

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

TESI DI LAUREA

ANALISI DI LINKAGE IN FAMIGLIE ITALIANE
PER IL CARATTERE DENSITA' MINERALE OSSEA:
SCANSIONE DEL CROMOSOMA 20

Relatore:
Ch.ma Prof.ssa MARIA LUISA MOSTACCIUOLO
Dipartimento di Biologia,
Università di Padova

Correlatore: Dott.ssa ANTONELLA SANGALLI
Dipartimento Materno Infantile e di Biologia e Genetica
Sezione di Biologia e Genetica,
Università di Verona

Laureanda:
BARBARA BORSATO

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

Indice

RIASSUNTO.....	5
1 INTRODUZIONE.....	7
1.1 L'osteoporosi	7
1.2 Diagnosi di osteoporosi	8
1.3 Fattori di rischio	9
1.4 Genetica dell'osteoporosi	10
1.5 Metodi di studio nella genetica dell'osteoporosi	12
1.6 Scopo della tesi	16
2 MATERIALI E METODI	17
2.1 Reclutamento dei soggetti da analizzare	17
2.2 Estrazione e quantificazione del DNA	18
2.3 Genotipizzazione	18
2.4 Scelta dei marcatori	18
2.5 Controllo degli amplificati	23
2.6 Elettroforesi sul sequenziatore ABI PRISM 377	23
2.6.1 Gel di poliacrilamide	24
2.6.2 Preparazione dei campioni da caricare su ABI PRISM 377	25
2.7 Riassegnazione delle dimensioni alleliche	26
2.8 Analisi statistica	26
3 RISULTATI	29
3.1 Descrizione del campione	29
3.2 Genotipizzazione	30
3.3 Eliminazione dell'artefatto +A.....	31
3.4 Riassegnazione delle dimensioni alleliche.....	32
3.5 Analisi di linkage non parametrica qualitativa	32
4 DISCUSSIONE	35
BIBLIOGRAFIA.....	39
RINGRAZIAMENTI.....	47

RIASSUNTO

L'osteoporosi è una malattia multifattoriale caratterizzata dalla progressiva perdita di tessuto osseo, che genera fragilità dello scheletro e predisposizione alle fratture. Studi su gemelli e su nuclei familiari hanno dimostrato che i fattori genetici giocano un ruolo importante nella regolazione della densità minerale ossea (BMD), uno dei principali caratteri indicatori di osteoporosi.

In questo lavoro di tesi è stata effettuata un'analisi di linkage in famiglie italiane per il carattere densità minerale ossea, misurata in diversi siti. I campioni di DNA relativi a 567 soggetti provenienti da 118 famiglie sono stati genotipizzati mediante 12 microsatelliti altamente polimorfici distribuiti lungo tutto il cromosoma 20.

Le famiglie sono state selezionate per la presenza di un probando osteoporotico-osteopenico come da definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità.

Il cromosoma 20 è stato preso in considerazione poiché un precedente lavoro di "scansione" su tutto il genoma eseguito su una popolazione islandese aveva evidenziato un risultato altamente significativo in 20p12.

L'analisi di linkage non parametrica qualitativa nel nostro campione di famiglie non ha permesso di confermare il linkage con la regione 20p12, ma ha dato un segnale indicativo di linkage per il marcatore D20S100 nella regione 20q13.3 (LOD = 1.48, p-value = 5×10^{-3}) a livello dell'anca. Poiché i valori di LOD score da noi osservati non superano comunque il livello accettato per un linkage significativo (LOD score > 3) saranno necessari degli approfondimenti mediante ulteriori studi.

1 INTRODUZIONE

1.1 L'osteoporosi

L'osteoporosi è una patologia multifattoriale caratterizzata da una generale riduzione della densità minerale ossea (BMD), dal progressivo deterioramento del tessuto osseo che diviene più fragile e più esposto al rischio di fratture (Stewart *et al.*, 2000).

