



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA

"TOR VERGATA"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

TECNOLOGIE AVANZATE IN BIOMEDICINA

CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

XXI

Analisi genetica della malattie complesse: loci comuni e loci specifici

Cecilia Sinibaldi

A.A. 2008/2009

Docente Guida: Prof. Giuseppe Novelli

Coordinatore: Prof. Luigi Giusto Spagnoli

A mio padre

INDICE

INTRODUZIONE	5
CAPITOLO I: LE MALATTIE COMPLESSE	7
• Cosa è cambiato nello studio delle malattie complesse?.....	10
• Studio delle patologie complesse: le nuove prospettive (il progetto HapMap, gli studi Genome Wide Association e lo studio di espressione dei tratti quantitativi).....	12
• Il Progetto HapMap.....	14
• Genome-Wide Association Study	16
CAPITOLO II: BASI GENETICHE DELLA SUSCETTIBILITÀ ALLA PSORIASI, ALLA PSORIASI ARTROPATICA ED ALLA DERMATITE ATOPIA	18
• Generalità cliniche e fisiopatologiche.....	18
• Psoriasi.....	18
Epidemiologia genetica della psoriasi.....	20
<i>IL LOCUS PSORS4 (1q21)</i>	24
<i>LCE CLUSTER</i>	25
• Artrite psoriasica.....	25
• Dermatite Atopica.....	26
Fisiopatologia.....	28
Epidemiologia genetica della dermatite atopica.....	31
Genetica della dermatite atopica.....	32
Filaggrina : il nuovo gene candidato per la suscettibilità alla dermatite atopica.....	34
CAPITOLO III: CONDIVISIONE DEI LOCI DI SUSCETTIBILITÀ TRA LE MALATTIE COMPLESSE: “Ipotesi common soil”	36

• Identificazione dell'effetto pleiotropico dei geni di suscettibilità.....	40
• Psoriasi e dermatite atopica: il locus 1q21 (PSORS4/ATOD2).....	43
CAPITOLO IV: SCOPO DEL LAVORO.....	46
PARTE I: Identificazione di un aplotipo protettivo per la psoriasi nella regione di co-localizzazione PSORS4/ATOD2	
MATERIALI e METODI.....	48
RISULTATI e DISCUSSIONE.....	62
PARTE II: Analisi delle mutazioni nulle R501X e 2282del4 del gene <i>FLG</i> nelle casistiche PS e DA	
MATERIALI E METODI.....	67
RISULTATI e DISCUSSIONE.....	79
PARTE III: Identificazione di una delezione tra i geni LCE3C e LCE3B associata alla psoriasi sul cromosoma 1	
MATERIALI E METODI.....	75
RISULTATI e DISCUSSIONE.....	78
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	84
BIBLIOGRAFIA.....	86

INTRODUZIONE

“La vita è governata da una moltitudine di forze. Le cose andrebbero assai lisce se si potesse determinare il corso delle proprie azioni esclusivamente in base a un unico principio morale, la cui applicazione in un dato momento fosse tanto ovvia da non richiedere neppure un istante di riflessione. Ma non riesco a ricordare una sola azione che si sia potuta determinare con tanta facilità” (Mohandas Karamchand Gandhi)

Il completamento del progetto genoma umano ha dato nuovi impulsi allo studio della variabilità umana, dimostrando che ogni individuo differisce da qualsiasi altro solamente per lo 0.5% della propria sequenza di DNA. Responsabili di questa porzione variabile di genoma sono in particolare i polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms), specifiche basi del DNA che variano negli individui con una frequenza maggiore di quella riscontrata per le mutazioni puntiformi.

Lo studio della variabilità interindividuale rappresenta una sfida per la medicina moderna soprattutto nella prospettiva di poter curare il malato in maniera sempre più specifica e sicura, individuando il trattamento terapeutico più efficace.

In particolare lo studio delle varianti polimorfiche è diventato determinante nella comprensione dei meccanismi alla base della suscettibilità alle diverse patologie multifattoriali, tra cui rientrano malattie comuni quali l'asma, la psoriasi, il diabete, l'obesità, e le malattie cardiovascolari.

I risultati degli studi familiari, degli studi sui gemelli e di quelli di adozione, hanno dimostrato che i fattori genetici rivestono un ruolo fondamentale nella patogenesi di molti difetti congeniti (cardiopatie, labiopalatoschisi, lussazione congenita dell'anca, etc.) e di molte comuni malattie croniche dell'adulto (ipertensione, diabete, malattie cardiovascolari, psoriasi, asma, etc.).

Sono patologie che si presentano con frequenze elevate nella popolazione, con un forte impatto sociale e dal peso rilevante sulla struttura sanitaria, tra le cause principali di morbilità e mortalità nei paesi occidentali.

La complessità è una condizione “normale” in biomedicina. Si chiamano infatti “complesse” le malattie umane più comuni. La crescente capacità di identificare le variazioni genetiche

associate con le malattie complesse sta creando nuove sfide alla comunità dei ricercatori e dei clinici.

L'identificazione delle varianti di suscettibilità alle patologie comuni promette, di avere notevoli ripercussioni in ambito medico (miglioramento della terapia, valutazione della risposta individuale ai farmaci, comprensione della risposta adattativa degli organismi agli stimoli ambientali) ed in ambito economico e sociale (diminuzione dei costi elevati a carico del sistema sanitario).

La ricerca delle basi genetiche delle malattie complesse è progredita contestualmente all'evoluzione della biologia molecolare. Pertanto si è passati dallo studio del singolo locus di suscettibilità, identificato mediante analisi di linkage agli studi completi del genoma che consentono di analizzare molti più loci contemporaneamente.

Questo progetto di Dottorato è stato incentrato sulla ricerca di regioni genomiche, geni e varianti geniche correlate alla suscettibilità per specifiche malattie dermatologiche di natura infiammatoria e/o immunomediata, quali psoriasi, dermatite atopica.

Entrambe malattie dermatologiche rappresentano degli ottimi modelli sperimentali per lo studio delle patologie multifattoriali, in quanto estremamente frequenti ed eterogenee sia a livello fenotipico che genetico.

La pelle è un organo di difesa ed è spesso soggetta a stress fisici e meccanici. In queste condizioni patologiche lo strato corneo, con il suo ruolo protettivo va incontro a modificazioni chimiche che ne limitano la funzione di barriera.

L'attività di ricerca è stata rivolta innanzitutto all'analisi di una stessa regione genomica, correlata alla suscettibilità per patologie dermatologiche diverse, che potrebbe essere coinvolta proprio nella natura infiammatoria delle patologie in esame ed, in secondo luogo, all'analisi di regioni specifiche, al fine di comprendere meglio, tramite analisi molecolari peculiari, la patogenesi delle patologie analizzate.

La natura mutualmente esclusiva della psoriasi e della dermatite atopica, patologie che raramente sono osservate contemporaneamente nello stesso paziente, suggerisce che probabilmente diversi possono essere gli alleli di suscettibilità causativi o regolatori. Nonostante ciò le due malattie sono associate alle medesime regioni cromosomiche e presentano caratteristiche cliniche comuni quali la secchezza cutanea, problemi di permeabilità della barriera epidermica e difetti nella funzione di difesa svolta dall'epidermide.

In particolare in questo studio è stata condotta un'analisi accurata del locus PSORS4/ATOD2, che mappa sul braccio lungo del cromosoma 1 (1q21), isolato nella popolazione italiana e responsabile della suscettibilità sia alla psoriasi che alla dermatite atopica.

CAPITOLO I

LE MALATTIE COMPLESSE

Le patologie complesse o multifattoriali dipendono dalla presenza di più loci (o geni) di suscettibilità, ognuno con uno specifico impatto sul fenotipo, e dal contributo di fattori ambientali. Il termine complesso definisce sia i caratteri quantitativi, che presentano un continuum di variabilità fenotipica (statura, peso corporeo, pressione sanguigna e il metabolismo) sia i caratteri qualitativi, in cui la manifestazione del fenotipo finale è determinata dall'interazione tra fattori ambientali e geni, ognuno con uno specifico contributo. Poter studiare e comprendere i meccanismi alla base delle patologie multifattoriali non è semplice: in primo luogo per l'elevata eterogeneità genetica, in secondo luogo per la difficile correlazione genotipo - fenotipo (dato che quest'ultimo è influenzato largamente dall'ambiente).

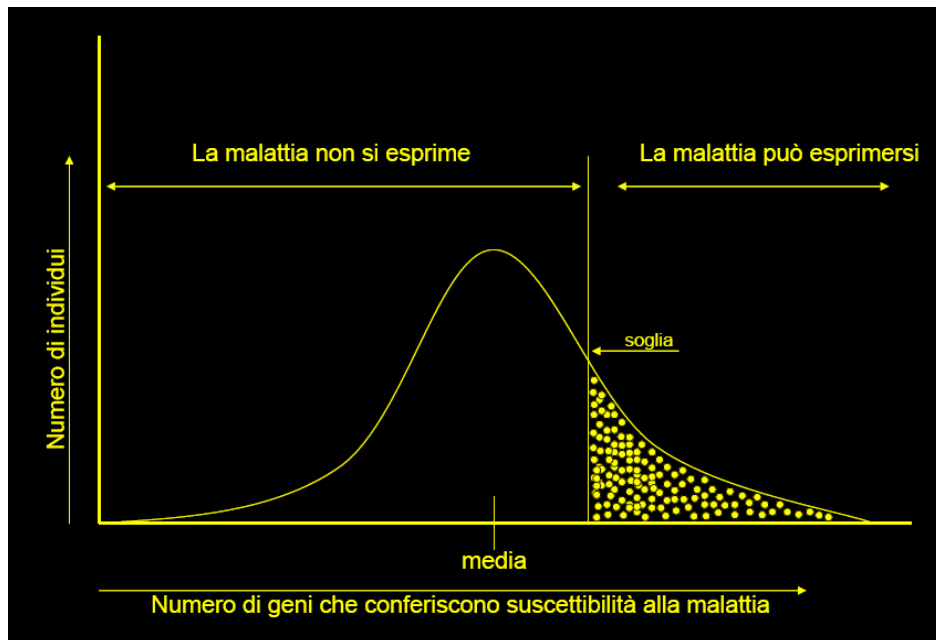
Sebbene anche le patologie semplici presentino diversi gradi di eterogeneità genetica, per la quale la severità della malattia varia da individuo a individuo (espressività variabile) e lo stesso fenotipo patologico potrebbe essere determinato da mutazioni diverse in geni diversi, nelle patologie complesse l'eterogeneità genetica è molto più diffusa e frequente per cui i geni contribuiscono in misura diversa all'espressione del fenotipo. Alcuni geni non sarebbero infatti causa di malattia, ma piuttosto ne influenzerebbero o determinerebbero particolari aspetti, comportandosi come geni modificatori. Quanto minore è l'effetto di un determinato gene sul fenotipo, tanto maggiori sono le difficoltà di rilevamento degli effetti causali della variante in esame. Occorre inoltre considerare che la complessità di una data malattia non correla soltanto con il numero di geni, ma riflette anche il tipo di interazione che si instaura tra i diversi fattori genetici ed i fattori ambientali.

Il modello statistico di studio delle patologie complesse presuppone l'esistenza di numerosi alleli di suscettibilità che si distribuiscono secondo una curva normale nella popolazione generale, ma con una soglia-limite che indica il punto critico di comparsa del fenotipo. Se non si supera tale soglia non si ha alcuna manifestazione della malattia (Figura 1).

Affinché una patologia si sviluppi, un individuo deve ereditare un certo numero di alleli di suscettibilità, o meglio un certo "quanto" di predisposizione totale. Esiste quindi un valore soglia di suscettibilità per cui, se l'individuo entra in contatto con i fattori ambientali

scatenanti può sviluppare la patologia mentre, al di sotto del quale, sebbene esposto ai fattori ambientali di rischio l'individuo non svilupperà la malattia.

Figura 1: Modello soglia per descrivere l'eredità delle patologie complesse



Per valutare la componente genetica di una patologia complessa esistono due parametri di osservazione:

- l'aggregazione familiare per cui la patologia si presenta con frequenze più elevate nei parenti di primo grado di pazienti affetti rispetto alla frequenza riscontrata nella popolazione generale;
- variazioni dell'incidenza della malattia in esame in gruppi etnici differenti.

Il rischio di trasmissione di una malattia multifattoriale è definito dal *rischio empirico*, che si basa sull'incidenza della patologia in una determinata popolazione. In genere esso aumenta in base alla gravità della malattia, al numero dei pazienti affetti nella famiglia ed in base al rapporto di parentela con il probando.

Un altro parametro utile per misurare il contributo offerto dai geni nello sviluppo di un determinato carattere è l'ereditabilità (H) che misura quanto le variazioni osservate del carattere preso in esame siano determinate dai geni e quanto dai fattori ambientali.

Ad $H=1$ corrisponde una variabilità completamente determinata dai geni, ad $H=0$ corrisponde una variabilità determinata dall'ambiente.

Lo studio delle popolazioni emigranti ci permette spesso di poter valutare il contributo offerto dall'ambiente nel determinare una patologia.

Ad esempio i giapponesi residenti in Giappone, rispetto alle popolazioni dell'Europa Occidentale hanno un'incidenza maggiore di infarto e di neoplasia dell'apparato digerente ma una minore frequenza di aterosclerosi e cancro del colon (Robertson et al., 1977). Queste malattie mostrano un'aggregazione familiare che suggerisce l'esistenza di una forte componente genetica. Tuttavia nei giapponesi emigrati negli Stati Uniti la frequenza di infarto e neoplasie dell'apparato digerente diminuisce mentre aumenta l'incidenza di aterosclerosi e cancro del colon. Data l'immutabilità dei geni, le differenze osservate nell'incidenza delle suddette patologie nella popolazione giapponese sono dovute in maniera preponderante ai fattori ambientali (probabilmente all'alimentazione) e non ai fattori genetici. Appare quindi evidente che le interazioni intergeniche devono essere valutate alla luce delle interazioni geni-ambiente (troppo spesso trascurate a causa dell'enorme difficoltà legata al loro studio).

I fattori genetici non sono *per se* sufficienti a garantire lo sviluppo di un determinato fenotipo a patogenesi complessa ma necessitano dei necessari fattori ambientali scatenanti; viceversa anche un'intensa esposizione ai fattori ambientali di rischio non sarà sufficiente a determinare la comparsa del fenotipo patologico in assenza di fattori genetici predisponenti. Un esempio può essere offerto dall'infezione da *Helicobacter Piloni* che promuove lo sviluppo dell'ulcera peptica. Non tutti gli individui infettati da *Helicobacter Piloni* svilupperanno l'ulcera ma soltanto quelli genotipicamente predisposti, a dimostrazione dell'importanza dell'interazione gene-ambiente.

Riassumendo l'eredità della patologie complesse presenta queste caratteristiche:

- la malattia dimostra un'aggregazione familiare ma non un chiara trasmissione;
- la malattia spesso predilige un sesso rispetto all'altro;
- il rischio di ricorrenza è in genere lo stesso nella medesima fratria;
- il rischio diminuisce con il diminuire del rapporto di parentela.

L'importanza dello studio genetico delle patologie complesse risiede nel fatto che sono malattie estremamente diffuse; come si evince nella Tabella 1:

Tabella 1: Frequenza di differenti patologie genetiche (da *The genetics basis of common diseases*, Oxford University Press, 2004)

	Incidenza alla nascita (per 1000)	Prevalenza a 25 anni di età (per 1000)	Prevalenza nella popolazione (per 1000)
Patologie genomiche e cromosomiche	6	1,8	3,8
Patologie monogenetiche	10	3,6	20
Patologie complesse	50	50	600

Cosa è cambiato nello studio delle malattie complesse?

Il Progetto Genoma Umano, ha reso disponibile la sequenza del DNA umano, rivelando che ogni individuo mostra il 99.5% d'identità genetica rispetto ad un qualsiasi altro individuo preso a caso nella popolazione.

Il restante 0.5% di DNA è soggetto a variabilità individuale e mostra cambiamenti all'interno della popolazione; la somma di queste differenze costituisce la *variabilità interindividuale*. Questa è caratterizzata principalmente da variazioni di sequenza definite **polimorfismi**, vale a dire la presenza ad un dato locus di due o più alleli, presenti con una frequenza maggiore (>1%) di quella che potrebbe essere mantenuta da una mutazione (Novelli e Giardina, 2003).

Gli SNPs, sostituzioni di un singolo nucleotide, rappresentano la più grande fonte di variabilità interindividuale nel genoma dato che lo 0,5% di porzione variabile di sequenza è responsabile non solo delle differenze fenotipiche tra gli individui, ma soprattutto delle differenze in termini di predisposizione e resistenza alle malattie comuni.

In passato è stata formulata l'ipotesi *CD=CV hypothesis* "*common disease/common variant*" (Becker, 2003) per la quale le mutazioni (**evento eccezionale**) determinano le malattie rare (patologie mendeliane) mentre gli SNPs (**frequenti nel genoma**) determinino la suscettibilità genetica alle malattie complesse. Le varianti polimorfiche sono alla base dell'eziologia patologica di molte malattie e andrebbero pertanto studiate su scala popolazioneale piuttosto

che su scala familiare. L'introduzione di innovativi studi genotipici su larga scala (WGA, Whole Genome Association Study) ha permesso l'identificazione di un nuovo repertorio di loci di suscettibilità di malattie complesse, con funzione fino ad oggi sconosciuta, caratterizzati da elevate frequenze alleliche e basso rischio relativo supportando maggiormente l'ipotesi CD=CV (Hemmink et al, 2008).

Studio delle patologie complesse

Lo studio delle patologie complesse negli ultimi anni è passato dall'analisi specifica di un singolo locus selezionato all'analisi simultanea di più loci situati su cromosomi differenti.

Per identificare le regioni di suscettibilità alle patologie complesse, si utilizzano due approcci differenti: **l'analisi di linkage e lo studio di associazione**.

In breve **l'analisi di linkage** è un'analisi di segregazione familiare che permette di assegnare un gene o un locus ad una determinata regione cromosomica definita da un insieme di marcatori polimorfi (i marcatori più utilizzati per questo tipo di analisi sono i microsatelliti, piccole sequenze di ripetute in tandem disperse uniformemente in tutto il genoma). Il linkage può essere studiato in famiglie estese che presentano una ricorrenza per la patologia in esame.

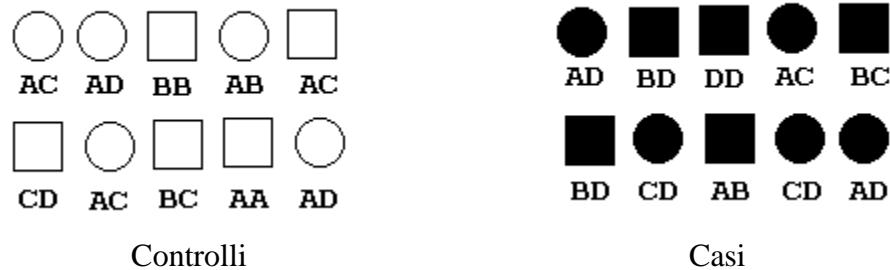
Se un microsatellite mappa vicino ad un gene-malattia in un determinato punto del genoma, ci si aspetta che tutti i membri affetti da quella patologia all'interno di una famiglia, ereditino lo stesso allele marcatore in linkage con l'allele responsabile del fenotipo patologico, specificatamente in quella famiglia.

Quando le famiglie studiate sono abbastanza estese da poter dimostrare che la co-localizzazione tra il gene-malattia e il marcatore non è un evento casuale, allora i due loci (malattia e marcatore) sono detti in linkage (Risch, 2000). Così definito, il linkage indica che il gene coinvolto nella patologia in esame, mappa vicino ad un marcatore e si delimita una regione minima entro la quale si procede per la ricerca del gene candidato, mediante clonaggio posizionale (tecnica utilizzata ad esempio per la scoperta del gene CFTR, il gene causativo della Fibrosi Cistica). Ne consegue che è possibile diagnosticare la presenza di una malattia senza conoscere effettivamente la mutazione o il gene coinvolto.

Nello studio delle patologie complesse si utilizza il linkage non-parametrico per il quale lo studio può essere effettuato su coppie di fratelli, su famiglie estese o su intere popolazioni (Strachan e Read, 1999) senza che siano definiti dei parametri a priori (come il tipo di ereditarietà, la penetranza, la segregazione etc etc).

Rispetto all'analisi di linkage, **gli studi di associazione** confrontano la frequenza di un allele, o di un genotipo, in un campione di persone non imparentate tra loro e la frequenza del medesimo allele in un campione di controlli sani (Figura 2).

Figura 2: L'allele D è più frequente nei casi (riportati a destra) rispetto ai controlli (riportati a sinistra)



L'ipotesi alla base di uno studio di associazione è che la presenza di polimorfismi genetici (in particolare gli SNPs) sia correlata all'aumento o alla diminuzione del rischio di sviluppare patologie complesse; esistono varianti alleliche con ruolo di predisposizione alle malattie e varianti alleliche con un ruolo protettivo più frequenti negli individui sani.

Le difficoltà riscontrate in uno studio di associazione, soprattutto per quanto concerne la riproducibilità dei risultati ottenuti, derivano dalle differenze tra le popolazioni in esame, dalla disomogeneità dei metodi utilizzati nella definizione del fenotipo e dall'eterogeneità genetica della patologia in esame.

Studio delle patologie complesse: le nuove prospettive (il progetto HapMap, gli studi Genome Wide Association e lo studio di espressione dei tratti quantitativi)

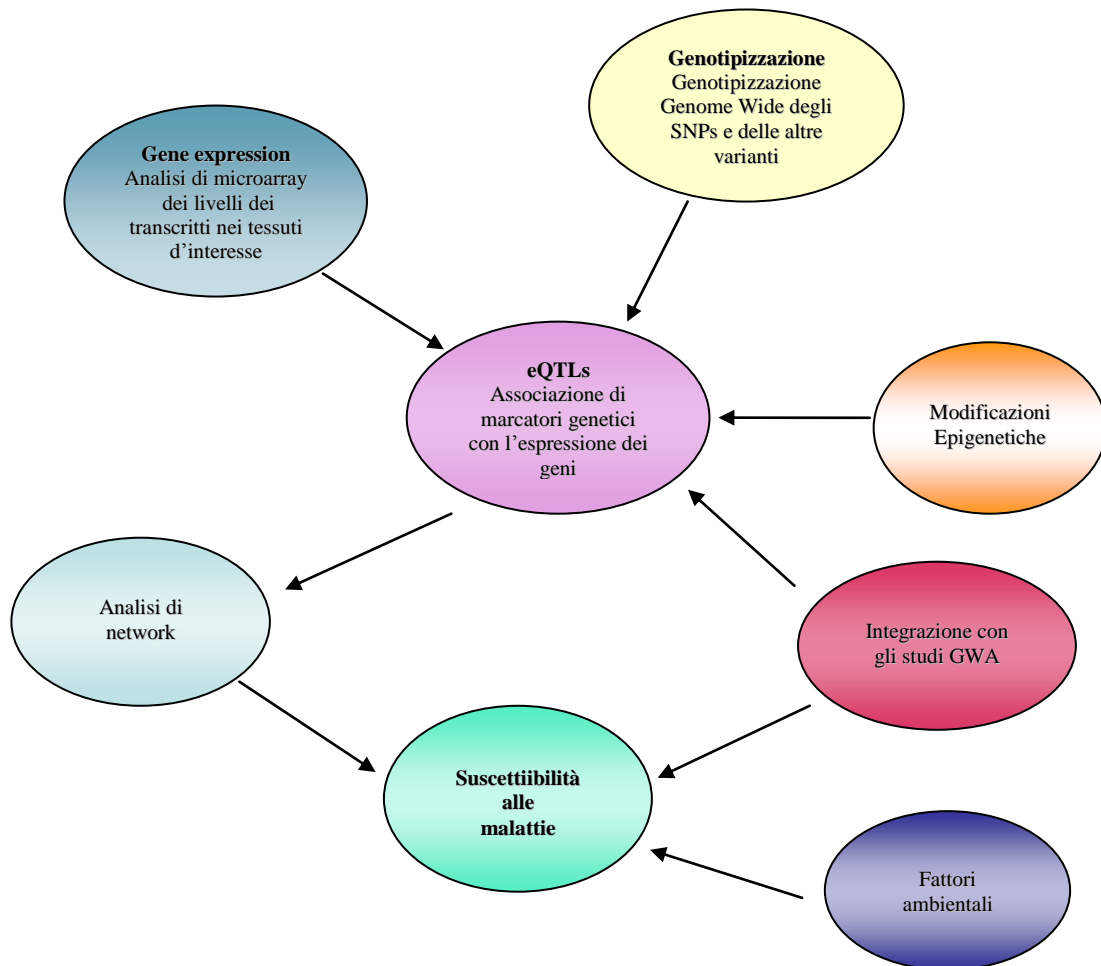
Da quanto osservato finora si evincono tutte le difficoltà dello studio e della valutazione del contributo offerto dagli SNPs in risposta agli agenti ambientali.

Fino ad oggi gli studi genetici come il linkage e gli studi caso-controllo prendevano in esame un unico locus genetico di suscettibilità per volta mentre, per questa tipologia di malattie, si è reso sempre più necessario uno studio dell'insieme dei loci di suscettibilità o dei geni associati. Pertanto si sono costruiti studi che prendono in considerazione l'analisi di più varianti contemporaneamente.

Come riportato nel grafico in Figura 3, modificato da una recente review (Cookson et al, 2009), lo studio delle patologie complesse ha subito un grande evoluzione, ed in questo paragrafo cercherò di riassumere brevemente le ultime tendenze della ricerca genetica per le quali non ci si sofferma più solamente all'analisi del singolo locus malattia ma vengono prese in considerazione più aspetti possibili (aumento del numero di SNPs analizzati, aumento delle

casistiche, implementazione dei programmi statistici e bioinformatici, valutazione dell'espressione genica, valutazione delle cause ambientali ed epigenetiche).

Figura 3: Studio della suscettibilità alle patologie complesse



L'evoluzione degli studi delle patologie complesse e l'importanza che ha assunto lo studio della variabilità individuale è strettamente correlata al peso socio-economico che hanno assunto nella società mondiale le malattie multifattoriali. In Tabella 2 sono riportati i costi sociali per i governi del mondo occidentale delle principali patologie di carattere complesso.

Tabella 2 : Costo annuale della malattie più comuni negli Stati Uniti

Malattia	Numero di individui affetti	Costo sociale (\$)
Alzheimer	4 milioni	152 miliardi
Artrite	43 milioni	65 miliardi
Cancro	8.4 milioni	107 miliardi
Malattie cardiovascolari	58 milioni	287 miliardi
Diabete	16 milioni	98 miliardi
Sclerosi multipla	350,000	5 miliardi
Osteoporosi	1,5 milioni	14 miliardi
Schizofrenia	2 milioni	30 miliardi

L'accresciuto interesse per lo studio delle patologie complesse si evince anche dal numero crescente di articoli pubblicati sulle riviste specializzate e dalla nascita di progetti e collaborazioni internazionali volti a facilitare questo tipo di esperimenti.

