



AF LENE GREDAL
BIOANALYTIKER
KLINISK FORSKNINGSCENTER
HVIDOVRE HOSPITAL

GENOTYPNING AF LAKTOSEINTOLERANS EN STATUSARTIKEL

Ny sikrere DNA-test til diagnostik af laktoseintolerans

Fundet af to enkelt-nukleotid polymorfier associeret til laktosetolerans og laktoseintolerans har gjort det muligt at erstatte den hidtil anvendte laktosetoleranstest med en genotypning til udredning af laktoseintolerans hos børn og voksne.

Det primært forekommende kulhydrat i mælk er laktose. Laktose er et disakharid, der består af monosacchariderne glukose og galaktose bundet sammen af en β -glycosidbinding. I tyndtarmens slimhinde bliver laktose spaltet til glukose og galaktose af enzymet laktase phlorizin hydrolase (laktase), hvilket er nødvendigt for at kunne bruge laktose.

Hos nyfødte børn, hvor hovedbestanddelen af ernæringen er mælk, er aktiviteten af laktase vital og aktiviteten derfor høj, men efterhånden som barnet bliver ældre, vil der ske en nedregulering af laktase (1). Hos nogle mennesker vil laktase være forsvundet før voksenalderen, og de kan derfor ikke fordøje laktose som voksne. Denne fænotype beskrives som laktoseintolerans eller adult-type hypolactasi i modsætning til fænotypen med laktosetolerans, hvor personen har en livslang laktase-ekspression og derfor også kan fordøje laktose som voksen (1, 2).

I Danmark er laktoseintolerans en relativt sjælden tilstand. Symptomerne ved laktoseintolerans er oftest luft i maven, mavekrampe og diarré. Laktose, der ikke spaltes, vil binde vand og transporteres til den nederste del af tarmen. Her nedbrydes laktose ved en gæring til laktat og karbondioxid (1).

Hvis der er mistanke om, at patienten har laktoseintolerans, kan der anvendes en oral laktose-belastning med måling af blodsukker, men denne test giver ofte et falsk positivt svar. En enzym-analyse på en biopsi af tyndtarmen er en mere sikker metode til at stille diagnosen, men den er omkostningsfuld og forbundet med ubehag for patienten. Med fundet af to enkelt-nukleotid polymorfier associeret til laktosetolerans og laktoseintolerans er det nu muligt at stille diagnosen ved hjælp af en DNA-test analyseret på en enkelt blodprøve⁽²⁾.

Forekomst

Hastigheden, hvormed laktase-aktiviteten nedsættes, varierer blandt individer og etniske grupper, og familiestudier har vist, at laktoseintolerans nedarves autosomal recessivt (1, 2).

De allerførste undersøgelser, der blev lavet omkring laktase, viste, at både børn og voksne havde en høj laktase-ekspression. Det betyder formentlig, at disse undersøgelser blev foretaget i lande, hvor fænotypen med livslang laktase-ekspression var den mest udbredte og hyppigst forekommende. Derfor blev fænotypen, som havde laktoseintolerans, i lang tid betragtet som et unormalt træk. Kort tid efter viste

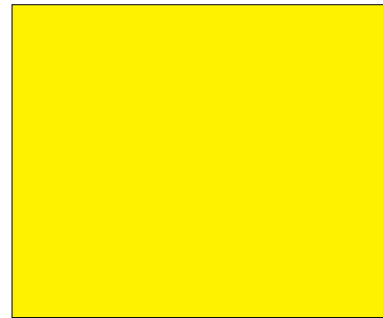
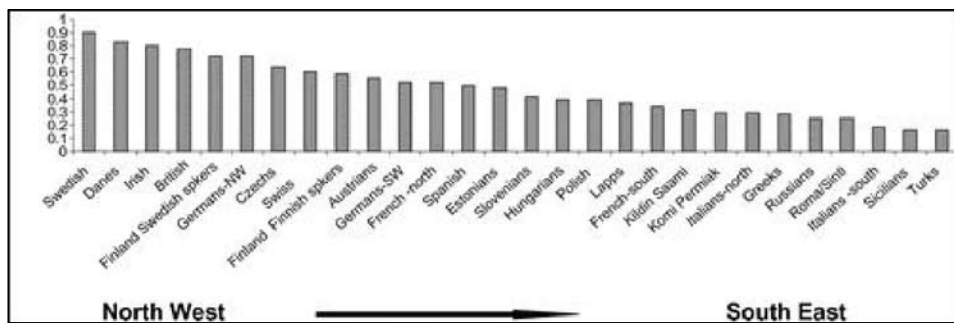
nye undersøgelser, at det var omvendt, og faktisk har ca. 70 % af jordens befolkning laktoseintolerans (1).

