

STUDI GENETICI SUL TRASPORTATORE DELLA SEROTONINA PER L'INDIVIDUAZIONE DI EFFICACI TRATTAMENTI FARMACOLOGICI DELL'ALCOL-DIPENDENZA

Esterina Pascale

Dipartimento di Scienze e Biotechnologie Medico Chirurgiche, "Sapienza" Università di Roma, Roma

Introduzione

L'alcol-dipendenza risulta da complesse interazioni tra fattori ambientali e genetici. La componente ereditaria nello sviluppo di questa dipendenza costituisce circa il 50-60%. Numerosi studi condotti sia in modelli animali che nell'uomo hanno evidenziato che il sistema serotonergico è associato al suo sviluppo e mantenimento. Il gene del trasportatore della serotonina è stato ampiamente esaminato visto il fondamentale ruolo svolto dalla proteina da esso codificata nel controllo della concentrazione della serotonina nello spazio sinaptico. Tuttavia i trattamenti farmacologici con inibitori specifici del re-uptake della serotonina (*Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*, SSRI) o con l'antagonista del recettore 5-HT₃ (5-hydracryptamine) (Ondansetron), in popolazioni eterogenee di individui alcol-dipendenti, non hanno prodotto risultati riproducibili. Tra le principali cause di variazione interindividuale nelle risposte farmacologiche particolare attenzione è stata rivolta allo studio dei polimorfismi genici. La conoscenza sempre più dettagliata del genoma umano ha portato alla nascita della farmacogenetica che studia come le differenze inter-individuali presenti nel DNA determinano risposte diverse ai farmaci e come queste informazioni possono essere applicate per realizzare terapie che tengono conto dell'unicità del genoma. In quest'ambito recenti trial clinici hanno prodotto risultati interessanti quando si considera il genotipo del trasportatore della serotonina in gruppi omogenei di alcolisti.

Polimorfismi genici

Si parla di polimorfismo genetico quando una variazione a livello del DNA presenta una prevalenza maggiore dell'1% nella popolazione. Sebbene il genoma degli individui sia identico per il 99,9%, la differenza dello 0,1% è in grado di dare luogo a tre milioni di polimorfismi. La variazione può essere costituita da sostituzioni, delezioni o inserzioni di basi nel DNA e può riguardare regioni codificanti e regioni non codificanti. Le differenze in singole paia di basi sono note invece come polimorfismi a singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP). Alcuni polimorfismi sono "silenti", in altre parole non condizionano in maniera significativa la funzione del prodotto genico, mentre altri, detti polimorfismi "funzionali", modificano l'espressione della proteina codificata, determinando alterazioni che possono influenzare la manifestazione di particolari patologie o condizionare la risposta ai farmaci. Il loro significato è particolarmente importante per l'individuazione e la personalizzazione delle terapie farmacologiche. L'esito di queste terapie può essere molto diverso tra soggetti della stessa popolazione. I fattori che contribuiscono a questa variabilità comprendono età, razza,

sesso, interazione con altri farmaci, la presenza di particolari patologie, comprese le funzionalità renali ed epatiche. Evidenze sempre più numerose sottolineano come anche le differenze genetiche tra gli individui, dovute a polimorfismi in particolari geni, costituiscono un fattore molto importante nell'influenzare la variabilità del trattamento farmacologico (1). La frequenza con cui gli alleli di un gene sono presenti in una popolazione può variare sensibilmente in etnie diverse.

I determinanti genetici della risposta a un farmaco possono influenzare il suo profilo farmacocinetico e/o farmacodinamico. Le variazioni che si riferiscono al profilo farmacodinamico possono determinare una mancanza di risposta alla presenza di concentrazioni terapeutiche del farmaco. Queste variazioni possono dipendere da polimorfismi a carico di geni che codificano per trasportatori, recettori, enzimi e altre proteine coinvolte nel meccanismo di azione del farmaco, o dei geni che influenzano significativamente la progressione della malattia.

