Genotipizzazione della sindrome di Gilbert: tre metodi a confronto

Roberta V. Marotta[1], Olivia Turri[2], Hanane Nadry[2], Gianlodovico Melzi d'Eril[1], Maria Luisa Biondi[2]
[1]Dipartimento di Medicina Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano
[2]Diagnostica Molecolare Infettivologica, Azienda Ospedaliera San Paolo, Milano

ABSTRACT

Comparison of three methods for Gilbert's syndrome genotyping. Gilbert's syndrome leads to intermittent non-hemolytic hyperbilirubinemia through a 70% reduction of hepatic bilirubin glucuronidation, associated with the presence of a homozygous insertion (thymine-adenine, TA) in the uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene promoter (UGT1A1*28). From the clinical point of view the Gilbert's syndrome is considered benign, but recent reports have linked it to drug toxicity. UGT1A1*28 homozygous subjects treated with the protease inhibitor atazanavir or the anti-tumor agent irinotecan are at increased risk of developing adverse drug reactions. To aid clinical decisions and to individualize therapy it is, therefore, important to perform a rapid and accurate molecular diagnosis. Several methodological approaches have been developed to genotype the (TA)n repeat region. In this study we have compared three different techniques: high resolution melting (HRM), multicapillary electrophoresis with QIAxcel system, and direct sequencing. All examined DNA samples (n=90) had concordant genotype calls among the three methods. HRM and QIAxcel system streamlined the laboratory workflow by minimizing analysis time and costs, but the direct sequencing remains the gold standard method.

INTRODUZIONE

La sindrome di Gilbert è un disordine genetico caratterizzato da un aumento delle concentrazioni plasmatiche della bilirubina non coniugata e modesto ittero intermittente, in assenza di altre patologie epatiche ed ematologiche (1). Tale sindrome è causata dalla ridotta espressione del gene codificante per l'enzima uridin 5'-difosfo (UDP)-glucuronosiltransferasi 1A1 (UGT1A1) coinvolto nella reazione di glucuronazione della bilirubina, che ne permette l'eliminazione sotto forma di composto idrosolubile, e di alcuni substrati esogeni (farmaci). In letteratura sono riportate numerose varianti del gene UGT1A1 che determinano differenti livelli di attività enzimatica. In particolare, nel 10% della popolazione caucasica l'inserzione in omozigosi di un timina-adenina (TA) "repeat" nel TATA box del promotore genico (UGT1A1*28) comporta una riduzione della trascrizione con conseguente manifestazione della sindrome di Gilbert. Portatori omozigoti di questa variante mostrano un genotipo TA7/TA7 anziché il genotipo "wild type" TA6/TA6, con una riduzione del 70% della glucuronazione della bilirubina (2, 3). Ulteriori varianti geniche sono associate al fenotipo osservabile nella sindrome di Gilbert (4); tuttavia, queste sono estremamente rare nella popolazione caucasica. La variante UGT1A1*36 (8% negli Africani) è caratterizzata dalla delezione di un TA "repeat" (TA5/TA5) e da un aumento della trascrizione del gene UGT1A1, mentre la variante UGT1A1*37 (7% negli Africani), caratterizzata dall'inserzione di due TA "repeat" (TA8/TA8) determina una diminuzione della trascrizione genica. In generale, si osserva, quindi, un'associazione inversa del numero di TA "repeat" con l'attività trascrizionale del promotore del gene UGT1A1 (5).

La sindrome di Gilbert è sempre stata considerata una condizione benigna non associata a disfunzione epatica cronica. Tuttavia, recenti studi di associazione hanno mostrato un coinvolgimento del gene UGT1A1 nella predisposizione al cancro e nella tossicità di farmaci antineoplastici (irinotecan) e retrovirali (atazanavir) (6-9). In particolare, in pazienti trattati con irinotecan la presenza della variante UGT1A1*28 determinerebbe un aumento dei livelli del metabolita attivo 7-etil-10-idrossi-camptotecina (SN-38) con conseguenti effetti collaterali (mielosoppressione, diarrea) (8, 9). Nel caso di trattamento con atazanavir, che non sembra essere un substrato importante di glucuronazione, ma è comunque in grado di inibire UGT1A1, la presenza della variante UGT1A1*28 comporta un'ulteriore diminuzione dell'attività enzimatica con conseguente importante iperbilirubinemia (10, 11). L'analisi di tale polimorfismo può dunque essere di grande importanza clinica per individuare pazienti che possono maggiormente beneficiare di un trattamento o predire gravi effetti collaterali.

