

Search for genetic variants affecting periodontal health in the Isolated population of Cilento: a suggestive pathway from a population-based study.

L. Nastri^{*^}, R. Sorice^{*^}, T. Nutile[#], D. Ruggiero[#], C. Cafiero[§] e M. Ciullo[#]

*** Co-first authors**

[^]Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche e Odontoiatriche, Università della Campania “Luigi Vanvitelli”.

[#]Istituto di Genetica e Biofisica “A. Buzzati-Traverso” CNR Napoli.

[§]Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli “Federico II”.

ABSTRACT:

Periodontitis is one of the most common inflammatory diseases affecting the humankind.

Despite decades of research, our knowledge of several important aspects of periodontal pathogenesis remains incomplete.

The disease is characterized by destruction of the connective tissue and alveolar bone due to an aberrant host inflammatory response to a complex oral microbiome, with different phenotypic effects according to “susceptibility” to the disease. This susceptibility partially relates to genetic variants.

We conducted a Genome Wide Association Study (GWAS) on the isolated populations of Cilento with the aim of finding individual genetic variants associated with periodontitis, assessed by Periodontal Screening and Recording. We performed two GWAS, using both a quantitative and a qualitative phenotype, leading to the identification of 13 associated genes. A pathway over-representation analyses was also conducted. We found 2 significantly enriched biological pathways: cell adhesion and collagen biosynthesis and folding. Interestingly, both can be related to periodontal diseases and attachment loss and to bacterial invasion of periodontal tissues.

Analisi delle varianti genetiche che influenzano la salute parodontale nella popolazione isolata del Cilento: nuovi e suggestivi pathways.

L. Nastri^{*^}, R. Sorice^{*^}, T. Nutile[#], D. Ruggiero[#], C. Cafiero[§] e M. Ciullo[#]

*** Co-first authors**

[^]Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche e Odontoiatriche, Università della Campania “Luigi Vanvitelli”.

[#]Istituto di Genetica e Biofisica “A. Buzzati-Traverso” CNR Napoli.

[§]Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli “Federico II”.

ABSTRACT

La parodontite è una delle malattie infiammatorie più comuni nella popolazione. Nonostante decenni di ricerca, la nostra conoscenza relativa ai diversi fattori eziologici che si trovano alla base della patogenesi parodontale rimane incompleta. La parodontite è caratterizzata dalla distruzione del tessuto connettivale e dell'osso alveolare determinata da una risposta infiammatoria aberrante che l'ospite sviluppa nei confronti della placca batterica, con effetti sul fenotipo diversi in base alla "susceptibilità" individuale alla malattia. Susceptibilità che in parte è spiegata da fattori genetici.

Nel nostro studio abbiamo condotto un'analisi di associazione sull'intero genoma (Genome Wide Association Study, GWAS) nella popolazione isolata del Cilento con l'obiettivo di trovare varianti genetiche associate a un fenotipo di parodontite, valutata con l'utilizzo del Periodontal Screening and Recording (PSR) Abbiamo eseguito un GWAS sia per il tratto quantitativo e che per quello qualitativo (caso/controllo). Tale analisi ha portato all'identificazione di 13 loci genetici. È stata inoltre condotta un'analisi per valutare se tali geni appartenessero a pathway comuni. Abbiamo trovato 2 pathway significativamente arricchiti: adesione cellulare, biosintesi e folding del collagene. È interessante notare che entrambi i pathways possono essere correlati alla malattia parodontale, alla perdita di attacco e all'invasione batterica nei tessuti parodontali.

Analisi delle varianti genetiche che influenzano la salute parodontale nella popolazione isolata del Cilento: nuovi e suggestivi pathways.

L. Nastri^{*^}, R. Sorice^{*^}, T. Nutile[#], D. Ruggiero[#], C. Cafiero[§] e M. Ciullo[#]

*** Co-first authors**

^ Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche e Odontoiatriche, Università della Campania “Luigi Vanvitelli”.

Istituto di Genetica e Biofisica “A. Buzzati-Traverso” CNR Napoli.

§ Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli “Federico II”.

Introduzione

La parodontite è una malattia infiammatoria multifattoriale, il cui attuale modello patogenetico sottolinea le complesse relazioni tra placca batterica, risposta infiammatoria dell'ospite e fattori ambientali. La placca batterica, organizzata in un complesso biofilm, induce una risposta infiammatoria da parte dell'ospite che, pur con l'intento di eliminare l'insulto batterico, in alcuni individui può essere sproporzionata, determinando la distruzione del tessuto di supporto dei denti¹. Ogni soggetto sviluppa una risposta, individuale e dose-dipendente, alla sfida batterica che determina la sua suscettibilità alla parodontite². Dati di letteratura supportano fortemente l'importanza del background genetico nel determinare una suscettibilità individuale alla parodontite. Le analisi sui gemelli monozigoti eseguite da diversi autori hanno stimato che il background genetico (l'ereditarietà) spiega una proporzione pari al 30-50% della variabilità della parodontite nella popolazione generale³⁻⁶.

La parodontite è considerata una malattia complessa su base poligenica, la cui insorgenza è associata alla presenza di variazioni in più geni (varianti genetiche e polimorfismi di singoli nucleotidi, o SNPs), ognuna delle quali dà un contributo modesto e un limitato rischio relativo per il processo della malattia. Tali varianti sono relativamente frequenti nella popolazione⁷ e questo si traduce ovviamente in una maggiore difficoltà di identificazione.

