



Università degli Studi di Ferrara
Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica e Ambientale
XXI Ciclo
Curriculum: Genetica (Settore Scientifico Disciplinare BIO/18)
Coordinatore: Prof. Guido Barbujani

**Suscettibilità Genetica alla Parodontite Aggressiva:
Analisi di Polimorfismi in Geni Candidati**

DOTTORANDO:
Leonardo Trombelli

TUTORE:
Prof.ssa Chiara Scapoli

Anni 2006/2008

*A mia moglie Cristina,
grande compagna di viaggio*

RINGRAZIAMENTI

Un sentito e doveroso ringraziamento va alla Prof. Chiara Scapoli, mio Tutor per questo periodo di Dottorato, che ha saputo indirizzarmi con inesauribile pazienza e mai sopito entusiasmo in tutte le fasi della ricerca.

Desidero inoltre ringraziare il Prof. Luigi Guida e i suoi Collaboratori presso il Dipartimento di Discipline Odontostomatologiche, Ortodontiche e Chirurgiche della Seconda Università di Napoli, per l'aiuto prezioso fornito nel reclutare e selezionare parte dei pazienti e dei campioni biologici.

Un ringraziamento speciale alla Dott.ssa Ilaria Borzani e alla Dr. Elisabetta Mamolini per la indispensabile collaborazione alla processazione dei campioni, e al Dott. Roberto Farina per la preziosa collaborazione alla parte clinica.

Un dovuto riconoscimento anche al Centro di Ricerca e Servizi per lo Studio delle Malattie Parodontali dell'Università di Ferrara e alla GABA International AG, Munchenstein, CH, per avere sostenuto economicamente lo studio.

INDICE DEI CONTENUTI

CAPITOLO I - INTRODUZIONE -	5
I.1. La malattia parodontale: definizione e overview	5
I.2. La parodontite: patogenesi	5
I.3. La parodontite: caratteristiche cliniche e classificazione	8
I.4. La parodontite aggressiva: epidemiologia, caratteristiche cliniche e classificazione	9
I.5. Aspetti genetici della suscettibilità dell'ospite nella parodontite aggressiva	14
I.6. Polimorfismi genici dell'interleuchina-1 nella parodontite aggressiva	16
I.7. Altri polimorfismi genici nella parodontite aggressiva	21
CAPITOLO II - SCOPO DELLO STUDIO -	28
CAPITOLO III - MATERIALI & METODI -	31
III.1. Popolazione analizzata	31
III.2. Estrazione e visualizzazione del DNA genomico	32
III.3. Determinazione della concentrazione del DNA estratto	33
III.4. Genotyping degli SNPs selezionati	34
III.5. Controllo di Qualità dei dati genetici	41
CAPITOLO IV – METODI STATISTICI -	42
IV.1. Metodi di mappaggio genetico per le patologie complesse	42
IV.2. Studi di associazione caso-controllo	45
IV.3. Stima del Linkage Disequilibrium	48
IV.4. Mappe di LD come strumento di mappaggio per geni malattia	52
IV.5. Analisi Statistiche	58
CAPITOLO V - RISULTATI -	62
V.1. Controllo di Qualità e dell'Equilibrio di Hardy-Weinberg	62
V.2. Tests di stratificazione	63
V.3. Analisi Single-point	64
V.4. Studio della Struttura LD nella regione 2q13-14	64
V.5. Ricostruzione Aplotipica	66
CAPITOLO VI - DISCUSSIONE E CONCLUSIONI -	71
CAPITOLO VII - BIBLIOGRAFIA -	75

CAPITOLO I

- Introduzione -

1.1. La malattia parodontale: definizione e overview

La malattia parodontale è iniziata dalla placca batterica, che si accumula nella regione crevicolare gengivale e induce una risposta infiammatoria. Questa infiammazione, o gengivite cronica, può progredire in individui suscettibili in una condizione infiammatoria cronica distruttiva denominata parodontite. Mentre la gengivite è un processo reversibile, nella parodontite l'osso e altri tessuti di supporto dei denti vengono distrutti irrimediabilmente (Armitage 1999, Flemmig 1999, Armitage et al. 2000).

La placca dentale, aggregato contenente 400 specie batteriche diverse, è l'agente eziologico della parodontite. Importante ruolo è rivestito dalla risposta infiammatoria dell'ospite all'infezione batterica. Il delicato rapporto fra questi due fattori determina lo stato istologico e clinico dei tessuti parodontali e, pertanto, anche l'eventuale comparsa della malattia.

Studi prospettici a lungo termine sulla evoluzione naturale della malattia parodontale condotti da Løe et al. (1986) su una popolazione dello Sry Lanka hanno dimostrato come il rischio per la parodontite non è condiviso equamente dalla popolazione. È chiaro che la parodontite influenza pesantemente un gruppo ad alto rischio che rappresenta il 10-15% circa della popolazione, nella quale la malattia progredisce rapidamente dalla gengivite cronica alla parodontite distruttiva (Løe et al. 1986, Johnson et al. 1988, Jenkins & Kinane 1989). Questo rischio differenziale per la parodontite è consistente con gli elementi ereditabili della suscettibilità, ma anche con una diversa esposizione a fattori di rischio esogeni/ambientali.

1.2. La parodontite: patogenesi

L'accumulo di placca batterica sulle superfici dentali adiacenti ai tessuti gengivali porta le cellule dell'epitelio giunzionale e sulcolare a contatto con prodotti di scarto, enzimi e componenti della parete dei batteri colonizzatori. Quando la carica batterica aumenta, allo stesso modo tende ad aumentare la risposta irritativa dei tessuti dell'ospite a queste sostanze. Le cellule epiteliali vengono stimulate dalle sostanze microbiche alla produzione di citochine pro-infiammatorie e altri mediatori chimici dell'infiammazione. Questi mediatori danno inizio ad una risposta all'interno dei tessuti che segue la risposta infiammatoria classica. I tessuti diventano edematosi per l'accumulo di fluidi e l'infiltrazione di cellule infiammatorie, e si sviluppa così la gengivite. Negli stadi precoci, i neutrofili (leucociti polimorfonucleati o PMN)

predominano a causa della loro mobilità e flessibilità, e a causa degli effetti delle molecole di adesione sui vasi sanguigni che legano preferenzialmente i PMN nelle fasi precoci dell'infiammazione. Inoltre, si sviluppa un gradiente chemiotattico dal solco al tessuto connettivo e pertanto i PMN sono attratti verso il solco crevicolare. I fattori chemiotattici includono proteine microbiche e peptidi come la potente formilmetionilleucil-fenilalanina (FMLP) e fattori chemiotattici dell'ospite come le chemochine (in particolare IL-8), molecole prodotte dai neutrofilo come il leucotriene B4 e molecole derivate dall'attivazione del sistema del complemento (C5a). I PMN vengono attratti nell'area insieme ad altri leucociti come monociti, macrofagi e linfociti. I macrofagi sono l'unico tipo di cellule oltre ai neutrofilo che hanno una funzione utile nel solco, ovvero che sono in grado di fagocitare PMN morti o morenti e quindi rimuoverli dall'area. Questo processo è estremamente utile per l'ospite, poiché le cellule morenti o iper-attivate sono in grado di degranulare, cioè di rilasciare i loro enzimi in modo incontrollato, causando più danno ai tessuti dell'ospite e esacerbando ulteriormente l'infiammazione. Pertanto, la funzione di spazzino dei macrofagi è utile nel contenere l'infiammazione. L'altra essenziale funzione di queste cellule, ovvero il loro ruolo di presentazione dell'antigene, non può essere operativo all'interno del solco poiché non è possibile, per queste cellule, ritornare ai tessuti dell'ospite e ai vasi linfatici, dove potrebbero completare questa funzione. Questo fa comprendere come il ruolo di presentazione dell'antigene dei macrofagi e le funzioni immunitarie delle cellule B e T si svolgano nel tessuto connettivo, e le molecole di adesione come CD44 sono in grado di ancorare queste cellule immunitarie all'interno dei tessuti in modo che possano espletare la loro funzione senza essere disperse nel solco crevicolare. Queste molecole vengono up-regolate (aumentate di numero) durante l'infiammazione da varie citochine pro-infiammatorie prodotte da una varietà di cellule. Non sorprende che i leucociti che necessitano di rimanere nel tessuto connettivo per svolgere le loro funzioni esprimano grandi quantità di queste molecole di adesione tissutale, sebbene cellule come i PMN, che funzionano in prossimità dei microrganismi, abbiano poche di queste molecole di adesione.

In aggiunta, specifiche molecole di adesione come ICAM-1 nell'epitelio giunzionale possono assistere i movimenti dei PMN nel solco crevicolare e sono infatti up-regolate dall'azione diretta dei prodotti batterici e da citochine prodotte dai PMN. Pertanto i PMN arrivano in grandi quantità nel solco crevicolare e iniziano a svolgere la loro funzione di fagocitosi, aiutati dal complemento e dagli anticorpi (opsonine). La presenza dei corrispondenti recettori Fc per queste molecole anticorpali sui PMN è necessaria per la funzione antimicrobica degli anticorpi. Le cellule del Langerhans all'interno dell'epitelio raccolgono materiale

antigenico di derivazione batterica e lo portano al tessuto linfoide dove avviene la presentazione antigenica ai linfociti. Questa presentazione dell'antigene risulta in linfociti attivati che ritornano al sito di esposizione microbica dove le cellule B vengono trasformate in plasmacellule e producono anticorpi o cellule T che diventano arruolate nella risposta umorale e nello sviluppo dell'immunità cellulo-mediata a questi microbi. Gli anticorpi possono essere prodotti a livello locale o sistemico e agiscono aggregando o bloccando microbi, prevenendo l'adesione dei microbi all'epitelio, lavorando con il complemento per favorire la lisi dei microbi e, in collaborazione con i PMN, permettendo una fagocitosi efficiente (opsonizzazione).

L'accumulo e l'attività dei PMN nel solco crevicolare risulta nel rilascio di molti enzimi che hanno effetti dannosi sia sui tessuti dell'ospite che sui microbi. Inoltre, l'infiltrato infiammatorio necessita di uno spazio progressivamente crescente nei tessuti parodontali per svolgere la sua funzione e alcuni componenti strutturali del parodonto vengono perduti creando lo spazio fisico per i leucociti che infiltrano i tessuti. Inoltre, quando il tessuto epiteliale viene danneggiato, l'epitelio ricresce in posizione più apicale, dando origine alla tasca parodontale. Mentre l'infiltrato infiammatorio si estende, l'osso viene riassorbito in modo da fare più spazio alle cellule di difesa. Si forma il tessuto di granulazione che è altamente vascolarizzato e pieno di plasmacellule che producono anticorpi. Questo tessuto di granulazione contiene cellule in grado di produrre enzimi che degradano la matrice e citochine che direttamente o indirettamente degradano ulteriormente il tessuto connettivo e l'osso. In ultimo, se lasciati incontrollati, i microbi continueranno a produrre prodotti dannosi per l'ospite, l'ospite continuerà il tentativo di confinare i microbi attraverso la sua risposta immunitaria, le tasche si approfondiranno, il tessuto di granulazione si estenderà, l'osso e il legamento parodontale verranno perduti e il riassorbimento del supporto parodontale del dente ne provocherà l'esfoliazione.

Un modello recentemente proposto per la descrizione dei meccanismi patogenetici alla base della parodontite è descritto in Figura I.1.

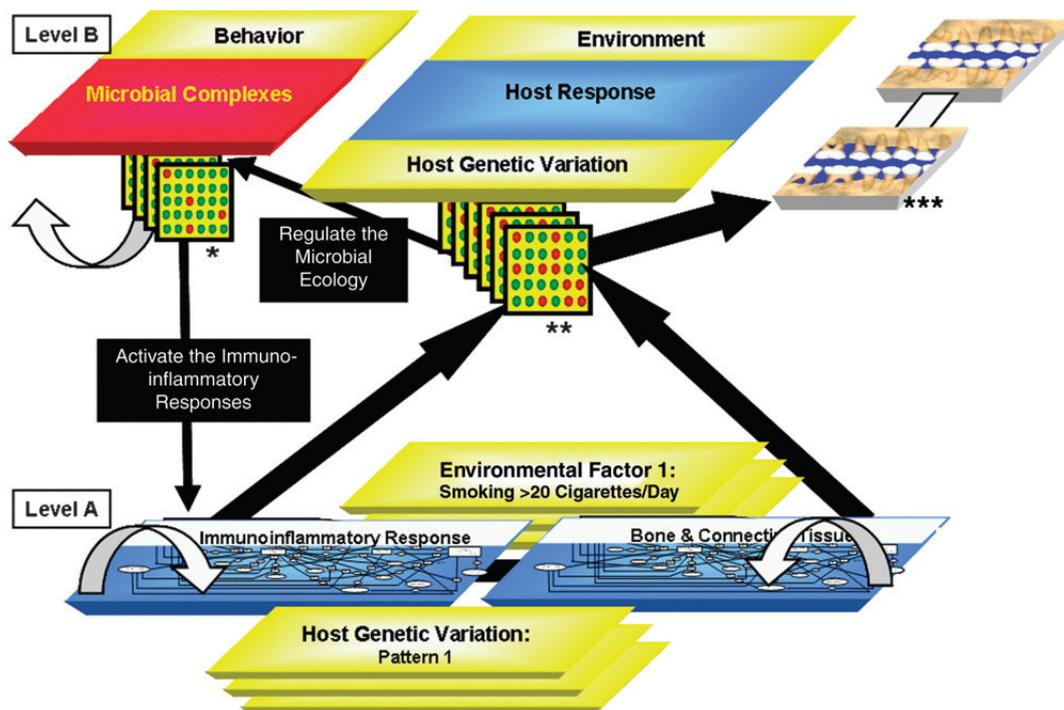


Figura I.1. Modello di sistemi biologici che suggerisce come la patogenesi della parodontite può essere definita attraverso la componente batterica, l'esposizione a fattori ambientali, e variazioni genetiche dell'ospite associate con la malattia. Il livello A descrive i meccanismi biologici coinvolti nelle risposte immuno-infiammatorie e nel metabolismo del tessuto connettivo e del tessuto osseo, e il livello B descrive i parametri clinici e i marker biologici osservabili. Nel livello B, i prodotti derivanti da diverse specie microbiche sono rappresentati dagli arrays (*). Questi prodotti attivano i meccanismi immuno-infiammatori, che conseguenzialmente influenzano il comportamento dell'osso e il metabolismo del tessuto connettivo. Per ciascun individuo ci sono combinazioni di variazioni genetiche e fattori ambientali (es. variazione genetica dell'ospite: pattern 1 e fumo > 20 sigarette/die). Questi fattori genetici e ambientali agiscono sui meccanismi del livello A modificando l'espressione dei geni attivati dai prodotti batterici. L'espressione genica, le proteine e i metaboliti del livello A possono essere individuati in campioni di tessuto (**), e l'azione di tali componenti biologiche induce variazioni nei tessuti che possono essere misurate attraverso segni clinici (***) (da Korman K.S. *J Periodontol* 2008;79 Suppl. 8:1560-1568).

1.3. La parodontite: caratteristiche cliniche e classificazione

I segni clinici associati alla parodontite, e quindi i parametri in base ai quali si effettua la diagnosi di tale malattia, sono i seguenti: 1) perdita di attacco clinico, 2) perdita di osso alveolare (sia in senso orizzontale che verticale).

I sintomi che possono essere associati alla parodontite sono i seguenti: 1) alterazioni del volume, del colore e della tessitura della gengiva marginale, 2) sanguinamento al sondaggio, 3) ridotta resistenza dei tessuti molli marginali al sondaggio (aumento della profondità di sondaggio), 4) recessione del margine gengivale, 5) esposizione delle forcazioni, 6) aumento della mobilità dentale, 7) estrusione, inclinazione o sventagliamento dentario.

La parodontite può avere diverse manifestazioni cliniche. Questo ha portato al riconoscimento di diverse sindromi cliniche. Fino a poco tempo fa, la domanda se queste differenti manifestazioni cliniche rappresentassero o meno differenti forme della stessa malattia è stata motivo di dibattito. Oggi diverse linee di evidenza supportano l'esistenza di forme diverse di parodontite. Queste, in particolare, includono:

1. Il consenso clinico crescente di una diversa prognosi e la necessità di approcci di trattamento specifici per le varie sindromi;
2. L'eterogeneità nell'eziologia con possibili implicazioni terapeutiche;
3. L'eterogeneità nella suscettibilità genetica e ambientale.

Nel Workshop sulla classificazione delle malattie parodontali del 1999, le diverse forme di parodontite sono state riclassificate in 3 diverse forme maggiori (croniche, aggressive, necrotizzanti) e in manifestazioni parodontali di malattie sistemiche.

1.4. La parodontite aggressiva: epidemiologia, caratteristiche cliniche e classificazione

Studi epidemiologici hanno mostrato che la prevalenza della AgP varia sensibilmente tra razze, continenti e stati diversi. La prevalenza stimata della AgP varia da 0.1% a 15% nei Caucasiche, negli Ispanici e negli Afro-Americani (Saxe'n 1980, Neely 1992, Sjodin et al. 1993, Albandar et al. 1997). Una prevalenza molto maggiore viene riportata negli Afro-Americani quando questi sono comparati ai Caucasiche (Buremeister et al. 1984, Løe & Brown 1991, Melvin et al. 1991). Dati dalla Cina mostrano che la prevalenza della AgP varia da 0.12% a 0.47% in differenti regioni del paese (Wang et al. 1990, Hu et al. 2002, Gao et al. 2004).

Sebbene la definizione di AgP sia recente e non rappresenti solo un nuovo termine per la precedente definizione di EOP, altri dati utili per stimare la prevalenza e distribuzione della AgP vengono da studi epidemiologici sulla EOP (Papapanou 1996).

È disponibile scarsa evidenza riguardo alla prevalenza della EOP nella dentizione decidua. Nei pochi studi condotti nei paesi industrializzati, la perdita di osso alveolare è stata riscontrata nella dentizione decidua di bambini di 5-11 anni con una frequenza variabile da 0.9% a 4.5% dei soggetti (Sweeney et al. 1987, Bimstein et al. 1994).

Nella dentizione permanente di soggetti di 13-20 anni, la maggioranza degli studi ha riportato una prevalenza della EOP inferiore all'1% (di solito 0.1%-0.2% nelle popolazioni

caucasiche). Il rischio di sviluppare EOP, tuttavia, non sembra essere condiviso equamente nella popolazione: tra gli studenti americani di 5-17 anni, la prevalenza di EOP è stata stimata aggirarsi tra 0.2% per i bianchi e 2.6% per i neri (Løe & Brown 1991). Inoltre, una elevata prevalenza di EOP è stata riportata in studi condotti nei paesi in via di sviluppo. Studi longitudinali di progressione della malattia negli adolescenti indicano che i soggetti con segni di parodontite distruttiva in giovane età sono predisposti ad un ulteriore deterioramento delle loro condizioni parodontali. Tale deterioramento appare più pronunciato nei siti colpiti inizialmente, e nei pazienti provenienti da fasce socio-economiche basse della popolazione. Il deterioramento dello stato parodontale implica sia un aumento dell'estensione (prevalenza di lesioni nella dentizione) che della severità delle lesioni (ulteriore perdita di osso alveolare nei siti colpiti inizialmente) (Lissau et al. 1990, Albandar et al. 1991a,b, Clerehugh et al. 1991, Albandar 1993).

Pertanto, anche se, ad oggi, esiste una scarsa quantità di dati epidemiologici relativi alla AgP, i dati relativi alla EOP sembrano suggerire che una piccola ma significativa frazione della popolazione di bambini e giovani adulti è affetta da forme aggressive di parodontite. Data la severità di queste forme di malattia parodontale e la loro tendenza a progredire, la identificazione precoce della AgP deve essere un obiettivo primario dei clinici e dei ricercatori.

La parodontite aggressiva (AgP) comprende un gruppo di forme di parodontite rare, caratterizzate da severa distruzione dell'attacco parodontale, rapidamente progressive, spesso caratterizzate da una tendenza dei casi ad aggregare in famiglie. Fino a pochi anni or sono, questo gruppo di patologie era definito come principalmente basato sulla età di insorgenza/diagnosi ed era pertanto denominato parodontite ad insorgenza precoce (EOP). Le caratteristiche di questa forma della malattia, tuttavia, possono manifestarsi a qualsiasi età. La AgP, in genere, tende a manifestarsi precocemente nella vita dell'individuo (terza-quarta decade); questo implica che gli agenti eziologici sono in grado di causare segni e sintomi di malattia identificabili clinicamente in un periodo di tempo relativamente breve. Questo fatto è determinante per la attuale comprensione di queste malattie, dal momento che implica una infezione a partire da una microflora altamente virulenta e/o un livello elevato di suscettibilità dell'ospite alla malattia parodontale.

In assenza di una classificazione eziologica, le forme aggressive di malattia parodontale sono state basate sulle seguenti caratteristiche primarie (Lang et al. 1999) (Tabella I.1):

- anamnesi medica non rilevante;
- rapida perdita di attacco clinico e distruzione di osso alveolare;
- aggregazione familiare dei casi.

Le caratteristiche secondarie che sono state considerate essere generalmente ma non universalmente presenti (Tabella I.1) sono:

- quantità di depositi microbici non corrispondente alla severità di distruzione dei tessuti parodontali;
- proporzioni elevate di *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans (A.a.)* e, in alcune popolazioni, di *Porphyromonas gingivalis (P.g.)*;
- anormalità dei fagociti;
- fenotipo macrofagico iper-rispondente, inclusa una produzione elevata di prostaglandina E₂ (PGE₂) e di interleuchina 1β (IL-1 β) in risposta alle endotossine batteriche;
- la progressione della perdita di attacco clinico e della perdita di osso alveolare può presentare una remissione spontanea.

Caratteristiche primarie della parodontite aggressiva	Caratteristiche secondarie della parodontite aggressiva
anamnesi medica non rilevante	quantità di depositi microbici non corrispondente alla severità di distruzione dei tessuti parodontali
rapida perdita di attacco clinico e distruzione di osso alveolare	proporzioni elevate di <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e, in alcune popolazioni, di <i>Porphyromonas gingivalis</i>
aggregazione familiare dei casi	anormalità dei fagociti
	fenotipo macrofagico iper-rispondente
	occasionale carattere <i>self-arresting</i> della progressione della perdita di attacco clinico e di osso alveolare

Tabella I.1. Caratteristiche primarie (criteri diagnostici) e secondarie (generalmente ma non universalmente presenti) della parodontite aggressiva (Lang et al. 1999).

Il Workshop internazionale per la classificazione ha identificato caratteristiche cliniche e di laboratorio abbastanza specifiche da consentire una sottoclassificazione della AgP in forma localizzata e forma generalizzata (Lang et al. 1999, Tonetti & Mombelli 1999). Le seguenti caratteristiche sono state identificate:

Parodontite Aggressiva Localizzata (LAP)

- insorgenza circum-puberale;
- insorgenza a livello dei primi molari/incisivi con perdita di attacco clinico interprossimale in almeno due denti permanenti, uno dei quali è un primo molare, e che coinvolga non più di due denti oltre a primi molari e incisivi;
- consistente risposta anticorpale sierica ad agenti infettanti;

Parodontite Aggressiva Generalizzata (GAP)

- di solito colpisce persone al di sotto dei 30 anni di età, ma i pazienti possono essere anche di età superiore a 30 anni;
- perdita di attacco interprossimale generalizzata che colpisce almeno tre denti permanenti oltre a primi molari e incisivi;
- natura episodica pronunciata della distruzione dell'attacco clinico e dell'osso alveolare;
- scarsa risposta anticorpale sierica ad agenti infettanti.

La GAP rappresenta il gruppo più eterogeneo e include le forme più severe di parodontite. Queste comprendono forme originalmente descritte come parodontite giovanile generalizzata (enfasi su una possibile relazione con LAP), parodontite severa (enfasi sulla distruzione parodontale avanzata in relazione all'età del paziente) o parodontite rapidamente progressiva (enfasi sulla elevata velocità di progressione della malattia). Ciascuna di queste forme di GAP, tuttavia, rimane altamente eterogenea in termini di manifestazione clinica e di risposta alla terapia. Il Workshop Europeo di Parodontologia (1993) ha pertanto suggerito che, dal momento che non è ancora disponibile una migliore classificazione eziologica, queste forme dovrebbero essere considerate come un unico gruppo nell'attesa che questo venga meglio definito in futuro attraverso l'uso di vari descrittori clinici della malattia basati su parametri clinici, microbiologici e immunologici (Attström & Van der Velden 1993). È anche importante sottolineare che, malgrado le linee di evidenza sopracitate, la LAP e la GAP possono semplicemente rappresentare variazioni fenotipiche di una singola entità patologica. D'altro canto, è possibile che differenti forme di AgP possano manifestarsi con una manifestazione clinica comune. Questo aspetto è di grande rilevanza diagnostica e terapeutica. Alcuni report clinici hanno indicato che alcuni soggetti possono manifestare parodontite nella dentizione decidua, seguita da LAP e più avanti da GAP (Shapira et al. 1994b). Uno studio ha indicato che la dentizione decidua dei pazienti con LAP presentava perdita ossea a livello dei primi molari nel 20-52% dei casi, suggerendo che almeno alcuni casi di LAP potevano inizialmente colpire la dentizione decidua (Sjodin et al. 1989, 1993). Inoltre, nei soggetti con LAP è stata descritta una

associazione tra il numero di lesioni e l'età del soggetto, suggerendo una variazione età-dipendente dalla forma localizzata alla forma generalizzata di AgP (Hormand & Frandsen 1979, Burmeister et al. 1984).

La Figura I.2 illustra un caso clinico paradigmatico di paziente affetto da forma generalizzata di AgP.

a.



b.

1997



1999

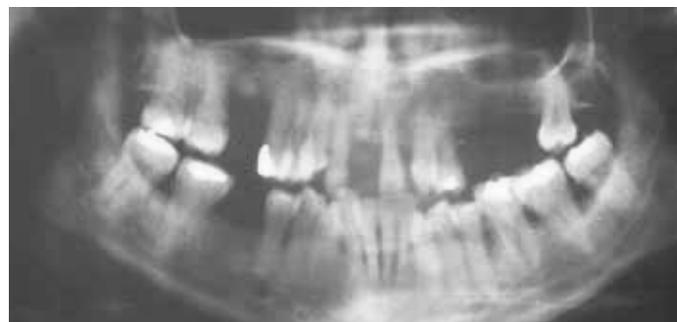


Figura I.2. Aspetto clinico (a) radiografico (b) di un paziente (♀, anni 28), affetto da parodontite aggressiva generalizzata. Si noti come la malattia determini un progressivo e rapido deterioramento delle condizioni parodontali, con perdita di attacco e di elementi dentari, in un arco di tempo di circa 2 anni (b).

