

Titolo del Programma di Ricerca

Sclerosi sistemica: ruolo dei polimorfismi genetici nella suscettibilità alla malattia e nella sua evoluzione

Abstract del Programma di Ricerca

Background: Numerosi dati suggeriscono un controllo poligenico della sclerosi sistemica. Infatti, sono state evidenziate, a livello di popolazione, associazioni significative tra sclerosi sistemica e diversi marcatori genetici, in particolare con alcuni alleli HLA e, più recentemente tra alcuni polimorfismi genici che regolano la struttura del collagene, la sua produzione e /o degradazione.

Scopo: Obiettivi del progetto sono:

- a) indagare il ruolo che, nella suscettibilità alla sclerosi sistemica e nella variabilità della sua espressività clinica, hanno i polimorfismi di geni candidati, in particolare: i polimorfismi di alcune citochine e loro recettori (IL1alfa, IL1R e IL1RA; TGF beta; IL6, IL10, TNFalfa, IFNgamma); i polimorfismi di geni attivi a livello vascolare (ossido nitrico, endotelina, geni del sistema renina angiotensina - angiotensina II, angiotensinogeno, recettore per l'angiotensina- e geni del sistema della serotonina - polimorfismo del promotore del trasportatore della serotonina e dei recettori IA e IB della serotonina-)
- b) valutare il ruolo del background genetico nel favorire un esordio precoce di sclerosi sistemica (età di esordio uguale o inferiore a 18 aa.
- c) fornire uno strumento clinico (database) in grado di raggruppare i pazienti dal punto di vista delle manifestazioni cliniche, tenendo conto non solo della localizzazione e della estensione del danno d'organo, ma anche dell'attività e della evolutività della sclerosi sistemica. Tale strumento è indispensabile per poter effettuare studi genetici su gruppi indipendenti di pazienti e dovrà essere applicato su tutti i pazienti arruolati per lo studio dei poli-morfismi genetici
- d) produrre un pannello, numericamente rilevante, di pazienti tutti tipizzati per un grande numero di polimorfismi genetici da utilizzare per la messa a punto di strategie terapeutiche mirate.

Popolazione in studio: Nei primi 2 anni dello studio verranno tipizzati per i polimorfismi delle citochine e gli antigeni HLA circa 700 pazienti sclerodermici adulti, 200 pazienti ad esordio precoce (entro i 18 anni di età) e 500 controlli sani. In una fase successiva i dati ottenuti verranno testati in un gruppo indipendente di pazienti e di relativi controlli sani. Verrà, sempre in una seconda fase, avviata la tipizzazione di altri geni candidati, indicati nello scopo della ricerca.

Durata del Programma di Ricerca

24 Mesi

Parole chiave

SCLEROSI SISTEMICA; POLIMORFISMI; CITOCHINE; NO; MMP; SEROTONINA; RAS; ENDOTELINA; CCR.

Base di partenza scientifica nazionale e internazionale

La Sclerosi Sistemica (SSc) è una malattia cronica, multisistemica, ad eziologia sconosciuta, caratterizzata da fibrosi della cute e degli organi interni, da alterazioni caratteristiche del microcircolo arteriolare e da attivazione del sistema immunitario (1).

La SSc è una malattia assai eterogenea per quanto riguarda le manifestazioni cliniche e la sua velocità di progressione interindividuale. Caratteristica comune a pressoché la totalità dei pazienti è, tuttavia, la presenza di alterazioni vascolari caratteristiche, che sono alla base del Fenomeno di

Raynaud (RP) sclerodermico (2, 3). In un sottogruppo di pazienti, caratterizzato da un'alta prevalenza di anticorpi anti-centromero (ACA), la sclerosi cutanea è limitata alle estremità distali del corpo ed il coinvolgimento viscerale è tardivo e limitato soprattutto all'esofago (4); in questi pazienti, in cui prevale il danno vascolare, la causa principale di morbilità e mortalità è l'ipertensione polmonare isolata (5, 6). Altri pazienti presentano un interessamento cutaneo più esteso ed una grave fibrosi degli organi interni, talvolta rapidamente evolutiva; in questo ultimo gruppo si riscontrano con maggiore frequenza gli anticorpi anti-Topoisomerasi I (anti Scl70) (4).

