

## GENETICKÉ A EPIGENETICKÉ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VYHASÍNÁNÍ EXPRESE LAKTASY: STÁRNUTÍ NA MOLEKULÁRNÍ ÚROVNI

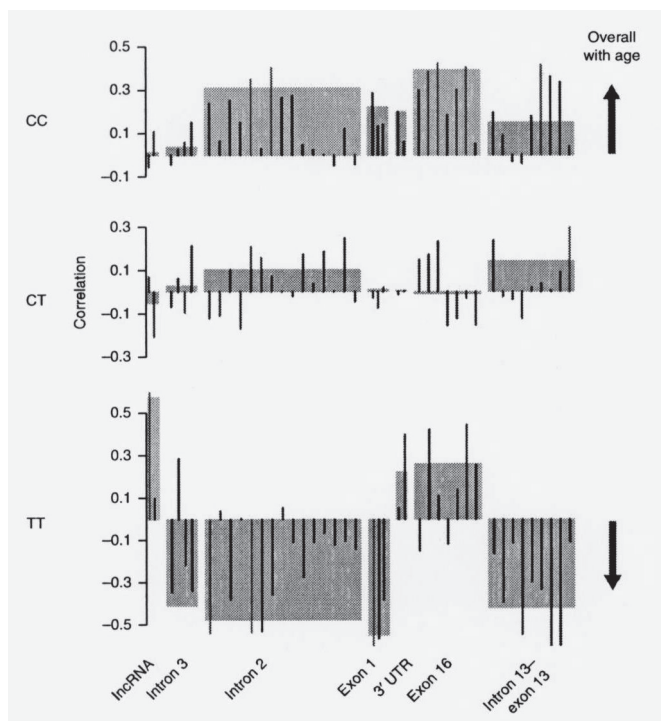
J. Kotyza

Ústav lékařské chemie a biochemie LF UK v Plzni

### VYHASÍNÁNÍ A PŘETRVÁVÁNÍ EXPRESE LAKTASY

Mléčný cukr, disacharid *laktosa* (beta-galaktosyl-1,4-glukosa), je hlavní uhlovodanovou složka mléka a mléčných produktů. Při trávení dochází k jeho štěpení účinkem enzymu laktasy (*LCT*), exprimované v epitelálních buňkách tenkého střeva (obr. 1). U savců – výjimkou jsou jen tuleni, u kterých plní funkci laktosy glukosa – je zahájena exprese *LCT* krátce před narozením a pokračuje po dobu konzumace mateřského mléka. Poté dochází u většiny savců k poklesu produkce *LCT*, a to postupně až na úroveň znemožňující štěpení laktosy („*lactase nonpersistence*, *lactose malabsorption*“). U lidí se kupodivu nejedná o všeobecný jev, globálně postihuje zhruba 65 % populace. Existuje tedy nezanebatelná skupina obyvatelstva, kde plná aktivita *LCT* přetrvává („*lactase persistence*“). Tento fenotyp je běžný zejména ve Skandinávii, Velké Británii, Německu a západní Africe. Vyznačuje se autosomálně dominantním typem dědičnosti. Evoluční biologové dávají tento jev do souvislosti s evolučním tlakem rozvoje konzumace mléka v dospělém věku, situací historicky poměrně nedávnou, podle evolučních kritérií vznikou v období posledních 10 tisíc let (2). Vysvětlení mechanismů, které perzistenci laktasy vyvolávají, však zůstávalo dlouho předmětem dohadů.

