantering av resultaten från analysen behöver vi undersöka om det går att omvandla genuttrycket till kvalitativa värden, t.ex. genom att använda kvoter mellan genpar, för att undvika behovet av en

referenspopulation att jämföra genuttryck mot. Detta skulle underlätta implementering av metoden kliniskt. Vi har ännu inte undersökt om RNA-nivåerna i tunntarm hos individer med celiaki är lika eller skiljer sig från individer med andra sjukdomar i tarmen. Detta behöver undersökas vidare, liksom potentialen för analys av RNA i blod baserat på biologiska processer. Av stort intresse att följa upp är också resultaten som indikerar att förändringar i genuttryck i tunntarmen skulle kunna mätas innan typiska celiakirelaterade tarmskador kan fastställas av patologen.



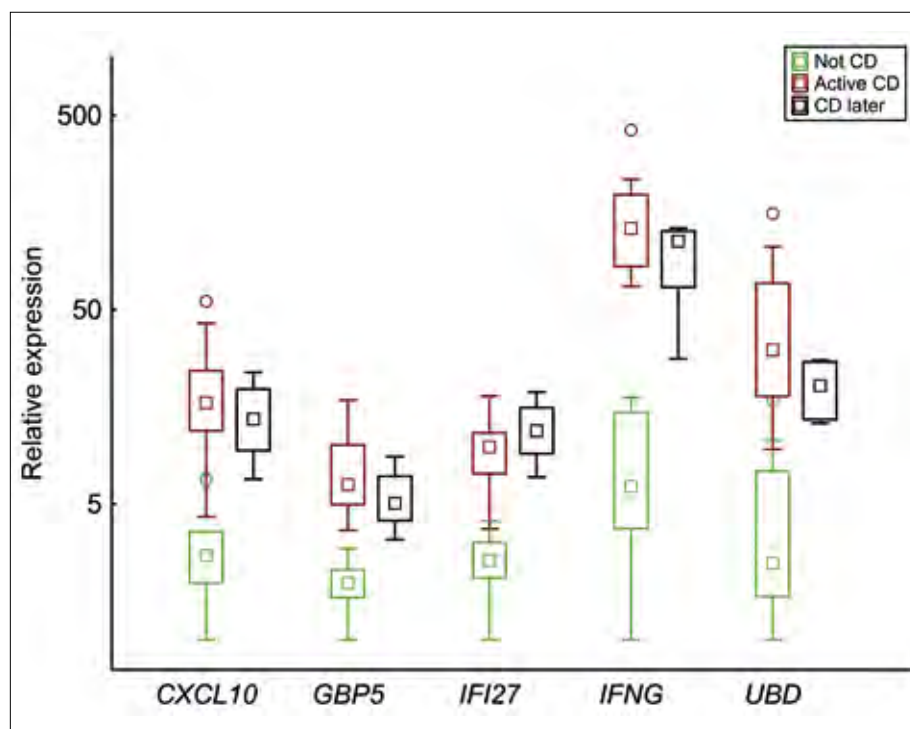
**Hanna Gustafsson Bragde**

Molekylärbiolog

Laboratoriemedicin

Länsjukhuset Ryhov

hanna.gustafsson.bragde@rjl.se



**Figur 3.** Box plot över uttrycket från fem gener som uppvisar ett skilt genuttryck hos gruppen "CD later" jämfört med gruppen utan celiaki. Figur från [2].

### Referenser

1. Bragde, H.; Jansson, U.; Jarlsfelt, I.; Soderman, J. Gene expression profiling of duodenal biopsies discriminates celiac disease mucosa from normal mucosa. *Pediatr Res* 2011, 69, 530-537, doi:10.1203/PDR.0b013e318217eccc.
2. Bragde, H.; Jansson, U.; Fredrikson, M.; Grodzinsky, E.; Soderman, J. Celiac disease biomarkers identified by transcriptome analysis of small intestinal biopsies. *Cell Mol Life Sci* 2018, 75, 4385-4401, doi:10.1007/s00018-018-2898-5.
3. Bragde, H.; Jansson, U.; Fredrikson, M.; Grodzinsky, E.; Soderman, J. Potential blood-based markers of celiac disease. *BMC gastroenterology* 2014, 14, 176, doi:10.1186/1471-230X-14-176.
4. Gustafsson Bragde, H. Biomarkers of Inflammation and Intestinal Mucosa Pathology in Celiac Disease. Diss., Linköping University, 2019.