La patogenesi della sclerodermia è assai complessa e non ancora del tutto chiara. In una certa misura sembrano essere implicati fattori genetici. Nelle famiglie di pazienti sclerodermici è stata evidenziata una incrementata percentuale di rotture ed instabilità cromosomiche (7). Inoltre, è stata evidenziata l'associazione fra alcuni aspetti evolutivi della malattia ed alcuni alleli HLA (8-10). Per quanto il ruolo di questi alleli come singola determinante genetica della malattia sia alquanto controverso (11), la presenza degli alleli HLA è stata nondimeno associata alla presenza di uno specifico pattern anticorpale, ACA (12) o Scl70 (13). Allo stesso modo, alcune delle alterazioni tipiche del RP sono state correlate con la presenza di alleli HLA (14). In diversi gruppi etnici è stata evidenziata la presenza di diversi polimorfismi genetici, in grado di determinare l'occorrenza della malattia, la presenza di determinati anticorpi, di alterazioni funzionali e cellulari e, in definitiva, la severità complessiva della SSc (15-22). Tutti questi risultati fanno pensare che la SSc sia una malattia poligenica in cui interazioni dovute alle alterazioni a carico di diversi sistemi (complesso maggiore di istocompatibilità, geni per il collagene, per la produzione di citochine, etc) giocano un ruolo determinante nella sua patogenesi (11).

Nella SSc sono state evidenziate numerose alterazioni funzionali e cellulari, verosimilmente importanti nello sviluppo e nell'evoluzione della malattia fra cui, il danno endoteliale, l'attivazione del sistema immunitario, l'eccessiva proliferazione ed attività sintetica dei fibroblasti con accumulo di collagene e componenti della matrice extracellulare (23). L'interazione tra i diversi meccanismi e soprattutto la loro amplificazione e persistenza è sostenuta dalla produzione autocrina e paracrina di diverse citochine (ET-1 [24-26], TGF β e CTGF [27], TNF α [28-30], IL-1 [29, 31], IL-2 [29], IL-6 [32, 33], IL-8 [32], IL-10 [33]), da parte delle cellule coinvolte nella patogenesi della malattia. E' stato ampiamente dimostrato come la regolazione e l'attività di queste citochine sia determinata a livello genico e come i polimorfismi dei loro geni e/o dei loro recettori ne determini la funzione complessiva. L'importanza della variabilità interindividuale dei livelli delle citochine e/o della loro attività di signaling dovuta ai polimorfismi genetici è stata ampiamente dimostrata in diverse malattie e, recentemente, anche nella sclerodermia. Il polimorfismo del TGF β è stato associato all'outcome dei trapianti di polmone (34), alla comparsa di una Graft Versus Host Disease (GVHD), malattia per molti versi simile alla SSc, dopo trapianti di midollo (35) e, più in generale, alla sclerodermia (20). Allo stesso modo, i polimorfismi dell'IL-1 si sono dimostrati importanti nel determinare l'esito di trapianti cardiaci (36), nella SSc (15, 16) e nella suscettibilità ad altre malattie immunologicamente determinate, quali la sarcoidosi (37). Alcune varianti genetiche dell'IL-6 sono state evidenziate nella fibrosi polmonari ideopatiche, specie nei soggetti con ridotti livelli di Dlc0 (38) elemento prognostico particolarmente sensibile per predire l'evoluzione dell'interessamento polmonare nella SSc (6, 10).

Nella patogenesi della sclerodermia un ruolo non trascurabile è giocato dall'aggregazione piastrinica, dalla vasocostrizione e dai conseguenti fenomeni di ischemia/riperfusion (3). Fra le sostanze implicate nei processi di vasocostrizione della sclerodermia, la serotonina (5-HT) sembra esercitare un ruolo predominante. L'infusione di serotonina è capace di scatenare il RP (39), livelli elevati di 5-HT sono stati ritrovati nei pazienti sclerodermici come conseguenza dell'aggregazione piastrinica e del rilascio della serotonina contenuta nei granuli di deposito dei trombociti (3). Il blocco del reuptake della serotonina nelle piastrine dei pazienti sclerodermici si è dimostrato efficace nel trattamento del RP, seppur con una notevole variabilità individuale (40). E' stato evidenziato come i polimorfismi del promoter del trasportatore della serotonina influenzino la risposta agli inibitori del reuptake della serotonina (41); questa variabilità potrebbe costituire una delle basi genetiche del diverso grado di intensità del RP nei pazienti sclerodermici o della loro differente risposta alla terapia.

