

Uit de laboratoriumpraktijk

Genotypische bevestiging van syndroom van Gilbert: een geruststelling van de patiënt

I.M.L.W. KEULARTS, B.B. van der MEIJDEN en J.P.M. WIELDERS

Gilbert-syndroom (GS) is een onschuldige en vrij vaak voorkomende (2-7% van de populatie) oorzaak van intermitterende ongeconjugeerde hyperbilirubinemie (OB, per definitie < 103 $\mu\text{mol/l}$) op basis van een verlaagde activiteit van het leverenzym UGT1A1. Ondanks de fenotypische diagnose worden GS-patiënten toch nog frequent onnodig aan invasief medisch onderzoek onderworpen om ernstige oorzaken van de OB uit te sluiten. Zodoende hebben wij een assay ontwikkeld om GS genotypisch m.b.v. sequentieanalyse van het UGT1A1-gen aan te tonen. Hiermee wordt een homo- of hemizygotie TA-insertie in de TATA-box (normaal (TA)₆TAA; GS(TA)₇TAA) aangetoond. 35 individuen (25 fenotypisch verdachte GS-patiënten en 10 vrijwilligers) werden getest. We toonden bij 4/10 vrijwilligers en 18/25 fenotypisch verdachte GS-patiënten daadwerkelijk het klassieke GS-genotype aan. 1/25 patiënt met fenotypisch GS bleek compound-heterozyoot voor de TA-insertie en P454R. De laatste mutatie is tot op heden nog niet gerapporteerd. 5/10 resp. 1/10 vrijwilligers en 2/25 resp. 5/25 GS-verdachte patiënten bleken een normale (TA)₆TAA resp. een (TA)₇TAA/(TA)₆TAA te hebben. In enige gevallen was het deze genotypische confirmatie van GS die leidde tot stopzetten van invasief onderzoek.

Trefwoorden: Gilbert; UGT1A1; farmacogenetica; sequentieanalyse; ongeconjugeerde intermitterende hyperbilirubinemie

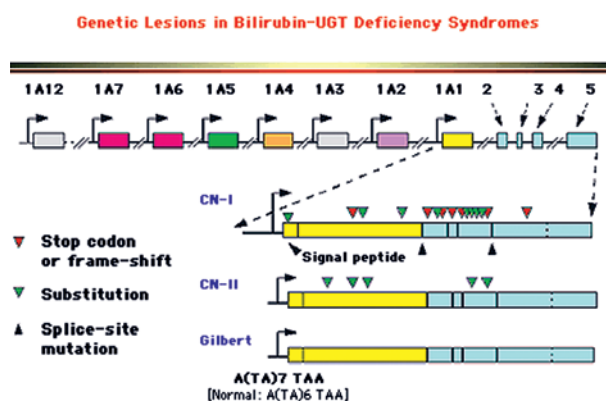
Het syndroom van Gilbert (GS) werd in 1901 voor het eerst beschreven door Gilbert en Lereboullet (1) en betreft een van de meest voorkomende, onschuldige oorzaken van geelzucht (2). GS, dat ook wel bekend staat als het syndroom van Gilbert-Lereboullet, icterus intermittens juvenalis, Meulengrachts ziekte of ongeconjugeerde benigne bilirubinemie, komt in ongeveer 2-7% van de populatie voor (3-6).

Het referentiebereik voor totaal bilirubine is < 17 $\mu\text{mol/l}$ waarbij > 75% ongeconjugerd bilirubine (d.w.z. gebonden aan albumine) is (7). Bij Kaukasische GS-patiënten wordt intermitterende ongeconjugeerde hyperbilirubinemie tot maximaal 103 $\mu\text{mol/l}$ gemeten. Bij

niet-Kaukasische patiënten moet rekening gehouden worden met rasafhankelijke bilirubineniveaus. Aziaten hebben na blanken en negroïde mensen de hoogste bilirubineniveaus (8-10). Naast een intermitterende hyperbilirubinemie is er sprake van normale leverfuncties, normale leverhistologie en afwezigheid van enige tekenen van hemolyse. Luxerende factoren voor hyperbilirubinemie kunnen vasten, een operatieve ingreep, infectie, lichamelijke of geestelijke stress, dehydratie en alcoholinname zijn. Vanaf een niveau van ca. 40 $\mu\text{mol/l}$ is een lichte verkleuring van de sclerae waarneembaar. Klinisch presenteren GS-patiënten zich met een lichte mate van icterus, moeheid, misselijkheid en vage buikklachten.