Il Progetto HapMap

Il progetto HapMap (sito <http://www.hapmap.org/index.html.en>), ad esempio, solamente durante la sua prima fase ha analizzato più di un milione di polimorfismi in 269 individui provenienti da 4 popolazioni differenti (Caucasici, Africani, Cinesi e Giapponesi) ed ha portato all'identificazione degli hot spot di ricombinazione cioè quei siti in cui le ricombinazioni avvengono con più frequenza rispetto ad altri punti del genoma.

Dagli studi del progetto si è compreso che il genoma viene ereditato in blocchi e non in punti, e nel sito sono disponibili tutte le regioni in cui è presente il fenomeno del **linkage disequilibrium (LD)**.

Il *linkage disequilibrium* indica la tendenza, tra specifici alleli relativi a due o più loci strettamente associati, a trovarsi insieme sullo stesso tratto cromosomico, in una popolazione con una frequenza maggiore rispetto a quella attesa sulla base delle singole frequenze alleliche. L'osservazione che l'allele malattia è in disequilibrium con l'allele marcatore consente di restringere notevolmente la regione entro la quale ricercare il gene causativo. E questa è la grande differenza che distingue il linkage dal linkage disequilibrium. Il linkage infatti prende vantaggio dalla ricombinazione all'interno di una famiglia, il linkage disequilibrium invece prende vantaggio da molti eventi di ricombinazione che accadono storicamente all'interno di una popolazione. Gli alleli in disequilibrium costituiscono infatti un particolare aplotipo ancestrale, perché trasmesso lungo la discendenza da un comune progenitore. Per questo motivo il linkage disequilibrium è maggiore in popolazioni omogenee, cioè originate da un nucleo di individui fondatori come le popolazioni sarda o finlandese. Il linkage disequilibrium è un importante strumento per individuare regioni cromosomiche di limitata ampiezza in cui si collocano i geni per una data malattia (mappaggio ad alta risoluzione) e si avvale dell'analisi molecolare di varianti alleliche (per lo più di SNPs o STRs) che costituiscono aplotipi in pazienti tra loro apparentemente non imparentati. Infatti è prevedibile che pazienti che hanno ereditato lo stesso segmento cromosomico, definito dal medesimo aplotipo, abbiano ereditato anche la stessa mutazione in esso contenuto. Questa è la ragione per la quale il linkage ha una risoluzione di 10-20 cM mentre l'associazione con approccio tramite linkage disequilibrium ha una maggior risoluzione (0.1-0.2 cM).

Nello studio delle malattie multifattoriali il LD viene applicato un per identificare negli affetti per una specifica patologia delle regioni cromosomiche ancestrali (aplotipi) definite da marcatori genetici che si trovano in vicinanza del locus/gene predisponente al fenotipo patologico. Si presuppone che tali aplotipi siano conservati (dopo essere stati introdotti nella popolazione) per un certo numero di generazioni (anche se le ricombinazioni tendono a ridurre l'estensione). All'interno di ciascun blocco di LD sono presenti fino a 70 SNPs che non soggetti a ricombinazione che pertanto tendono a rimanere vicini nello stesso locus e sono ereditati insieme.

La presenza di questi blocchi di disequilibrium ha evidenti vantaggi: ha permesso, nelle analisi di associazione, di studiare non più un numero indefinito di polimorfismi all'interno di ogni regione, ma quegli SNPs (definiti appunto TAG - segnale) (Figura 4) necessari a identificare il blocco di DNA in disequilibrium ed il progetto HapMap inoltre ne ha garantito l'identificazione, la localizzazione e la genotipizzazione nelle popolazioni già menzionate.

Questi sistemi permettono un'analisi molto più veloce ed accurata utilizzando tecniche di genotipizzazione high – throughput su piattaforme array che permettono l'analisi contemporanea di migliaia di SNPs, e mettendo in relazione l'associazione con la patologia in esame o con altre caratteristiche.

Dal 2005 ad oggi sono stati identificati circa 100 nuovi loci di suscettibilità per 40 comuni malattie genetiche attraverso gli studi GWA (Thomas et al, 2008).

Il primo studio GWAs è stato pubblicato su Nature nel Febbraio del 2007 (Sladek et al, 2007) per la ricerca delle varianti di suscettibilità del diabete di tipo II. In seguito sono stati condotti numerosi studi GWAs sulle più importanti patologie complesse (artrite reumatoide, disordini bipolari, ipertensione, patologie coronariche, psoriasi) implementando le piattaforme di genotipizzazione e le analisi statistiche e bioinformatiche.

Si è trattato di un approccio rivoluzionario in quanto ha permesso di analizzare l'intero genoma contemporaneamente a livelli di risoluzione non raggiunti in precedenza, in migliaia di individui non imparentati tra loro senza che ci fossero ipotesi precedenti alla base dei classici studi caso-controllo.

Sono stati individuati geni che non si pensava potessero avere coinvolgimento patogenetico per le patologie analizzate e dall'altra parte si sono avute repliche e conferme nelle regioni precedentemente identificate tramite linkage.

Sebbene l'impatto di questi studi sia stato determinante ad oggi si è evinto che la tecnica presenta notevoli limiti tra cui il rischio di falsi positivi e falsi negativi, gli errori di genotipizzazione, una selezione imprecisa dei partecipanti allo studio ed un elevato costo non sostenibile da molti centri di ricerca.

L'ultima applicazione nel campo degli studi GWA si è concentrata non più sugli SNPs non sinonimi, ma sulle varianti all'interno dei geni, che inserivano cioè variazioni aminoacidi che nella proteina codificata. Questi SNPs hanno un ruolo più specifico nel determinare la variazione dell'espressione genica. Quindi l'analisi simultanea degli SNPs e dell'espressione genica permette di mappare i fattori genetici alla base delle differenze individuali dei livelli quantitativi di espressione (eQTLs). Questi due studi correlati porrebbero pertanto costituire i quadri di variazione genetico di una patologia indicando contemporaneamente i loci coinvolti ed i geni mis-regolati nella patologia permettendo di ricostruire il pathway patogenetico.

CAPITOLO II

BASI GENETICHE DELLA SUSCETTIBILITÀ ALLA PSORIASI, ALLA PSORIASI ARTROPATICA ED ALLA DERMATITE ATOPICA

Generalità cliniche, fisiopatologiche e genetiche

Psoriasi

La psoriasi (OMIM %177900) è una comune patologia cutanea presente nel 2-4% della popolazione Caucasica. E' una dermatosi eritemato-squamosa ed è caratterizzata da una notevole variabilità clinica, localizzazione eterogenea e forme talvolta gravi (Figura 5).

Figura 5: Placca eritemato-squamosa con le tipiche squame bianco argentee caratteristica della psoriasi
(Amerio et al.,2003)



La principale caratteristica clinica della psoriasi è rappresentata da chiazze eritematose croniche, sormontate da squame bianco-argentee spesso non pruriginose localizzate negli adolescenti e negli adulti, preferenzialmente sul cuoio capelluto e sulle superfici estensorie di braccia e gambe, e nei bambini all'interno delle pieghe cutanee.

Il decorso è cronico caratterizzato dall'alternarsi di fasi acute e fasi di remissione difficilmente prevedibili. La malattia può decorrere silente per anni fino a quando uno stimolo di natura non definita, sufficientemente intenso, determina la comparsa di una chiazza psoriasica nella sede di lesione (reazione isomorfa della cute). Le più comuni aree colpite sono la cute del cranio e delle estensioni superficiali e le unghie (onicopatia) sebbene le lesioni possano essere presenti su tutto il corpo. Un'altra caratteristica tipica ma non esclusiva della psoriasi è il **fenomeno di**

Koebner o isomorfismo reattivo, che consiste nella comparsa di chiazze psoriasiche in sedi soggette a stress meccanici (scarificazione, ustioni, cicatrici chirurgiche).

Esistono varie forme cliniche di psoriasi:

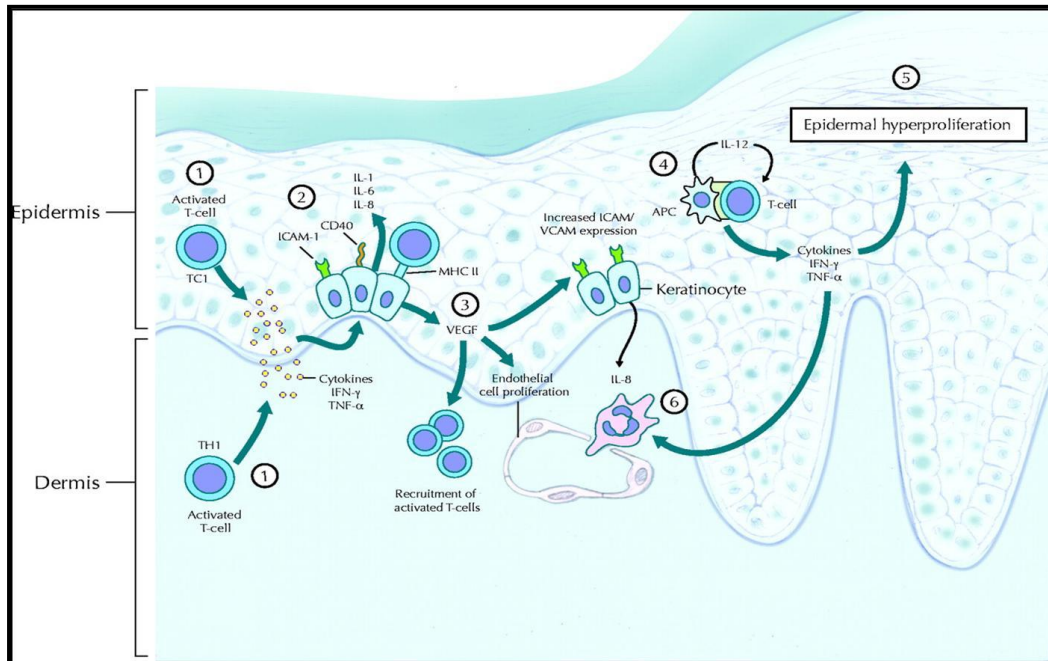
1) la **psoriasi volgare**, caratterizzata da lesioni che appaiono come chiazze eritematose, desquamanti, spesse anche alcuni centimetri, localizzate tipicamente sul cuoio capelluto e sulla regione estensoria degli arti (gomiti e ginocchia in particolare che sono zone sottoposte a continui traumi);

2) la **psoriasi guttata**, più comune nei bambini, contrassegnata dalla rapida comparsa (psoriasi eruttiva) di lesioni guttate (da pochi mm a poco più di un cm) sparse con regolarità e simmetria su tutta la superficie cutanea prediligendo la zona del tronco e del volto. Si riscontra spesso dopo un episodio infiammatorio del cavo orale o delle prime vie aeree soprattutto di origine streptococcica (streptococco β -emolitico di gruppo A);

3) la **psoriasi artropatica** può interessare le articolazioni e si associa frequentemente ad onicopatia psoriasica. La gravità non è correlata all'intensità delle manifestazioni cutanee e i distretti più interessati sono le articolazioni distali delle mani e dei piedi e le sincondrosi sacroiliache. Si tratta di una seria complicazione del quadro clinico della psoriasi riconosciuto alla fine del diciannovesimo secolo e colpisce circa **il 10%** dei pazienti con psoriasi (anche se come vedremo in seguito non c'è uniformità sui dati epidemiologici). Al contrario della psoriasi volgare e della psoriasi guttata è più comune nelle donne ed ha un'insorgenza tardiva.

La comprensione della **patogenesi** non è semplice e potrebbe non essere sempre la stessa in tutti i malati (Figura 6). Un'analisi dei trascritti estesa a tutto il genoma ha evidenziato un gran numero di geni o "cluster" genetici alterati, in particolare quelli coinvolti nella proliferazione epiteliale e nel sistema immunitario. Il sistema immunitario è chiaramente coinvolto nella patogenesi della psoriasi e il normale ciclo di divisione dei cheratinociti che dura 28-30 giorni, nei malati di psoriasi è accelerato a soli 3-4 giorni. Durante la formazione delle lesioni psoriasiche l'infiammazione precede la proliferazione epidermica ed aumenta il numero di linfociti T. In particolare sono attive le cellule $CD4^+$ e $CD8^+$ che, nelle lesioni, si presentano fortemente polarizzate e le cellule **Th1** (che in molti pazienti aumentano anche nel circolo sanguigno). Non è ancora noto se le cellule primariamente coinvolte siano i cheratinociti o i linfociti T e sono state fatte diverse ipotesi patogenetiche.

Figura 6: Il processo patogenetico della psoriasi

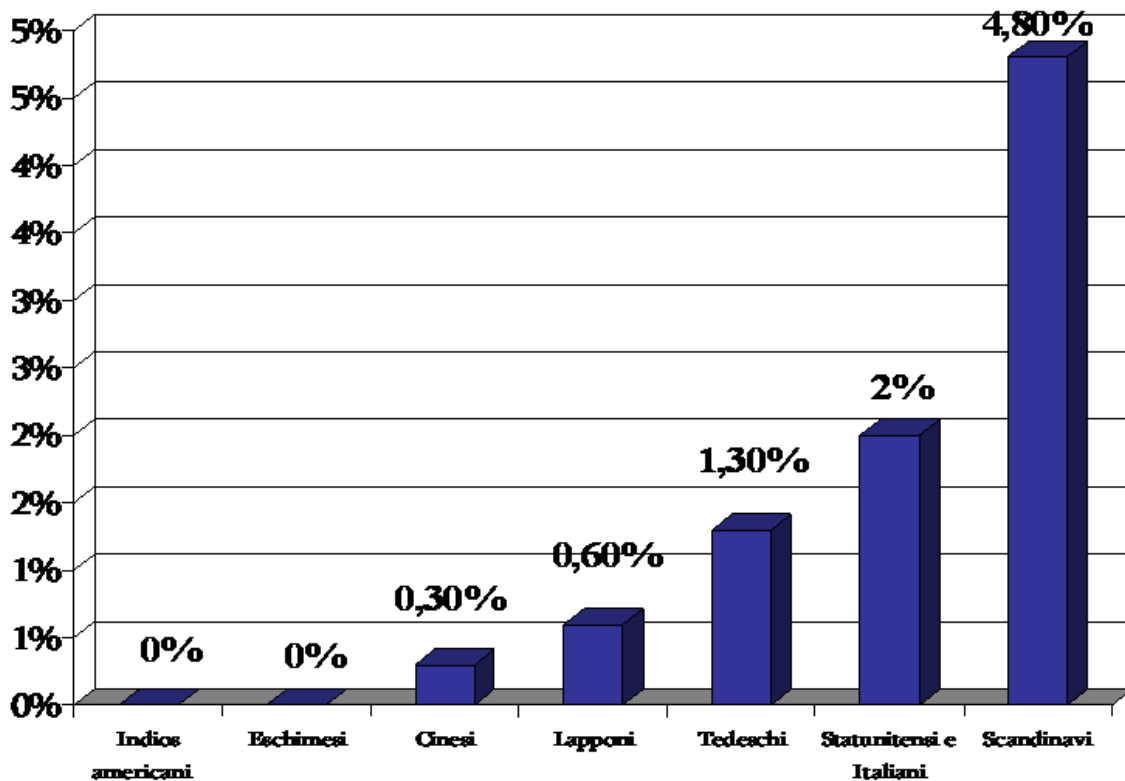


Epidemiologia genetica della psoriasi

La parola psoriasi prende origine dal Greco “ψωρα”-□□□ psora, conosciuta da Ippocrate di Cos (V°sec. a.C) e la prima chiara descrizione clinica è attribuita al dermatologo anglosassone Robert Willan che nel 1808 pubblicò l’opera “On cutaneous disease”.

La psoriasi è diffusa in tutto il pianeta sebbene mostri netta prevalenza nella regione Scandinava e nel Nord Europa (raggiunge frequenze del 3%), nel Nord America e nel Regno Unito dove ha una frequenza del 2%. Nel Giappone invece la prevalenza della malattia è dello 0.2%, ed è quasi assente nei Nativi d’America (Figura 7).

Figura 7: Prevalenza della psoriasi nella popolazione mondiale (modificata da : La Psoriasi; dalla diagnosi clinica alle nuove Terapie, Fabbri P, SEE Firenze)



Studi epidemiologici indipendenti hanno rilevato che, mediamente, la concordanza della psoriasi nei gemelli monozigoti è del 65-72% confrontata con quella dei dizigoti che invece è del 15-30% (Schultz Larsen et al., 1993).

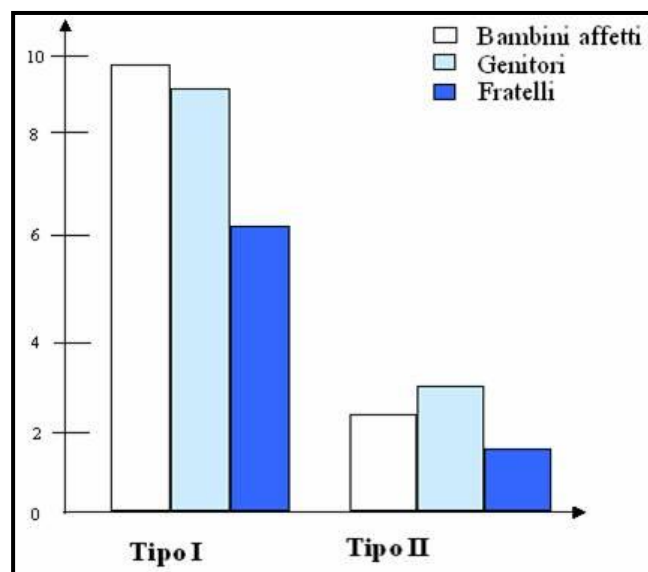
La malattia colpisce maschi e femmine in eguali proporzioni e il 75% dei pazienti sviluppa la patologia prima dei 40 anni di età.

Le prime manifestazioni cliniche della malattia sono più comuni nella terza decade d'età. In particolare, la malattia mostra due picchi di età d'insorgenza: uno maggiore intorno ai 20-30 anni (psoriasi di tipo I) e uno minore intorno ai 50-60 anni di età (psoriasi di tipo II) che potrebbe sottendere l'esistenza di due differenti forme della malattia.

Un'importante misura del carattere genetico delle malattie complesse è il rischio di trasmissione, il rapporto tra il rischio di sviluppare la patologia per un parente del probando affetto ed il rischio presente nella popolazione generale. Sulla base di uno studio epidemiologico molto esteso è stato dimostrato che il rischio di trasmissione nella psoriasi è

approssimativamente 10 volte maggiore nei parenti di primo grado di un paziente con psoriasi ad insorgenza giovanile (Elder et al., 2001) (Figura 8).

Figura 8. Incremento del rischio di trasmissione della psoriasi in parenti di malati di psoriasi. Il rischio di trasmissione è definito come la prevalenza della psoriasi nei parenti del probando affetto dal tipo di malattia indicato, diviso la prevalenza della psoriasi nella popolazione generale (assunta qui come l'1.5%) (Dati di Christophers e Henseler, modificati da Elder, JT. et al, 2001; figura modificata da Elder, JT., et al., 2001).



Genetica della psoriasi

Ad oggi sono noti circa 11 loci di suscettibilità alla psoriasi localizzati sui cromosomi 6q21 (PSORS1), 17q (POSRS2), 4q (PSROS3), 1q21 (PSORS4), 3q21 (PSORS5), 19 (PSORS6), 1p (PSORS7), 4q31 (PSORS9), 18p11 (PSORS10), 5q31-33 (PSORS11) (OMIM 177900). Altri loci di suscettibilità suffragati da minori evidenze scientifiche sono stati identificati sui cromosomi 16q (PSORS8) e 20p (Tabella 3).

Tabella 3. Localizzazione dei loci di suscettibilità della psoriasi

LOCUS	LOCALIZZAZIONE	GENI	POPOLAZIONE
PSORS1	6p21	MHC I	molteplici
PSORS2	17q25	SLC9A3R1;NAT9;RAPTOR	Americana e Inglese
PSORS3	4q	ND	
PSORS4	1q21	ALL'INTERNO DELL' EDC	Italiana e Americana
PSORS5	3q21	SLC12A8	Svedese
PSORS6	19p13	ND	
PSORS7	1p	ND	
PSORS8	16q		
PSORS9	4q31-4q34	ND	Cinese
PSORS10	18p11	Tra i marcatori D18S63 e D18S967	Finlandese
PSORS11	5q31-33	IL12 B	Nord Americana, Inglese e Cinese

Nella psoriasi, come nella maggior parte delle patologie autoimmuni esiste una forte associazione con il locus HLA (Human Leucocyte Antigene), nota da oltre 30 anni (Russel et al., 1972). Il locus PSORS1 è localizzato sul cromosoma 6p21.3 in una regione di 1-2 cM comprendente il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) in cui sono localizzati i geni per gli HLA. Questa regione è considerata il maggior locus di suscettibilità alla psoriasi ed è responsabile del 30-50% dei casi della malattia (Trembath et al., 1997). La psoriasi di tipo I è caratterizzata da esordio precoce (prima dei 40 anni di età) (Elder et al., 2001), e presenta una forte associazione con l'allele HLA-Cw06 mentre la psoriasi di tipo II, caratterizzata da una età d'insorgenza maggiore di 40 anni, mostra associazione con gli alleli HLA-Cw2 e HLA-B27. Alcuni studi hanno dimostrato che solo il 10% degli individui che possiedono l'allele HLA-Cw*06 sviluppano la malattia mentre in alcune popolazioni, come ad esempio nei giapponesi, questa regione non è correlata allo sviluppo della patologia.

In tal senso sono stati studiati e analizzati i numerosi loci non-MHC. La localizzazione del secondo locus di suscettibilità alla psoriasi sul cromosoma 17q25 è stata dimostrata da numerosi gruppi di ricerca in campioni composti da famiglie psoriasiche appartenenti a differenti popolazioni Caucasiche (USA, Irlanda e Svezia) (Enlund et al., 1999; Nair et al., 1997). Ad oggi, l'unico gene causativo di suscettibilità della psoriasi per il quale sono stati generati solidi dati scientifici è SLC9A3R localizzato sul cromosoma 17q25 (Helms et al., 2003). In particolare, un polimorfismo in questo gene, rimuove un sito di legame per il fattore

di trascrizione RUNX1 (runtrelated transcription factors) e mostra un'elevata associazione con la malattia (Capon et al., 2004).

Gli altri loci non-MHC sono stati identificati, ad esempio, nelle popolazioni Inglese ed Irlandese (PSORS3 localizzato sul cromosoma 4q35) e nella popolazione Italiana (PSORS4 sul cromosoma 1q21) (Matthews et al., 1996; Capon et al., 1999).

A conferma dell'eterogeneità genetica della patologia oltre all'identificazione di differenti loci di suscettibilità è nota l'esistenza di epistasi tra alcuni di essi. In particolare nella popolazione italiana è stata dimostrata un'interazione epistatica tra HLA (PSORS1) e il cromosoma 1q21 (PSORS4) (Capon et al., 1999).

IL LOCUS PSORS4 (1q21)

L'importanza che ha assunto il locus PSORS4 negli ultimi anni nello studio della suscettibilità genetica alla psoriasi risiede nella sua ottimale localizzazione genetica.

Situato infatti all'interno di una regione estremamente interessante per lo studio delle patologie dermatologiche in quanto presenti i geni del complesso dell'EDC (complesso di differenziamento dell'epidermide), implicati nella formazione di uno strato corneo funzionale. L'EDC (OMIM # 601588) è un cluster di 3 famiglie di geni correlate a livello funzionale, strutturale ed evolutivo che prendono parte alle parti finali del processo di differenziamento dell'epitelio (Mischke et al., 1996).

Espressi durante la fase tardiva della maturazione delle cellule dell'epidermide, si estendono per circa 2Mb e sono suddivisi in tre grandi famiglie.

La prima famiglia comprende 13 geni, inclusi i geni che codificano per l'involucrina, la loricrina e per 3 classi di proteine ricche in prolina (SPRRs small proline-rich proteins), indotte durante la differenziazione squamosa dei cheratinociti. I legami transeglutaminasi dei prodotti di questi geni conferiscono resistenza ed elasticità all'involucro corneo.

La seconda famiglia dei geni dell'EDC comprende i geni che codificano per la pro-filaggrina, la tricoialina e per la famiglia delle proteine di riconoscimento del peptidoglicano (PGRP family) tra cui i geni *PGLYRP3* e *PGLYRP4* (codificanti rispettivamente PGLYRP-Ia e PGLYRP-IB) localizzati nella regione 1q21. Questi geni codificano per molecole importanti per il riconoscimento dei batteri e sono determinanti nella funzione di protezione della cute (Lu et al., 2006). La terza famiglia di geni comprende 10 geni appartenenti alle proteine S100 (da A1 a A12) che codificano per proteine leganti il calcio con funzione chemiotattica.

Studi di linkage e di associazione condotti sui malati di psoriasi nella popolazione Italiana, non hanno ancora identificato mutazioni e polimorfismi associati con la malattia nei geni S100 e nei geni PGLYRP3 e PGLYRP4 (Semprini et al. 1999; Stoll et al. 2001, Giardina et al 2006). Un recente studio di associazione condotto nelle popolazioni Irlandesi, Finlandesi e Svedesi ha individuato delle varianti di rischio nei geni PGLYRP3 e PGLYRP4 e in alcuni geni SPRRs (Kainu et al., 2008).

L'associazione genetica con la psoriasi, pur essendo presente in tutte e tre le casistiche analizzate non era mai riconducibile ad un aplotipo univoco nelle tre popolazioni a conferma dell'eterogeneità genetica della regione genetica.

LCE CLUSTER

Il cluster genetico LCE (Late Cornified Envelope), comprende 11 geni localizzati sul braccio lungo del cromosoma 1 (1q21 -1q21.3) che codificano per proteine dello strato corneo. Come indica la loro denominazione sono geni espressi nelle fasi più tardive dell'assemblamento dell'epidermide fetale (Jackson et al., 2005).

E' un cluster che si estende per oltre 320 kb all'interno dell'EDC e si può suddividere in 3 gruppi denominati LCE1, LCE2 ed LCE3.

I geni dei complessi LCE1 e LCE2 sono espressi nella cute mentre i geni del complesso LCE3 sono espressi in tutti gli epiteli, compresi gli epiteli di rivestimento degli organi interni (Marshall et al. 2001).

Un recente studio GWA ha analizzato 311398 SNPs in una casistica composta da 223 pazienti PS e PsA. Lo SNP rs6701216 localizzato nel gene *LCE1C* è risultato associato con la psoriasi e l'associazione è stata confermata in una seconda casistica di pazienti comprendente 577 PS e 737 controlli (combined p -value = 6.2×10^{-5}) (Liu et al., 2008).