Fra le sostanze in grado di influire sul rimodellamento tissutale ed in particolare sui processi di fibrosi post-flogistici e quindi potenzialmente rilevanti nella genesi della SSc, vanno ricordate quelle appartenenti al sistema della renina-angiotensina (ACE). E' stato dimostrato come i polimorfismi

dell'enzima di conversione dell'ACE determino la comparsa di fibrosi e la sopravvivenza complessiva nei trapianti di rene (42) e come nei pazienti affetti da SSc siano presenti in numero elevato alcune sue varianti all'eliche (43).

Alcuni dati suggeriscono che un ruolo nella suscettibilità e/o gravità della sclerosi sistemica sia svolto da geni che codificano per l'enzima NO-sintetasi endoteliale (44) e per una proteina della famiglia delle metalloproteinasasi (45).

L'interesse per NO nella SSc nasce dal ruolo di questa sostanza nella regolazione del tono vascolare e nelle sue azioni vasoprotettiva e antiproliferativa (46). Una ridotta produzione di NO da parte dell'endotelio comporterebbe un proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari e fibrosi irreversibile (47).

L'interesse per la stromelisinasi nasce dall'identificazione di una sua variante (6A) associata con una ridotta attività enzimatica e dalla segnalazione che individui eterozigoti o omozigoti per tale variante sarebbero a rischio di ristrenosi dopo angioplastica e di progressione di malattia aterosclerotica (48,49). Ricordiamo che le MMP sono un gruppo di enzimi che degradano la matrice extracellulare (MEC), e che nella SSc è stata ipotizzata una aumentata produzione di MEC ed una riduzione dell'attività collagenasica (50,51).

E' ancora materia di studio il ruolo di geni codificanti per alcune chemochine coinvolte nella regolazione della fibrosi e ritenute importanti nella SSc e in altri stati caratterizzati da fibrosi, quali la MCP-1 (52), i recettori CCR2 e CCR5 (53) e il RANTES (54).

In conclusione, considerando il ruolo rivestito dalla variabilità genetica nelle diverse espressioni delle malattie fibrotiche e nella SSc, è assai verosimile che l'eterogeneità della manifestazioni cliniche della sclerodermia e della sua evoluzione siano espressione del variabile contributo che ciascuno di questi fattori dà alla patogenesi della malattia. E' anche probabile che l'eterogeneità del background genetico individuale sia alla base della diversa risposta ad una stessa terapia in popolazioni di pazienti sovrapponibili dal punto di vista clinico-terapeutico. Risulta, quindi, indispensabile per poter attuare un intervento terapeutico mirato ed efficace, chiarire quale sia il meccanismo o i meccanismi predominanti nel singolo soggetto. Per raggiungere questo obiettivo è indispensabile:

- a) Analizzare a livello di popolazione l'associazione dei possibili geni candidati in sottogruppi di pazienti che sono il più omogenei possibile dal punto di vista clinico e quindi, assai verosimilmente, anche dal punto di vista patogenetico;
- b) chiarire, dopo averli identificati, quale sia il ruolo dei singoli geni e delle loro interazioni nella patogenesi della sclerodermia;
- c) identificare i meccanismi patogenetici prevalenti nel singolo paziente attraverso la determinazione dei polimorfismi genetici rilevanti.

Riferimenti bibliografici

1. Silver RM. *Ann Rheum Dis* 1991;50:854-61.
2. Raynaud M. In: Balrow TH, ed. *Selected Monographs*. London: New Sydenham Society, 1888:34-8.
3. Turton EPL. *Cardiovasc Surgery* 1998;6:431-40.
4. LeRoy EC. *J Rheumatol* 1988;15:202-5.
5. Silver RM. *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22:825-40.
6. Steen VD. *Arthritis Rheum* 2003;2:516-22.
7. Arlett CM. *Br J Rheumatol* 1996;35:732-7.
8. Langevitz P.. *Br J Rheumatol*. 1992;31: 609-13.
9. Grigolo B. *Clin Exp Immunol*. 121:1-6.
10. Scorza R. *Ann N Y Acad Sci* 2002;966:238-46.
11. Johnson RW. *Curr Rheumatol Rep* 2002;4:99-107.
12. Reveille JD. *J Clin Invest* 1992;89:1208-13.
13. Reveille JD. *J Clin Invest* 1992;90:973-80.
14. DellaBella S. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:647-54.
15. Kawaguchi Y. *Arthritis Rheum* 2003;48:186-92.
16. Kawaguchi Y. *Arthritis Rheum* 2003;48:193-202.
17. Takeuchi F. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:823-8.