L'analisi di associazione sull'intero genoma (genome-wide association study, GWAS) rappresenta uno strumento per identificare tali varianti geniche potenzialmente associate alle malattie. Il maggior vantaggio offerto dai GWAS è l'approccio di natura agnostica (ovvero uno studio libero da ipotesi a-priori, basate sulle conoscenze già acquisite su una data malattia) e la possibilità di analizzare una congrua proporzione di varianti comuni ritrovate nel genoma umano (ovvero molti milioni di possibili varianti). Il primo studio di GWAS per la parodontite è stato pubblicato nel 2010⁸. Recentemente, l'approccio GWAS è stato ripetutamente utilizzato per identificare nuovi fattori di rischio genetici per la parodontite, sottolineando la presenza di diverse regioni genomiche individuate, senza tuttavia produrre una concordanza di risultati⁸⁻¹⁴. Negli ultimi anni la comunità scientifica ha rivolto una particolare attenzione allo studio delle popolazioni isolate per identificare geni responsabili di malattie complesse. La scelta delle popolazioni isolate si basa sulla possibilità di semplificare il modello genetico alla base di tali malattie. Infatti, le caratteristiche di queste popolazioni quali il ridotto numero di fondatori e l'elevata consanguineità, causerebbero una riduzione del numero di geni implicati nello sviluppo di queste malattie. D'altra parte, l'uniformità dello stile di vita e dell'ambiente di tali popolazioni, permettono di ridurre la variabilità dei fattori di rischio non genetici facilitando l'identificazione dei fattori genetici¹⁵.

Il nostro studio si inserisce su una più ampia analisi eseguita nell'ambito del progetto “Parco Genetico del Cilento e Vallo di Diano”¹⁶ allo scopo di identificare dei geni e varianti genetiche che possano predisporre alla parodontite.

Materiali e Metodi

I dati di 678 individui (18-99 anni) provenienti dalle popolazioni isolate di Gioi (n=398), Cardile (n=181) e Campora (n=99), sono stati raccolti tra 2007 e il 2008 nell'ambito del Progetto "Parco Genetico del Cilento e Vallo di Diano". Lo studio è stato condotto grazie all'approvazione della commissione etica "Carlo Romano" dell'Università degli studi di Napoli "Federico II" e della commissione etica dell'Azienda Sanitaria Locale Napoli 1.

Per ogni partecipante è stata compilata una scheda anagrafica, anamnestica, eseguito un esame clinico generale, effettuato un prelievo di sangue periferico ed eseguito un accurato esame obiettivo del cavo orale. La valutazione delle condizioni cliniche parodontali è stata effettuata da un operatore esperto mediante il Periodontal Screening and Recording index (P.S.R.)^{17,18}. In sintesi, la bocca di ciascun partecipante è stata divisa in sestanti e ciascun dente è stato esaminato in sei siti mediante l'uso della sonda parodontale proposta dalla WHO¹⁹, in accordo con il protocollo. Ad ogni sestante è stato assegnato un valore (o codice) da 0 a 4, sulla base del rilievo clinico più grave nel sestante esaminato. Il codice "X" è stato utilizzato per indicare i sestanti edentuli²⁰.

Selezione del campione per il GWAS quantitativo

Il massimo valore tra i sestanti non edentuli (M-PSR) è stato scelto come tratto quantitativo da utilizzare come variabile dipendente (y) nell'associazione genetica. Criterio di inclusione nel campione di studio è stata la presenza di un numero minimo di denti presenti e valutabili clinicamente ≥ 10 .

Selezione del campione per il GWAS qualitativo

Sulla base dei valori di M-PSR è stata effettuata anche la definizione dei gruppi di "casi" e "controlli". I criteri di inclusione dei controlli prevedevano: età ≥ 35 anni, numero minimo di denti presenti in arcata ≥ 10 e valori di M-PSR uguale a 0, a 1 o a 2. Anche individui con età compresa tra i 18 e i 34 anni sono stati inclusi nel campione di controllo purché il loro valore di M-PSR fosse pari a 0.

I criteri di inclusione dei casi prevedevano: presenza di almeno 2 sestanti valutati e con valori di M-PSR uguale a 3 o 4 e diagnosi clinica di parodontite. È stato, poi, selezionato un sottogruppo di casi in cui la totalità (100%) dei sestanti valutati fosse valore 3 o 4 di PSR

Genotipizzazione e Imputazione

I set di SNPs (SNP-chips) utilizzati per la genotipizzazione del DNA estratto da sangue periferico sono il "370K" e l'"Omniexpress" Illumina chips (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). In aggiunta alle varianti individuate mediante genotipizzazione diretta, sono state prese in considerazione anche tutte le varianti genetiche che risultano in co-segregazione con quelle genotipizzate. È stato, in sostanza, utilizzato un processo di "inferenza genetica" (o imputazione) per includere nell'analisi ulteriori varianti, ricavabili tramite il pannello di riferimento (Phase3-v5) del progetto 1000 Genome²¹ (software Shapeit²² ed Impute²³).

Analisi statistiche e selezione dei geni candidati

I dati di genotipizzazione e imputazione sono stati utilizzati per effettuare due analisi indipendenti di GWAS: un'analisi di GWAS per un fenotipo quantitativo applicando un modello misto di regressione lineare; un'altra per un fenotipo qualitativo applicando una regressione logistica, come previsto per i tratti binari nel caso di analisi caso/controllo.

