

MAPPA DI LINKAGE DISEQUILIBRIUM DELLA REGIONE 2q13-14 CONTENENTE IL CLUSTER GENICO DELL'IL-1 E ASSOCIAZIONE CON LA PARODONTITE AGGRESSIVA NELLA POPOLAZIONE ITALIANA

I. Borzani¹, M. E. Guarnelli², E. Mamolini¹, M. Annunziata³, L. Guida³, C. Scapoli^{1,2}

¹Dipartimento di Biologia ed evoluzione, Università di Ferrara, Ferrara; ²Centro di Ricerca e Servizi per lo Studio delle Malattie Parodontali, Università di Ferrara, Ferrara;

³Dipartimento di Discipline Odontostomatologiche, Ortodontiche e Chirurgiche, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli

Atti della Sessione di ricerca Premio "HM Goldman" - XV Congresso Nazionale SIdP - Bologna 6-7-8 Marzo 2008

RIASSUNTO

È stata condotta un'analisi di Linkage Disequilibrium (LD) utilizzando 70 marcatori genetici equamente distribuiti sulla regione cromosomica di 1.1 Mb dove mappa il cluster dell'Interleuchina-1 (IL-1), famiglia genica candidata per la Parodontite Aggressiva (AgP). I risultati dell'analisi sostengono l'esclusione di una possibile associazione tra varianti dell'IL-1 e l'AgP.

INTRODUZIONE

L'Interleuchina-1 (IL-1) svolge un ruolo importante nella patogenesi delle parodontiti. In particolare, l'IL-1a e l'IL-1b, molecole funzionalmente simili, vengono identificate come citochine che svolgono un ruolo centrale nella risposta pro-infiammatoria; l'IL-1ra, è una molecola con azione anti-infiammatoria ed ha la funzione di legare in modo antagonista il recettore per l'IL-1a e l'IL-1b. Pertanto, il contributo effettivo del complesso delle IL-1 nella risposta pro-infiammatoria dipende principalmente dal bilancio tra queste tre molecole. I geni del cluster dell'IL-1 presentano un'elevata frequenza di varianti alleliche e risultano associati ad una molteplicità di condizioni infiammatorie e di patologie autoimmuni.

Nel 1997, Kornman et al.^[1] evidenziarono un'associazione tra varianti alleliche nei geni codificanti per l'IL-a (IL-1A⁻⁸⁸⁹) e per l'IL-b (IL-1B⁺³⁹⁵³) ed un incremento della severità nella parodontite cronica (ChP). A questo primo lavoro sono seguite numerose altre pubblicazioni che hanno contribuito notevolmente ad aumentare l'interesse verso i polimorfismi genici e le patologie parodontali.

L'osservazione iniziale di Kornman et al. è stata indagata in numerose altre ricerche e recentemente Huynh-Ba e colleghi^[2] hanno raccolto e rivisitato più di 100

analisi, relative al “genotipo composito” (definito PAG), concludendo che non ci sono sufficienti evidenze per dimostrare che la condizione di portatore del genotipo “PAG predisponente” sia effettivamente coinvolta nella progressione della ChP e/o nell’esito del suo trattamento clinico.

Per quanto concerne la specifica associazione tra genotipi dell’IL-1 e suscettibilità alla AgP, le ricerche effettuate fino ad oggi presentano anche risultati contrastanti. Un primo fattore confondente è costituito dalla componente etnica: le indagini presenti in letteratura coinvolgono infatti popolazioni appartenenti a diversi gruppi, quali gli Americani di origine Caucasica, gli Americani di origine Africana, gli Europei e le popolazioni Asiatiche^[3]. In aggiunta alla componente etnica, la ricerca del ruolo dei polimorfismi dell’IL-1 nell’AgP è ulteriormente complicata ed influenzata anche da altri fattori quali fumo, sesso od età.

Da qualche anno abbiamo iniziato lo studio della componente genetica sia nella gengivite indotta placca-associata^[4] sia nelle AgP^[5]. In particolare, nello studio delle AgP abbiamo esaminato la relazione tra 6 varianti del cluster genico dell’IL-1 e la patologia, tramite sia l’analisi classica di associazione allelica sia attraverso la costruzione di una mappa in Unità di LD^[6] della regione candidata 2q13-14. Il metodo utilizzato^[6] combina le informazioni provenienti da tutti i singoli marcatori e costruisce un unico modello statistico che include, tra gli altri, un parametro per la stima della localizzazione di un potenziale polimorfismo causativo all’interno della regione. Nel lavoro del 2005, tale modello multilocus ha fornito una stima della localizzazione del picco di associazione in corrispondenza del locus IL-1B⁺³⁹⁵³ e, nell’analisi aplotipica, il genotipo combinato IL-1B⁺³⁹⁵³-IL-1B⁻⁵¹¹ presentava il più basso livello di significatività nella regione considerata. Tuttavia in entrambi i casi i test statistici non raggiungevano la piena significatività.