18. Zhou X. Arthritis Rheum 2002 Nov;46(11):2990-9.
19. Koderà T. Gene 2002;297:61-7.
20. Crilly A. Ann Rheum Dis 2002;61:678-81.
21. Renzoni E. Arthritis Rheum 2000 Jul;43(7):1633-40.
22. Pandey JP. Hum Immunol 1999;60:1128-30.
23. Smith EA. In: Klippel JH, Dieppe PA eds. Rheumatology 2nd ed. London: Mosby-Year Book 1998;7:10.1-10
24. Xu SW. J Cardiovasc Pharmacol 1998;31:S545-7.
25. Morelli. Am J Med 1995;99:255-60.
26. Vancheeswaran R. J Rheumatol 1994;21:1838-44.
27. Denton CP, Abraham DJ. Curr Opin Rheumatol 2001;13:505-11.
28. Young V. Rheumatology (Oxford) 2002;41:869-75.
29. Alecu M et al. Rom J Intern Med 1998;36:251-9.
30. Hasegawa. J Rheumatol 1997;24:663-5.
31. Kawaguchi Y. Ann Rheum Dis 1994;53:506-10.
32. Kadono T et al. J Rheumatol 1998;25:296-301.
33. Sato S. J Dermatol Sci 2001;27:140-6.
34. Awad MR. Transplantation 1998;66:1014-20.
35. Hattori H. Bone Marrow Transplant 2002;30:665-71.
36. Vamvakopoulos JE. Am J Transplant 2002;2:76-83.
37. Hutyrova B et al. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:148-51.
38. Pantelidis P. Am J Respir Crit Care Med 2001;163:1432-6.
39. Seibold JR. J Cardiovasc Pharm 1985;7:S95-98.
40. Coleiro B. Rheumatology 2001;40:1038-43.
41. Eichhammer P. Psychopharmacology (Berl) 2003;166:294-7.
42. Barocci. Transplantation 1999;67:534-8.
43. Fatini C. Am J Med 2002;112:540-4.
44. Marasini B et al. Rheumatology 2001; 40: 475-6.
45. Loscalzo J et al. Progr Cardiovasc Res 1995; 38: 87-104.
46. Faller DV. Clin Exp Pharmacol 1999; 26: 74-84.
47. Shimasaki Y et al. J Am Coll Cardiol 1998; 31: 1506-10.
48. Hingorani AD et al. Circulation 1999; 100: 1515-20.
49. Fatini C et al. Am J Med 2002; 112:539-43.
50. De Maat MPM et al. Am J Cardiol 1999; 83: 852-56.
51. Ye S et al. J Biol Chem 1996; 271: 13055-60.
52. Kikushi K et al. J Am Acad Dermatol 1995; 33: 973-8.
53. Mattila L et al. J Invest Dermatol 1998; 110: 416-21.
54. Distler O et al. Arthritis Rheum 2001; 44: 2665-78.
55. Renzoni E et al. Arthritis Rheum 2000; 43: 1633-40.
56. Distler O et al. Rheumatol Int 1999; 19:39-46.

Sede dove verrà svolta la ricerca

UO di Allergologia e Immunologia Università degli Studi di Milano & Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena. Via Pace 9 -20122 Milano.
 Tel + 39 02 55035282
 Fax + 39 02 55035289.

Responsabile del Progetto: Prof. Raffaella Scorza – Ordinario di medicina Interna-
 Direttore dell'U.O di Allergologia e Immunologia Clinica del Centro di Riferimento Regionale per le
 Malattie Autoimmuni Sistemiche – Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli,
 Regina Elena – Milano

Metodologie impiegate

TIPIZZAZIONE HLA:

Gli antigeni HLA di classe II verranno tipizzati a livello genomico tramite tecniche di PCR-SSO e SSP. Le tecniche, i primer e le sonde marcate con (DIG) utilizzate negli assay PCR-SSO sono quelle validati nel 12^o e 13^o International Histocompatibility Workshop e riportate in dettaglio nel IHWG technical manual (1). Le metodiche sono di impiego routinario nel laboratorio e sono riportate in dettaglio nei lavori pubblicati dal gruppo di ricerca sul tema HLA-malattie.