Artrite psoriasica

L'artrite psoriasica, anche detta artrite sieronegativa, è una forma infiammatoria di artrite che è comunemente associata con la psoriasi cutanea. Studi indipendenti hanno riportato frequenze difformi di questa malattia, variando dal 5% al 42% (Gladman et al., 2000). La maggior parte dei pazienti sviluppa la psoriasi molti anni prima di avere l'esordio della artropatia, la cui severità non correla con la tipologia delle lesioni psoriasiche.

La forma volgare è il tipo di psoriasi che più frequentemente si associa con l'artrite psoriasica, sebbene la presenza di coinvolgimento artropatico è stata riportata anche per le forme guttata e pustolosa.

La psoriasi artropatica interessa tanto le articolazioni periferiche che quelle assiali.

L'analisi del sinovio, delle articolazioni di pazienti psoriasici è caratterizzato da infiltrazione di monoliti, responsabili della produzione di metalloproteinasi che potrebbero contribuire alla erosione cartilaginea nelle forme infiammatorie di artrite.

Sono stati descritti 5 principali tipi di psoriasi artropatica:

- 1) Oligoartrite asimmetrica: meno di cinque articolazioni coinvolte;
- 2) Poliartrite simmetrica: cinque o più lesioni coinvolte (difficilmente distinguibile dall'artrite reumatoide);
- 3) Artrite delle articolazioni distali interfalangeiche;
- 4) Artrite mutilante (esita in gravi deformità);
- 5) Spondiloartrite: interessa la giunzione sacroiliaca.

Clinicamente è possibile che uno stesso paziente manifesti più di un tipo di lesioni sia contestualmente, sia durante periodi di vita successivi.

La diagnosi di artrite si avvale dell'osservazione clinica delle lesioni e della loro localizzazione, della familiarità alla psoriasi, all'esame radiografico. Per accertare la presenza di psoriasi artropatica è necessario dapprima escludere le altre possibili cause di coinvolgimento articolare.

Dermatite Atopica

Lo stato atopico (dal greco “α-τοπος” - di difficile collocazione) indica uno stato caratterizzato dall'insorgere di una risposta allergica contro comuni allergeni con conseguente aumento della concentrazione di IgE nel siero, caratteristica comune anche all'asma, all'orticaria e alla rinite allergica (i valori fisiologici della concentrazione nel siero delle IgE sono inferiori ai 250 ng/ml) (Rugarli, 1996).

La dermatite atopica (DA - OMIM %603165) è una malattia infiammatoria della pelle caratterizzata da cicli alternati di esacerbazioni e stati clinici silenti.

Questa patologia presenta un'insorgenza estremamente precoce (il 50-75% degli affetti sono bambini con un'età inferiore ai sei mesi) e la prevalenza nella popolazione Caucasica è

compresa tra del 10-15%. La variabilità sarebbe legata non tanto a motivi di natura genetica ma di stile di vita ed ambientale (dieta, abitazione, stress, stile di vita).

Gli studi epidemiologici hanno messo in luce come la patologia sia distribuita variabilmente passando da una maggior prevalenza nelle zone urbane rispetto a quelle rurali.

La malattia si manifesta con disidratazione della cute, prurito, lesioni eritemato-vescicolari ad evoluzione crostosa e desquamativa, lichenificazione cutanea ed essudazione (Figura 9).

Figura 9. Dermatite atopica: lesioni eritemato-essudative al volto e lesioni croniche lichenificate al collo (Girolomoni e Pastore, 2002)



La dermatite atopica, data l'elevata frequenza tra i bambini, è divenuta anche un problema socio-economico a causa delle modificazioni dei comportamenti sociali che ne derivano per l'impatto negativo sulla qualità della vita.

Tra questi citiamo:

- problemi psicologici determinati dalla visibilità delle lesioni esterne;
- perdita del sonno e mancanza di concentrazione a scuola e al lavoro;
- lesioni da scarificazione causate dall'intenso prurito;
- trattamenti costosi e temporalmente lunghi.

La diagnosi di DA si basa sulle rilevazioni di manifestazioni cliniche che sono variamente presenti. Tra queste il prurito in sedi specifiche, la cronicità dell'infiammazione, la ricorrenza personale o familiare della "triade atopica": asma, congiuntivite/rinite allergica e dermatite atopica (Blauvelt et al., 2003).

La maggior parte dei casi di DA sono associati ad un'aumentata sensibilità ad allergeni ambientali con il conseguente incremento nel siero di IgE (DA estrinseca), ma circa il 10-30% dei casi è affetto da un tipo di dermatite che non presenta i classici criteri atopici (DA intrinseca) (Wollenberg et al., 2000).

Clinicamente si possono distinguere 3 stadi della malattia relativi all'età d'insorgenza. La disidratazione della cute e il prurito sono manifestazioni cliniche associate a tutte e tre gli stadi.

1) Fase neonatale (0-2 anni) può originare prima dei tre mesi di età. Le lesioni nei bambini molto piccoli sono frequenti sul viso, sulla testa e sulle superfici estensorie delle braccia e delle gambe;

2) fase infantile (2-12 anni) le lesioni si localizzano nelle aree flessurali delle estremità sebbene l'intenso prurito periorbitario possa portare alla formazione di interlinee infraorbitarie (pliche di Morgan);

3) negli adulti (circa il 25% dei casi) la pelle tende ad essere secca e rugosa, con modificazioni licheniformi coinvolte nelle regioni periorbitali, papule pruriginose ed eczema nummulare (a forma di moneta) (Amerio et al., 2003).

Nelle forme croniche di DA si osserva una lichenificazione cutanea rappresentata da un ispessimento epidermico con accentuazione delle pliche cutanee. Si possono verificare intensi arrossamenti e notevole ipertrofia che portano alla formazione di noduli pruriginosi nell'epidermide che mostra un'estesa iperplasia mentre il derma mostra un aumentato numero di eosinofili e di cellule mononucleari indice di risposta immunitaria attivata.

Nella forma subacuta le lesioni appaiono eritematose con la presenza di papule crostose e piastre in rilievo che suggeriscono una superinfezione batterica.

Le lesioni acute si presentano inizialmente con intenso prurito, macule o papule eritematose. Alterazioni nei geni che controllano le risposte immunitarie e la differenziazione dei linfociti T sono state confermate in diversi studi e condivise dai pazienti affetti da asma bronchiale o rino-congiuntivite. L'aumento della prevalenza delle malattie atopiche nei paesi industrializzati è attribuito alla ridotta esposizione ad agenti microbici.

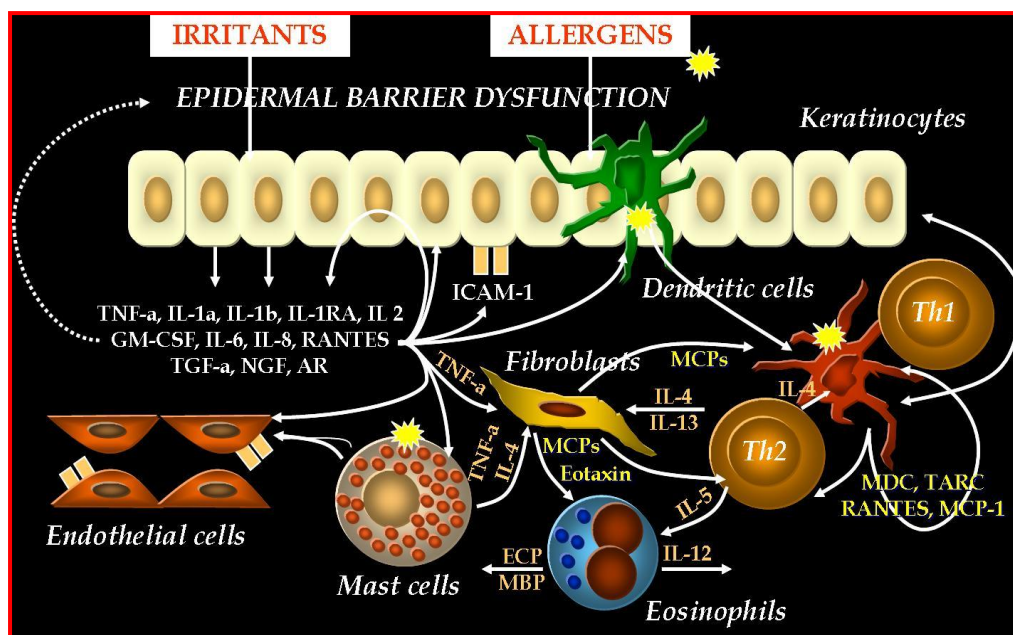
Fisiopatologia

La dermatite atopica, viene considerata una reazione da ipersensibilità da contatto in cui coesistono fenomeni di ipersensibilità IgE mediati (I tipo). Il quadro immunologico è schematicamente il seguente:

- squilibrio linfocitario Th1/Th2 (espansione clonale Th2);
- incremento delle citochine infiammatorie (IL 1,2,4,5,6,8,9,13);
- “switch” IgG-IgE (IL-4 mediato);
- deficit enzimatici.

Il quadro istologico è caratterizzato da un predominante interessamento dell'epidermide nella quale fluiscono linfociti T (esocitosi) e da edema intercellulare (spongiosi) con formazione di vescicole, mentre nel derma sono presenti eosinofili (Figura 10) (Amerio et al., 2003).

Figura 10. Patogenesi della dermatite atopica



Una delle più tipiche caratteristiche dei pazienti con DA è la secchezza cutanea (xerosi). La xerosi cutanea è conseguenza delle alterazioni della barriera epidermica che, a loro volta, dipendono da un alterato metabolismo lipidico e proteico impegnato nella costruzione dello strato corneo che si presenta povero di ceramidi.

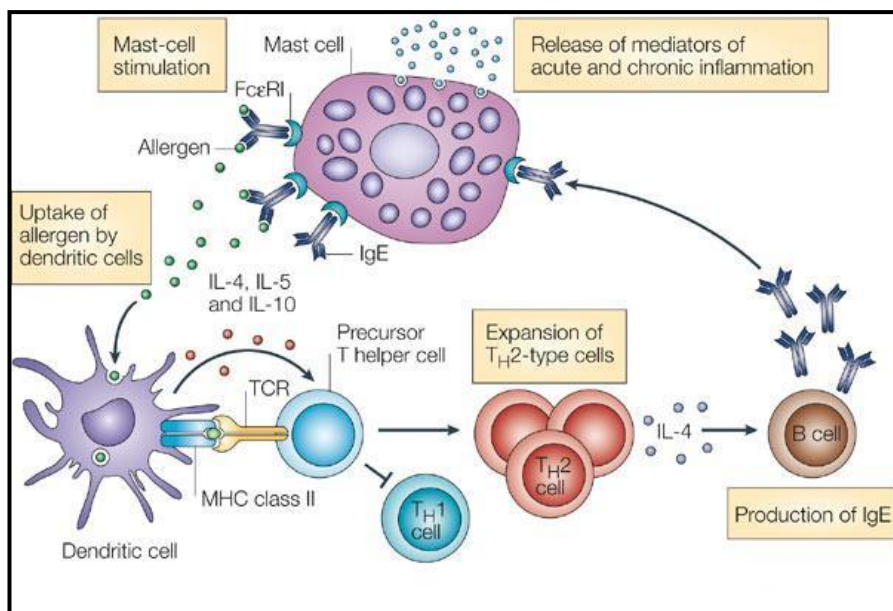
Gli allergeni più frequentemente coinvolti sono quelli alimentari, gli aeroallergeni (pollini) e il Dermatophagoides pterossinus. Questi, a causa del malfunzionamento della barriera epidermica (dello stato corneo in particolare), potrebbero penetrare per via transepidermica e attraverso la mucosa sia respiratoria che intestinale (Girolomoni et al., 2002).

L'esposizione a vari allergeni ambientali comporta un *iper-produzione di IgE* da parte dei linfociti B.

Una volta avvenuto il contatto si verifica l'espansione clonale e la differenziazione in linfociti T della memoria e linfociti T effettori polarizzati in senso Th2 (cellule T helper di tipo 2). Le IgE si legano alla superficie dei mastociti e dei basofili attraverso recettori ad alta affinità per i frammenti Fc delle immunoglobuline di tipo I (FcεRI). Una volta che è avvenuto il riconoscimento dell'allergene da parte delle IgE, inizia una cascata di reazioni immunologiche. Mastociti e basofili rilasciano nell'ambiente le citochine, mediatori dell'infiammazione. Si verifica un rilascio nel microambiente di IL4 e IL13 in grado di stimolare i linfociti B nella produzione di IgE, IL5, IL8 e IL9 e chemochine che richiamano i granulociti eosinofili. Questo meccanismo eziopatogenico permette di spiegare molti aspetti della dermatite atopica tra cui gli alti valori di IgE, le manifestazioni respiratorie e gastrointestinali e le lesioni cutanee (Amerio et al., 2003).

L'innesco della risposta immunitaria e lo switch TH1/TH2 sono riassunti nella Figura 11.

Figura 11: Meccanismo dell'ipersensibilità immediata mediato dai linfociti T CD4+ e CD8+. Durante l'allergia gli allergeni stimolano la differenziazione dei linfociti T CD4+ in cellule effetttrici Th2 mediante citochine IL-4, IL-5 e IL-13 che stimolano i linfociti B nella produzione di IgE. Le IgE si legano ai recettori ε ad alta affinità (FcεRI) esposti sulla superficie dei mastociti e dei granulociti basofili i quali liberano gli effettori chimici che determinano la risposta allergica (Cookson et al., 2004).



Epidemiologia genetica della dermatite atopica

La dermatite atopica è una patologia molto comune nei paesi industrializzati. Una recente ricerca svolta dall'Associazione Italiana Eczema Atopico ha mostrato una prevalenza della malattia di circa il 5% nei bambini di 9 anni, che sale al 15% se si considera la prevalenza in tutta la durata di vita (Girolomoni et al., 2002). I costi terapeutici, sostenuti dalle famiglie degli affetti sono sensibili, e molti bambini presentano la patologia anche in età adulta. Lo stato atopico è diagnosticato tramite i seguenti criteri:

- prick test cutaneo ai comuni allergeni: prende il suo nome dall'inglese (to prick = pungere) in rapporto alla sua modalità di esecuzione;
- dosaggio totale delle IgE tramite PRIST test (acronimo inglese di "Paper Radio Immuno Sorbent Test" test di radioimmunoassorbimento su carta): un elevato livello delle IgE nel siero può avvalorare il sospetto diagnostico di una patologia allergica;
- dosaggio delle IgE specifiche: ha più valore diagnostico del dosaggio delle IgE totali e serve per confermare gravi dermopatie nei bambini molto piccoli. Si utilizza il RAST test (acronimo inglese di "Radio Allergo Sorbent Test" test di radio-allergo-adsorbimento) (Rugarli, 1996).

Circa l'80% dei bambini affetti da eczema presenta lo stato di atopia definito da questi criteri ma nel 20% dei casi non si osservano manifestazioni "atopiche" non è ancora chiaro se questo secondo tipo di malattia è il risultato di un differente processo patogenetico (Cookson et al., 2002).

Studi gemellari sull'eczema mostrano un tasso di concordanza dello 0.72-0.86 nei monozigoti e dello 0.21-0.23 nelle coppie di gemelli dizigoti. Il livello di IgE totali nel siero mostra un ereditabilità del 50%.

Il rischio di trasmissione nelle patologie atopiche da una madre affetta è approssimativamente quattro volte maggiore rispetto a quello di un padre affetto. Questo tipo di ereditarietà dipendente dallo status dei genitori è stata riscontrata anche nella psoriasi e nella psoriasi artropatica e in altre patologie autoimmuni (diabete tipo I, artrite reumatoide ecc.) (Bowcock, 2004; Cookson, 2002). Questo "effetto-materno" potrebbe essere il risultato dell'interazione tra il sistema immunitario materno e il feto sia a livello placentare che durante l'allattamento. Alternativamente potrebbe essere il risultato di un imprinting genomico (con imprinting

genomico si intende l'espressione differenziale di alcuni geni a seconda dell'origine parentale, effettuata mediante meccanismi epigenetico) (Cookson, 2002).

La malattia è spesso correlata ad altri disturbi autoimmuni in particolare l'asma, la rinite e la congiuntivite allergica. La concentrazione di IgE nel siero è molto più elevata in bambini che presentano più di una manifestazione atopica, piuttosto che in bambini che presentano soltanto una delle patologie.

Sebbene la dermatite atopica sia clinicamente e patologicamente distinta dalla psoriasi alcuni sintomi sono condivisi da entrambe le patologie tra cui la secchezza della cute ed una alterata differenziazione epidermica. Tuttavia la psoriasi è caratterizzata da infiltrazione di cellule infiammatorie entro il derma e l'epidermide e la caratteristica principale è l'iperproliferazione dei cheratinociti, diversamente da quanto avviene nella dermatite atopica.

Genetica della dermatite atopica

Studi di linkage sull'intero genoma hanno identificato loci di suscettibilità alla dermatite atopica sui cromosomi 1q21 (ATOD2), 3q21 (ATOD1), 5q31-q33 (ATOD6), 13q12-q14 (ATOD5), 17q25 (ATOD4), 20p (ATOD3). (Bradley et al., 2002) (Tabella 4)

Ad oggi sono noti due screening genomici eseguiti per la dermatite atopica infantile ed uno per la dermatite atopica nell'adulto: il primo, eseguito su bambini di famiglie Tedesche e Scandinave, ha localizzato il primo locus della dermatite atopica sul cromosoma 3q21 (ATOD1) (Lee et al., 2000). In questa regione di circa 10 cM mappano alcuni geni che codificano per proteine di membrana del tipo I della superfamiglia delle immunoglobuline, gli antigeni CD80 e CD86. Entrambe queste proteine interagiscono con CD28 per promuovere l'attivazione delle cellule T e sono coinvolte nell'attivazione dei linfociti CD4+ T-helper del tipo Th2 che svolgono un ruolo determinante nel mediare l'infiammazione allergica.

Il secondo studio, condotto su 148 famiglie inglesi, ha portato alla scoperta di altre tre regioni di linkage alla Dermatite Atopica e alla Dermatite Atopica combinata ad asma, sui cromosomi 1q21 (ATOD2), 17q25 (ATOD4) e 20p (ATOD3) (Cookson et al., 2001) dimostrando la sovrapposizione tra i loci di suscettibilità della dermatite atopica e della psoriasi.

Il terzo screening condotto su adulti della popolazione Svedese ha portato all'evidenza di un'associazione tra la DA e la regione 3q24-22, oltre alla dimostrazione di un linkage alla regione 18q21 particolarmente rilevante nella DA e l'asma combinate (Bradley et al., 2002).

Per quanto riguarda lo studio dei geni candidati per la dermatite atopica sono stati studiati alcuni polimorfismi della catena ϵ dei recettori ad alta affinità per le IgE (Fc ϵ RI) mappati sul cromosoma 11q13 ed associati ad asma e dermatite atopica (Cookson, 2002). Inoltre è stata

riscontrata una sopraespressione del gene RANTES (Regulated on activation normal T cell expressed and secreted) causata da una mutazione a livello del suo promotore, correlata all'aumento di concentrazione della famiglia C-C delle chemochine presente durante l'infiammazione allergica.

Infine in un recente studio (Kato et al., 2003) è stata messa in evidenza un'associazione tra alcuni polimorfismi a livello degli esoni 13 e 14 di SPINK5 un gene difettivo nella Sindrome di Netherton's, (malattia autosomica recessiva caratterizzata da tricoressi, eritrodermia congenita ittiosiforme e diatesi atopica) localizzato sul cromosoma 5q31-q32 e la suscettibilità allo stato atopico, all'asma e alla DA.

Tabella 4. Screening genomici della dermatite atopica

Studio	Localizzazione	Marcatore	Fenotipo patologico	Popolazione
Lee et al, 2000	3q21	D3S3606	ATOD	Tedesca/Scandinava 199 trios (n=839)
Cookson et al, 2001	1q21	D1S498	ATOD	Inglese
	17q25	D17S784	ATOD	148 trios (n=383)
Bradley et al, 2002	20p	D20S115	ATOD & Asma	
	3p24-22	D3S1768	ATOD	Svedese
	3q14	D3S2459	ATOD	
	13q14	D13S325	ATOD	109 famiglie (n=470)
	15q14-15	D15S118	ATOD	
	17q21	D17D1290	ATOD	
Haagerup et al., 2004	18q21	D18S851	ATOD con incremento di IgE	
	3p26-24	D3S3594-D3S3038	ATOD con incremento di IgE	Danese
	4p15-14	D4S2408	ATOD con incremento di IgE	
	18q11-12	D18S877	ATOD con incremento di IgE	100 trios (n=424)

Filaggrina : il nuovo gene candidato per la suscettibilità alla dermatite atopica

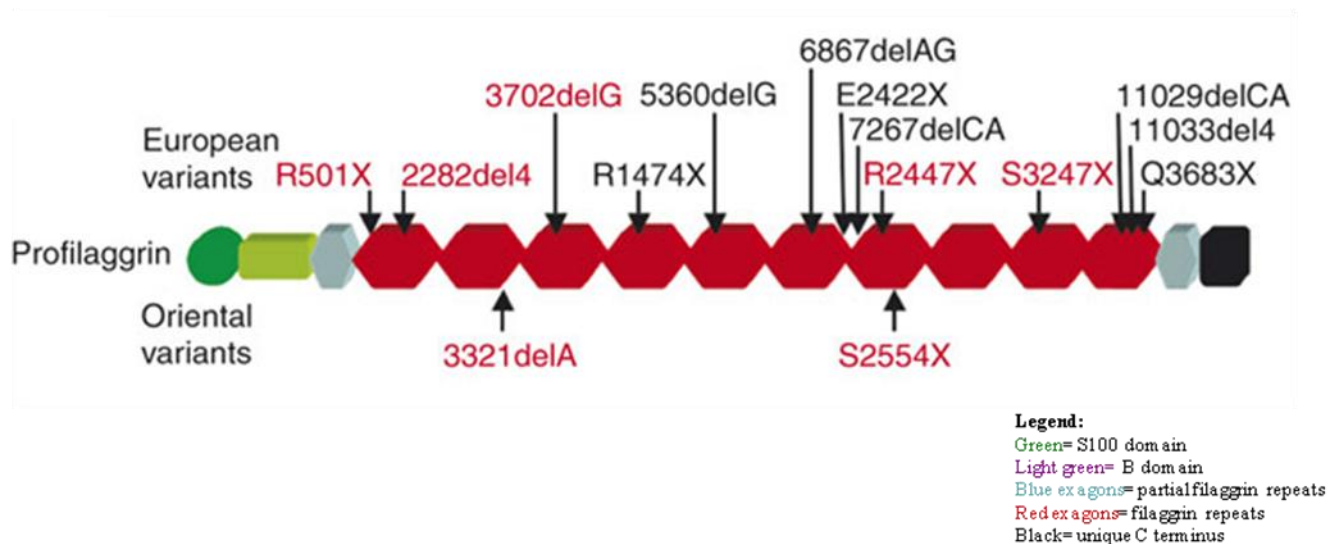
La filaggrina, codificata dal gene *FLG* che fa parte dell'EDC, costituisce il principale componente dei granuli di cheratoialina dell'epidermide umana ed è essenziale per la formazione e l'idratazione dello strato corneo. Il suo precursore, la pro-filaggrina, è una proteina di 400 kDa che viene defosforilizzata da una serie di proteasi e processata in 10-12 monomeri (37 kDa) funzionali di filaggrina. Insieme i monomeri danno inizio al compattamento cellulare richiesto nella biogenesi di formazione delle squame.

La riduzione del numero di copie o la perdita dell'espressione della filaggrina è stata associata ad un aumento della secchezza cutanea (xerosi cutanea) ed una formazione ridotta dello strato corneo (ittiosi) (Seguchi et al, 1996). Inoltre la perdita parziale o totale dell'espressione genica della filaggrina causa grosse perturbazioni della barriera cutanea ed a una aumentata suscettibilità all'entrata di allergeni nella cute.

Il gene *FLG* gene è formato da soli 3 esoni: l'esone 1 (15 bp), l'esone 2 (159 bp) ed un esone 3, estremamente grande (12.753 bp) che codifica per la maggior parte dell'N-terminale e per tutte le ripetizioni in tandem (10-12) della filaggrina (Palmer et al., 2006).

Molte sono i polimorfismi e le mutazioni polimorfiche all'interno del terzo esone (riportate in Figura 12)

Figura 12: Struttura del gene FLG

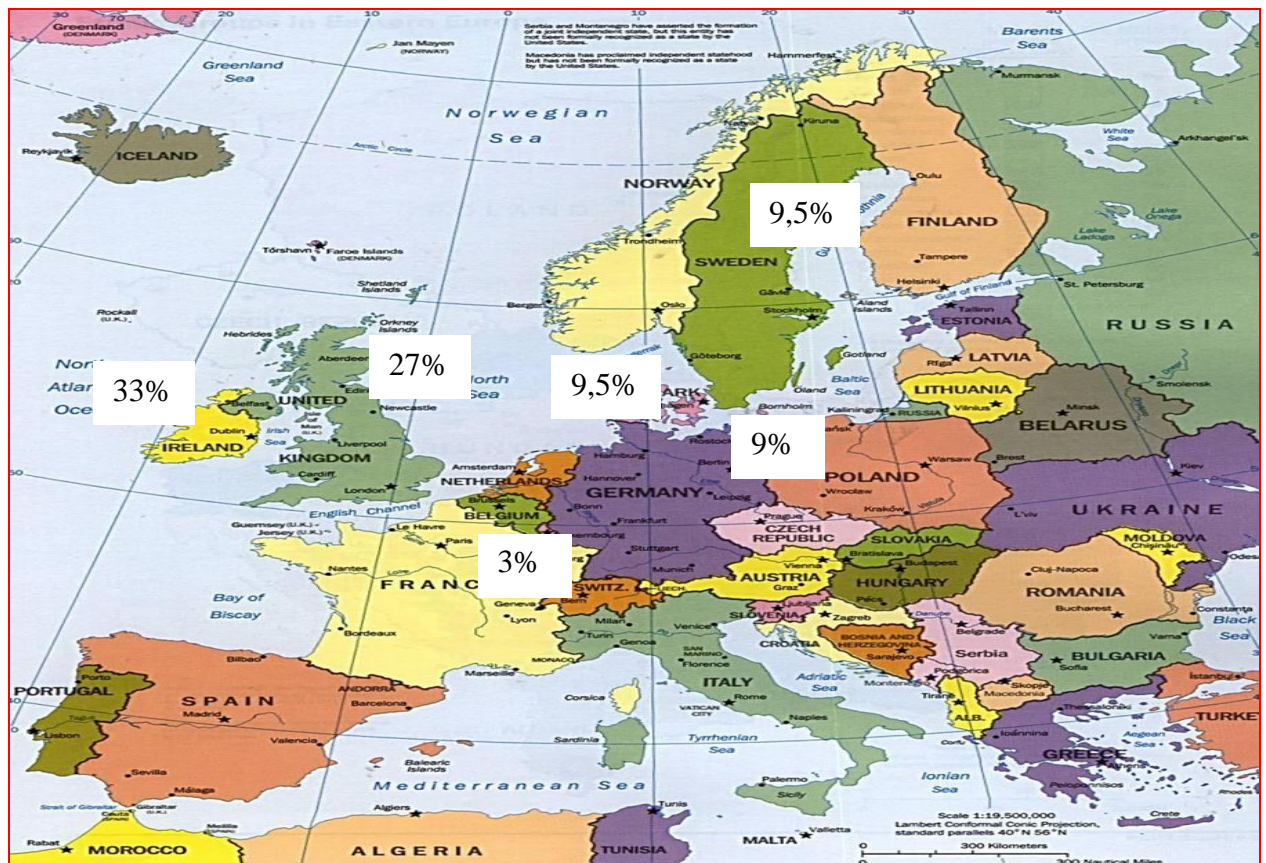


Negli ultimi anni 2 mutazioni polimorfe 2282del4 e R501X localizzate all'interno del 3 esone del gene *FLG*, sono state correlate alla suscettibilità genetica dell'Ittiosi Volgare (IV) (OMIM#146700) e della dermatite atopica in quanto comportano la formazione di una

proteina tronca e sono presenti nel DNA di circa il 9% degli individui di origine Europea (Palmer et al., 2006; Weidinger et al., 2007).

