

RELAZIONE FINALE

Correlazione tra polimorfismo genetico del citocromo P450 e risposta clinica al donepezil

L'obiettivo alla base di questo Progetto di Ricerca si inserisce in una più ampia tematica di recente interesse del Gruppo cui afferisco, come studente di Dottorato di Ricerca in Scienza delle Sostanze Bioattive, riguardante “La Farmacogenetica come potenziale strumento per l'ottimizzazione della Farmacoterapia”. In particolare con questo progetto, ci proponiamo di studiare se tra le cause della differente risposta clinica al donepezil, in pazienti affetti da MA probabile, possa essere considerata anche l'eventuale presenza di un polimorfismo genetico per l'isoenzima CYP2D6. Questo enzima, come noto, è infatti soggetto ad un alto grado di polimorfismo genetico, ed è responsabile del metabolismo di molti farmaci tra cui anche gli anticolinesterasici di seconda generazione [1,2]. Sono stati individuati, finora, 70 alleli mutanti che codificano per varianti più o meno funzionanti di questo isoenzima, per cui la popolazione può essere divisa fenotipicamente in soggetti EM (*Extensive Metabolizers*, soggetti con capacità metabolica normale), PM (*Poor Metabolizers*, soggetti con capacità metabolica ridotta o nulla) o UM (*Ultrarapid Metabolizers*, soggetti con capacità metabolica notevolmente superiore alla norma). Con la presente ricerca ci proponiamo di genotipizzare i pazienti per le varianti alleliche dell'isoenzima CYP2D6 (Tabella I), di valutare lo stato clinico dei pazienti affetti da MA probabile, prima e dopo la terapia con donepezil, mediante le scale internazionali di valutazione per queste affezioni, di monitorare i livelli plasmatici di donepezil, e di eseguire test di correlazione statistici sui dati ottenuti.

Tabella I. Polimorfismo genetico del *CYP2D6* analizzato in questo studio:

ALLELE MUTATO	MUTAZIONE	CONSEGUENZE
Nessuno (<i>CYP2D6*1</i>)	Nessuna	Enzima attivo
<i>CYP2D6*3</i>	<i>Frame-shift</i>	Enzima inattivo
<i>CYP2D6*4</i>	<i>Splicing</i> difettoso	Enzima inattivo
<i>CYP2D6*5</i>	Delezione del gene	Enzima assente
<i>CYP2D6*6</i>	<i>Frame-shift</i> che genera un codone di stop	Enzima inattivo
<i>CYP2D6*2xn</i>	Duplicazione del gene	Aumentata attività dell'enzima

La prima parte di questo lavoro consta nella messa a punto nei nostri laboratori delle tecniche di biologia molecolare necessarie per la genotipizzazione dei pazienti per le isoforme di CYP2D6. A questo scopo si è reso necessario un mio breve soggiorno all'estero, supportato in parte dal contributo messo a disposizione dalla SIF, presso il laboratorio di Farmacologia Clinica (Università di Uppsala, Dipartimento di Scienze Mediche, Svezia), diretto dalla Prof.ssa Marja-Liisa Dahl, dove ho preso visione delle tecniche di biologia molecolare necessarie per la determinazione delle varianti alleliche del *CYP2D6* e dove ho effettuato i test di genotipizzazione su una popolazione di volontari sani, che successivamente verranno utilizzati come soggetti controllo nel nostro studio.

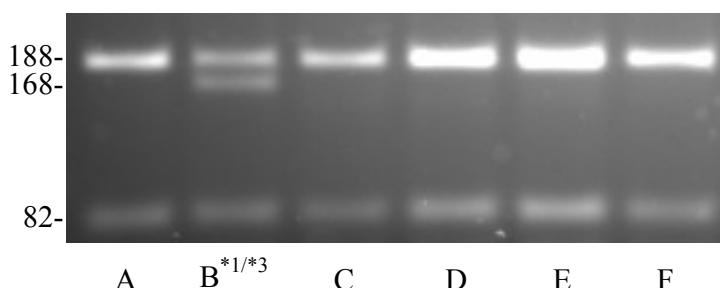
Le metodiche utilizzate sono state:

Estrazione del DNA

Il DNA viene estratto da 200 µl di sangue periferico umano per mezzo del kit di estrazione QIAamp DNA Blood Mini Kit (250) (QIAGEN).