POLIMORFISMI DELLE CITOCHINE.

Saranno analizzati i seguenti polimorfismi dei geni delle citochine:

IL1 α : T-889C; IL1 β C-511T e T+3962C ; IL1R C1970T ; IL1RA T11100C ; IL4R G1902A ; IL12 C-1188A ; IFN γ UTR A5644T ; TGF β : mutazioni CT al codone 10 e GC al codone 25 ; TNF α G-308A e G-238A; IL2 T-330G e G+166T; IL6 G-174C e Gnt565A; IL10 G-1082A e C-819T e C-592A.

Per lo studio dei polimorfismi saranno impiegate le piastre messe a punto presso l'Università di Heidelberg e utilizzate per il Workshop di istocompatibilità, componente citochinica. Le condizioni di amplificazione, di preparazione e di lettura dei gel sono quelle riportate in dettaglio nell'IHWG technical manual (1).

POLIMORFISMI DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (RAS):

GENOTIPO DELL'ACE.

Il polimorfismo genetico d'inserzione/delezione dell'introne 16 del gene dell'ACE verrà determinato tramite amplificazione del DNA utilizzando tre primers oligonucleotidici in reazione singola. Due primers si sono localizzati vicino al sito di inserzione e delezione (forward 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'; Reverse 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3') ed il terzo era complementare alla sequenza nel contesto dell'inserzione (Forward 5'-TGGGATTACAGGCGTGATACAG-3'). Questo ha generato un frammento di 159 pb dall'allele I e 190 pb dall'allele D. Le reazioni di amplificazione saranno eseguite in un volume totale di 20 mcg, utilizzando 100 ng di DNA genomico, 200 mcg dNTPs, 25 pmol di ciascun primer, 0.8 mM MgCl₂, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCL (pH 8,8 at 25 \pm), 0.1% Tween-20, 1U Taq polimerasi. I campioni verranno posti in un termociclatore e denaturati a 96 \pm C per 5 min, seguiti da 30 cicli di denaturazione a 94 \pm C per 30 sec, allineamento dei primer a 58 \pm C per 1 min ed estensione del DNA a 72 \pm C per 1 min, con un'estensione finale di 10 min a 72 \pm C. I prodotti della PCR saranno ridiluiti tramite elettroforesi in gel d'agarosio colorato con etil bromide.

GENOTIPO DELL'ANGIOTENSINOGENO

Il polimorfismo del gene M325T dell'angiotensinogeno (AGT) sarà determinato tramite amplificazione del DNA utilizzando AGT1 (5'-TGTTCCCTTGAAGGACAAGA-3') e primer oligonucleotidici M235R (5'-CAGGGTGCTGTCCACTGGACCCC-3'). Le reazioni di amplificazione saranno eseguite in un volume totale di 20 mcg, utilizzando 100 ng di DNA genomico, 200mcM dNTPs, 25 pmol di ciascun primer, 1.2 mM MgCl₂, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM tris-HCL (pH 8.8 a 25 \pm), 0.1% Tween-20, 1U Taq polimerasi. I campioni verranno posti in un termociclatore e denaturati a 94 \pm C per 5 min, seguiti da 32 cicli di denaturazione a 94 \pm per 30 sec, allineamento dei primer a 60 \pm per 30 sec ed estensione del DNA a 72 \pm per 30 sec. I prodotti della PCR saranno digeriti a 65 \pm C con 2-3 U dell'enzima di restrizione Tth111. In presenza dell'allele 235T il prodotto della PCR (340 pb) "" stato olivato in 2 frammenti di 320 pb e 20 pb e visualizzati su gel di agarosio colorato al 2% con etil bromide