Bij het syndroom van Gilbert is de activiteit van het leverenzym uridinedifosfaat-glucuronyltransferase (UGT1A1) verlaagd tot ca. 20-30% van normaal (11, 12). Dit enzym komt in het endoplasmatisch reticulum van de hepatocyten tot expressie en katalyseert de conjugatie van glucuronzuur aan bilirubine tot bilirubinedigluconide (2, 13-14).

Het UGT1A1-gen is gelegen op chromosoom 2 (2q37) en bestaat uit 5 exonen met 2351 basen. Het UGT1A-gen kent 9 isovormen op basis van een uniek exon 1 met een eigen promotor en gemeenschappelijke exonen 2 t/m 5 (figuur 1). Dit exon 1 verleent UGT1A1 zijn substraatspecificiteit. In 1995 hebben Bosma et al. (14) voor het eerst de associatie beschreven tussen een dinucleotide(TA)-insertie in de TATA-box van de pro-



Figuur 1. Samenstelling van het UGT1A1-gen waarbij exon 1 een eigen promotor heeft (aangegeven in geel) en de exonen 2 t/m 5 gemeenschappelijk zijn. Afkorting: CN, Crigler Najjar. Bron: UpToDate, 2006

Correspondentie: dr. I.M.L.W. Keularts, Afdeling Klinische Genetica - lab. Erfelijke Metabole Ziekten, Academisch Ziekenhuis Maastricht, Joseph Bechlaan 113, 6229 GR Maastricht E-mail: irene.keularts@gen.unimaas.nl

motor van het UGT1A1-gen en GS. Normaliter bestaat de TATA-box uit (TA)₆TAA (ook wel UGT1A1*1) en bij GS-patiënten wordt vaak een homozygote (TA)₇TAA (ook wel aangeduid als UGT1A1*28) aangetroffen. Deze insertie interfereert met de binding van de transcriptiefactor IID en resulteert in een verlaagde expressie van het enzym. In een HepG2-cel lijn met luciferasereporter is aangetoond dat een (TA)₈TAA en (TA)₉TAA tot nog lagere enzymactiviteiten leiden dan de (TA)₇TAA; (TA)₅TAA daarentegen zou voor een hogere activiteit (transcriptie) zorgen (14). De homozygotie voor de UGT1A1*28, die aanleiding geeft tot de milde GS-variant, wordt in de Kaukasische bevolking het meest frequent gevonden met een allelfrequentie van ca. 35%; bij Japanners wordt de mutatie minder frequent waargenomen. Binnen de Japanse bevolking worden echter ernstiger vormen van GS beschreven die veroorzaakt worden door een heterozygotie voor een van de mutaties (Gly71Arg, Tyr486Asp, Pro364Leu) in het coderende gebied, soms in combinatie met een heterozygotie voor de (TA)₇TAA (15).

In het verlengde van het syndroom van Gilbert ligt het veel ernstigere syndroom van Crigler-Najjar dat onderverdeeld kan worden in twee subtypen, I en II. De ziekte kan zowel autosomaal-dominant als recessief worden overgeërfd en mutaties worden (eventueel in combinatie met de TA-insertie) waargenomen in het UGT1A1. De subtypen worden klinisch onderscheiden op basis van de concentratie bilirubine in plasma, het optreden van kernicterus en de reactie op fenobarbital. Bij Crigler-Najjar I is UGT1A1-activiteit nagenoeg afwezig, bilirubineniveaus bedragen 340-685 µmol/l (en zelfs nog hoger), er treedt kernicterus op met progressieve, ernstige neurologische schade. De sterfte binnen de eerste twee levensjaren is groot. Slechts enkele honderden casus zijn beschreven. Alleen een levertransplantatie is effectief. Bij Crigler-Najjar II is sprake van een ernstige reductie van UGT1A1 (< 10% t.o.v. controle), bilirubineniveaus bedragen 100-340 µmol/l en er is sprake van enzyminductie door fenobarbital. Zelden treedt neurologische schade op (16, 17).