Forekomsten af laktoseintolerans varierer fra 5 % til omkring 100 % mellem etniske befolkningsgrupper, og den laveste forekomst af laktoseintolerans findes i Danmark og Sverige. Generelt har det meste af Nordeuropas og Nordamerikas voksenbefolkning ikke mistet evnen til at nedbryde laktose, hvorimod forekomsten af laktoseintolerans stiger i Sydeuropa for at være næsten 100 % i Sydøstasien og Afrika (1, 2) (se figur 1).

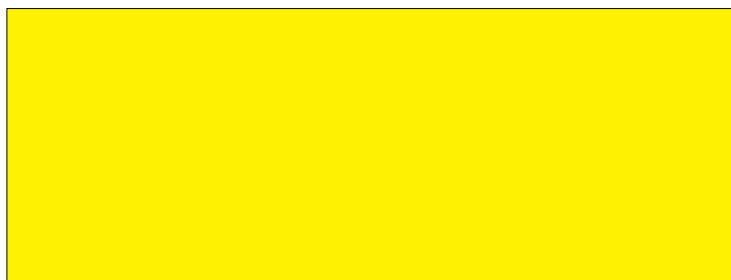
Lokalisering af to polymorfier

Ønsket om at finde en mere sikker metode til diagnosticering af laktoseintolerans har fået flere forskere til at undersøge, om DNA-variationer i genet for laktase kunne være forklaringen på laktoseintolerans. Ved sekvensanalyse af promotor-regionen og de kodende exons i laktase-genet er der fundet flere polymorfier, men ingen af dem kan umiddelbart give en molekylær forklaring på den nedregulering, der giver fænotypen laktoseintolerans (1).

I 2002 undersøgte forskere ni finske familier med laktoseintolerans for at afsløre en eventuel DNA-variation. Arveligheden af flere mikrosatellit markører lokaliseret omkring laktase-genet på



Figur 1 illustrerer frekvensen (y-aksen) af laktosetolerans hos voksne personer i den europæiske befolkning (x-aksen) (1).



Forskerne antager, at alle mennesker på et tidspunkt har haft den samme genetiske nedregulering af laktase. Genotypen, der giver laktosetolerans, anslås til kun at være mellem 5.000-10.000 år gammel og er formentlig opstået, da nordeuropæerne begyndte at bruge mælken fra deres kvæg som en vigtig ernæringskilde (5).

kromosom 2q21 blev nøje undersøgt. Ved denne mikrosatellitanalyse blev der fundet et område på 47kb, der var identisk hos alle personer med laktosetolerans, der blev testet. Med en sekvensanalyse af hele området på de 47kb fandt forskerne 2 polymorfier associeret med laktoseintolerans. Den ene C/T-polymorfi er lokaliseret 13 910 basepar opstrøms for laktase-genet. Den anden polymorfi G/A, 22 018 basepar opstrøms laktase-genet. De to polymorfier blev nærmere undersøgt i 196 finske DNA-prøver. DNA-prøverne var biopsier fra tyndtarmen, hvor laktase-aktiviteten var biokemisk bestemt og derfor kendt. Denne undersøgelse kunne bekræfte de første resultater og viste, at homozygot C/C-13 910-genotype var 100 % associeret med laktoseintolerans, og G/G-22 018-homozygot var 97 % associeret med laktoseintolerans. T-13 910- og A-22 018-varianterne er associeret med laktosetolerans (1, 2).

MCM6-genet

I den finske undersøgelse blev 47 kb ved siden af laktase-genet sekvenseret. De 47 kb indeholder kun et gen, minichromosommaintenance-6 gen (3). MCM6-genet er involveret i celcyklusregulationen, hvor det sørger for, at DNA-replikationen kun sker en gang i hver cyklus. Indtil nu er ingen sygdomme i mennesket associeret til MCM6-genet.