GENOTIPO DEL RECETTORE DI TIPO I DELL'ANGIOTENSINA II

Il polimorfismo genetico del recettore A1166C di tipo I dell'angiotensina II (AT1R) sarà determinato tramite amplificazione del DNA utilizzando primer oligonucleotidici AT1R1 (5'-AGCTCATCCACCAAGAAGCC-3') e At1R2 (5'-AAGCTTTTGTTCAGAGCTTT-3'). Le reazioni di amplificazione saranno eseguite in un volume totale di 30 mcg, utilizzando 100 ng di DNA genomico, 200 mcM dNTPs, 25 pmol di ciascun primer, 1.2 mM MgCl₂, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCL (pH 8.8 a 25 \pm C), 0.1% Tween-20, 1U Taq polimerasi. I campioni verranno posti in un termociclatore e denaturati a 94 \pm C per 5 min, seguiti da 28 cicli di denaturazione a 94 \pm C per 1 min, allineamento dei primer a 52 \pm C per 45 sec ed estensione del DNA a 72 \pm C per 1 min. I prodotti della PCR verranno digeriti nel corso di una notte tramite aggiunta di 1U dell'enzima di

restrizione Ddel. In presenza dell'allele 1166C, i prodotti della pCR (404 pb) saranno olivati in 2 frammenti di 118 pb e 286 pb e visualizzati su gel d'agarosio colorato al 2% con etil bromide.

GENOTIPO DEL RECETTORE DI TIPO 2 DELL'ANGIOTENSINA II (AGTR2)

I polimorfismi del recettore AGTR2 sono elencati nel sito

(<http://weizman.ac.il/cardsbin/carddisp?AGTR2&search=angiotensin+receptor&stuff=text>).

Analizzeremo dapprima le SNPs nella regione di codifica dell'AGTR2 che provoca un cambio aminoacidico (rs1042880 e rs5191). Lo screening sarà eseguito sia in pazienti sclerodermici sia nella popolazione normale dal momento che le frequenze alleliche non sono disponibili. Se le frequenze alleliche non risulteranno significative utilizzeremo le altre SNPs riportate nel database SNPs. Eventualmente potremmo sequenziare l'intera regione di codifica dell'AGTR2 (1089 pb) in un campione di pazienti sclerodermici al fine di evidenziare mutazioni specifiche associate alla malattia. La discriminazione allelica sarà eseguita tramite ABI prism 7770 Sequence Detection System (Applera)

POLIMORFISMI DEL SISTEMA DELLA SEROTONINA:

Primer oligonucleotidici fiancheggiati la regione polimorfica 5HTT-linked e corrispondenti alle posizioni nucleotidiche da "C1,416 a 1,397 (forward primer: 5j⁻ -GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3j⁻) e da "C910 a "C889 (reverse primer: 5j⁻ -GAGGGACTGAGCTGGA CAACCAC-3j⁻) verranno utilizzati per generare frammenti polimorfici (484 e 528 bp, rispettivamente). L'amplificazione PCR verrà effettuata in un volume di 30ml costituito da 50 ng di DNA genomico, 2.5 mM desossiribonucleotidi, 0.1 mg di primer senso ed anti-senso, 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 5% DMSO e 1U Taq DNA polimerasi. L'analisi verrà effettuata a 61 °C per 30 s, extension a 72 °C per 1 min, e denaturazione a 95 °C per 30 s, per un totale di 35 cicli. I prodotti di reazione verranno sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio al 3% e visualizzati tramite illuminazione UV in presenza di etidio bromide.

Il DNA genomico viene estratto da cellule della serie bianca del sangue periferico mediante tecniche standard. La PCR viene eseguita in un volume di 25 µl contenenti 100 ng di DNA genomico, 8.25 pmol di ciascun primer, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM di ciascun dNTP, e 1U di Taq polimerasi. Dopo 3 minuti iniziali di denaturazione a 94 °C, vengono eseguiti 30 cicli consistenti in una denaturazione a 94 °C per 30 sec.; annealing a 58 °C per 30 sec.; extension per 30 sec.; seguiti da una extension finale a 72 °C per 5 min. in termociclatore.

I prodotti della PCR vengono visualizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2%. Prima di sequenziare, il rimanente prodotto della PCR, questo viene purificato, al fine di rimuovere i primer non incorporati ed eventualmente dei frammenti aspecifici, mediante il kit Quiagen Quiaquick. Le sequenze dei prodotti della PCR vengono sequenziate mediante il sequenziatore automatico L' elettroferogramma viene quindi allineato e analizzato per verificare l' eventuale presenza di polimorfismi.

ANALISI STATISTICA

I dati verranno analizzati mediante test non parametrici (software SPSS), calcolando gli ODD ratio e l'intervallo di confidenza delle associazioni trovate. Verrà analizzata anche l'eventuale esistenza di assetti genetici di particolare rilevanza clinica. L'analisi della interazione gene-gene sarà effettuata usando il processo a 4 step sviluppato da Moore et al. (2006).