Entrambe le analisi sono state corrette per la mancanza d'indipendenza tra gli individui, data l'alta consanguineità presente tra loro. Le covariate incluse nel modello di associazione genetica sono state età, sesso, fumo, BMI, denti presenti in arcata e sestanti mancanti. Le analisi di regressione sono state eseguite mediante l'utilizzo del pacchetto di R "Gaston"²⁴.

Tutti gli SNPs con un p-value $\leq 5 \times 10^{-8}$ sono stati considerati statisticamente significativi a livello genomico^{25,26}, le varianti con p-value compresi tra 1×10^{-5} e 5×10^{-8} sono state considerate come "suggestive".

La ricerca di geni candidati è stata eseguita applicando ai risultati dei GWASs tutti i seguenti criteri di selezione delle regioni genomiche: 1) presenza di almeno 3 SNPs con un p-value $\leq 1 \times 10^{-5}$, situati ad una massima distanza tra loro di 100kb, con una frequenza dell'allele minore (Minor Allele Frequency, MAF) $\geq 0,01$; 2) presenza nella regione di più varianti in "linkage disequilibrium" (LD, con $r^2 > 0,4$) tra loro.

Il set di geni, derivato da questa analisi, è stato successivamente utilizzato per effettuare un'analisi di arricchimento funzionale eseguita con il programma ConsensusPathDB²⁷ allo scopo di identificare i processi biologici (pathway) in cui sono coinvolti. Per questa analisi sono stati riportati rispettivamente il p-value (calcolati applicando il test ipergeometrico) e i q-value (p-value corretto per test-multipli ottenuto applicando il metodo del False Discovery Rate). Sono stati considerati significativi solo i risultati con q-value $< 0,05$.

Risultati

La descrizione dei campioni di studio utilizzati per le analisi sono state riportate rispettivamente in Tabella 1 e 2. In particolare, nel campione utilizzato nell'analisi del M-PSR non si osserva nessuna differenza statisticamente significativa tra maschi e femmine, eccetto per la frequenza di fumatori (p-value per il test Chi-quadro: $4,57 \times 10^{-14}$).

Tutte le caratteristiche considerate presentano invece differenze statisticamente significative nei due gruppi dei casi e dei controlli (Tabella 2).

L'analisi di associazione sull'intero genoma per il tratto quantitativo ha consentito di identificare la variante rs17530274 (p-value = $6,54 \times 10^{-8}$), localizzato sul cromosoma 2, a 22 kb a monte del gene LYPD6.

L'analisi di GWAS per il tratto qualitativo ha identificato 2 varianti, rs373596430 (p-value = $3,77 \times 10^{-7}$) localizzata sul cromosoma 12 all'interno della regione intronica del gene CAMKK2 e rs140778295 (p-value = $4,72 \times 10^{-7}$), localizzata nell'introne del gene COL13A1 sul cromosoma 10.

Nessuna variante con p-value significativo a livello dell'intero genoma è stata identificata in queste due analisi.

Le regioni genomiche identificate con SNPs suggestivi, applicando i criteri descritti nella sezione Materiali e Metodi, sono 10 (5 con la GWAS quantitativa, 5 con la GWAS qualitativa, vedi tabella 3, figura 1 e 2).

In 6 dei 10 loci identificati, gli SNPs ricadono direttamente in geni codificanti proteine, DLC1, COL15A1, CNTN5 per l'analisi quantitativa e TMEM178B, APBB1IP, e RGS6 per quella qualitativa. Per le regioni 11q14.3 e 8q21.2 le varianti si trovano, invece, a monte della sequenza dei geni FAT3 e RAYL. Gli SNPs più associati rs653403 (p-value = $1,04 \times 10^{-6}$) e rs76633991 (p-value = $4,9 \times 10^{-6}$) ricadono in long-noncoding-RNA (LOC100507283, DLEU1).

I dieci geni identificati nelle regioni suggestive (vedi Materiali e Metodi) insieme ai 3 identificati dagli SNPs con p-values $< 5 \times 10^{-7}$ sono stati usati in un'analisi volta a determinare se essi appartenessero a pathway funzionali comuni. Tale analisi ha evidenziato la presenza di 2 processi biologici statisticamente significativi (q-value $< 0,05$). La tabella 4 mostra l'appartenenza di 6 geni su 13 al pathway dell'adesione cellulare e di 2 geni su 13 implicati a pathway coinvolti nell'interazione con componenti della Matrice Extracellulare e nel metabolismo e folding del collagene.

Discussione

In questo studio abbiamo condotto due analisi di associazione sull'intero genoma, utilizzando sia un fenotipo quantitativo (M-PSR) che qualitativo (affetti/sani per la malattia parodontale).

Le analisi dei due fenotipi ci hanno consentito di individuare 13 geni il cui ruolo biologico li designa come possibili candidati nel processo di malattia parodontale. Sebbene nessuna delle varianti correlata a ciascun gene raggiunga la significatività statistica, a partire da tali geni è stato possibile individuare dei pathways biologici ad alta significatività.

Il primo pathway riguarda l'"adesione cellulare" e vede coinvolti ben 6 dei 13 geni candidati, ossia COL15A1, FAT3, CNTN5, DLC1, COL13A1, e APBB1IP. Diversi sono gli aspetti che possono collegare tale processo biologico alle funzioni del parodonto come barriera contro la penetrazione del biofilm e come tessuto di

supporto del dente. L'altro pathway biologico statisticamente significativo coinvolge i soli geni COL13A1 e COL15A1 evidenziando la loro funzione nel folding del collagene, nel suo metabolismo e nei rapporti con la matrice extracellulare, la quale riveste un ruolo di supporto delle cellule e di separazione tra i diversi tessuti, ma anche un importante ruolo di regolazione e trasmissione di segnali.