Vstřebávání cukrů ve střevě je podmíněno rozštěpením oligosacharidů a polysacharidů na monosacharidy. Při absenci laktasy dochází v GIT k hromadění laktosy, která se v distálních částech trávicí trubice uplatní jako živina pro střevní mikroorganismy a stává se zdrojem nežádoucích osmotických jevů. Výsledkem činnosti mikrobů je zvýšená produkce plynů ( $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$ ) a kyselých zplodin, vedoucí k rozmanitým střevním potížím, označovaným jako nesnášenlivost laktosy („*lactose intolerance*“). Vzhledem k heterogenitě příznaků, individuálním rozdílům v hodnocení potíží a výskytu potravní alergie na mléčné proteiny není stanovení diagnózy laktosové nesnášenlivosti snadné. Pomocí jsou klinická a laboratorní vyšetření zahrnující zátěžové testy, stanovení plynů ve vydechaném vzduchu, zjišťování enzymové aktivity v bioptických vzorcích střevní sliznice, a genetické testy. Vzhledem k tomu, že mléko je značně koncentrovaným roztokem laktosy (4–5 %), zůstává základem preventivních opatření při intoleranci laktosy redukce příjmu mléčného cukru, jeho absolutní vyloučení z výživy však není nutné. Všeobecně je tolerováno 12–18 g laktosy denně (ekvivalent přibližně 250–350 ml mléka). Při omezování příjmu je nutno



**Obr. 1** Struktura laktosy a štěpení laktosou na galaktosu a glukosu

však mít na zřeteli, že mléko a mléčné výrobky představují hlavní zdroj vápníku. Další možností řešení problému je přidavek samotné laktasy. Tím se ovšem mění chuťové vlastnosti produktu, protože směs glukosy a galaktosy je sladší než původní disacharid (6).

## VLIV GENETICKÝCH FAKTORŮ

Při hledání strukturálních souvislostí nebyly nalezeny žádné odchylky v nukleotidovém složení v bezprostředním okolí promotoru, takže se srovnávací analýzy přenesly na vzdálenější oblasti. V r. 2002 bylo zjištěno, že přetrvávání vysoké exprese LCT u Evropanů je vázáno na přítomnost soliterního nukleotidu v oblasti genu, označovaného jako MCM6. Klíčový nukleotid je vzdálen asi 14 tisíc bází (kB) od laktasového genu. Jde tedy o ukázkou funkčně diferencovaného jednonukleotidového polymorfismu. Neměnná aktivita laktasy je sdružena s přítomností thyminového nukleotidu (T), jedinci s vyhasínáním exprese genu mají na stejné pozici cytosinový nukleotid (C). Lokální situaci vyjadřuje tedy údaj -13910T/C (1). Brzo nato se podařilo vypátrat, že uvedený polymorfismus spadá do regulační oblasti, která má charakter „zesilovače“ (enhanceru) aktivity laktasového promotoru.

Bylo prokázáno, že zminěná -13910T varianta má silnější enhancerovou aktivitu než -13910C varianta. Je známo, že enhancery zesilují expresi genů prostřednictvím zvláštního typu transkripčních faktorů, které propojují enhancer s oblastí genového promotoru. V této souvislosti byla prokázána interakce s běžně se vyskytujícím transkripčním faktorem Oct-1 (5). Oct-1, neboli „octamer-binding factor-1“ je protein, jehož centrální úsek o 160 AK má schopnost vázat specifickou osminukleotidovou sekvenci DNA (7).

Je zajímavé, že laktasová perzistence u afrických pasterveckých kmenů je vázána na jiné polymorfismy zmíněné regulační oblasti, konkrétně na -14010G, -13915G, -13907C, v Saudské Arabii pak na lokus -13915G. Z toho vyplývá, že se fenotyp laktasové perzistence vyvíjel opakovaně a nezávisle v různých geografických oblastech (6).