1.5. Aspetti genetici della suscettibilità dell'ospite nella parodontite aggressiva

Nel passato è stato riconosciuto che i fratelli dei pazienti con parodontite giovanile (JP) soffrivano frequentemente di parodontite. Questa osservazione era principalmente basata su casi aneddotici riferibili di una o più famiglie identificate sulla base di un membro affetto da JP. In uno studio americano condotto su 77 discendenti di 39 soggetti con JP localizzata (LJP) o generalizzata (GJP), è stato mostrato come più del 50% dei fratelli soffrivano di JP (Boughman et al. 1992). In 11 famiglie era osservabile la presenza di entrambe le forme LJP e GJP. Poiché uno studio epidemiologico su larga scala condotto negli Stati Uniti ha mostrato che la prevalenza di JP varia tra lo 0.16% e il 2.49% (Löe & Brown 1991), l'alta prevalenza di JP in queste famiglie ha suggerito l'esistenza di un background genetico per la malattia.

Il più grande studio di aggregazione familiare della JP ha incluso 227 membri affetti da forma aggressiva di parodontite (Marazita et al. 1994). Per 26 pazienti affetti da GJP la storia anamnestica e clinica era compatibile con una pregressa LJP, a dimostrazione della progressione della forma localizzata in una forma più generalizzata. Inoltre, in 16 famiglie è stata osservata la presenza concomitante di LJP e GJP, a conferma delle osservazioni fatte da Boughman et al. (1992). Dei 227 membri affetti, 104 avevano almeno un parente di primo grado che era stato sottoposto ad esame clinico. Era quindi possibile condurre una analisi di segregazione su 100 famiglie, 4 delle quali avevano 2 membri affetti ciascuna. I membri delle famiglie hanno incluso 527 soggetti: 60 con LJP, 72 con GJP, 254 soggetti non affetti, 141 soggetti con una condizione parodontale non nota. Il gruppo dei soggetti non affetti includeva soggetti edentuli, soggetti con parodontite cronica, e soggetti parodontalmente sani. La maggioranza delle famiglie era di origine Afro-Americana. Gli Autori hanno concluso che la modalità più plausibile di ereditarietà era il modello di trasmissione autosomica dominante sia nelle popolazioni Afro-Americane che Caucasiche, con una penetranza del 70% negli Afro-Americani e del 73% nei Caucasici.

Altri studi di aggregazione familiare hanno indicato che la prevalenza di AgP è alta in certe famiglie, dove la percentuale di fratelli affetti può raggiungere il 40-50% (Saxen & Nevanlinna 1984, Beaty et al. 1987, Long et al. 1987, Llorente & Griffiths 2006). Tale rilevante aggregazione familiare dei casi rinforza l'ipotesi che i fattori genetici possono essere importanti nel determinare la suscettibilità alla AgP. Gli studi genetici in queste famiglie suggeriscono che la modalità di trasmissione della malattia sia consistente con l'ereditarietà mendeliana di un gene di maggiore effetto (Saxen & Nevanlinna 1984, Beaty et al. 1987, Boughman et al. 1992, Hart et al. 1992, Marazita et al. 1994). Questo significa che l'aggregazione familiare osservata può dipendere in parte da uno o più geni che possono predisporre gli individui a sviluppare la AgP.

Le analisi di segregazione hanno indicato che la modalità più plausibile di ereditarietà è quella autosomica dominante (Saxen & Nevanlinna 1984, Beaty et al. 1987, Hart et al. 1992, Marazita et al. 1994). La maggior parte degli studi, tuttavia, sono stati condotti su popolazioni Afro-Americane; è quindi possibile che possano esistere altre modalità di ereditarietà in popolazioni diverse.

L'analisi di segregazione può fornire informazioni circa la modalità di ereditarietà di un tratto genetico ma non fornisce informazioni circa il/i gene/i coinvolto/i. La localizzazione cromosomica di un gene di maggiore effetto per un tratto come la suscettibilità alla AgP può essere determinato attraverso l'analisi di linkage. (Boughman et al. 1986, Hart et al. 1993, Li et al. 2004b, Scapoli et al. 2005a). Nell'insieme tali dati, attualmente, sostengono l'esistenza di una eterogeneità genetica nella forma localizzata di AgP e in forme distinte di AgP. Pertanto, è attualmente accettato che sebbene studi genetici autorevoli sulla AgP sostengano l'esistenza di un gene di maggiore effetto, è improbabile che tutte le forme di AgP siano dovute alla stessa variante genetica (Hart 1996, Loos et al. 2005).

Uno studio recente ha fornito una ulteriore linea di evidenza per una componente genetica alla AgP, mostrando che misure quantitative dei parametri parodontali mostrano livelli sostanziali di ereditarietà nei pazienti affetti da AgP (Diehl et al. 2005). Data l'attuale conoscenza che i soggetti affetti da AgP presentano una prevalenza elevata di difetti funzionali dei PMN e che hanno elevati livelli di produzione di mediatori dell'infiammazione in risposta ai lipopolisaccaridi batterici, sono stati proposti diversi loci genici per spiegare una aumentata suscettibilità alla AgP (Hart 1996).

Un certo numero di polimorfismi genici, tra i quali quelli per interleuchina-1, interleuchina-4, interleuchina-10, il fattore di necrosi tumorale α , i recettori Fc, l'antigene leucocitario umano, il recettore per la vitamina D e il recettore per N-formilpeptide, sono stati indagati come potenziali marker per l'aumentata suscettibilità alla AgP. È stata eseguita una serie di studi per valutare se specifici polimorfismi in questi geni candidati sono associati con la AgP (Shapira et al. 2005, Loos et al. 2005). Sono state osservate associazioni significative per i geni che codificano per proteine associate alla funzione dei neutrofili (Fu et al. 2002, Loos et al. 2003, Kaneko et al. 2004, de Souza & Colombo 2006), all'infiammazione e all'abilità dell'ospite di fronteggiare componenti batteriche come le endotossine (Suzuki et al. 2004, Scapoli et al. 2005 a,b, Brett et al. 2005, Noack et al. 2006), e con l'omeostasi del tessuto

connettivo (Suzuki et al. 2004, Park et al. 2006, Soedarsono et al. 2006). In genere, sono stati presentati risultati discordanti sulla relazione tra polimorfismi genici indagati e la suscettibilità alla AgP in differenti popolazioni. Inoltre, la validità delle conclusioni della maggior parte degli studi citati soffre di una limitata numerosità campionaria, lo studio di un singolo polimorfismo o di pochi polimorfismi specifici in un gene, la mancata correzione per l'influenza dell'etnia e dei fattori ambientali (es. fumo) (Tonetti & Claffey 2005).

Oltre ai geni di maggior effetto che possono determinare la suscettibilità alla AgP, altri geni possono agire come geni modificatori e influenzare l'espressione clinica della malattia. In questo senso, è stato dimostrato un particolare interesse in merito all'impatto del controllo genetico sulla risposta anticorpale a specifici batteri associati alla AgP, A.a. in particolare. Questi studi hanno dimostrato che l'abilità di produrre livelli elevati di anticorpi specifici dipende dalla razza ed è probabilmente protettiva (Gunsolley et al. 1987, 1988). Questo è stato dimostrato essere sotto il controllo genetico come un tratto co-dominante, indipendente dal rischio per la AgP. Negli individui suscettibili alla AgP, quindi, l'abilità di produrre elevati titoli anticorpali (IgG₂ in particolare) può essere protettiva e prevenire l'estensione della patologia alla forma generalizzata (Diehl et al. 2003).

1.6. Polimorfismi genici dell'interleuchina-1 nella parodontite aggressiva

L'interleuchina-1 gioca un ruolo importante nella parodontite. L'interleuchina-1 α e l'interleuchina-1 β , due molecole funzionalmente simili, sono state riconosciute come citochine pro-infiammatorie di importanza fondamentale. L'interleuchina-1ra è una molecola anti-infiammatoria non segnalante che compete per il legame al recettore con l'interleuchina-1 α e l'interleuchina-1 β . Il contributo complessivo dell'interleuchina-1 alla risposta pro-infiammatoria dipende dal bilanciamento di queste tre molecole. Il cluster genico dell'interleuchina-1 mostra una elevata frequenza di polimorfismi, che risultano in una iper-espressione delle citochine della famiglia dell'interleuchina-1, e sono associate con una serie di disordini autoimmunitari e patologie infiammatorie.

Nel 1997, Kornman et al. (1997) hanno identificato una associazione tra la severità della parodontite cronica e dei polimorfismi di interleuchina-1A⁻⁸⁸⁹ e interleuchina-1B⁺³⁹⁵⁴, con un odd ratio di 6.8 (intervallo di confidenza 95%: 1.01 – 45.95). Questo studio ha suscitato grande interesse per i polimorfismi genici nelle malattie parodontali. Riguardo alla relazione tra il genotipo dell'interleuchina-1 e la suscettibilità alla AgP, sono stati presentati risultati discordanti in differenti ceppi etnici, inclusi i Caucasiche-Americani, gli Afro-Americani, gli

Europei-Caucasici e gli Asiatici.

I polimorfismi in interleuchina-1 β ⁺³⁹⁵⁴ sono stati riportati essere associati con la AgP in diversi studi (Diehl et al. 1999, Parkhill et al. 2000, Quappe et al. 2004, Scapoli et al. 2005a). La frequenza dell'allele 1 di interleuchina-1 β ⁺³⁹⁵⁴ è stato riscontrato più frequentemente in pazienti con AgP sia in popolazioni Afro-Americane che Caucasiche (Diehl et al. 1999, Parkhill et al. 2000), mentre l'allele 2 è stato osservato più spesso in pazienti Cileni affetti da AgP (Quappe et al. 2004). Anche la combinazione dell'allele 1 dell'interleuchina-1 β ⁺³⁹⁵⁴ con il fumo o l'allele 1 VNTR interleuchina-1RN sono stati associati alla AgP (Parkhill et al. 2000). Una differenza significativa nella distribuzione del genotipo di interleuchina-1 β ⁺³⁹⁵⁴ è stata riportata in una popolazione Brasiliana comparando il gruppo affetto da AgP con il gruppo affetto da parodontite cronica (Moreira et al. 2005). Tuttavia, questi risultati non sono stati confermati da altri studi sui polimorfismi di interleuchina-1 nella AgP dei Caucasici (Hodge et al. 2001, Roger set al. 2002), negli Afro-Americani (Walker et al. 2000), nei Nord-Europei (Gonzales et al. 2003), nei Brasiliani (Trevilatto et al. 2002), nei Giapponesi (Tai et al. 2002), nei Thailandesi (Anusaksathien et al. 2003) e nei Cinesi (Li et al. 2004). Nella popolazione Afro-Americana, l'allele 1 di interleuchina-1 β ⁺³⁹⁵⁴ è stato trovato essere portato da più del 99% del gruppo controllo e dal 100% dei pazienti giovani con parodontite localizzata. Pertanto, in questa popolazione, i polimorfismi IL-1 β ⁺³⁹⁵⁴ fornirebbero limitate informazioni diagnostiche o predittive per la LAP (Walker et al. 2000). In maniera simile, in una popolazione Thailandese, la distribuzione del genotipo omozigote dell'allele di interleuchina-1 β ⁺³⁹⁵⁴ era del 97.6%, valore che ha reso l'interleuchina-1 β ⁺³⁹⁵⁴ inadatta per l'utilizzo come marker genetico per la AgP (Anusaksathien et al. 2003).

Altri polimorfismi genici per l'interleuchina-1, inclusi interleuchina-1A⁻⁸⁸⁹, interleuchina-1RN VNTR, interleuchina-1A⁺⁴⁸⁴⁵ e interleuchina-1B⁻⁵¹¹, sono stati studiati da diversi gruppi in varie etnie (Diehl et al. 1999, Parkhill et al. 2000, Walker et al. 2000, Hodge et al. 2001, Rogers et al. 2002, Tai et al. 2002, Trevilatto et al. 2002, Anusaksathien et al. 2003, Gonzales et al. 2003, Li et al. 2004a, Quappe et al. 2004, Scapoli et al. 2005a). I risultati emersi sono contraddittori ed è estremamente difficile, se non impossibile, trarre alcuna conclusione sull'associazione del gene dell'interleuchina-1 con la AgP. Oltre alle differenze etniche, sembra che fattori confondenti, quali il fumo, il sesso o l'età, complichino complessivamente la studio del potenziale ruolo dei polimorfismi genici dell'interleuchina-1 nella AgP.

Recentemente, uno studio caso-controllo ha valutato 10 SNPs nel cluster genico dell'interleuchina-1 per l'associazione con la AgP (Fiebig et al. 2008). Lo studio ha incluso 415 pazienti Europei di razza caucasica affetti da AgP e 874 soggetti parodontalmente sani come

controlli. Gli SNPs analizzati hanno incluso i geni di interleuchina-1 α e interleuchina-1 β (7 SNPs), il gene CKAP2L che codifica per la proteina 2 associata al citoscheletro (2 SNPs), il gene per interleuchina-1 α (1 SNP). I risultati dello studio non sembrano confermare l'esistenza di una associazione tra i geni indagati e la AgP (Fiebig et al. 2008).

La Tabella I.2 riporta in ordine cronologico gli studi di associazione tra polimorfismi genici del cluster dell'IL-1 e AgP.

Riferimento bibliografico	Patologia	Geni indagati	Risultati dello studio
Diehl et al. 1999	parodontite a insorgenza precoce localizzata parodontite a insorgenza precoce generalizzata	interleuchina-1A interleuchina-1B	contributo significativo ma non esclusivo alla AgP dei polimorfismi genici indagati per interleuchina-1
Walker et al. 2000	parodontite giovanile localizzata	interleuchina-1A interleuchina-1B	nessuna associazione
Hodge et al. 2001	parodontite a insorgenza precoce generalizzata	interleuchina-1A interleuchina-1B	nessuna associazione
Rogers et al. 2002	parodontite a insorgenza precoce	interleuchina-1A interleuchina-1B interleuchina-1RA	nessuna associazione
Trevilatto et al. 2002	parodontite aggressiva	interleuchina-1A interleuchina-1B interleuchina-1RA	nessuna associazione
Tai et al. 2002	parodontite a insorgenza precoce generalizzata	interleuchina-1A interleuchina-1B interleuchina-1RA	associazione positiva per il polimorfismo genico VNTR di IL-1ra
Gonzales et al. 2003	parodontite aggressiva	interleuchina-1A interleuchina-1B	nessuna associazione
Quappe et al. 2004	parodontite aggressiva	interleuchina-1A interleuchina-1B	associazione positiva per il polimorfismo genico +3954 di IL-1b
Li et al. 2004a	parodontite aggressiva generalizzata	interleuchina-1A interleuchina-1B interleuchina-1RA	associazione positiva per il polimorfismo genico +4845 di IL-1a e per il polimorfismo genico -511 di IL-1b
Scapoli et al. 2005a	parodontite aggressiva generalizzata	interleuchina-1A interleuchina-1B interleuchina-1RA	associazione positiva per il polimorfismo genico +3953 di IL-1b e il polimorfismo genico VNTR di IL-1ra
Moreira et al. 2005	parodontite aggressiva	interleuchina-1B	nessuna associazione
Li et al. 2005	parodontite aggressiva	interleuchina-1A interleuchina-1B interleuchina-1RA	associazione positiva per il polimorfismo genico +4845 di IL-1a
Brett et al. 2005	parodontite aggressiva	interleuchina-1A interleuchina-1B interleuchina-1RA	associazione positiva per il polimorfismo genico +3954 di IL-1b

Berdeli et al. 2006	parodontite aggressiva generalizzata	interleuchina-1RA	associazione positiva per l'allele IL-1RN2
Sakellari et al. 2006	parodontite aggressiva	interleuchina-1A interleuchina-1B interleuchina-1RA	nessuna associazione
Drożdżik et al. 2006	parodontite aggressiva generalizzata	interleuchina-1B	nessuna associazione
Moreira et al. 2007	parodontite aggressiva	interleuchina-1A	nessuna associazione
Maria de Freitas et al. 2007	parodontite aggressiva generalizzata	interleuchina-1A	nessuna associazione
Ren et al. 2008	parodontite aggressiva	interleuchina-1A interleuchina-1B interleuchina-1RA	associazione positiva per il polimorfismo genico -511 di IL-1b
Guzeldemir et al. 2008	parodontite aggressiva localizzata	interleuchina-1A interleuchina-1B	associazione positiva per il polimorfismo genico +4845 di IL-1a e per il polimorfismo genico +3954 di IL-1b
Fiebig et al. 2008	parodontite aggressiva	interleuchina-1A interleuchina-1B interleuchina-1RA CKAP2L	nessuna associazione

Tabella I.2. Attuale evidenza scientifica riguardante la associazione del cluster genico dell'interleuchina-1 con la parodontite aggressiva.

I.7. Altri polimorfismi genici nella parodontite aggressiva

Polimorfismi genici dell'interleuchina-4

L'interleuchina-4 è considerata una citochina anti-infiammatoria, dal momento che possiede importanti funzioni nella modulazione della cellule B e nella regolazione della funzione macrofagica. Alterazioni del gene per interleuchina-4 possono aumentare la severità della malattia attraverso la down-regolazione della produzione di interleuchina-4. I polimorfismi genici dell'interleuchina-4 sono stati indagati in differenti etnie. Risultati negativi sono stati riportati sull'associazione tra i polimorfismi genici dell'interleuchina-4 con il rischio di AgP (Gonzales et al. 2004, Pontes et al. 2004, Michel et al. 2001).

Polimorfismi genici dell'interleuchina-10

L'interleuchina-10 è una citochina anti-infiammatoria, che può modulare l'espressione della malattia nella parodontite cronica. I polimorfismi del *promoter* del gene dell'interleuchina-10 sembrano influenzare la regolazione della sua espressione. Diversi studi sono stati condotti in diverse popolazioni per indagare l'associazione del gene dell'interleuchina-10 con la AgP, ma nessun risultato positivo è stato riportato (Kinane et al. 1999, Yamazaki et al. 2001, Gonzales et al. 2002).

Polimorfismi genici del fattore di necrosi tumorale- α

Il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α) è una potente citochina pro-infiammatoria che è in grado di indurre la distruzione tissutale e il riassorbimento osseo. Kinane et al. (1999) valutarono per primi un locus del gene per TNF- α in 77 pazienti affetti da EOP nella Scozia occidentale e fallirono nel rinvenire una correlazione significativa. Successivamente, molti ricercatori hanno indagato la possibile associazione tra il polimorfismo nel gene per TNF- α ⁻³⁰⁸ e la EOP. Tale polimorfismo nella regione del promotore del gene sembra avere un'influenza nella produzione di TNF- α , e i monociti dei pazienti con EOP localizzata secernono livelli elevati di TNF- α . Sebbene sia stata osservata una frequenza più elevata dell'allele 2 del TNF- α nei pazienti Caucasici con parodontite cronica rispetto a pazienti sani (Kornman & Di Giovine 1998), e questa differenza sia stata correlata alla severità della parodontite cronica (Galbraith et al. 1999), i polimorfismi genici del TNF- α non sembrano essere associati alla AgP in differenti etnie (Endo et al. 2001, Shapira et al. 2001, Trevilatto et al. 2002, Perez et al. 2004).

Polimorfismi genici dei recettori Fc α/γ

I recettori Fc γ giocano un ruolo cruciale nella difesa dell'ospite contro l'infezione batterica

legando le risposte umorali e cellulo-mediate. I geni che codificano gli allotipi con una diminuita attività sono stati suggeriti come potenziali fattori di rischio per patologie infettive ed infiammatorie. È stata indagata la associazione tra il polimorfismo genico del recettore Fc γ e la AgP. Sebbene i risultati varino a seconda degli studi, sembra che il gene codificante per il recettore Fc γ possa essere coinvolto nella suscettibilità alla AgP.

Le frequenze del genotipo IIIB NA1/NA1 del recettore Fc γ erano significativamente più elevate nella AgP rispetto ai controlli sani in una popolazione Cinese (Fu et al. 1999, Zhang et al. 2003a). Il recettore Fc γ IIIB NA1/NA1 può essere un indicatore di rischio per la AgP. La frequenza dell'allele IIA R131 del recettore Fc γ è stata trovata maggiore nella forma generalizzata di AgP rispetto alla parodontite cronica in una popolazione Taiwanese (Chung et al. 2003).

In una popolazione Giapponese, è stata osservata una significativa prevalenza dell'allele IIIB NA2 del recettore Fc γ nei pazienti affetti da EOP generalizzata. Sono state riscontrate differenze significative nella distribuzione dei genotipi IIIB del recettore Fc γ e del genotipo composito comprendente il recettore Fc γ IIIB NA2 e il recettore Fc γ IIIA 158F tra i pazienti affetti da EOP generalizzata e pazienti sani (Kobayashi et al. 2000). Un altro studio ha riportato una differenza significativa nella distribuzione dell'allele IIIB NA2 del recettore Fc γ in un gruppo di pazienti con AgP quando questi sono stati confrontati con un gruppo controllo, ma nessuna differenza nelle distribuzioni degli alleli/genotipi IIA e IIIA del recettore Fc γ (Yasuda et al. 2003). È stata osservata una differenza significativa nella distribuzione del marcatore Fc γ IIB Ile232Thr tra la AgP e i gruppi controllo, con maggior prevalenza di di 232T nel gruppo AgP. Yoshihara et al. (Yoshihara et al. 2001) hanno riportato una forte associazione tra la EOP generalizzata e il genotipo composito del recettore per la vitamina D e il recettore Fc γ IIIB.

Uno studio nei soggetti Caucasic del Nord Europa ha indicato che le frequenze dell'allele IIIA V158 del recettore Fc γ , dell'allele IIA H131 del recettore Fc γ e del genotipo IIA H/H131 del recettore Fc γ sono significativamente più elevate nei pazienti affetti da AgP rispetto ai controlli (Loos et al. 2003). Inoltre, i pazienti con il genotipo IIA H/H131 del recettore Fc γ mostrano una perdita ossea radiograficamente determinata più severa rispetto a pazienti con altri genotipi IIA del recettore Fc γ .

Tuttavia, in una popolazione Afro-Americana, invece dei genotipi IIA 131R/H del recettore Fc γ o IIIA 158V/F del recettore Fc γ , è stata osservata nei pazienti una maggior frequenza (statisticamente significativa) dell'allele IIIB NA2 del recettore Fc γ e del genotipo IIIB NA2/NA2 del recettore Fc γ nei pazienti con forma localizzata di AgP rispetto ai controlli (Fu et al. 2002).

Kaneko et al. (Kaneko et al. 2004) hanno confrontato la distribuzione di un polimorfismo (A/G in posizione I +324) tra 46 pazienti Giapponesi affetti da AgP, 80 controlli sani appaiati della stessa razza e 59 soggetti Caucasici sani. Nessun effetto della razza è stato osservato nelle distribuzioni del genotipo tra controlli sani Giapponesi e Caucasici. La presenza dell'allele A era più frequente nei pazienti con AgP (65.2%) rispetto ai controlli sani (42.5%) (OR= 2.54). I leucociti polimorfonucleati dal sangue periferico e dal fluido crevicolare gengivale hanno mostrato una diminuita attività fagocitaria nei confronti dei batteri parodontopatogeni nei pazienti con genotipo AA confrontati con i pazienti con genotipo GG. Questi risultati hanno suggerito che il polimorfismo genico del sito per il ligando I del recettore Fc α possa essere associato alla suscettibilità alla AgP in individui Giapponesi.

Polimorfismi genici dell'antigene leucocitario umano (HLA)

L'antigene leucocitario umano (HLA) gioca un importante ruolo nella regolazione e nella mediazione di diversi processi immunitari. È stata suggerita una associazione tra i geni dell'HLA e diverse patologie, in particolare in alcune patologie auto-immunitarie. Se implicato nelle malattie parodontali, il sistema HLA può essere associato ad una scarsa o assente capacità di rispondere agli antigeni batterici, che potrebbe risultare nella progressione della malattia.

È stata fornita evidenza a sostegno del coinvolgimento dell'HLA A9 nella suscettibilità alla parodontite rapidamente progressiva, mentre A10 sembra giocare un ruolo nella resistenza alla malattia (Amer et al. 1988). I siti atipici di restrizione *Bam*III e *Eco*R1 e una sequenza ripetuta di 41 nucleotidi nell'introne prima del terzo esone del gene DQB dell'HLA, sono stati indicati come utili marker genetici per la EOP potendo influenzare le reazioni immunitarie, come il riconoscimento dell'antigene (Takashiba et al. 1994). Tuttavia, un altro studio ha indicato l'assenza di differenze statisticamente significative tra casi e controlli rispetto alla presenza del sito *Bam*HI in una popolazione di Europei-Caucasici con EOP (Hodge et al. 1999). Ohyama et al. (1996) hanno indagato gli alleli di classe II dell'HLA in individui Giapponesi trovando che la molecola DQB1 può giocare un ruolo cruciale nella patogenesi della EOP. La suscettibilità alla EOP può essere determinata da una affinità di legame tra il peptide e HLA - antigeni DQ (Ohyama et al. 1996). Inoltre, individui Giapponesi con il genotipo DRB1*1501-DQB1*0602 dell'HLA, che esprime acido aspartico in posizione 57 e glicina in posizione 70 sulla catena β DQ ed è suggerito essere in grado di legarsi a determinati antigeni batterici, hanno mostrato una risposta accelerata delle cellule T contro proteine di membrana di *Porphyromonas Gingivalis* e aumentata suscettibilità alla EOP (Takashiba et al. 1999).

I risultati di Shapira et al. (1994a) sono in accordo con studi precedenti, nei quali A9 e B15

sono stati associati alla EOP generalizzata, ma non con la forma localizzata della malattia. Gli antigeni leucocitari umani A24, A9 e DR4 sono stati riportati in associazione alla parodontite giovanile e alla parodontite rapidamente progressiva (Firatli et al. 1996).

In una popolazione Tedesca, una frequenza significativamente più elevata dell'HLA DRB1*13 e una frequenza significativamente inferiore dell'HLA DRBblank* (non-DRB3/4/5) sono state riportate in pazienti con AgP (Machulla et al. 2002). Inoltre, le femmine affette da AgP hanno mostrato anche un livello aumentato di HLA A*68/69 e un livello diminuito di DRBblank* (non-DRB3/4/5*) e DQB1*05-positivo (Reichert et al. 2002). Al fine di chiarire la relazione di particolari combinazioni di marker dell'HLA con la suscettibilità/resistenza alla AgP, nella stessa popolazione è stata valutata l'incidenza degli omozigoti, eterozigoti e degli aplotipi per l'HLA (Stein et al. 2003). La combinazione dell'HLA A*02 e dell'HLA A*03 era significativamente diminuita nella AgP, e le associazioni positive note per i marker HLA A*68/69 (A28) e HLA DRB1*04 sono state confermate dalla associazione positiva degli aplotipi HLA A*68/69:Cw*07:B*18 con AgP.