MCM6-genet er lokaliseret 3 kb opstrøms for laktase-genet. Den ene

C/T-polymorfi er lokaliseret i intron 13, den anden polymorfi G/A i intron 9. De to polymorfier er altså ikke lokaliseret i exon og har formentlig ingen betydning for funktionen af selve MCM6-genet (2, 3) (se figur 2).

Regulering af laktase-genet

Identifikationen af de to polymorfier associeret til laktosetolerans og laktoseintolerans har igangsat flere undersøgelser for at finde den molekylære årsag til reguleringen af laktase-ekspressionen.

Fleere transfektionsstudier in vitro har vist, at de to polymorfier ikke har lige stor betydning for reguleringen af laktase-genet. Regionen indeholdende polymorfien C/T-13 910 har vist sig at fungere som en enhancer for laktase-promotor-aktiviteten, hvis aktivitet øges signifikant ved T-varianten i forhold til C-varianten. Dette stemmer overens med, at det er C-varianten, der giver fænotypen laktoseintolerans. Samme forsøg blev foretaget med regionen indeholdende polymorfien G/A-22 018. G-varianten viste ingen ændring i laktasepromotor-aktiviteten. A-varianten, der er associeret med laktosetolerance, viste en let øget, men ikke signifikant øget promotor-aktivitet (3, 4).

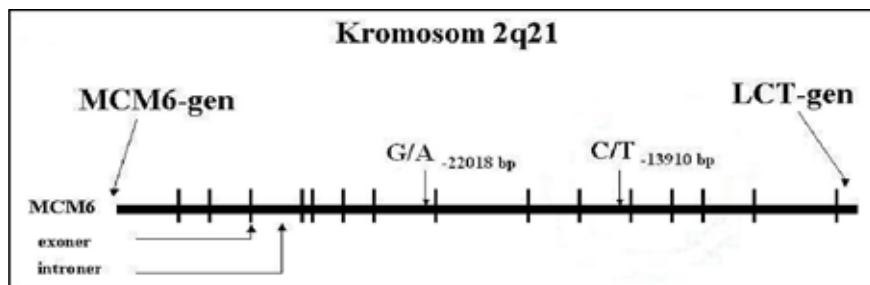
Dette gør det sandsynligt, at G/A-22 018-polymorfien ikke har nogen funktion eller betydning for fænotypen laktosetolerans, men derimod bare er i koblingsuligevægt med C/T-13 910-polymorfien (3, 4).

Forskning i transkriptionsfaktorer

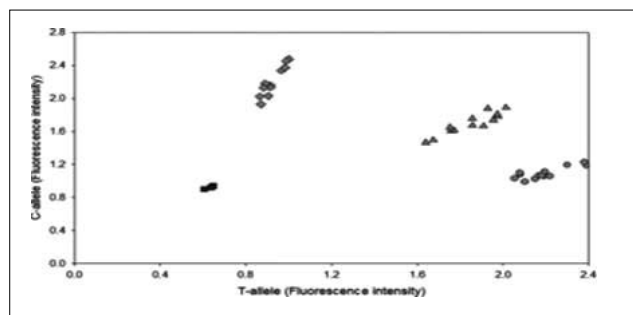
I endnu et forsøg på at finde den molekylære årsag til reguleringen af laktase-ekspressionen har forskere undersøgt, om der er en sammenhæng mellem de to polymorfier og nogle af de transkriptionsfaktorer, der er knyttet til laktase-genet.

En region på 150 bp opstrøms transkriptionsinitieringsstedet for laktase-promotoren er yderst velbevaret og til dels ens for mennesker, grise og rotter. Omfattende studier af denne region har vist, at en binding samt interaktion af Cdx-2-, HNF1 α - og GATA-transkriptionsfaktorerne er nødvendig for en promotor-aktivitet i laktase-genet (4, 5) (se figur 3).