Diversi approcci sono stati sviluppati per effettuare una diagnosi molecolare rapida e accurata, ma il sequenziamento diretto rimane il metodo di screening mutazionale "gold standard", nonostante sia costoso e

Corrispondenza a: Maria Luisa Biondi, U.O. Diagnostica Molecolare Infettivologica, Azienda Ospedaliera San Paolo, Via A. Di Rudinì 8, 20142 Milano. Tel. 0281844314, Fax 0281844027, E-mail marialuisa.biondi@ao-sanpaolo.it

Ricevuto: 27.10.2010 Revisionato: 22.11.2010 Accettato: 23.11.2010

richieda lunghi tempi di analisi (12). Nel nostro laboratorio l'esame genetico per la sindrome di Gilbert è stato introdotto nel 1999 e, ad oggi, abbiamo studiato più di 600 soggetti (13, 14). Per cercare di velocizzare i tempi e ottimizzare i costi, abbiamo messo a punto due metodiche alternative al sequenziamento, sfruttando strumenti presenti nel nostro laboratorio ["high resolution melting" (HRM) ed elettroforesi multicapillare], che abbiamo valutato in questo lavoro in comparazione con il sequenziamento diretto.

MATERIALI E METODI

Casistica

Entrambe le metodiche (HRM ed elettroforesi multicapillare) sono state messe a punto analizzando 90 soggetti, tra quelli pervenuti nel nostro laboratorio per sospetta sindrome di Gilbert ed analizzati per la presenza della variante UGT1A1*28. Durante il lavoro è stata rispettata ed applicata la dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996, e per ogni campione biologico utilizzato è stato ottenuto uno specifico consenso informato.

Su campioni di sangue intero in EDTA è stata eseguita l'estrazione del DNA genomico da leucociti periferici mediante l'utilizzo dell'estrattore automatico di DNA/RNA QIAsymphony (Qiagen).

Genotipizzazione mediante sequenziamento diretto

La regione TATA box del promotore del gene UGT1A1 è stata amplificata mediante l'utilizzo di "primer" specifici (5' AAGTGAACTCCCTGCTACCTT 3' e 5' CCACTGGGATCAACAGTATCT 3') sintetizzati e forniti da Invitrogen. Le reazioni a catena della polimerasi (PCR) sono state preparate in 25 µL [1,5 mmol/L cloruro di magnesio ($MgCl_2$), 100 mmol/L deossinucleotidetrifosfato (dNTPs), 80 nmol/L "primer", 0,5 IU DNA polimerasi (Taq polimerasi), 5 µL DNA] e amplificate su termociclatore "Mastercycler Eppendorf" alle seguenti condizioni: 94 °C 10 s, seguita da 30 cicli di tre step (94 °C 30 s, 58 °C 40 s, 72 °C 30 s). Taq polimerasi, $MgCl_2$ e dNTPs sono stati forniti da Applied Biosystem.

Le reazioni di sequenza ("forward" e "reverse") sono state preparate sui prodotti amplificati utilizzando il kit "Big Dye Terminator VI.I Cycle Sequencing" (Applied Biosystem) e gli stessi "primer" delle reazioni di PCR, ma ad una concentrazione finale di 0,32 µM. Il sequenziamento diretto è stato ottenuto tramite sequenziatore automatico ABI PRISM 310 Applied Biosystem e i risultati sono stati analizzati utilizzando il software "Sequencing Analysis".