I geni coinvolti nei due processi biologici individuati, anche analizzati singolarmente, esprimono delle caratteristiche funzionali interessanti.

La proteina codificata da DLC1 grazie alla funzione GTPasica, influenza la riorganizzazione citoscheletrica cellulare, determina cambiamenti morfologici delle cellule, influisce sull'adesione, migrazione e proliferazione cellulare.^{27,28,29} Nello studio di Wu J. et al³⁰, gli autori dimostrano un'aumentata espressione di questo gene nelle cellule del legamento parodontale sottoposte a carico meccanico.

FAT3 codifica per una proteina membro della famiglia "correlata alle caderine", famiglia di proteine che comprendono specifici "recettori adesivi" che intervengono nel riconoscimento e adesione cellulare. Gli stessi recettori conferiscono stabilità meccanica ai tessuti e controllano il differenziamento e la proliferazione cellulare, garantendo un accrescimento corretto dei tessuti sia durante lo sviluppo embrionale sia durante i processi di riparazione. Un tipo particolare di caderine, è presente nei desmosomi²⁸.

CNTN5 codifica per una proteina, membro della superfamiglia delle immunoglobuline e della famiglia contactine, che mediano le interazioni della superficie cellulare durante lo sviluppo del sistema nervoso.

Il gene CNTN5 è stato individuato anche in una ricerca di Offenbacher et al²⁹. in un campione di oltre 5000 individui come possibile gene candidato associato ad una maggiore predisposizione alla parodontite, con un p-value di associazione incluso nel range di $10^{-6/-7}$.

APBB1IP codifica per una proteina coinvolta nell'attivazione delle cellule T e nella regolazione positiva dell'adesione cellulare, interagendo con l'integrina $\alpha 2\beta 3$. Sima et al. nel 2016³⁰ includono APBB1IP tra i geni candidati che, nel topo, si rivelano associati alla perdita di tessuto osseo alveolare mediata dall'infiammazione.

Infine, COL13A1 e COL15A1 codificano entrambi per una subunità alfa1 rispettivamente del collagene tipo XIII e XV. Il Collagene tipo XIII è coinvolto sia nell'adesione cellula/matrice extracellulare che cellula/cellula.

Il collagene tipo XV ha un'ampia distribuzione nei tessuti ma è maggiormente espresso a livello della lamina densa della membrana basale³¹. La sua carenza produce fenestrazioni al livello della membrana basale e ne aumenta la permeabilità. Takai et al³² dimostrano che i fibroblasti del legamento parodontale (HPdLF) cimentati con lipopolisaccaride di *Porphyromonas gingivalis*, mostravano una riduzione nell'espressione genica di 25 geni associati alla matrice extracellulare, tra cui COL15A1. L'ipo-regolazione di questo gene viene messa in relazione con una migrazione apicale dell'epitelio cui seguirebbe una progressione della parodontite.

Anche se i geni LYPD6, TMEM178B e CAMKK2 non risultano coinvolti in uno stesso pathway, presentano un denominatore comune, il Calcio (Ca^{2+}) e delle funzioni interessanti, evidenziate dalla letteratura.

La proteina lypd6 è un modulatore positivo del pathway di Wnt/beta-catenine, importante per la stabilizzazione del citoscheletro, e modulatore del recettore nicotinic espresso nel cervello. Un recettore di lypd6 è localizzato anche sulle cellule staminali del legamento parodontale³³. Zhifei Zhou et al³⁴ riportano che l'uso di nicotina andrebbe ad inficiare il differenziamento osteogenico di tali cellule attraverso la regolazione a valle del pathway di Wnt/beta-catenine.

La proteina tmem178 è localizzata, invece, a livello del reticolo endoplasmatico dove sarebbe in grado di regolare i flussi di Ca^{2+} indotti da RANKL. Il suo primo ruolo biologico è stato descritto da Corinne E. et al³⁵. Gli AA parlano di un ruolo chiave svolto nella preservazione della massa scheletrica. Nei topi, la sua ridotta espressione correla con un'eccessiva osteoclastogenesi e una sua dis-regolazione è stata osservata in pazienti affetti da artrite idiopatica giovanile.

La proteina camkk2 interviene nella fosforilazione della chinasi attivata dall'AMP (AMPK) che studi recenti vedono coinvolta nella regolazione delle risposte immuni e infiammatorie³⁶⁻³⁸. In particolare, il lavoro di Qin X. et al ha dimostrato che in modelli murini AMPK può modulare le cellule linfoidi innate e le relative citochine in relazione alla parodontite³⁹. Altri studi ne evidenziano il coinvolgimento nel rimodellamento osseo. Infatti, l'inibizione del gene CAMKK2, infatti, sembra promuovere la crescita del tessuto osseo aumentando la differenziazione in senso osteoblastico e inibendo quella in senso osteoclastico⁴⁰.

Vantaggi e limiti dello studio

Il vantaggio di eseguire questa analisi in un campione di una popolazione isolata, qual è il Cilento^{41,42}, è rappresentato dalla maggiore omogeneità genetica, ambientale e fenotipica. Tali caratteristiche facilitano l'identificazione di fattori genetici implicati nello sviluppo di malattie complesse come la parodontite.