La variabilità osservata nella risposta ai trattamenti farmacologici nell'alcol-dipendenza ha indirizzato la ricerca verso la farmacogenetica e la farmacogenomica con l'obiettivo di identificare un trattamento farmacologico più efficace. L'utilizzo di test genetici semplici, condotti mediante la metodica della PCR e della real-time PCR, consente di analizzare i polimorfismi genici coinvolti nella risposta ai farmaci per fornire indicazioni sull'efficacia dei trattamenti farmacologici prima della somministrazione. Recenti studi clinici in quest'ambito hanno prodotto risultati interessanti per alcuni polimorfismi funzionali presenti nel gene del trasportatore della serotonina.

Trasportatore della serotonina e polimorfismi funzionali

La serotonina (5-HT) è un neurotrasmettitore coinvolto nel processo fisiopatologico di diverse condizioni psichiatriche, tra cui anche l'alcol-dipendenza (2, 3). Il trasportatore della serotonina (5-HTT) è una proteina che costituisce il meccanismo principale di rimozione della 5-HT dallo spazio sinaptico, modulando così la trasmissione serotonergica a livello del sistema nervoso centrale. Il grado di ricaptazione dipende dalla densità del trasportatore presente sulla membrana presinaptica.

Il gene che codifica per il 5-HTT, (SLC6A4) è stato oggetto di numerosi studi nell'ambito dell'alcol-dipendenza per le seguenti osservazioni: (a) la proteina svolge un ruolo critico nel determinare la dimensione e la durata della neurotrasmissione serotoninergica (4), (b) il gene 5-HTT è associato con l'alcolismo (5), e con sottotipi di alcolismo (6), e (c) composti farmacologici, quali gli inibitori specifici del re-uptake della serotonina (SSRI) o gli antagonisti del recettore 5-HT₃ (Ondansetron) hanno dimostrato avere importanti applicazioni terapeutiche (7-9). I livelli di espressione del gene SLC6A4 sono regolati da tre principali meccanismi: elementi che regolano la trascrizione a livello del promotore al 5' del gene (10), *splicing* differenti (11), e siti diversi di poliadenilazione al 3' del gene (12).

Tra le varianti funzionali del gene per il trasportatore della serotonina, numerosi studi riguardo all'alcol-dipendenza sono stati condotti sul polimorfismo 5HTTLPR, caratterizzato dalla presenza o dall'assenza di un tratto di 43 bp che dà origine a due varianti alleliche, una lunga (L) e una corta (S) (13) che possono condizionare l'attività trascrizionale del gene SLC6A4. La variante S è associata a una ridotta trascrizione del gene, rispetto alla variante L con conseguente aumento della serotonina disponibile nelle sinapsi e down-regulation dei siti di binding post-sinaptici (14).

Numerosi studi genetici sono stati condotti per valutare l'associazione tra gli alleli S e L nell'alcol-dipendenza. I risultati sono a tutt'oggi conflittuali: in alcuni studi non è stata trovata

associazione tra genotipo e dipendenza, mentre in altri, è descritto un ruolo patogenetico per la variante S e in altri ancora per quella L (15, 16).

Oltre agli alleli L e S, il livello di espressione del 5-HTT è influenzato da altri polimorfismi più recentemente identificati nel gene (12, 17-21). In particolare, il polimorfismo a singolo nucleotide rs25531 è in grado di modulare l'efficienza trascrizionale del 5-HTTLPR (18). Il rs25531 è un polimorfismo funzionale con la sostituzione di una Adenina (A) in Guanina (G) che modifica i livelli di espressione della variante L creando un sito di legame funzionale per il fattore di trascrizione AP2 che agisce come repressore della trascrizione genica. Pertanto, la modulazione di 5-HTTLPR da parte di rs25531 risulta in tre alleli comuni: LA (a più elevata espressione), LG e S (a bassa espressione). L'identificazione di questo nuovo polimorfismo, definito triallelico, potrebbe spiegare i risultati contrastanti ottenuti dagli studi di associazione genica finora condotti.