Genotipizzazione mediante elettroforesi multicapillare con QIAxcel (Qiagen)

I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante l'uso di uno strumento per l'elettroforesi multicapillare realizzato per la separazione automatica e ad alta risoluzione di frammenti di DNA in base al PM. QIAxcel comprende un analizzatore, un rivelatore di fluorescenza multipla, una cartuccia precostituita, un computer e il "software" di analisi Biocalculator. A differenza della tradizionale elettroforesi su gel d'agarosio, la separazione avviene all'interno di capillari di una cartuccia precostituita (12 microcapillari contenenti gel con etidio bromuro) utilizzando marcatori d'allineamento per calibrare le differenze di migrazione lungo tutti i capillari. Ogni campione viene caricato automaticamente in un singolo capillare. Quando il voltaggio viene applicato, le molecole di acido nucleico cariche negativamente migrano attraverso il capillare verso il polo positivo e passano attraverso un rilevatore che raccoglie e misura il segnale fluorescente. Questo viene quindi convertito in segnale elettronico da un fotomoltiplicatore e successivamente trasferito al computer per l'analisi mediante il "software" Biocalculator. Ad analisi ultimata i dati vengono sintetizzati con un elettroferogramma o con l'immagine di un gel.

I campioni "wild type" TA6/TA6 mostravano bande ad un'altezza inferiore rispetto ai campioni mutati TA7/TA7, mentre gli eterozigoti presentavano una banda più spessa ad un'altezza intermedia alle precedenti (Figura 1).

Genotipizzazione mediante "high resolution melting" (15)

Le reazioni sono state allestite in duplicato in un volume finale di 10 µL, utilizzando il "Type-it HRM PCR kit" fornito dalla ditta QIAgen. Alla miscela di reazione "Master Mix HRM 1X", appositamente sviluppata dalla ditta produttrice per l'analisi HRM e contenente dNTPs, HotStartTaqPlus DNA polimerasi, intercalante del DNA a doppio filamento (Eva Green), HRM PCR buffer e "Qsolution", sono stati aggiunti i "primer" (5' GGTGTATCGATTGGTTTTTGC 3' e 5' TTTGCTCCTGCCAGAGGTT 3', concentrazione finale, 0,7 µM) e il DNA (concentrazione finale, 20 ng/µL).



Figura 1
Rappresentazione schematica dei tre genotipi del gene UGT1A1 rilevati mediante genotipizzazione con elettroforesi multicapillare: A) omozigote mutato (TA7/TA7); B) omozigote "wild type" (TA6/TA6); C) eterozigote (TA6/TA7). Le bande più alte e più basse rappresentano i marcatori d'allineamento necessari per calibrare le differenze di migrazione lungo i capillari.

Il saggio è stato condotto su amplificatore Rotor Gene Q (Qiagen) provvisto di un apposito "software" di analisi. Il programma di PCR è consistito di una denaturazione iniziale a 95 °C per 10 min, seguita da 45 cicli di tre step: 95 °C per 15 s, 54 °C per 30 s e 72 °C per 10 s con acquisizione della fluorescenza a 515 nm. Nella successiva analisi di "melting" la fluorescenza è stata acquisita in modalità continua da 82 °C a 95 °C. I dati sono stati quindi analizzati mediante il "software" di analisi (Figura 2).

RISULTATI

Analisi dei dati e interpretazione

Ad eccezione del sequenziamento diretto, i 90 campioni sono stati analizzati in più sedute, ognuna delle quali includeva un controllo omozigote (TA7/TA7), uno eterozigote (TA6/TA7) e un soggetto normale (TA6/TA6) per garantire la corretta interpretazione dei dati.

Per il sistema QIAxcel, essendo quello di interpretazione più ambigua, il genotipo è stato assegnato ad ogni campione da 4 differenti operatori con una concordanza di ~100%. L'analisi con QIAxcel non ha permesso, tuttavia, di genotipizzare tre campioni che mostravano tre bande anomale più volte ripetute. Il successivo sequenziamento diretto di questi campioni ha rivelato la presenza di una delezione di un TA "repeat" su un allele e di un'inserzione di un TA "repeat" sull'altro (TA5/TA8).