Tra i limiti che ci consentono di spiegare la mancanza di significatività statistica delle varianti genetiche valutate nei GWASs, ricordiamo le dimensioni del campione utilizzato e la definizione del fenotipo. Il fenotipo parodontale di ciascun individuo è stato infatti valutato mediante il PSR, che molti studi hanno dimostrato efficacemente correlato con la gravità della malattia parodontale¹⁸, ma che non ci consente di disporre del dato relativo alla perdita di attacco clinico.

Conclusioni

Il nostro studio di associazione sull'intero genoma permette di aprire un nuovo scenario verso l'individuazione di geni che influiscono sulla suscettibilità ad ammalare di parodontite. I processi biologici, individuati a partire dalle varianti genetiche associate alla parodontite, coinvolgono l'adesione cellula/cellula, l'adesione e stabilizzazione tra cellule e matrice extracellulare e la struttura del collagene. Questi risultati, se confermati in studi di replica, potrebbero fornire un ulteriore tassello per la valutazione della risposta individuale dell'ospite all'attacco della placca batterica e alle modifiche ambientali che si verificano nella patogenesi della parodontite. L'affascinante ipotesi che alterazioni su base genetica dell'adesione a livello del solco gengivale e del connettivo sottostante possano fornire una via di penetrazione preferenziale alla migrazione della placca batterica in profondità nell'ambito dei tessuti parodontali, potrebbe spiegare in parte alcuni aspetti dei diversi fenotipi delle malattie parodontali.

Tabella1: Caratteristiche del campione di studio utilizzato per il GWAS per il M-PSR come fenotipo quantitativo.

Covariate	Totale, n° = 509	Maschi, n° = 305	Femmine, n° = 204
Età, anni (media ± DS)	48,3 ± 17,4	48,3 ± 17,9	48,2 ± 16,7
Fumo, n° (%)			
SI	206 (40,5%)	82 (26,9%)	124 (60,8%)
No	303 (59,5%)	223 (73,1%)	80 (39,2%)
BMI (media ± DS)	26,2 ± 4,8	26,1 ± 5,5	26,3 ± 3,7
Sestanti mancanti, n° (%)			
0	440 (86,4%)	262 (85,9%)	178 (87,3%)
1	44 (8,6%)	24 (7,9%)	20 (9,8%)
2	19(3,7%)	13(4,3%)	6(2,9%)
3	6 (1,2%)	6(2,0%)	0
Denti presenti (media ± DS)	22,4 ± 5,1	22,1 ± 5,3	22,6 ± 4,8

Tabella2: Caratteristiche del campione di studio utilizzato per il GWAS per il tratto qualitativo.

Covariate	Totale, n° = 459	Casi, n° = 264	Controlli, n° = 195	p-value
Sesso, M/F	270/189	141/123	129/66	8,13x10 ⁻³ ***
Età, anni (media ± DS)	55,6 ± 15,2	59,4 ± 14,3	50,5 ± 14,8	4,27x10 ⁻¹⁰ ***
Fumo, n° (%)				
SI	199 (43,4%)	133 (50,4%)	66 (33,8%)	5,86x10 ⁻⁴ ***
No	260 (56,6%)	131 (49,6%)	129 (66,2%)	
BMI (media ± DS)	27,1 ± 4,7	26,5 ± 4,4	27,5 ± 4,9	0,019*
Sestanti mancanti, n° (%)				
0	338 (73,6%)	163 (61,7%)	175 (89,7%)	3,55x10 ⁻¹⁰ ***
1	45 (9,8%)	33 (12,5%)	12 (6,2%)	
2	32(7,0%)	26 (9,8%)	6(3,1%)	
3	29 (6,3%)	27 (10,2%)	2 (1,0%)	
4	15 (3,3%)	15 (5,7%)	NA	
Denti presenti (media ± DS)	19,4 ± 6,7	17,1 ± 7,0	22,5 ± 4,7	<2,2x10 ⁻¹⁰ ***

*=p-value< 0,05; ***= p-value<0,005

Table 3. Geni candidati

Analisi	Chr	Regione genomica	Mb	Gene	Descrizione	TopSNP	MAF	TopSNP pvalue	Localizzazione genica
M-PSR Quantitativa	2	2q23.2	154	LYPD6	Modulatore del recettore nicotino (nAChRs)	rs17530274	4,1 %	6,54x10⁻⁸	22 kb a monte
	8	8p22	13	DLC1	Proteina 7 attivante le Rho-GTPasi	rs150106088	4,5 %	2,45x10 ⁻⁶	Esonica
	9	9q22.33	102	COL15A1	Catena α1 del collagene XV	rs16918163	12,1 %	6,35x10 ⁻⁶	Intronica
	11	11q14.3	92	FAT3	Protocaderina Fat 3	rs200407529	4,3 %	9,27x10 ⁻⁷	320 kb a monte
	11	11q22.1	100	CNTN5	Contattina 5	rs11223128	16,6 %	1,07x10 ⁻⁶	Intronica
	11	11q24.2	125	LOC100507283	Long-noncoding RNA	rs653403	41,8 %	1,04x10 ⁻⁶	Intronica
Caso/controllo Qualitativa	7	7q34	140	TMEM178B	Proteina transmembrana 178B	rs12113136	30,0 %	1,41x10 ⁻⁶	Intronica
	8	8q21.2	84,9	RALYL	Proteina legante l'RNA RALY-Like	rs16912360	2,1 %	5,78x10 ⁻⁶	188 kb a monte
	10	10p12.1	26,8	APBB1IP	Famiglia delle proteine leganti il precursore β-amiloide	rs11015167	1,3 %	8,63x10 ⁻⁶	Intronica
	10	10q22.1	71,6	COL13A1	Catena α1 del collagene XIII	rs140778295	1,13 %	4,72x10⁻⁷	Intronica
	12	12q24.31	121	CAMKK2	Chinasi Ca²⁺/Calmodulina dipendente	rs373596430	32,5 %	3,77x10⁻⁷	Intronica
	13	13q14.3	51	DLEU1	Long-noncoding RNA	rs9596305	8,2 %	4,95x10 ⁻⁶	2 kb a monte
	14	14q24.2	72,5	RGS6	Regolatore del signaling delle proteine G	rs11850350	20,7 %	4,24x10 ⁻⁶	Intronica