Negli studi citati, che hanno rappresentato il punto di partenza del presente progetto, due erano i potenziali punti critici: le dimensioni limitate dei campioni ed il basso numero di varianti genetiche prese in considerazione. Nella presente analisi tali restrizioni sono state risolte con il coinvolgimento di un secondo Centro Clinico che ha permesso di aumentare le dimensioni campionarie e con la copertura della regione cromosomica con un appropriato numero di SNPs, scelti in funzione della struttura di LD della regione.

Lo scopo del presente lavoro è stato pertanto quello di studiare, in un campione adeguato di soggetti, i geni coinvolti nella suscettibilità genetica alla AgP tramite l’analisi di associazione allelica e con la costruzione di una mappa ad alta densità di SNPs per lo studio della struttura di LD della regione 2q13-14, la principale regione candidata per tale patologia.

MATERIALI E METODI

Soggetti analizzati: un totale di 95 pazienti (29 maschi e 66 femmine) affetti da AgP, come definita clinicamente da Tonetti & Mombelli^[7], sono stati raccolti in due diversi Centri: il Centro di Ricerca e Servizi per lo Studio delle Malattie Parodontali, Università di Ferrara (56 soggetti) ed il Dip. di Discipline Odontostomatologiche, Ortodontiche e Chirurgiche, Seconda Università di Napoli (39 soggetti). Come controlli, sono stati identificati 121 individui sani, 61 provenienti da Ferrara e 60 da Napoli, non imparentati tra loro e residenti da più generazioni nelle rispettive aree di appartenenza. Tali soggetti, appaiati per sesso e abitudini

comportamentali ai pazienti affetti da AgP, non dovevano presentare, su nessun dente, una perdita di attacco osseo interprossimale più ampia di 2 mm. Tutti i 216 individui hanno firmato un consenso informato scritto, relativo al tipo di analisi a cui si sarebbero sottoposti ed il protocollo di studio è stato approvato dai Comitati etici locali.

Genotipizzazione: il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico utilizzando il QIAamp blood Kit (QIAGEN Inc., Germany) o impiegando un metodo di estrazione con fenolo/cloroformio. Un minimo di 1 µg di DNA genomico è stato estratto da ogni campione, diluito in tampone TE (0,2X a 10 ng per microlitro) e raccolto in una griglia a 96 pozzetti, in cui le concentrazioni dei DNA sono state determinate tramite misure di fluorescenza con sonde molecolari (Invitrogen, Molecular Probes, USA). Per ciascun campione, i 70 polimorfismi selezionati sono stati tipizzati utilizzando la piattaforma Sequenom MassARRAY® (Sequenom, San Diego, CA), con il protocollo iPLEXTM.

Analisi statistiche: Nelle due popolazioni considerate, l'analisi della potenziale associazione tra varianti/geni candidati e AgP è stata effettuata tramite l'applicazione dei seguenti programmi statistici: PLINK [versione 1.00] è stato utilizzato per testare la presenza di stratificazione, per la verifica dell'equilibrio di Hardy Weinberg e per determinare, tramite Chi-quadro e test esatto di Fisher, eventuali differenze nelle distribuzioni alleliche o genotipiche tra casi e controlli. Il livello di significatività scelto è la convenzionale soglia al 5%. Quando necessario, i livelli di significatività sono stati sottoposti alla correzione di Bonferroni per confronti multipli. Tramite l'algoritmo di Expectation-Maximization implementato in PLINK, partendo dai dati genotipici della popolazione sono stati ricostruiti gli aplotipi e le frequenze aplotipiche osservate sono state confrontate tra casi e controlli tramite test del Chi quadro.

CHROMSCAN <http://cedar.genetics.soton.ac.uk/pub/PROGRAMS>^[8] è stato utilizzato per costruire una mappa di linkage disequilibrium espressa in Unità di LD (LDUs), in cui le distanze di mappa sono additive e le localizzazioni sono monotoniche con le mappe fisiche e genetiche^[9].

RISULTATI

Controllo di qualità: Dei 70 marcatori caratterizzati, 2 polimorfismi sono risultati monomorfici e 6 presentavano una percentuale di identificazione certa inferiore al 20%. Tali marcatori sono stati pertanto esclusi dalle analisi. Tra i rimanenti 62 SNPs caratterizzati con successo, 4 polimorfismi presentavano una deviazione significativa dall'Equilibrio di Hardy-Weinberg nel gruppo dei controlli e, pertanto, sono stati anch'essi esclusi.