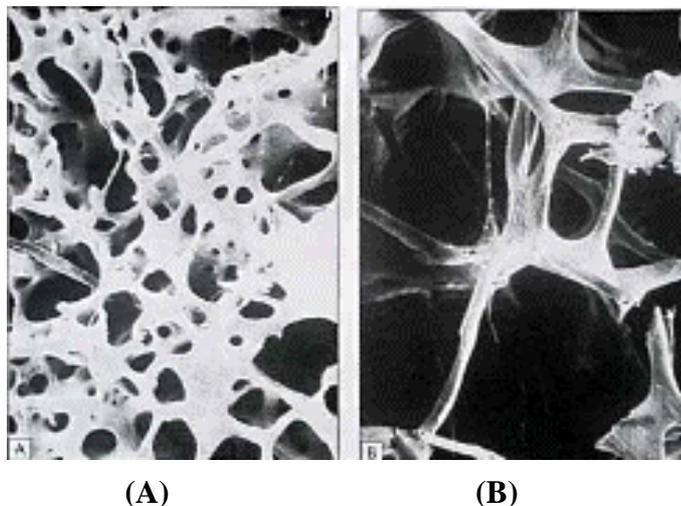


Fig. 1: confronto tra osso normale (A) e osso osteoporotico (B) (immagine tratta da www.parathyroid.com/osteoporosis.htm).

Il tessuto osseo non è inerte, ma subisce un continuo rimodellamento per l'azione degli osteoblasti e degli osteoclasti, le cellule deputate a formare nuovo osso e a riassorbire quello esistente. In particolare la massa ossea aumenta rapidamente durante l'infanzia e l'adolescenza, con un picco massimo intorno ai 30 anni. La comparsa dell'osteoporosi è legata a uno squilibrio di questo processo, con prevalenza dei fenomeni di riassorbimento osseo rispetto alla formazione di nuovo osso.

La fisiologica ed inevitabile riduzione della massa ossea dovuta all'avanzamento dell'età viene definita osteopenia; quando il processo di demineralizzazione diviene particolarmente intenso e prolungato, si parla di osteoporosi. La perdita d'osso legata all'invecchiamento (osteoporosi primaria senile), che si svolge in un arco di tempo di circa 40 anni, è quindi sufficiente a portare una quota di uomini e di donne di tutti i gruppi etnici in una situazione di particolare fragilità ossea che li predispone a fratture anche per eventi traumatici minimi (Horsman *et al.*, 1985).

Le più comuni conseguenze cliniche dell'osteoporosi sono fratture all'anca, alla colonna e ai polsi (Sexson *et al.*, 1988).

Nelle donne, l'osteoporosi post-menopausale è dovuta a fattori ormonali quali la riduzione del tasso plasmatico degli estrogeni, l'incremento dei processi di riassorbimento osseo, la ridotta stimolazione della secrezione endogena di calcitonina, un ormone che favorisce i processi di sintesi dell'osso. Vanno infine ricordate altre patologie che, influenzando in senso negativo il metabolismo del calcio, risultano causa di osteoporosi (osteoporosi secondaria): l'insufficienza renale, le sindromi da malassorbimento, le patologie cardio-vascolari (McFarlane *et al.*, 2004), i tumori (Cauley *et al.*, 1996) e il diabete mellito (Hanley *et al.*, 2003).

L'osteoporosi e le fratture ad essa correlate rappresentano uno dei maggiori problemi di salute pubblica, e assumeranno un'importanza sempre maggiore dato l'aumento dell'aspettativa di vita e dell'età della popolazione (Ferrari and Rizzoli, 2005).

1.2 Diagnosi di osteoporosi

Oggi sono disponibili molte tecniche in grado di misurare la densità minerale ossea, ma attualmente quella più utilizzata è la DEXA (*Dual Energy Xray Absorptiometry*).

Questa metodica sfrutta i raggi X emessi da un tubo radiogeno, consentendo misurazioni accurate e riproducibili in tempi brevi (5-10 minuti) e riducendo l'esposizione alle radiazioni. DEXA è attualmente a livello mondiale il *gold-standard* nella diagnosi dell'osteoporosi (Roux *et al.*, 2004). La densità ossea, misurata con le apparecchiature DEXA, è oggi l'unico parametro osseo proporzionale e misurabile alla resistenza meccanica dell'osso. Mentre l'osteoporosi è una patologia sistemica che colpisce l'intero scheletro, la correlazione delle misurazioni di densità minerale ossea ai diversi siti, è invece modesta. Solitamente la diagnosi di osteoporosi viene effettuata con misurazioni della colonna lombare e del collo del femore (Ralston, 2005).

Come molti fenomeni biologici, l'andamento della massa ossea nella popolazione è una variabile continua e segue una distribuzione gaussiana.