Chr: Cromosoma; Mb: posizione in Megabasi; TopSNP: identificativo dello SNP con il p-value più significativo trovato nella regione genomica; TopSNP-pvalue: il p-value di associazione del TopSNP; MAF: frequenza dell'allele minore per il TopSNP; Localizzazione genica: posizione del TopSNP rispetto al gene

Le righe riportate **in grassetto** corrispondono ai geni identificati dagli SNPs che presentano il più basso p-value di associazione per i diversi tratti analizzati.

Tabella 4: Elenco dei pathways derivanti dall'analisi di arricchimento funzionale effettuata con ConsensusPathDB.

Processo biologico	Geni candidati	p-value	q-value	GO ID
Adesione cellulare	COL15A1; APBB1IP; FAT3; COL13A1; CNTN5; DLC1	8,74x10 ⁻⁵	0,0017	GO:0007155
Componenti della Matrice Extracellulare. Metabolismo e folding del collagene	COL15A1; COL13A1	2,34x10 ⁻⁴	0,0012	GO:0030020; GO:0005201 GO:0030574; GO:0032963; GO:0005581;

GO ID: l'identificativo del processo biologico presente in Gene Ontology (<http://geneontology.org/>)

Figura 1. Regional plot relativo alle regioni genomiche candidate identificate mediante l'analisi di GWAS per il tratto quantitativo.

Y: $-\log_{10}$ dei p-values per tutte le varianti ordinate in base alla loro posizione cromosomica (build37) all'interno delle regioni candidate. I pannelli A-E mostrano rispettivamente i loci: 8p22, 9q22.33, 11q14.3, 11q22.1 e 11q24.2

Il colore di ogni variante corrisponde al valore di linkage disequilibrium (r^2) che ciascuna di esse presenta con la variante più associata (rappresentata da un rombo).

La stima del grado di ricombinazione (cM/Mb) è stata generata sulla base della mappa genetica di HapMap Phase II e riportata in grafico come linea blue. Sotto ogni grafico è riportato il nome e la localizzazione dei geni presenti in UCSC Genome Browser.