Gezien het onschuldige karakter, lijkt genetisch onderzoek naar GS niet nodig. Sterker nog: een licht verhoogd ongeconjugeerd bilirubine zou werken als anti-oxidant (18) en de GS-patiënt beschermen tegen o.a. hart- en vaatziekten. Afwijkende leverfuncties (zo-

als een verhoogd bilirubine) kunnen echter voor een behandelaar aanleiding geven tot uitgebreider leveronderzoek. Indien de patiënt bekend is met GS als oorzaak van de hyperbilirubinemie kan uitgebreider onderzoek hem/haar bespaard blijven. Daarnaast speelt het enzym UGT1A1 een belangrijke rol bij de glucuronidering van bepaalde hormonen en geneesmiddelen. Bij onze gastro-enterologen bleek belangstelling te bestaan voor een definitieve vaststelling van GS middels genotypering. Met behulp van sequentieanalyse hebben wij de genotypische confirmatie van GS opgezet en aan de hand van enige monsters van vrijwilligers en fenotypisch verdachte 'patiënten' gevalideerd.

Materiaal en methoden

Participanten

25 patiënten met een verhoogd bilirubine zonder bekende pathologische oorzaak, waarbij de aanvrager de diagnose Gilbert-syndroom overwoog, werden geïnccludeerd in deze studie. Daarnaast werden 10 vrijwilligers meegenomen (informed consent), waaronder twee personen die bekend waren met episodes van milde hyperbilirubinemie. In het totaal werden in de periode van december 2005-november 2007 35 personen geïnccludeerd. Directe en totale bilirubine werden gemeten alsook γ -GT, AST, ALT, ALP and LD.

DNA-analyse

Uit 300 µl EDTA-ontstold volbloed werd DNA geïsoleerd m.b.v. de Puregene DNA-isolatiekit (Gentra Systems, Minneapolis, MN) volgens de instructies van de producent. Hierop werd uiteindelijk sequentieanalyse van de promotor en alle coderende regio's inclusief de intron / exonjuncties van het UGT1A1-gen uitgevoerd. De primers zoals gebruikt (zie tabel 1) t.b.v. de polymerasekettingreactie (PCR)-amplificatie en sequentieanalyse werden verkregen van Applied Biosystems UK (Warrington, Cheshire UK).

In 100-µl-volumes werden de PCR-reacties uitgevoerd met o.a.: 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,3, 50 mmol/l KCl, 1,5 mmol/l MgCl₂, 0,001% (w/v) gelatine, 0,2 mmol/l van elk dNTP, 0,3 µmol/l van elke primer en 2,5 U van Amplitaq Gold DNA Polymerase. Genoemde reagentia zijn afkomstig van Applied Biosystems (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA).

Tabel 1. UGT1A1-genamplificatie en sequencing primers

	Naam	Sequentie (5'-3')	Gebruikt voor	PCR-product
Exon 1	UGT1A1-1F	GTC ACG TGA CAC AGT CAA AC	PCR & seq.	
	UGT1A1-1aF	CCT CTG GCA GGA GCA AAG	Sequentie	
	UGT1A1-1aR	ATG CCC GAG ACT AAC A	Sequentie	
	UGT1A1-1R	CTT GCT CAG CAT ATA TCT GG	PCR & seq.	1060 bp
Exon 2	UGT1A1-2F	CTC TAT CTC AAA CAC GCA TGC C	PCR & seq.	
	UGT1A1-2R	TGG AAG CTG GAA GTC TGG G	PCR & seq.	330 bp
Exon 3 en 4	UGT1A1-3F	TAT GTT CTT TCT TTA CGT TCT GCT CT	PCR & seq.	
	UGT1A1-4R	TTA TCA TGA ATG CCA TGA CC	PCR & seq.	681 bp
Exon 5	UGT1A1-5F	GAG GAT TGT TCA TAC CAC AG	PCR & seq.	
	UGT1A1-5R	TGA ATT TAA CAC TGA TTC TGT T	PCR & seq.	436 bp

Na 10 min denaturatie bij 95 °C werden de samples in 35 cycli geamplificeerd. Een cyclus duurt 30 s bij 94 °C voor de denaturatie, 30 s bij 58 °C voor annealing en 60 s bij 72 °C voor de verlenging van de cycli, gevolgd door een elongatie-extentietijd van 10 min bij 72 °C.