Determinazione della variante allelica *CYP2D6*3*

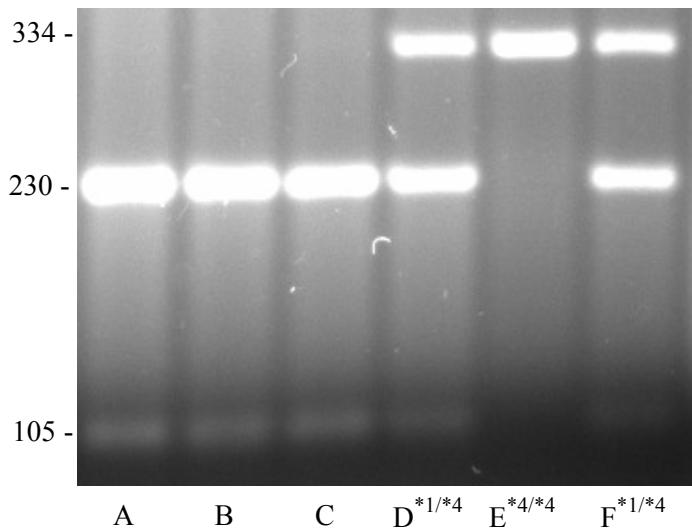
La variante allelica *CYP2D6*3*, è caratterizzata dalla mutazione funzionale A2549del (delezione dell'adenina in posizione 2549). Tale mutazione determina uno spostamento della cornice di lettura (*frame shift*) che porta all'espressione di una forma enzimatica inattiva. Questa mutazione genera un sito di restrizione aggiuntivo che può essere sfruttato per scopi diagnostici. Un esempio di amplificazione (reazione di PCR) è mostrato in Figura 1:



I primers utilizzati (forward 5'-GATGAGCTGCTAACTGAGCCC-3'; reverse 5'-CCGAGAGCATACTCGGGAC-3', Sigma-Genosys) hanno consentito l'amplificazione specifica del tratto di sequenza dove può verificarsi la mutazione. I soggetti A-C-D-E-F sono omozigoti *1/*1 (EM) e presentano due frammenti di 188 bp ed 82 bp. Il soggetto B è eterozigote *1/*3 (EM) e presenta una terza banda di 168 bp, derivante dalla parziale digestione della banda di 188 bp ancora presente. Nella nostra popolazione in studio, finora analizzata, non sono stati determinati soggetti omozigoti *3/*3 (PM), caratterizzati da una completa digestione enzimatica della banda di 188 bp.

Determinazione della variante allelica *CYP2D6*4*

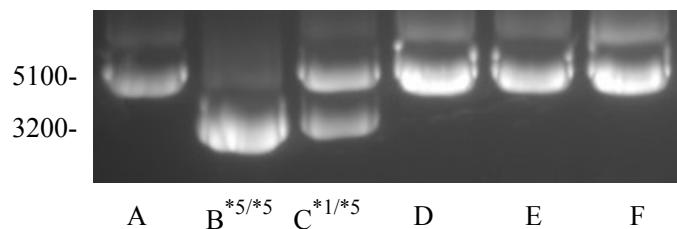
La variante allelica *CYP2D6*4*, caratterizzata dalla mutazione funzionale G1846A (sostituzione di una guanina con una adenina in posizione 1846) è dovuta al polimorfismo di un singolo nucleotide (SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*). Tale mutazione determina un difetto di *splicing* che porta alla perdita di uno specifico sito di restrizione ed all'espressione di una forma enzimatica inattiva. Un esempio di amplificazione (reazione di PCR) è mostrato in Figura 2:



I primers utilizzati (forward 5'-GCCTTCGCCAACCAACTCCG-3'; reverse 5'-AAATCCTGCTCTTCCGAGGC-3', Sigma-Genosys) hanno consentito l'amplificazione specifica del tratto di sequenza dove può verificarsi la mutazione. I soggetti A-B-C sono omozigoti *1/*1 (EM) e presentano due frammenti di 230 bp e 105 bp. I soggetti D ed F sono eterozigoti *1/*4 (EM) e presentano anche la banda di amplificazione di 334 bp. Nel soggetto E (omozigote *4/*4: PM) è presente solo la banda di amplificazione di 334 bp poiché la digestione enzimatica non è avvenuta a causa della mutazione su entrambi gli alleli.

