

Sindrome di Gilbert e genotipo TATA-box: esperienze e prospettive*

Rosana Pacciolla¹, Olivia Turri¹, Laura Ferri², Hanane Nadry², Elena Banfi¹, Gianlodovico Melzi d'Eril¹, Maria Luisa Biondi²

¹Dipartimento di Medicina Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano

²Diagnostica Molecolare Infettivologica, Azienda Ospedaliera San Paolo, Milano

ABSTRACT

Gilbert's syndrome and TATA-box genotype: experience of work and perspectives. Gilbert's syndrome is characterized by unconjugated nonhemolytic hyperbilirubinemia and mild intermittent jaundice. Its molecular basis results in a TA repeat insertion (TA7) in the TATA-box of the UDP-glucuronosyltransferase gene promoter (UGT1A). In 1999 we introduced the Gilbert's syndrome genetic test to analyze the relationship between the genetic variant TA7 and the bilirubin concentration in a sample of 98 subjects from all Italian regions. From 1999 to 2008 we analyzed the polymorphism's influence on bilirubin metabolism in a larger population (500 subjects) and evaluated the appropriateness of the genetic analysis requests in the Gilbert's syndrome diagnostic procedure by comparing results with those of the previous study. The TA7 homozygous distribution was statistically different between the two groups (16.3% in the first vs. 54,0% in the second one; $P=0.00001$). The bilirubin concentrations were higher in TA7 homozygous subjects when compared with heterozygous and normal ones (TA7/TA7, 1.47 ± 0.67 mg/dL; TA6/TA6, 0.68 ± 0.29 mg/dL; $P=0.009$).

INTRODUZIONE

La sindrome di Gilbert è caratterizzata da aumento delle concentrazioni plasmatiche della bilirubina non coniugata e modesto ittero intermittente in assenza di altre patologie epatiche ed ematologiche (1-3). Si manifesta nella popolazione generale con una frequenza di ~16%. È causata da una ridotta espressione del gene che codifica per l'enzima UDP-glucuronosiltransferasi (UGT1A) coinvolto nella reazione di glucuronazione della bilirubina che ne permette l'eliminazione sotto forma di composto idrosolubile (4).

Il gene UGT1A appartiene al locus complesso del gene UGT1, situato sul cromosoma 2 (2q37) (5,6). Sono note diverse isoforme ("splicing" tessuto-dipendente), 5 sono gli esoni presenti, 4 dei quali (esoni 2-5) sono costanti per tutte le isoforme, mentre l'esone 1 è variabile e conferisce specificità (5,6). Quello codificato dal gene UGT1A1 è l'unico enzima che fisiologicamente è in grado di formare complessi glucuronati della bilirubina solubili in acqua. Oltre alla bilirubina, questo enzima ha diversi altri substrati endogeni ed esogeni (estrogeni, fibrati, statine, benzopirene) (7,8). Alterazioni dell'attività dell'enzima sono quindi in grado di modulare il metabolismo di farmaci e l'influenza di agenti mutageni.

In letteratura sono riportate numerose varianti del gene UGT1A1 (UGT1A1*1-*113) che determinano differenti gradi di variazioni funzionali (5). In particolare, nella sindrome di Gilbert è presente la variante UGT1A1*28 in

cui si ha l'inserzione di un "TA repeat" nel TATA-box del promotore del gene (TA7 invece della prevalente TA6) che comporta una riduzione di trascrizione del 70% (4). La sua frequenza nella popolazione sembra variare nelle diverse aree geografiche suggerendo una diversità etnica della presenza delle varianti (23% negli afro-americani, 16% negli europei, 12% negli indiani, 8% negli egiziani) (4,9-11). L'osservazione che nella variante UGT1A1*37 si ha un genotipo TA8 con due "TA repeat" inseriti nel TATA-box ed una riduzione della trascrizione genica, mentre nella variante UGT1A1*36 si osserva una TA in meno nel TATA-box (TA5) ed un incremento di trascrizione genica, suggerisce una associazione inversa del numero di "TA repeat" con l'attività trascrizionale del promotore del gene UGT1A1 (12). Inoltre l'associazione con altre varianti genetiche dell'UGT1A1 può modulare il fenotipo osservabile nella sindrome di Gilbert.

Nel 1999 abbiamo introdotto l'esame genetico per la sindrome di Gilbert ed effettuato uno studio per analizzare la relazione tra la variante genetica TA7 e la concentrazione plasmatica di bilirubina in un campione di soggetti provenienti da tutte le regioni italiane (13). Più recentemente, ci siamo proposti di analizzare l'influenza del polimorfismo genetico sul metabolismo della bilirubina in una popolazione più ampia e di valutare l'adeguatezza delle richieste delle analisi genetiche nell'iter diagnostico della sindrome di Gilbert confrontandone la distribuzione genotipica con quella del gruppo studiato nel 1999.