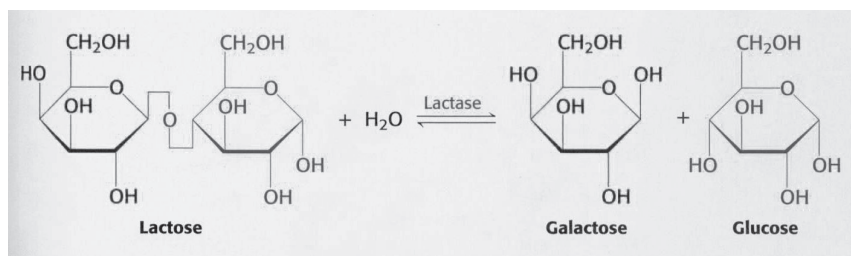
## VLIV EPIGENETICKÝCH FAKTORŮ

Výše představený polymorfismus evropského typu na -13910 demonstruje zřetelné rozdíly v ovlivnění exprese laktasového genu. Změny v enzymových aktivitách provázejících obě alelické varianty ovšem nejsou nijak dramatické (3). Při studiu africké populace se navíc našly příklady perzistence laktasy i u jinak nepermissivních alelických variant. Dosavadní výsledky rovněž nevysvětlily, co způsobuje u většiny populace utlumení plně aktivní LCT v procesu stárnutí. Vzhledem k tomu, že sekvence DNA, která představuje genetický základ, je neměnná, musí se zde uplatňovat jiný, dynamičtější regulační systém epigenetického charakteru. V úvahu tak přicházejí chemické modifikace DNA a histonových proteinů, které jak známo zasahují do regulace genové transkripce a vykazují rozdíly jak mezi různými tkáňovými a buněčnými typy, tak u stejného jedince v různých obdobích života.

Základní epigenetickou modifikací DNA jsou methylace cytosinů na 5-methyl cytosin (5mC). Methylyaci katalyzují methyltransferázy, přenášející methylovou skupinu z S-adenosylmethioninu (obr. 2). Methylované cytosiny se nacházejí převážně v CpG dinukleotidech. Dvojice CpG jsou v genomu rozloženy nerovnoměrně, od řídkého výskytu až po oblasti s vysokou hustotou těchto sekvencí, které se nazývají CpG ostrůvky, a kterým se v současné době přikládá značná důležitost. Při dělení somatických buněk se mohou methylační vzory předávat na dceřinná vlákna DNA. Vzhledem k tomu, že se methylová skupina promítá do velké rýhy dvojšroubovice DNA, kde dochází k interakcím s regulačními proteiny, ovlivňuje methylace různé molekulárně biologické procesy spojené s vazbou těchto proteinů na DNA, včetně genové exprese.

Methyltransferasy přenášejí methylovou skupinu z S-adenosylmethioninu na cytosiny lokalizované v dinukleotidech CpG. Regulačně důležité jsou zejména úseky s opakovanými modifikovanými dinukleotidy (CpG ostrůvky).

Ovlivnění exprese LCT epigenetickými faktory bylo nedávno prokázáno u laktasového genu v rozsáhlé studii publikované v Nature Structural and Molecular Biology (4). Při studiu korelace mezi stupněm methylační modifikace cytosinů u střevních slizničních vzorků souboru dospělých jedinců, lišících se až 29× úrovní tvorby LCT mRNA, byla zjištěna výrazná nepřímá korelace s expresí LCT genu. Obdobný inverzní vztah byl pozorován



**Obr. 2** Přeměna cytosinu na 5-methyl-cytosin

i u zvířat při porovnání DNA modifikačního profilu novorozených a dospělých myši. Dospělí jedinci s útlumem tvorby enzymu měli signifikantně vyšší hustotu modifikovaných cytosinů regulačních oblastí.

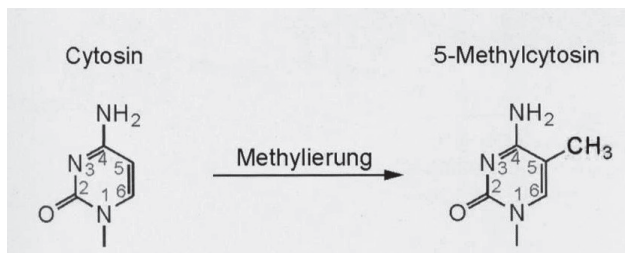
Jemnější mapování LCT a MCM6 genů bisulfitovou padlock-probe sekvenací lokalizovalo modifikovatelné ostrůvky CpG do regulační oblasti označované jako MCM6, tedy do místa, kde byl identifikován -13910 polymorfismus. V obou případech byla nalezena nepřímá korelace mezi modifikací uvedených míst a expresí LCT genu. Vcelku podle očekávání byly nalezeny výrazné methylace studovaných míst u LCT genu i v buňkách jiného než střevního původu, např. u bílých krvinek. Není bez zajímavosti, že mezi methylovatelnými CpG sekvencemi byl i intron 5 genu LCT, a to v promotoru dlouhé nekódující RNA (lncRNA), která je transkribována z DNA vlákna opačné polaritě vzhledem ke genu LCT. Jedná se zřejmě o regulační element kontrolovaný modifikacemi DNA, což dosvědčuje výrazná korelace mezi expresí lncRNA a LCT mRNA. Methylace patrně brání nasednutí „insulátoru“ CTCF, známého tím, že blokuje tkáňově specifickou expresi.