Determinazione della variante allelica CYP2D6*5

La variante allelica CYP2D6*5 è caratterizzata dalla delezione dell'intero gene CYP2D6. Tale mutazione porta alla mancata espressione dell'isoenzima. È stato possibile amplificare (PCR), non solo la regione comprensiva del gene CYP2D6, ma anche le regioni a valle e a monte di questo gene (pseudogeni). Un esempio di amplificazione (reazione di PCR) è mostrato in Figura 3:

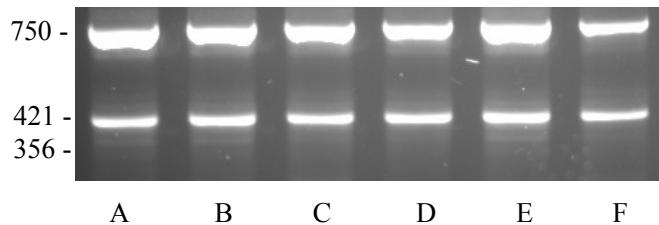


I primers utilizzati per il controllo della reazione di amplificazione (forward 5'-GTT ATC CCA GAA GGC TTT GCA GGC TTC A-3'; reverse 5'-GCC GAC TGA GCC CTG GGA GGT AGG TA-3', Sigma-Genosys) e quelli utilizzati per l'amplificazione degli pseudogeni (forward 5'-CAG GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C-3'; reverse 5'-CAC ACC GGG CAC CTG TAC TCC TCA-3', Sigma-Genosys) hanno consentito di verificare la presenza o meno della delezione del gene. La banda di amplificazione di 5100 bp indica la mancata delezione del gene su entrambi gli alleli nei soggetti A-D-E-F (omozigoti *1/*1: EM) o su uno solo dei due alleli nel soggetto C (eterozigote *1/*5: EM), dove compare anche la banda di 3200 bp. Nel soggetto B (omozigote *5/*5: PM) invece la presenza dell'unica banda di 3200 bp dimostra la completa delazione del gene su entrambi gli alleli.

Determinazione della variante allelica CYP2D6*6

La variante allelica CYP2D6*6, è caratterizzata dalla mutazione funzionale T1707del (delezione della timina in posizione 2549). Tale mutazione determina uno spostamento della cornice di lettura

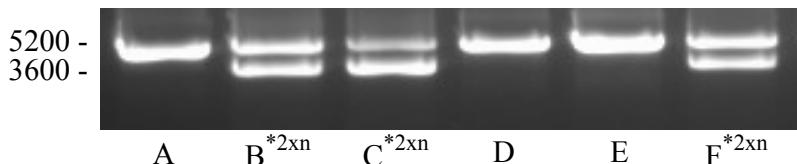
(*frame shift*) che genera un codone di stop e porta all'espressione di una forma enzimatica inattiva. Un esempio di amplificazione (reazione di PCR) è mostrato in Figura 4:



I primers utilizzati per il controllo della reazione di amplificazione (forward 5'- TCC CAG CTG GAA TCC GGT GTC G -3'; reverse 5'- GGA GCT CGC CCT GCA GAG ACT CCT -3', Sigma-Genosys), per l'amplificazione della sequenza non mutata (reverse 5'- TCC TCG GTC ACC CA -3', Sigma-Genosys) e per l'amplificazione della sequenza mutata (reverse 5'- GTC GCT GGA GCA GG -3', Sigma-Genosys) hanno consentito di discriminare la mutazione. Le bande di amplificazione di 750 bp e di 421 bp dimostrano la mancanza di mutazioni nei soggetti A-B-C-D-E-F (omozigoti *1/*1: EM). Nella nostra popolazione di studio non sono stati determinati finora né soggetti eterozigoti *1/*6 (EM) né omozigoti *6/*6 (PM).

Determinazione della variante allelica *CYP2D6*2xn*

La variante allelica *CYP2D6*2xn* è caratterizzata dalla duplicazione dell'intero gene *CYP2D6*. Tale mutazione porta ad una iperespressione dell'isoenzima. È stato possibile amplificare (PCR), non solo la regione comprensiva del gene *CYP2D6*, ma anche le regioni a valle e a monte di questo gene (pseudogeni). Un esempio di amplificazione (reazione di PCR) è mostrato in Figura 5:



I primers utilizzati per il controllo della reazione di amplificazione (forward 5'- TCC CCC ACT GAC CCA ACT CT -3'; reverse 5'- CACGTGCAGGGCACCTAGAT -3', Sigma-Genosys) hanno consentito di verificare la presenza o meno della duplicazione del gene. La banda di amplificazione di 5200 bp indica la mancata duplicazione del gene nei soggetti A-D-E (omozigoti *1/*1: EM). Nei soggetti B-C-F (duplicati *2xn: UM) invece la presenza dell'altra banda di 3600 bp dimostra la duplicazione e quindi la presenza di extracopie del gene.

Risultati ottenuti

La valutazione delle frequenze alleliche percentuali calcolate per ciascuna delle varianti analizzate, relative ad uno studio, condotto sulla popolazione italiana [3], ed allo studio in oggetto (45 volontari sani) è riportata in Figura 6. La frequenza allelica rappresenta la percentuale di alleli mutati rispetto al numero di soggetti analizzati e l'intervallo di confidenza correla questa frequenza allelica all'errore standard, calcolato rispetto al numero di alleli.