Questo dato preliminare è stato esteso a molte popolazioni Europee (Ingresi, Scozzesi, Irlandesi, Danesi, Tedeschi, Svedesi) e Americane e le mutazioni sono state trovate associate con differenti frequenze rendendo la filaggrina il principale gene candidato alla suscettibilità alla dermatite atopica e all'Ittiosi Volgare. Le frequenze riscontrate nelle popolazioni Europee sono riportate in Figura 13.

Figura 13: Frequenze delle mutazioni R501X 2282del4 nelle popolazioni Europee



CAPITOLO III

CONDIVISIONE DEI LOCI DI SUSCETTIBILITA' TRA LE MALATTIE COMPLESSE

“Ipotesi common soil”

Come affermato precedentemente, la maggior parte delle malattie che colpiscono l'uomo ha una base genetica. Chiaramente tutte queste malattie hanno caratteristiche diverse e possono pertanto essere raggruppate in distinte categorie.

Un'analisi più ampia di queste categorie rivela che molte malattie condividono caratteristiche cliniche, opportunità terapeutiche ed anche loci di suscettibilità genetica o polimorfismi di suscettibilità/resistenza. Questa condivisione dei loci di suscettibilità (co-localizzazione) può essere il risultato della condivisione di specifiche caratteristiche cliniche, specifici sintomi ricorrenti in diverse patologie, oppure essere dovuta alla contestuale presenza di diverse malattie nei medesimi pazienti. A dispetto delle enormi differenze in termini di eziologia, diagnosi e prognosi delle varie malattie, esistono in ogni caso delle caratteristiche condivise che hanno una base genetica, che, una volta identificate, miglioreranno la comprensione della patogenesi e conseguentemente delle possibilità terapeutiche.

Per esempio l'autismo, la malattia di Alzheimer e la sindrome di Tourette hanno caratteristiche cliniche simili, e le malattie cardiovascolari correlano con l'infarto del miocardio e le patologie coronariche. Malattie autoimmuni o immunomediate che siano sistemiche o confinate in specifici organi ricorrono con grande frequenza nei medesimi pazienti, a conferma dell'esistenza di basi genetiche comuni (Yamada et al, 2005).

Sono state proposte molte teorie per cercare di spiegare dal punto di vista genetico queste osservazioni di tipo clinico.

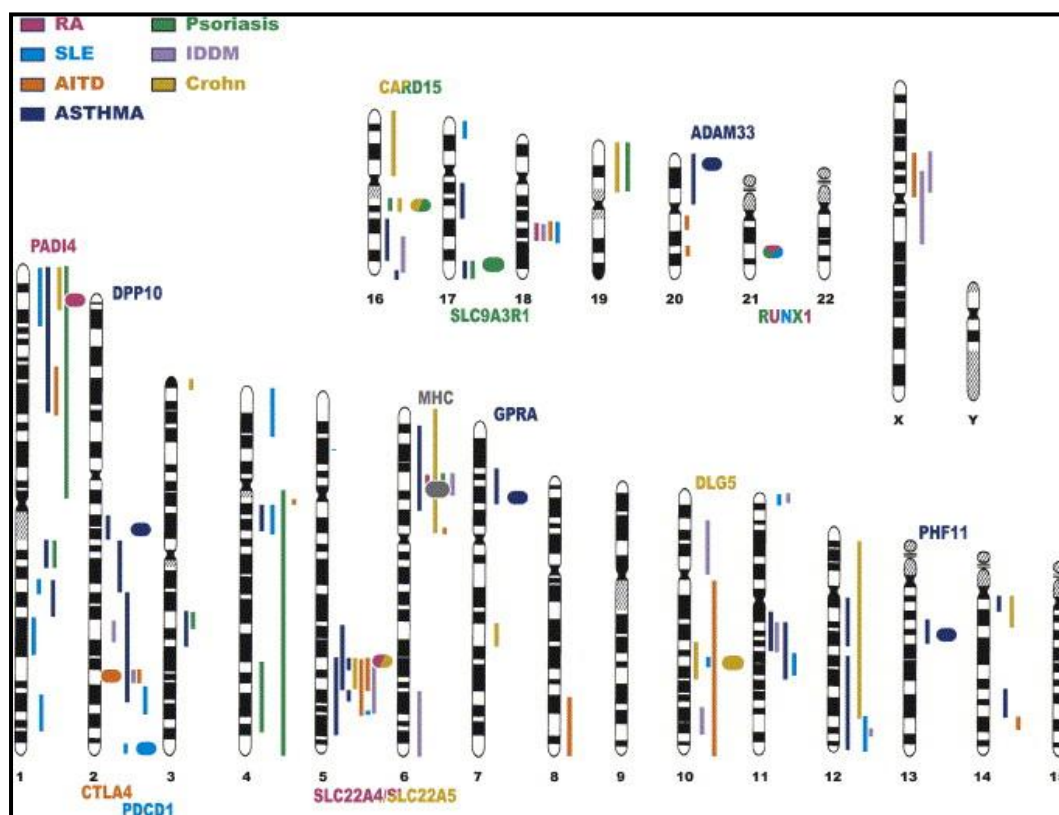
Una di queste è la teoria “**Common Disease/Common Variant**” che cerca di spiegare per quale motivo le malattie complesse siano mantenute con così alta frequenza nella popolazione. Questa ipotesi afferma che il rischio genetico per le malattie complesse è spesso dovuto all'effetto di alleli di suscettibilità frequenti. Pertanto le malattie comuni sono frequenti perché frequenti sono gli alleli di suscettibilità; le malattie semplici sono rare perché rare sono le mutazioni che le determinano. Tuttavia, a fronte di una così elevata frequenza, queste varianti di suscettibilità sono caratterizzate da una bassa/bassissima penetranza che ne complica tremendamente lo studio e l'identificazione.

Un esempio paradigmatico può venire offerto dai polimorfismi del gene *APOE* nel contesto della malattia di Alzheimer. In particolare, la malattia di Alzheimer affligge circa il 60% della popolazione superati i 75 anni. L'allele *APOE4* è presente nel 15% della popolazione generale e nel 50% dei pazienti affetti da Alzheimer. Lo stesso discorso può essere esteso ad altre patologie ad eziologia complessa quali l'asma, il diabete di tipo II e la schizofrenia.

Tuttavia la teoria Common Disease/Common Variant non spiega se questi alleli di suscettibilità hanno effetti soltanto su specifiche malattie o se possano conferire rischio anche per altre. In particolare, la sfida della moderna medicina non è soltanto l'identificazione di queste varianti, ma anche e soprattutto la comprensione degli effetti di queste varianti nei diversi contesti genetici, ambientali e in relazione ad altre patologie.

Come descritto precedentemente, le patologie complesse negli ultimi dieci anni sono state studiate mediante analisi di linkage e di associazione o entrambi. Un'analisi comparativa dei risultati degli studi di linkage rivela che molte delle regioni di suscettibilità identificate sono condivise da diverse patologie. Per fare alcuni esempi, regioni di suscettibilità sono condivise da schizofrenia e disturbi bipolari, diabete di tipo II ed obesità, psoriasi e dermatite atopica. Nelle malattie autoimmuni la co-localizzazione di loci di suscettibilità è stata osservata sia nelle diverse malattie sia nei diversi modelli animali suggerendo l'esistenza di una componente genetica comune che è alla base anche dello spirito del lavoro presentato in questa tesi. In Figura 14 sono presentati i risultati della co-localizzazione tra le diverse patologie.

Figura 14: Mappa dei loci e dei geni di suscettibilità delle malattie infiammatorie (Yamada et al.,2005)



Le patologie auto-immuni mostrano almeno 30 regioni di suscettibilità condivise all'interno del genoma: 1p21-22, 1q21-25, 1q42, 2q22, 2q32-36, 3q21, 4q28, 5p15, 5p11, 5q31-33, 6p12-q11, 6q27, 7p15-21, 7q21-22, 7q31, 8q22, 9p22, 10p12, 11p15, 11p13-14, 12p12-13, 14q31-32, 15q11, 15q26, 16q12-21, 17p13, 17q22, 19p13, 19q13, 20p11, 20q22, 22q12-13 e Xp11. Queste regioni di co-localizzazione non indicano necessariamente la condivisione dei medesimi alleli di suscettibilità, bensì possono risultare dalla presenza di cluster geni funzionalmente correlati o essere il risultato della distribuzione non casuale della ricombinazione nel genoma (blocchi di linkage disequilibrium).

Tuttavia, alcune patologie condividono anche singoli specifici geni di suscettibilità.

Un aspetto trascurato nelle tradizionali trattazione delle malattie complesse riguarda il fatto che la pleiotropia di singoli geni non è un fenomeno raro, non rappresenta un'eccezione bensì la regola. I vari alleli di suscettibilità codificano spesso per varianti di molecole normalmente

coinvolte in vie metaboliche importanti. Queste vie metaboliche contribuiscono in modo additivo allo sviluppo ed alla modifica di molteplici fenotipi malattia. Nel loro insieme queste varianti hanno effetti rilevabili nella determinazione delle varie malattie, ma singolarmente potrebbero avere effetti piccolissimi o addirittura non averne. Questi alleli che individualmente potrebbero non essere sufficienti a causare la malattia diventano determinanti se valutati alla luce delle interazioni tra altri fattori genetici, altri contesti patologici e le diverse pressioni ambientali. Occorre considerare che ai loci di suscettibilità vengono attribuiti nomi in relazione alla prima associazione identificata che non sempre ne rappresenta un esclusivo ruolo nella suscettibilità. In altre parole il nome dei vari loci potrebbe suggerire una specificità funzionale fuorviante poiché non tiene conto della intensissima rete di interazioni metaboliche e fisiologiche che si instaurano a livello dei singoli distretti corporei o anche a livello sistemico.

La teoria common variant/common disease diventa common variant/multiple diseases

Identificazione dell'effetto pleiotropico dei geni di suscettibilità

Come citato precedentemente, oltre a regioni di suscettibilità che co-localizzano tra le diverse patologie, è stato conseguentemente identificato l'effetto pleiotropico di varianti di suscettibilità.

CTLA4

Il gene *CTLA4* (cytotoxic T lymphocyte-associated 4) è stato mappato in cluster con il gene *CD28* sul cromosoma 2q33 ed insieme rappresentano un esempio di geni funzionalmente correlati e fisicamente "clusterizzati", entrambi coinvolti nello stesso pathway metabolico dei linfociti T. In particolare, *CD28* attiva le cellule T, mentre *CTLA4* agisce come un regolatore negativo delle stesse cellule T. Curiosamente diverse varianti di splicing di *CTLA4* producono sia una forma transmembrana sia molecole solubili (Magistrelli G. et al.,1999). Queste due diverse isoforme hanno funzioni differenti, e la loro espressione è fisiologicamente regolata ed anche correlata con diversi fenotipi. Ancora prima dell'identificazione delle forme di splicing del gene, studi di associazione indiretti avevano suggerito un'associazione tra *CTLA-4* e la tiroidite autoimmune (AITD) (Yanagawa et al.,1995). Nel corso degli anni diversi lavori hanno suggerito associazioni tra varianti del gene *CTLA-4* e diverse fenotipi correlato con AITD (morbo di Graves e tiroidite di Hashimoto). Sebbene tre polimorfismi del gene *CTLA-4* (-318T; A49G e THR17ALA) si sono dimostrati associati in diversi gruppi etnici compresi

caucasici, tunisini, asiatici e africani-americani a conferma della solidità dei risultati ottenuti, non è stato ancora del tutto chiarito il ruolo funzionale del gene. In particolare, non è possibile ancora determinare se il gene *CTLA-4* è l'unico responsabile della suscettibilità o se i polimorfismi associati rappresentano soltanto un'associazione indiretta dovuta a linkage disequilibrium.

A conferma della stretta inter-relazione tra le diverse malattie autoimmuni, anche la tiroidite autoimmune spesso si sviluppa in associazione con altre malattie autoimmuni tra le quali il diabete mellito di tipo I (IDDM), artrite reumatoide e lupus sistemico eritematoso. D'altra parte i polimorfismi del gene *CTLA-4* sono stati identificati come varianti associate a malattie autoimmuni quali il morbo celiaco, l'artrite reumatoide, la malattia di Addison, l'epatite autoimmune, la miastenia grave (Vaidya et al., 2002; Djilali-Saiah et al.,1998; Seidl et al.,1998; Kristiansen et al.,2000; Marron et al.,1997; Nistico et al.,1996; Einarsdottir et al.,2003).

RUNX1

Runx1 è espresso in tutte le linee cellulari ematopoietiche ed è coinvolto nei processi di regolazione di vari geni specifici per l'ematopoiesi. *RUNX1* è un gene trovato principalmente alterato (ad esempio è soggetto ad interruzione nelle traslocazioni cromosomiche) nelle varie forme di leucemia (Nucifora et al.,1995; Romana et al, 1995). Polimorfismi genetici nelle sequenze riconosciute da *RUNX1* sono stati identificati in artrite reumatoide, psoriasi, lupus sistemico eritematoso, artrite reumatoide. Occorre considerare che lo SNP associato con la suscettibilità di psoriasi e lupus sistemico eritematoso cade al centro della sequenza di consenso ed è in grado di diminuire l'affinità del legame con *RUNX1*. Nel caso dell'artrite reumatoide, lo SNP cade alla fine delle sequenza consenso ed invece aumenta l'affinità di legame per *RUNX1*. Quindi l'associazione con *RUNX1* è dipendente sia da un'affinità aumentata sia da un'affinità ridotta ma comporta sempre una iporegolazione dei geni da esso controllati. In particolare, nel caso di psoriasi e del lupus sistemico eritematoso *RUNX1* agisce come un attivatore della trascrizione e quindi l'allele di suscettibilità in grado di diminuire l'affinità di legame comporta una ridotta espressione dei geni controllati, rispettivamente *SLC93R1/NAT9* e *PDCDI*. Nel caso dell'artrite reumatoide, *RUNX1* agisce come un soppressore della trascrizione e pertanto l'allele di suscettibilità che è in grado di aumentare l'affinità di legame conduce sempre ad un'iporegolazione dell'espressione genica del gene *SLC22A4*.

SLC22A4

SLC22A4 e *SLC22A5* codificano per trasportatori di cationi organici. *SLC22A5* è coinvolto nel trasporto della carnitina, mentre *SLC22A4* ha un'attività simile a quella di *SLC22A5* ma la sua precisa funzione non è ancora chiara (Nezu et al.,1999). Uno stesso segmento di LD (linkage disequilibrium) è associato con artrite reumatoide e morbo di Crohn, sebbene gli SNPs associati siano diversi nelle due patologie. In questo contesto gli studi sull'architettura allelica (LD) del genoma e studi su diversi gruppi etnici dovrebbero chiarire con maggiore precisione gli effetti funzionali di queste varianti e come queste si correlano nelle due patologie.

CARD15

Il gene *CARD15* fu clonato come un omologo della molecola apoptotica *CARD4* (*NOD1*). Studi funzionali e di espressione hanno dimostrato che *CARD15* agisce come un recettore intracellulare per i prodotti batterici nei monociti. Recentemente *CARD15* è stato associato alle malattie infiammatorie dell'intestino ed alcune mutazioni causano la sindrome di Blau, una rara malattia autosomica dominante caratterizzata da artrite, uveite e rash cutanei (Miceli et al., 2001; Wang et al.,2002). Nel 1996 è stato assegnato il locus di suscettibilità del morbo di Crohn IBD1 sul cromosoma 16q12. Il gene *CARD15* è stato successivamente investigato quale potenziale candidato di suscettibilità. La ricerca di varianti di sequenza nel gene ha portato all'identificazione di una variante di frameshift (3020insC) fortemente associata alla malattia attraverso uno studio caso-controllo su 235 famiglie nucleari (TDT). Oltre alla variante principale 3020insC sono state identificate altre due varianti indipendenti R702W e G908R analogamente associate con la malattia. Curiosamente, un gruppo indipendente nello stesso periodo ha identificato le stesse varianti e riportato la medesima associazione in uno studio di TDT condotto su un numero di famiglie ancora superiore (416) (Ogura et al.,2001; Hugot et al.,2001). In particolare, questo secondo studio ha condotto uno studio basato sul linkage disequilibrium utilizzando sia marcatori microsatelliti che SNPs. Occorre considerare che le varianti identificate sono caratterizzate da una bassa frequenza nella popolazione (<5%) e ad essi corrisponde un rischio relativo che varia da 1.5 a 17.6 a seconda della penetranza e della popolazione. Dal momento che lo stesso locus è stato suggerito quale regione di suscettibilità per la psoriasi artropatica studi indipendenti tra i quali anche gli esperimenti condotti nell'ambito di questa tesi hanno cercato una relazione genetica tra *CARD15* e psoriasi artropatica/psoriasi con risultati contraddittori.

Psoriasi e della dermatite atopica: il locus 1q21 (PSORS4/ATOD2)

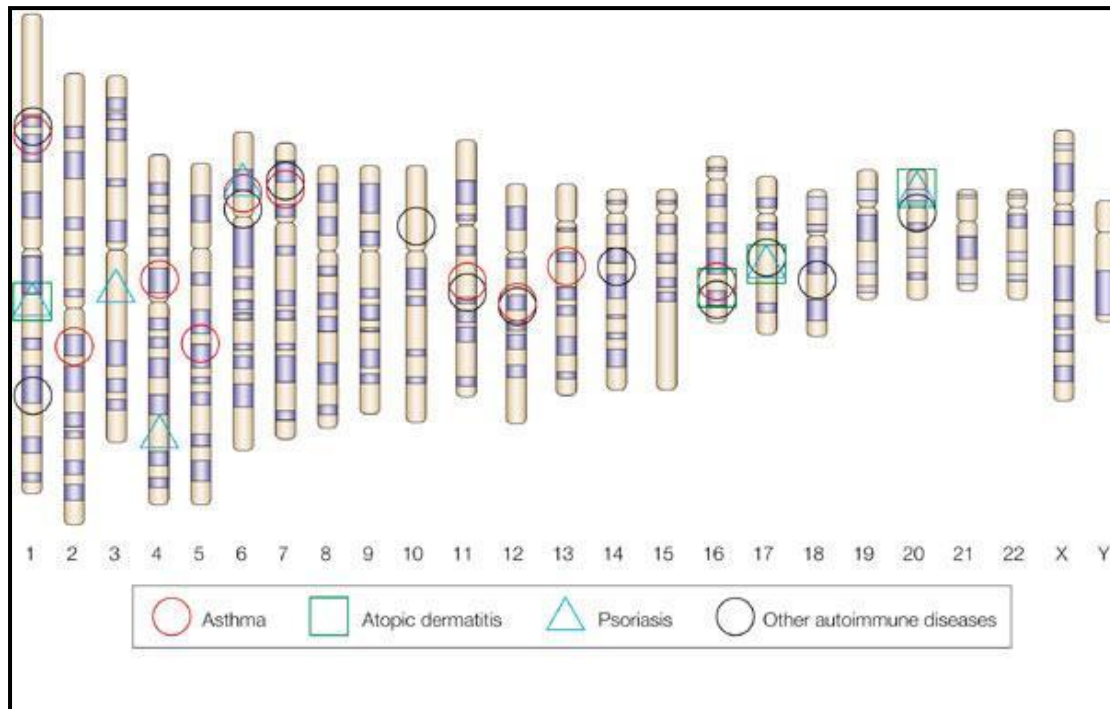
Come precedentemente discusso, da molti anni gli studi dermatologici di clinica e ricerca hanno notato associazioni tra differenti patologie di origine autoimmune.

Frequentemente diverse patologie autoimmuni coesistono nello stesso paziente o sono associate ad altri disturbi di natura infiammatoria (Chan et al.,1998) ed esistono prove sempre più concrete che alcune di queste malattie di origine infiammatoria/immuno-mediata presentino una comune eziopatogenesi.

La psoriasi e la dermatite atopica rientrano nelle patologie immuno-mediate di tipo infiammatorio e presentano caratteristiche comuni sebbene clinicamente ben distinte.

Studi di linkage hanno dimostrato che alcuni loci di suscettibilità della dermatite atopica (ATOD1, ATOD2, ATOD3, e ATOD4 localizzati rispettivamente sui cromosomi 3q21, 1q21, 20p e 17q25) corrispondono a loci di suscettibilità della psoriasi sebbene la dermatite atopica sia un patologia differente e immunologicamente ben distinta dalla psoriasi e raramente ad essa associata nello stesso paziente (Figura 15).

Figura 15. Localizzazione dei loci di suscettibilità della psoriasi, della dermatite atopica e dell'asma (Cookson et al.,2004).



Sebbene differenti dal punto di vista clinico, queste malattie sono caratterizzate da difetti nella funzione di difesa svolta dall'epidermide: nella dermatite atopica l'alterata funzione

epidermica determina una maggiore suscettibilità agli antigeni con conseguente iper-reattività locale, nella psoriasi può determinare una maggiore suscettibilità alla cronicizzazione delle lesioni.

L'epidermide rappresenta lo strato più esterno della pelle e si è evoluta per garantire una funzione difensiva contro patogeni ed agenti esterni, necessaria all'adattamento terrestre dei mammiferi. Questa funzione difensiva, che da una parte deve evitare la penetrazione di agenti patogeni e dall'altra prevenire la perdita di liquidi vitali, è garantita dal processo di differenziamento terminale dei cheratinociti (corneificazione). Alla luce di ciò non sorprende che i loci di suscettibilità di dermatite atopica e psoriasi ATOD2 e PSORS4 siano co-localizzati sul cromosoma 1q21 nella regione che comprende il *cluster* di geni dell'EDC coinvolto nella differenziazione terminale dei cheratinociti.

Molti geni dell'EDC sono stati trovati differenzialmente espressi nella psoriasi e nella dermatite atopica. Negli ultimi cinque anni il nostro gruppo si è concentrato sull'identificazione dei determinanti genetici della psoriasi e della dermatite atopica localizzati nell'EDC.

La regione nella quale ricercare il gene/i geni di suscettibilità di dermatite atopica e psoriasi si estendeva per diverse centinaia di migliaia di basi.

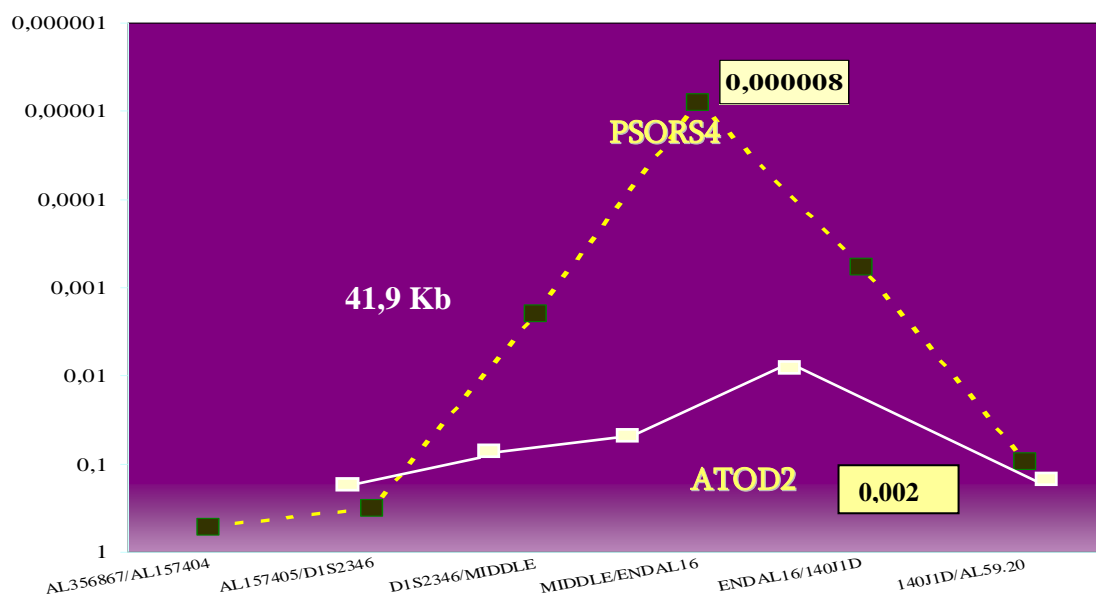
Precedentemente a questo lavoro di Dottorato, abbiamo condotto uno studio di associazione in due casistiche di famiglie nucleari (trios) affette da psoriasi e dermatite atopica provenienti dall'Italia continentale.

La caratterizzazione genetica dell'intera regione in un campione di 128 famiglie affette da psoriasi e 120 famiglie affette da dermatite atopica, ci ha consentito di restringere notevolmente l'area "critica".

Lo studio, condotto mediante STRs, ha permesso di identificare una regione minima associata ad entrambe le patologie all'interno dell'EDC.

Questo recente refinement della regione 1q21 ha riportato valori di associazione significativi per la psoriasi ($p=0.000008$) e per la dermatite atopica ($p=0.0046$) (Giardina et al. 2006). Per una regione di suscettibilità di 42 Kb e confermato, pertanto, l'esistenza di co-localizzazione anche nella regione PSORS4-ATOD2 ridefinita. L'intervallo di associazione è delimitato dai marcatori microsatelliti MIDDLE ed ENDAL16 all'interno del clone AL161636 (Figura 16) in corrispondenza del gene *LOR* che codifica per la loricrina.