Test di stratificazione: Utilizzando PLINK, è stata testata la presenza di un'eventuale stratificazione tra le due sottopopolazioni analizzate (Ferrara e Napoli). L'algoritmo implementato nel software stima le probabilità di "identità per stato" tra individui e costruisce una matrice 216x216 di distanze genetiche. L'informazione contenuta in tale matrice, ridotta in un sistema a due dimensioni

con la tecnica dello Scaling Multidimensionale, viene riassunta in un grafico in cui ogni punto rappresenta un individuo del campione (Figura 1). La distribuzione uniforme dei punti nel grafico indica chiaramente l'assenza di eterogeneità tra gli individui appartenenti alle due sotto popolazioni.

Per saggiare ulteriormente l'omogeneità tra individui è stato utilizzato il test di Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) per campioni stratificati. Al CMH-test, il marcatore che è risultato maggiormente eterogeneo è lo SNP rs895497, variante che, tuttavia, non risulta significativamente diversa nelle due popolazioni ($\chi^2_{[CMH]}=2.1$, $p\text{-value}=0.146$, $OR_{[CMH]}=1.4$ (95%CI 0.90-2.08)].

Da queste analisi è possibile concludere che le due sottopopolazioni campionate, Ferrara e Napoli, risultano geneticamente omogenee in relazione alla regione cromosomica studiata. Pertanto, nelle successive analisi, sono state considerate come un'unica popolazione, suddivisa in casi e controlli.

Analisi Single-point: In tabella 1 sono riportati, per ogni marcatore, i livelli di significatività ottenuti dal confronto delle distribuzioni di frequenza genotipiche e alleliche nei casi vs i controlli. Di tutti i marcatori analizzati, solo la distribuzione genotipica dello SNP rs6751201, localizzato nell'introne dieci del gene SEC7, è risultata significativamente diversa nei due gruppi.

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

La struttura cromosomica della regione candidata (Figura 2) è stata costruita tracciando, sulle distanze in Kb, le distanze in LDU ottenute con: i dati per la popolazione Caucasica del database pubblico di HapMap (linea blu); i dati complessivi della popolazione Italiana (linea rosa); i soggetti Italiani sani (linea gialla) ed i

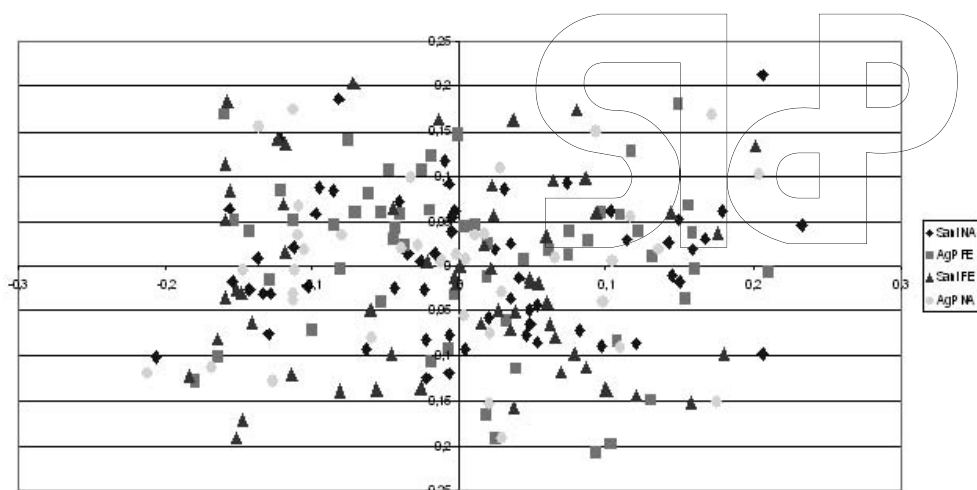


Fig. 1. Analisi di Scaling Multidimensionale, basato sulla matrice di distanze genetiche IBS, per la verifica di omogeneità tra le due sottopopolazioni analizzate: Ferrara (FE) e Napoli (NA)

