

Genotyping av laktosetoleranse

LAKTOSEINTOLERANSE er en tilstand som gir mage- og tarmlager ved inntak av melk og melkeprodukter. Tradisjonelt har laktosebelastning vært brukt til diagnostisering, men de senere år har analyse av genetiske varianter assosiert med laktosetoleranse blitt et viktig supplement. I denne artikkelen beskriver vi de kjente genetiske variantene og en metode for å analysere dem.

Av **HARALD STRAND**, bioingeniør, mester i molekylær biologi, og **LIV KARIN SØRENSEN**, bioingeniør. Laboratoriemedisin, Universitetssykehuset Nord-Norge

Alle pattedyr har ved fødselen evnen til å spalte melkesukker (laktose) til glukose og galaktose. Dette skjer ved hjelp av enzymet laktase som produseres i tynntarmen. I barneårene avtar produksjonen av laktase. Hos mennesker skjer dette i 5-12 års alder. Inntak av laktoseholdig melk eller melkeprodukter etter denne alderen vil hos personer med laktoseintoleranse kunne føre til ubehag i form av magesmerter, oppblåsthet og diaré. Årsaken er at ikke-hydrolysert laktose blir fermentert av bakterier til kortkjedete fettsyrer og gasser. I motsetning til ved allergiske tilstander, hvor selv små mengder allergener kan gi kraftige reaksjoner, kan personer med laktoseintoleranse innta en viss mengde melk eller

melkeprodukter uten å få symptomer. Mengden som tolereres varierer mellom individer, og kan også forandre seg ved endringer i tarmfloraen (1).

Geografiske forskjeller

Hos europeere og en del afrikanske og arabiske befolkningsgrupper har en del beholdt evnen til å spalte laktose, også i voksen alder. Det skjer ved at laktaseproduksjonen opprettholdes også etter ammeperioden. Denne laktasepersistens-fenotypen arves autosomt dominant. Transkripsjonen fra laktasegenet er regulert fra en promoterregion som er rundt 14000 baser oppstrøms for genet. Polymorfier i denne regionen er vist å være assosiert med ulik laktaseaktivitet (2).

Varianten -13910C>T ble først påvist i en finsk studie fra 2002 (3). Den er assosiert med laktosetoleranse, og *in vitro* forskning har vist at varianten øker ekspresjonen av laktase. Da menneskene startet med husdyrhold for 5-10 000 år siden, ga denne laktasepersistens-fenotypen bærerne muligheten til å benytte melk som ernæring. Etter denne perioden har det vært en sterk seleksjon for dette allelet hos europeere (4).

Laktosetoleranse er vanlig også i arabiske og afrikanske befolkningsgrupper som tradisjonelt har drevet med kvegdrift. Kun noen få av disse har den samme genvarianten som europeere. Det er til nå påvist fire andre varianter som er assosiert med laktosetoleranse. To av disse er i umiddelbar nærhet til -13910C>T-varianten, mens to er i et annet regulatorisk område, ytterligere 100 baser oppstrøms for denne regionen (tabell 1). I de samme genregionene er det også beskrevet andre polymorfier, noen

med uavklart assosiasjon, andre uten assosiasjon til laktosetoleranse (5).