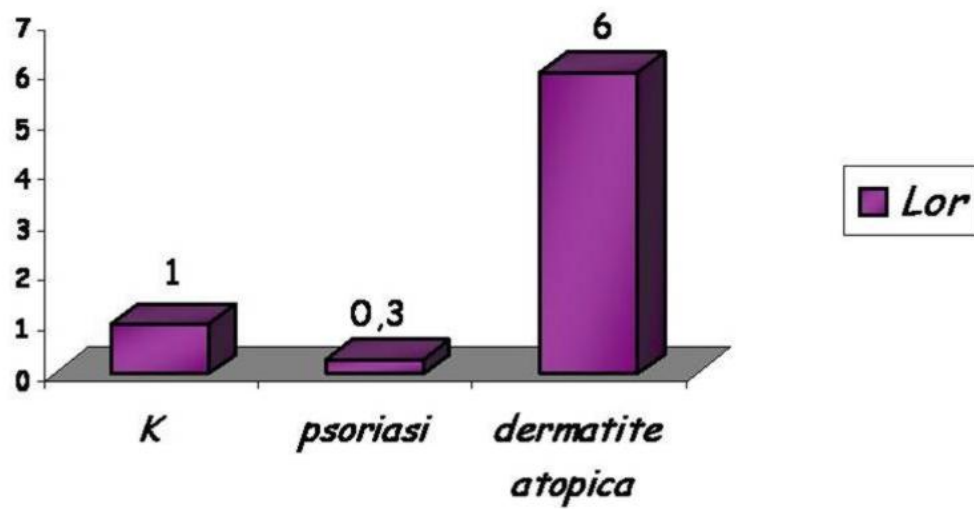
Figura 16: Associazione aplotipica tra l'aplotipo formato dai microsatelliti MIDDLE-ENDAL16 e psoriasi e dermatite atopica.



La loricrina rappresenta il maggior componente dell'involucro corneo che comprende il 70-80% della totale massa proteica dello strato corneo. E' una proteina strutturale espressa nello strato granulare insolitamente ricca di residui di glicina, serina e cisteina (domini non conservati) intervallati da piccole regioni ricche in glutammica (regioni estremamente conservate tra le varie specie). La loricrina rappresenta il substrato per molte transglutaminasi (TG1, TG2, TG 3 e TG5) e i suoi loop di glicine garantiscono la necessaria elasticità all'involucro corneo. Studi in vitro hanno dimostrato che TG1 e TG5 per prime si legano alla loricrina e la oligomerizzano mentre successivamente il legame con l'enzima TG3 garantisce il rinforzamento nella fase terminale del differenziamento dei cheratinociti. La mancanza di strutture ordinate, quali quella osservata nella loricrina è alla base dell'elasticità del rivestimento corneo, mentre il legame con le transglutaminasi conferisce alla cute la necessaria resistenza meccanica. Tuttavia, quando abbiamo cercato polimorfismi o varianti genetiche all'interno del gene *LOR* in un gruppo di pazienti affetti da psoriasi o affetti da dermatite, non abbiamo evidenziato alcuna significatività statistica per l'associazione. Abbiamo pertanto rivolto la nostra attenzione all'espressione del gene *LOR* nel tessuto target. Questo studio ha permesso di evidenziare un'interessante fenomeno di mis-regolazione: *LOR*

appare ipo-regolato nella psoriasi ($r.a.0.3\pm0.04$) mentre risulta iper-regolato nella dermatite atopica ($r.a.6\pm0.5$) (Figura 17) .

Figura 17: Risultati di espressione del gene *LOR* in biopsie ottenute da pazienti psoriasici e atopici



CAPITOLO IV

SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi cinque anni il nostro gruppo di ricerca si è concentrato sull'identificazione dei determinanti genetici della psoriasi e della dermatite atopica localizzati nel complesso di differenziazione dell'epidermide (*Epidermal Differentiation Complex*, EDC). Dato il coinvolgimento dei geni che mappano nell'EDC nel conferire suscettibilità a differenti patologie dermatologiche (psoriasi, Ittiosi Volgare) ed autoimmuni (asma e dermatite atopica) l'obiettivo principale di questo progetto di dottorato è stato quello di comprendere e ponderare, in una casistica di soggetti Italiani, quale fosse il "peso genetico" delle varianti di suscettibilità identificate nella regione 1q21 o limitroficamente ad essa per quelle patologie cutanee che in passato sono state trovate in linkage con questa regione: la psoriasi e la dermatite atopica. Sebbene differenti dal punto di vista clinico, queste malattie sono caratterizzate da difetti della funzione di difesa svolta dall'epidermide: nella dermatite atopica l'alterata funzione epidermica determina una maggiore suscettibilità agli antigeni con conseguente iper-reattività locale, mentre nella psoriasi può determinare una maggiore suscettibilità alla cronicizzazione delle lesioni cutanee.

La comprensione della struttura della regione associata alla psoriasi sul cromosoma 1q21 è diventata una vera e propria sfida, che ha coinvolto numerosi gruppi di ricerca, così come è accaduto in passato per lo studio del principale locus di suscettibilità (PSORS1) della psoriasi, localizzato sul cromosoma 6.

E' la prima volta che un locus non-MHC (**Major Histocompatibility Complex**) desta questo interesse nello studio di patologie autoimmuni.

Il locus PSORS4, identificato nel laboratorio diretto dal Prof. Novelli nel 1999, è oggi oggetto di studio di molti gruppi di ricerca afferenti all'**International Psoriasis Genetics Consortium**, data l'evidente importanza che riveste nel determinare la corretta strutturazione dello strato corneo dell'epidermide. Differenti sono i picchi di associazione identificati negli ultimi anni in corrispondenza dei geni *LOR*, *PGLYRP3*, *PGLYRP4* ed *LCE1C*, tutti localizzati nella regione 1q21 o limitroficamente ad essa. Nonostante ciò nessuna variante allelica funzionale è stata ancora isolata.

Considerata la complessità e la variabilità del locus PSORS4/ATOD2, durante il corso di questo dottorato, abbiamo investigato la regione del braccio lungo del cromosoma 1 al fine identificare le varianti causative o di protezione alla base della suscettibilità genetica alla

dermatite atopica (AD) e alla psoriasi (PS) utilizzando approcci speculativi e metodologici differenti.

Per questo il progetto è stato suddiviso in tre parti sperimentali.

Nella prima parte (PARTE SPERIMENTALE I) la regione di co-localizzazione PSORS4/ATOD2, precedentemente identificata, verrà ridefinita tramite un'analisi genetica approfondita eseguita attraverso la saturazione della regione limitrofa a quella di co-localizzazione, con SNPs e sequenziamento in due casistiche di trios PS e DA ed in una casistica caso-controllo. Inoltre verrà valutata l'espressione dei geni dell'EDC più prossimi alla regione condivisa tra PS e DA per verificare se siano differenzialmente espressi nelle due patologie. In questa parte dello studio verrà quindi verificata l'eventuale presenza di aplotipi o varianti che possano influenzare l'espressione genica dei geni dell'EDC in maniera differenziale.

Nella seconda parte (PARTE SPERIMENTALE II) verrà valutata la frequenza delle due mutazioni polimorfe R501X e 2282del4 del gene *FLG*, che codifica per la filaggrina, nelle casistiche affettivi PS e AD. Il gene *FLG*, infatti, è stato trovato associato sia alla dermatite atopica che alla dermatite atopica/asma combinate in diverse popolazioni (Palmer et al, 2007).

Per la prima volta, verrà valutata la frequenza delle mutazioni anche in malati psoriasici.

Nella terza ed ultima fase sperimentale (PARTE SPERIMENTALE III), verrà analizzata la regione cromosomica 1q21.3 in cui è localizzato il cluster dei geni LCE (late cornified envelope). Questa parte del progetto sarà svolta in collaborazione con il gruppo di ricerca Internazionale guidato dal Prof. Estivill del CIBERESP (Biomedical Research Centre Network for Epidemiology and Public Health) di Barcellona. La regione dove sono localizzati i geni LCE, presenta numerosi CNV (copy number variants, variazioni del numero di copie) ed una regione ad elevata instabilità genomica. Attraverso un'analisi array dei CNVs della regione, il gruppo di Estivill ha evidenziato la presenza di una delezione di 32199 kb localizzata tra i geni LCE3C e LCE3B.

In questa fase del lavoro analizzeremo la delezione nella casistica PS Italiana al fine di valutarne l'associazione. Contemporaneamente, data la presenza di 6 Tag SNPs nella regione compresa tra le regioni LCE3 ed LCE2, valuteremo la presenza di linkage disequilibrium tra queste varianti e la delezione polimorfica. Tra questi SNP è presente anche rs6701216 localizzato nel gene LCE1C, che è stato trovato associato con la psoriasi in un precedente lavoro di genome wide association (GWA) (Liu et al., 2008).

Infine valuteremo la frequenza della delezione negli affetti nelle altre due patologie in esame (dermatite atopica e psoriasi artropatia).

PARTE I : Identificazione di un aplotipo protettivo per la psoriasi nella regione di co-localizzazione PSORS4/ATOD2

Parte I: MATERIALI e METODI

Casistica e consenso informato

Al progetto hanno aderito i centri diagnostici e di raccolta del Dipartimento di Dermatologia dell'Università Cattolica di Roma, dell'Istituto Dermatopatico dell'Immacolata (IDI) di Roma, del Dipartimento di Dermatologia del Policlinico Tor Vergata (PTV) di Roma e della Sezione di Dermatologia dell'Ospedale Fatebenefratelli - San Pietro di Roma. Per ogni paziente è stato ottenuto un consenso informato per illustrare le finalità e gli obiettivi della ricerca e per garantire la totale riservatezza nel trattamento dei dati ottenuti.

Per lo studio della dermatite atopica sono state reclutate 120 famiglie nucleari o trios (per un totale di 348 soggetti), ciascuna delle quali risulta composta da un probando (paziente affetto dalla patologia) e dai suoi genitori, entrambi clinicamente sani.

Lo studio della psoriasi è stato effettuato su una casistica di 128 trios (per un totale di 384 soggetti). La casistica caso-controllo selezionata è invece composta da 385 pazienti psoriasici e 400 donatori di sangue provenienti dal medesimo background genetico dal centro Trasfusionale del Policlinico di Tor Vergata, selezionati come controlli sani.

L'80% dei pazienti PS presentava una psoriasi di tipo I. L'età media al momento del reclutamento dei pazienti era di 26 ± 14 anni (PSI 21 ± 9 ; PSII 52 ± 11); il 64% dei pazienti psoriasici sono maschi.

L'età media dei controlli era di 42 ± 15 ed il 62% sono maschi.

Estrazione di DNA da sangue periferico

Il sangue (circa 5 ml) è stato prelevato ai genitori e al probando in provette contenenti EDTA (0.5 w/v). Il campione è stato poi congelato e mantenuto a -20°C .

I campioni di DNA sono stati estratti tramite l'estrattore automatico EZ1 (Qiagen Inc., Valencia, CA) e la concentrazione media ottenuta era tra i 40 e gli 80 ng/ μl . Tutti i campioni sono stati quantificati tramite Nanodrop Spectrophotometer (ND-1000).

Selezione degli SNPs

Tabella 5: Selezione, localizzazione cromosomica e genica, MAF (minor allele frequencies) dei 48 geni analizzati nella regione di co-localizzazione PSORS4-ATOD2

SNP	LOCALIZZAZIONE CROMOSOMICA	GENE	MAF
rs510277	151388934	3'UTR SPRR2G	0.458
rs11585767	151408952	Intergenic Position	0.45
rs523771	151410666		0.425
rs943139	151430001	Intergenic Position	0.233
rs1329106	151435251		0.325
rs1831238	151436146	Intergenic Position	0.383
rs11576296	151442990	Intron LELP1	0.479
lelp intronic	150394434	Intron LELP1	NA
rs12145115	151446547	Downstream LELP1	0.379
rs7555477	151446721	Downstream LELP1	0.255
rs1410858	151448740	Downstream LELP1	0.408
rs1980909	151449941	Intergenic Position	0.267
rs10494292	151450469	Intergenic Position	0.167
rs7519359	151455126	Upstream PRR9	0.286
rs7549592	151466531	Intergenic Position	0.475
rs11205236	151466896		0.318
rs10788863	151466931		0.435
rs737302	151467463	Intergenic Position	0.373
rs4845341	151469410		0.292
rs6674985	151473617		0.28
rs10888541	151476212	Intergenic Position	0.242
rs7523883	151481491	Intergenic Position	0.307
rs10494296	151487340	Intergenic Position	0.192
rs7542150	151492545	Intergenic Position	0.319
rs873233	151493607		0.407
rs873234	151493801	Intergenic Position	0.35
rs943967	151498500	Upstream LOR	0.246
rs12138538	151502461		0.408
rs10888547	151508712		0.229
rs10788864	151509429		0.433
rs10888548	151512249	Intergenic Position	0.492
rs10888549	151515696	Intergenic Position	0.407
rs2916238	151527335	Intergenic Position	0.425
rs6587735	151532151	Downstream PGLYRP3	0.392
rs1347251	151535808	Downstream PGLYRP3	0.492
rs2771110	151536986	3' UTR PGLYRP3	0.298
rs821427	151542601	Intron PGLYRP3	0.308
rs843971	151544047	Non-synonymous coding,	0.208

HAP1

HAP2

		splice site PGLYRP3		} HAP3
rs3006473	151549803	5' Prime UTR PGLYRP	0.478	
rs821421	151550147	5' Near gene PGLYRP3	0.175	
rs3006440	151562231		0.475	
rs3006448	151580777	Non-synonymous coding, splice site PGLYRP4	0.167	
rs3006450	151581158	Intron PGLYRP4	NA?	
rs2916193	151598473	Intron S100A9	NA?	
rs2070864	151600424	3' near S100A9	0.188	
rs4772	151612887	3' UTR S100A12	0.108	
rs3006488	151629131	3' near S100A8	0.108	
S100A8ex2	151630100	Exon 2 S100A8	NA	

Gli SNPs per lo SNPlex assay sono stati selezionati in base alla loro informatività ed eterozigosità, dal sito HapMap (www.hapmap.org). Nella prima fase dello studio sono stati selezionati 42 Tag SNPs, per ridurre il numero di SNPs da analizzare, localizzati in una regione di 650 kb comprendente l'aplotipo associato PSORS4/ATOD2 (Tabella5).

Genotipizzazione (I FASE)

Il primo studio caso-controllo condotto sulle casistiche familiari di affetti di psoriasi e dermatite atopica è stato effettuato in collaborazione con il Centre National de Genotypage (EVRY, Francia) utilizzando la metodica dello SNPlex™ Genotyping System (Applied Biosystems, Foster City, CA., USA). Questo saggio permette di analizzare contemporaneamente 48 polimorfismi di un unico campione biologico.

Il sistema è quindi ideale per la mappatura fine di loci di suscettibilità e l'analisi dei geni candidati. Lo SNPlex. Genotyping System adotta un saggio di ligazione nucleotidica (OLA) combinato con PCR multiplex per ottenere sia l'amplificazione del prodotto che la discriminazione allelica. Questo sistema di genotipizzazione si avvale di sonde specifiche per ogni SNPs. Ogni saggio utilizza tre diverse sonde: due sonde sono oligonucleotidi allele specifici (ASOs) che sono disegnati specificamente per il rilevamento dei polimorfismi avendo il nucleotide polimorfo all'estremità 3'. Ogni sonda ASO contiene anche una delle 96 sequenze Zip Code rese disponibili dalla ditta. Nella reazione multiplex le sequenze universali Zip Code, su ogni ASO, sono univoche e specifiche per quello SNP. Quindi in una reazione multiplex da 48 analisi ci sono 96 ASOs (due per ogni SNP) e 96 differenti sequenze ZipCode. La terza sonda è un oligonucleotide locus-specifico (LSO). La sua sequenza è comune ad entrambi gli alleli di un dato locus e complementare ad una regione adiacente lo SNP sul DNA

target. Tutte le 144 sonde (96 ASOs + 48 LSOs) per una reazione da 48 fanno parte di un saggio integrato ASO/LSO, che garantisce la specificità del sistema di genotipizzazione; tutti gli altri reagenti sono universali e possono essere utilizzati anche per altri SNPs. Lo SNPlex System Oligonucleotide Ligation Kit include anche un set di ligatori ASO/LSO.

Ogni ASO è legato ad uno specifico ASO linker. Questi linker contengono:

- un primer di sequenza universale che corrisponde al primer forward universale;
- una sequenza Zip Code;
- un ligatore addizionale, legato alla sonda LSO che possiede una sequenza universale compatibile con tutti gli LSOs.

La sequenza include un sito di binding complementare al primer reverse universale.

Ogni linker contiene uno spaziatore che protegge il prodotto completo della ligazione dalla digestione esonucleasica.

Il genotipo dei campioni ad ognuno dei 48 loci viene infine determinato mediante corsa elettroforetica su ABI3130xl (Applied Biosystems, Foster City, Ca).

L'analisi è stata eseguita con successo per 31 degli SNPs selezionati, riportati in Tabella 5 con le rispettive localizzazione cromosomica e MAF.

Studio di espressione

A seguito dei risultati ottenuti tramite la genotipizzazione, si è deciso di valutare l'espressione dei geni dell'EDC localizzati a monte e a valle dell'aplotipo di rischio per comprendere se la presenza di diversi varianti associate potesse, come per la loricrina, influirne l'espressione.

9 biopsie cutanee (3 controlli sani, 3 biopsie di soggetti con dermatite atopica e 3 soggetti con psoriasi) utilizzate per l'analisi dell'espressione dei geni del complesso dell'EDC, sono state fornite dai centri diagnostici dell'IDI (dermatite atopica e controlli) e dell'Università di Chieti (psoriasi).

L'estrazione dell'RNA totale dalle biopsie cutanee è stata eseguita tramite la metodica fenolo-cloroformio utilizzando il reagente TRIZOL (Life Technologies, UK) secondo il protocollo fornito dal produttore.

Per la reazione di retrotrascrizione (RT-PCR) I nostri campioni sono stati normalizzati a 500 ng/ μ l.

Protocollo RT-PCR

Volume finale = 20 μ l (di cui 10 μ l RNA diluito con H₂O Depc e 10 μ l di Mix

10x RT Buffer 2 μ l

25x dNTPs 0.8 μ l

10x RT Primer 2 μ l
Taq Multiscribe 1 μ l
H₂O Depc 4.2 μ l

Ciclo Reverse PCR:

25°C 10'

37°C 2h

85°C 5'

Real Time PCR Quantitativa

I profili di espressione dei geni dell'EDC sono stati ottenuti tramite saggi di espressione quantitativa Real-Time PCR (ABI Prism® 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). I risultati sono stati standardizzati utilizzando come gene housekeeping di riferimento la β 2-tubulina.

Il protocollo d'espressione è il seguente:

Volume finale=25 μ l

Mater Mix	12.5 μ l
Sonda espressione <i>gene target</i>	1.25 μ l
Housekeeping β 2-tubulina	1.25 μ l
cDNA	7 μ l
H ₂ O	3 μ l

Il ciclo di PCR utilizzato è il seguente:

2 min a 50°C

10 min a 95°C

15 sec a 95°C } 42 cicli
1 m a 60°C }

Ogni campione analizzato è stato mandato in triplicato per la riproducibilità dell'analisi; una volta ottenuta l'amplificazione del gene d'interesse e dell'HK , si effettua la media dei singoli CT (cicli soglia) effettuata tra i tre cicli soglia di ogni campione mandato in triplo

Δ Ct: differenza tra i cicli soglia *del gene target e dell'housekeeping*

$\Delta\Delta Ct$: ΔCt campione – ΔCt campione scelto come riferimento

$2^{-\Delta\Delta Ct}$: fornisce un'informazione sull'espressione del gene in esame.

In particolare avremo

$0 < 2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$ gene ipoespresso

$2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ gene iperespresso

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ gene presenta stessa espressione

Genotipizzazione (2°FASE)

Real Time PCR

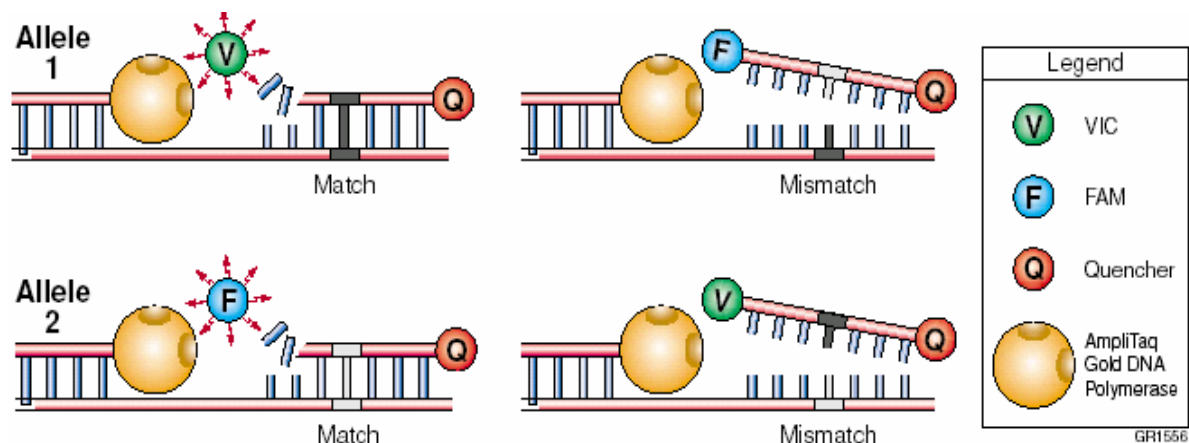
Per la genotipizzazione dei polimorfismi nella casistica nella casistica caso-controllo di affetti da psoriasi, è stata utilizzata la metodica TaqMan (ABI prism 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Inoltre 6 ulteriori SNPs sono stati selezionati per restringere l'aplotipo associato e verificare l'ampiezza del blocco in disequilibrio (segnati in grassetto in tabella XX).

La PCR Real-Time è una metodologia che si basa sull'abbinamento di un termociclatore con un sistema di rilevamento della fluorescenza introducendo la possibilità di monitorare costantemente, in "tempo reale", l'andamento della reazione. La possibilità di visualizzare l'accumulo del prodotto di amplificazione in "real time" è reso possibile dalla marcatura di sonde con molecole fluorescenti. Sono state messe a punto differenti chimiche che consentono di rilevare in modo specifico gli ampliconi e per quanto riguarda il lavoro da noi svolto si è utilizzato un saggio real-time basato sulla chimica più diffusa nei laboratori analisi, la *TaqMan*[®]. Il saggio si basa sulla presenza nella miscela di reazione di PCR di un oligonucleotide sonda non estendibile, che ibrida specificatamente una regione del DNA bersaglio compresa tra le due sequenze degli oligonucleotidi primer. La sonda è marcata con due molecole fluorescenti: il *Reporter*, una fluoresceina modificata posta all'estremità 5' e il *Quencer*, una rodamina modificata posta all'estremità 3', la cui fluorescenza è l'unica efficientemente misurabile quando la sonda è integra; durante la PCR, ad ogni ciclo di amplificazione l'enzima Taq polimerasi non solo duplica il bersaglio, ma, con la sua attività 5'-3' endonucleasica, degrada anche la sonda ad esso ibridata separando i due fluorocromi e rendendo così pienamente rilevabile l'emissione del reporter (Figura 16). Dato che una coppia di DNA duplicata durante la PCR è accompagnata dalla liberazione di una molecola di reporter, la fluorescenza relativa che si accumula nel campione è in ogni momento proporzionale alla quantità di DNA amplificato. Tale tecnica è stata condotta sullo strumento

ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) in grado di funzionare contemporaneamente sia da termociclatore sia da fluorimetro . Il programma deputato a gestire lo strumento, *Sequence Detection System* (SDS), acquisisce lo spettro di emissione del campione per tutta la durata della reazione di PCR e converte la variazione di fluorescenza del reporter in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di amplificazione. Il ciclo di PCR in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter dovuto non a mera variazione del “rumore di fondo” del sistema ma a specifico evento di amplificazione è definito ciclo soglia (Ct) della reazione. Il saggio Taqman® quantifica il DNA bersaglio al ciclo soglia quindi, quando la reazione di PCR è in fase esponenziale, condizione essenziale per eseguire una corretta quantificazione.

Figura 18: Meccanismo d’azione della tecnologia TaqMan®



Preparazione del saggio Real-Time

Su di una piastra a lettura ottica da 96 campioni vengono aggiunti ad ogni pozzetto:

- *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* 12.50 µl
- *SNP Genotyping assay* 0.31 µl
- H₂O bidistillata 10.19 µl
- DNA 20-40 ng/µl

La *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA) contiene il Buffer di reazione, i dNTPs e la Taq Gold Polimerasi.

Lo *SNP Genotyping assay* (Applied Biosystems, Foster City, CA) contiene i due primers (Forward e Reverse) e le due sonde specifiche per ogni allele, una marcata al 5' con il fluoroforo FAM™ (fluorescenza nel rosso) e l'altra marcata con il fluoroforo VIC® (fluorescenza nel verde).

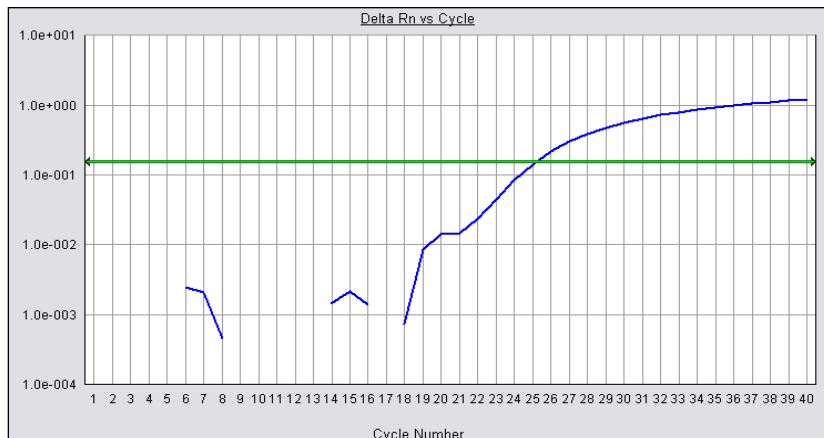
Una volta preparata la piastra questa viene caricata sullo strumento alle seguenti condizioni di incubazione:

- 2' a 50°C
 - 10' a 95°C
 - 15'' a 95°C
 - 1' a 60°C.
- } 42 cicli

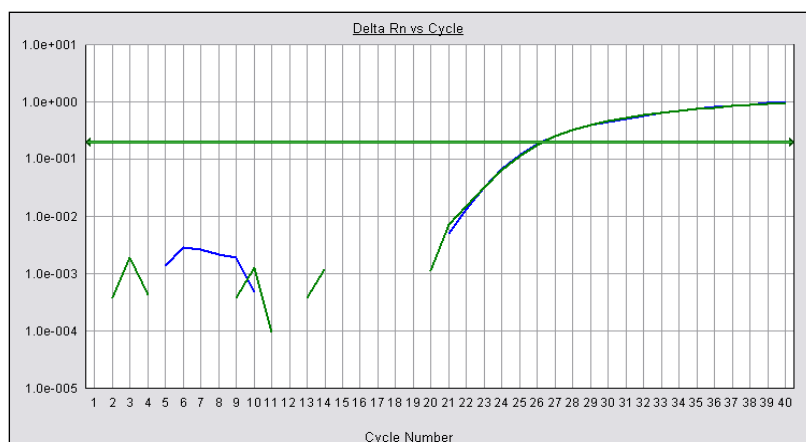
I risultati vengono analizzati e letti tramite il software SDS in dotazione (Figura 19).