Un altro polimorfismo funzionale a singolo nucleotide è stato recentemente descritto nel gene SLC6A4, denominato rs1042173 e consiste nella sostituzione di una Guanina (G) in Timina (T) (21). L'allele G mostra livelli di espressione di mRNA e di proteina più elevati rispetto all'allele T. Questo polimorfismo è localizzato nella regione regolatrice al 3' del gene in prossimità sia del sito di poliadenilazione che del sito di legame con micro RNA (Tabella1). Il cambiamento di sequenza in questa regione potrebbe modificare il livello di espressione del gene e della proteina alterando la stabilità del mRNA (12, 22, 23).

Tabella 1. Polimorfismi funzionali del trasportatore della serotonina: rs25531, 5-HTTLPR e rs1042173

Polimorfismo	Localizzazione nel gene SLC6A4	Alleli	Funzione
5-HTTLPR	Promotore	S= Short L= Long	S=ridotta trascrizione L= aumentata trascrizione
rs25531	Promotore	SNP: A/G	A= elevata trascrizione G= ridotta trascrizione
rs1042173	3'-UTR	SNP: T/G	G= elevata trascrizione T= ridotta trascrizione

Sistema serotonergico: farmacogenetica del trattamento dell'alcol-dipendenza

Gli studi di associazione genica tra il polimorfismo 5-HTTLPR e alcol-dipendenza hanno prodotto risultati contrastanti nelle varie popolazioni analizzate (15, 16). Anche il trattamento dell'alcol-dipendenza utilizzando farmaci serotonergici non ha prodotto risultati conclusivi.

L'eterogeneità dei soggetti alcol-dipendenti potrebbe costituire un importante fattore di variabilità. Tra i diversi criteri utilizzati per rendere più omogenei i gruppi di alcolisti, l'età d'insorgenza della dipendenza costituisce un fattore molto importante. Utilizzando questo criterio è possibile distinguere i soggetti alcolisti in due gruppi: il gruppo con insorgenza della dipendenza più tardiva (*Late-Onset Alcoholism*, LOA) definita dopo i 25 anni di età, con una più bassa vulnerabilità in età infantile e minori complicanze patologiche, e il tipo con alcol-dipendenza che inizia a un'età inferiore o uguale a 25 anni (*Early-Onset Alcoholism*, EOA), più elevata vulnerabilità in età infantile e complicanze psicopatologiche. Il genotipo 5-HTTLPR è stato studiato e utilizzato per indirizzare la farmacoterapia in sottogruppi di alcolisti classificati in base all'età d'insorgenza della dipendenza.

Studi genetici sono stati condotti per verificare se tra i due sottogruppi di alcolisti LOA ed EOA esistano differenze genotipiche per quanto riguarda i polimorfismi del trasportatore della serotonina. In particolare per il polimorfismo 5-HTTLPR è stata evidenziata un'associazione tra i genotipi S/S e S/L e il sottotipo a insorgenza tardiva, mentre il genotipo L/L è associato con il sottogruppo di alcolisti ad esordio precoce e che presentano complicanze più gravi.

L'associazione tra LOA e il genotipo S/S e L/S del trasportatore della serotonina suggerirebbe un normale funzionamento del recettore 5-HT₃ e la presenza dell'allele S potrebbe influenzare il rischio di ricaduta in soggetti alcol-dipendenti in astinenza. Mentre, soggetti EOA con genotipo L/L presentano livelli ridotti di serotonina a livello sinaptico che potrebbe determinare una up-regolazione del recettore 5-HT₃ durante il consumo di alcol e un aumentato rilascio di dopamina nel *nucleus accumbens*.

Le differenze neurobiologiche tra questi due sottotipi di alcolisti possono avere implicazioni efficaci per il trattamento farmacologico dell'alcol-dipendenza. Da un punto di vista clinico, gli antagonisti del recettore 5-HT₃, come l'Ondansetron, potrebbero costituire un trattamento efficace nei soggetti EOA rispetto a LOA. Mentre il trattamento farmacologico con inibitori del re-uptake della serotonina (SSRI), come la Sertalina, faciliterebbe la trasmissione serotonergica e l'inibizione della dopamina e potrebbe invece essere più efficace nei soggetti LOA che presentano prevalentemente i genotipi S/S e L/S.