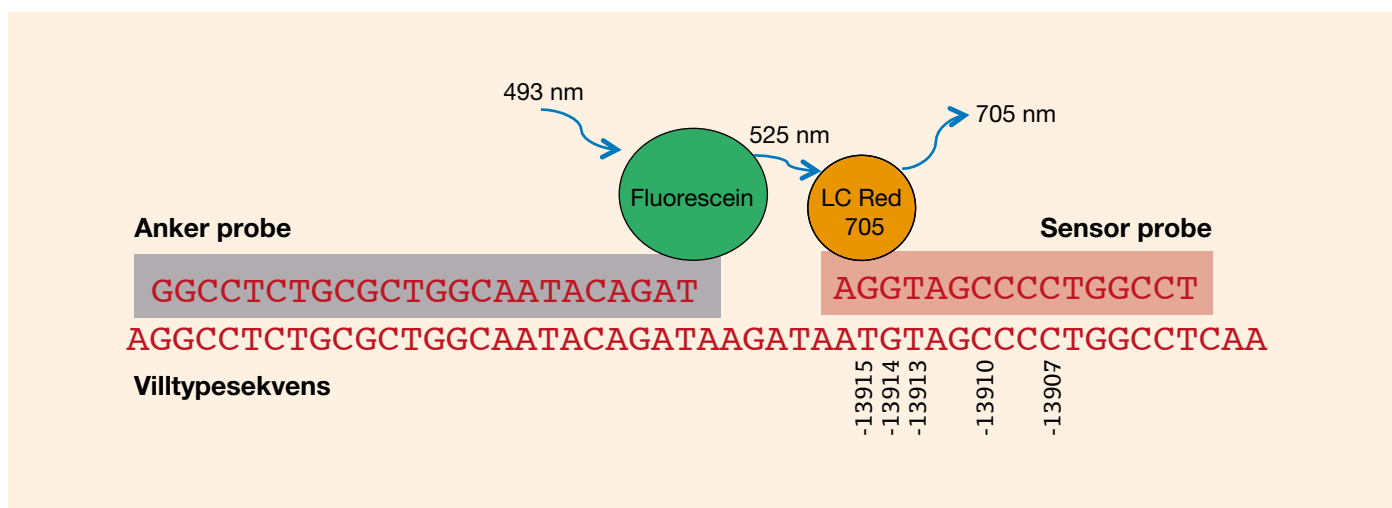
Tarmsykdommer som cøliaki og inflammatorisk tarmsyndrom har symptomer som overlapper symptomer på laktoseintoleranse. I de befolkningsgruppene hvor laktosetoleranse er utbredt, utgjør melk og melkeprodukter en viktig del av kostholdet. Av den grunn er det relevant å avklare om pasienter med mage- og tarmproblemer har laktoseintoleranse. I tillegg til den arvelige laktoseintoleransen, som skyldes nedregulert transkripsjon av laktasegenet, finnes det også tilstander som kan gi sekundært nedsatt laktaseaktivitet og medfølgende laktoseintoleranse.

Analysemetoder

Diagnostikk av laktoseintoleranse kan gjøres ved å måle laktaseaktivitet i tarmbiopsi. Dette er et omfattende inngrep, og ikke anvendelig i rutinediagnostikk. En enklere utredning er å gjøre en laktosebelastning. Her kan man enten måle hydrogengass i utåndingsluft, eller glukosestigning i blodprøver. Laktosebelastning er en tidkrevende undersøkelse, og den har ikke fullgod sensitivitet og spesifitet. Genetisk analyse av de beskrevne laktosetoleranse-assosierte variantene har blitt et viktig supplement i utredningen av pasienter med mage- og tarmproblemer.

Flere ulike metoder kan benyttes for analyse av slike basesubstitusjoner. Som det framgår av tabell 1 er alle variantene lokalisert nært hverandre. Tradisjonell Sanger sekvensering er velegnet til å påvise slike varianter, men er ikke egnet for analysering av et stort antall prøver.

Pyrosekvensering er en metode som er enklere å automatisere enn Sanger



FIGUR 1. Hybridiseringsprober for analyse av varianter i -13910-regionen. Sensorproben er komplementær til -13915G-allelet. Når probe er bundet til målsekvensen vil emisjonslyset fra fluorescein eksitere fluoroforen på sensorproben slik at denne sender ut lys ved 705 nm. Når temperaturen økes vil sensorproben smelte av, og ikke lenger sende ut lys. Smeltetemperaturer er avhengig av antall feilparinger mellom probe og målsekvens, posisjonen til feilparingen(e), og type feilparing.

sekvensering. Den er godt egnet for å detektere ulike substitusjoner innenfor et kort område, men krever et kostbart instrument som ikke er tilgjengelig på de fleste sykehuslaboratorier (6).

En mye brukt metode for påvisning av basesubstitusjoner er sanntids-PCR og TaqMan® prober. Denne metoden detekterer kun en substitusjon i hvert rør, og vil gi feil resultat når det foreligger andre substitusjoner i regionen som dekkes av proben. En annen metode basert på sanntids-PCR er bruk av hybridiseringsprober og smeltekurveanalyse (7). Den baserer seg på at to prober bindes til den regionen man vil analysere (figur 1). Probe er merket med fluoriserende fargestoff på en slik måte at de kun sender ut lys når begge er bundet til målsekvensen. Ved design av analysen legger man en sensorprobe over den/de variantene man vil detektere. Oppstrøms eller nedstrøms for denne sensorproben har man en noe lengre ankerprobe, som kun har til oppgave å holde sin fluorofor nært inntil fluoroforen på sensorproben. Etter PCR-amplifisering gjøres en smeltekurveanalyse hvor temperaturen økes samtidig som fluorescenssignalet avleses. Ved en gitt temperatur vil sensorproben smelte av fra målsekvensen og gi bortfall av fluorescenssignal. En probe som er fullt komplementær til målsekvensen vil smelte av ved en høyere temperatur enn der hvor

proben har en (eller flere) ikke-komplementære baseparinger med målsekvensen. Ved å framstille den 1. deriverte av slike smeltekurver fås kurver med topper for de ulike allelene.