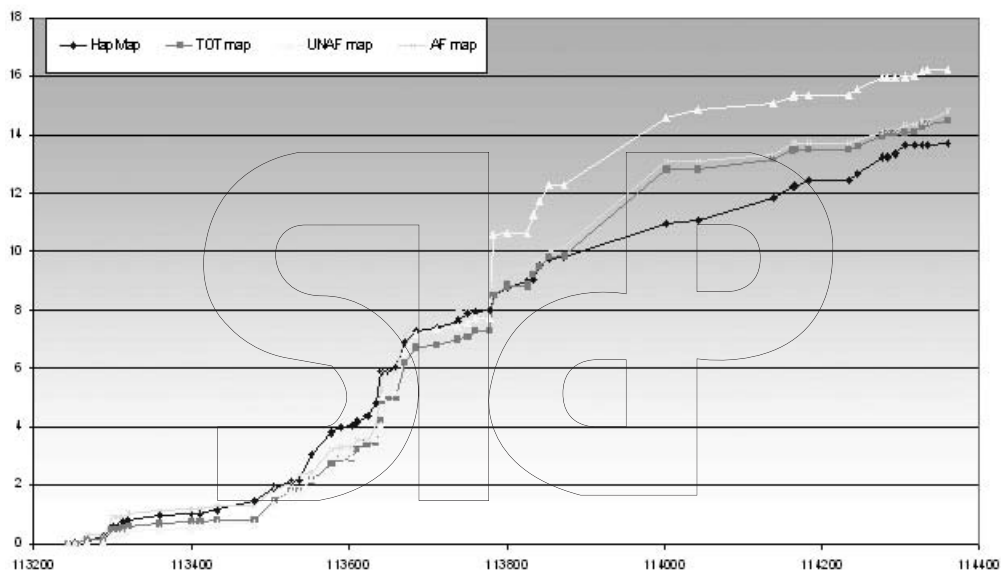


Fig. 2. Struttura cromosomica della regione candidata 2q13-14 costruita tracciando, sulle distanze in Kb tra gli SNPs selezionati (ascissa), le distanze in LDU (ordinata) ottenute con: database di HapMap (linea blu); b) i dati dei 216 soggetti Italiani (linea rosa); c) i soggetti Italiani sani (linea gialla) e d) i pazienti affetti da AgP (linea azzurra)

pazienti affetti da AgP (linea azzurra). Le 4 mappe di LD mostrano profili molto simili, con una lunghezza complessiva di circa 16 LDU e, in particolare, la struttura cromosomica della regione 2q13-14 ottenuta dai dati della popolazione Italiana conferma il profilo ottenibile dal database di HapMap.

Come definito in Maniatis et al.^[9], per verificare l'esistenza di un polimorfismo causale all'interno della regione candidata sono state confrontate "l'ipotesi nulla", che assume assenza di associazione tra patologia e regione candidata, e "l'ipotesi alternativa" che assume la presenza di un allele predisponente alla patologia all'interno della regione 2q13-14. Dal confronto non sono emerse evidenze significative della presenza di una variante causativa all'interno della regione analizzata ($\chi^2=1.59$; $P=0.207$, la significatività è stata stabilita tramite 400 permutazioni dello stato di affezione).

Ricostruzione Aplotipica: Utilizzando il metodo delle finestre sovrapposte (con lo scivolamento di 1 SNP a passo), sono stati ricostruiti tutti i possibili aplotipi a 3 ed a 6 marcatori. Dal confronto delle distribuzioni aplotipiche dei casi vs i controlli è emerso che tutti gli aplotipi (sia a 3 che a 6 SNPs) che contenevano le varianti alleliche ai geni IL1F6 e IL1F8 mostravano una significativa o borderline associazione con la patologia (range dei P-values da 0.022 a 0.053). Non è stata osservata alcuna associazione tra l'AgP e gli aplotipi contenenti varianti ai geni IL1A, IL1B e IL1RN.

DISCUSSIONE

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare, in un campione adeguato di soggetti, una possibile associazione tra la suscettibilità genetica alla AgP e la regio-

ne cromosomica 2q13-14. Le nostre analisi hanno rivelato che non ci sono evidenze significative della presenza di varianti causative per l'AgP nella regione genomica dove mappano i geni IL1A, IL1B e IL1RN.

Come risulta dai numerosi studi presenti in letteratura, i geni del cluster dell'IL-1 rappresentano i principali geni candidati per le patologie parodontali. D'altra parte, sia per la ChP che per l'AgP, le ricerche sulla relazione tra i genotipi dell'IL-1 e la suscettibilità a tali patologie hanno portato a risultati contraddittori^[10].