Pro potvrzení regulační funkce modifikovatelných úseků byly pro porovnání prostudovány i mapy DNasa I senzitivních míst, která jsou typická pro transkripčně aktivní chromatin. I zde byl konstatován překryv s methylací modifikovatelnými úseky. V souladu s lokalizacemi methylovaných cytosinů jsou i údaje z Epigenomics Roadmap, zahrnující histonové modifikace typické jak pro aktivní oblasti enhancerové (methylace H3K4, acetylace H3K27), tak promotorové (trimethylace H3K4).

Jednonukleotidový polymorfismus C/T(-13910) v regulačním místě laktosového genu ovlivňuje hustotu DNA modifikací (methylací CpG) v 7 epigeneticky kontrolovaných oblastech. U CC haplotypů jsou modifikace navyšovány s věkem (pozitivní korelace), naopak u TT haplotypů modifikací ovlivňovaných věkem ubývá (negativní korelace), s výjimkou atypického lncRNA promotoru (viz text).

Odpověď na otázku, zda a jak se genetický předpoklad (nukleotidový polymorfismus na -13910) promítá do modifikací DNA v závislosti na věku, vyžaduje porovnat věkovou dynamiku modifikací u všech 3 genotypů, tj. CC, CT a TT. Pokud bychom do souboru zahrnuli i DNA zárodečných buněk, pak by se jednalo o methylaci 94 % relevantních míst u všech haplotypů bez rozdílu. Je známo, že při diferenciaci v embryonálním období tyto modifikace u produkujících buněk mizejí, takže po narození je zajištěna plná aktivita LCT. Postnatálně se ovšem metylační proces obnovuje, a to v míře typické pro jednotlivé

haplotypy. Změny pokračují i v dospělosti. Při sledování 21–72letých nosičů narůstaly modifikace u CC typů a většinou se snižovaly u TT typů. Souběžně docházelo k signifikantnímu poklesu tvorby LCTmRNA u CC haplotypu, nevýrazné změny byly typické pro CT haplotyp, a nonsignifikantní vzestup byl pozorován u TT individui (obr. 3).



**Obr. 3** Korelace mezi epigenetickými modifikacemi DNA genu pro laktasu včetně regulačních oblastí u genetických variant sdružených s přítomností/absencí laktasové aktivity (dle Labrie V. a spol., 2016)

Dalším příspěvkem k osvětlení úlohy modifikovatelných sekvencí na expresi LCT jsou výsledky cílené delecce regulačních *intronových oblastí* s užitím CRISPR-Cas9 technologie u myši. Následkem vyvolané delecce došlo k vyhasínání aktivity LCT v tenkém střevě. Obdobné výsledky byly získány při studiu vlivu delecce intronových úseků u lidských enterocytových kultur.

## ZÁVĚR

Laktasový gen je regulován komplexním způsobem, přičemž epigenetické modifikace diferencovaně pozměňují regulační elementy. Tyto změny se promítají do druhových a tkáňově specifických rozdílů, stejně jako do individuální variability v expresi LCT během života. Klíčový poznatek vyplývající z komentované studie (4) se týká dopadu geneticky podmíněného jednonukleotidového polymorfismu na rychlost těchto epigenetických změn, které je možno nazvat epigenetickým „stárnutím“. Ukazuje se, že epigenetické „hodiny“ jsou pod vlivem genetického pozadí. Mononukleotidové polymorfismy samy o sobě mohou, ale nemusí ovlivňovat transkripci – mladí jedinci nejsou při standardně vysoké expresi LCT evidentně ovlivněni haplotypem. Zdá se tedy, že haplotyp zasahuje především do následné tvorby nebo zanikání epigenetických modifikací na specifických enhancerech a promotorech a tím ovlivňuje připojování regulačních proteinů.