Smeltepunktsanalyse

Smeltekurvemethoden har vært mye brukt for genotyping av laktosetoleranse. Den er godt egnet til å detektere den europeiske -13910C>T-varianten, men det er vist at -13915T>G-varianten kan bli feiltolket som villtype i et slikt analyseoppsett (8). De to variantene -14009T>G og -14010G>C har ikke blitt detektert med de smeltekurvemethodene som har vært brukt til nå.

Vi har designet nye primere og prober som gjør at vi nå også kan detektere disse to variantene, og i tillegg gir metoden entydig deteksjon av alle de til

nå beskrevne variantene i -13910-regionen (9). Dette har vi oppnådd ved å bruke ett probesett for -13910-regionen, og ett sett for -14010-regionen; disse har ulike fluoroforer, og kan dermed detekteres i samme rør. For -13910-regionen har vi laget sensorproben slik at den er komplementær til -13915G-allelet (figur 1). Den har dermed en feilparet base mot villtypeallelet, og to feilparinger mot de andre allelene vi vil detektere. På denne måten oppnås en større differensiering av smeltetemperaturer mellom de ulike allelene. Vi har klonet PCR-produktet fra en prøve med villtypesekvens inn i et plasmid i en E. coli bakterie. Etter oppdyrking av denne, har vi rensset ut plasmid DNA. Ved hjelp av *in vitro* mutagenese har vi med dette plasmidet som utgangspunkt, laget plasmidstandarder for alle de andre allelene vi ønsket å teste. Ved å

TABELL 1. Varianter som blir detektert med analysemetoden presentert i artikkelen.

Variant	Laktosetoleranse	Forekomst
-13907C>G	Ja	Sudan, Etiopia
-13910C>T	Ja	Europa
-13913T>C	Nei	Etiopia
-13914G>A	Ja	Europa (sjelden variant)
-13915T>G	Ja	Øst-Afrika og Arabia
-14009T>G	Ja	Etiopia
-14010G>C	Ja	Afrika
-14011C>T	Uavklart	Afrika og Europa

blande standarder har vi laget heterozygote kontrollprøver for alle mulige allelkombinasjoner. Disse er blitt brukt til å validere metoden.

Som det framgår av figur 2A gir alle variantene ulike smeltetemperaturer. I figur 2B og 2C vises resultatet fra et rutineoppsett av prøver tilsendt til oss for laktosetoleransegenotyping. De fleste prøvene har den europeiske varianten i heterozygot (-13910C/T) eller homozygot form (-13910T). Én prøve er homozygot for -13907G og én prøve er heterozygot for -13915T/G (figur 2B). I -14010 regionen er de fleste prøvene villtype; én er heterozygot for -14011C/T, én kontrollprøve er heterozygot for -14009T/G og én kontrollprøve er heterozygot for -14010G/C (figur 2C).

Våre erfaringer

Vi har brukt denne metoden i snart to år, og har funnet 21 pasienter med andre laktosetoleranse-assosierte varianter enn -13910T. Noen av disse er heterozygote for to varianter. Vi har også funnet 18 pasienter som er heterozygote for -14011C/T. Denne er beskrevet tidligere, men det er ikke kartlagt om den gir opphav til laktasepersistens (5).

Metoden ble først etablert på et LightCycler 1.2 (Roche) instrument med glasskapillærer. Seinere er den overført til et LightCycler 480 (Roche) instrument. Metoden kan etableres på andre plattformen for sanntids-PCR, forutsatt at instrumentet kan eksistere fluorescinsom donorprobe og detektere emisjonslyset fra to ulike akseptorfluoroforer. ■