De PCR-producten werden vervolgens gerund op een ethidiumbromide gekleurde agarosegel om de grootte van de fragmenten te controleren. Zuivering van het DNA vond plaats m.b.v. een QIAquick PCR Purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) en sequentieanalyse volgde m.b.v. een ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, Cheshire UK). Analyse van de sequentie werd gedaan m.b.v. de 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City CA, USA).

Resultaten

Validatie

Bij de validatie van onze assay werd een 10-tal bekende monsters afkomstig van het Referenzinstituut für Bioanalytik von DGKL (Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriummedizin) bepaald in een aantal separate runs. Het betrof 4 (TA)6TAA, 4 (TA)7TAA en 2 (TA)6/(TA)7 monsters. We waren in staat de sequenties van de TATA-box met 100% juistheid te reproduceren.

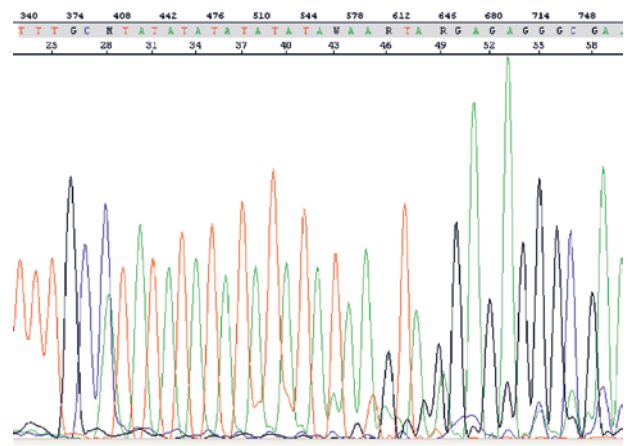
Patiënten

Tabel 2 geeft een overzicht van alle patiënten en controles die tussen 1-12-2005 en 1-11-2007 in het Meander Medisch Centrum zijn aangemeld voor screening op het syndroom van Gilbert op basis van hyperbilirubinemie e.c.i. In figuur 2 is een voorbeeld van een sequentieanalyse zoals die aangetroffen wordt bij een GS-patiënt. Opvallend is dat bij het merendeel van de patiënten sprake is van een homozygote TA-insertie (TA)7TAA (n=18 bij de fenotypische GS-patiënten, totaal n=22, inclus. vrijwilligers) en in vijf gevallen een heterozygotie werd vastgesteld (TA)7/(TA)6TAA. Eén van deze vijf patiënten blijkt echter compound-

heterozygoot te zijn voor de insertie in combinatie met een nog niet eerder beschreven mutatie (zie later, casus 3); het is deze patiënt die een verhoogd bilirubine van 47 umol/l had. Hieronder is bij een drietal patiënten het nut van de screening op GS toegelicht. Alle door ons geteste patiënten zijn van het Kaukasische ras.

Patiënt beschrijvingen

Patiënt 1 betreft 55-jarige Nederlandse man met in de voorgeschiedenis nefrolithiasis, doorgemaakte hepatitis A, syfilis en gonorrhoe met een acute hepatitis B in 2005. De patiënt houdt klachten van moeheid. Dit treedt met name op na inspanning en hierbij is het zijn omgeving opgevallen dat zijn oogwit dan ook wat geel wordt. Verder gaat het redelijk. De patiënt bezoekt op basis van deze klachten zijn MDL-arts die laboratoriumonderzoek aanvraagt. De totale bilirubine concentratie was met 36 umol/l licht verhoogd (ongeconjugerd bilirubine 32 umol/l); leverparameters w.o. AF, ALAT waren binnen de referentiewaarden.



Figuur 2. Sequentieanalyse van de TATA-box van een GS-patiënt met duidelijk zichtbaar de (TA)7TAA in homozygotie. In rood resp. groen zijn de zeven opeenvolgende TA's te zien gevolgd door TAA als einde van de TATA-box. Bij het wildtype zouden zes TA's in combinatie met de TAA te zien zijn.

Tabel 2. Genotypering en biochemische presentatie van vrijwilligers en fenotypisch van Gilbert-syndroom verdachte patiënten. Tenzij anders vermeld zijn getallen gemiddelden met (standaarddeviatie, SD). Indien er geen SD is vermeld, is het aantal meetwaarden voor de betreffende parameter < 3.