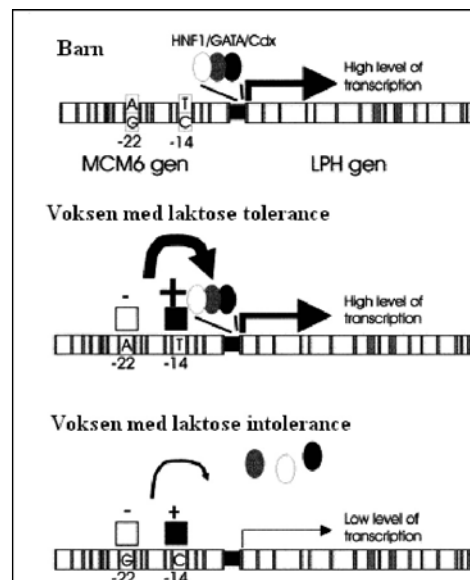
En nærmere analyse af regionen omkring T-13 910-varianten har vist, at der findes flere transkriptionsfaktorer, der binder sig til T-13 910-varianten. Disse faktorer er vigtige for en enhanceraktivitet og dermed en øget laktasepromotor-aktivitet. Et transfektionsstudie in vitro har vist, at Oct-1, der er et gen-regulatorisk protein, er en af de transkriptionsfaktorer, der bindes til T-13 910. Binding samt interaktion af både Oct-1 og især HNF1 α øger enhancereffekten betydeligt, hvilket må betyde, at det er bindingen af Oct-1 til T-13 910-varianten, der forhindrer en nedregulering af laktaseaktiviteten. At Oct-1 bindes meget stærkere til T-13 910 varianten end C-13 910-varianten, er måske endnu et bevis for, at det er T-13 910 DNA-varianten, der er år-



Figur 2



Figur 4 illustrerer en genotypning af C/T-13 910-polymorfien med et ABI PRISM 7000-analyseudstyr. X-aksen viser fluorescens-intensiteten af den VIC-mærkede probe bundet til T-allelen. Y-aksen viser fluorescens-intensiteten af den 6-FAM-mærkede probe bundet til C-allelen. Her er data fra 20 patienter samt 3 negative og 3 positive kontroller. Firkanterne er kontroller, trekant betegner genotypen CT, ruder CC og cirkel TT (6).



Figur 3 illustrerer en skematisk model af interaktionen mellem promotoren i laktase-genet (LPH-gen) og de to polymorfier. I de tidlige barneår er ekspresionen af laktase høj, da transskriptionsfaktorerne Cdx-2, HNF1 α , GATA kan regulere laktase-genet uden enhancer-aktivitet fra 13 910-allelen. Hos voksne er tilgængeligheden af faktorerne nedsat. Der skal derfor være en stærk enhancer-aktivitet fra T-13 910-varianten, for at ekspresionen af laktase ikke mistes (4).

>>>

sagen til en bevaret laktaseaktivitet in vivo (4,5).

Tre genotyper fører til to fænotyper

Forskning omkring ekspresionen og reguleringen af laktase-genet peger altså imod, at kun personer med homozygot C/C-13 910-genotype har laktoseintolerans. Dette bekræftes ved målinger af mRNA i tyndtarmens mucosa. Disse målinger har vist, at personer med T-13 910-/A -22 018-allelen har et noget højere niveau af laktase-mRNA end personer med C-13 910/G -22 018. Dette bekræfter en transskriptionel regulering af laktasegenet, hvor hver laktase-allel reguleres uafhængigt. Det betyder, at personer med genotyperne T/T og C/T-13910 kan nedbryde laktose og har fænotypen laktosetolerans, hvorimod personer med genotypen C/C har fænotypen laktoseintolerans (adult- type hypo-

laktoseintolerans). Sammenligning af resultaterne fra personer, der fik foretaget både en genotypning og oral laktosetolerans-test, viser heller ingen signifikant forskel i stigningen af vB-glukose, stofk. for heterozygot C/T og homozygot C/C (3, 5, 6, 8).

Nemmere prøvetagning

Ved mistanke om laktoseintolerans er der hidtil anvendt en oral laktosetolerans-test. Denne test kræver, at patienten møder fastende til undersøgelsen og skal drikke en opløsning af vand tilsat 50 g laktose. Efterfølgende tages der en blodprøve til bestemmelse af kB-glukose, stofk. hvert 15. minut i en time. Det er stigningen af kB-glukose, stofk, der afgør, om patienten ikke har laktoseintolerans (6). Foruden at være behæftet med en del usikkerhed er testen ubehagelig for patienterne, idet de skal faste og stikkes flere gange. Tilmeld har nogle patienter meget svært ved at drikke laktoseopløsningen, og de kan blive dårlige under undersøgelsen.