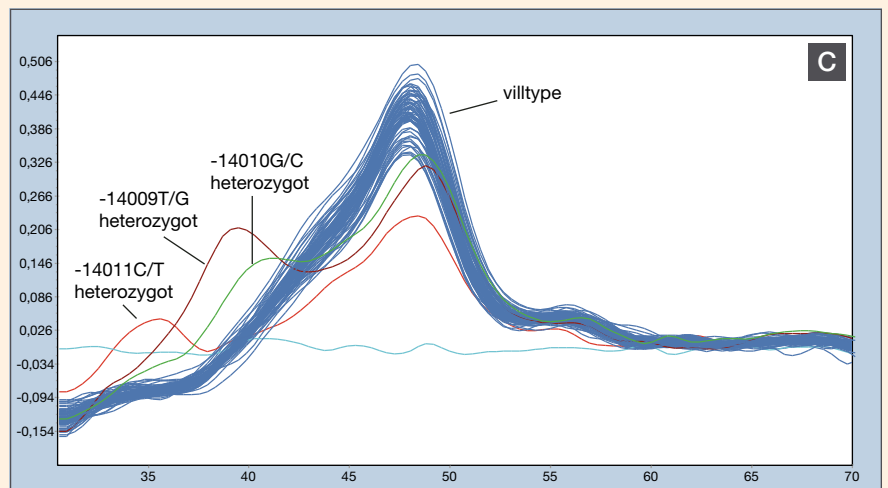
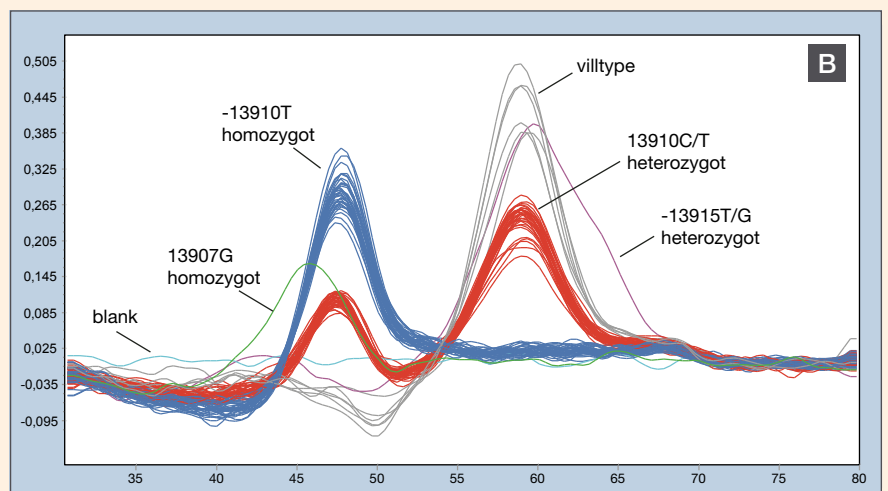
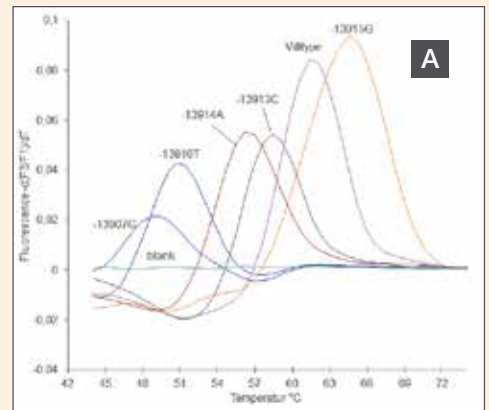
Referanser

- Mattar R, Mazo DFC, Carrilho FJ. Lactose intolerance: Diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2012;5(1):113-21.
- Lewinsky RH, Jensen TG, Moller 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;14(24):3945-53.
- Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Jarvela I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet*. 2002;30(2):233-7.
- Bersaglieri T, Sabeti PC, Patterson N, Vanderploeg T, Schaffner SF, Drake JA et al. Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. *Am J Hum Genet*. 2004;74(6):1111-20.
- Jones B, Raga T, Liebert A, Zmarz P, Bekele E, Danielsen E et al. Diversity of Lactase Persistence

FIGUR 2. Smeltetopper

A): Smeltetopper for alle de kjente variantene i -13910-regionen.

B og C): Representativt resultat av et rutineoppsett for analyse av prøver sendt til oss for utredning av laktosetoleranse. De to sensorproben har ulike fluoroforer, og avleses i hver sin kanal i instrumentet. Resultat for -13910-regionen (B) og -14010-regionen (C).



Alleles in Ethiopia: Signature of a Soft Selective Sweep. *The American Journal of Human Genetics*. 2013;93(3):538-44.

6. Nilsson TK, Olsson LA. Simultaneous genotyping of the three lactose tolerance-linked polymorphisms LCT -13907C>G, LCT -13910C>T and LCT -13915T>G with Pyrosequencing technology. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(1):80-4.

7. Bodlaj G, Stocher M, Hufnagl P, Hubmann R, Biesenbach G, Stekel H et al. Genotyping of the lactase-phlorizin hydrolase -13910 polymorphism by LightCycler PCR and implications for the diagnosis of

lactose intolerance. *Clin Chem*. 2006;52(1):148-51.

8. Weiskirchen R, Tag CG, Mengsteab S, Gressner AM, Ingram CJ, Swallow DM. Pitfalls in LightCycler diagnosis of the single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene that is associated with adult-type hypolactasia. *Clin Chim Acta*. 2007;384(1-2):93-8.

9. Strand H, Sørensen LK, Ingebretsen OC. Lactase persistence genotyping: rapid detection of seven sequence variants in a single tube with melting curve analyses. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(9):1277-82.