Sebbene alcune patologie siano state correlate positivamente ad alcuni loci specifici dell'antigene leucocitario umano, ad oggi è difficile identificare i tipi di antigene leucocitario umano che possano predisporre i soggetti alla AgP.

Polimorfismi genici del recettore per la vitamina D

I polimorfismi genici del recettore per la vitamina D sono associati con i parametri di omeostasi dell'osso e con le patologie nelle quali la perdita ossea è un segno patognomonico, in particolare l'osteoporosi. È stato indagato un polimorfismo Taq I nell'esone 9 del gene del recettore per la vitamina D poiché potrebbe influenzare la funzione immunitaria e il riassorbimento osseo. L'allele t in questo sito è stato riportato in associazione a diminuzione nella densità minerale dell'osso e nell'incidenza dell'osteoporosi. È stata riportata una associazione significativa tra il meno frequente allele t e la forma localizzata di EOP (Hennig et al. 1999). Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nella distribuzione genotipica o nelle frequenze alleliche quando è stata inclusa nella analisi di associazione la forma generalizzata di EOP.

Le frequenze del genotipo Tt e dell'allele t che sono state registrate erano significativamente maggiori nei pazienti con EOP rispetto ai controlli sani in una popolazione Cinese (Tachi et al. 2001, Sun et al. 2002). Un campione più ampio della stessa popolazione non ha modificato questi risultati ed è stata suggerita una forte associazione tra pazienti AgP di sesso femminile e il genotipo Tt.

In una popolazione Giapponese, la frequenza di non portatori del recettore B per la vitamina D era più bassa, ma non statisticamente significativa, in pazienti con EOP generalizzata. È stata trovata una forte associazione tra EOP generalizzata e il genotipo composito IIIB del recettore per la vitamina D – recettore Fc γ (Yoshihara et al. 2001).

Polimorfismi genici del recettore N-formilpeptide

Sono stati riportati un certo numero di difetti cellulari nei neutrofili polimorfonucleati, inclusa la diminuita chemiotassi, l'alterata produzione di superossidi, la diminuita mobilizzazione di Ca^{2+} e la diminuita fagocitosi, nei pazienti affetti da AgP. Il recettore N-formilpeptide è coinvolto nell'attivazione e nella conseguente risposta a determinati stimoli chemiotattici. Le alterazioni di due codoni, uno nel secondo dominio trans-membrana (329T/C) e uno nel secondo loop intra-cellulare (378C/G) del recettore N-formilpeptide, sono stati riportati in associazione con la AgP in pazienti Afro-Americani (Gwinn et al. 1999). I due polimorfismi sembrano interferire con l'accoppiamento e la chemiotassi relativi alla proteina G, ma con differenti livelli di influenza (Seifert & Wenzel-Seifert 2001, Jones et al. 2003). L'analisi della sequenza di un intervallo di 363-bp nel gene del recettore N-formilpeptide non ha individuato né 329T/C né 378C/G in un gruppo etnicamente differente di casi e controlli (Zhang et al. 2003b). Sono stati identificati due SNP (568A/T, 576T/C/G) localizzati nel secondo loop extra-cellulare del gene del recettore N-formilpeptide, risultati significativamente associati con il fenotipo della AgP nei pazienti Afro-Americani. I due marcatori mostrano tre aplotipi predominanti, ciascuno associato con un differente rischio per la patologia.

Recentemente, sono stati identificati i due polimorfismi singoli - 289C/A e 301G/C – nel frammento 370-bp del gene del recettore N-formilpeptide in soggetti Cinesi, ma non è stata trovata alcuna differenza statisticamente significativa nella distribuzione genotipica e allelica tra pazienti con AgP, parodontite cronica e controlli sani (Liu et al. 2001, Zhu & Meng 2002). Gli SNP nel gene del recettore N-formilpeptide sembrano non essere associati alla suscettibilità alla AgP nella popolazione Cinese.

Altri polimorfismi genici

Le metalloproteinasi (MMP)-1 e MMP-3 hanno un ruolo determinante nel rimodellamento del tessuto connettivo e nei processi distruttivi legati alla parodontite. Un'inserzione/delezione di guanina in posizione 1607 della MMP-1, un'inserzione/delezione di adenina in posizione 1171 della MMP-3, sembrano influenzare la trascrizione genica. In uno studio su coorte Giapponese Itagaki et al. (2004) hanno riportato che questi due polimorfismi non hanno

mostrato differenze significative nel genotipo, nelle frequenza degli alleli, e nelle frequenze aplotipiche nei pazienti con AgP e nei controlli sani. I dati non supportano l'ipotesi che i polimorfismi genici dei promoter dei geni di MMP-1 e MMP-3 influenzino la suscettibilità alla parodontite in soggetti Giapponesi.

La lattoferrina è una glicoproteina di 80 kDa in grado di legarsi al ferro ed è caratterizzata da un'attività batteriostatica come risultato della sua abilità di chelare il ferro, essenziale per la crescita microbica. Inoltre, la lattoferrina possiede attività antibatteriche, antimicotiche, antivirali, antitumorali, antinfiammatorie e immuno-regolatorie che non sono legate al ferro, ma che sono mediate dal terminale N altamente caricato della proteina. Esiste un polimorfismo di transizione A/G nell'esone 1 del gene della lattoferrina che risulta in uno scambio Lys/Arg alla posizione 29 nell'elica α del terminale N del gene della lattoferrina. Le due varianti della lattoferrina sono funzionalmente differenti, e le frequenza dei genotipi sono significativamente diverse in pazienti con AgP localizzata e soggetti sani (Velliyagounder et al. 2003).

Poiché la AgP è caratterizzata da una rapida perdita di osso alveolare, è stato ipotizzato che alcuni fattori associati con il metabolismo osseo possano contribuire alla suscettibilità alla malattia. I polimorfismi genici del recettore α dell'estrogeno sono associati ad alterazioni della densità minerale dell'osso e all'osteoporosi. In una popolazione Cinese, la frequenza del genotipo XX del gene XbaI del recettore α dell'estrogeno era significativamente maggiore in pazienti affetti da parodontite cronica rispetto a soggetti sani, ma nessuna differenza è stata individuata tra soggetti con AgP e soggetti sani (Zhang et al. 2004a).

La calprotectina (S100A8/S100A9), che costituisce circa la metà delle proteine citoplasmatiche dei neutrofilii polimorfonucleati, è associata con l'infiammazione parodontale. Studi hanno rivelato la sua attività antibatterica e antimicotica, di induzione dell'apoptosi e chemiotattica. La calprotectina gioca anche un ruolo prominente nel *trafficking* leucocitario e nel metabolismo dell'acido arachidonico. I polimorfismi, putativamente coinvolti nell'iper-espressione di calprotectina, potrebbero associarsi alla suscettibilità parodontite. Dopo lo screening dei polimorfismi nella regione del gene S100A8, è stata condotta un'analisi di associazione tra un marcatore, localizzato 94 bp dal codone iniziale ATG del gene S100A8, e la AgP. Tuttavia, le distribuzioni dei genotipi/alleli non erano significativamente diverse tra pazienti con AgP e controlli sani (Li et al. 2004b).

Suzuki et al. (2004) hanno codificato 310 SNPs in 125 geni candidati in 134 pazienti con AgP e 125 soggetti sani. La valutazione dell'associazione ha rivelato differenze significative tra la AgP e marcatori in geni multipli. Questi geni comprendevano sia mediatori dell'infiammazione (il trasduttore del segnale dell'interleuchina-6 e la prostaglandina-D2

sintetasi) sia fattori strutturali dei tessuti parodontali (collagene tipo IV α 1, collagene tipo I α 1 e cheratina 23).

I recettori *toll-like* interagiscono con i patogeni e inducono la produzione di citochine, che possono causare e accelerare il decorso della patologia. Tuttavia, nessuna differenza è stata individuata nella presenza di Asp299Gly e Thr399Ile del recettore toll-like-4, o di Arg743Gln del recettore *toll-like-2*, tra pazienti con AgP e controlli (Schroeder et al. 2005).

In conclusione, considerando quanto attualmente disponibile in letteratura, sembra ragionevole ammettere che la AgP, patologia multifattoriale, abbia una base genetica complessa. Nonostante sia stata ampiamente analizzata l'associazione tra differenti polimorfismi genici con la AgP, non è stato a tutt'oggi possibile identificare alcun singolo gene di maggiore effetto con ruolo patogenetico determinante nei pazienti con AgP appartenenti a differenti popolazioni etniche. I polimorfismi genici possono influenzare l'insorgenza della AgP con un meccanismo complesso, agendo come varianti genetiche in associazione a fattori di rischio ambientali. Verosimilmente la aumentata suscettibilità individuale alla AgP può essere causata dall'effetto combinato di geni multipli che interagiscono con fattori ambientali (es. patogeni parodontali dotati di alta virulenza, fumo, ecc.) e fattori predisponenti locali.

CAPITOLO II

- Scopo dello studio -

L'obiettivo principale del presente studio è stato di quello di identificare geni associati nella suscettibilità individuale alla Parodontite Aggressiva (AgP). Tale identificazione è stata basata su una metodologia di studio caso controllo condotto su due popolazioni di individui parodontalmente sani (controlli) e affetti da AgP (casi), derivanti da due coorti di origine ferrarese e napoletana, rispettivamente.

La presente ricerca si è svolta nell'ambito di un progetto più generale, avviato nel 2002, che si è proposto di studiare la struttura della regione cromosomica 2q13-14 nella quale mappano i geni del cluster dell'Interleuchina 1 (IL-1). L'interesse per tale regione cromosomica deriva dal fatto che esistono numerose evidenze che suggeriscono una associazione tra i polimorfismi dei geni per IL-1 e diverse patologie su base infiammatoria e/o autoimmune, con una natura causale di tipo multifattoriale e una componente genetica di tipo poligenico, incluse le Gengiviti e le Parodontiti (Cronica e Aggressiva).

Per lo studio delle patologie complesse come la AgP, una dettagliata conoscenza del pattern di Linkage Disequilibrium (LD) di una regione candidata nella popolazione di interesse è considerata un importante pre-requisito per un efficace approccio di mappaggio genico eseguito su base popolazionistica, come nel caso degli studi caso-controllo (De La Vega et al. 2005, Maniatis et al. 2007).

In base alle considerazioni sopra riportate, gli obiettivi specifici del presente studio sono stati:

1) Caratterizzare molecolarmente la regione cromosomica 2q13-14 attraverso la costruzione di una mappa di LD ad alta densità di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs).

Diversi studi, infatti, hanno dimostrato che la distanza in kilobasi sulla quale si estende l'associazione allelica varia in relazione alle diverse popolazioni, alle differenti regioni cromosomiche e alle diverse classi di marcatori polimorfici utilizzati. Pertanto, la scelta di quali e quanti marcatori utilizzare per studiare una regione candidata deve essere basata su un approfondito studio del LD delle regioni candidate di interesse (De La Vega et al. 2005).

Per la messa a punto della strategia più appropriata per l'identificazione di geni potenzialmente coinvolti nella suscettibilità individuale all'AgP, la costruzione di una mappa di LD ha rappresentato il primo step essenziale. Per la costruzione di tale mappa

sono stati selezionati, tra le migliaia disponibili nel database HapMap, 60 SNPs già validati nella popolazione Caucasica, con frequenze della variante rara superiore al 10% ed equamente spaziate, in grado di coprire in modo relativamente omogeneo la regione di 1.2 Mb contenente il cluster delle IL-1 localizzato all'interno del segmento cromosomico 2q13-14.1.

2) Ricercare geni candidati per la AgP.

Come già descritto nella Introduzione, tra i geni candidati per le Parodontiti, in generale, e per la AgP, in particolare, quelli maggiormente indagati negli studi di associazione e per cui persistono tutt'ora controversie derivanti da dati contrastanti, sono i geni relativi al cluster della IL-1.

Nel corso del 2002 l'intera regione del cromosoma 2 che comprende il cluster dell'IL-1 nell'uomo è stata sequenziata (Nicklin et al. 2002) e la mappa fisica dei 9 geni (IL-1A, IL-1B, IL-1F7, IL-1F9, IL-1F6, IL-1F8, IL-1F5, IL-1F10, IL-1RN) appartenenti al cluster IL-1, è stata perfettamente ricostruita. Durante il sequenziamento della regione, sono stati individuati diversi siti polimorfici, sparsi in modo abbastanza uniforme nel segmento cromosomico (Taylor et al. 2002).

Secondo obiettivo del presente studio, pertanto, è stato quello di focalizzare l'attenzione sulla regione cromosomica 2q13-14 che comprende il cluster genico dell'IL-1, per verificare l'esistenza di una associazione tra la AgP e marcatori genici localizzati in diversi geni codificanti per le Interleuchine, coinvolte nel processo infiammatorio placca-associato.

Il disegno sperimentale scelto per analizzare il coinvolgimento della regione candidata 2q13-14 nella suscettibilità genetica alla AgP è stato lo studio caso-controllo. A tal riguardo si è proceduto alla caratterizzazione genetica di 216 individui, 95 casi e 121 controlli, reclutati in 2 differenti Centri: 56 casi e 61 controlli sono stati reclutati presso il Centro di Ricerca e Servizi per lo Studio delle Malattie Parodontali dell'Università di Ferrara, mentre 39 casi e 60 controlli sono stati reclutati presso il Dipartimento di Discipline Odontostomatologiche, Ortodontiche e Chirurgiche della Seconda Università di Napoli.

L'analisi della potenziale associazione tra la regione 2q13-14 e la suscettibilità alla AgP nelle 2 coorti (sottopopolazioni) di studio è stata effettuata mediante l'applicazione di specifici programmi statistici che hanno permesso, per tutti i marcatori considerati, di:

1. testare la presenza di stratificazione (omogeneità) tra le due popolazioni in oggetto (Ferrara, Napoli), in modo da poterle considerare, nelle analisi successive, come un unico campione, ottenendo così un incremento del potere statistico;
2. valutare se le distribuzioni dei genotipi per i marcatori genetici utilizzati, nei casi e nei controlli fossero in accordo con la legge di Hardy-Weinberg;
3. verificare l'esistenza di una diversa distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche nei casi e nei controlli, per ciascun polimorfismo, attraverso il calcolo del χ^2 e dell'Odds Ratio (O.R.)
4. effettuare una analisi aplo-tipica sui dati genotipici ottenuti;
5. approfondire lo studio del LD nella regione candidata 2q13-14, costruendo con i 60 SNPs selezionati una mappa di unità di LD (LDUs).

CAPITOLO III

- Materiali & Metodi -

III.1. Popolazione analizzata

La collaborazione tra il Dipartimento di Biologia Evolutiva dell'Università di Ferrara ed il Centro di Ricerca e Servizi per lo Studio delle Malattie Parodontali dell'Università di Ferrara e il Dipartimento di Discipline Odontostomatologiche, Ortodontiche e Chirurgiche della Seconda Università di Napoli ha permesso di raccogliere 216 campioni biologici (sangue o saliva), che hanno rappresentato il materiale utilizzato nel presente lavoro. I 95 pazienti affetti da AgP (29 maschi and 66 femmine, età media: $43,6 \pm 7,7$) a cui è stato effettuato il prelievo, sono stati suddivisi in due sottogruppi in relazione all'area di provenienza: il primo sottogruppo era rappresentato da 56 pazienti (40 femmine e 16 maschi, età media $39,4 \pm 5,0$), nati e residenti a Ferrara, il secondo sottogruppo era costituito da 39 pazienti nati e residenti a Napoli (26 femmine e 13 maschi, età media $47,8 \pm 8,0$). Tutti i soggetti appartenenti ai due sottogruppi non erano imparentati tra loro e risultavano affetti da una forma di AgP generalizzata in base alle diagnosi effettuate presso i rispettivi centri ospedalieri di provenienza. 121 soggetti (60 maschi e 61 femmine, età media: $30,1 \pm 9,0$) sono stati utilizzati come controllo. I due gruppi reclutati come controlli, provenienti da Ferrara e Napoli, erano costituiti rispettivamente da 61 soggetti (32 femmine e 29 maschi, età media $29,9 \pm 12,6$) e 60 soggetti (29 femmine e 31 maschi, età media $30,2 \pm 10,1$). I soggetti del gruppo controllo presentavano le seguenti caratteristiche: clinicamente sani, senza relazioni di parentela, appaiati per sesso con i probandi, residenti da più generazioni nelle rispettive aree di appartenenza e di età superiore ai 40 anni, parodontalmente sani. Lo stato di salute parodontale era stato verificato mediante apposita valutazione clinica, con raccolta dei dati biometrici di interesse (profondità di sondaggio, perdita di attacco clinico, recessione, lesione di formazione, mobilità dentaria, indice di sanguinamento al sondaggio, presenza di siti con essudato purulento). Venivano considerati "parodontalmente sani", e quindi inclusi come controlli, soggetti almeno nella terza decade che non presentassero una perdita di attacco clinico, determinata mediante sonda parodontale millimetrata, maggiore di 2 mm nei siti interprossimali di ciascun elemento dentario eretto in arcata.

Tutti i 95 pazienti, riconosciuti affetti da AgP clinicamente definita in base ai criteri di Lang et al. (1999) (Tabella I.1), erano in fase di terapia attiva (chirurgica e/o non chirurgica) o di supporto presso i Centri clinici di pertinenza.

Il presente studio è stato approvato dal Comitato Etico locale in accordo con la Legislazione Italiana e tutti i soggetti afferenti al progetto hanno fornito il proprio consenso informato scritto.

III.2. Estrazione e visualizzazione del DNA genomico

I campioni biologici oggetto del presente studio, provengono da 216 prelievi di sangue o saliva, ciascuno rappresentato: da due provette di circa 5 ml ciascuna nel caso di prelievi ematici, da due provette di circa 2 ml ciascuna nel caso di prelievi di saliva. I campioni sono stati conservati in congelatore a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA.

La purificazione del DNA genomico dai campioni ematici è stata effettuata mediante l'utilizzo del kit di estrazione QIAamp blood (QIAGEN Inc., Germany) partendo da 200 μl di sangue per ogni campione, in accordo con i protocolli standard (Maniatis et al. 1982). L'estrazione del DNA genomico degli altri campioni biologici è stata effettuata partendo da 1,5 ml di saliva e utilizzando il metodo del fenolo-cloroformio (Lum e Le Marchand et al., 2001) con le modificazioni suggerite da Garcia-Closase (Garcia-Closase et al., 2001). Il metodo prevede la lisi cellulare del pellet (Lysis Buffer: 10 mM Tris a pH 8, 10 mM EDTA a pH 8, NaCl 0,1 M e 2% w/v SDS), la degradazione dell'RNA (RNAsi, 10mg/ml), la rimozione delle proteine (Proteinasi K, 20 mg/ml). La denaturazione delle proteine avviene con l'aggiunta di un ugual volume di fenolo/cloroformio/Alcool Isoamilico (USB, Amersham Life Science) e la rimozione delle tracce di fenolo con l'aggiunta di cloroformio (rapporto 1:1). Per la concentrazione del DNA sono stati utilizzati cationi monovalenti (0,3 M di Sodio Acetato, pH 6) in rapporto di 1:10 e l'aggiunta di 2 - 2,5 volumi di Etanolo assoluto alla temperatura di -20°C , mescolando con cura la soluzione, che verrà conservata a -20°C overnight. Il DNA viene poi recuperato mediante centrifugazione per 15-30 min, il supernatante è decantato e, per rimuovere i sali, il pellet viene "lavato" con etanolo 70% v/v, il supernatante eliminato e il pellet essiccato.

Il DNA genomico estratto da questi campioni biologici è stato sciolto in circa 200 μl di tampone TE 0,2X (Tris HCl 10mM, EDTA 1 mM pH8) (Maniatis et al., 1982) -4°C overnight e successivamente conservato nel congelatore a -20°C .

Per verificare l'avvenuta estrazione del DNA, è stata eseguita un'elettroforesi su gel di agarosio all'1% w/v (DUKEFA-SPI) in tampone TBE 1X (89 mM Tris Borato, 89 mM

Acido Borico, 2 mM EDTA pH 8) (Maniatis et al., 1982), a cui è stato addizionato Etidio Bromuro (Ethidium Bromide, EtBr) alla concentrazione di 1 µg/ml.

In ogni pozzetto sono stati caricati 5 µl di DNA con 1,5 µl di tampone di carico di tipo IV, costituito da blu di bromofenolo (0,25% w/v) e saccarosio (60% w/v) in acqua distillata (Maniatis et al., 1982). La migrazione del DNA è stata condotta ad un voltaggio massimo di 5-10 Volt/cm. Il DNA genomico, a migrazione avvenuta, è stato visualizzato al transilluminatore (GEL DOC 2000 Bio-Rad) come una banda fluorescente.

III.3. Determinazione della concentrazione del DNA estratto

Alla fase precedente è seguita la determinazione della concentrazione del DNA estratto mediante l'uso del Fluorimetro Qubit Fluorometer™ (Invitrogen, Molecular Probes, USA). Questo strumento permette di effettuare misure di fluorescenza tramite l'utilizzo di fluorofori, ovvero molecole contenenti gruppi fluorescenti in grado di legare il DNA a doppia elica (dsDNA).

La fluorescenza è un fenomeno di emissione in cui si misura la trasmissione energetica all'interno della molecola da analizzare, da un livello energetico più alto ad uno inferiore, rilevando la radiazione emessa piuttosto che quella assorbita.

Affinché vi sia fluorescenza la molecola deve essere "eccitata" mediante l'assorbimento di luce di lunghezza d'onda minore (cioè a maggiore energia) rispetto a quella emessa (a minore energia).

Il principale vantaggio dell'utilizzo della fluorescenza rispetto ad altre misure di assorbimento è la maggiore sensibilità e accuratezza in quanto il segnale di fluorescenza parte da un background pari a zero.

Il fluorimetro utilizzato nella presente analisi contiene una sorgente d'eccitazione costituita da due LED (Light Emitting Diode), una cella per il campione e un rivelatore costituito da fotodiodi in grado di misurare lunghezze d'onda emesse che vanno da 300 a 1000 nm. Alla soluzione di DNA estratto viene aggiunta una soluzione (Quant-iT™ Working solution) contenente la sonda fluorescente in modo tale da ottenere, per ciascun campione da analizzare, un volume finale pari a 200 µl. Le molecole di DNA estratto, legate alla sonda fluorescente, vengono eccitate da raggi UV e la luce proveniente dalla sorgente d'eccitazione passa attraverso un monocromatore. La fluorescenza viene dispersa da un'altro monocromatore e rivelata dai fotodiodi.

L'intensità della fluorescenza è linearmente proporzionale alla concentrazione dell'analita.

Per determinare la concentrazione dalla fluorescenza emessa da ogni campione analizzato occorre effettuare la calibrazione dello strumento con due standard forniti dalla casa produttrice in modo tale da ottenere una curva di lavoro.

La quantificazione del DNA estratto ha permesso di 'normalizzare' ogni campione ad una concentrazione standard di utilizzo pari a 10 ng/μl, necessaria per attuare le successive analisi.

III.4. Genotyping degli SNPs selezionati

I marcatori genetici inclusi nello studio sono stati 60 SNPs, tutti convalidati nella popolazione Caucasica provenienti dalla banca dati dbSNP (Single Nucleotide Database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) del sito web del National Center for Biotechnology Information; (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). In Tabella III.1 sono riportate alcune caratteristiche degli SNPs scelti per la presente analisi.

ID di riferimento	Alleli ⁺	Distanza fisica (bp)	Localizzazione genica	MAF CAUC*	Eterozigosità (%)	MAF °	Call rate (%)
rs4848300	T/C	113244377	IL1A (DOWNSTREAM)	0,308	40,7	0,253	99,0
rs17561	G/T	113253694	IL1A (ESONE 5)	0,355	40,6	0,253	100,0
rs10496444	T/C	113270139	INTERGENICO	0,333	37,6	0,264	99,5
rs12469600	T/C	113288828	INTERGENICO	0,242	35,2	0,231	100,0
rs3917368	G/A	113299253	IL1B (DOWNSTREAM)	0,360	47,9	0,399	99,5
rs1143634	C/T	113306861	IL1B (ESONE 5)	0,223	35,0	0,231	100,0
rs1143627	T/C	113310858	IL1B (UPSTREAM)	0,367	45,6	0,304	99,8
rs16944	G/A	113311338	IL1B (PROMOTORE)	0,345	43,4	0,199	96,8
rs4849127	G/A	113319030	INTERGENICO	0,033	12,0	0,080	99,5
rs2708919	C/T	113358102	INTERGENICO	0,467	51,8	0,417	100,0
rs7577574	T/C	113399242	INTERGENICO	0,100	14,0	0,090	99,5
rs2723163	G/A	113410810	INTERGENICO	0,433	51,0	0,491	99,8
rs879711	G/T	113432725	INTERGENICO	0,467	48,4	0,422	100,0
rs895497	G/A	113480046	IL-1F6 (ESONE2)	0,330	43,4	0,306	99,8
rs2305150	T/C	113505787	IL1F8 5' UTR	0,430	54,1	0,453	99,5
rs1562302	G/A	113526929	IL1F8 5' UTR	0,142	39,9	0,201	100,0
rs1800930	G/A	113537001	IL1F5 3' UTR	0,481	42,8	0,364	93,2
rs2515402	A/C	113537051	IL1F5 3' UTR	0,458	46,4	0,366	99,5
rs6759676	T/C	113552819	IL1F10 (DOWNSTREAM)	0,450	51,5	0,391	99,3
rs1623119	A/T/G	113578529	INTERGENICO	0,158	21,9	0,118	79,5
rs4251961	T/C	113590938	IL1RN (UPSTREAM)	0,400	48,4	0,442	100,0
rs454078	A/T	113605264	IL1RN (INTRONE 4)	0,275	39,6	0,251	100,0
rs315943	T/C	113610809	IL1RN (DOWNSTREAM)	0,433	50,1	0,480	100,0
rs11123167	G/C	113623340	INTERGENICO	0,417	51,1	0,439	100,0
rs12475781	T/G	113633383	INTERGENICO	0,317	40,5	0,286	99,5
rs724496	G/A	113638747	INTERGENICO	0,250	40,7	0,228	99,8
rs4849159	T/C	113641532	INTERGENICO	0,283	32,0	0,186	100,0

rs6761202	C/G	113658745	TIC/PSD4 (INTRONE 2)	0,450	49,5	0,404	97,3
rs1975535	A/C	113659374	TIC/PSD4 (INTRONE 3)	0,448	49,5	0,402	99,8
rs6751201	G/C	113669170	TIC/PSD4 (INTRONE 10)	0,167	29,5	0,204	99,5
rs1015754	C/T	113684461	INTERGENICO	0,210	42,2	0,290	98,5
rs1110839	T/G	113710887	PAX 8/Q7Z3M5 (introne 7)	0,450	43,6	0,384	89,7
rs2018348	A/G	113723991	PAX 8/Q7Z3M5 (introne 2)	0,283	41,0	0,302	97,8
rs1374161	A/G	113751097	PAX 8/Q7Z3M5 (introne 2)	0,483	49,0	0,474	99,3
rs4848327	C/T	113759761	INTERGENICO	0,417	46,0	0,330	100,0
rs2002510	T/C	113777936	INTERGENICO	0,288	34,1	0,219	99,8
rs4404277	C/T	113783799	INTERGENICO	0,395	52,5	0,462	98,8
rs1191694	A/G	113801306	INTERGENICO	0,317	42,8	0,313	97,8
rs2008324	A/G	113826562	INTERGENICO	0,450	50,1	0,468	100,0
rs6739740	G/T	113833982	INTERGENICO	0,492	49,9	0,412	98,0
rs11123181	A/G	113842676	INTERGENICO	0,407	38,0	0,424	97,8
rs1968615	T/G	113854068	INTERGENICO	0,458	49,1	0,454	99,5
rs1867870	T/A	113880117	UPSTREAM	0,442	48,9	0,451	100,0
rs1739538	T/C	114002985	INTERGENICO	N.D	45,0	0,400	98,3
			LOC645529 (ACROL)				
rs11123202	A/C	114139441	DOWNSTREAM	0,175	27,8	0,157	99,5
rs11123205	G/A	114163654	INTERGENICO	0,492	48,7	0,434	99,5
rs4849261	G/A	114166498	INTERGENICO	0,367	48,7	0,416	97,3
rs935644	G/A	114183464	SLC35F5 (DOWNSTREAM)	0,433	45,5	0,416	100,0
rs2166966	G/T	114234271	SLC35F5 (UPSTREAM)	0,200	21,2	0,171	93,6
rs4848348	A/C	114246135	INTERGENICO	0,208	22,4	0,121	99,3
rs7587985	T/G	114275588	INTERGENICO	0,508	52,3	0,477	99,5
rs11123208	T/C	114283157	INTERGENICO	0,258	29,8	0,116	83,6
rs4450608	T/C	114292588	INTERGENICO	0,417	46,9	0,405	100,0
rs4849285	T/C	114303902	INTERGENICO	0,417	46,7	0,436	99,5
rs1028245	A/C	114317805	INTERGENICO	0,417	43,5	0,416	97,8
rs9941677	T/C	114326281	INTERGENICO	0,283	35,5	0,284	99,8
rs12995005	A/G	114332963	INTERGENICO	0,275	38,1	0,305	100,0
rs6740934	T/C	114359282	ACTR3/ARP3 (UPSTREAM)	0,100	16,9	0,098	100,0

° Frequenza dell'allele minore (Minor Allele Frequency, MAF) calcolata sull'intero campione (216 individui).