*TATA-box (o elemento TATA o Goldberg e Hogness box): caratteristica sequenza di nucleotidi presente nel promotore di molti geni situata negli eucarioti a circa 25 paia di basi dal punto di inizio della trascrizione. È costituita da coppie di basi azotate appaiate secondo lo schema adenina (A)-timina (T). La sequenza tipica 5'-TATAAA-3' facilita la separazione delle eliche per l'inizio della trascrizione e ne determina anche il punto esatto di inizio.

MATERIALI E METODI

Nello studio effettuato nel 1999 sono stati analizzati i campioni di 98 soggetti non selezionati per le concentrazioni di bilirubinemia e senza alterazioni dei principali parametri biochimici. Di questi, 45 erano femmine e 53 maschi, con età compresa tra 2 e 30 anni (13). Tra il 1999 e il 2008, abbiamo invece analizzato un gruppo di 500 soggetti selezionati dai clinici per probabile sindrome di Gilbert ed inviati presso il nostro centro per riscontro diagnostico. Di questi, 200 erano femmine e 300 maschi, con età compresa tra 1 e 80 anni. 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.

Sono stati raccolti campioni di sangue intero in EDTA per l'analisi genetica e di siero per il dosaggio della bilirubina. È stata eseguita l'estrazione del DNA genomico da leucociti periferici (kit commerciale Qiagen) ed amplificazione mediante "polymerase chain reaction" (PCR) della regione del promotore UGT-1A1 con "primer" specifici (5'AAGTGAAGTCCCTGCTACCTT3' e 5'CCACTGGGATCAACAGTATCT3') (volume finale 25 μ L; concentrazioni di "primer" 80 nmol/L, deossinucleotidtrifosfato 100 mmol/L, MgCl₂ 1,5 mmol/L, Taq gold 0,5 IU). Le condizioni di PCR su termociclatore Mastercycler Eppendorf erano 94 °C per 10 min e 30 cicli di tre step con 94 °C per 30 s, 58 °C per 40 s e 72 °C per 30 s. Il sequenziamento diretto è stato ottenuto tramite sequenziatore capillare ABI PRISM 310 Applied Biosystem. Il dosaggio della bilirubina è stato eseguito su analizzatore Modular Analytics SWA (Roche Diagnostics). La significatività statistica è stata valutata con test χ^2 e test t-Student.

RISULTATI

Nello studio effettuato nel 1999, la distribuzione genotipica risultava essere rappresentata per il 43,9% da omozigoti TA6/TA6, per il 39,8% da eterozigoti TA6/TA7 e per il 16,3% da omozigoti TA7/TA7 con concentrazioni plasmatiche di bilirubina più elevate nei TA7/TA7 rispetto agli omozigoti per TA6 (1,47 \pm 0,92 mg/dL vs. 0,45 \pm 0,17; P=0,001) (13).

Nello studio sul gruppo di 500 soggetti selezionati, il genotipo è risultato essere per il 15% TA6/TA6 (76 soggetti), per il 31% eterozigoti TA6/TA7 (154 soggetti) e per il 54% omozigoti TA7/TA7 (270 soggetti), statisticamente differente rispetto ai dati ottenuti nel lavoro del 1999 (χ^2 = 60,2; P=0,00001), deponendo per una adeguatezza delle richieste. Infatti, i portatori di almeno un TA7 erano più del 85% dei casi.

Nella valutazione della distribuzione genotipica, sono stati anche individuati 3 casi di genotipo TA7/TA8 e un solo caso di genotipo TA5/TA7, che, in considerazione della difficile interpretazione per la presenza in eterozigosi, sono stati esclusi dal lavoro.

Per quanto riguarda l'influenza del polimorfismo sul metabolismo della bilirubina, i dati hanno confermato i risultati dello studio precedente (13), in quanto la concen-

trazione di bilirubina nei soggetti con genotipo TA7/TA7 (1,47 \pm 0,67 mg/dL) risultava significativamente più alta sia di quella dei soggetti TA6/TA7 (0,79 \pm 0,39 mg/dL, P=0,04) sia di quella dei soggetti TA6/TA6 (0,68 \pm 0,29 mg/dL; P= 0,009). Nella valutazione dei valori di bilirubina sono stati considerati solo quelli inferiori a 2,0 mg/dL, in quanto è stato arbitrariamente deciso di porre questo limite come indicativo di una possibile sindrome di Gilbert in assenza di altra patologia.

DISCUSSIONE

La revisione della casistica degli studi effettuati ci porta a considerare come il polimorfismo della regione TATA-box del promotore del gene UGT1A sia realmente incisivo sul metabolismo della bilirubina. I dati ottenuti, infatti, mostrano come i valori di bilirubina degli omozigoti TA7 siano effettivamente più elevati rispetto a quelli degli eterozigoti TA6/TA7 e degli omozigoti TA6.

Nell'ampio gruppo studiato tra il 1999 e il 2008 la valutazione della distribuzione genotipica ha confermato l'ipotesi diagnostica di sindrome di Gilbert posta dai clinici nella maggioranza dei casi, deponendo per una appropriatezza della richiesta per l'analisi genetica nei campioni analizzati.