Spesso l'inconsistenza dei risultati che si riscontrano negli studi di associazione caso-controllo possono essere riconducibili a problemi di stratificazione, alle dimensioni campionarie, alle procedure di raccolta e appaiamento dei campioni di controllo, oltre che alla perdita di potere statistico dovuto alle procedure di correzione per confronti multipli. Nella presente analisi tali restrizioni sono state opportunamente controllate e verificate statisticamente ed i risultati ottenuti sembrano tutti coerenti con l'esclusione di una possibile associazione tra polimorfismi ai geni IL-1A, IL-1B o IL1RN con l'AgP. Queste indicazioni emergono sia dall'analisi single-point sia dalla ricostruzione degli aplotipi, come anche dall'adattamento del modello di clonaggio posizionale basato sulla struttura di LD.

RINGRAZIAMENTI

Il presente studio è stato supportato dal Centro di Ricerca e Servizi per lo Studio delle Malattie Parodontali, Università di Ferrara, e da un finanziamento della GABA International AG, Munchenstein, Svizzera.

BIBLIOGRAFIA

1. Kornman KS, Crane A, Wang HY et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 72-77.
2. Huynh-Ba G, Lang NP, Tonetti MS & Salvi GE. The association of the composite IL-1 genotype with periodontitis progression and/or treatment outcomes: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 305-317.
3. Meng H, Xu L, Li Q, Han J, Zhao Y. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000, 2007; 43: 133-159.
4. Scapoli C, Tatakis DN, Mamolini E, Trombelli L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: interleukin-1 gene cluster polymorphisms. *Journal of Periodontology* 2005; 76: 49-56.
5. Scapoli C, Trombelli L, Mamolini E, Collins A. Linkage disequilibrium analysis of case-control data: an application to generalized aggressive periodontitis. *Genes Immun.* 2005; 6: 44-52.
6. Morton N, Maniatis N, Zhang W, Ennis S, Collins A. Genome scanning by composite likelihood. *Am J Hum Genet.* 2007; 80: 19-28.
7. Tonetti MS & Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 1999; 4: 39-53.
8. Collins A, Lau W. CHROMSCAN: genome-wide association using a linkage disequilibrium map. *J Hum Genet* 2007; Nov 28 [Epub ahead of print].
9. Maniatis N, Collins A, Gibson J, Zhang W, Tapper W, Morton NE. Positional cloning by linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet.* 2004; 74, 846-855.
10. Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol* 2000, 2007; 43: 102-132.

Tabella 1. Sono riportati, per ogni marcatore, i livelli di significatività ottenuti dal confronto delle distribuzioni di frequenza genotipiche e alleliche nei casi verso i controlli

DBSNP	DISTRIBUZIONI ALLELICA (P-VALUE)	DISTRIBUZIONI GENOTIPICA (P-VALUE)	DBSNP	DISTRIBUZIONI ALLELICA (P-VALUE)	DISTRIBUZIONI GENOTIPICA (P-VALUE)
rs4848300	0,320	0,554	rs6751201	0,398	0,025
rs17561	0,320	0,534	rs1015754	0,860	0,998
rs10496444	0,791	0,292	rs1110839	0,152	0,351
rs12469600	0,432	0,709	rs2018348	0,740	0,591
rs3917368	0,292	0,510	rs1374161	0,486	0,493
rs1143634	0,154	0,086	rs4848327	0,714	0,380
rs1143627	0,721	0,525	rs2002510	0,941	0,800
rs16944	0,914	0,941	rs4404277	0,515	0,743
rs4849127	0,413	0,659	rs1191694	0,427	0,468
rs2708919	0,151	0,205	rs2008324	0,655	0,350
rs7577574	0,614	0,735	rs6739740	0,853	0,760
rs2723163	0,217	0,215	rs11123181	0,373	0,694
rs879711	0,221	0,387	rs1968615	0,766	0,808
rs895497	0,153	0,358	rs1867870	0,834	0,762
rs2305150	0,488	0,586	rs1739538	0,748	0,904
rs1562302	0,702	0,340	rs11123202	0,799	0,811
rs1800930	0,483	0,602	rs11123205	0,475	0,256
rs2515402	0,486	0,710	rs4849261	0,905	0,961
rs6759676	0,859	0,971	rs935644	0,897	0,345
rs1623119	0,399	0,464	rs2166966	0,440	0,732
rs4251961	0,957	0,993	rs4848348	0,871	0,434
rs454078	0,659	0,875	rs7587985	0,557	0,754
rs315943	0,633	0,520	rs11123208	0,877	0,799
rs11123167	0,207	0,152	rs4450608	0,737	0,933
rs12475781	0,664	0,657	rs4849285	0,637	0,639
rs724496	0,677	0,854	rs1028245	0,893	0,871
rs4849159	0,468	0,777	rs9941677	0,857	0,438
rs6761202	0,553	0,778	rs12995005	0,867	0,402
rs1975535	0,683	0,911	rs6740934	0,660	0,323