Figura 19: Grafica dei risultati di genotipizzazione eseguita con Real-Time PCR

Se lo SNP è omozigote si avrà graficamente un'unica curva di amplificazione.



Se il polimorfismo analizzato è eterozigote entrambe le sonde emetteranno fluorescenza e si graficamente due curve di amplificazione.



Sequenziamento del blocco in disequilibrium

Al fine di valutare la ricombinazione all'interno del blocco identificato, 11 pazienti omozigoti per l'aplotipo protettivo sono stati sequenziati per verificare la presenza di ricombinanti.

A seguito della reazione di amplificazione il prodotto viene purificato tramite reazione enzimatica eliminando i primers e i nucleotidi in eccesso.

La purificazione utilizza gli enzimi esonucleasici EXO/SAP che una volta aggiunti al prodotto amplificato vengono incubati a 37° C per un ora e successivamente inattivati a 75° C per 3 minuti. La reazione di sequenza utilizza la chimica BigDye® v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) e purificata con colonnine EZ1 che rimuovono i terminatori non incorporati (Qiagen)

Analisi Statistica

L'associazione allelica è stata valutata mediante il test del χ^2 test statistico che permette di stabilire se dati osservati si adattano ad una distribuzione teorica assegnata (Garetto, 2002). In particolare, consente di stabilire se le differenze osservate tra due gruppi di dati riflettono una reale diversità o sono dovute soltanto ad un errore di campionamento o al caso. E' stato condotto uno classico caso-controllo che prevedeva la tipizzazione di cromosomi appartenenti a pazienti (casi) e la tipizzazione di cromosomi appartenenti a soggetti sani (controlli). Abbiamo utilizzato il test del chi quadro per determinare la misura in cui le frequenze di un determinato marcatore (o aplotipo) osservate nei cromosomi dei casi e dei controlli differivano da quelle attese in base all'ipotesi di assenza di associazione. Il test è stato utilizzato per

stabilire se l'ipotesi di assenza di associazione potesse essere rifiutata con un margine di errore inferiore al 5% ($p < 0.05$). Infatti per ogni valore di χ^2 è stato calcolato un valore di p che indica la probabilità dell'ipotesi di non associazione (ipotesi nulla). In particolare, ad un minore valore di p , corrisponde una maggiore probabilità che l'ipotesi di non associazione sia effettivamente da rifiutare (evidenza di associazione). Tale valore di p viene calcolato considerando il numero dei gradi di libertà del nostro test. Il numero di gradi di libertà di un test si determina con la formula numero di classi-1, ove per numero di classi, nel nostro caso, si intende il numero di differenti gruppi di cromosomi.

Si definisce il test χ^2 come:

$$\chi^2 = \frac{\sum (O - E)^2}{E}$$

La formula matematica equivalente è:

$$\chi^2 = \sum \frac{O^2}{E}$$

Dove O è il numero di osservati (cromosomi che presentano l'allele marcatore esaminato), E è il numero di cromosomi che si attende possiedano il marcatore, *in base all'ipotesi di assenza di associazione*.

Il valore del chi quadro è sempre calcolato sui numeri assoluti e mai su percentuali e frazioni, poiché l'utilità del test del chi quadro risiede anche nella possibilità di considerare la grandezza del campione.

L'associazione tra i marcatori e la presenza di Dermatite Atopica o Psoriasi è stata stimata attraverso il Transmission Disequilibrium Test (TDT) (Spielman, et al., 1993).

Il test è largamente utilizzato per verificare la presenza di linkage disequilibrium tra un locus candidato (un marcatore) e un locus malattia. E' un test specifico per l'analisi di famiglie nucleari e presenta pertanto il vantaggio di essere insensibile alla stratificazione della popolazione. Il TDT richiede il genotipo del marcatore del probando e dei suoi genitori. Per tale ragione il suo utilizzo è limitato alle malattie ad insorgenza infantile o precoce per quali è più facile ottenere i campioni biologici dei genitori del probando. Un'ulteriore applicazione

del TDT prevede l'analisi di segregazione anche di aplotipi composti dagli alleli di molti marcatori adiacenti, che aumentano il potere statistico del test di rilevare specifici segmenti cromosomici.

Anche in questo caso viene stimato un valore p utilizzando una tabella di contingenza 2x2. Per ciascun allele di ogni marcatore, è stata generata una tabella (tabella di contingenza) in cui sono stato riportato il numero dei cromosomi che portavano l'allele in esame rispetto al numero totale di cromosomi analizzati. I cromosomi sono stati divisi in cromosomi appartenenti agli affetti (casi) e cromosomi appartenenti ai soggetti sani (controlli). Pertanto ogni tabella appariva costituita da quattro classi: cromosomi casi che portavano l'allele in esame; cromosomi casi che non portavano l'allele in esame (rimanenti); cromosomi controlli che portavano l'allele in esame; cromosomi controlli che non portavano l'allele in esame (rimanenti). Tale elaborazione è stata effettuata per tutti i marcatori analizzati. Dal momento che il TDT utilizza soltanto le meiosi in cui i genitori risultano eterozigoti per i marcatori (o aplotipi) analizzati, parte dell'informazione del campione viene perduta. In particolare, l'effetto di alleli poco frequenti o con piccolo contributo di suscettibilità alla patologia può non venire rilevato da questo tipo di test. Pertanto, abbiamo condotto anche un test di tipo "haplotype risk relative". Questo test utilizza quali cromosomi malattia i 2 cromosomi trasmessi dai genitori al probando e utilizza quali controlli i 2 cromosomi non trasmessi, senza considerare lo stato di eterozigosità dei genitori (come invece avviene nel Transmission Disequilibrium Test). In tal modo viene effettuato un test caso-controllo che sfrutta tutte le meiosi disponibili e non soggetto alla stratificazione della popolazione (poiché utilizza un controllo interno).

Odds Ratio

L'Odds Ratio costituisce una misura della forza di associazione statistica tra fattore di rischio e malattia presa in esame; la sua interpretazione è la stessa del Rischio Relativo (RR).

Odds Ratio (o rapporto crociato) = $a/b / c/d = a \times d / b \times c$

dove

$a =$ *malati esposti*

$b =$ *non malati esposti*

c= malati non esposti

d= non malati non esposti

Analisi bioinformatica

LD Plotter

Il programma, disponibile sul sito www.pharmgat.org, permette di identificare la relazione di linkage disequilibrium tra gli alleli esaminati nei casi e nei controlli. E' necessario creare un file di input in cui inserire il nome dei diversi SNPs in posizione verticale e la genotipizzazione dei campioni. Il programma permette di scegliere la modalità di espressione del linkage disequilibrium: D' , r , r^2 e fornisce anche la possibilità di ottenere i risultati espressi in maniera numerica oppure attraverso un grafico.

Unphased 3.0.9

Per verificare l'ipotesi nulla di un'associazione, è stata verificata la frequenza di distribuzione degli alleli delle varianti analizzate sui cromosomi portatori della malattia e sui cromosomi di controlli. Entrambe le casistiche sono state analizzate tramite il programma unphased disponibile sul sito www.litbio.org. UNPHASED è un'applicazione per l'esecuzione di analisi genetica di associazione in nuclei familiari e soggetti estranei. Essa incrementa la massima inferenza verosimile sugli effetti dell'aplotipo e del genotipo. Il programma consente di analizzare dati che siano inseriti in uno specifico file di input letto dal software. Tale formato, ottenuto compilando un foglio di lavoro Microsoft Excel deve contenere possibilmente per ogni persona i seguenti campi:

- il numero identificativo del membro all'interno della famiglia (1 padre, 2 madre, 3 primo figlio ecc), utile per individuare i vari membri di una stessa famiglia; oppure 0 per i non consanguinei;
- il numero identificativo del sesso di ogni campione;
- il numero identificativo dello stato della malattia (2 se è malato, 1 se è sano);
- il genotipo dei marcatori: gli alleli sono codificati da numeri interi progressivi, (1 o 2) dove lo zero indica l'assenza di informazione sul genotipo. Il genotipo 0/0 rappresenta dati completamente assenti per un marcatore bi-allelico, mentre il genotipo 2/0 potrebbe indicare sia i genotipi 2/1 che 2/2.

Il file di output è costituito da una tabella contenente le seguenti informazioni:

- Allele/Haplotipo/Genotipo: l'unità genetica di interesse. Gli alleli e i successivi loci sono separati da un trattino - . Per i genotipi, gli alleli agli stessi loci sono separati dalla sbarretta/. Ad esempio, 1/2 – 3/4 significa genotipo 1/2 al primo locus e 3/4 al secondo;
- Casi: la conta stimata di questo aplotipo nei casi;
- Controlli: la conta stimata dell'aplotipo nei controlli;
- Ca-Freq: la frequenza relativa dell'aplotipo nei casi;
- Co-Freq: la frequenza relativa dell'aplotipo nei controlli;
- Odds-R :il valore stimato di odds ratio per l' aplotipo;
- Chisq : un punteggio statistico per gli effetti dell'aplotipo in questione rispetto gli altri;
- P-value: misura la consistenza dei dati osservati con l'ipotesi nulla formulata, e quindi la forza dell'evidenza contro la stessa ipotesi: più piccolo è il P-value (generalmente <0.05) maggiore è l'inconsistenza con l'ipotesi nulla, e maggiore è l'evidenza contro l'ipotesi nulla.

TRANSMIT

Il Transmission Disequilibrium Test (TDT) per l'analisi dell'associazione tra marcatori e malattia è stato effettuato tramite due varianti del programma *transmit* (Clayton, 1999), disponibili gratuitamente presso l'HGMP (Human Genome Mapping Project: Test association for marker and disease, disponibile all'indirizzo web <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Option/transmit.html>) e presso l'indirizzo web <http://archimedes.well.ox.ac.uk/pise/transmit.html>. *Transmit* è un programma che elabora i dati analizzati tramite il sopra citato Transmission Disequilibrium Test. In particolare, determina la presenza di associazione tra un marcatore genetico (o aplotipo) e la malattia, valutando il numero delle volte con cui l'allele marcatore viene trasmesso dai genitori al probando. Ogni aplotipo o allele viene analizzato attraverso un test del chi-quadro con un solo grado di libertà. L'utilizzo di un test del chi quadro con un solo grado di libertà comporta un maggiore potere statistico del test, che risulta maggiormente adatto ad identificare anche gli alleli debolmente associati. In aggiunta, viene condotto anche un test del chiquadro comprendente tutte le classi. Il test statistico del chi-quadro viene condotto calcolando le differenze tra il numero degli alleli osservati nei cromosomi appartenenti ai probandi e il numero degli alleli osservati nei cromosomi appartenenti ai casi. In questo particolare caso i cromosomi di controllo sono costituiti dai 2 cromosomi parentali non trasmessi al probando.

Il programma consente di analizzare dati che siano inseriti in uno specifico formato letto dal software. Tale formato, ottenuto compilando un foglio di lavoro Microsoft Excel deve contenere possibilmente per ogni persona i seguenti campi:

- numero identificativo della famiglia;
- il numero identificativo del membro all'interno della famiglia (1 padre, 2 madre, 3 primo figlio ecc), utile per discriminare i vari membri di una stessa famiglia;
- numero identificativo del padre del probando;
- numero identificativo della madre del probando;
- numero identificativo del sesso di ogni componente del trios analizzato (1=maschio 2=femmina);
- numero identificativo dello stato della malattia (2 se è malato, 1 se è sano, 0 se non è conosciuto);
- genotipo del marcatore 1: gli alleli sono codificati da numeri interi progressivi, dove lo zero indica l'assenza di informazione sul genotipo. Il genotipo 0/0 rappresenta dati completamente assenti per un marcatore bi-allelico, mentre il genotipo 2/0 potrebbe indicare sia i genotipi 2/1 che 2/2;
- i genitori devono essere inclusi nei dati anche se i genotipi non sono noti.

Il programma PHASE [Stephens et al., 2001] consente la ricostruzione degli aplotipi di soggetti non imparentati tra loro, derivati dai dati genotipici di una popolazione analizzata. Il software può analizzare SNPs, microsatelliti, ed altri loci multiallelici (come gli SNPs tri-allelici o gli alleli HLA), in molte combinazioni differenti e anche in presenza di dati mancanti.

Il programma elabora i dati presentati in un file di input che permette di specificare il numero di individui da analizzare, il numero di loci/siti per i quali è stato tipizzato ogni individuo, il tipo di marcatori utilizzato nell'analisi (SNPs o microsatelliti) ed i genotipi di ciascun individuo. Come opzione il file di input può anche specificare la classe di appartenenza di ciascun individuo (ad esempio lo stato caso/controllo), o la posizione fisica di ogni specifico marcatore.

Tale file di input, ottenuto sempre compilando un foglio di lavoro Excel risulta così composto:

- numero di individui che sono stati genotipizzati;
- numero di loci per i quali la popolazione in esame è stata tipizzata;
- la posizione del marcatore: un numero indica la posizione del/i locus/i. I loci devono essere riportati nel loro ordine fisico lungo il cromosoma;

- tipo di marcatore: indicato da una lettera. Le opzioni sono le seguenti: S per un marcatore biallelico (SNP), M per i microsatelliti o altri loci multiallelici (SNPs tri-allelici o alleli HLA);
- numero d'identificazione di ciascun individuo;
- il genotipo di ciascun individuo. Deve essere indicato su due righe successive. Per ogni locus un allele è inserito nella prima file, e l'altro allele nella seconda. L'ordine di inserimento non è determinante. Per loci bi-allelici, possono essere utilizzati solo due caratteri (ad esempio A/G, G/T, 0/1) per rappresentare i due alleli. Gli alleli mancanti sono rappresentati da un punto interrogativo (?). Per loci multiallelici per ogni allele deve essere utilizzato un numero intero positivo separato da uno spazio. L'allele mancante è rappresentato con -1.

Parte I: RISULTATI e DISCUSSIONE

L'analisi di refinement della regione di co-localizzazione è stata condotta nelle stesse due casistiche familiari del lavoro degli STRs.

I campioni di DNA sono stati analizzati per 42 polimorfismi (riportati in Tabella) dalla posizione 151388934 alla posizione 152032947 in una regione di 650 kb comprendente l'aplotipo di co-localizzazione MIDDLE-ENDAL16.

All'interno della regione selezionata sono presenti i geni *SPRR2G*, *LELPI*, *LOR*, *PGLYRP3*, *PGLYRP4*, *S100A8*, *S100A9* e il 3'UTR del gene *S100A12*.

La selezione degli SNPs è stata eseguita in base alla loro informatività.

Nella prima fase sono stati correttamente tipizzati in entrambe le casistiche 31 SNPs.

L'analisi è stata eseguita in collaborazione con il Centre National de Genotypage di EVRY (Francia) utilizzando la metodica dello SNPlex™ Genotyping System (Applied Biosystems, Foster City, CA., USA) ed ha portato all'identificazione di 3 regioni di associazione.

La prima regione, definita da noi Hap1, si estende per 9,7 kb ed è localizzata nella regione PSORS4/ATOD2 a monte del gene *LOR*; i dati di associazione hanno riportato valori statisticamente significativi per entrambe le patologie analizzate (PS p-value 0.0229; ATOD p-value 0.0077); il test del TDT eseguito per singolo locus ha riportato un'associazione dello SNP rs11205236 per entrambe le malattie (p-value= 0.0012).

Le altre due regioni Hap2 ed Hap3 estese per 8,8 kb e 38,5 kb sono associate solamente ad una delle due patologie (rispettivamente Hap2 alla dermatite atopica e Hap3 alla psoriasi),

pertanto il secondo round di genotipizzazione per la replica dei dati di tipizzazione è stato condotto solo per la prima regione Hap1.

La seconda fase di genotipizzazione è stata eseguita su di una casistica caso-controllo composta da 385 pazienti PS e 400 controlli sani (i dati sono stati replicati solo nella casistica PS perché già disponibile presso il nostro laboratorio).

Per saturare la regione di associazione Hap1 sono stati selezionati 6 nuovi SNPs (in grassetto in Tabella 5), e ri-tipizzati nuovamente tutti i polimorfismi che componevano l'aplotipo associato.

Le analisi di associazione, elaborate attraverso il programma UNPHASED, e confermate attraverso il calcolo dell'Odd Ratio, hanno permesso di identificare un aplotipo minimo di associazione costituito da 4 polimorfismi (rs10494292, rs7549592, rs11205236, rs737302).

Questo aplotipo è stato rilevato nel 26% dei controlli e solamente nel 18,8 % dei casi pertanto risulta di rotezione nei confronti della malattia.

Le frequenze alleliche dei 4 polimorfismi che compongono l'aplotipo associato sono riportate in Tabella 6.

	rs10494292*		rs7549592*		rs11205236*		rs737302*	
	G	T	A	G	A	G	A	G
CASI	143 (0.21)	533 (0.79)	414 (0.6)	310 (0.4)	562 (0.8)	146 (0.2)	386 (0.53)	338 (0.47)
CONTROLLI	137 (0.18)	633 (0.82)	425 (0.54)	367 (0.46)	557 (0.72)	217 (0.28)	444 (0.56)	352 (0.44)

Tutti i marcatori analizzati sono in Equilibrio di HW

I risultati dell'analisi aplotipica sono riportati in Tabella 7.

Tabella 7: Risultati dell'analisi aplotipica all'interno della regione di associazione Hap1.

Aplotipo	Freq. Casi	Freq. Controlli	Chi-quadro	p-value
G-A-A-A	0.33	0.28	3.75	0.0528
G-A-A-G	0.24	0.25	0.03025	0.8619
G-G-A-G	0.018	0.015	0.2083	0.6481
G-G-G-A	0.1881	0.2616	11.5	0.0006942
G-G-G-G	0.004882	0.011	2.978	0.08439
T-G-A-A	0.0045	0.011	1.044	0.3068
T-G-A-G	0.20	0.1598	3.378	0.06608
T-G-G-A	0.003	0.003	0.090	0.07638

Analisi del blocco LD

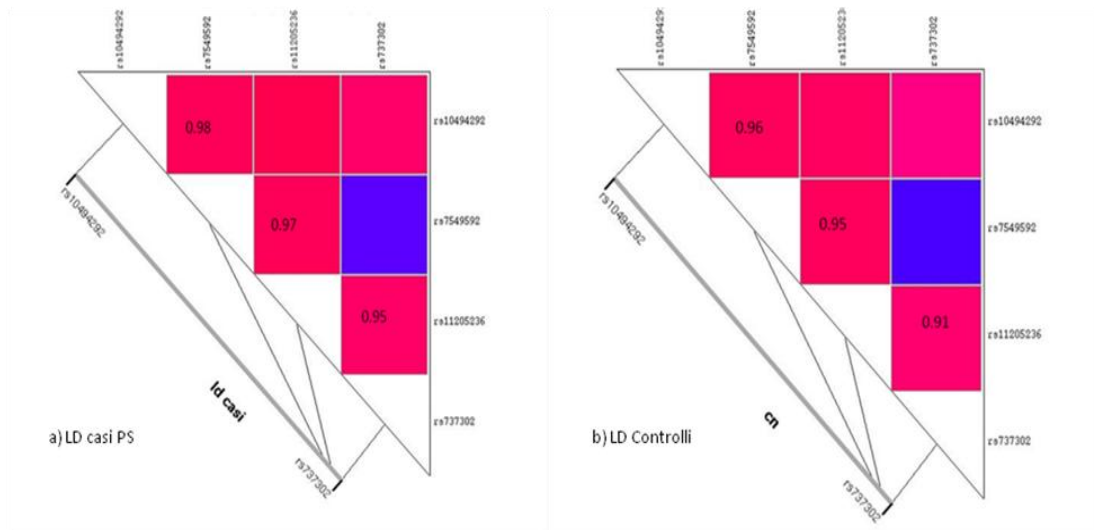
Dai dati di disequilibrium disponibili su HapMap è emerso che la regione a monte del gene *LOR* è localizzata all'interno di una regione in disequilibrium. I nostri dati hanno ristretto il disequilibrium ad una regione di 19,8 kb.

Per valutare la presenza di ricombinanti, gli individui omozigoti per l'aplotipo associato sono stati sequenziati per l'intera regione analizzata. Nessuno degli 11 pazienti sequenziati presentava ricombinazione.

Le analisi LD della regione, eseguite nelle due casistiche, hanno messo in evidenza che i blocchi di disequilibrium differiscono tra casi e controlli come si può notare nella Figura 18.

In particolare la regione associata risulta essere più conservata nei pazienti affetti rispetto ai soggetti sani.

Figura 20: LD tra i polimorfismi che compongono l'aplotipo protettivo associato in a) casi e b) contro



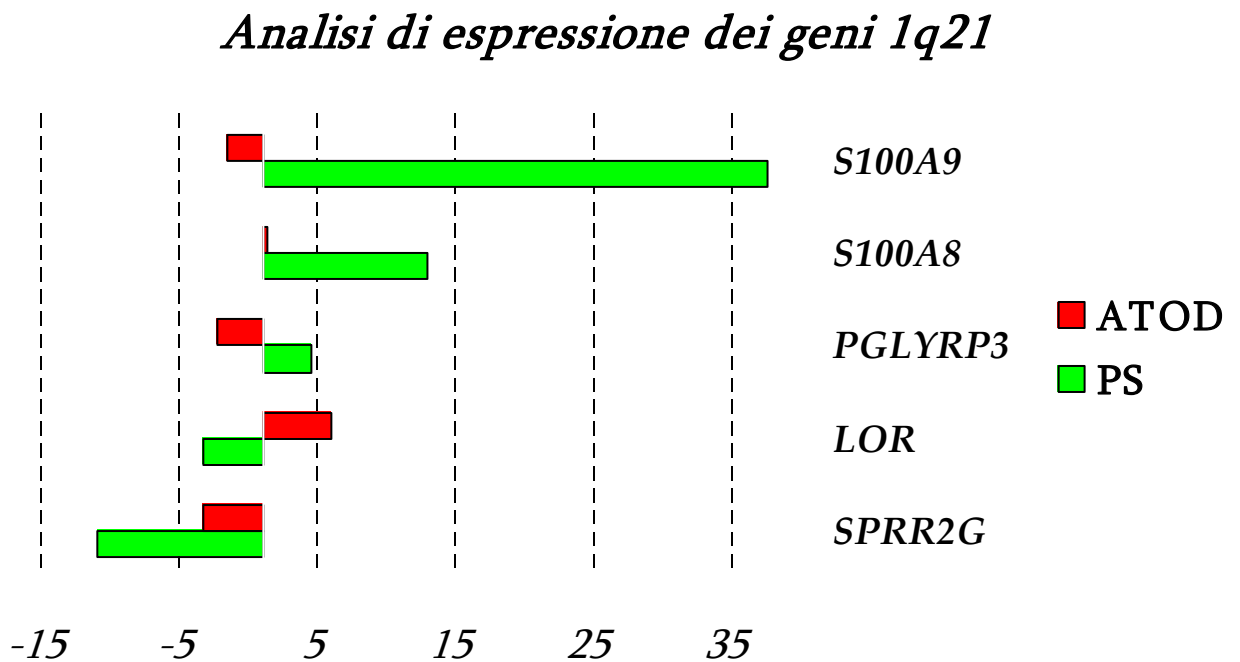
Il blocco LD identificato non contiene nessun gene.

L'analisi dell'aplotipo identificato è attualmente in corso per la dermatite atopica, sebbene i dati preliminari rivelino un'associazione più debole rispetto a quella riscontrata per la psoriasi. Il dato di associazione riflette quello identificato nello studio caso controllo eseguito mediante STRs.

Espressione dei geni dell'EDC

L'analisi dell'espressione dei geni dell'EDC a monte e a valle della regione di co-localizzazione PSORS4/ATOD2 (*S100A9*, *S100A8*, *PGLYRP3*, *LOR* e *SPRR2G*), riportati in Figura 21, ha rivelato un interessante meccanismo di regolazione differenziale nelle due patologie. Più precisamente laddove i geni sono iper-espresi nella cute psoriatica risultano ipo-espresi nella cute atopica e viceversa.

Figura 21 : Analisi dell'espressione dei geni all'intero della regione di 650 kb



I geni regolati a livello trascrizionale da meccanismi comuni o che possiedono funzioni simili, spesso mappano all'interno di specifici domini cromosomici. In queste prospettive l'ipotesi dell'esistenza di una regione di controllo (Locus Control Region, LCR) dei geni dell'EDC all'interno dell'intervallo di 19,8 kb identificato dall'aplotipo associato. L'alterata regolazione dei geni da parte dell'LCR potrebbe risultare in uno o l'altro dei due fenotipi clinici, a seconda della presenza di diversi aplotipi di rischio o di diversi polimorfismi di suscettibilità all'interno del locus.

PARTE II: Analisi delle mutazioni nelle R501X e 2282del4 del gene *FLG* nelle casistiche PS e DA

MATERIALI E METODI

Reclutamento campioni

I 176 pazienti AD sono stati reclutati presso il Centro Diagnostico IDI (Istituto Dermopatico dell'Immacolata), presso il Dipartimento di Pediatria del Policlinico di Tor Vergata e dell'Ospedale San Pietro Fatebenefratelli di Roma.

I 195 pazienti PS sono stati reclutati presso il Dipartimento di Dermatologia del Policlinico di Tor Vergata. 210 sono i controlli sani sono stati reclutati presso il Centro Trasfusionale del Policlinico di Tor Vergata di Roma ed utilizzati per lo studio caso-controllo.

Tutti i soggetti analizzati hanno fornito il proprio consenso allo studio genetico

Genotipizzazione della mutazione R501X

La mutazione R501X è stata analizzata mediante saggio Real-Time di discriminazione allelica (ABI Prism® 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Primers dell'amplificazione: Forward 5' GCACTGGAGGAAGACAAGGAT 3'

Reverse 5' CTCTTGGGACGCTGAATGC 3'

Sonde TaqMan: FAM CTGTCTC**G**TGCCTGC

VIC CTGTCTC**A**TGCCTGC

Genotipizzazione della mutazione 2282del4

L'analisi della delezione della variante 2282del4 è stata condotta tramite amplificazione mediante primer fluorescinato e analizzata attraverso elettroforesi capillare (sequenziatore 3130xl, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Conferma per Sequenziamento diretto

Entrambe le mutazioni sono state sequenziate direttamente nel 10% dei pazienti ed in tutti i pazienti portatori per confermare il dato di genotipizzazione. Il sequenziamento è stato effettuato mediante elettroforesi capillare come descritto precedentemente.