Per quanto riguarda la genotipizzazione mediante HRM, il "software" di analisi è stato in grado di attribuire correttamente i genotipi TA7/TA7, TA6/TA7, TA6/TA6 ai campioni analizzati con 100% di concordanza con le analisi precedenti. Inoltre, ha identificato come "anomali" quei campioni che non presentavano genotipo TA7/TA7, TA6/TA7 e TA6/TA6 o quei campioni per i quali era fallita l'amplificazione (n=3). Per questi ultimi è bastato ripetere l'analisi.

L'assegnazione dei genotipi è risultata essere più rapida nella metodica HRM, grazie appunto all'utilizzo del "software" d'analisi. Tuttavia, i campioni che presentavano un profilo di "melting" differente dai tre controlli dovevano essere successivamente sequenziati.

L'interpretazione dei risultati del sequenziamento diretto è stata meno rapida, ma univoca. Talvolta, è stata resa difficoltosa dalla presenza di un elevato segnale di "background", che tuttavia non ha impedito l'analisi, o dalla presenza degli omozigoti rari (TA5/TA8) a causa della sovrapposizione dei picchi del tracciato elettroforetico. Vantaggio di tale metodica è la possibilità di identificare variazioni nelle regioni adiacenti al TA "repeat", che potrebbero influire sull'attività enzimatica.

Tempo di esecuzione e costi

Una volta effettuata l'estrazione del DNA genomico, le tre metodiche richiedono differenti tempi di esecuzione. Il sistema QIAxcel risulta essere il più rapido (90 min), ma diversamente dal HRM (110 min), il processo analitico non si svolge su un unico strumento. D'altra parte, campioni analizzati in HRM che presentavano un profilo di "melting" anomalo sono stati comunque sottoposti a sequenziamento diretto (4 ore).

I costi per l'analisi di un singolo campione variano da metodica a metodica. Escludendo l'estrazione, fase comune a tutte le metodiche valutate, il sequenziamento è risultato il più costoso, di circa 10 volte rispetto al sistema QIAxcel e 8 volte rispetto al HRM.

DISCUSSIONE

Come precedentemente sottolineato, la sindrome di Gilbert è sempre stata considerata una condizione benigna. Tuttavia, recenti dati hanno mostrato come le varianti del gene UGT1A1 (UGT1A1*28, *36, *37) siano

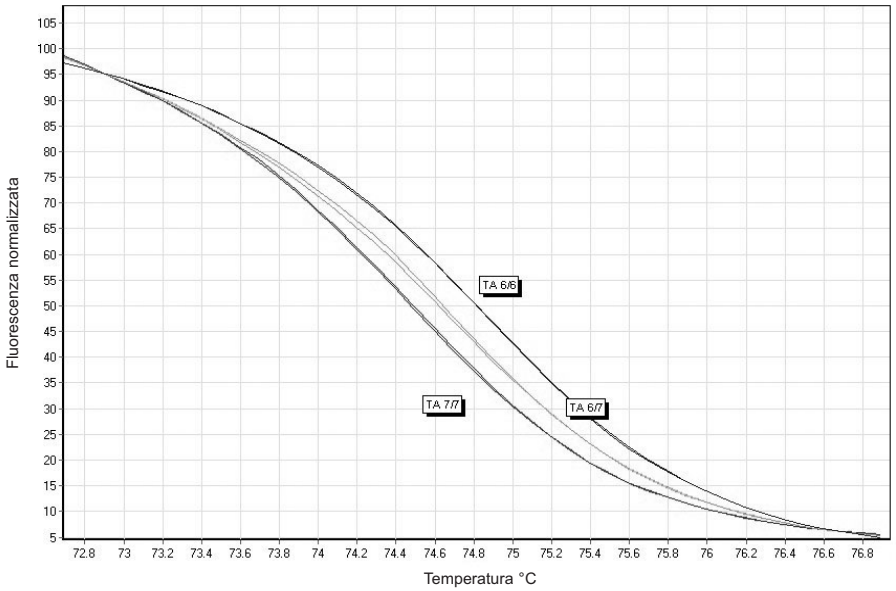


Figura 2
Esempio di genotipizzazione del gene UGT1A1 mediante "high resolution melting".