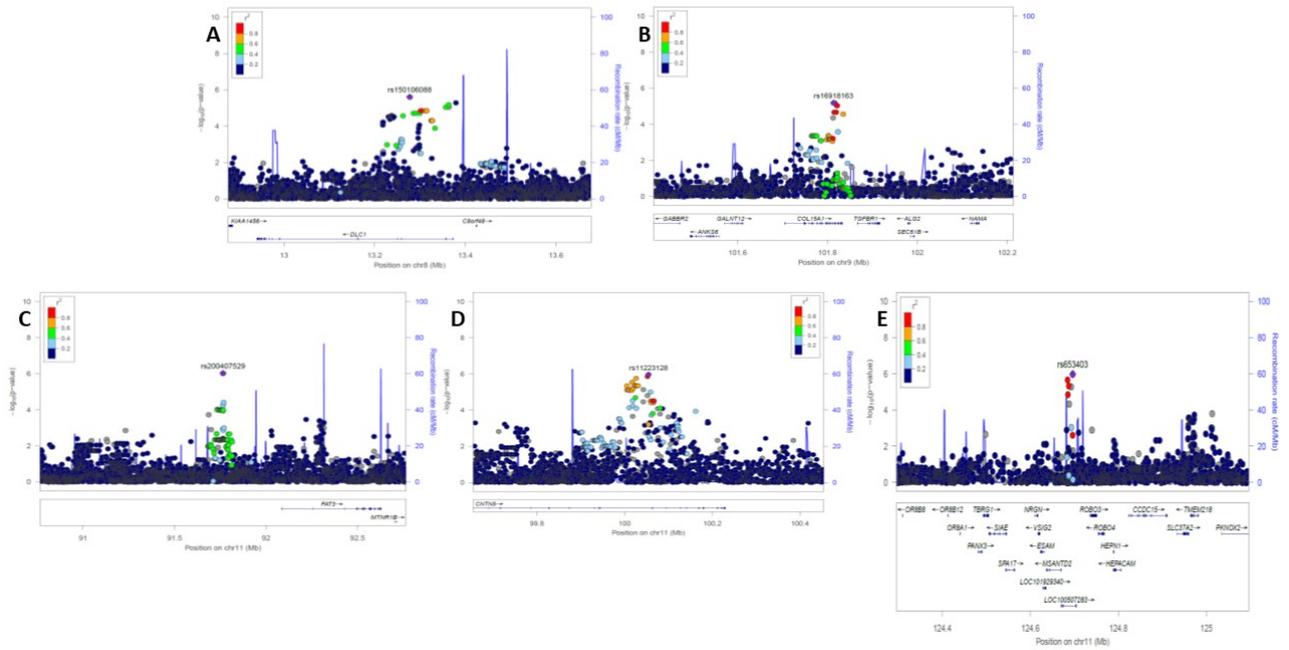
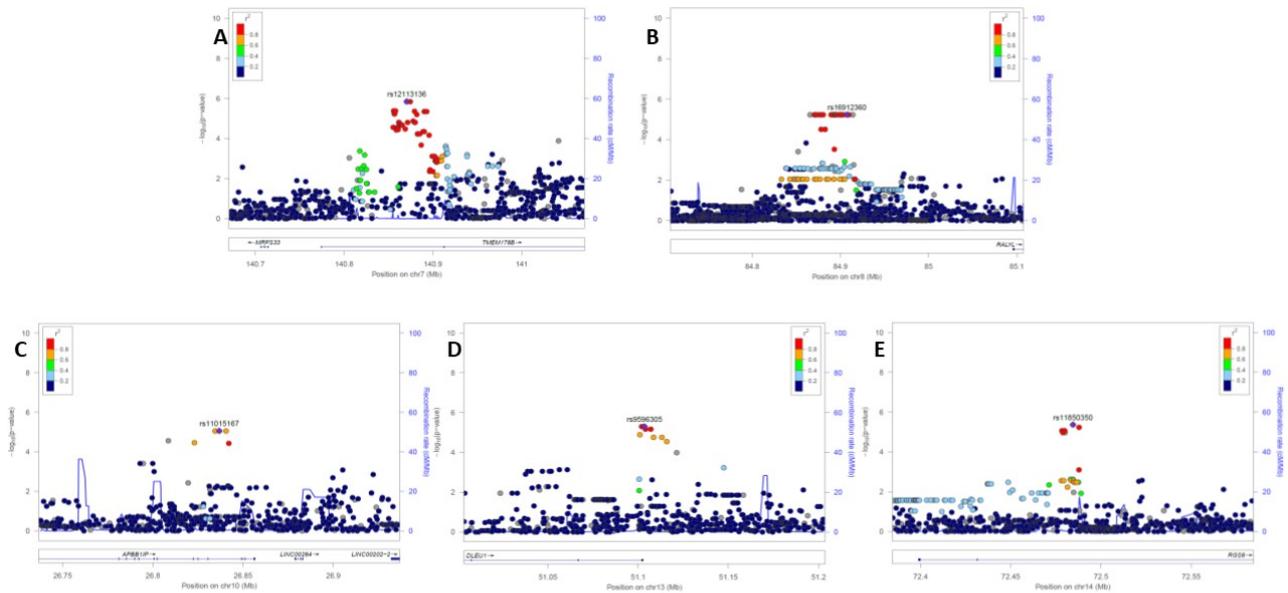


Figura 2. Regional plot relativo alle regioni genomiche candidate identificate mediante l'analisi di GWAS per il tratto qualitativo.

Y: $-\log_{10}$ dei p-values per tutte le varianti ordinate in base alla loro posizione cromosomica (build37) all'interno delle regioni candidate. I pannelli A-E mostrano rispettivamente i loci: 7q34, 8q21.2, 10p12.1, 13q14.3 e 14q24.2

Il colore di ogni variante corrisponde al valore di linkage disequilibrium (r^2) che ciascuna di esse presenta con la variante più associata (rappresentata da un rombo).

La stima del grado di ricombinazione (cM/Mb) è stata generata sulla base della mappa genetica di HapMap Phase II e riportata in grafico come linea blue. Sotto ogni grafico è riportato il nome e la localizzazione dei geni presenti in UCSC Genome Browser.