En genotypning til bestemmelse af C/T 13 910-polymorfien og dermed laktoseintolerans kræver kun en enkelt blodprøve. Til analysen kan anvendes EDTA-stabiliseret blod udtaget enten som en vene- eller kapillærblodprøve. En genotypebestemmelse er meget patientvenlig og vil kunne give en mere præcis diagnostik (6).

Forskellige analysemetoder

Et svensk studie har sammenlignet tre analysemetoder til genotypning af C/T 13 910-polymorfien med en oral laktosetolerans-test. Patienter, der kom til undersøgelse for laktoseintolerans, fik også tage en blodprøve til en genotypning. Desuden blev der foretaget en genotypning af et antal af anonyme bloddonorer. De tre metoder til genotypning var henholdsvis en direkte DNA-sekventering, PCR-RFLP samt Real-time PCR. Hos 94 % af patienterne var der overensstemmelse mellem laktosetolerans-test og genotypning. Alle tre metoder til genotypning viste 100 % overensstemmelse, men Real-time PCR er en mere velegnet metode, især hvis mange prøver skal analyseres. Det at Real-time PCR er en automatiseret metode, gør den hurtigt og sikker. Desuden er risiko for PCR-kontamination mindre med denne metode.

I studiet blev anvendt et ABI PRISM 7000-analyseudstyr (Applied Biosystem). Et DNA-stykke på 71 bp dækkende C/T 13 910-polymorfien bliver amplificeret af hertil designede primere. Under annealingsfasen hybridiseres to prober mærket med fluorescerende farvestof til henholdsvis T-allelen og C-allelen. En VIC-mærket probe hybridiseres til T-allelen, og en 6-FAM-mærket probe til C-allelen. Lysintensiteten fra den tilstedeværende allel kan nu detekteres (6) (Se figur 4).

MÆLKEALLERGI

Mælkeallergi er så godt som ukendt hos voksne, men forekommer ikke helt sjældent hos spædbørn. Symptomerne ved mælkeallergi er diarré og evt. opkastninger efter indtagelse af mælk. Ved mælkeallergi er det proteinerne i mælken, som barnet ikke kan tåle. Barnet må derfor ikke få kost, der indeholder mælkeprotein. Mælkeallergi er altså ikke det samme som laktoseintolerans, hvor man helt eller delvist mangler enzymet laktase i tyndtarmen (11).

Lightcycler Real-time PCR er en anden nem og hurtig metode til at detektere C/T-13 910-polymorfien. Ved hjælp af PCR amplificeres det ønskede DNA-stykke, og der tilsættes to specialdesignede prober. Den ene er detektionsprobe, der dækker polymorfien og er mærket med et farvestof (LC-640) i 5'enden. Den anden er en "anchor" probe, der hybridiserer til et stykke DNA tæt ved polymorfien og er mærket med fluorescein i 3'enden. Under annealingsfasen vil de to prober hybridisere til det amplificerede DNA-stykke, og fordi de er nær hinanden udsende et fluorescerende lys. Polymorfien kan så detekteres med en smeltepunktanalyse, da en mismatch probe har et lavere smeltepunkt end en probe med 100 % homologi. Når mismatch proben smelter af, og proberne ikke længere er nær hinanden detekteres et fald i intensiteten af det fluorescerende lys (7, 8).

Et studie har sammenlignet Lightcycler Real-time PCR med en laktosetoleranstest.

Dette studie viser, at en genotypning giver færre falsk positive resultater (7).

Begrænsninger

En genotypning kan ikke påvise laktoseintolerans, som er opstået af sekundære årsager, som fx cøliaki, inflammatorisk tarmsygdom, cytostatikabehandling eller mælkeallergi (1, 6).

Uanset genotypen er laktase i tyndtarmen opreguleret i den tidlige barnealder. Først fra 12 års alderen har børn med genotypen homozygot C/C 13 910 så lav laktase-ekspression, at det medfører laktoseintolerans. Derfor kan en genotypning kun anvendes hos børn under 12 år som en udelukkelsestest (9).