	Controles			Fenotypisch verdachte GS-patiënten			Bijzondere patiënt
	(TA)6	(TA)6/(TA)7	(TA)7	(TA)6	(TA)6/(TA)7	(TA)7	(TA)6/(TA)7 en P454R
Genotype Aantal	5	1	4	2*	5	18	1
Bilirubine totaal (2-17 umol/l) range	13 (1) 11-14	24	23 (7) 17-33	12/124	34 (19) 20-47	45 (17) 24-82	47
Bilirubine geconj. (2-17 umol/l) range	2 1-4	4	3 (2) 1-3	79	3 (2) 1-4	4 (2) 1-7	4
GGT (5-50 μmol/l)	3	19	11 (11)	1076	54	18 (7)	15
ALAT (5-45 U/l)	16	22	22 (8)	71	42	26 (11)	19
ASAT (5-40 U/l)	17	16	18 (1)	162	7	13 (12)	14
AP (40-120 U/l)	52	54	52 296	105	103 (57)	105	
LDH (160-450 U/l)	462		382 (113)	355		274 (84)	

* Patiënte met leverproblemen

Bij patiënt blijkt een seroconversie te hebben plaatsgevonden (anti-HBs > 100 IU/l). Op dit moment is er derhalve geen besmettelijkheid meer op hepatitis B en is immuniteit aanwezig. De periodes van geelzien, met name na lichamelijke inspanning blijken te berusten op het syndroom van Gilbert; dit werd bevestigd middels DNA-analyse. Er werd geconcludeerd dat deze bevinding verder onderzoek overbodig maakte.

Patiënt 2 is een 23-jarige Nederlandse man die wordt gezien op de polikliniek Maag-, darm- en leverziekten. De reden van verwijzing is dat hij geruime tijd al last heeft van recidiverende gele sclerae met af en toe vermoeidheid. Defecatie is normaal met een normaal aspect van de ontlasting. Er zijn geen aanwijzingen voor hemolyse. Bij de huisarts werd een verhoogd bilirubine totaal van 91 $\mu\text{mol/l}$ gevonden. De voorgeschiedenis vermeldt constitutioneel eczeem, Gilles de la Tourette en scoliose. In het lab wordt een ongeconjugeerde hyperbilirubinemie (ongeconjugerd bilirubine is 59 $\mu\text{mol/l}$) gezien met verdenking op Gilbert-syndroom. In de familie zijn geen leverafwijkingen; leverparameters van de patiënt zijn ook niet afwijkend. De patiënt gebruikt gedurende enkele jaren aspirine. Paracetamol werd met enige regelmaat in het afgelopen half jaar tot 5 tabletten per week ingenomen. Op basis van de hyperbilirubinemie werd de genoemde medicatie gestaakt. De intake van alcohol was minimaal (1 eenheid per week).

Bij lichamenlijk onderzoek wordt een normale lever met een in lichte mate vergrote milt gezien zonder dat er sprake is van een overtuigende splenomegalie. Er wordt een MRCP ('magnetic resonance cholangiopancreatography'; november 2005) uitgevoerd waarbij geen afwijkingen worden gezien. DNA-onderzoek wordt ingezet leidend tot confirmatie van het vermoeden op een Gilbert. De brief vermeldt dat de arts de patiënt op basis van deze uitkomst gerustgesteld heeft en aangegeven heeft dat noch verdere controles noch behandeling in de toekomst noodzakelijk zijn.

Patiënt 3, Dhr. G (1971), komt via de gastro-enterologie bij ons binnen op basis van een geïsoleerde hyperbilirubinemie (totaal resp. ongeconjugerd bilirubine bedraagt resp. 47 en 43 $\mu\text{mol/l}$). Zijn voorgeschiedenis vermeldt cholecystolithiasis waarvoor een laparoscopische cholecystectomie is verricht in verband met een hydrops van de galblaas t.g.v. een grote afsluitsteen. De MDL-arts vraagt onderzoek op GS aan op basis van de hyperbilirubinemie. Bij sequentieanalyse wordt een (TA)7TAA / (TA)6TAA gezien die op zich niet bewijzend is voor GS. Daarnaast wordt echter een nog niet eerder beschreven mutatie in codon 454 Pro \rightarrow Arg (P454R) aangetroffen. Mogelijk geeft de combinatie van deze heterozygote verandering in de TATA-box in combinatie met de door ons gevonden mutatie wel aanleiding tot het syndroom van Gilbert. Ook bij deze patiënt zijn de leverparameters binnen de referentiewaarden.