Studium regulace LCT genu by se mohlo stát vodítkem i pro zkoumání genové regulace u medicínsky závažných chorobných stavů. Výzkum by měl v zásadě být zaměřen na buněčné typy přímo ovlivňující fenotypové změny a při analýze genových oblastí by měla být zvýšená pozornost věnována spíše shlukům modifikovaných CpG, než jednotlivým dinukleotidům. Přínosem jsou mezidruhová porovnávání (člověk, myš). Poznatky ze studia dynamiky epigenetických změn mohou být rovněž využity k výzkumu etiologie stářím

podmíněných nemocí, jako jsou nádorové choroby, diabetes 2. typu, a Alzheimerova choroba. Genetické rizikové faktory bez epigenetické nálože mohou být neškodné po mnoho desetiletí, neboť pouze vytyčují rámec, tj. usnadňují nebo brání modifikacím regulačních míst DNA v průběhu života. Analogicky mohou geneticko-epigenetické interakce pomoci chápat časově podmíněné ztráty patogenicity rizikových genů (dětské asthma, epilepsie, atopické dermatitidy dospělých).

## SOUHRN

Neschopnost štěpit laktosu, hlavní uhlovodanovou složku mléka, z důvodu vyhasínání tvorby enzymu laktasy, je běžným jevem u dospělých savců s výjimkou některých lidských populací, u kterých produkce laktasy přetrvává. Laktasový gen je umlčován s postupujícím věkem u většiny jedinců, u některých však jeho aktivita přetrvává. Nedávné studie ukazují, že za individuální, mezibuněčné a mezidruhové rozdíly v produkci laktasové mRNA jsou zodpovědné epigeneticky kontrolované regulační elementy. Genetické faktory tyto věkově závislé modifikace regulačních elementů ovlivňují, což se promítá do rozdílů v dynamice epigenetického stárnutí mezi DNA haplotypem laktasové adultní inaktivity a laktasové perzistence.

### ***Genetic and epigenetic factors influencing lactase nonpersistence: aging at a molecular level***

## SUMMARY

The inability to digest lactose, the major carbohydrate component of milk, due to lactase nonpersistence, is a common trait in adult mammals, except in certain human populations that exhibit lactase persistence. The lactase gene is downregulated with age in most individuals but remains active in some individuals. Recent studies show that epigenetically controlled regulatory elements accounted for the differences in lactase mRNA levels among individuals, cell types and species. Genetic factors contribute to epigenetic changes occurring with age at the regulatory elements, because lactase-persistence and lactase-nonpersistence DNA haplotypes demonstrated markedly different epigenetic aging.

## LITERATURA

1. Enattah N. S., Sahi T., Savilahti E. et al.: Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat. Genet.* 30, 2002: 233–237. – 2. Ingram C. J., Mulcare C. A., Itan Y. et al.: Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human Genet.* 124, 2009: 579–591. – 3. Jensen T. G., Liebert A., Lewinsky R. et al.: The -14010C variant associated with lactase persistence is located between an Oct-1 and HNF1-alpha binding site and increases lactase promoter activity. *Hum. Genet.* 130, 2011: 483–493. – 4. Labrie V., Buske O. J., Oh E. et al.: Lactase nonpersistence is directed by DNA-variation-dependent epigenetic aging. *Nature Struct.*

Mol. Biol. , published online 9 May 2016; doi: 10.1038/nsmb.3227. – 5. Lewinsky R. H., Jensen T. G. K., Moller J. et al.: T-13910 DNA variant associated with lactase persistence interacts with Oct-1 and stimulates lactase promoter activity *in vitro*. Hum. Molec. Genet 14, 2005: 3945–3953. – 6. Misselwitz B., Pohl D., Fruehauf H. et al.: Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. United Eur. Gastroenterol. J. 1, 2013: 151–159. – 7. Sturm R. A., Das G., Herr W.: The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. Genes Dev. 2, 1988: 1582–1599.

Adresa autora: J. K., Karlovarská 48, 301 00 Plzeň