I risultati di trial clinici hanno mostrato l'efficacia del trattamento con Sertalina, inibitore del re-uptake della serotonina (24), in pazienti LOA, mentre l'Ondansetron, un antagonista del recettore 5-HT₃ si è dimostrato più efficace tra soggetti EOA (8).

Recenti trial clinici hanno preso in considerazione sia la distinzione dei soggetti alcolisti in EOA o LOA che la presenza dei polimorfismi funzionali del trasportatore della serotonina in risposta al trattamento con farmaci serotonergici con interessanti risultati. In particolare, il trattamento con Ondansetron per 11 settimane si è dimostrato più efficace nei soggetti con genotipo L/L nel ridurre il consumo di alcol con un periodo di astinenza più prolungata rispetto ai pazienti sottoposti a trattamento con placebo. Inoltre, la presenza contemporanea del genotipo LL e del polimorfismo rs1042173 rende il trattamento farmacologico con Ondansetron ancora più efficace in termini di riduzione del consumo alcolico e dei giorni di astinenza, rispetto ai soggetti con tutti gli altri genotipi sottoposti al trattamento (25).

In un altro trial clinico controllato con placebo, la somministrazione di Sertralina per 12 settimane ha mostrato un effetto farmacologico maggiore tenendo conto di entrambi i fattori età d'insorgenza dell'alcol-dipendenza e genotipo 5-HTTLPR. Il trattamento risulta più efficace in soggetti EOA rispetto ai pazienti sottoposti al trattamento con placebo, ma solo in soggetti con il genotipo LL. I pazienti di questo studio sono stati seguiti dopo il trattamento, che è efficace anche fino a tre mesi successivi (9). Gli stessi risultati sono stati ottenuti anche considerando il polimorfismo triallelico, determinato dai due polimorfismi 5-HTTLPR e rs25531 (26).

Questi studi recenti hanno valutato l'effetto del genotipo 5-HTTLPR sulla risposta al trattamento con farmaci serotonergici evidenziando come il genotipo LL risponda in modo diverso ai diversi trattamenti in gruppi omogenei di alcolisti e dimostrando che trattamenti farmacologici efficaci possono essere raggiunti mettendo insieme le conoscenze genetiche funzionali e la corrispondenza dei pazienti ottenuta mediante caratterizzazione del sottotipo clinico. Nuovi studi prospettici con Ondansetron e altri agenti serotonergici sono necessari per validare l'utilizzo di questo polimorfismo come predizione del trattamento terapeutico. Inoltre, sarebbe opportuno valutare sia il contributo di altri polimorfismi funzionali in aggiunta al polimorfismo S/L, come pure definire ulteriori criteri volti a identificare sottogruppi ancora più omogenei di alcolisti.

Conclusioni

I risultati degli studi clinici condotti negli ultimi due anni hanno evidenziato come la definizione di gruppi più omogenei di pazienti e la conoscenza di varianti genetiche funzionali sia di fondamentale importanza nell'identificazione di trattamenti farmacologici efficaci. Vi è un'ampia variazione individuale nella risposta ai farmaci. La ricerca nell'ambito della farmacogenetica dell'alcolismo è volta a una più dettagliata caratterizzazione dei pazienti che tenga conto di altre variabili, oltre all'età d'insorgenza della dipendenza e ad altri polimorfismi di geni che codificano per enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci, nei suoi recettori e trasportatori. L'obiettivo ultimo della farmacogenetica è quello di conoscere l'efficacia del farmaco sul soggetto prima della sua somministrazione ed evitare effetti tossici. Ciò permetterebbe di somministrare solo i farmaci con attività terapeutica accertata, diminuendo notevolmente anche gli sprechi.