Na overleg met de MDL-arts wordt besloten tot vervolgonderzoek waarbij de patiënt zelf alsmede een van GS verdacht familielid, de vader, getest wordt op de TA-insertie alsmede de mutatie middels sequentieanalyse.

Discussie en vooruitzichten

Het syndroom van Gilbert betreft een relatief vaak voorkomende onschuldige vorm van ongeconjugeerde hyperbilirubinemie op basis van een verlaagde activiteit van het enzym UGT1A1. Patiënten kunnen bij stress of koorts intermitterende geelzucht vertonen en geven vaak aan sneller vermoeid te zijn dan individuen die het syndroom niet hebben. De onder 'resultaten' genoemde patiënten blijken langere tijd met klachten van GS rond te lopen en ook de labwaarden zijn indicatief voor GS met een geïsoleerde hyperbilirubinemie. Schijnbaar worden patiënten toch, ter uitsluiting van ernstige pathologie, onderworpen aan invasief onderzoek. Met het beschikbaar stellen van een relatief eenvoudige DNA-analyse op GS is een aantal patiënten gescreend. Wij hebben in het laboratorium met behulp van een viertal primersets het hele UGT1A1-gen inclusief de promotor in kaart gebracht bij patiënten en vrijwilligers. Dit heeft geleid tot de bevestiging van de diagnose GS hetgeen, zoals de klinische geschiedenis rond patiënt 2 aangeeft, verder onderzoek (MRCP, leveronderzoek) overbodig gemaakt heeft en tot geruststelling leidt van de patiënt. De mogelijkheid bestaat dat ook in het coderende gedeelte mutaties gevonden kunnen worden die de patiënt verdacht maken voor dragerschap van een Crigler-Najjar. Bij dit vermoeden en/of een totaal bilirubine dat > 100 $\mu\text{mol/l}$ verwijzen wij de patiënt naar een klinisch-genetisch centrum dat voor verdere diagnostiek en klinisch-genetische consultatie zorg draagt.

Bij patiënt 3 is er een nog niet eerder beschreven mutatie gevonden in het coderende deel; gezien de kliniek en laboratoriumresultaten zou hier sprake kunnen zijn van GS. Verder onderzoek moet bevestigen dat er sprake is van een GS.

GS beïnvloedt niet alleen de glucuronidatie snelheid van bilirubine maar ook het metabolisme van bepaalde geneesmiddelen kan aangedaan zijn. Binnen de groep van individuen met GS is er een heterogeniteit m.b.t. het metabolisme van paracetamol; enige patiënten vertonen een normaal metabolisme maar anderen blijken een verlaagde glucuronidatie en toegenomen oxidatie te hebben. Relevante klinische consequenties zijn echter nog niet beschreven.

Als voorbeeld van een vertraagde metabolisering van een geneesmiddel noemen we het cytostaticum irinotecan (19). Glucuronidatie (en daarmee de klaring) van dit geneesmiddel bij patiënten met een (TA)7TAA, de klassieke GS, verloopt significant trager dan bij patiënten met de wildtype-promotor, (TA)6TAA. Reeds is ernstige SN38-toxiciteit beschreven met graad-4-neutropenie en diarree (20). Er gaan dan ook stemmen op om alle kankerpatiënten die behandeling moeten ondergaan met irinotecan te screenen op de mutatie in de TATA-box van het UGT1A1 gen om irinotecantoxiciteit te voorkomen (20-22).

Afsluitend stellen wij dat confirmatie van GS door sequentie van de TATA-box een zinvol onderzoek is dat belastende diagnostiek overbodig maakt en leidt tot geruststelling van de patiënt. Ook bij zuigelingen met persisterende hyperbilirubinemie zou deze analyse nuttig kunnen zijn. Daarnaast kan deze aanpak leiden tot identificatie van trage glucuronideerders met mogelijke belangrijke farmacotherapeutische consequenties.