un fattore predittivo nella terapia con atazanavir e irinotecan. La "Food and Drug Administration" ha già raccomandato la somministrazione di una dose iniziale inferiore del farmaco antitumorale irinotecan per pazienti portatori della variante UGT1A1*28. La disponibilità di un esame rapido, ma accurato per la genotipizzazione della TATA box del gene UGT1A1 è dunque di estrema importanza. Attualmente sono disponibili differenti metodi di genotipizzazione, inclusi PCR quantitativa ("real-time" PCR), HPLC denaturante (dHPLC) e "single-strand conformation polymorphism" (SSCP); tuttavia, il sequenziamento diretto del promotore del gene UGT1A1 rimane il metodo "gold standard".

In questo lavoro abbiamo valutato due valide alternative. Nella metodica HRM, la disponibilità di un economico kit commerciale e di un unico strumento per il processo analitico hanno permesso una facile e rapida genotipizzazione. L'interpretazione dei risultati è stata semplificata e velocizzata dall'utilizzo del "software" di analisi fornito con lo strumento; tuttavia, campioni che differivano dai controlli necessitavano di essere genotipizzati mediante sequenziamento diretto. Il sistema QIAxcel offre vantaggi in termini di risparmio di tempo, forza lavoro e costi. Tuttavia, la genotipizzazione mediante questo sistema è risultata talvolta ambigua a causa della soggettività interpretativa delle bande su gel da parte di più operatori e del loro a volte difficile confronto con i campioni di controllo.

BIBLIOGRAFIA

1. Feverey J. Pathogenesis of Gilbert's syndrome. Eur J Clin Invest 1981;11:417-8.
2. 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.
3. Hsieh TY, Shiu TY, Huang SM, et al. Molecular pathogenesis of Gilbert's syndrome: decreased TATA-binding protein binding affinity of UGT1A1 gene promoter. Pharmacogenet Genomics 2007;17:229-36.
4. Strassburg CP, Lankisch TO, Manns MP, et al. Family 1 uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A1): from Gilbert's syndrome to genetic organization and variability. Arch Toxicol 2008;82:415-33.
5. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:8170-4.
6. Guillemette C, Millikam RC, Newman B, et al. Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 and association with breast cancer among African Americans. Cancer Res 2000;60:950-6.
7. Lankish TO, Moebius U, Wehmeier M, et al. Gilbert's disease and atazanavir: from phenotype to UDP-glucuronosyltransferase haplotype. Hepatology 2006;44:1324-32.
8. Ando Y, Saka H, Asai G, et al. UGT1A1 genotypes and glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan. Ann Oncol 1998;9:845-7.
9. Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, et al. Relevance of different UGT1A1 polymorphism inirinotecan-induced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients. Clin Cancer Res 2004;10:5151-9.
10. Rotger M, Taffe P, Bleiber G, et al. Gilbert syndrome and the development of antiretroviral therapy-associated hyperbilirubinemia. J Infect Dis 2005;192:1381-6.
11. Zhang D, Chando TJ, Everett DW, et al. In vitro inhibition of UDP glucuronosyltransferase by atazanavir and other HIV protease inhibitor and the relationship of this property to in vivo bilirubin glucuronidation. Drug Metab Dispos 2005;33:1729-39.
12. Ehmer U, Lankisch TO, Erichsen TJ, et al. Rapid allelic discrimination by TaqMan PCR for the detection of the Gilbert's syndrome marker UGT1A1*28. J Mol Diagn 2008;10:549-52.
13. Biondi ML, Turri O, Dilillo D, et al. Contribution of the TATA-box genotype (Gilbert's syndrome) to serum bilirubin concentrations in the Italian population. Clin Chem 1999;45:897-8.
14. Pacciolla R, Turri O, Ferri L, et al. Sindrome di Gilbert e genotipo TATA-box: esperienze e prospettive. Biochim Clin 2009;33:255-7.
15. Minucci A, Concolino P, Giardina B, et al. Rapid UGT1A1 (TA)n genotyping by high resolution melting curve analysis for Gilbert's syndrome diagnosis. Clin Chim Acta 2010;411:246-9.