Bibliografia

1. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics. An opportunity to a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med* 2001;250:186-200.
2. Sellers EM, Higgins GA, Sobell MB. 5-HT and alcohol abuse. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:69-75.
3. LeMarquand D, Pihl RO, Benkelfat C. Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. *Biol Psychiatry* 1994;36:395-421.
4. Lesch KP, Mossner R. Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental and neurodegenerative disorders? *Biol Psychiatry* 1998;44:179-92.
5. Matsushita S, Yoshino A, Murayama M, Kimura M, Muramatsu T, Higuchi S. Association study of serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and alcoholism. *Am J Med Genet* 2001;105:446-50.
6. Parsian A, Cloninger CR. Serotonergic pathway genes and subtypes of alcoholism: association studies. *Psychiatr Genet* 2001;11:89-94.
7. Kenna GA. Medications acting on the serotonergic system for the treatment of alcohol dependent patients. *Curr Pharm Des* 2010;16:2126-35.
8. Johnson BA. Serotonergic agents and alcoholism treatment: rebirth of the subtype concept and hypothesis. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1597-601.
9. Kranzler HR, Armeli S, Tennen H, Covault J, Feinn R, Arias AJ, Pettinati H, Oncken C. Double-blind, randomized trial of sertraline for alcohol dependence: moderation by age of onset and 5-HTTLPR genotype. *J Clin Psychopharmacol* 2011;31:22-30.
10. Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2542-46.
11. Bradley CC, Blakely RD. Alternative splicing of the human serotonin transporter gene. *J Neurochem* 1997;69:1356-67.
12. Battersby S, Ogilvie AD, Blackwood DH, Shen S, Muqit MM, Muir WJ, Teague P, Goodwin GM, Harmer AJ. Presence of multiple functional polyadenylation signals and a single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of the human serotonin transporter gene. *J Neurochem* 1999;72:1384-8.
13. Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 1996;66:2621-4.

14. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996;274:1527-31.
15. Feinn R, Nellissery M, Kranzler HR. Meta-analysis of the association of a functional serotonin transporter promoter polymorphism with alcohol dependence. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 2005;133:79-84.
16. McHugh RK, Hofmann SG, Asnaani A, Sawyer AT, Otto MW. The serotonin transporter gene and risk for alcohol dependence: a meta-analytic review. *Drug and Alcohol Depend* 2010;108:1-6.
17. MacKenzie A, Quinn J. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:15251-5.
18. Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, Xu K, Arnold PD, Richter MA, Kennedy JL, Murphy DL, Goldman D. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet* 2006;78:815-26.
19. Wendland JR, Moya PR, Kruse MR, Ren-Patterson RF, Jensen CL, Timpano KR, Murphy DL. A novel, putative gain-of-function haplotype at SLC6A4 associated with obsessive-compulsive disorder. *Hum Mol Genet* 2008;17:717-723
20. Lipsky RH, Hu XZ, Goldman D. Additional functional variation at the SLC6A4 gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009;150B(1):153.
21. Seneviratne C, Huang W, Ait-Daoud N, Li MD, Johnson BA. Characterization of a functional polymorphism in the 3'UTR of SLC6A4 and its association with drinking intensity. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33:332-9.
22. Beaudoin E, Freier S, Wyatt JR, Claverie JM, Gautheret D. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res* 2000;10:1001-10.
23. Chen K, Rajewsky N. Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nature Genetics* 2006;38:1452-6.
24. Chick J, Aschauer H, Hornik K. Efficacy of fluvoxamine in preventing relapse in alcohol dependence. A one year, double-blind, placebo-controlled multicentre study with analysis by typology. *Drug Alcohol Depend* 2004;74:61-70.
25. Johnson BA, Ait-Daoud N, Seneviratne C, Roache JD, Javors MA, Wang XQ, Liu L, Penberthy JK, Di Clemente C, Li MD. Pharmacogenetic approach at the serotonin transporter gene as a method of reducing the severity of alcohol drinking. *Am J psychiatry* 2011;168:265-75.
26. Kranzler HR, Feinn R, Armeli S, Tennen H. Comparison of alcoholism subtypes as moderators of the response to sertraline treatment. *Alcohol Clin Exp Res* 2012, 36:509-16.