* MAF nella popolazione Caucasica analizzata dall'Hap Map Projet.

+ L'allele alla sinistra della barra è quello con la frequenza maggiore, mentre l'allele a destra ha la frequenza minore.

Tabella III.1. Caratteristiche generali dei polimorfismi selezionati

La genotipizzazione dei 60 polimorfismi selezionati, per ciascuno dei 216 campioni di DNA estratto, è stata realizzata dalla società di servizi di genotyping Pharma-Gen (Pula, Cagliari) su piattaforma Sequenom MassARRAY[®] (Sequenom, San Diego, CA), utilizzando il protocollo iPLEX[™] (Oeth et al. 2005).

Al Consorzio Pharma-Gen sono stati inviati, per ogni SNP selezionato dal dbSNP, l'ID corrispondente e la relativa sequenza, di lunghezza variabile tra 300 e 500 bp, al centro della quale si localizza lo SNP di interesse.

Il protocollo iPLEX[™] prevede diversi passaggi preliminari:

a) Disegno dei primers per l'amplificazione di ciascun SNP mediante multiplex-PCR. La costruzione degli oligonucleotidi prevede un'analisi preliminare delle sequenze inviate tramite allineamento (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) sull'intero genoma umano e riformattazione delle sequenze in modo da demarcare eventuali polimorfismi noti che siano localizzati in prossimità del polimorfismo da genotipizzare.

b) Disegno dei "multiplexed" assay con il software Assay Design[®] che genera, per ciascun polimorfismo, tre primers:

- due primers per la reazione di PCR caratterizzati all'estremità 5' da sequenza-tag di 10 bp (5'-ACGTTGGATG-3') che consentono di migliorare la resa di ogni reazione PCR;
- un primer per la reazione di estensione di una singola base dell'oligonucleotide (Single Base Primer Extension).

La reazione di "primer extension" del protocollo iPLEX[™] prevede il disegno di oligonucleotidi la cui sequenza termina esattamente una base prima del sito polimorfico di interesse. I primers vengono aggiunti ad una miscela di reazione contenente i prodotti di amplificazione di ogni multiplex-PCR con i quali si ibridano. La posizione da tipizzare viene evidenziata mediante l'incorporazione di uno dei quattro didesossinucleotidi trifosfato (ddATP, ddCTP ddGTP ddTTP), ciascuno caratterizzato da una peso molecolare modificato (Mass-Modified Terminator). L'aggiunta alla miscela di reazione di questi ddNTPs terminatori, genera prodotti di estensione allele-specifici ciascuno distinto da un'unica e peculiare massa molecolare in grado di essere rilevata, senza ambiguità, dallo spettrofotometro di massa con la metodica MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight).

c) Set up delle reazioni di PCR dei singoli assay.

d) Processamento e genotipizzazione dei campioni nello spettrofotometro di massa MassARRAY[®] in piastre da 384 pozzetti. Per ciascuna piastra sono previsti quattro controlli negativi.

Il protocollo sperimentale per ciascun assay prevede:

1. Reazione di multiplex-PCR per isolare e amplificare i frammenti di DNA contenenti il polimorfismo in studio. Per tutti i campioni, in ogni reazione di amplificazione, vengono utilizzati gli stessi reagenti e aliquote riassunti nella seguente tabella (Tabella III.2):

Reagenti	Conc. in 5 μ L	Volume per campione	Volume per 384 campioni
H ₂ O Nanopura	/	1.850 μ L	888 μ L
Hotstar Taq [®] PCR Buffer con MgCl ₂ (10x)	1.25x	0.625 μ L	300 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	1.625 mM	0.325 μ L	156 μ L
dNTP mix (25 mM)	500 μ M	0.100 μ L	48 μ L
Primer mix (500 nM ognuno)	100 nM	1.000 μ L	480 μ L
DNA Genomico (10ng/ μ L)	10 ng per reazione	1.000 μ L	480 μ L
Hotstar Taq [®] (5U/ μ L) QIAGEN Inc.	0.5 U per reazione	0.100 μ L	48 μ L
Totale	/	5.000 μL	2400 μL

Tabella III.2.

Per l'amplificazione con multiplex-PCR delle sequenze contenenti i 60 SNPs da analizzare è stato utilizzato il seguente programma:

- 1) 94° C per 15 minuti
- 2) 94° C per 20 secondi
- 3) 56° C for 30 secondi
- 4) 72° C per 1 minuto
- 5) Vai al punto 2 e ripeti 45 volte
- 6) 72° C per 3 minuti
- 7) 4° C ∞

2. I prodotti di reazione vengono purificati enzimaticamente mediante l'uso di una Fosfatasi Alcalina o SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) per rimuovere i dNTPs non incorporati nella reazione di multiplex-PCR. Nella seguente tabella (Tabella III.3) vengono riportati i reagenti utilizzati per la purificazione (SAP mix):

Reagenti	Volume per campione	Volume per 384 campioni
H ₂ O Nanopura	1.530 µL	734.4 µL
SAP Buffer (10x)	0.170 µL	81.6 µL
Enzima SAP(1U/µL)	0.300 µL	144.0 µL
Totale	2.000 µL	960.0 µL

Tabella III.3.

Per ogni campione, si utilizzano 5 µl di prodotto purificato di a cui vengono addizionati 2 µl di SAP mix. I prodotti PCR, trattati con SAP, vengono incubati in un termociclatore impostato col seguente profilo termico: 37°C / 20 min + 85°C / 5 min + 4°C / ∞.

3. Reazione di “primer-extension” (iPLEX reaction) per la generazione di prodotti di PCR allele-specifici.

Per ciascun campione, in ogni reazione di estensione, vengono utilizzati i reagenti e aliquote riassunti nella seguente tabella (Tabella III.4):

Reagenti	Conc. in 9µL	Volume per campione	Volume per 384 campioni
H ₂ O Nanopura	/	0.755 µL	362.40 µL
iPLEX Buffer (10x)	0.222	0.200 µL	96 µL
ddNTPs terminatori	1x	0.200 µL	96 µL
Primer mix (7 µM)	0.625 nM	0.804 µL	385.92 µL
Enzima iPLEX	1x	0.041 µL	19.68 µL
Totale	/	2.000 µL	960.00 µL

Tabella III.4.

I prodotti della reazione di estensione vengono successivamente incubati in un termociclatore standard impostato con il seguente programma:

- 1) 94° C per 30 secondi
- 2) 94° C per 5 secondi
- 3) 52° C for 5 secondi
- 4) 80° C per 5 secondi
- 5) Vai al punto 3 e ripeti 4 volte
- 6) Vai al punto 2 e ripeti 39 volte
- 7) 72° C per 3 minuti
- 8) 4° C ∞

I cinque cicli di appaiamento ed estensione che avvengono rispettivamente a 52 e 80 gradi, sono ripetuti per 39 volte all'interno del ciclo più esteso che comprende lo step di denaturazione a 94° in modo tale che il programma PCR risulti complessivamente costituito da 200 cicli (5x40).

4. Purificazione dei campioni con la Sequenom Clean Resin[®] per l'eliminazione di sali o eventuali altri contaminanti che potrebbero interferire con l'analisi allo Spettrofotometro di Massa. A questo scopo ogni campione viene diluito in 25 µl di acqua a cui sono addizionati 6 mg di Sequenom Clean Resin[®] e centrifugato a 4000 rpm.

5. Trasferimento di 15-20 nl di reazione nello Spectrochip[®] bioarray. Lo Spectrochip[®] bioarray è una componente integrante del sistema MassARRAY[®] ed è costituito da un chip in silicone diossido, fotoresistente, in formato da 384 pozzetti 'pre-spottati' con una particolare matrice MALDI.

6. Analisi del chip con lo spettrometro di massa MassARRAY[®].

Questo strumento fornisce un modo veloce e accurato per ottenere la genotipizzazione di un elevato numero di SNPs in tempo reale.

Il principio su cui si basa lo spettrometro di massa MassARRAY[®] è dato dalla possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica mediante l'applicazione di campi magnetici.

Un fascio laser è impiegato per ionizzare le molecole dei campioni da analizzare che diventano instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici, in funzione della loro struttura chimica.

Il flusso di ioni prodotto entra nell'analizzatore TOF (Time-Of-Flight), un dispositivo costituito da una colonna ad alto vuoto, capace di separare gli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z), misurando il tempo impiegato da uno ione per percorrere l'intero spazio dell'analizzatore e giungere al rivelatore.

Per ogni SNP, il peso molecolare di ciascun allele, può essere determinato in base alla velocità relativa o "tempo-di-volo" relativo.

7. Identificazione ("call") degli alleli e determinazione dei genotipi mediante il software Typer[®]. Questo programma è in grado di identificare ogni ione in funzione della sua massa in modo tale da ottenere uno spettro di massa finale (Figura III.1).

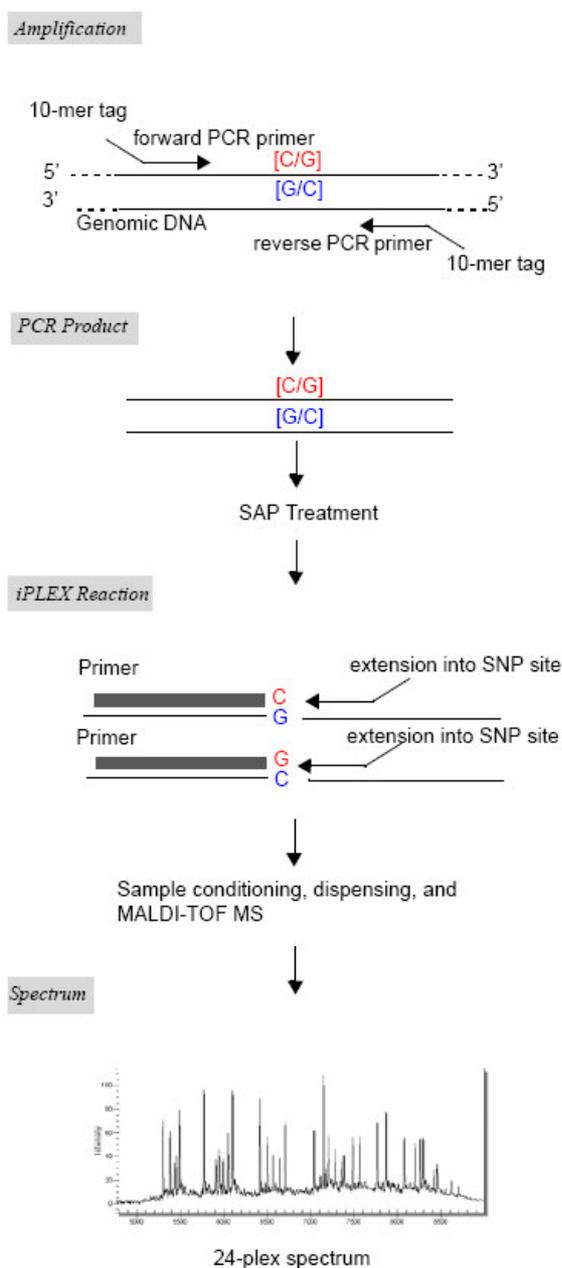


Figura III.1. Schema dei diversi passaggi previsti dal protocollo iPLEX[™] (Oeth et al. 2005)

III.5. Controllo di Qualità dei dati genetici

Il Controllo di Qualità (CQ) consente di definire se una serie di marcatori può essere utilizzata per l'analisi di associazione e se soddisfa i criteri prestabiliti per minimizzare la probabilità di osservare falsi positivi. Gli errori di primo genere possono essere causati principalmente o dalla bassa qualità della genotipizzazione (errori di lettura dei genotipi) oppure dal ridotto numero di individui tipizzati con successo per uno specifico marcatore.

I passaggi del CQ previsti per preparare i dati alle successive analisi statistiche sono stati:

1. Rimuovere tutti i marcatori, per i quali i primers non sono altamente specifici (non-calls) o la genotipizzazione non è riuscita per tutti gli individui;
2. Eliminare i marcatori monomorfici;
3. Escludere i marcatori con meno dell'80% di genotipizzazioni riuscite;
4. Porre in evidenza i marcatori che non sono in equilibrio di Hardy-Weinberg (HW) nei controlli ($P < 0,05$).
5. Eliminare tutti gli individui per i quali il 20% dei marcatori non sono stati caratterizzati con successo.

La qualità dei campioni di sangue, infine, potrebbe essere compromessa in caso di contaminazione durante il prelievo, lo scongelamento o il trasferimento del campione biologico tra i centri di raccolta e analisi.

CAPITOLO IV

- Metodi statistici -

IV.1. Metodi di mappaggio genetico per le patologie complesse

Esistono due principali approcci che permettono di mappare geni che conferiscono suscettibilità genetica a diverse patologie umane: a) Analisi del Linkage e b) Studi di Linkage Disequilibrium o studi di associazione allelica.

a) L'analisi del linkage prende in esame la relazione specifica esistente tra due loci genici all'interno di alberi genealogici, cioè di nuclei familiari allargati, che siano informativi per la patologia di interesse.

Questo tipo di indagine ha dato risultati notevoli per numerose malattie mendeliane o quasi mendeliane e si basa sulla tendenza di due geni situati sullo stesso cromosoma, ad essere ereditati insieme con una frequenza dipendente dalla loro distanza genetica (Hirschhorn & Daly 2005).

L'analisi del linkage si avvale dell'identificazione di marcatori polimorfici nell'ambito di gruppi familiari: se i soggetti affetti trasmettono alleli di un dato marcatore insieme con l'allele-malattia, con una frequenza statisticamente superiore all'atteso, si conclude che il marcatore è concatenato ('linked') con il gene-malattia.

L'analisi fornisce una stima della distanza in centimorgan (cM) del locus polimorfico dal gene-malattia.

Per definire, su base statistica, l'esistenza di un 'linkage' sono necessari diversi gruppi familiari con numerosi soggetti affetti; inoltre l'analisi comporta lo studio di diversi marcatori localizzati a monte, a valle o all'interno del gene candidato.

Per ciascun nucleo familiare, vengono valutate, quindi, due ipotesi alternative: la probabilità 'H' che tra due loci qualsiasi, tra quelli considerati, esista associazione, cioè linkage, con frequenza di ricombinazione pari a θ , e la probabilità alternativa 'H₀', cioè che i due loci siano indipendenti. Il logaritmo decimale (\log_{10}) del rapporto tra queste probabilità, corrisponde al 'logarithmic odds' o, più semplicemente, *LOD SCORE*, il cui valore indica quale delle due ipotesi alternative, sia quella più probabile (Morton, 1955).

$$\text{Likelihood - Ratio} = \frac{\theta \leq 0.5(\text{Linkage})}{\theta = 0.5(\text{no - Linkage})}$$

$$Z = \log_{10} LR$$

Attraverso il calcolo iterativo del lod score, assumendo ogni volta un diverso valore di θ , si ottiene il Maximun Likelihood Score (MLS), ovvero il valore di θ che massimizza il valore del LR.

Per l'intero campione in studio, la probabilità complessiva di linkage, si ottiene dal prodotto delle probabilità in ciascuna famiglia, per cui, trattandosi di logaritmi, i lod score possono essere sommati tra famiglie.

Morton N.E. ha dimostrato che i lod score rappresentano il calcolo statistico più attendibile per calcolare il linkage nell'ambito degli alberi genealogici (Strachan & Read 2003), individuando un lod score di 3 quale soglia stabilita per accettare statisticamente il linkage, con una probabilità di errore del 5%. Il linkage può essere escluso se il lod score è minore a -2. Valori compresi fra -2 e +3 non consentono di accettare o rigettare l'ipotesi di linkage tra i geni, pertanto i loci considerati sono indipendenti (Morton 1955, De Carli et al. 1998, Strachan & Read 2003).

Per il mappaggio marcatore-malattia il punto di partenza, generalmente, è un lod score di due punti che testa se la malattia mappa vicino ad un particolare marcatore, ovviamente l'analisi del linkage può essere molto più efficiente se si analizza simultaneamente l'associazione della patologia con più loci marcatori. Data per acquisita la mappa dei marcatori, lo scopo è di localizzare il gene responsabile della malattia in uno degli intervalli della mappa. Programmi come *LINKMAP* (parte del pacchetto *LINKAGE*, Lathrop et al. 1984) o *GENEHUNTER* (Kruglyak et al. 1996) ricavano la posizione del locus malattia rispetto alla griglia dei marcatori, calcolando la probabilità complessiva dei dati di associazione per ciascuna delle posizioni possibili. Il risultato è una curva di probabilità rispetto alle localizzazioni di mappa in cui sull'asse delle y c'è il lod score (il logaritmo del rapporto di probabilità per quella data localizzazione rispetto ad una più distante lungo la mappa) e sull'asse x c'è la distanza tra markers espressa in centimorgan (cM) (Strachan & Read 2003).

L'analisi dei lod score viene definita "parametrica" perchè richiede un preciso modello genetico, in cui vengono precisate le modalità di eredità, le frequenze geniche e la penetranza di ciascun genotipo al locus malattia. L'analisi del linkage viene generalmente utilizzata per identificare geni responsabili di malattie monogeniche, con elevata penetranza, nella cui insorgenza non sono coinvolti fattori ambientali. L'utilizzo di questo approccio quindi, è poco efficace nell'identificare geni associati a malattie multifattoriali (Gray et al. 2000). La presenza, infatti, di un limitato numero di generazioni in una

famiglia e, di conseguenza, il numero ridotto di eventi di ricombinazione, non permette di individuare la presenza di linkage in così brevi distanze genetiche nei pedigree.

b) Gli studi di Linkage Disequilibrium (LD) o studi di associazione, invece, si basano su una misura statistica che esprime l'associazione non casuale tra gli alleli di loci situati a breve distanza lungo il cromosoma (Sawyer et al. 2005), confronta individui non imparentati, ovvero non appartenenti a gruppi familiari comuni ed infine, non essendo un metodo parametrico, non necessita di nessuna assunzione circa il modello genetico.

Inoltre gli studi di associazione sono più facili da condurre rispetto all'analisi di linkage perché non sono necessarie famiglie con più casi o particolari strutture familiari ed è pertanto possibile raggiungere dimensioni campionarie più elevate. Inoltre, poiché il LD è un fenomeno che si estende su un breve segmento di genoma, se si individua un'associazione, essa definisce un piccola regione candidata in cui cercare il gene di suscettibilità (Strachan & Read 2003).

Il vantaggio dell'analisi del LD è che permette di individuare, se è presente, l'associazione di uno o più SNPs con un gene candidato: tale LD è il risultato di centinaia di eventi di ricombinazione, che hanno interessato tale regione cromosomica, e che si sono verificati nel corso delle generazioni passate (Balding 2005).

L'elevata frequenza degli SNPs nel genoma umano, unita alla loro presunta stabilità in termini di tasso di mutazione relativo, rende tali polimorfismi tra i più adatti per questo tipo studi (Maniatis et al. 2004). Pertanto, uno degli approcci attualmente impiegati per l'analisi genetica di una patologia complessa, utilizza gli SNPs come marcatori in LD con i geni implicati nella patologia in esame (Dupuis 2007).

In generale, l'estensione del LD attorno a ciascun marcatore genetico dipende fortemente dalla storia della popolazione considerata pertanto, processi stocastici come il flusso genico, la deriva genetica, mutazioni multiple e selezione naturale, possono modificare la relazione esistente tra LD e loci genetici (Lonjou et al. 2003, Tapper et al. 2003, Maniatis et al. 2004). La conoscenza dell'estensione del LD attorno ad uno SNP in una popolazione è di fondamentale importanza per gli studi di mappaggio, basati sull'associazione (Matisse et al. 2007). Il valore dell'estensione del LD sufficiente per l'identificazione di geni associati a patologie complesse, è tuttora oggetto di molte controversie (Hirschhorn & Daly 2005). Approcci puramente teorici, che non tengono conto degli effetti della selezione naturale e degli effetti migratori della popolazione, indicano che tale valore può perdere di significatività a distanze superiori a 3 Kilobasi

(Collins et al. 2004) e che, pertanto, nell'intero genoma umano, sarebbero necessari circa 500.000 SNPs per uno screening completo (Gray et al. 2000). Predizioni basate, invece, su dati empirici suggeriscono che sarebbero sufficienti 30.000 SNPs per lo screening del genoma, in quanto il LD sufficiente per l'identificazione di geni associati a patologie complesse si estenderebbe fino a 200 kilobasi attorno ad uno SNP (Wang et al. 2005).

Per analizzare in dettaglio il contributo di un gene candidato può essere necessaria l'analisi di 5-10 SNPs all'interno ed attorno al gene (Nowotny et al. 2001), ma lo studio delle malattie complesse, ha una migliore risoluzione attraverso l'analisi degli aplotipi di più SNPs in LD tra loro e con la patologia stessa.

IV.2. Studi di associazione caso-controllo

Nello studio di una malattia complessa, uno dei disegni di studio più diretti ed efficienti per identificare l'associazione tra geni candidati per una patologia e loci marcatori, è l'analisi di associazione su base popolazionistica ed in particolare il disegno "caso-controllo" (Hirschhorn & Daly 2005).

Negli studi di associazione caso-controllo viene analizzata una popolazione di individui "affetti", identificati con il termine di "casi" (Gibson & Muse 2002).

Alla popolazione di 'casi' reclutati, se ne affianca un'altra di 'controllo', composta da individui 'non affetti' dalla patologia in esame, e che risulta appaiata alla prima, per età, per distribuzione di sessi, per abitudini comportamentali o per altri fattori di confondimento specifici della patologia in esame ed appartenenti allo stesso gruppo etnico.

Riscontrare una frequenza più elevata di un determinato allele ad un locus nel gruppo dei soggetti affetti rispetto al gruppo dei controlli, suggerisce una probabile relazione tra il polimorfismo analizzato e la patologia in esame.

Tale analisi, a differenza delle analisi di linkage, non considera individui imparentati poiché questo approccio non fornisce informazioni sull'ereditabilità del tratto analizzato e pertanto qualsiasi associazione osservata può essere attribuita sia a cause genetiche che non genetiche.

Le possibili cause di associazione possono essere:

➤ Effetti diretti del polimorfismo sul rischio di insorgenza della malattia

Un polimorfismo utilizzato come marcatore può trovarsi all'interno di un gene e può quindi essere responsabile dell'alterazione della sequenza aminoacidica della catena polipeptidica codificata da quel gene o influenzarne il processo di trascrizione (Figura

IV.1). Alleli diversi, quindi, possono determinare differenze nella natura o nella quantità del prodotto genico e questo può influenzare la suscettibilità alla patologia.

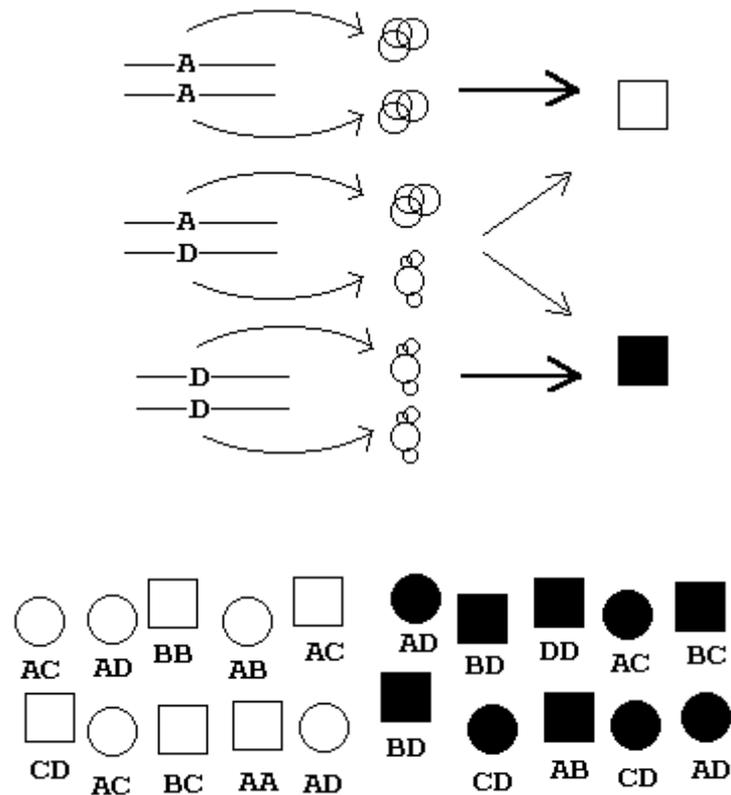


Figura IV.1. Effetto diretto del polimorfismo sul rischio di insorgenza della patologia

➤ Effetto indiretto (tramite Linkage Disequilibrium) del polimorfismo

Il LD, detto anche "associazione gametica preferenziale", è il fenomeno per cui, a livello di popolazione, specifiche combinazioni a due o più loci concatenati tendono a trovarsi insieme sullo stesso cromosoma più frequentemente di quanto ci si attenda per effetto del caso a causa della medesima derivazione da un antenato comune. Il LD è un evento che riguarda loci strettamente concatenati tra i quali, quindi, sono molto rari gli eventi di ricombinazione.