FREQUENZE ALLELICHE PER CYP2D6 NELLA POPOLAZIONE ITALIANA

VARIANTE ALLELICA	FREQUENZA ALLELICA	INTERVALLO DI CONFIDENZA
CYP2D6*1	0.750	0.718 - 0.792
CYP2D6*3	0.007	0.001 - 0.013
CYP2D6*4	0.153	0.127 - 0.179
CYP2D6*5	0.034	0.021 - 0.047
CYP2D6*6	0.014	0.005 – 0.023
CYP2D6*2xn	0.042	0.027 – 0.057

FREQUENZE ALLELICHE PER CYP2D6 NEL GRUPPO DI STUDIO (45 SOGGETTI)

VARIANTE ALLELICA	FREQUENZA ALLELICA	INTERVALLO DI CONFIDENZA
CYP2D6*1	0.745	0.655 – 0.835
CYP2D6*3	0.022	-0.008 – 0.052
CYP2D6*4	0.156	0.081 – 0.231
CYP2D6*5	0.044	0.002 – 0.086
CYP2D6*6	0.000	0.000 – 0.000
CYP2D6*2xn	0.033	-0.004 – 0.070

La valutazione delle frequenze genotipiche percentuali, relative ad uno studio, condotto sulla popolazione italiana [3], ed allo studio in oggetto (45 volontari sani) è riportata in Figura 7. La frequenza del genotipo rappresenta la percentuale di un certo genotipo rispetto al numero totale di soggetti analizzati.

FREQUENZE GENOTIPO PER CYP2D6 NELLA POPOLAZIONE ITALIANA

GENOTIPI	FREQUENZA %	FENOTIPO IPOTIZZABILE
*1/*1	53.3%	Omozigoti EM
*1/*3, *1/*4, *1/*5, *1/*6	35.0%	Eterozigoti EM
*3/*4, *4/*4, *4/*5	3.4%	PM
*2xn/*1	8.3%	UM

FREQUENZE GENOTIPO PER CYP2D6 NEL GRUPPO DI STUDIO (45 SOGGETTI)

GENOTIPI	FREQUENZA %	FENOTIPO IPOTIZZABILE
*1/*1	55.6%	Omozigoti EM
*1/*3, *1/*4, *1/*5	35.6%	Eterozigoti EM
*4/*4, *5/*5	4.4%	PM
*2xn/*1	4.4%	UM

I geriatri che collaborano al progetto procederanno a questo punto all'arruolamento, previo parere favorevole del Comitato Etico, dei pazienti affetti da MA probabile, afferenti alla Struttura Complessa Geriatrica dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara. Verranno esaminati i pazienti inseriti nel Protocollo ministeriale di trattamento con anticolinesterasici ed in terapia da almeno tre mesi con donepezil. Verranno valutati i principali parametri vitali dei pazienti ed il grado di deterioramento cognitivo e funzionale mediante il test di screening *Mini Mental State Examination* (MMSE) e le scale di valutazione delle attività elementari e strumentali della vita quotidiana (IADL e ADL). Verrà quindi effettuato un prelievo di sangue venoso periferico su cui eseguiremo il dosaggio dei livelli plasmatici di donepezil, secondo metodica HPLC. La procedura di estrazione del farmaco dal plasma e la validazione della metodica HPLC verranno messe a punto sulla base delle indicazioni riportate in letteratura [4,5].

L'eventuale dimostrazione di una correlazione tra la capacità metabolica individuale, la risposta clinica e le concentrazioni plasmatiche di farmaco, dimostrerebbe l'utilità della genotipizzazione del paziente come guida all'adozione di schemi posologici personalizzati prima di iniziare la terapia.

Referenze Bibliografiche

1. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *TIPS* 2004; 25:193-200.
2. Prior T.I., Baker G.B. Interactions between the cytochrome P450 system and the second-generation antipsychotics. *J. Psychiatry. Neurosci.* 2003; 28(2): 99-112.
3. Scordo M.G., Caputi A.P., D'Arrigo C., Fava G., Spina E. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol. Res.* 2004; 50:195-200.
4. Ohnishi A., Mihara M., Kamakura H., Tomono Y., Hasegawa J., Yamazaki K., Morishita N., Tanaka T. Comparison of the pharmacokinetics of E2020, a new compound for Alzheimer's disease, in healthy young and elderly subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 1993; 33:1086-1091.
5. Yasui-Furukori N., Furuya R., Takahata T., Tateishi T. Determination of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002; 768: 261-265.

Novara, 28 Aprile 2005

Dr. Federica Varsaldi