Vista l'esperienza maturata, il costo modesto e i dati ottenuti, è attualmente di grande interesse l'applicazione dell'esame genetico per la sindrome di Gilbert alla farmacogenetica. Dati di letteratura mostrano un coinvolgimento del gene UGT1A1 nella tossicità e nella efficacia di farmaci antineoplastici (irinotecan) e retrovirali (atazanavir). In particolare, per quanto riguarda l'irinotecan la ridotta espressione del gene nella variante UGT1A1*28 determinerebbe un aumento dei livelli del metabolita attivo SN-38 con conseguenti effetti collaterali, quali mielosoppressione e diarrea (14-19). Nel caso di trattamento con atazanavir, che non sembra essere un substrato importante di glucuronazione, ma è comunque in grado di inibire UGT1A1, UGT1A3 e UGT1A4, la presenza della variante UGT1A1*28 comporta un'ulteriore riduzione dell'attività enzimatica con conseguente importante iperbilirubinemia (20,21). L'analisi del polimorfismo del gene UGT1A1 può dunque essere utile da un punto di vista clinico per individuare i pazienti che possono maggiormente beneficiare di un trattamento o poter predire gravi effetti collaterali. La possibilità di induzione del gene potrebbe inoltre rappresentare un potenziale approccio terapeutico per superare i rischi di tossicità farmacologia (22-24).

BIBLIOGRAFIA

1. Fevery J. Pathogenesis of Gilbert syndrome. *Eur J Clin Invest* 1981;11:417-8.
2. Watson KJR, Gollan JL. Gilbert's syndrome. *Baillière's Clin Gastroenterol* 1989;3:337-55.
3. De Morais SMF, Uetrecht JP, Wells PG. Decreased glucuronidation and increased bioactivation of acetaminophen in Gilbert's syndrome. *Gastroenterology* 1992;102:577-86.
4. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuro-

- nosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995;333:1171-5.
5. Strassburg CP. Pharmacogenetics of Gilbert's syndrome. *Pharmacogenomics* 2008;9:703-15.
 6. Gong QH, Cho JW, Huang T, et al. Thirteen UDP glucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics* 2001;11:357-68.
 7. Lankisch TO, Moebius U, Wehmeier M, et al. Gilbert's disease and atazanavir: from phenotype to UDP-glucuronosyltransferase haplotype. *Hepatology* 2006;44:1324-32.
 8. Fang JL, Lazarus P. Correlation between the UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) TATAA box polymorphism and carcinogen detoxification phenotype: significantly decreased glucuronidating activity against benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol(-) in liver microsomes from subjects with the UGT1A1*28 variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;3:102-9.
 9. Kohle C, Mohrle B, Munzel PA, et al. Frequent co-occurrence of the TATA box mutation associated with Gilbert's syndrome (UGT1A1*28) with other polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase-1 locus (UGT1A6*2 and UGT1A7*3) in Caucasians and Egyptians. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1521-7.
 10. Monaghan G, Ryan M, Seddon R, et al. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* 1996;347:578-81.
 11. Balram C, Sabapathy K, Fei G, et al. Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase in Asians: UGT1A1*28 is a common allele in Indians. *Pharmacogenetics* 2002;12:81-3.
 12. 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.
 13. Biondi ML, Turri O, Dilillo D, et al. Contribution of the TATA-box genotype (Gilbert syndrome) to serum bilirubin concentrations in the Italian population. *Clin Chem* 1999;45:897-8.
 14. 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.
 15. Tukey RH, Strassburg CP, Mackenzie PI. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferases and irinotecan toxicity. *Mol Pharmacol* 2002;62:446-50.
 16. Innocenti F, Ratain MJ. Irinotecan treatment in cancer patients with UGT1A1 polymorphisms. *Oncology* 2003;17(suppl 5):52-5.
 17. Gagne JF, Montminy V, Belanger P, et al. Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol Pharmacol* 2002;62:608-17.
 18. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, et al. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 2004;22:1382-8.
 19. Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, et al. Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:5151-9.
 20. 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.
 21. Zhang D, Chando TJ, Everett DW, et al. In vitro inhibition of UDP glucuronosyltransferases by atazanavir and other HIV protease inhibitors and the relationship of this property to in vivo bilirubin glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 2005;33:1729-39.
 22. Ritter JK, Kessler FK, Thompson MT, et al. Expression and inducibility of the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 in liver and cultured primary hepatocytes: evidence for both genetic and environmental influences. *Hepatology* 1999;30:476-84.
 23. Usui T, Kuno T, Ueyama H, et al. Proximal HNF1 element is essential for the induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 by glucocorticoid receptor. *Biochem Pharmacol* 2005;71:693-701.
 24. Ellis E, Wagner M, Lammert F, et al. Successful treatment of severe unconjugated hyperbilirubinemia via induction of UGT1A1 by rifampicin. *J Hepatol* 2006;44:243-5.