Se una mutazione patogenetica insorge a breve distanza da un sito polimorfico, allora l'allele ancestrale al locus marcatore verrà trasmesso, associato alla patologia, dal fondatore che porta la mutazione.

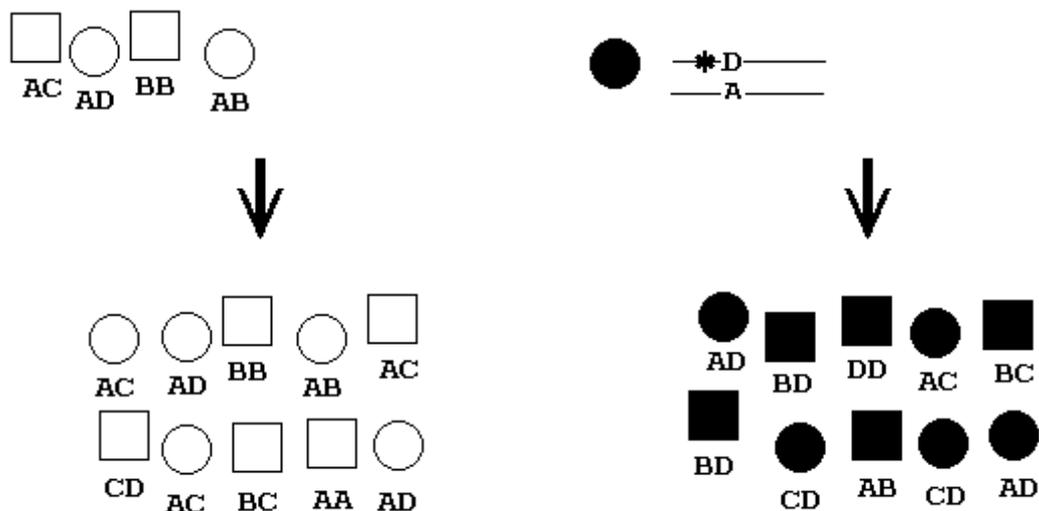


Figura IV.2. Effetto "indiretto" del polimorfismo mediante Linkage Disequilibrium

La Figura IV.2 riporta il caso in cui la mutazione che causa la malattia viene originariamente introdotta nella popolazione da un individuo fondatore che presenta la variante allelica D sullo stesso segmento cromosomico in cui si localizza la mutazione patogenica. Nel corso delle generazioni successive, la regione cromosomica contenente la mutazione patogenetica e l'allele D, sarà interessata da una serie di eventi di ricombinazione che ridurranno le dimensioni del segmento cromosomico. L'associazione tende ad essere preservata se vi è un linkage molto stretto tra le due posizioni così che le due varianti vengono trasmesse insieme come un 'unico blocco'. Differenti alleli possono essere associati alla malattia in popolazioni diverse a seconda del tipo e della natura dei fattori che, dal fondatore, hanno operato sulle diverse popolazioni.

➤ Stratificazione della popolazione

Quando una popolazione è composta da due o più sottogruppi eterogenei di individui, si dice che essa è "stratificata". La "stratificazione" presente nella popolazione in esame, può mettere in evidenza a un'associazione tra marker e la patologia, che in realtà non esiste ("associazione spuria"), pertanto essa può guidare a un'interpretazione errata dei risultati (Serre et al. 2008). Ci si può accorgere della presenza di una stratificazione, quando sottogruppi di popolazioni mostrano notevoli differenze nella frequenza allelica per il gene marcatore analizzato e/o varia la frequenza della patologia in esame (Cardon & Palmer 2003, Cheng & Lin 2007).

Nella Figura IV.3, la patologia (individui colorati in nero) e la variante allelica D sono entrambi rari nella prima popolazione ma risultano comuni nella seconda. Quando casi e controlli sono campionati dall'intera popolazione la malattia appare associata all'allele D, anche se non risulta associata in nessun sottogruppo.

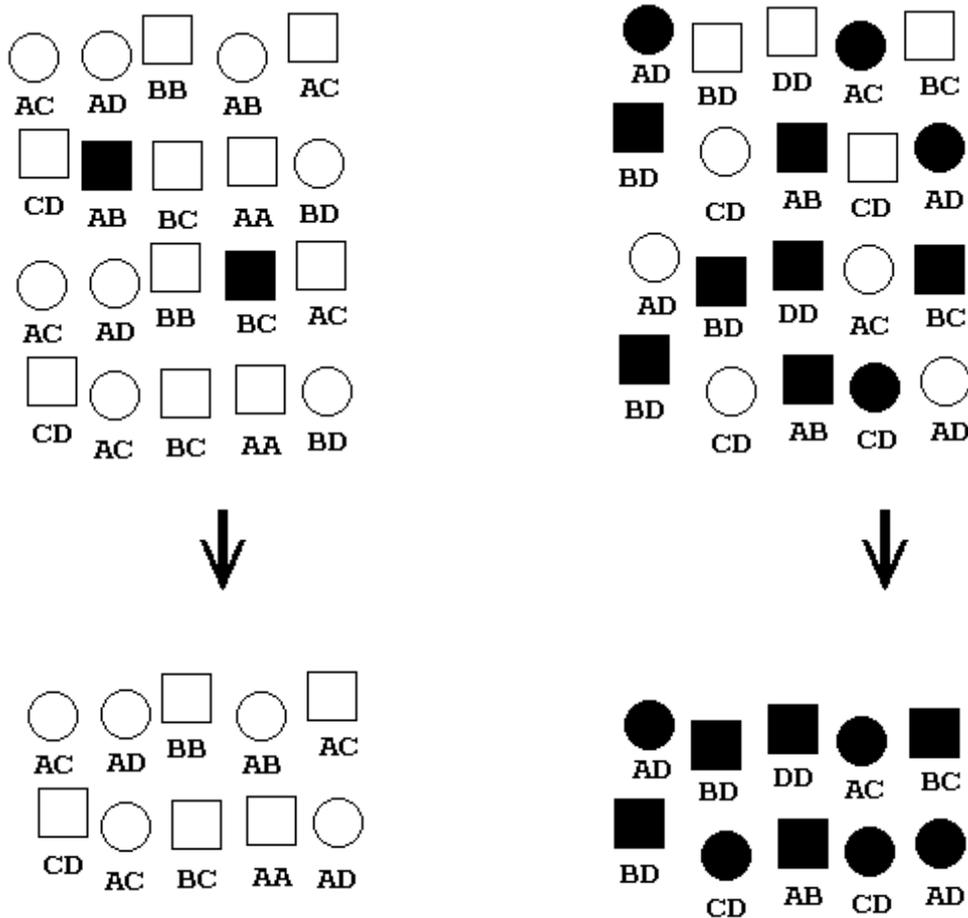


Figura IV.3. Effetto della stratificazione della popolazione sulla selezione dei soggetti per lo studio

Se si conducono studi di associazione caso-controllo, è opportuno, quindi, scegliere in modo accurato gli individui appartenenti ai gruppi dei casi e dei controlli, per cercare di azzerare tutte le possibili componenti ambientali.

IV.3. Stima del Linkage Disequilibrium

Quando due o più loci si trovano fisicamente sullo stesso cromosoma e per questo sono ereditati insieme con una frequenza maggiore di quella attesa nell'ipotesi che la segregazione fosse casuale, si parla di Linkage Disequilibrium. Maggiore è la distanza fra due marcatori genetici sul cromosoma, maggiore è la probabilità che la ricombinazione,

omologa o non reciproca (conversione genica), causi il riassortimento degli alleli provocando quindi la diminuzione del LD fra questi ultimi. Misurare il livello di LD permette quindi di inferire l'entità degli eventi di ricombinazione genica ed il ruolo di questi ultimi nel modellare la diversità genetica osservata in una specifica regione cromosomica. Sono stati sviluppati diversi metodi per la valutazione del livello di LD:

a) Il primo coefficiente proposto per la misura del Linkage Disequilibrium D si esprime come:

$$D_{ij} = p_{ij} - p_i p_j$$

dove p_{ij} è la frequenza dell'aplotipo che presenta l'allele i al primo locus e l'allele j al secondo, mentre p_i e p_j sono le frequenze degli alleli i e j , rispettivamente. Se non c'è associazione, ci si aspetta che il valore di p_{ij} coincida con il prodotto di p_i e p_j . Fin dai primi momenti della sua applicazione è emerso che il valore di D_{ij} era influenzato dalle frequenze alleliche, variando tra un minimo ed un massimo non definiti a priori. È stato quindi proposto di utilizzare il coefficiente D_{ij} standardizzato per il massimo valore che può assumere ($D_{ij} \max$), date le frequenze alleliche (Lewontin 1964). Questo indice, definito D' , si esprime come:

$$D'_{ij} = D_{ij} / D_{ij} \max$$

dove $D_{ij} \max$ ha uno dei seguenti valori:

$$\min [p_i p_j, (1-p_i) (1-p_j)] \text{ se } D_{ij} < 0$$

$$\min [(1-p_i) p_j, p_i (1-p_j)] \text{ se } D_{ij} > 0$$

A seguito della standardizzazione questo indice risulta indipendente dalle frequenze alleliche, essendo definito come la proporzione del massimo valore raggiungibile da D . L'indice varia quindi fra +1 e -1 in modo indipendente da p_i . Il segno è irrilevante, in quanto dipende dalla scelta (arbitraria) degli alleli i e j rispetto alla loro alternativa. $D'=0$ indica assenza di associazione (indipendenza) fra i loci considerati.

b) Un'altra misura successivamente proposta per valutare il livello di LD è il coefficiente di correlazione r^2 (Hill & Robertson 1968) espresso come:

$$r^2 = \frac{D_{ij}^2}{p_i(1-p_i)p_j(1-p_j)}$$

Il parametro r^2 riflette il potere statistico nel rilevare il LD tra loci e risulta particolarmente informativo negli studi di associazione in quanto è inversamente proporzionale alla dimensione del campione (n) richiesta per identificare un'associazione con la patologia in esame, dato un rischio genetico fissato. Infatti, se si considera un qualsiasi marker adiacente ad uno SNP causale, il prodotto nr^2 è corrisponde al chi quadrato di Pearson per una tabella di contingenza 2x2 dove le frequenze aplotipiche attese sono calcolate assumendo indipendenza tra i due loci. Pertanto, un elevato valore di r^2 permette di individuare la presenza di "un'associazione indiretta" tra il marcatore in studio ed il fenotipo patologico.

c) A partire dagli anni '70 molti altri parametri sono stati proposti per stimare l'associazione allelica. Tuttavia alcune di queste metriche si sono rivelate particolarmente sensibili alle variazioni delle frequenze alleliche e, quindi, poco adatte allo studio del LD in differenti regioni cromosomiche e in diverse popolazioni (Morton 2006). Nel del presente studio viene utilizzata una misura di associazione allelica alternativa, caratterizzata da solide basi teoriche e meno influenzata dalle frequenze alleliche rispetto le altre metriche (Collins et al. 2001).

Collins e Morton sviluppano questa metrica nel 1998 descrivendo l'associazione allelica tra coppie di loci in termini di probabilità di associazione, espressa come ρ , alla generazione i -esima partendo da una 'popolazione fondatrice' (Collins & Morton 1998). Data una coppia di loci diallelici, un aplotipo scelto casualmente (random) alla generazione t è identico per discesa ad uno specifico aplotipo nella generazione precedente con una probabilità di $1/2N_{t-1}$, dove N_i è la dimensione effettiva della popolazione. La probabilità complementare che un aplotipo selezionato in maniera random, non sia interessato da un evento di ricombinazione alla generazione $t-1$, è data da ρ_{t-1} (Morton et al. 2001). In tal modo, la probabilità di associazione viene espressa come:

$$\rho_t = (1-\nu)(1-\theta)[1/2N_{t-1} + (1-1/2N_{t-1})\rho_{t-1}]$$

e può essere suddivisa in due componenti:

$$\rho_t = \rho_{rt} + \rho_{ct}$$

in cui:

$$\rho_{rt} = \rho_0 e^{-(1/2N+v+\theta)t}$$

$$\rho_{ct} = L \left[1 - e^{-(1/2N+v+\theta)t} \right]$$

dove ρ_{rt} è la componente dell'associazione che declina dalla 'generazione fondatrice' ρ_0 , ρ_{ct} è la componente che aumenta a causa della deriva genetica dalla popolazione fondatrice, θ rappresenta la frazione di ricombinazione e v è il tasso di mutazione. In tal modo, all'aumentare del numero di generazioni, ρ_{rt} tende a zero e ρ_{ct} tende ad L. L'asintoto L rappresenta l'associazione residua (bias) o spuria a larghe distanze e può essere minimizzato considerando campioni di grandi dimensioni. Da un punto di vista matematico, L è il valore che assume ρ_t quando $e^{-\theta t}$ tende a zero. Per N costante, ρ_t può essere quindi espressa come:

$$\rho_t = (1-L)Me^{\theta t} + L$$

Il parametro M, l'intercetta della funzione, è dato da: $M = (\rho_0 - L)e^{-(v+1/2N)t} / (1-L)$ e rappresenta la massima associazione quando θ è pari a zero. Il parametro M fornisce l'interpretazione evolutiva dell'equazione: un valore di M non significativamente diverso da 1 è consistente con un'origine monofiletica degli aplotipi dalla linea fondatrice, mentre un valore di M inferiore a 1 implica un'origine polifiletica.

Aniché esprimere la probabilità di associazione in funzione del tempo, risulta più conveniente utilizzare una misura di distanza lungo i cromosomi (Morton et al. 2001). Ciò può essere ottenuto sostituendo il fattore θt con ϵd dove il parametro ϵ rappresenta il declino esponenziale della probabilità di associazione ρ all'aumentare della distanza d tra due loci SNPs espressa in chilobasi (Kb) (Maniatis et al. 2005). In tal modo, la probabilità di associazione può essere riformulata in funzione della distanza secondo l'equazione:

$$\rho_d = (1-L)Me^{-\epsilon d} + L \quad [1]$$

Questa equazione è del tutto analoga al modello di Isolamento per Distanza formulato da G. Malécot nel 1948.

La metrica ρ è unica e peculiare nel descrivere il pattern di LD tra diverse popolazioni e differenti regioni cromosomiche (Morton et al. 2001) in quanto il suo calcolo è basato su solide teorie evolutive (Shete 2003) ed è applicabile sia a campioni costituiti da gruppi familiari sia a campioni formati da individui non imparentati (Zhang et al. 2002, 2004b). Inoltre la funzione [1] è caratterizzata da parametri biologicamente interpretabili e rappresenta la base per la costruzione di mappe metriche espresse in Unità di Linkage Disequilibrium (LDUs) (Collins et al. 2004).

IV.4. Mappe di LD come strumento di mappaggio per geni malattia

Collins e collaboratori hanno sviluppato un approccio alternativo per l'identificazione di loci che conferiscono suscettibilità a patologie complesse attraverso la costruzione di mappe metriche in LDUs. Questa metodologia utilizza un adattamento della equazione [1] in cui viene introdotto il parametro S per determinare la localizzazione di massima verosimiglianza di un putativo locus malattia in una regione candidata. Tale adattamento, proposto per la prima volta da Zhang et al. nel 2002, si basava sulla trasformazione dell'equazione di Malécot in una funzione di regressione in cui il coefficiente di regressione, β , tra un marcatore (SNP) e la patologia in esame veniva stimato in funzione di quattro parametri:

$$\beta = (1 - L)Me^{-\epsilon\Delta(S-\hat{S})} + L \quad [2]$$

dove S è la posizione dello SNP marcatore (espressa in Kb o LDUs), \hat{S} è la posizione stimata per lo SNP causale, il delta di Kronecker (Δ) è pari a 1 se $S > \hat{S}$ oppure -1 se $S < \hat{S}$. Il parametro ϵ in questo caso rappresenta il declino esponenziale dell'associazione della patologia con la distanza e l'asintoto L può o essere derivato dal campione (L_p) o può essere stimato (L) (Collins & Lau 2008).

Nella sua prima formulazione l'approccio regressivo era stato applicato allo studio dell'associazione tra un sistema multiplo di marcatori del gene ACE in un gruppo di famiglie britanniche (Zang et al. 2002). Successivamente il modello regressivo è stato esteso allo studio di una coorte di individui sani non imparentati (Maniatis et al 2004) ed infine è stato esteso agli studi caso-controllo (Scapoli et al. 2005a), in cui le distribuzioni genotipiche dei markers analizzati nel gruppo dei casi e in quello dei controlli (mostrate in

Tabella IV.1) permettono la riduzione ad una tabella 2x2 di frequenze alleliche (Tabella IV.2)

		Genotipi al locus SNP			T
		PP	PP'	P'P'	total
Casi		n ₁₁	n ₁₂	n ₁₃	n ₁
Controlli		n ₀₁	n ₀₂	n ₀₃	n ₀

Tabella IV.1.

Se le distribuzioni genotipiche sono in accordo con l'equilibrio di Hardy-Weinberg, è possibile calcolare un chi-quadrato con 1 grado di libertà (g.d.l.) dato da:

$$\chi^2 = (a_0 d_0 - b_0 c_0)^2 n / (a_0 + b_0)(c_0 + d_0)(a_0 + c_0)(b_0 + d_0)$$

Collins & Morton (1998) hanno sviluppato un fattore di arricchimento (ω) per correggere l'eccesso di casi presenti nel disegno di studio in modo tale da ricostruire un campione casuale di alleli, come riportato in tabella:

		Alleli al locus SNP		Totale
		P	P'	
Casi		a ₀ = 2n ₁₁ +n ₁₂	b ₀ = n ₁₂ +2n ₁₃	a ₀ +b ₀
Controlli		c ₀ = 2n ₀₁ +n ₀₂	d ₀ = n ₀₂ +2n ₀₃	c ₀ +d ₀
				n = a ₀ +b ₀ +c ₀ +d ₀
Casi		a =	b =	a+b
Controlli		c =	d =	c+d
				N = a+b+c+d

Tabella IV.2.

Data la frequenza di affezione, z, nella popolazione generale, il fattore di arricchimento ω viene definito come il rapporto tra il numero dei casi e il numero dei controlli

moltiplicato per il rapporto tra la frequenza di affezione nella popolazione generale e quella del fenotipo normale:

$$\omega = [(n_{11}+n_{12}+n_{13})/(n_{01}+n_{02}+n_{03})] * [(1-z)/z]$$

Il parametro di regressione β , pertanto, può essere ottenuto per aggiustamento del numero dei controlli secondo l'equazione:

$$\beta = |a(\omega d) - b(\omega c)| / (a + \omega c)(b + \omega d)$$

dove la corrispondente informazione è data da $K_{\beta} = \chi^2 / \beta^2$ e la varianza residua viene espressa come:

$$V = \sum K_{\beta_i} (\hat{\beta}_i - \beta_i)^2 / (n - k)$$

β_i e $\hat{\beta}_i$ sono rispettivamente i coefficienti di regressione osservato e atteso per il marcatore i -esimo, n corrisponde al numero dei polimorfismi analizzati e k è il numero di parametri stimati nel modello di Malécot (Scapoli et al. 2005a).

Dato il coefficiente di regressione β , i parametri del modello di Malécot sono stimati iterativamente utilizzando una likelihood composita ($-2\ln L$) che incorpora le informazioni derivanti dall'analisi di marcatori multipli (Maniatis et al. 2007).

In tal modo l'analisi risulta più potente da un punto di vista statistico rispetto al caso in cui ogni SNP sia considerato separatamente, evitando infatti l'applicazione della correzione di Bonferroni per test multipli, e l'associazione può essere stimata anche senza la ricostruzione degli aplotipi.

Questo modello presenta inoltre altri vantaggi: considera l'ipotesi di mutazioni 'fondatrici' multiple e permette il raggruppamento di dati eterogenei provenienti da studi diversi (meta-analisi) mantenendo un elevato potere statistico (Scapoli et al. 2005a).

Le equazioni [1] e [2] vengono pertanto utilizzate nella costruzione di mappe di LD, che godono della proprietà di additività delle distanze (Maniatis et al. 2002) e sono monotoniche con le mappe genetiche e fisiche (Zhang et al. 2002, De La Vega et al. 2005, Maniatis et al. 2007) e per il clonaggio posizionale di geni candidati.

Caratteristiche delle mappe metriche espresse in Unità di Linkage Disequilibrium: le mappe di LD sono analoghe alle mappe genetiche di Linkage ma differiscono

sostanzialmente da esse in quanto tengono conto del tempo durante il quale gli eventi di ricombinazione si sono accumulati (Collins et al. 2004, Morton 2005). Le equazioni [1] e [2] vengono utilizzate per stimare il valore medio di ϵ in ogni intervallo di mappa tra loci SNPs adiacenti. La distanza genetica di mappa, espressa in termini di LDUs, è data dal prodotto $\epsilon_i d_i$ per ogni intervallo i -esimo, all'interno della regione da analizzare. Poiché le distanze espresse in LDUs sono additive, la regione in studio risulterà perciò costituita da $\sum \epsilon_i d_i$ unità di LD totali dove d_i è la distanza espressa in Kb tra coppie di SNPs adiacenti (Collins et al. 2004, Tapper et al. 2005).

L'algoritmo che consente la costruzione di mappe in LDUs è implementato nel software *CHROMSCAN* (<http://cedar.genetics.soton.ac.uk/pub/PROGRAMS>) che permette di stimare il parametro ϵ in ogni intervallo di mappa (Tapper et al. 2003, Collins & Lau 2008).

Il valore medio di ϵ è il limite entro il quale il LD è utile per il mappaggio genico ed è dato da $\sum \epsilon_i d_i / \sum d_i$, mentre il suo inverso, $1/\epsilon$, è definito 'swept radius' e riflette l'estensione del LD 'utile', ovvero la distanza in Kb alla quale il disequilibrio declina a ~ 0.37 volte (e^{-1}) dal suo valore iniziale (Scapoli et al. 2005a, Lau et al. 2007, Collins & Lau 2008).

Pertanto, è richiesta una distribuzione il più possibile uniforme di SNPs, per ogni unità di LD per la completa copertura della regione cromosomica da analizzare ed in modo da massimizzare il potere statistico nel descrivere il pattern di LD della regione in studio (Collins et al. 2004).

Recenti stime basate sulla costruzione di mappe di LD ad alta densità di SNPs per i cromosomi 6, 21 e 22, suggeriscono che lo swept radius medio per le popolazioni caucasiche ed asiatiche si aggira attorno ad un intervallo di 30-56 Kb e cade in un range di 22-41 Kb per le popolazioni afro-americane (De La Vega et al. 2005).

Il numero di LDUs, per un dato segmento cromosomico, è inversamente proporzionale al livello di ricombinazione: regioni caratterizzate da un esteso LD e da un tasso di ricombinazione basso possiedono poche LDUs, mentre in regioni cromosomiche con molte LDUs si osservano alti livelli di crossino over (step regions) (Tapper et al. 2003).

Le mappe di LD pertanto sono caratterizzate da una struttura costituita da steps e plateaus: i plateaus corrispondono a blocchi di bassa diversità aplo-tipica e quindi di elevato LD definiti da $\epsilon_i=0$, mentre gli steps ($\epsilon_i>0$) corrispondono a regioni caratterizzate da eventi di crossing over; la magnitudo degli steps riflette l'intensità della ricombinazione (Maniatis

et al. 2004, Kuo et al. 2007). Plottando le LDUs in funzione della distanza fra coppie di SNPs, espressa in Kb, è possibile rappresentare graficamente la struttura ‘block-step’ della regione in studio (Collins et al. 2004) (Figura IV.4).

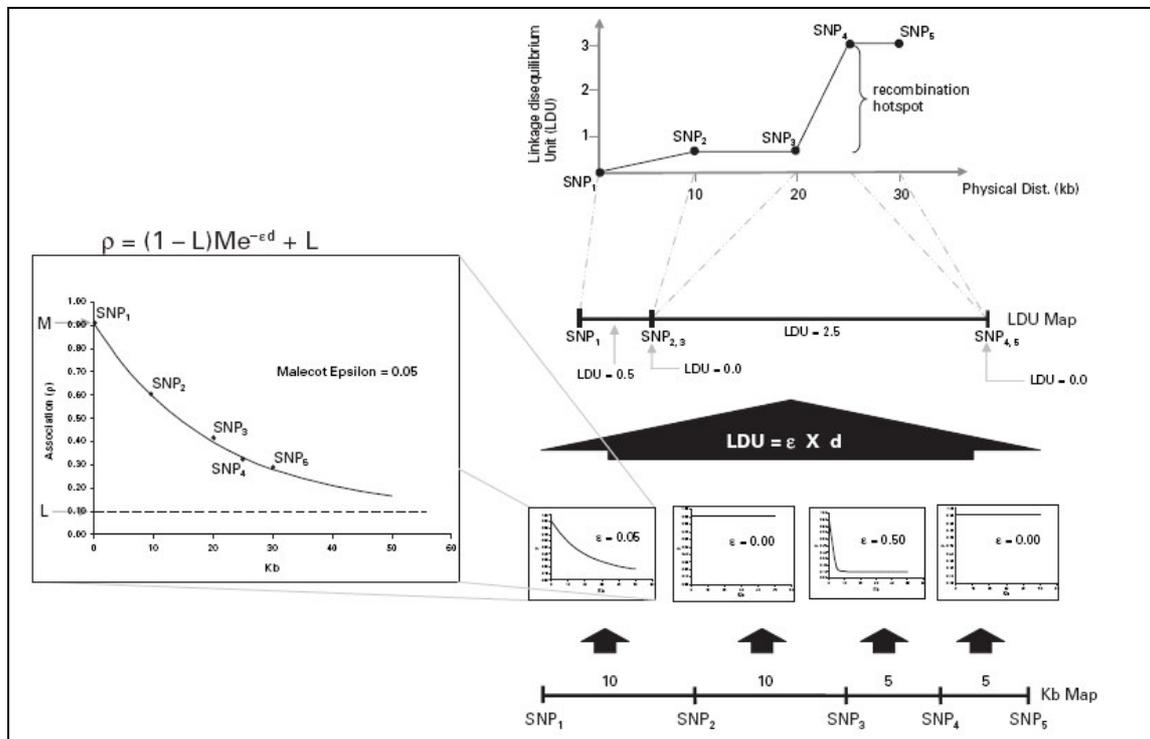


Figura IV.4. Esempio di costruzione di una mappa di LD con 5 SNPs. Il parametro ϵ è stimato per ognuno dei quattro intervalli di mappa e le LDUs sono calcolate per ciascun intervallo come ϵd . Il grafico a sinistra mostra il declino del LD tra lo SNP1 e gli altri SNPs in funzione della distanza. La mappa in LDU risultante riflette la forza del LD tra gli SNPs 2 e 3 e gli SNPs 4 e 5 e la probabile presenza di un putativo hot-spot di ricombinazione tra gli SNPs 3 e 4 (Collins et al., 2004).