Primer1	Primer2	Primer3	Primer4	Prime 5	Primer6	Primer 7	Primer 8	Primer 9	Primer10	Primer 11
1000bp	750bp	250bp	775bp	1000bp	800bp	1000bp	1500bp	2080bp	1000bp	700bp

Analisi delle varianti 3321delA e S2554X

Le due varianti 3321delA e S2554X analizzate ed associate con la dermatite atopica nella popolazione giapponese sono state tipizzate entrambe mediante sequenziamento diretto della regione specifica. Pertanto è stato amplificato e sequenziato un frammento di 3697 bp comprendente le prime due ripetizioni ed le prime 400 basi della terza ripetizione dell'esone 3 è stato sequenziato in 120 pazienti DA e 100 pazienti PS. I primers utilizzati sono i seguenti:

Forward FILF3 :5' GCTGATAATGTGATTCTGTCT 3'

Reverse RPT3P10R: 5'GACCCCGATGATTGTTTCCTGT 3'

Per l'analisi di sequenza è stato necessario utilizzare un primer intermedio

FILFR3: 5' GGGTCAGGACACCATTCGTGC 3'

Il ciclo di PCR utiizzato:

94°C 5'

94°C 30''

61°C 45''

72°C 3' e 20''

72°C 5'

} x31 cicli

Ri-sequenziamento del gene *FLG*

Per il ri-sequenziamento del terzo esone del gene *FLG* abbiamo suddiviso il gene in 11 ampliconi.

- Primers1: FLG_F: AAAGGCTGGGCTGAGACAG; FLG_R: GTCACCATCAGCAGAGCCA ;
- Primers 2: FLG_F: GTACCTGTGGCTGGTCACC; FLG_R: GGAATCCTCACGCAGAG
- Primers 3: FLG_F: CAGACAATCAGGAACTCCTC; FLG_R: GATGGCCCCATCAGCAG
- Primers 4: FLG_F: TCAGGCCATGGACAGGATG; FLG_R: CTCATGGACAGGCTGTGTC
- Primers 5: FLG_F: CATGGACAGGCTGTGTC; FLG_R: CACAGACTCAGGCACTGGG
- Primers 6: FLG_F: GCAGACAGCTCCACAGAC; FLG_R: GTCAGCAGACAAACACGTAA
- Primers 7:FLG_F:TCAGGATCCAGAAGTGTCAG: FLG_R: ATATGACAAGGAACAATCAGGA
- Primers 8: FLG_F: AAGCAGAAAAACATATGACAAG; FLG_R: GGAACTGGGGATCCAGTTT
- Primers 9: FLG_F: GGAAGTGGGGATCCAGTTT; FLG_R: AGCTCCAGGCACTCAGTG
- Primers 10: FLG_F: AGCTCCAGGCACTCAGTG; FLG_R: CTCATGGTCGCATCACCAT
- Primers 11: FLG_F: CTCATGGTCGCATCACCAT; FLG_R: AGTACTGGAGGAAGACAAG

Il ri-sequenziamento è stato eseguito in 100 pazienti DA e su 73723 controlli, tutti sequenziati tramite ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) e il DNA è stato successivamente purificato tramite DyeE™ 2.0 Spin Kit (Qiagen), e corso tramite ABI 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, US). Le varianti nucleotidiche sono state identificate utilizzando il software Sequencing Analysis software v5.2, Applied Biosystems 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, US).

Parte II: RISULTATI e DISCUSSIONE

La genotipizzazione delle varianti R501X e 2282del4, ha riportato nella casistica ATOD frequenze rispettivamente dell'1% e del 2% (la frequenza combinata delle due mutazioni è pertanto del 3%) comparabili alle frequenze riscontrate nei controlli sani (rispettivamente dello 0% e dell'1% entrambe riportate in Tabella 8).

Nessuna delle due mutazioni è stata ritrovata nei pazienti con PS analizzati.

Tabella 8: Frequenza delle mutazioni del gene *FLG* in casi (PS e ATOD) e controlli (CTRL).

	R501X			2282del4			Genotipizzazione combinata		
	PS	ATOD	CTRL	PS	ATOD	CTRL	PS	ATOD	CTRL
AA	195 (1)	176 (0.99)	210 (1)	195 (1)	175 (0.98)	208 (0.99)	195 (1)	173 (0.97)	208 (0.99)
Aa	-	2 (0.01)	-	-	3 (0.02)	2 (0.01)	-	5 (0.03)	2 (0.1)
aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-

La frequenza dell'allele di rischio nei pazienti affetti DA e nei controlli è molto simile se si osservano i dati riportati in Tabella xx2: 0,6 e 0 % per la mutazione R501X , 0,9 e 0,5 % per la mutazione 2282del4.

Tabella 9: Frequenze dell'allele di rischio e dell'allele wild-type delle mutazioni R501X e 2282del4

	Casistica	Frequenza allelica Wild-type	Frequenza allelica allele di rischio
R501X	Psoriasi	390 (100%)	0 (0%)
	Dermatite atopica	354 (99,4%)	2 (0,6%)
	Controlli	420 (100%)	0 (0%)
2282del4	Psoriasi	390 (100%)	0 (0%)
	Dermatite atopica	353 (99,1%)	3 (0,9%)
	Controlli	420 (99,5%)	2 (0,5%)

Risultati ri-sequenziamento gene *FLG*

In tabella 10 sono riportate tutte le varianti sinonime identificate nel corso del sequenziamento.

Solamente 3 sono le varianti non sinonime specifiche per la popolazione italiana.

La 5392 A/T porta alla formazione di una proteina tronca in quanto introduce un codone di stop tra la 4° e la 5° ripetizione del terzo esone. La 10810 G/T e la 10912 A/T interrompono il gene ma all'inizio ed alla fine della decima ripetizione (le forme funzionali della proteina presentano comunque da un minimo di 10 ad un massimo di 12 ripetizioni)

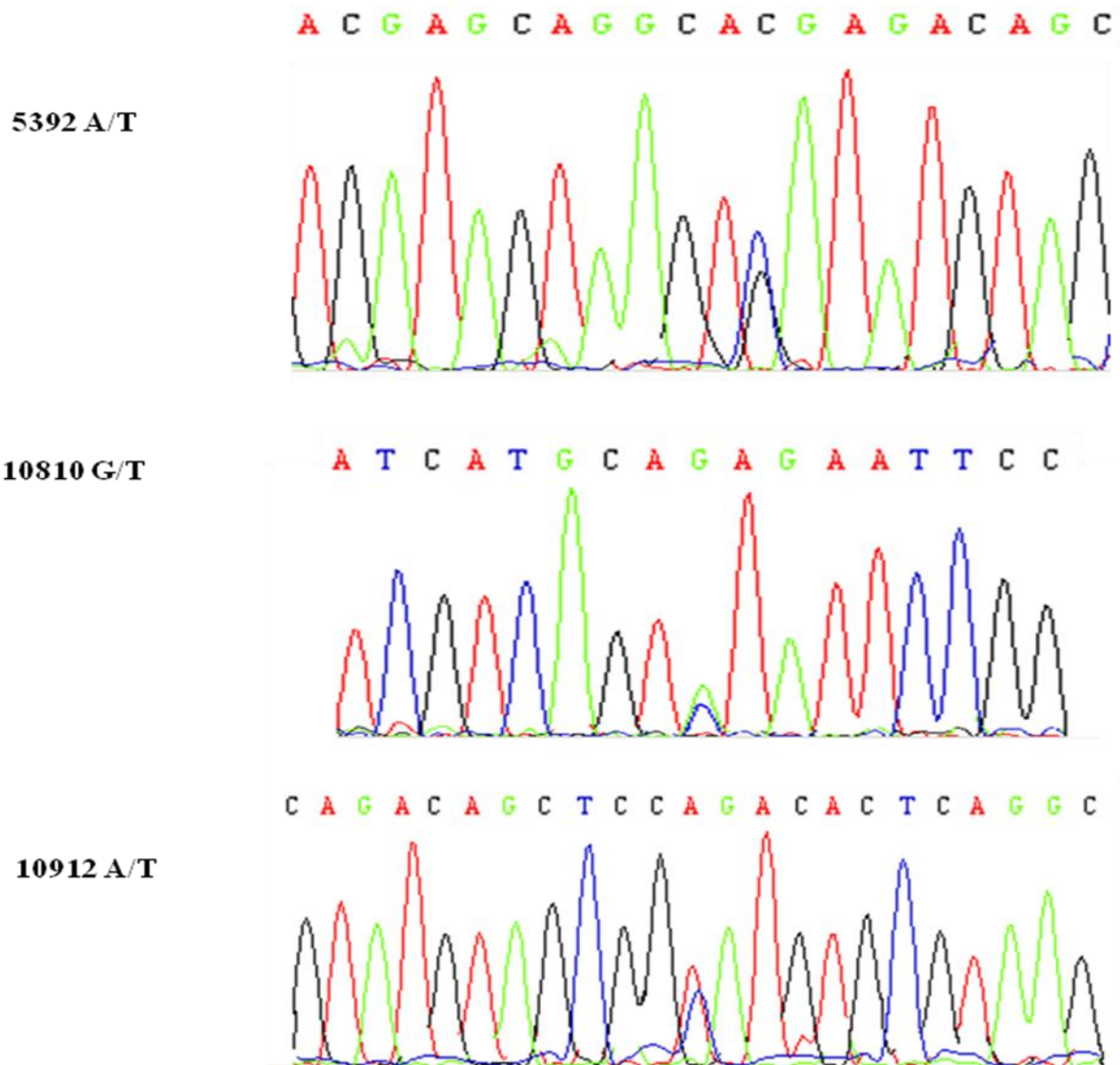
Tabella 10: Variazione sinonime individuate nella popolazione Italiana

Sinonimi	Aminoacidi	Frequenza allelica		posizione
Rs34124650 C>T	ASP	C 199(0.995)	T 1(0.005)	RPT 1
2077 G>A	GLN	G 199(0.995)	A 1(0.005)	RPT 1
2508 T>C	ASP	T 178(0.93)	C 14(0.07)	RPT 2
2541 A>G	SER	A 189(0.98)	G 3(0.02)	RPT 2
2580 G>A	SER	G 191(0.99)	A 1(0.01)	RPT 2
3388 T>C	SER	T 167(0.83)	C 33(0.17)	RPT 3
4445 C > A	SER	C 150(0.84)	A 28(0.16)	RPT 4
5022 G > A	ARG	G 139 (0.8)	A 35 (0.2)	RPT 4
6354 T>C	HIS	T 159(0.92)	C 15(0.08)	RPT 6
6498 T>C	SER	T 170(0.98)	C 4(0.02)	RPT 6
6789 G > A	ALA	G 147(0.992)	A 1(0.008)	RPT 6- RPT7
10260 C>T	ASP	C 175(0.95)	T 9(0.05)	RPT9-RPT10
RS3120643 G>A	PRO	G 173(0.94)	A11(0.06)	RPT9-RPT10
10350 C>T	TYR	C 174(0.95)	T 10(0.05)	RPT9-RPT10
10386 C>T	SER	C 174(0.95)	T 10(0.05)	RPT9-RPT10
10404 A>G	THR	A 174(0.95)	G 10(0.05)	RPT9-RPT10
10467 T>A	THR	T 174(0.95)	A 10(0.05)	RPT9-RPT10
10722 C>A	GLY	C 199(0.995)	A 1(0.005)	RPT10

La struttura del gene *FLG* si presenta pertanto come in Figura 22 dove sono evidenziate le mutazioni polimorfe riscontrate nella popolazione Italiana e quelle invece identificate nelle altre popolazioni Europee.

Il sequenziamento inoltre ha confermato i dati di genotipizzazione precedenti.

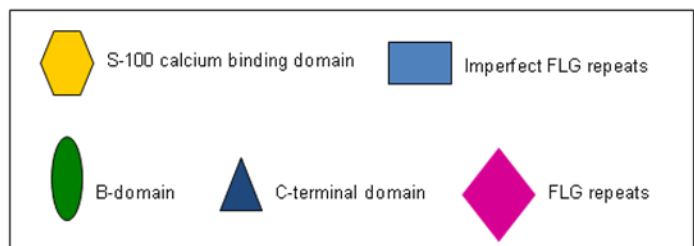
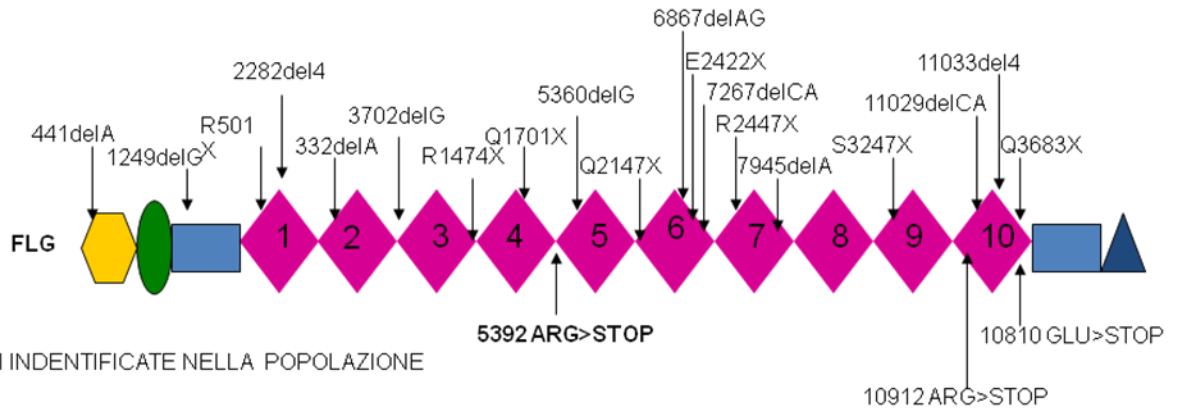
Figura 22: Sequenza delle varianti non-sinonime identificate nella popolazione Italiana



Inoltre il ri-sequenziamento del gene condotto su 100 controlli però ha messo in evidenza le stesse varianti; nessuna delle mutazioni identificate è pertanto associato ad una maggior suscettibilità con la dermatite atopica.

Figura 23 Struttura del gene *FLG* con in evidenza delle mutazioni Italiana e le mutazioni identificate nelle altre popolazioni Europee

MUTAZIONI IDENTIFICATE IN VARIE
POPOLAZIONI EUROPEE



La frequenza delle varianti analizzate del gene *FLG* nei pazienti affetti da DA, riscontrata nelle altre popolazioni Europee e riportata in Figura 12 , è decisamente maggiore se comparata alla frequenza riscontrata nella popolazione Italiana (Tabella 7). Il mancato coinvolgimento del gene *FLG* nella suscettibilità alla psoriasi è stata successivamente confermata dai recenti studi condotti nella popolazione Tedesca, Irlandese ed Inglese.

Il gene *FLG* dista solo 959 kb dal gene *LOR*, cioè dalla regione in cui è localizzato il locus di suscettibilità ATOD2. L'assenza di associazione, tra le varianti R501X e 2282del4 e la dermatite atopica riscontrata nella nostra casistica di affetti, e la mancata associazione anche delle altre mutazioni analizzate, da una parte potrebbe implicare la possibilità di una selezione negativa delle due mutazioni nella popolazione Italiana e quindi la mancanza di un effetto epistatico tra i loci analizzati; dall'altra potrebbe sottintendere la presenza mutazioni e/o

polimorfismi di suscettibilità non all'interno del gene *FLG* ma nelle regioni regolatrici del gene stesso.

La bassa frequenza delle mutazioni nulle analizzate potrebbe riflettersi nell'esistenza di una selezione negativa delle mutazioni all'interno del gene *FLG* nel cromosoma 1 nei pazienti Italiani che presentano associazione genetica con il locus ATOD2.

Dato che la presenza di diverse allelotipi del gene è stata vista in passato essere correlate a una maggior o minor permeabilità cutanea, il prossimo passo sarà quello di correlare gli allelotipi della pro-filaggrina con le forme più severe della malattia. (quelle estrinseche che presentano elevati livelli di IgE nel siero).

III PARTE: Identificazione di una delezione tra i geni LCE3C e LCE3B associata alla psoriasi sul cromosoma 1

MATERIALE E METODI

Soggetti

Tutti i partecipanti allo studio hanno firmato un consenso informato disponibile presso il centro di ricerca di riferimento. Per la popolazione Italiana hanno preso parte allo studio 400 pazienti PS e 400 controlli sani.

Un totale di 2831 casi sono stati analizzati in 4 popolazioni provenienti dall'Olanda, dall'Italia Continentale, dagli Stati Uniti e dalla Spagna.

Analisi della delezione tra i geni LCE3C e LCE3B

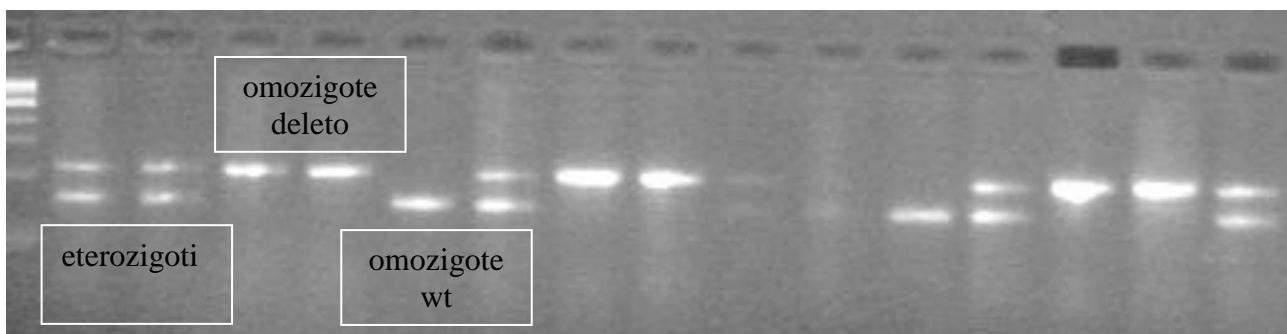
Per amplificare gli alleli deleti i primer sono stati disegnati nelle regioni fiancheggianti la delezione, mentre per amplificare l'allele wild-type si è costruito un primer interno alla delezione che contenesse il gene LCED1.

Come controllo positivo di PCR, per poter discriminare i veri omozigoti dagli eterozigoti in cui era fallita l'amplificazione i due saggi sono stati messi in multiplex con la B-globina.

I prodotti amplificati avevano diverse dimensioni : l'allele deleto risulta lungo 2572 bp mentre l'allele wild-type 2108 bp , mentre la B-globina aveva una dimensione di 268 bp (Figura 24).

La verifica dell'amplificazione e la successiva genotipizzazione sono state eseguite mediante gel d'agarosio al 1,8%.

Figura 24: Gel 1,8% con le tre genotipizzazioni della PCR multiplex per identificare la delezione



Sequenza primers:

Allele Deleto: **LCE1E_1D_DELF**: AGCAGGTGGTAAGCTGAGGA
LCE1D_R: GGCATCCAGATTTCAAAGGA. 2,572 bp
B-GLOBIN F: CAACTTCATCCACGTTACCC
B-GLOBIN R :GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 268 bp

Allele non-deleto: **LCE1D_F**: TGCTTTTAAACTTGAGAGGTGCT
LCE1D_R (lo setso utilizzato per la delezione). 2,108bp

Condizioni di PCR

(Volume 50 µl)

Buffer (1.5 mM Mg²⁺) 5ul

dNTPs (125 mM) 6ul

Taq ROCHE (5U/µl) 0.2ul

Primer

Forward (**LCE1E_1D_DELF** or **LCE1D_F**) 1.65ul

Reverse (**LCE1D_R**) 1.65ul

B-Globina (**F/R**) 0.65/0.65ul

(per tutti i primers la concentrazione è standardizzata a 10pm/ul)

DNA 100 ng/µl

Ciclo di PCR 95° C 2 min

95° 30''

65° 30''

72° 40'' X 2 cycles

95° 30''

64° 30''

72° 40'' X 2 cycles

95° 30''

63° 30''

72° 40'' X 2 cycles

95° 30''

62° 30''

72° 1' 45'' X 30 cycles

72° 7 min

Genotipizzazione Tag SNPs

Sei Tag SNPs (compresi tra le regioni LCE3 e LCE2) sono stati tipizzati per valutare la presenza di LD disequilibrium con la delezione, mediante saggi di discriminazione allelica, in entrambe le casistiche.

Per ogni polimorfismo la conferma dei genotipi è stata effettuata tramite sequenziamento diretto.

Tutti gli SNPs ed i primers di PCR ed il codice delle sonde TaqMan sono riportati in Tabella 11.

Tabella 11: Tag SNPs localizzati tra le regioni LCE3 ed LCE2 e primer di amplificazione

SNP	Forward	Reverse
rs17659389	ATC CCA TATC AAG CCC TG TC	AGG AAG GTA GGA TTG CAA CC
rs7516108	ACC TGC TGT TGA GCC CTT CT	TCA TGA AGC AAA TGG ACA GTG
rs7516108	ACC TGC TGT TGA GCC CTT CT	TCA TGA AGC AAA TGG ACA GTG
rs10888502	CCT TAG TGA CTG AAG CTT GG	AAA TAG GTA CCC GGA CAG TC
rs12046030	AGA ACA TAG GTT GGG GAG TC	CCT GGG TGA ATC ACC TTC TT
rs4112788	CTG GCA TCT AGT GGG TAG AG	TCA TCA TGT TGG TCA GGC AG
rs6701216	GGA GTA ACT TCC TAG GAG AC	CAA GCT GAG GAT CAC TGT G

La presenza di LD tra i polimorfismi e la delezione è stata calcolata tramite il software LD plotter (vd PARTE I: Materiali e Metodi)

Tipizzazione del locus HLA Cw *06-*02

L'analisi del locus HLA Cw *06-*02 è stata eseguita mediante due metodiche differenti.

La tipizzazione dell'allele HLA Cw*06-*02 è stata effettuata principalmente come descritto nel lavoro di de Bakker et al 2006.

Nello specifico, i due polimorfismi rs887466 (A/G) ed rs2894207 (C/T) sono in completo disequilibrium con l'allele *06 -*02 del locus HLA C.

Se la G dell'rs887466 si trova in fase (sullo stesso cromosoma) con la C dell'rs2894207 l'allele del locus HLA C risulterà *06*02.

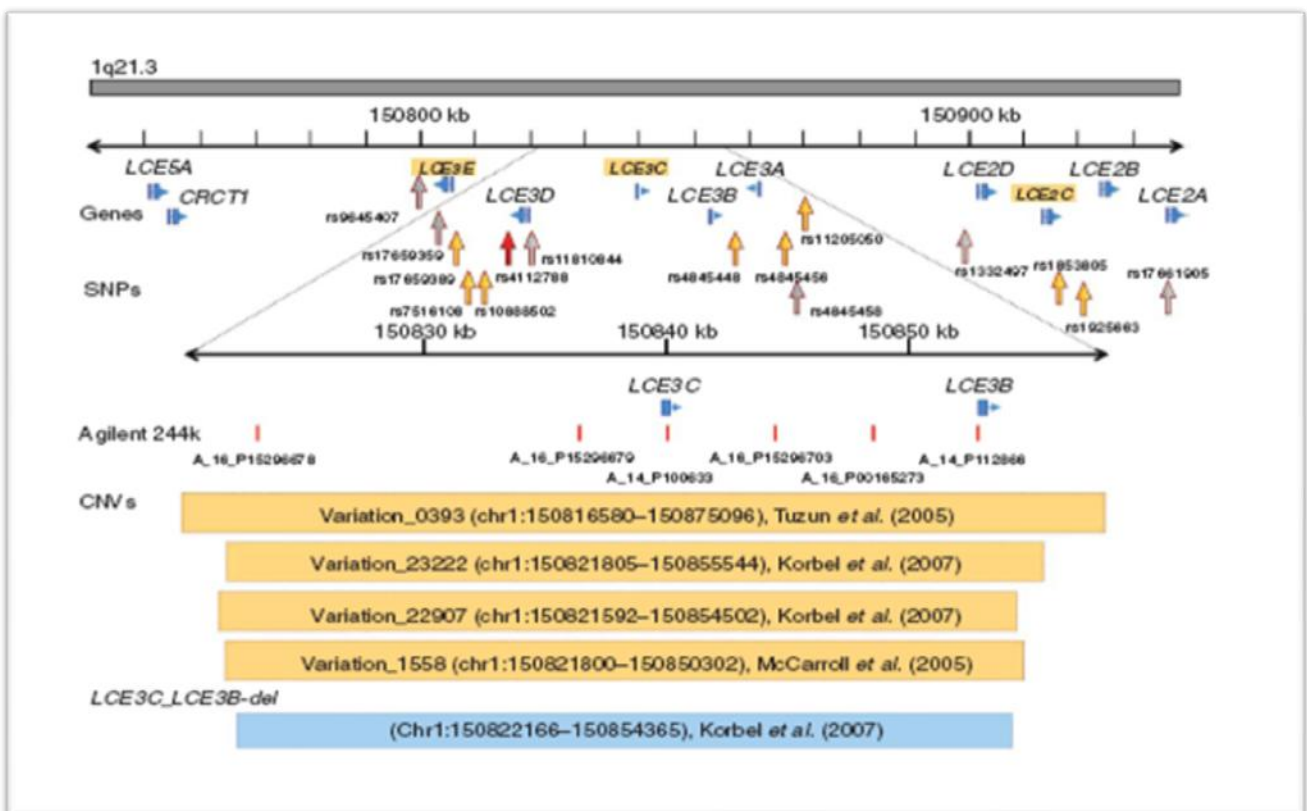
Quando non è stato possibile risalire alla fase in quanto i due SNPs sono entrambi eterozigoti, la tipizzazione è stata eseguita tramite Immuoblotting.

La tecnica dell'Immunoblotting (Innogenetics) sfrutta l'ibridizzazione dei prodotti di PCR biotilinati con sonde specifiche, discriminanti gli alleli del locus HLA C, adese su strisce di nitrocellulosa (Tecnica del Reverse Dot Blot). Ciascuna striscia è dotata di un controllo di colorazione e di un controllo Universale. Le sonde che si ibrideranno verranno rilevate mediante colorazione in situ .

PARTE III: RISULTATI E DISCUSSIONE

Il locus LCE in cui sono localizzati i geni LCE3B e LCE3C è una regione ad alta instabilità genomica come si può vedere dalla Figura 25. Attraverso un'analisi d'ibridizzazione comparativa del genoma (aCGH) è stato condotto precedentemente a questo lavoro un GWA per verificare la presenza di nuovi CNV associati alla psoriasi.

Figura 25: Locus LCE: particolare della regione compresa tra i geni LCE3B ed LCE3C e i copy number variants identificati nella regione



La delezione identificata tra i due geni (LCE3C_LCE3Bdel), analizzata attraverso una multiplex PCR, è stata analizzata nella popolazione Italiana in 400 pazienti PS e 400 soggetti sani.

L'associazione con la psoriasi, riscontrata prima nella popolazione Spagnola è stata successivamente confermata nelle popolazioni Olandese e US.

I dati di associazione sono riportati in Tabella 12.

Tabella 12: Associazione della delezione LCE3C_LCE3B in 2831 soggetti di origine Europea provenienti da diverse popolazioni.