Literatuur

1. Gilbert A, Lereboullet P. La cholémie simple familiale. *Semaine Med* 1901; 21: 241-3.
2. Watson KJ, Gollan, JL. Gilbert's syndrome. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1989; 3: 337-55.
3. Berk PD, Noyer CM. Bilirubin metabolism and the hereditary hyperbilirubinemias. *Semin Liver Dis* 1994; 14: 321-2.
4. Olsson R, Bliding A, Jagenburg R et al. Gilbert's syndrome – does it exist? A study of the prevalence of symptoms in Gilbert's syndrome. *Acta Med Scand* 1988; 224: 485-90.
5. Owens D, Evans J. Population studies on Gilbert's syndrome. *J Med Genet* 1975; 12: 152-6.
6. Bailey A, Robinson D, Dawson AM. Does Gilbert's disease exist? *Lancet* 1977; 1: 931-3.
7. Dufour DR, Lott JA Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem* 2000; 46: 2027-49.
8. Manolio T, Burke GL, Savage PJ, Jacobs PJ et al. Sex- and race-related differences in liver-associated serum chemistry tests in young adults in the CARDIA study. *Clin Chem* 1992; 38: 1853-9.
9. Brown AK, Kim MH, Wu PY, Bryla DA. Efficacy of phototherapy in prevention and management of neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 1985; 75: 393-400.
10. Horiguchi T, Bauer C. Ethnic differences in neonatal jaundice: comparison of Japanese and Caucasian newborn infants. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 121: 71-4.
11. Arias IM, London IM. Bilirubin glucuronide formation in vitro; demonstration of a defect in Gilbert's disease. *Science* 1957; 126: 563-4.
12. Black M, Billing BH. Hepatic bilirubin UDP-glucuronide transferase activity in liver disease and Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1969; 280: 1266-71.
13. Fevery, J. Pathogenesis of Gilbert syndrome. *Eur J Clin Invest* 1981; 11: 417-8.
14. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 1171-5.
15. Takeuchi K, Kobayashi Y, Tamaki S, Ishihara T, Maruo Y, Araki J, Mifuji R, Itani T, Kuroda M, Sato H, Kaito M, Adachi Y. Genetic polymorphisms of bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene in Japanese patients with Crigler-Najjar syndrome or Gilbert's syndrome as well as in healthy Japanese subjects. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 19 (9): 1023-8.
16. Crigler JF, Najjar VA. Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics* 1952; 10: 169-179.
17. Blumenschein SD, Kallen RJ, Storey B, Natzschka JC, Odell GB, Childs, B. Familial nonhemolytic jaundice with late onset of neurological change. *Pediatrics* 1968; 42: 786-92.
18. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; 235: 1043-6.
19. Wasserman E, Myara A, Lokiec F, Goldwasser F, Trivin F, Mahjoubi M, Misset JL, Cvitkovic E. Severe CPT-11 toxicity in patients with Gilbert's syndrome: two case reports. *Ann Oncol* 1997; 8: 1049-51.
20. Ando Y, Saka H, Ando M et al. Polymorphism of UDP-glucuronyltransferase 1A1 gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 2000; 60: 6921-6.
21. Innocenti F, Undevia SD, Lyer L et al. Genetic variants in the UDP-glucuronyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1382-8.
22. Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, Gomez-Pardo M, Baiget M. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 678-82.

Summary

Keularts IMLW, Meijden BB van der, Wielders JPM. Genotyping of Gilbert's syndrome: a benefit for the patient. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 43-47.

Gilbert syndrome (GS) is an innocent and quite frequent (2-7% of the population) cause of intermittent unconjugated hyperbilirubinaemia (UCHB, by definition < 103 $\mu\text{mol/L}$) due to a decreased activity of the liver enzyme UGT1A1. Despite its phenotypical diagnosis, GS patients sometimes have to undergo extensive medical investigations to exclude more serious causes of UCHB. We therefore developed an assay for sequencing analysis of the UGT1A1 gene in order to genotype GS by demonstrating mutations in the UGT1A1 gene such as a homo- or hemizygote insertion of an extra TA in the (TA)₆TAA box. 35 individuals were tested of whom 25 were suspected to be GS patients. We demonstrated the classical GS genotype in 5/10 controls and 18/25 GS patient. 1/25 patients with a GS phenotype was compound heterozygote for (TA)₇TAA/P454R. The latter mutation had never been reported before. 5/10 (1/10) of the controls and 5/25 (1/25 of the GS patients) demonstrated the normal (TA)₆TAA (heterozygosity for the TA insertion). In several cases, not the phenotype but the genotypical confirmation of GS led to cessation of further investigations and was a relief for the doctor and his patient.