Applicazione delle mappe di LD ai fini di clonaggio posizionale: per testare l'esistenza di uno SNP causale all'interno di una regione candidata, Maniatis et al. (2005) utilizzano un modello gerarchico di LD che prende in considerazione quattro differenti 'sub-ipotesi' del modello di Malécot (Figura IV.5):

- **Il Modello A** è il cosiddetto modello 'base' in cui nessuno dei parametri viene stimato: in tal modo $M=0$ e il parametro L è ricavato dal campione ($L=L_p$). Il modello A, in pratica, è considerato l'ipotesi nulla (H_0) per la quale non esiste associazione tra il fenotipo malattia e il marcatore; qualsiasi associazione riscontrata, pertanto, è attribuibile ad un 'background' o 'rumore di fondo' (Scapoli et al. 2005a).
- **Il Modello B**, simile al Modello A, considera $M=0$, ma stima il parametro L ; un aumento significativo di L rispetto ad L_p implica un'associazione positiva a livello della

regione di interesse senza però fornire informazioni circa la localizzazione precisa del polimorfismo causale (Maniatis et al. 2007). Il Modello B, pertanto, consente di testare un'ipotesi di "associazione generale" della regione candidata (Collins & Lau 2008).

- **Il Modello C** considera $L=L_p$ ma stima l'intercetta M e il parametro S , che rappresenta la posizione di un potenziale gene causativo all'interno della regione candidata.
- **Il Modello D**, infine, rappresenta l'ipotesi alternativa più complessa in quanto prevede la stima dei tre parametri L , M ed S contemporaneamente e quindi la definizione del modello genetico in tutti i suoi aspetti.

Per tutti e quattro i modelli, il parametro ϵ nelle equazioni [1] e [2] è fissato ad 1 per le mappe in LDUs ed è assunto pari a 0,02 per le mappe in Kb, come stabilito da Morton et al. 2007.

Poiché Modello A è considerata l'ipotesi nulla, confronto fra i Modelli A-B, A-C e A-D permette di testare l'esistenza di un polimorfismo causale all'interno della regione analizzata (Maniatis et al. 2004).

La significatività dei tre tests viene valutata attraverso un chi-quadrato (χ^2) il cui calcolo è basato sulla differenza tra la likelihood composta di ciascun modello a confronto divisa per la varianza residua dell'ipotesi più complessa. I tests A-B, A-C e A-D, hanno rispettivamente 1, 2 e 3 g.d.l (Morton et al. 2007).

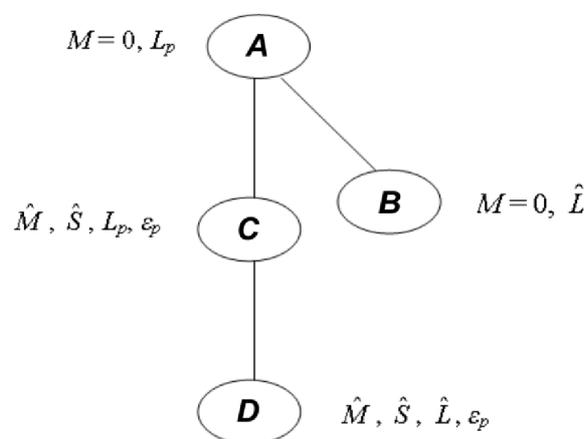


Figura IV.5. ‘Sub-ipotesi’ del modello di Malécot. L'accento circonflesso indica il parametro stimato nel mappaggio di associazione e la lettera p al pedice indica il parametro stimato dai dati (Morton et al., 2007).

Nel presente lavoro viene applicata questa metrica basata sulla regressione utilizzando dati genotipici ottenuti dalla tipizzazione di 60 SNPs per costruire una mappa di LD della regione candidata 2q13-14 e testare l'esistenza di un SNP causale all'interno di tale segmento cromosomico.

IV.5. Analisi Statistiche

Utilizzando i dati relativi ai 60 SNPs selezionati è stato verificato se le distribuzioni dei genotipi, nelle sottopopolazioni dei casi e dei controlli, sono in accordo con la legge di Hardy-Weinberg attraverso il calcolo del χ^2 di equilibrio. Per questa analisi è stato utilizzato il software *ARLEQUIN* (versione 3.11, Excoffier et al. 2005).

Al fine di verificare, inoltre, l'esistenza di un'associazione allelica tra ciascuno dei polimorfismi analizzati e il fenotipo patologico, sono stati utilizzati il test esatto di Fisher, il test del χ^2 di indipendenza e l'Odds Ratio (O.R.), implementati nel software *PLINK* versione 0.99s (Purcell et al. 2007).

Questo programma ha permesso inoltre di condurre l'analisi di associazione della patologia tra differenti clusters mediante il test Cochran-Mantel-Haenszel applicato a tabelle di contingenza stratificate. Il livello di significatività scelto è la convenzionale soglia al 5%. Quando necessario, i livelli di significatività sono stati sottoposti alla correzione di Bonferroni per confronti multipli.

IV.5.1. Tests di omogeneità

Al fine di ottenere un incremento del potere statistico, si è verificato se i due campioni in studio, provenienti dalle aree geografiche di Ferrara e Napoli, potessero essere aggregati in un'unica popolazione verificando la presenza di stratificazione mediante il software *PLINK* versione 0.99s (Purcell et al. 2007). Questo programma utilizza un sistema di clustering gerarchico basato sul calcolo della proporzione di alleli identici di fatto (Identical by State, IBS) condivisi tra coppie di individui e permette di: a) raggruppare gli individui in subsets omogenei; b) eseguire un'analisi di *scaling* multidimensionale o Multidimensional Scaling (MDS) per visualizzare graficamente la substruttura del campione in analisi; c) individuare la presenza di individui outliers rispetto agli altri soggetti in studio.

La procedura di clustering, implementata nel software, inizia considerando ciascun individuo come un unico cluster di dimensione uno e prosegue raggruppando

(ripetutamente) di volta in volta gli individui geneticamente più simili; la procedura di “aggregazione” si arresta quando tutti gli individui vengono assegnati al numero di gruppi specificati nell’analisi. Per campioni costituiti da soggetti affetti e controlli, è possibile utilizzare una serie di opzioni che permettono di: fissare il numero o la dimensione massima di ciascun cluster, combinare l’informazione fenotipica con la dimensione di ogni gruppo specificando, ad esempio, che ogni cluster può contenere non più di un caso e due controlli ed infine, valutare diversi criteri di appaiamento sia categorici che quantitativi quali l’età, il sesso ed eventuali variabili ambientali.

PLINK fornisce un ulteriore metodo per verificare la presenza di stratificazione nel campione: anziché raggruppare gli individui in clusters discreti è possibile eseguire un’analisi MDS. Questa tecnica di analisi multivariata permette di ottenere una rappresentazione degli 'n' soggetti, che costituiscono il campione in studio, in uno spazio di 'k' dimensioni, attraverso la costruzione di una matrice NxN di distanze genetiche tra ciascuna coppia di soggetti in termini di IBS, come descritto precedentemente.

L'applicazione di questa tecnica esplorativa permette di trovare la configurazione che meglio approssima le distanze osservate tra soggetti ed i valori ottenuti dall'analisi possono essere riportati in un grafico a due dimensioni e rappresentate dalle prime due componenti principali, dove ogni punto è un individuo ed è possibile identificare l'eventuale esistenza di clusters.

Infine, per individuare la presenza di outliers nella popolazione in esame, l’algoritmo stima le distanze genetiche di ciascun soggetto con due o più individui geneticamente simili ad esso (*n*th-nearest neighbors) rispetto al resto del campione in studio ed ottiene quindi una distribuzione di distanze genetiche da cui è possibile calcolare la variabile standardizzata *z*. Il software, sostanzialmente, raggruppa tutti gli individui che compongono il campione sulla base delle loro similarità genetiche e restituisce un output in cui riporta, per ciascun individuo, un elenco ordinato dei soggetti geneticamente più simili al probando di riferimento.

Gli individui che presentano uno *z*-score inferiore a 2,57 ($P < 0,01$) vengono considerati outliers.

IV.5.2. Determinazione degli aplotipi

I metodi di laboratorio descritti nel paragrafo precedente ed utilizzati per ricavare i dati genotipici dal campione in studio, non forniscono informazioni circa la fase degli SNPs sul cromosoma. Pertanto, al fine di evitare ulteriori complesse e costose tecniche di laboratorio

che prevedono il clonaggio dei cromosomi in stato aploide o il genotyping addizionale dei familiari degli individui oggetto di studio, è possibile ricorrere all'uso di metodi statistici che permettono di inferire la fase stessa a partire dal dato dei singoli SNPs (Stephens et al. 2001).

A questo scopo, nel presente lavoro, viene utilizzato un algoritmo di ricostruzione degli aplotipi implementato nel software *PLINK*.

Questo programma permette di stimare le frequenze aplotipiche, dai dati genotipici osservati, attraverso un criterio di Maximum-Likelihood, basandosi sull'algoritmo Expectation-Maximization (EM) (Excoffier & Slatkin 1995). Si tratta di una procedura iterativa il cui scopo è quello di stimare le frequenze aplotipiche che massimizzano la probabilità di ottenere i dati osservati; tali stime sono note come 'stime della massima verosimiglianza'.

L'algoritmo EM implica l'assunzione di equilibrio di Hardy-Weinberg e il principio su cui si basa prevede: 1) una stima iniziale (random) delle frequenze aplotipiche per ogni dato genotipico a fase ignota osservato; 2) l'utilizzo di questi valori iniziali per calcolare, durante il primo ciclo di iterazione, le nuove frequenze genotipiche attese (step-E); 3) le frequenze genotipiche relative, ottenute nello step-E, vengono utilizzate come "pesi" per una nuova stima delle frequenze aplotipiche (step-M); 4) i cicli 2) e 3) vengono ripetuti finché l'algoritmo non giunge a convergenza.

PLINK utilizza diversi approcci per la ricostruzione degli aplotipi. Mediante il metodo delle "sliding windows" il software analizza il primo segmento (window) contenente un numero specificato di polimorfismi e restituisce tutti i possibili aplotipi all'interno di quel segmento; la finestra successivamente si sposta di una posizione e il software inferisce la fase degli SNPs appartenenti al segmento seguente e così via.

La velocità di esecuzione del programma dipende esponenzialmente dalla dimensione della "sliding window" specificata nell'analisi.

In alternativa tutti gli aplotipi ad un dato locus possono essere stimati fornendo al software un file, di estensione .hlist, contenente una lista in cui sono già specificati blocchi predefiniti di SNPs sui quali inferire la fase (es: blocco1: snp1, snp2, snp3; blocco2: snp4, snp5 ecc.).

Il programma *PLINK* fornisce, per entrambi i metodi adottati, un output con una lista di tutti i possibili aplotipi (per ogni window o blocco specificati) con le relative frequenze sia per il gruppo dei casi che per il campione dei controlli secondo la 'migliore ricostruzione' e verifica la presenza di associazione tra il fenotipo patologico e gli aplotipi inferiti

attraverso il calcolo di un chi-quadrato con i gradi di libertà appropriati, in funzione della dimensione della finestra o del blocco impostati, ed il relativo p-value.

L'opzione "*proxy association*" implementata nel programma *PLINK*, fornisce un ulteriore metodo per testare la forza di associazione tra un particolare SNP di riferimento (reference SNP) e la patologia in esame attraverso la ricostruzione dei possibili aplotipi inferiti (con una frequenza superiore all'1%) considerando tre SNPs a valle e tre a monte rispetto al polimorfismo di riferimento. Le frequenze aplotipiche osservate, anche in questo caso, sono confrontate tra casi e controlli tramite test del χ^2 .

Per l'analisi del Linkage Disequilibrium della regione candidata 2q13-14 è stato utilizzato il software *HAPLOVIEW* version 4.0 (Barrett et al. 2005).

Questo programma calcola, per ogni coppia di SNPs in esame, la statistica D' e il coefficiente di correlazione r^2 i cui valori vengono utilizzati per creare una rappresentazione grafica dell'estensione del LD nella regione cromosomica in studio. Il livello di LD viene evidenziato attraverso una scala cromatica di diverse intensità di colore.

Il software *HAPLOVIEW* consente inoltre di utilizzare differenti metodi per l'identificazione dei blocchi aplotipici all'interno della regione in esame (Gabriel et al. 2002, Wang et al. 2002, Barrett et al. 2005) ed effettua, in un campione costituito da soggetti affetti e controlli, un'analisi di associazione tra gli aplotipi inferiti in ciascun blocco aplotipico e il fenotipo patologico.

Nel presente lavoro, per l'individuazione dei blocchi aplotipici, è stata utilizzata l'opzione '*solide spine*' (Barrett et al., 2005) implementata nel software. Questo metodo si basa sulla ricerca, di un punto o zona ("spine") di elevato LD: il programma, "scorre" da un marcatore ad un altro lungo i lati di un ipotetico triangolo generato dal confronto fra coppie di SNPs. In tal modo il primo e l'ultimo marker di ciascun blocco risultano in LD con tutti gli altri polimorfismi all'interno del blocco stesso, ma tali marcatori 'intermedi' non sono necessariamente in LD tra loro.

Il file di output contiene, per ogni aplotipo ricostruito, i markers che lo compongono con le relative frequenze ed un parametro, definito D' multiallelico, il cui valore rappresenta il grado di LD tra due blocchi adiacenti.

CAPITOLO V

- Risultati -

V.1 Controllo di Qualità e dell'Equilibrio di Hardy-Weinberg

A seguito del controllo di qualità, tra i 60 markers selezionati, 2 polimorfismi sono stati esclusi dalle analisi successive poiché sono risultati monomorfici. Tra i rimanenti 58 SNPs correttamente caratterizzati, solo 2 marcatori tra i campioni derivanti dai casi hanno mostrato una deviazione significativa dall'equilibrio di HW (Tabella V.1).

ID SNP	P HW CASI	P HW CONTR.	ID SNP	P HW CASI	P HW CONTR.
rs4848300	0,451	0,369	rs6751201	0,093	0,271
rs17561	0,451	0,369	rs1015754	0,854	0,000
rs10496444	0,151	0,837	rs1110839	0,867	0,152
rs12469600	0,727	0,406	rs2018348	0,279	0,846
rs3917368	0,950	0,290	rs1374161	0,326	0,501
rs1143634	0,069	0,189	rs4848327	0,414	0,681
rs1143627	0,469	0,768	rs2002510	0,797	0,982
rs16944	0,394	0,914	rs4404277	0,749	0,562
rs4849127	0,308	0,382	rs1191694	1,000	0,377
rs2708919	0,380	0,145	rs2008324	0,933	0,804
rs7577574	0,170	0,679	rs6739740	0,599	0,906
rs2723163	0,251	0,195	rs11123181	0,038	0,459
rs879711	0,229	0,216	rs1968615	0,312	0,796
rs895497	0,202	0,183	rs1867870	0,312	0,803
rs2305150	0,251	0,357	rs1739538	0,341	0,718
rs1562302	0,107	0,658	rs11123202	0,776	0,980
rs1800930	0,086	0,452	rs11123205	0,308	0,501
rs2515402	0,117	0,496	rs4849261	0,440	0,982
rs6759676	0,657	0,821	rs935644	0,547	0,876
rs1623119	0,513	0,399	rs2166966	0,885	0,433
rs4251961	0,956	0,920	rs4848348	0,705	0,876
rs454078	0,751	0,596	rs7587985	0,057	0,680
rs315943	0,279	0,501	rs11123208	0,396	0,000
rs11123167	0,784	0,194	rs4450608	0,535	0,681
rs12475781	0,213	0,675	rs4849285	0,117	0,816
rs724496	0,852	0,547	rs1028245	0,030	0,939
rs4849159	0,924	0,586	rs9941677	0,093	0,917
rs6761202	0,708	0,609	rs12995005	0,128	0,906
rs1975535	0,439	0,775	rs6740934	0,763	0,691

Tabella V.1. Verifica dell'Equilibrio di Hardy-Weinberg nel gruppo dei casi (P HW CASI) e nel campione dei controlli (P HW CONTR.) per ciascun SNPs.

V.2 Tests di stratificazione

Sulla base dei dati derivanti dell'intero complesso di SNPs, è stata costruita la matrice 216x216 delle distanze genetiche basata sul calcolo della proporzione di alleli identici di fatto (Identical by State, IBS) utilizzando il software PLINK e attraverso il Multidimensional Scaling (MDS). Mediante MDS, è stato possibile ottenere un grafico ove ciascun punto rappresentasse un singolo individuo e i due assi generassero una immagine dei dati ridotto a due dimensioni (Figura V.1.).

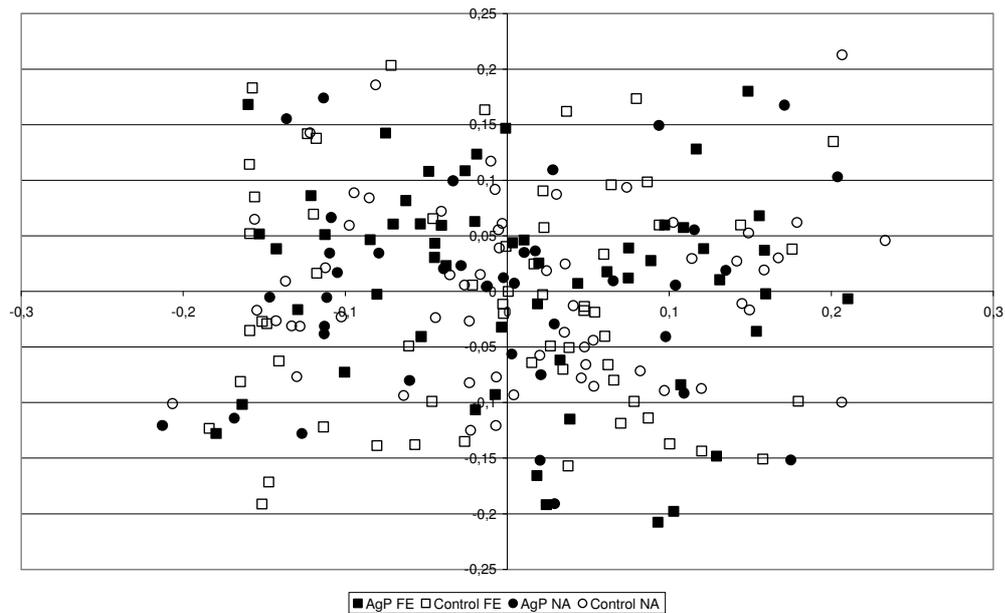


Figura V.1. Analisi Multi Dimensional Scaling per verificare la stratificazione della popolazione in relazione ai 2 sottogruppi analizzati: Ferrara (FE, quadrati) e Napoli (NA, cerchi).

La distribuzione uniforme dei punti sul grafico indica chiaramente la assenza di eterogeneità tra le due sottopopolazioni (Ferrara e Napoli). Per verificare ulteriormente la omogeneità tra sottopopolazioni, è stato effettuato il test di Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) per campioni stratificati. Al test CMH, il marker più eterogeneo è risultata la variante rs895497 che è comunque risultata non significativamente differente nelle due sottopopolazioni [$\chi^2_{[CMH]} = 2.1$, p-value=0.146, $OR_{[CMH]} = 1.4$ (95%CI 0.90-2.08)].

Da queste analisi è stato possibile concludere che le due sottopopolazioni campionate, Ferrara e Napoli, erano geneticamente omogenee per la regione cromosomica analizzata e, di conseguenza, potevano essere trattate come una popolazione unica di casi e controlli.

V.3 Analisi Single-point

Nella Figura V.2 vengono riportati i valori di significatività ottenuti dal confronto tra la distribuzione delle frequenze genotipiche e alleliche riscontrate nei casi e nei controlli. Dai tests su frequenze alleliche e genotipiche, è emerso un livello significativo ($p < 0.05$) solo per le distribuzioni genotipiche del polimorfismo di rs6751201, che mappa nel decimo introne del gene omologo SEC7.

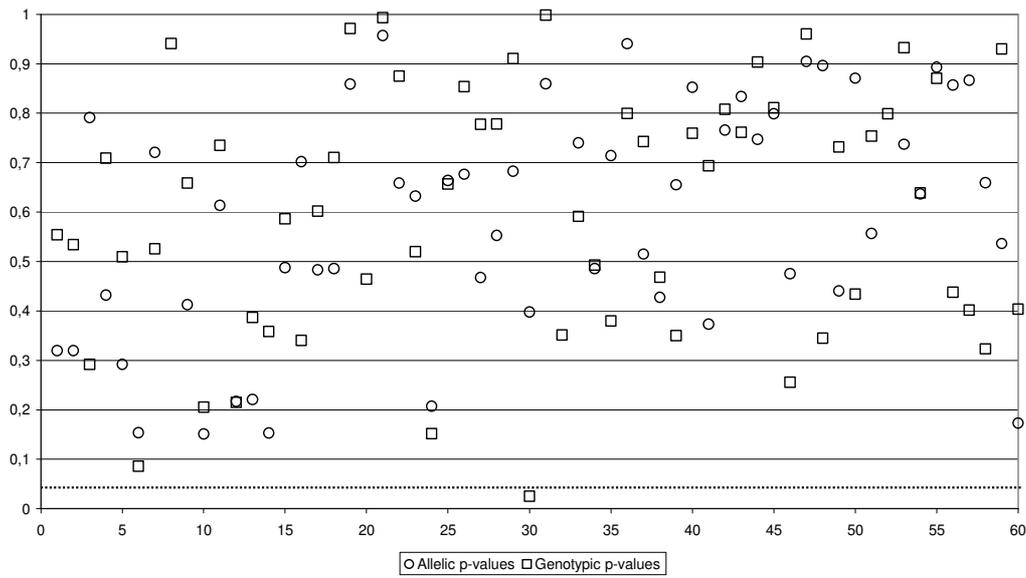


Figura V.2. Analisi allelica e genotipica “single-point”. Per ciascun marcatore viene mostrato il valore p ottenuto dal confronto tra casi e controlli relative alle frequenze genotipiche (quadrati) e alleliche (cerchi). La linea tratteggiata rappresenta il livello soglia di significatività del 5%.

V.4 Studio della Struttura LD nella regione 2q13-14

L'estensione del LD tra gli SNPs selezionati all'interno della regione candidata è stata valutata, in prima analisi, tra coppie di marcatori mediante la stima della statistica D' e dal coefficiente di correlazione r^2 . Tale analisi viene raffigurata in Figura V.3. Usando l'opzione “solid spine” del programma HAPLOVIEW, all'interno della regione 2q13-14 sono stati osservati 17 blocchi di forte LD, la cui dimensione variava tra 7 and 136 Kb.

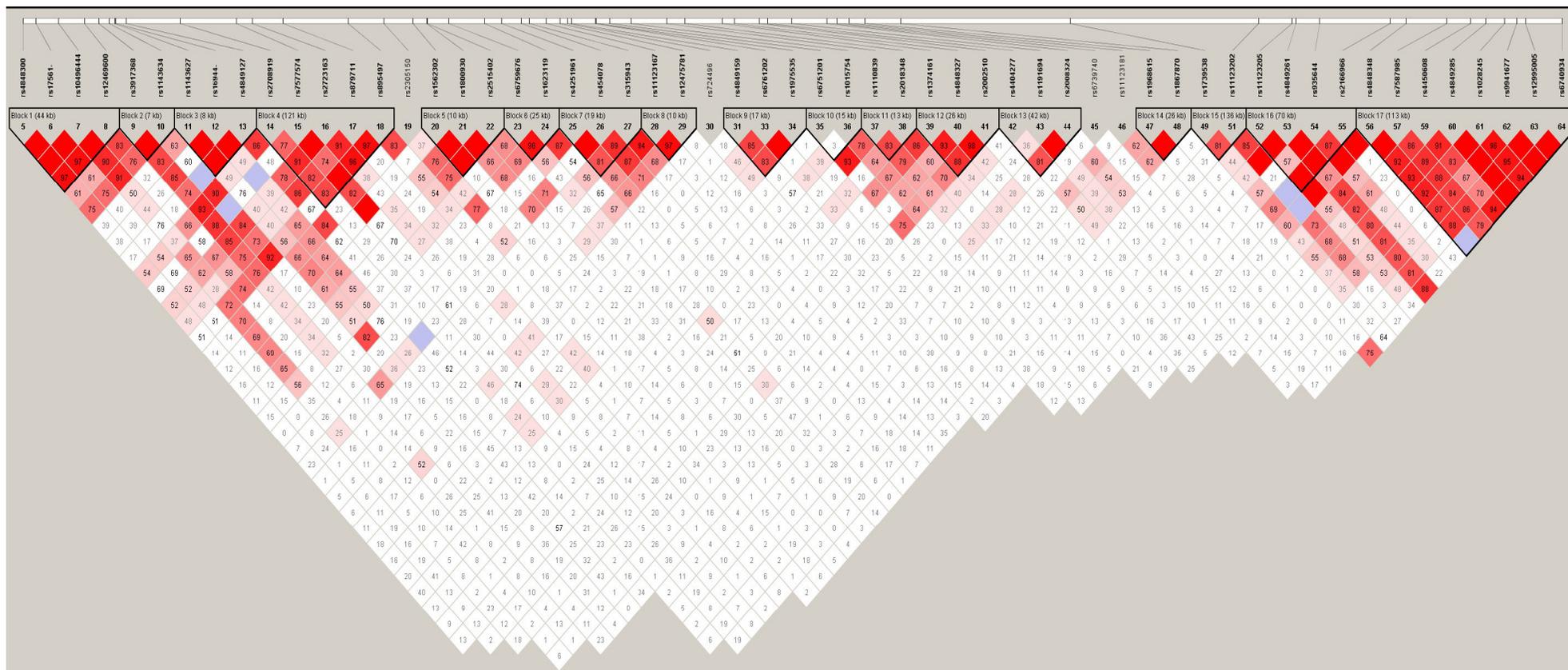


Figura V.3.