Popolazione	Fenotipo	N° tot alleli analizzati	LCE3C_LCE3Bdel %	LCE3C_LCE3B %	OR (95%CI)	P value
Spagnoli (557)	Psoriasi controlli	350 764	225 (64) 420 (55)	125 (36) 344 (45)	1,47 (1,28-1,72)	0.0028
Italiani (900)	Psoriasi Controlli	900 900	573 (64) 516 (57)	327 (36) 384 (43)	1.30 (1,12-1,51)	0.006
Olandesi (484)	Psoriasi Controlli	408 560	281 (69) 334 (60)	127 (31) 226 (40)	1,50 (1,29-1,74)	0.0033
US (890)	Psoriasi Controlli	1192 588	847 (71) 378 (64)	345 (29) 210 (36)	1,36 (1,18-1,58)	0.0038
Totale (2831)	Psoriasi Controlli	2852 2812	1926 (68) 1648 (59)	924 (32) 1164 (41)	1,38 (1,19-1,61)	1.38E-08

Il risultato riscontrato evidenzia una buona associazione della delezione in tutte e 4 le casistiche analizzate. Nello specifico il 64 % dei casi della nostra casistica PS porta la delezione che se confrontata con il 57% dei controlli da un risultato di associazione con p-value a 0.006 (10^{-3}).

Analisi del locus HLA Cw *06-*02 nella popolazione Italiana

Il principale locus di suscettibilità, localizzato nella regione 6p21.3 (PSORS1), è responsabile di circa il 30-60% del contributo genetico della psoriasi.

Dato che diversi studi di genetica molecolare e funzionale concordano nel ritenere l'allele HLA-Cw*0602 il principale fattore di rischio della psoriasi abbiamo voluto analizzare la frequenza dell'allele del locus HLAC nella nostra casistica.

I risultati di tipizzazione, riportati in Tabella, indicano solo il 45% dei pazienti PS Italiani è positivi all'allele HLA Cw *06-*02 rispetto al 60% registrato nelle altre popolazioni Europee.

Tabella 13: Tipizzaione del locus HLA-Cw6 nella popolazione Italiana

	HLA Cw*06-*02 Negativi	HLA Cw*06-02 Positivi	
CASI	224 (0.56)	176 (0.44)	400
CONTROLLI	324 (0.81)	76 (0.19)	400

Genotipizzazione Tag SNPs

La genotipizzazione dei 6 polimorfismi compresi tra le regioni LCE3 ed LCE2 ha permesso di ottenere due risultati importanti.

In primo luogo la delezione è “taggata” dall’rs4112788. In particolare l’allele G del polimorfismo è in quasi totalmente in disequilibrio (sia nei casi che nei controlli) con la delezione come si può verificare dai risultati di genotipizzazione riportati in Tabella 14.

Tabella 14: Risultati dell’associazione dello SNP rs4112788 con la psoriasi nella popolazione Italiana e nel totale delle popolazioni che hanno preso parte allo studio

Popolazione	psoriasi	controlli	OR	p-value	D’
Italiana	449	446	1,58	0.0065	0,98
Totale	1413	1399	1,45	6,56E-09	

L’associazione con la psoriasi dell’rs412788 nella popolazione italiana, è praticamente equiparabile a quella della delezione mentre l’associazione combinata calcolata per tutte e quattro le popolazioni ha riportato un p-value inferiore a $6,6 \times 10^{-9}$.

L’rs4112788 è localizzato 584 bp a valle del gene LCE3D e 4,5 kb dalla delezione in direzione centromerica.

Le analisi alleliche ed aplo tipiche degli altri 5 Tag SNPs non hanno evidenziato nessuna associazione con la malattia, e pertanto i nostri dati non confermano l’associazione tra psoriasi e lo SNP **rs6701216** (p-value nella popolazione Italiana 0,535) riportata nello studio GWA condotto nelle popolazioni US e UK (Liu et al, 2008)

Valutazione dell'effetto epistatico tra la delezione e il locus PSORS1

Per valutare l'interazione genetica (effetto epistatico) tra la delezione (LCE3C_LCE3B_ del) e l'allele Cw *06-*02, abbiamo messo in relazione i "portatori " del locus HLA Cw *06-*02 con gli individui che presentavano la delezione, in entrambe le casistiche caso controllo.

La valutazione dell'effetto epistatico è stata eseguita mediante modelli di regressione logistica ed il p-value totale è stato calcolato tramite il test log-likelihood ratio.

Questo test statistico rapporta il modello che include sia gli effetti additivi che i termini d'interazione (rs4112788-HLA-Cw6 oppure LCE3C_LCE3B_ del ed HLA-Cw06) con il modello che include soltanto gli effetti additivi.

Nella popolazione italiana (edanche in quella spagnola) il risultato dell'analisi statistica indica che tra i due loci non esiste interazione (al contrrio della popolazione Olandese in cui esiste un effetto epistatico tra i due loci in esame); il p-value calcolato per entrambe le interazioni è uguale a 0,875 tra rs4112788 e l'allele HLACw6 e 0,544 tra la delezione e il locus HLACw06.

Valutazione dell'interazione allelica tra l'aplotipo protettivo identificato a monte del gene *LOR* e la delezione

In ultima analisi, per verificare se le due regioni associate sul cromosoma 1q21, distanti tra loro circa 620 kb, correlassero nel determinare l'associazione alla psoriasi in maniera additiva abbiamo dapprima calcolato il disequilibrio tra le due regioni; in secondo luogo abbiamo valutato l'analisi aplotipica tra i due polimorfismi maggiormente associati nel locus LCE e nel locus PSORS4: l'rs4112788 e l'rs11205236.

La valutazione del disequilibrio, eseguita con il software LD plotter, non ha riportato associazione pertanto le due regioni sono indipendenti tra loro e soggette a ricombinazione.

Le analisi di associazione tra gli SNPs rs412788, in completo LD con la delezione, ed il polimorfismo maggiormente associato nella regione di co-localizzazione, rs11205236, identificata nella popolazione Italiana hanno messo in evidenza i seguenti punti:

- l'aplotipo A-G (assenza delezione + allele protettivo) dei due SNPs è presente nel 12% dei controlli e nell'8% dei casi della nostra casistica di pazienti (p-value= 4,4E10-4);
- l'aplotipo G-A (presenza delezione + allele di rischio) al contrario è presente maggiormente nei pazienti affetti (53,3%) rispetto ai soggetti di controllo (43,7 %) riportando un valore di p uguale a 1,1E10-4.

Questo dato necessita sicuramente di un approfondimento in quanto l'associazione aplo-tipica identificata per entrambe le varianti è più significativa rispetto a quella rilevata per ciascun SNP in singleplex.

Risultati della tipizzazione della delezione nelle casistiche di soggetti DA e PsA

La tipizzazione dell'rs4112788 è stata condotta anche nelle casistiche di affetti di dermatite atopica e di psoriasi artropatica.

La delezione non risulta associata nei pazienti affetti da DA della popolazione Italiana (Tabella 12) e riporta un valore di p non significativo (0.52).

Tabella 12: Frequenza allelica dello SNP rs412788 nei pazienti DA

rs4112788	A	G
CASES	0.4 (183)	0.6 (265)
CONTROLS	0.43 (384)	0.57 (516)

Nella casistica PsA l'associazione con il polimorfismo è di minor entità rispetto a quella rilevata per la psoriasi (p-value=0.029) a confermare che le due patologie nonostante condividano molte caratteristiche cliniche sono distinte anche dal punto di vista genetico .

	AA	AG	GG	A	G
CASI PsA	0.14 (48)	0.46 (155)	0.40 (131)	0.37 (251)	0.63 (417)
CONTROLLI	0.21 (57)	0.46 (135)	0.33 (93)	0.43 (249)	0.57 (321)

I geni identificati in questo studio sono implicati nel corretto sviluppo dello strato corneo, intervenendo nei processi di riparo e di difesa del nostro organismo. La pelle è un organo di difesa ed è spesso soggetta a stress fisici e meccanici. In queste condizioni lo strato corneo lo

scudo protettivo a infezioni batteriche e stress meccanici, va incontro a modificazioni chimiche che ne limitano la funzione di barriera.

In seguito a questi stress i geni *LCE3B* e *LCE3C* vengono attivati e ripristinano la corretta funzione di barriera.

In particolare nello studio si è anche dimostrato che l'assenza di espressione di questi geni impedisce il riparo e la corretta rigenerazione dello strato corneo.

Tutto questo comporta, nei soggetti portatori della delezione di un rischio aumentato alla penetrazione nella pelle di parte di molecole estranee e microrganismi.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Durante il corso di questi studi è emerso come lo studio delle patologie complesse si sia radicalmente evoluto negli ultimi anni. Se da una parte l'approccio del gene candidato ha permesso l'identificazione delle regioni di suscettibilità, gli studi GWA hanno evidenziato la necessità di studiare le malattie complesse in casistiche ampie e mediante tecnologie molecolari avanzate.

Questo lavoro ha permesso di identificare due diverse regioni associate alla psoriasi sul cromosoma 1q21, ed una terza regione, più a valle, sul medesimo cromosoma, associata alla dermatite atopica.

La frequenza dell'allele HLA-Cw*0602, riportata nella popolazione Italiana di pazienti PS è risultata minore (45%) rispetto a quella riscontrata nelle altre popolazioni europee (60%). Questo dato rafforza il ruolo del locus di suscettibilità PSORS4 isolato nella popolazione Italiana e localizzato a monte del gene *LOR* in grado di conferire un rischio con OR =1.98.

Tramite lo studio GWA in collaborazione con gruppi di ricerca Spagnoli, Olandesi e Statunitensi, abbiamo tipizzato la delezione identificata tra i geni *LCE3B* ed *LCE3C* nella nostra casistica identificando una seconda regione associata alla psoriasi sul cromosoma 1q21. Questo locus, caratterizzato da elevata instabilità genomica per la presenza di delezioni, variazioni del numero di copie e polimorfismi, è indipendente da PSORS4, come indicano i dati di disequilibrium, ma molto frequentemente associato alla malattia nei pazienti psoriasici italiani (60%). Inoltre, nell'analisi comparata con le altre patologie autoimmuni studiate, risulta associato unicamente alla psoriasi.

Sono attualmente in corso analisi volte alla determinazione degli altri alleli di suscettibilità di questa regione cromosomica data la presenza di una seconda delezione tra i geni *LCE1D* ed *LCE1E* e la presenza di polimorfismi che potrebbero essere associati alla malattia. L'analisi del cluster di geni LCE si è resa necessaria per l'importante ruolo che assumono queste proteine nel determinare una corretta formazione dello strato corneo.

Per quanto riguarda la DA, il gene *FLG* è stato tipizzato e sequenziato in 170 pazienti, ma non è stata rilevata alcuna associazione sebbene siano state identificate varianti non-sinonime peculiari della nostra popolazione. Il mancato coinvolgimento del gene *FLG* nella popolazione Italiana potrebbe essere spiegato da una selezione negativa del gene stesso o dalla presenza dell'altro locus di suscettibilità identificato a monte di *LOR* nella medesima regione di PSORS4.

In conclusione, la caratterizzazione completa delle due regioni del cromosoma 1q21 e dell'allele HLA-Cw*0602 sul cromosoma 6 associate a psoriasi nella popolazione Italiana, faciliterà la comprensione dei meccanismi fisiopatogenetici che concorrono a determinare il fenotipo clinico e principalmente a fornire un valido strumento per la determinazione del rischio individuale di sviluppare la malattia.

Da questi risultati emerge come la complessità della struttura del genoma umano e la sua fine regolazione possano difficilmente essere spiegati da singole varianti alleliche.

La variabilità del genoma umano garantisce un'enorme adattabilità agli stimoli ambientali. Le stesse malattie possono essere interpretate come interazioni geni-ambiente sfavorevoli e non come semplice sommatoria di effetti singoli di geni ed ambiente. Ciò è particolarmente vero per i geni funzionalmente ed evolutivamente correlati che sono organizzati in clusters, come quelli dell'EDC.

Questo studio ha permesso di identificare nuove varianti associate a psoriasi e dermatite atopica e potenzialmente implicate nell'insorgenza della malattie. Altri studi saranno necessari per comprendere come agiscono questi polimorfismi.

Lo studio dei fattori genetici delle malattie complesse non fornisce ancora delle ovvie spiegazioni per l'insorgenza delle patologie, ma identifica dei percorsi fisiopatologici alla loro base. L'approfondita conoscenza di tali meccanismi sarà la base per poter determinare il rischio di sviluppare la patologia e comprenderla nel suo insieme per permettere, in un futuro sempre più prossimo, l'identificazione e la sintesi di farmaci innovativi

Bibliografia

1. Amerio PL, Bernengo MG, Calvieri S, Chimenti S, Pippione M: *Dermatologia e Venereologia*. Edizioni Minerva Medica. Torino 2003.
2. Becker KG: The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. *Med Hypotheses* 2003; 62: 309-317.
3. Beyer K, Nickel R, Freidhoff L, Bjorksten B, Huang SK, Barnes KC, MacDonald S, Forster J, Zepp F, Wahn V, Beatty TH, Marsh DG, Wahn U (2000): Association and linkage of atopic dermatitis with chromosome 13q12-14 and 5q31-33 markers. *J Invest Dermatol* 115:906-908
4. Blauvelt A., Hwang ST., Udey MC.: Allergic and immunologic disease of the skin. *J Allergy Clin Immunol* . 111; 560-570, 2003
5. Bowcock AM, Cookson WO: The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* 2004; 13 Spec No 1: R43-r55.
6. Bradley M, Soderhall C, Luthman H, Wahlgren CF, Kockum I, Nordenskjold M (2002): Susceptibility loci for atopic dermatitis on chromosomes 3, 13, 15, 17 and 18 in a Swedish population. *Hum Mol Genet* 11:1539-1548
7. Capon F, Novelli G, Semprini S et al. Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 32-35
8. Capon F., Helms C., Veal C. D., Tillman D., Burden A. D., Barker JN., Bowcock AM., Trembath RC. : Genetic analysis of PSORS2 markers in a UK dataset supports the association between RAPTOR SNPs and familial psoriasis. (Letter) *J. Med. Genet.* 41: 459-460, 2004.
9. Capon F, Di Meglio P, Szaub J, Prescott N J, Dunster C, Bumber L, Timms K, Gutin A, Abkevic V, Burden AD, Lanchbury J, Barker JN, Trembath RC, Nestle FO . Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Hum. Genet.* 122: 201-206, 2007.
10. Cargill, M.; Schrodi, S. J.; Chang, M.; Garcia, V. E.; Brandon, R.; Callis, K. P.; Matsunami, N.; Ardlie, K. G.; Civello, D.; Catanese, J. J.; Leong, D. U.; Panko, J. M.; McAllister, L. B.; Hansen, C. B.; Papenfuss, J.; Prescott, S. M.; White, T. J.; Leppert, M. F.; Krueger, G. G.; Begovich, A. B. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am. J. Hum. Genet.* 80: 273-390, 2007
11. Chen H, Toh TK, Szeverenyi I, Ong RT, Theng CT, McLean WH, Seielstad M, Lane EB. Association of Skin Barrier Genes within the PSORS4 Locus Is Enriched in Singaporean Chinese with Early-Onset Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2008 Sep 11.
12. Cookson WO, Ubhi B, Lawrence R et al. Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet* 2001; 27: 372-373
13. Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M, Lathrop M. Mapping complex disease traits with global gene expression (2009). *Nat Rev Genet.* 10:184-194.
14. Ekelund E, Liedén A, Link J, Lee SP, D'Amato M, Palmer CN, Kockum I, Bradley M. Loss-of-function variants of the filaggrin gene are associated with atopic eczema and associated phenotypes in Swedish families. *Acta Derm Venereol.* 2008;88(1):15-9.
15. de Cid R, Riveira-Munoz E, Zeeuwen PL, Robarge J, Liao W, Dannhauser EN, Giardina E, Stuart PE, Nair R, Helms C, Escaramís G, Ballana E, Martín-Ezquerria G, den Heijer M, Kamsteeg M, Joosten I, Eichler EE, Lázaro C, Pujol RM, Armengol L, Abecasis G, Elder JT, Novelli G, Armour JA, Kwok PY, Bowcock A, Schalkwijk J, Estivill X. Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat Genet.* 2009 Feb;41(2):211-5. Epub 2009
16. Giardina E, Capon F. et al. Characterization of the loricrin (LOR) gene as a positional candidate for the PSORS4 psoriasis susceptibility locus. *Ann Hum Genet.* 2004; 68 (Pt 6): 639-645.
17. Giardina E, Sinibaldi C, Chini L, Moschese V, Marulli G, Provini A et al: Co-localization of susceptibility loci for psoriasis (PSORS4) and atopic dermatitis (ATOD2) on human chromosome 1q21. *Hum Hered* 2006; 61:229-236.
18. Giardina E, Sinibaldi C, Novelli G. Mapping the future of common diseases: lessons from psoriasis *Frontiers in Bioscience* 2007; 12: 1563- 1573
19. Giardina E Paolillo N Sinibaldi C Novelli G. R501X and 2282del4 filaggrin mutations do not confer susceptibility to psoriasis and atopic dermatitis in Italian patients. *Dermatology.* 2008; 216:83-84.
20. Girolomoni G., Pastore S. Dermatite atopica: clinica e terapia alla luce della patogenesi. Università degli studi di Napoli Federico II. Corso teorico 6-7 dicembre 2002. <http://www.dermatologyresearch.it/caserta/index.html>.
21. Gladman DD, Brockbank J: Psoriatic arthritis. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9:1511-1522.
22. Helms C.; Cao, L.; Krueger, J. G.; Wijsman, E. M.; Chamian, F.; Gordon, D.; Heffernan, M.; Daw, J. A. W.; Robarge, J.; Ott, J.; Kwok, P.-Y.; Menter, A.; Bowcock, A. M. : A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nature Genet.* 35: 349-356, 2003.
23. Hemminki K, Försti A, Bermejo JL (2008).The 'common disease-common variant' hypothesis and familial risks. *PLoS ONE* 3:e2504.

24. Hoffjan S Stemmler S. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol.* 2007 157:441-449
25. Huffmeier U Traupe H et al Loss-of-function variants of the filaggrin gene are not major susceptibility factors for psoriasis vulgaris or psoriatic arthritis in German patients. *J Invest Dermatol.* 2007 127:1367-1370
26. Hwu, W.-L.; Yang, C.-F.; Fann, C. S. J.; Chen C.-L.; Tsai T.-F.; Chien Y.-H.; Chiang S.-C.; Chen C.-H.; Hung S.-I.; Wu J.-Y.; Chen Y.-T. : Mapping of psoriasis to 17q terminus. (Letter) *J. Med. Genet.* 42: 152-158, 2005.
27. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature.* 2005 Oct 27;437(7063):1299-1320.
28. Kainu K, Kivinen K, Zucchelli M, Suomela S, Kere J, Inerot A, Baker BS, Powles AV, Fry L, Samuelsson L, Saarialho-Kere U. Association of psoriasis to PGLYRP and SPRR genes at PSORS4 locus on 1q shows heterogeneity between Finnish, Swedish and Irish families. *Exp Dermatol.* 2008
29. Kauffman CL, Aria N, Toichi E, McCormick TS, Cooper KD, Gottlieb AB, Everitt DE, Frederick B, Zhu Y, Graham MA, Pendley CE, Mascelli, MA : A phase I study evaluating the safety, pharmacokinetics, and clinical response of a human IL-12p40 antibody in subjects with plaque psoriasis. *J. Invest. Derm.* 123: 1037-1044, 2004.
30. Lee YA, Wahn U, Kehrt R, Tarani L, Businco L, Gustafsson D, Andersson F, Oranje AP, Wolkertstorfer A, v Berg A, Hoffmann U, Kuster W, Wienker T, Ruschendorf F, Reis A (2000): A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21. *Nat Genet* 26:470-473
31. Lee JE, Choi JH, Lee JH, Lee MG (2005) Gene SNPs and mutations in clinical genetic testing: haplotype-based testing and analysis. *Mutat Res* 3:195-204
32. Li C, Li M, Long JR, Cai Q, Zheng W (2008). Evaluating cost efficiency of SNP chips in genome-wide association studies. *Genet Epidemiol* 32:387-395.
33. Liu Y, Helms C, Liao W, Zaba LC, Duan S, Gardner J, Wise C, Miner A, Malloy MJ, Pullinger CR, Kane JP, Saccone S, Worthington J, Bruce I, Kwok PY, Menter A, Krueger J, Barton A, Saccone NL, Bowcock AM. A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet.* 2008
34. Lu X Wang M Qi J et al. Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *J Biol Chem* 2006: 281: 5895–5907
35. Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, Jacob CO, Serrano-Rios M, Martinez Larrad MT, Teng WP, Park Y, Zhang ZX, Goldstein DR, Tao YW, Beaurain G, Bach JF, Huang HS, Luo DF, Zeidler A, Rotter JI, Yang MC, Modilevsky T, Maclaren NK, She JX (1997): Insulin-independent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA-4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* 6:1275-1282
36. Matthews D., Fry L., Powles A., Weissenbach J., Williamson R.: Confirmation of genetic heterogeneity in familial psoriasis. *J. Med. Genet.* 32: 546-548 1995.
37. Matthews D.; Fry L.; Powles A.; Weber J.; McCarthy M.; Fisher E.; Davies K.; Williamson R.: Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q. *Nature Genet.* 14: 231-233, 1996.
38. Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A (1996): Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 106:989-992
39. Nair R. P., Guo S.-W., Jenisch S., Henseler T., Lange E. M., Terhune M., Westphal E., Christophers E., Voorhees J. J., Elder J. T. : Scanning chromosome 17 for psoriasis susceptibility: lack of evidence for a distal 17q locus. *Hum. Hered.* 45: 219-230 1995.
40. Nair R. P., Henseler T., Jenisch S., Stuart P., Bichakjian C. K., Lenk W., Westphal E., Guo S.-W., Christophers E., Voorhees J. J., Elder J. T. : Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum. Molec. Genet.* 6: 1349-1356 1997.
41. Nair RP, Duffin KC, Helms, C., Ding, J., Stuart, P. E., Goldgar, D., Gudjonsson, J. E., Li, Y., Tejasvi, T., Feng, B.-J., Ruether, A., Schreiber, S., and 18 others : Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappa-beta pathways. *Nature Genet.* 41: 199-204, 2009.
42. Novelli G. e Giardina E.: *Genetica Medica pratica.* Edizioni Aracne. Roma 2003.
43. Palmer CN Irvine AD Terron-Kwiatkowski A Zhao Y Liao H Lee SP Goudie DR Sandilands A Campbell LE Smith FJ O'Regan GM Watson RM Cecil JE Bale SJ Compton JG DiGiovanna JJ Fleckman P Lewis-Jones S Arseculeratne G Sergeant A Munro CS El Houate B McElreavey K Halkjaer LB Bisgaard H Mukhopadhyay S McLean WH. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006;38:441-446.
44. Pearson TA, Manolio TA (2008). "How to interpret a genome-wide association study". *JAMA* 299 (11): 1335–1344.
45. Robertson TL, Kato H, Gordon T, Kagan A, Rhoads GG, Land CE, Worth RM, Belsky JL, Dock DS, Miyamishi M, Kawamoto S. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California. Coronary heart disease risk factors in Japan and Hawaii (1977) *Am J Cardiol.* 39:244-249.
46. Rugarli C: *Manuale di Medicina Interna Sistematica* , Edizione Masson (3°Edizione), 1996

47. Sandilands A O'Regan GM Liao H Zhao Y Terron-Kwiatkowski A Watson RM Cassidy AJ Goudie DR Smith FJ McLean WH Irvine AD. Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris and predispose individuals to atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2006;126:1770-1775
48. Sandilands A Smith FJ Irvine AD McLean WH. Filaggrin's fuller figure: a glimpse into the genetic architecture of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2007 127:1282-1284
49. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci.* 2009 May 1;122(Pt 9):1285-1294.
50. Seguchi T, Cui CY, Kusuda S, Takahashi M, Aisu K, Tezuka T (1996): Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Arch Dermatol Res* 288:442-446
51. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. (2007). "A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes". *Nature* 445: 881–885.
52. Schultz Larsen F.: Atopic dermatitis: a genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J. Am. Acad. Dermatol.* 28: 719–723, 1993.
53. Speckman R. A., Daw J. A. W., Helms C., Duan S., Cao L., Taillon-Miller P., Kwok P.-Y., Menter A., Bowcock A. M: Novel immunoglobulin superfamily gene cluster mapping to a region of human chromosome 17q25 linked to psoriasis susceptibility. *Hum. Genet.* 112: 34-41 2003.
54. Stemmler S. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol.* 2007, 157:441-449
55. Stuart P., Nair R. P., Abecasis G. R., Nistor I., Hiremagalore R., Chia N. V., Qin Z. S., Thompson R. A., Jenisch S., Weichenthal M., Janiga J., Lim H. W., Christophers E., Voorhees J. J., Elder J. T. : Analysis of RUNX1 binding site and RAPTOR polymorphisms in psoriasis: no evidence for association despite adequate power and evidence for linkage. *J. Med. Genet.* 43: 12-17 2006
56. Strachan T. e Read A.P.: "Genetica umana e molecolare". Edizioni UTET Torino 1999.
57. Tomfohrde J., Silverman A., Barnes R., Fernandez-Vina M. A., Young M., Lory D., Morris L., Wuepper K. D., Stastny P., Menter A., Bowcock A. : Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science* 264: 1141-1145 1994.
58. Tsunemi Y., Saeki H., Nakamura K., Sekiya T., Hirai K., Fujita H., Asano N., Kishimoto M., Tanida Y., Kakinuma T., Mitsui H., Tada Y., Wakugawa M., Torii H., Komine M., Asahina A., Tamaki K. : Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3-prime-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J. Derm. Sci.* 30: 161-166, 2002.
59. Vyse TJ, Todd J (1996): Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 85:311-318
60. Weidinger S Rodriguez E Stahl C Wagenpfeil S Klopp N Illig T Novak N. Filaggrin Mutations Strongly Predispose to Early-Onset and Extrinsic Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 2007;127:724-726
61. Wellcome Trust Case Control Consortium (2007). Largest ever study of genetics of common diseases published today.
62. Wollenberg A., Kraft S., Opiel T., Bieber T.: Atopic dermatitis: pathogenetic mechanisms. *Clin Exp Dermatol.* 25: 530-4, 2000.
63. Zhang X.-J., He P.-P., Wang Z.-X., Zhang J., Li Y.-B., Wang H.-Y., Wei S.-C., Chen S.-Y., Xu S.-J., Jin L., Yang S., Huang W.: Evidence for a major psoriasis susceptibility locus at 6p21 (PSORS1) and a novel candidate region at 4q31 by genome-wide scan in Chinese Hans. *J. Invest. Derm.* 119: 1361-1366 2002.
64. Zhang X.-J., Huang W., Yang S., Sun L.-D., Zhang F.-Y., Zhu Q.-X., Zhang F.-R., Zhang C., Du W.-H., Pu X.-M., Li H., Xiao F.-L., and 55 others : Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21. *Nature Genet.* 41: 205-210, 2009.
65. Zhao Y Terron-Kwiatkowski A et al. Filaggrin null alleles are not associated with psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2007 127:1878-1882.