Konklusion

Selvom flere studier er nødvendige for at vise, om C-13 910 er varianten, der giver laktoseintolerans, eller om det kun er en associeret markør, kan en genotypning anvendes diagnostisk og er forbundet med mindre ubehag for patienterne end gængse test (6, 7, 8).

De nye analysemetoder, hvor Real-time PCR anvendes, kan let og hurtigt give en bestemmelse af laktasegenotypen og dermed give en mere sikker udredning af laktoseintolerans hos både børn og voksne med abdominalsymptomer. Metoden anvendes allerede på flere af landets hospitaler og er netop taget i brug på Hvidovre Hospital, Klinisk Biokemisk Afdeling.

ORDFORKLARING

Enkelt nukleotid polymorfi: Forskelle i DNA-sekvensen imellem individerne i en population, der skyldes et enkelt nukleotid.

Promotorregion: En speciel sekvens af nukleotider, der findes i starten af hvert gen. Denne sekvens er i stand til at binde RNA-polymerasen og således starte transskriptionen.

PCR (eng. Polymerase Chain Reaction): Polymerase kædereaktion. Opformering af et DNA-stykke på baggrund af to udvalgte primere.

RFLP (eng. Restriction Fragment Length Polymorphism): Restriktionsfragmentlængde polymorfi. Metode, hvor der bruges restriktionszymer, gelelektroforese og probe til at undersøge DNA-områder, som varierer fra person til person.

Transfektion: Indførelse af nyt genetisk materiale i eukaryote celler.

Transskriptionsfaktorerne:

Cdx-2: - Caudal-type homeobox transcription factor 2.

HNF1 α : Hepatocyte nuclear factor 1.

GATA: GATA-binding protein.

Oct-1: Octamer-binding transcription factor 1.

Alle er vigtige transskriptionsfaktorer, der regulerer transskriptionen og ekspresionen af specifikke tarmgener.

LITTERATURLISTE

1. Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu. Rev. Genet.* 2003; 37:197-219.
2. Enattah, N. S.; Sahi, T.; Savilahti, E.; Terwilliger, J. D.; Peltonen, L.; Jarvela, I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature Genet.* 30: 2002, 233-237.
3. Olds LC, Sibley E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. *Hum Mol Genet.* 2003 Sep 15; 12(18):2333-40
4. Troelsen JT, Olsen J, Møller J, Sjøstrøm H. An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology.* 2003 Dec; 125(6):1686-94.
5. Lewinsky RH, Jensen TG, Møller J, Stensballe A, Olsen J, Troelsen JT. T-13910 DNA variant associated with lactase persistence interacts with Oct-1 and stimulates lactase promoter activity in vitro. *Hum Mol Genet.* 2005 Dec 15; 14(24):3945-53.
6. Ridefelt P, Hakansson LD. Lactose intolerance: lactose tolerance test versus genotyping. *Scand J Gastroenterol.* 2005 Jul; 40(7):822-6.
7. Szilagyi A, Malolepszy P, Hamard E, Xue X, Hilzenrat N, Ponniah M, MacNamara E, Chong G. Comparison of a real-time polymerase chain reaction assay for lactase genetic polymorphism with standard indirect tests for lactose maldigestion. *Clin. Gastroenterol Hepatol.* 2007 Feb; 5(2):192-6.
8. Bodlaj G, Stocher M, Hufnagl P, Hubmann R, Biesenbach G, Stekel H, Berg J. Genotyping of the lactase-phlorizin hydrolase -13910 polymorphism by LightCycler PCR and implications for the diagnosis of lactose intolerance. *Clin Chem.* 2006 Jan; 52(1):148-51.
9. Rasinpera H et al Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Totterman N, Lindahl H, Jarvela I, Kolho KL. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut.* 2004 Nov; 53(11):1571-6.
10. <http://www.arla.dk/APPL/HJ/HJ401/HJ401D01.nsf/O/443510B102869F29C125703F0051BEFF.2007>
11. <http://fagfolk.astma-allergi.dk/regado.jsp?type=page&id=151.2007>