Mediante programma CHROMSCAN, è stata costruita una mappa LD della regione 2q13-14 in base al modello di Malécot per marcatori multipli. La scelta di copertura per ogni unità di LD è stata di 4 SNPs/LDU con una distanza media tra SNPs di 15.75 ± 11 Kb.

La struttura cromosomica della regione candidata, che viene mostrata in Figura V.4, è stata ricavata tracciando, sulle distanze in kb, le distanze in LDU ottenute con: **a)** i dati per la popolazione Caucasica provenienti dalla banca dati dell'HapMap project (spezzata blu) **b)** i dati complessivi della popolazione Italiana (spezzata rosa) **c)** i soggetti controllo (spezzata gialla) **d)** i pazienti affetti da AgP (spezzata azzurra).

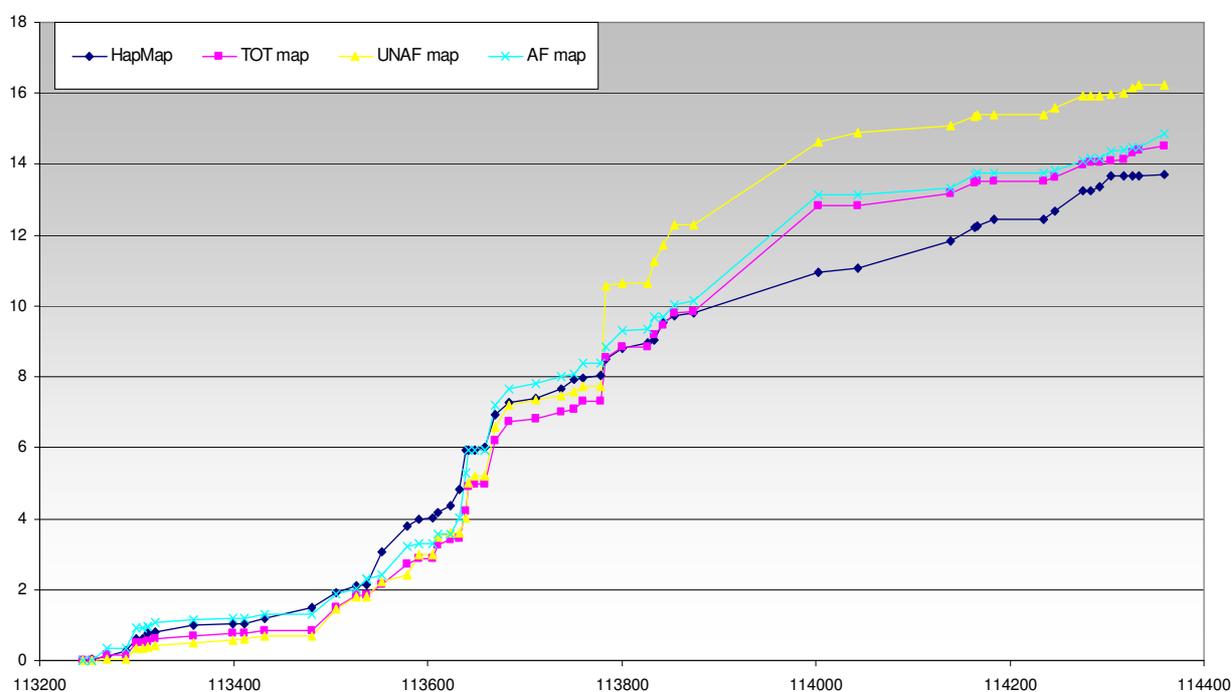


Figura V.4. Grafico della mappa di LD per la regione 2q13-14. Sull'asse delle ascisse è riportata la posizione fisica (in kb) degli SNPs selezionati mentre sull'asse delle ordinate è riportata la distanza in unità di LD (LDUs).

Le 4 mappe di LD mostrano profili molto simili, con una lunghezza complessiva di circa 16 LDUs e, in particolare, la struttura cromosomica della regione 2q13-14 ottenuta dai dati della popolazione di studio Italiana conferma il profilo ottenibile dal database di HapMap.

V.5 Ricostruzione Aplotipica

In relazione al profilo "a blocchi" ottenuto dalla mappa LD e dall'analisi a coppie dei marcatori (Figura V.5), i 58 polimorfismi sono stati suddivisi in 4 regioni raggruppando 15

(Blocchi 1 - 4), 10 (Blocchi 5 - 8), 13 (Blocchi 9 - 13) e 16 (Blocchi 14 - 17) SNPs, rispettivamente; i rimanenti SNPs non sono stati attribuiti a nessun blocco. All'interno di ciascuna regione, sono stati ricostruiti tutti gli aplotipi a 3 ed a 6 marcatori tramite l'algoritmo Expectation-Maximization (Excoffier & Slatkin, 1995) implementato dal software PLINK utilizzando il metodo alternativo delle finestre sovrapposte (con lo scivolamento di 1 SNP a passo).

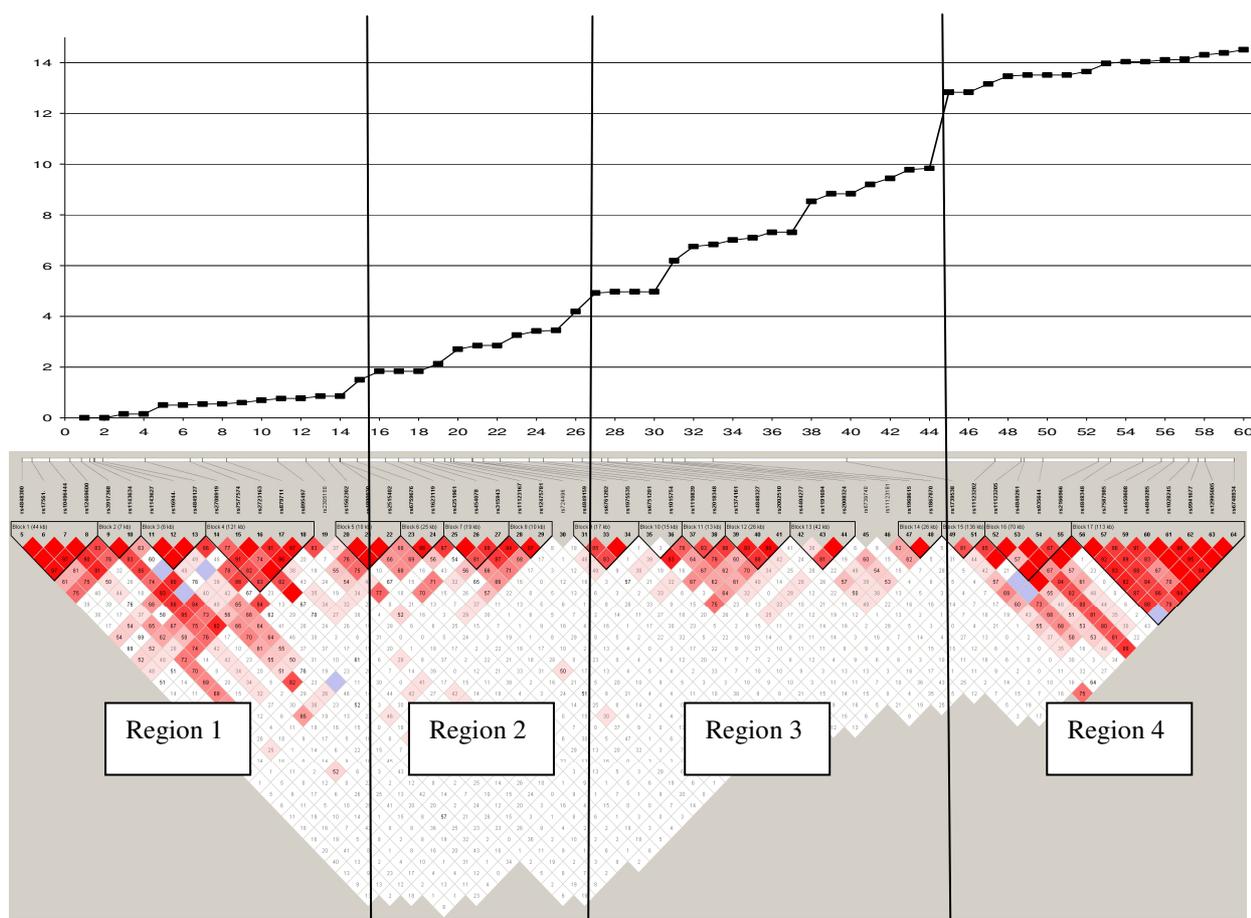


Figura V.5. Nel grafico la struttura LD, misurata mediante D' , è evidenziata dall'uso di una scala cromatica, in relazione alla locazione cromosomica degli SNPs considerati. Le barre verticali definiscono le 4 regioni identificate attraverso sia la mappa LD che la analisi "pairwise".

Le frequenze aplotipiche osservate sono state confrontate nei casi e nei controlli per verificare eventuali associazioni aplotipiche con la AgP. Nessuno degli aplotipi ottenuti ha mostrato una associazione significativa con la AgP. Nella Tabella 9 sono stati riportati gli specifici aplotipi risultati più significativamente associati alla condizione patologica. Gli aplotipi che contenevano la variante allelica che mappa all'interno di IL1F6 e IL1F8 (regione 1, blocco 4, SNPs: rs879711, rs895497, rs2305150, rs1562302), hanno

mostrato una associazione statisticamente significativa o borderline con la AgP (p-values variabili da 0.028 a 0.058) utilizzando sia finestre a 3 che a 6 marcatori. Gli aplotipi combinati da SNPs che mappano all'interno di IL1B (SNPs: rs3917368, rs1143634, rs1143627, rs16944) hanno rivelato una associazione borderline con la malattia (p-values: 0.046 and 0.053) solo per le finestre a 6 marcatori. Non è stata riscontrata alcuna associazione significativa nella regione dove mappano IL1A and IL1RN.

A								
haplotype	<i>Freq. in cases</i>	<i>Freq. in Controls</i>	<i>Assoc. χ^2</i>	<i>Df</i>	<i>P</i>		<i>SNPs</i>	
112	0,106	0,178	4,386	1	0,036	rs879711	rs895497	rs2305150
112	0,000	0,021	4,022	1	0,045	rs315943	rs11123167	rs12475781
111	0,087	0,040	4,039	1	0,045	rs6751201	rs1015754	rs1110839
221	0,027	0,067	3,633	1	0,057	rs6751201	rs1015754	rs1110839
212	0,101	0,166	3,763	1	0,052	rs28665122	rs34713741	rs11327127

B											
haplotype	<i>Freq. in cases</i>	<i>Freq. in Controls</i>	<i>Assoc. χ^2</i>	<i>Df</i>	<i>P</i>			<i>SNPs</i>			
122212	0,160	0,240	3,969	1	0,046	rs3917368	rs1143634	rs1143627	rs16944	rs4849127	rs2708919
222121	0,153	0,227	3,730	1	0,053	rs1143634	rs1143627	rs16944	rs4849127	rs2708919	rs7577574
221211	0,151	0,252	6,332	1	0,012	rs1143627	rs16944	rs4849127	rs2708919	rs7577574	rs2723163
211112	0,098	0,174	4,822	1	0,028	rs2708919	rs7577574	rs2723163	rs879711	rs895497	rs2305150
111212	0,040	0,094	4,445	1	0,035	rs2723163	rs879711	rs895497	rs2305150	rs1562302	rs1800930
112121	0,043	0,091	3,603	1	0,058	rs879711	rs895497	rs2305150	rs1562302	rs1800930	rs2515402
121221	0,002	0,033	5,149	1	0,023	rs4849159	rs6761202	rs1975535	rs6751201	rs1015754	rs1110839
211121	0,026	0,002	4,803	1	0,028	rs2018348	rs1374161	rs4848327	rs2002510	rs4404277	rs1191694
212112	0,051	0,013	5,035	1	0,025	rs4848327	rs2002510	rs4404277	rs1191694	rs2008324	rs6739740
111221	0,018	0,056	3,662	1	0,056	rs2008324	rs6739740	rs11123181	rs1968615	rs1867870	rs1739538
222211	0,023	0,062	3,738	1	0,053	rs6739740	rs11123181	rs1968615	rs1867870	rs1739538	rs11123202
222112	0,024	0,070	4,666	1	0,031	rs11123181	rs1968615	rs1867870	rs1739538	rs11123202	rs11123205

Tabella V.2. Aplotipi combinati più significativi tra quelli ottenuti utilizzando sia finestre a 3 (A) che a 6 (B) marcatori all'interno della regione cromosomica 2q13-14 e i loro corrispondenti test di associazione tra pazienti AgP e controlli.

Per verificare la presenza di un polimorfismo causale all'interno della regione candidate, in accordo con quanto riportato da Maniatis et al. (2004), l'ipotesi nulla (modello A), che assume la assenza di associazione tra la malattia e i marcatori considerati, è stata valutata comparandola alla ipotesi alternativa (modello D), in cui si assume l'esistenza di un allele determinante la malattia localizzato all'interno della regione 2q13-14. La significatività del chi quadro di massima likelihood è stata verificata tramite test di permutazione (sono stati effettuati 400 cicli di permutazione modificando casualmente, ad ogni ciclo, l'assegnazione dei 216 individui al gruppo dei casi o dei controlli).

Dal confronto A-D, non è emersa alcuna evidenza significativa della esistenza di una variante causale all'interno della regione candidata ($\chi^2=1.59$; $P=0.207$ per la mappa LDU).

CAPITOLO VI

- Discussione e Conclusioni -

Le cellule dei tessuti parodontali e dell'infiltrato infiammatorio in risposta alla colonizzazione della porzione sotto-gengivale della superficie radicolare da parte di batteri parodonto-patogeni, sono in grado di secernere citochine pro-infiammatorie e anti-infiammatorie a loro volta in grado di influenzare la estensione e la severità della distruzione dell'apparato di attacco del dente. Tra queste citochine, le pro-infiammatorie IL-1 α e IL-1 β e l'anti-infiammatoria IL-1Ra sembrano svolgere un ruolo determinante nella patogenesi delle Parodontiti. A tal riguardo, i polimorfismi relativi al cluster genico dell'IL-1 sono stati associati a differenze inter-individuali stabili nei livelli tissutali di IL-1 conseguenti a stimolo batterico e, di conseguenza, sono stati proposti come potenziali markers genetici per le malattie parodontali. È comunque da sottolineare che, nonostante l'ampio numero di studi, il ruolo del polimorfismo genico dell'IL-1 nella insorgenza e progressione delle forme distruttive di malattia parodontale, inclusa la AgP, rimane ipotetico ed è ancora lontano dall'aver un solido fondamento scientifico (Yoshie et al. 2007).

L'identificazione di fattori di rischio genetici per la Parodontite è complicata dalla esistenza di differenti forme fenotipiche della patologia, quali la Parodontite Cronica (ChP) e la forma aggressiva (AgP) (AAP International workshop 1999). Nel nostro studio, sono stati selezionati esclusivamente pazienti affetti da AgP. Questa scelta è stata basata sulle caratteristiche specifiche della patologia in esame. Mentre nei pazienti affetti da ChP la progressione della distruzione tissutale è lenta e la severità delle lesioni parodontali sembrano essere direttamente correlate alla carica infettante e alla esposizione all'insulto microbico, nei pazienti affetti da AgP si osserva una perdita di attacco severa e rapidamente progressiva peculiarmente in individui di giovane età, e solo in minima parte l'entità della distruzione parodontale può essere associata alla entità del biofilm dentale sopra- e sotto-gengivale. Queste caratteristiche fenotipiche della malattia sembrano rinforzare l'ipotesi che la suscettibilità individuale alla AgP sia associata a specifici tratti genetici (Hart 1996, Hodge & Michalowicz 2001). I pazienti affetti da AgP possono essere più facilmente e precocemente intercettati diagnosticamente rispetto ai pazienti con ChP. Inoltre, la AgP offre la possibilità di distinguere in maniera dicotomica i casi patologici dai controlli sani, mentre i pazienti con ChP presentano un ampio range di espressione fenotipica della malattia in relazione alla estensione e severità della

distruzione parodontale. Queste caratteristiche cliniche della patologia rendono la AgP un condizione patologica adatta, tra le varie forme di malattia parodontale, allo studio della associazione con polimorfismi genici, quali quelli relativi al cluster genico della IL-1.

Una revisione della letteratura disponibile sembra indicare che la prevalenza della AgP sia estremamente variabile tra differenti Paesi e gruppi etnici. Sfortunatamente, non esistono a tutt'oggi dati epidemiologici relativi alla prevalenza di AgP in Italia. Tassi di prevalenza modesti, variabili tra lo 0.1% e 0.2% sono stati riportati per l'Europa Caucasica, mentre tassi più alti, variabili dall'1% al 3%, sono stati riferiti agli Africani e Afro-Americani (Albandar & Tinoco 2002). Di conseguenza, per reclutare una coorte di casi sufficientemente ampia, è essenziale stabilire collaborazioni tra Centri clinici in modo da intraprendere studi di associazione con adeguata Potenza statistica. L'inclusione di differenti sotto-popolazioni provenienti da diverse aree geografiche può determinare una eterogeneità genetica e conseguenti problemi di stratificazione. Nel presente studio, la eterogeneità genetica tra due sotto-popolazioni derivanti da 2 Centri differenti (Ferrara e Napoli) è stata esclusa mediante analisi con test MDS e CMH.

In un nostro studio precedente, era stata trovata una debole associazione tra la forma generalizzata di AgP e il polimorfismo IL-1B+3953 ($P=0.039$) (Scapoli et al. 2005a). Un sostegno ulteriore, sia pur non significativo, per l'esistenza di una associazione tra il cluster genico dell'IL-1 e la AgP è emerso dal clonaggio posizionale tramite LD che indicava la posizione più probabile della variante causale in corrispondenza di questo marcatore, così come dalla analisi degli aplotipi, che ha trovato l'aplotipo IL-1B+3953-IL-1B-511 avere il minore livello di significatività (p-value) della regione. Inoltre, la frequenze genotipiche osservate per IL-1RN sono risultate significativamente diverse nei pazienti AgP rispetto ai controlli ($P=0.019$), nonostante le distribuzioni alleliche fossero simili nei due gruppi (Scapoli et al. 2005a).

Studi precedenti hanno suggerito che i loci polimorfici relativi al cluster genico dell'IL-1, includente i geni IL-1A, IL-1B e IL-1RN, possono essere in forte LD (Cox et al. 1998). Questi risultati contrastano con quelli di Parkill et al. (2000) che ha valutato la frequenza dei polimorfismi nei geni codificanti l'Interleuchina 1 β (IL-1B) e l'antagonista del suo recettore (IL-1RA) in 70 pazienti con AgP, arrivando a dimostrare un comportamento indipendente dei due polimorfismi nei confronti di una potenziale associazione con la patologia (Parkhill et al.

2000). Nella nostra precedente analisi (Scapoli et al. 2005a), il LD del cluster dell'IL-1 è stato descritto utilizzando 5 differenti varianti geniche comprese nella regione candidata. I nostri dati hanno indicato la presenza di due possibili "hot-spots": il primo tra IL-1B+3953 e IL-1B-511, il secondo all'interno della regione che porta il gene IL-1RN e il polimorfismo TIC. Questi risultati erano in accordo con quelli presentati da uno studio indipendente che ha costruito una mappa LDU (Zhang et al. 2002) della stessa regione cromosomica basata su 93 polimorfismi (Gohlke et al. 2004). Queste osservazioni, nel loro insieme, suggeriscono un comportamento indipendente tra i marcatori IL-1B+3953 e IL-1RN.

Il presente studio si proponeva di stabilire il ruolo dei geni compresi nel cluster dell'IL-1 nella patogenesi della AgP in una coorte Italiana Caucasica. In letteratura sono stati riportati risultati contrastanti relativamente alla associazione specifica tra suscettibilità alla AgP e genotipi dell'IL-1. Mentre alcuni studi hanno mostrato una associazione positiva tra il polimorfismo IL-1B +3954 e AgP sia negli Afro-Americani che nelle popolazioni Caucasiche (Diehl et al. 1999, Parkhill et al. 2000), altri studi hanno fallito nel dimostrare un legame significativo tra queste varianti geniche e la condizione patologica (Hodge et al. 2001, Rogers et al. 2002). Recentemente, uno studio condotto su 415 soggetti affetti da AgP Nord-Europei e di etnia Caucasica e 874 controlli, che si proponeva di esaminare 10 SNPs nella regione del cluster genico dell'IL-1, non ha rilevato alcuna associazione significativa tra i marcatori analizzati e la condizione patologica (Fiebig et al. 2008). In genere questi studi prendono in considerazione la associazione tra singoli marcatori, all'interno dei geni candidati appartenenti al cluster genico dell'IL-1, e la patologia. Questa analisi "single point" è basata sulla genotipizzazione di un piccolo set di marcatori presenti nella regione genomica di interesse. Anche se sono condotti su regioni specifiche, questi studi sono negativamente influenzati dal fatto che esaminano solo una frazione della variazione genetica e trascurano le eventuali correlazioni tra marcatori (Cardon & Abecasis 2003). Inoltre, i test di associazione che considerano i singoli markers separatamente nei casi e nei controlli hanno un potere statistico limitato dovuto ai necessari aggiustamenti dovuti ai confronti multipli.

Nel nostro studio, è stata effettuata una analisi più dettagliata della struttura di LD della regione cromosomica 2q13-14, ove mappano i geni IL-1A, IL-1B e IL-1RN. La valutazione è stata effettuata sia mediante test tra coppie di marcatori (D' ed r^2) che mediante studio del profilo a blocchi di LD (mappa in LDUs) considerando contemporaneamente tutti i 58 SNPs che coprivano l'intera regione cromosomica. Sulla base del profilo "a blocchi" ottenuto sia

dalla mappa di LD che dall'analisi a coppie abbiamo analizzato la struttura aplo-tipica della regione candidata raggruppando i polimorfismi utilizzati in quattro regioni. Dopo la ricostruzione degli aplotipi, non è stata rilevata alcuna associazione significativa tra i geni IL-1A, IL-1B e IL-1RN e la AgP. È stata osservata solo una debole associazione tra la patologia e IL-1F6 e IL-1F8.

In conclusione, all'interno dei limiti del presente studio, i risultati sembrano non sostenere la esistenza di una variante causale per la AgP all'interno della regione candidata ove mappano i geni IL-1A, IL-1B e IL-1RN in una popolazione Italiana Caucasica rappresentativa.

CAPITOLO VII

- Bibliografia -

- 1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. *Ann Periodontol* 1999;**4**:i1-112.
- Agerbaek MR, Lang NP, Persson GR. Microbiological composition associated with interleukin-1 gene polymorphism in subjects undergoing supportive periodontal therapy. *J Periodontol* 2006;**77**:1397-1402.
- Albandar JJ, Brown LJ, Löe H. Clinical features of earlyonset periodontitis. *J Am Dent Assoc* 1997;**128**:1393-1399.
- Albandar JM, Baghdady VS, Ghose LJ. Periodontal disease progression in teenagers with no preventive dental care provisions. *J Clin Periodontol* 1991a;**18**:300-304.
- Albandar JM, Buischi YA, Barbosa MF. Destructive forms of periodontal disease in adolescents. A 3-year longitudinal study. *J Periodontol* 1991b;**62**:370-376.
- Albandar JM. Juvenile periodontitis--pattern of progression and relationship to clinical periodontal parameters. *Community Dent Oral Epidemiol* 1993;**21**:185-189.
- Albandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol 2000* 2002;**29**:153-176.
- Amer A, Singh G, Darke C, Dolby AE. Association between HLA antigens and periodontal disease. *Tissue Antigens* 1988;**31**:53-58.
- Anusaksathien O, Sukboon A, Sitthiphong P, Teanpaisan R. Distribution of interleukin-1beta(+3954) and IL-1alpha(-889) genetic variations in a Thai population group. *J Periodontol* 2003;**74**:1796-1802.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;**4**:1-6.
- Armitage GC, Wu Y, Wang HY, Sorell J, di Giovine FS, Duff GW. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J Periodontol* 2000;**71**:164-171.
- Attström R, Van der Velden U. Summary of session 1. In: Lang NP, Karring T, eds. *Proceedings of the 1st European Workshop in Periodontology*. Berlin: Quintessence, 120-126.
- Balding D. The impact of low-cost, genome-wide resequencing on association studies. *Hum Genomics* 2005;**2**:79-80.
- Barret JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;**21**:263-265.
- Beatty TH, Boughman JA, Yang P, Astemborski JA, Suzuki JB. Genetic analysis of juvenile periodontitis in families ascertained through an affected proband. *Am J Hum Genet* 1987;**40**:443-452.
- Berdeli A, Emingil G, Gürkan A, Atilla G, Köse T. Association of the IL-1RN2 allele with periodontal diseases. *Clin Biochem* 2006;**39**:357-362.
- Bimstein E, Garcia-Godoy F. The significance of age, proximal caries, gingival inflammation, probing depths and the loss of lamina dura in the diagnosis of alveolar bone loss in the primary molars. *ASDC J Dent Child* 1994;**61**:125-128.
- Boughman JA, Halloran SL, Roulston D, Schwartz S, Suzuki JB, Weitkamp LR, Wenk RE, Wooten R, Cohen MM. An autosomal-dominant form of juvenile periodontitis: its localization to chromosome 4 and linkage to dentinogenesis imperfecta and Gc. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1986;**6**:341-350.
- Boughman JA, Astemborski JA, Suzuki JB. Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships. *J Clin Periodontol* 1992;**19**:233-239.

Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, Tonetti M. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res* 2005;**84**:1149-1153.

Buremeister JJ, Best AA, Palcanis KK, Caine FA, Ranney RR. Localized juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis: clinical findings. *J Clin Periodontol* 1984;**11**:181-192.

Cardon LR, Abecasis GR. Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends Genet* 2003;**19**:135-140.

Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003;**361**:598-604.

Cheng KF, Lin WJ. Simultaneously correcting for population stratification and for genotyping error in case-control association studies. *Am J Hum Genet* 2007;**81**:726-743.

Chung HY, Lu HC, Chen WL, Lu CT, Yang YH, Tsai CC. Gm (23) allotypes and Fcγ3 receptor genotypes as risk factors for various forms of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:954-960.

Clerehugh V, Lennon MA, Worthington HV. 5-year results of a longitudinal study of early periodontitis in 14- to 19-year-old adolescents. *J Clin Periodontol* 1990;**17**:702-708.

Collins A, Morton NE. Mapping a disease locus by allelic association. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:1741-1745.

Collins A, Ennis S, Taillon-Miller P, Kwok PY, Morton NE. Allelic associations with SNPs: metrics, populations, and the linkage disequilibrium map. *Hum Mutat* 2001;**17**:255-262.