Bibliografia

1. Meyle, J. & Chapple, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol. 2000* **69**, 7–17 (2015).
2. Loe, H., Anerud, A., Boysen, H. & Morrison, E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J. Clin. Periodontol.* **13**, 431–440 (1986).
3. Michalowicz, B. S. *et al.* Periodontal Findings in Adult Twins. *J. Periodontol.* **62**, 293–299 (1991).
4. Michalowicz, B. S. *et al.* Evidence of a Substantial Genetic Basis for Risk of Adult Periodontitis. *J. Periodontol.* **71**, 1699–1707 (2000).
5. Corey, L. A., Nance, W. E., Hofstede, P. & Schenkein, H. A. Self-Reported Periodontal Disease in a Virginia Twin Population. *J. Periodontol.* **64**, 1205–1208 (1993).
6. Mucci, L. A., Björkman, L., Douglass, C. W. & Pedersen, N. L. Environmental and heritable factors in the etiology of oral diseases--a population-based study of Swedish twins. *J. Dent. Res.* **84**, 800–5 (2005).
7. Zhang, S., Yu, N. & Arce, R. M. Periodontal inflammation: Integrating genes and dysbiosis. *Periodontology 2000* **82**, 129–142 (2020).
8. Schaefer, A. S. *et al.* A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 553–562 (2009).
9. Divaris, K. *et al.* Exploring the genetic basis of chronic periodontitis: A genome-wide association study. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2312–2324 (2013).
10. Teumer, A. *et al.* Genome-wide association study of chronic periodontitis in a general German population. *J. Clin. Periodontol.* **40**, 977–985 (2013).
11. Rhodin, K. *et al.* Chronic periodontitis genome-wide association studies: Gene-centric and gene set enrichment analyses. *J. Dent. Res.* **93**, 882–890 (2014).
12. Shimizu, S. *et al.* A genome-wide association study of periodontitis in a Japanese population. *J. Dent. Res.* **94**, 555–561 (2015).
13. Offenbacher, S. *et al.* Genome-wide association study of biologically informed periodontal complex traits offers novel insights into the genetic basis of periodontal disease. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 2113–2129 (2016).
14. Munz, M. *et al.* A genome-wide association study identifies nucleotide variants at SIGLEC5 and DEFA1A3 as risk loci for periodontitis. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 2577–2588 (2017).
15. Wright, A. F., Carothers, A. D. & Pirastu, M. Population choice in mapping genes for complex diseases. *Nature Genetics* **23**, 397–404 (1999).
16. <http://www.igb.cnr.it/cilento>.
17. Charles, C. J. & Charles, A. H. Periodontal screening and recording. *J. Calif. Dent. Assoc.* **22**, 43–46 (1994).
18. Beltrán-Aguilar, E. D., Eke, P. I., Thornton-Evans, G. & Petersen, P. E. Recording and surveillance systems for periodontal diseases. *Periodontol. 2000* **60**, 40–53 (2012).
19. Hunter, F. Periodontal probes and probing. *Int. Dent. J.* **44**, 577–83 (1994).
20. Ambadi, S. & Pudukulangara, A. Accuracy of Periodontal Screening and Recording as a Screening Tool for Assessing Periodontal Status Journal of Health Sciences & Research. **6**, 33–36
21. Sudmant, P. H. *et al.* An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature* **526**, 75–81 (2015).
22. Delaneau, O., Marchini, J. & Zagury, J. F. A linear complexity phasing method for thousands of genomes. *Nat. Methods* **9**, 179–181 (2012).
23. Howie, B. N., Donnelly, P. & Marchini, J. A Flexible and Accurate Genotype Imputation Method for the Next Generation of Genome-Wide Association Studies. *PLoS Genet.* **5**, e1000529 (2009).
24. Lorenzo Bermejo, J., Marcella Devoto, H. & Christine Fischer, R. Hum Hered 2017-18. **83**, 1–29 (2018).
25. Belmont, J. W. *et al.* A haplotype map of the human genome. *Nature* **437**, 1299–1320 (2005).
26. Pe'er, I., Yelensky, R., Altshuler, D. & Daly, M. J. Estimation of the multiple testing burden for

- genomewide association studies of nearly all common variants. *Genet. Epidemiol.* **32**, 381–385 (2008).
27. Kamburov, A., Stelzl, U., Lehrach, H. & Herwig, R. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res.* **41**, D793–D800 (2013).
 28. Yagi, T. & Takeichi, M. Cadherin superfamily genes: Functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes and Development* **14**, 1169–1180 (2000).
 29. Offenbacher, Steven; Moss, Kevin L; Barros, Silavana; Monda, K; North, K; Beck, J. Candidate Susceptibility Genes For Severe Periodontitis. in *Candidate Susceptibility Genes For Severe Periodontitis* (2011).
 30. Sima, C. *et al.* Identification of quantitative trait loci influencing inflammation-mediated alveolar bone loss: Insights into polygenic inheritance of host-biofilm disequilibria in periodontitis. *J. Periodontal Res.* **51**, 237–249 (2016).
 31. Ramchandran, R. *et al.* Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: Comparison to endostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 735–739 (1999).
 32. Takai, R. *et al.* DNA hypermethylation of extracellular matrix-related genes in human periodontal fibroblasts induced by stimulation for a prolonged period with lipopolysaccharide derived from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal Res.* **51**, 508–517 (2016).
 33. Wang, X. J. *et al.* Functional expression of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in human periodontal ligament fibroblasts and rat periodontal tissues. *Cell Tissue Res.* **340**, 347–355 (2010).
 34. Zhou, Z. *et al.* Nicotine deteriorates the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor regulating wnt pathway. *PLoS One* **8**, (2013).
 35. Decker, C. E. *et al.* Tmem178 acts in a novel negative feedback loop targeting NFATc1 to regulate bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 15654–15659 (2015).
 36. Mangalam, A. K. *et al.* AMP-Activated Protein Kinase Suppresses Autoimmune Central Nervous System Disease by Regulating M1-Type Macrophage–Th17 Axis. *J. Immunol.* **197**, 747–760 (2016).
 37. O’Neill, L. A. J. & Grahame Hardie, D. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* **493**, 346–355 (2013).
 38. Honnappa, C. G. & Kesavan, U. M. A concise review on advances in development of small molecule anti-inflammatory therapeutics emphasising AMPK: An emerging target. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **29**, 562–571 (2016).
 39. Qin, X. *et al.* Increased innate lymphoid cells in periodontal tissue of the murine model of periodontitis: The role of AMP-activated protein kinase and relevance for the human condition. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
 40. Cary, R. L. *et al.* Inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 stimulates osteoblast formation and inhibits osteoclast differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **28**, 1599–1610 (2013).
 41. Colonna, V. *et al.* Campora: A young genetic isolate in South Italy. *Hum. Hered.* **64**, 123–135 (2007).
 42. Colonna, V. *et al.* Comparing population structure as inferred from genealogical versus genetic information. *Eur. J. Hum. Genet.* **17**, 1635–1641 (2009).