Collins A, Lau W, De La Vega FM. Mapping genes for common diseases: the case for genetic (LD) maps. *Hum Hered* 2004;**58**:2-9.

Collins A, Lau W. CHROMSCAN: genome-wide association using a linkage disequilibrium map. *J Hum Genet* 2008;**53**:121-126.

Cox A, Camp NJ, Nicklin MJ, di Giovine FS, Duff GW. An analysis of linkage disequilibrium in the interleukin-1 gene cluster, using a novel grouping method for multiallelic markers. *Am J Hum Genet* 1998;**62**:1180-1188.

De Carli L, Boncinelli E, Danieli GA, La Rizza L. *Genetica generale e umana*. Piccin Editore 1998.

De La Vega FM, Isaac H, Collins A, Scafe CR, Halldórsson BV, Su X, Lippert RA, Wang Y, Laig-Webster M, Koehler RT, Ziegler JS, Wogan LT, Stevens JF, Leinen KM, Olson SJ, Guegler KJ, You X, Xu LH, Hemken HG, Kalush F, Itakura M, Zheng Y, de Thé G, O'Brien SJ, Clark AG, Istrail S, Hunkapiller MW, Spier EG, Gilbert DA. The linkage disequilibrium maps of three human chromosomes across four populations reflect their demographic history and a common underlying recombination pattern. *Genome Res* 2005;**15**:454-462.

de Souza RC, Colombo AP. Distribution of Fcγ3RIIa and Fcγ3RIIb genotypes in patients with generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2006;**77**:1120-1128.

Diehl SR, Wang Y, Brooks CN, Burmeister JA, Califano JV, Wang S. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1999;**70**:418-430.

Diehl SR, Wu T, Burmeister JA, Califano JV, Brooks CN, Tew JG, Schenkein HA. Evidence of a substantial genetic basis for IgG2 levels in families with aggressive periodontitis. *J Dent Res* 2003;**82**:708-712.

Diehl SR, Wu T, Michalowicz BS, Brooks CN, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA. Quantitative measures of aggressive periodontitis show substantial heritability and consistency with traditional diagnoses. *J Periodontol* 2005;**76**:279-288.

Drożdżik A, Kurzawski M, Safronow K, Banach J. Polymorphism in interleukin-1β gene and the risk of periodontitis in a Polish population. *Adv Med Sci* 2006;**51 Suppl 1**:13-17.

Dupuis J, Albers K, Allen-Brady K, Cho K, Elston RC, Kappen HJ, Tang H, Thomas A, Thomson G, Tsung E, Yang Q, Zhang W, Zhao K, Zheng G, Ziegler JT. Effect of linkage

disequilibrium between markers in linkage and association analyses. *Genet Epidemiol* 2007;**31** Suppl 1:139-148.

Endo M, Tai H, Tabeta K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5' - flanking region of tumor necrosis factor- α gene in Japanese patients with early-onset periodontitis. *J Periodontol* 2001;**72**:1554-1559.

Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 1995;**12**:921-927.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005;**1**:47-50.

Fiebig A, Jepsen S, Loos BG, Scholz C, Schäfer C, Rühling A, Nothnagel M, Eickholz P, van der Velden U, Schenck K, Schreiber S, Grössner-Schreiber B. Polymorphisms in the interleukin-1 (IL1) gene cluster are not associated with aggressive periodontitis in a large Caucasian population. *Genomics* 2008;**92**:309-315.

Firatli E, Kantarci A, Cebeci I, Tanyeri H, Sonmez G, Carin M, Tuncer O. Association between HLA antigens and early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 1996;**23**:563-566.

Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;**4**:32-38.

Fu Y, Cao C, Wang S. Relevance of Fc gamma R polymorphism to the susceptibility of early-onset periodontitis [Chinese]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1999;**34**:364-366.

Fu Y, Korostoff JM, Fine DH, Wilson ME. Fc gamma receptor genes as risk markers for localized aggressive periodontitis in African-Americans. *J Periodontol* 2002;**73**:517-523.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002;**296**:2225-2229.

Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999;**26**:705-709.

Gao LY, Li DY, Shang GW, Wang RR. Survey and compare on aggressive periodontitis and chronic periodontitis at Huangpu district in Shanghai. *Chinese J Practical Chinese with Modern Medicine* 2004;**4**:3393-3395.

García-Closas M, Egan KM, Abruzzo J, Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Franklin T *et al.* Collection of Genomic DNA from Adults in Epidemiological Studies by Buccal Cytobrush and Mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevent* 2001;**10**:687-696.

Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2004;**35**:21-41.

Gibson G, Muse SV. A primer of genome science. Sinauer Associates Inc. Publishers 2002.

Gohlke H, Illig T, Bahnweg M, Klopp N, André E, Altmüller J *et al.* Association of the interleukin-1 receptor antagonist gene with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;**169**:1217-1223.

Gonzales JR, Michel J, Diete A, Herrmann JM, Bodeker RH, Meyle J. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 loci in aggressive and chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;**29**:816-822.

Gonzales JR, Michel J, Rodriguez EL, Herrmann JM, Bodeker RH, Meyle J. Comparison of interleukin-1 genotypes in two populations with aggressive periodontitis. *Eur J Oral Sci* 2003;**111**:395-399.

Gonzales JR, Kobayashi T, Michel J, Mann M, Yoshie H, Meyle J. Interleukin-4 gene polymorphisms in Japanese and Caucasian patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;**31**:384-389.

Gray IC, Campbell DA, Spurr NK. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum Mol Genet* 2000;**9**:2403-2408.

Gunsolley JC, Burmeister JA, Tew JG, Best AM, Ranney RR. Relationship of serum antibody to attachment level patterns in young adults with juvenile periodontitis or generalized severe periodontitis. *J Periodontol* 1987;**58**:314-320.

Gunsolley JC, Tew JG, Gooss CM, Burmeister JA, Schenkein HA. Effects of race and periodontal status on antibody reactive with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4. *J Periodontol Res* 1988;**23**:303-307.

Guzeldemir E, Gunhan M, Ozcelik O, Tastan H. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in Turkish patients with localized aggressive periodontitis. *J Oral Sci* 2008;**50**:151-159.

Gwinn MR, Sharma A, De Nardin E. Single nucleotide polymorphisms of the N-formyl peptide receptor in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1999;**70**:1194-1201.

Hart T. Genetic risk factors for early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1996;**67**:355-366.

Hart TC, Marazita ML, Schenkein HA, Diehl SR. Re-interpretation of the evidence for X-linked dominant inheritance of juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1992;**63**:169-173.

Hart TC, Marazita ML, McCanna KM, Schenkein HA, Diehl SR. Reevaluation of the chromosome 4q candidate region for early onset periodontitis. *Hum Genet* 1993;**91**:416-422.

Hennig BJ, Parkhill JM, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. *J Periodontol* 1999;**70**:1032-1038.

Hill WG, Robertson A. The effects of inbreeding at loci with heterozygote advantage. *Genetics* 1968;**60**:615-628.

Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 2005;**6**:95-108.

Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. No association with HLA-DQB1 in European Caucasians with early-onset periodontitis. *Tissue Antigens* 1999;**54**:205-207.

Hodge P, Michalowicz B. Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults. *Periodontol 2000* 2001;**26**:113-134.

Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Failure to detect an association with IL-1 genotypes in European Caucasians with generalised early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;**28**:430-436.

Hørmand J, Frandsen A. Juvenile periodontitis. Localization of bone loss in relation to age, sex, and teeth. *J Clin Periodontol* 1979;**6**:407-16.

Hu CZ, Li GL, Li DY, Xu BY. Juvenile periodontitis survey in 9548 middle school students at Huangpu District in Shanghai [Chinese]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2002;**11**:300-302.

Huynh-Ba G, Lang NP, Tonetti MS, Salvi GE. The association of the composite IL-1 genotype with periodontitis progression and/or treatment outcomes: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2007;**34**:305-317.

Itagaki M, Kubota T, Tai H, Shimada Y, Morozumi T, Yamazaki K. Matrix metalloproteinase-1 and -3 gene promoter polymorphisms in Japanese patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;**31**:764-769.

Jenkins WMM, Kinane DF. The high-risk group in periodontitis. *Br Dent J* 1989;**167**:168-171.

Johnson NW, Griffiths GS, Wilton JM, Maiden MF, Curtis MA, Gillett IR, Wilson DT, Sterne JA. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. Evidence for the existence of high-risk groups and individuals and approaches to their detection. *J Clin Periodontol* 1988;**15**:276-282.

Jones BE, Miettinen HM, Jesaitis AJ, Mills JS. Mutations of F110 and C126 of the formyl peptide receptor interfere with G-protein coupling and chemotaxis. *J Periodontol* 2003;**74**:475-484.

Kaneko S, Kobayashi T, Yamamoto K, Jansen MD, van de Winkel JG, Yoshie H. A novel polymorphism of Fc α RI (CD89) associated with aggressive periodontitis. *Tissue Antigens* 2004;**63**:572–577.

Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodontol Res* 1999;**34**:379–386.

Kinane DF, Mark Bartold P. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol 2000* 2007;**43**:278-293.

Kobayashi T, Sugita N, van der Pol WL, Nunokawa Y, Westerdaal NA, Yamamoto K, van de Winkel JG, Yoshie H. The Fc γ receptor genotype as a risk factor for generalized early-onset periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol* 2000;**71**:1425–1432.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk EW, Wilson TG Jr, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;**24**:72–77.

Kornman KS, Di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Periodontol 2000* 1998;**3**:327–328.

Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996;**58**:1347-1363.

Kuo TY, Lau W, Collins AR. LDMAP: the construction of high-resolution linkage disequilibrium maps of the human genome. *Methods Mol Biol* 2007;**376**:47-57.

Lang NP, Bartold PM, Cullinam M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, Page R, Papapanou P, Tonetti M, Van Dyke T. International Classification Workshop. Consensus report: aggressive periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;**4**:53.

Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;**81**:3443-3446.

Lau W, Kuo TY, Tapper W, Cox S, Collins A. Exploiting large scale computing to construct high resolution linkage disequilibrium maps of the human genome. *Bioinformatics* 2007;**23**:517-519.

Le Marchand L, Lum-Jones A, Saltzman B, Visaya V, Nomura AMY, Kolonel LN. Feasibility of Collecting Buccal Cell DNA by Mail in a Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevent* 2001;**10**:701-703

Lewontin RC. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics* 1964a;**49**:49-67.

Lewontin RC. The interaction of selection and linkage. II. Optimum models. *Genetics* 1964b;**50**:757-82.

Li QY, Zhao HS, Meng HX, Zhang L, Xu L, Chen ZB, Shi D, Feng XH, Zhu XL. Association analysis between interleukin-1 family polymorphisms and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population. *J Periodontol* 2004a;**75**:1627–1635.

Li QY, Zhao HS, Meng HX, Zhang L, Xu L, Chen ZB. The relationship between a nucleotide substitution of S100A8 gene and aggressive periodontitis [Chinese]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2004b;**39**:181–184.

Li QY, Zhao HS, Meng HX, Zhang L, Xu L, Chen ZB. Interleukin-1 polymorphisms in patients with aggressive periodontitis. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2005;**14**:333-337.

Lissau I, Holst D, Friis-Hasché E. Dental health behaviors and periodontal disease indicators in Danish youths. A 10-year epidemiological follow-up. *J Clin Periodontol* 1990;**17**:42-47.

Liu RK, Cao CF, Meng HX, Gao Y. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2001;**72**:1545–1553.

Llorente MA, Griffiths GS. Periodontal status among relatives of aggressive periodontitis patients and reliability of family history report. *J Clin Periodontol* 2006;**33**:121-125.

Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986;**13**:431-445.

Löe H, Brown LJ. Early onset periodontitis in the United States of America. *J Periodontol* 1991;**62**:608-616.

Long JC, Nance WE, Waring P, Burmeister JA, Ranney RR. Early onset periodontitis: a comparison and evaluation of two proposed modes of inheritance. *Genet Epidemiol* 1987;**4**:13-24.

Lonjou C, Zhang W, Collins A, Tapper WJ, Elahi E, Maniatis N, Morton NE. Linkage disequilibrium in human populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:6069-6074.

Loos BG, Leppers-Van de Straat FG, Van de Winkel JG, Van der Velden U. Fcγ receptor polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:595-602.

Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005;**32 Suppl 6**:159-179.

Machulla HK, Stein J, Gautsch A, Langner J, Schaller HG, Reichert S. HLA-A, B, Cw, DRB1, DRB3/4/5, DQB1 in German patients suffering from rapidly progressive periodontitis (RPP) and adult periodontitis (AP). *J Clin Periodontol* 2002;**29**:573-579.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory 1982.

Maniatis N, Collins A, Xu CF, McCarthy LC, Hewett DR, Tapper W, Ennis S, Ke X, Morton NE. The first linkage disequilibrium (LD) maps: delineation of hot and cold blocks by diplotype analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:2228-2233.

Maniatis N, Collins A, Gibson J, Zhang W, Tapper W, Morton NE. Positional cloning by linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 2004;**74**:846-855.

Maniatis N, Morton NE, Gibson J, Xu CF, Hosking LK, Collins A. The optimal measure of linkage disequilibrium reduces error in association mapping of affection status. *Hum Mol Genet* 2005;**14**:145-153.

Maniatis N, Collins A, Morton NE. Effects of single SNPs, haplotypes, and whole-genome LD maps on accuracy of association mapping. *Genet Epidemiol* 2007;**31**:179-188.

Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake K, Schenkein HA. Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1994;**65**:623-630.

Maria de Freitas N, Imbronito AV, Neves AC, Nunes FD, Pustiglioni FE, Lotufo RF. Analysis of IL-1A(-889) and TNFA(-308) gene polymorphism in Brazilian patients with generalized aggressive periodontitis. *Eur Cytokine Netw* 2007;**18**:142-147.

Matisse TC, Chen F, Chen W, De La Vega FM, Hansen M, He C, Hyland FC, Kennedy GC, Kong X, Murray SS, Ziegler JS, Stewart WC, Buyske S. A second-generation combined linkage physical map of the human genome. *Genome Res* 2007;**17**:1783-1786.

Melvin WW, Sandifer JB, Gray JL. The prevalence and sex ratio of juvenile periodontitis in a young racially mixed population. *J Periodontol* 1991;**62**:330-334.

Meng H, Xu L, Li Q, Han J, Zhao Y. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 2007;**43**:133-159.

Michel J, Gonzales JR, Wunderlich D, Diète A, Herrmann JM, Meyle J. Interleukin-4 polymorphisms in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;**28**:483-488.

Moreira PR, de Sa AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. A functional interleukin-1β gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodont Res* 2005;**40**:306-311.

Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontol Res* 2007;**42**:23-30.

Morton NE. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 1955;**7**:277-318.

- Morton NE, Zhang W, Taillon-Miller P, Ennis S, Kwok PY, Collins A. The optimal measure of allelic association. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:5217-5121.
- Morton NE. Linkage disequilibrium maps and association mapping. *J Clin Invest* 2005;**115**:1425-1430.
- Morton NE. Fifty years of genetic epidemiology, with special reference to Japan. *J Hum Genet* 2006;**51**:269-277.
- Morton N, Maniatis N, Zhang W, Ennis S, Collins A. Genome scanning by composite likelihood. *Am J Hum Genet* 2007;**80**:19-28.
- Neely AL. Prevalence of juvenile periodontitis in a circumpubertal population. *J Clin Periodontol* 1992;**19**:367-372.
- Nicklin MJ, Barton JL, Nguyen M, FitzGerald MG, Duff GW, Kornman K. A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. *Genomics* 2002;**79**:718-725.
- Noack B, Görgens H, Hoffmann T, Schackert HK. CARD15 gene variants in aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2006;**33**:779-783.
- Nowotny P, Kwon JM, Goate AM. SNP analysis to dissect human traits. *Curr Opin Neurobiol* 2001;**11**:637-41.
- Oeth P, Beaulieu M, Park C, Kosman D, del Mistro G, Van den Boom DCJ. iPLEX™ assay: increased plexing efficiency and flexibility for MassARRAY system through single base primer extension with mass-modified terminators. *Sequenom Application Note* 2005;1-12.
- Ohyama H, Takashiba S, Oyaizu K, Nagai A, Naruse T, Inoko H, Kurihara H, Murayama Y. HLA Class II genotypes associated with early-onset periodontitis: DQB1 molecule primarily confers susceptibility to the disease. *J Periodontol* 1996;**67**:888-894.
- Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1996;**1**:1-36.
- Park KS, Nam JH, Choi J. The short vitamin D receptor is associated with increased risk for generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2006;**33**:524-528.
- Parkhill JM, Hennig BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;**27**:682-689.
- Perez C, Gonzalez FE, Pavez V, Araya AV, Aguirre A, Cruzat A, Contreras-Levicoy J, Dotte A, Aravena O, Salazar L, Catalan D, Cuenca J, Ferreira A, Schiattino I, Aguillon JC. The -308 polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene and ex vivo lipopolysaccharide-induced TNF-alpha expression in patients with aggressive periodontitis and/or type 1 diabetes mellitus. *Eur Cytokine Netw* 2004;**15**:364-370.
- Pontes CC, Gonzales JR, Novaes AB Jr, Junior MT, Grisi MF, Michel J, Meyle J, de Souza SL. Interleukin-4 gene polymorphism and its relation to periodontal disease in a Brazilian population of African heritage. *J Dent Res* 2004;**32**:241-246.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;**81**:559-575.
- Quappe L, Jara L, Lopez NJ. Association of interleukin-1 polymorphisms with aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2004;**75**:1509-1515.
- Reichert S, Stein J, Gautsch A, Schaller HG, Machulla HK. Gender differences in HLA phenotype frequencies found in German patients with generalized aggressive periodontitis and chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2002;**17**:360-368.
- Ren XY, Xu L, Meng HX. Interleukin-1 family polymorphisms in aggressive periodontitis patients and their relatives. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2008;**40**:28-33.
- Rogers MA, Figliomeni L, Baluchova K, Tan AE, Davies G, Henry PJ, Price P. Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or the success of dental implants? *J Periodontol Res* 2002;**37**:37-41.
- Sakellari D, Katsares V, Georgiadou M, Kouvatsi A, Arsenakis M, Konstantinidis A. No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. *J Clin Periodontol* 2006;**33**:765-770.

Sawyer SL, Mukherjee N, Pakstis AJ, Feuk L, Kidd JR, Brookes AJ, Kidd KK. Linkage disequilibrium patterns vary substantially among populations. *Eur J Hum Genet* 2005;**13**:677-686.

Saxe'n L. Prevalence of juvenile periodontitis in Finland. *J Clin Periodontol* 1980;**7**:177-186.

Saxen L, Nevanlinna HR. Autosomal recessive inheritance of juvenile periodontitis: test of a hypothesis. *Clin Genet* 1984;**25**:332-335.

Scannapieco FA. Periodontal inflammation: from gingivitis to systemic disease? *Compend Contin Educ Dent* 2004;**25**:16-25.

Scapoli C, Trombelli L, Mamolini E, Collins A. Linkage disequilibrium analysis of case-control data: an application to generalized aggressive periodontitis. *Genes Immun* 2005a;**6**:44-52.

Scapoli C, Tatakis DN, Mamolini E, Trombelli L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: interleukin-1 gene cluster polymorphisms. *J Periodontol* 2005b;**76**:49-56.

Schroder NW, Meister D, Wolff V, Christan C, Kaner D, Haban V, Purucker P, Hermann C, Moter A, Gobel UB, Schumann RR. Chronic periodontal disease is associated with single-nucleotide polymorphisms of the human TLR-4 gene. *Genes Immun* 2005;**5**:448-451.

Seifert R, Wenzel-Seifert K. Defective Gi. Protein coupling in two formyl peptide receptor mutants associated with localized juvenile periodontitis. *J Biol Chem* 2001;**276**:42043-42049.

Serre D, Montpetit A, Paré G, Engert JC, Yusuf S, Keavney B, Hudson TJ, Anand S. Correction of population stratification in large multi-ethnic association studies. *PLoS ONE* 2008;**3**:1382.

Shapira L, Eizenberg S, Sela MN, Soskolne A, Brautbar H. HLA A9 and B15 are associated with the generalized form, but not the localized form, of early-onset periodontal diseases. *J Periodontol* 1994a;**65**:219-223.

Shapira L, Smidt A, Van Dyke TE, Barak V, Soskolne AW, Brautbar C, Sela MN, Bimstein E. Sequential manifestation of different forms of early-onset periodontitis. A case report. *J Periodontol* 1994b;**65**:631-635.

Shapira L, Stabholz A, Rieckmann P, Kruse N. Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promoter region in families with localized early-onset periodontitis. *J Periodontal Res* 2001;**36**:183-186.

Shapira L, Wilensky A, Kinane DF. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol* 2005;**32 Suppl 6**:72-86.

Shete S. A note on the optimal measure of allelic association. *Ann Hum Genet* 2003;**67 (Pt 2)**:189-191.

Sjödén B, Crossner CG, Unell L, Ostlund P. A retrospective radiographic study of alveolar bone loss in the primary dentition in patients with localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1989;**16**:124-127.

Sjödén B, Matsson L, Unell L, Egelberg J. Marginal bone loss in the primary dentition of patients with juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993;**20**:32-36.

Soedarsono N, Rabello D, Kamei H, Fuma D, Ishihara Y, Suzuki M, Noguchi T, Sakaki Y, Yamaguchi A, Kojima T. Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* 2006;**41**:397-404.

Stein J, Reichert S, Gautsch A, Machulla HK. Are there HLA combinations typical supporting for or making resistant against aggressive and/or chronic periodontitis? *J Periodontal Res* 2003;**38**:508-517.

Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;**68**:978-989.

Strachan T, Read AP. *Genetica umana molecolare*. Ed. UTET 2003.

Sun JL, Meng HX, Cao CF, Tachi Y, Shinohara M, Ueda M, Imai H, Ohura K. Relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and periodontitis. *J Periodontol Res* 2002;**37**:263–267.

Suzuki A, Ji G, Numabe Y, Muramatsu M, Gomi K, Kanazashi M, Ogata Y, Shimizu E, Shibukawa Y, Ito A, Ito T, Sugaya A, Arai T, Yamada S, Deguchi S, Kanoi K. Single nucleotide polymorphisms associated with aggressive periodontitis and severe chronic periodontitis in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**317**:887–892.

Sweeney EA, Alcoforado GA, Nyman S, Slots J. Prevalence and microbiology of localized prepubertal periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1987;**2**:65-70.

Tachi Y, Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Shinohara M, Ueda M, Imai H, Ohura K, Sun J, Meng H, Cao C. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with periodontal diseases in Japanese and Chinese. *Nucleic Acids Res Suppl* 2001;**1**:111–112.

Tai H, Endo M, Shimada Y, Gou E, Orima K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H. Association of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms with early onset periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol* 2002;**29**:882–888.

Takashiba S, Noji S, Nishimura F, Ohyama H, Kurihara H, Nomura Y, Taniguchi S, Murayama Y. Unique intronic variations of HLA-DQ beta gene in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1994;**65**:379–386.

Takashiba S, Ohyama H, Oyaizu K, Kogoe-Kato N, Murayama Y. HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early-onset periodontitis. *J Periodontol Res* 1999;**34**:374–378.

Takashiba S, Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol 2000* 2006;**40**:94-106.

Tapper WJ, Maniatis N, Morton NE, Collins A. A metric linkage disequilibrium map of a human chromosome. *Ann Hum Genet* 2003;**67** (Pt 6):487-494.

Tapper W, Collins A, Gibson J, Maniatis N, Ennis S, Morton NE. A map of the human genome in linkage disequilibrium units. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;**102**:11835-11839.

Taylor SL, Renshaw BR, Garika KE, Smith DE, Sims JE. Genomic organization of the interleukin-1 locus. *Genomics* 2002;**79**:726-733.

Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol* 2005;**32 Suppl 6**:210-213.

Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;**4**:39-53.

Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MA, Goncalves RB, Sallum AW, Line SR. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;**29**:233–239.

Velliyagounder K, Kaplan JB, Furgang D, Legarda D, Diamond G, Parkin RE, Fine DH. One of two human lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis. *Infect Immun* 2003;**71**:6141–6147.

Walker SJ, Van Dyke TE, Rich S, Kornman KS, di Giovine FS, Hart TC. Genetic polymorphisms of the IL-1alpha and IL-1beta genes in African-American LJP patients and an African-American control population. *J Periodontol* 2000;**71**:723–728.

Wang ZL, Qü XQ, Yang SH, Li XY. Prevalence study of juvenile periodontitis [Chinese]. *J Modern Stomatol* 1990;**4**:171–172.

Wang N, Akey JM, Zhang K, Chakraborty R, Jin L. Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation. *Am J Hum Genet* 2002;**71**:1227-1234.

Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet* 2005;**6**:109-118.

Yamazaki K, Tabeta K, Nakajima T, Ohsawa Y, Ueki K, Itoh H, Yoshie H. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Japanese patients with adult and early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;**28**:828–832.

Yasuda K, Sugita N, Kobayashi T, Yamamoto K, Yoshie H. FcγRIIB gene polymorphisms in Japanese periodontitis patients. *Genes Immun* 2003;**4**:541–546.

Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000* 2007;**43**:102–132.

Yoshihara A, Sugita N, Yamamoto K, Kobayashi T, Miyazaki H, Yoshi H. Analysis of vitamin D and Fcγ receptor polymorphisms in Japanese patients with generalized early-onset periodontitis. *J Dent Res* 2001;**80**:2051–2054.

Zhang W, Collins A, Maniatis N, Tapper W, Morton NE. Properties of linkage disequilibrium (LD) maps. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:17004–17007.

Zhang HX, Xie H, Ren TG. Relevance of FcγRIIIb genotype, IgG G2 m(23) factor to the susceptibility of aggressive periodontitis [Chinese]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2003a;**38**:129–131.

Zhang Y, Syed R, Uygur C, Pallos D, Gorry MC, Firatli E, Cortelli JR, Van Dyke TE, Hart PS, Feingold E, Hart TC. Evaluation of human leukocyte N-formylpeptide receptor (FPR1) SNPs in aggressive periodontitis patients. *Genes Immun* 2003b;**4**:22–29.

Zhang L, Meng H, Zhao H, Li Q, Xu L, Chen Z, Shi D, Feng X. Estrogen receptor-alpha gene polymorphisms in patients with periodontitis. *J Periodontol Res* 2004a;**39**:362–366.

Zhang W, Collins A, Gibson J, Tapper WJ, Hunt S, Deloukas P, Bentley DR, Morton NE. Impact of population structure, effective bottleneck time, and allele frequency on linkage disequilibrium maps. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004b;**101**:18075–18080.

Zhu XL, Meng HX. Assessment of monocyte chemotaxis in patients with rapidly progressive periodontitis [Chinese]. *J Modern Stomatol* 2002;**16**:38–39.