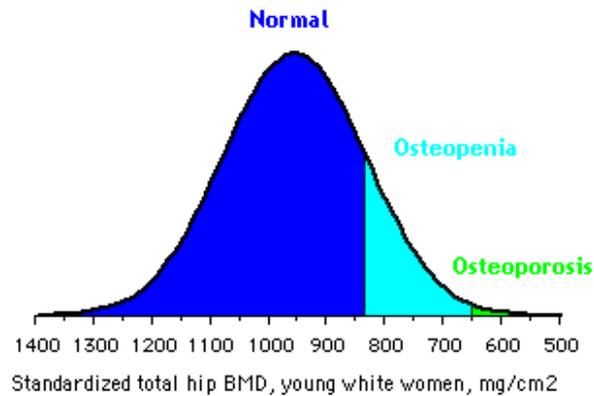


Fig. 2: Valori di BMD (mg/cm²) calcolata per giovani donne caucasiche (immagine tratta da <http://courses.washington.edu/bonephys/Gallery/NormBMD.gif>).

Lo scostamento dal valore medio della popolazione di riferimento viene espressa come Deviazione Standard (DS). Il numero di DS dalla media, per ogni soggetto considerato, si indica sia in funzione del picco di massa ossea teorico di un giovane adulto di circa 30 anni (T-score) sia in funzione dei valori medi per un collettivo della stessa età e sesso (Z-score). Un individuo viene definito osteoporotico se i valori di BMD misurati a livello della colonna e dell'anca risultano essere minori di -2.5 DS rispetto al valore medio dell'adulto (T-score < -2.5); per valori di T score compresi tra -1 e -2.5 l'individuo è osteopenico, e infine valori di T-score superiori a -1 indicano una normale massa ossea.

Ogni diagnosi di osteoporosi deve essere inoltre accompagnata da un esame clinico, da un certo numero di esami di laboratorio ed eventualmente di radiologia, indispensabili per la diagnosi differenziale e per stabilire la terapia.

Da alcuni anni sono disponibili delle indagini che indicano il grado di rimodellamento osseo, dunque la velocità con cui l'osso perde la sua sostanza. Questi parametri si dosano nel sangue e nelle urine, alcuni riflettono la neoformazione ossea (osteocalcina e fosfatasi specifiche dell'osso), mentre altri il catabolismo osseo (piridinoline, idrossipiridinoline e prodotti di degradazione del collagene di tipo I) (Garnero and Delmas, 1998).

1.3 Fattori di rischio

Il sesso, il gruppo etnico di appartenenza, i caratteri costituzionali di un individuo, le variazioni di complessi sistemi endocrini in relazione a fenomeni come la

menopausa e l'invecchiamento, interagendo con cause ambientali, possono determinare lo sviluppo di una condizione di osteoporosi (Peacock *et al.*, 2002).

La predisposizione del sesso femminile all'osteoporosi dipende innanzitutto dal fatto che le donne possiedono una massa ossea minore rispetto agli uomini e, secondariamente, dal fatto che la carenza di ormoni sessuali (estrogeni), che inizia con la menopausa, determina nelle donne una perdita di massa ossea più precoce e più rapida rispetto agli uomini. Si calcola che siano affette da osteoporosi il 15% delle donne caucasiche di 50 anni ed il 50% di quelle di 80 anni (Jones *et al.*, 1994).

Una storia familiare positiva (genitori o ascendenti affetti da osteoporosi, o che hanno avuto durante la vita fratture multiple) sembra poter indicare la predisposizione allo sviluppo di tale malattia, sia per caratteri costituzionali che per abitudini di vita. Probabilmente il metodo più facile per poter valutare l'ereditarietà di questi caratteri deriva da studi su gemelli. I gemelli monozigotici hanno il 100% degli alleli in comune, mentre i gemelli dizigotici ne possiedono il 50% in comune. I caratteri geneticamente determinati dovrebbero quindi mostrare una concordanza maggiore nei gemelli monozigotici rispetto ai dizigotici. Nel 1987, utilizzando questo approccio, venne dimostrato che la densità minerale ossea, calcolata a livello femorale e vertebrale, è più simile nei gemelli monozigotici che in quelli dizigotici, con una concordanza dell'80% nel primo caso e del 52% nel secondo caso (Pocock NA *et al.*, 1987).

Studi più recenti condotti su gemelli e nuclei familiari (Hunter *et al.*, 2001; Sowers *et al.*, 1992; Gueguen *et al.*, 1995) hanno ulteriormente dimostrato che i fattori genetici giocano un ruolo importante nella regolazione della BMD, con un'ereditabilità stimata superiore all'84%.

Un regime dietetico povero di calcio, di latte e dei suoi derivati, favorisce una progressiva riduzione della densità ossea.

Il fumo ha un effetto negativo sull'osso e sembra possa determinare l'insorgenza anticipata della menopausa. L'eccessivo consumo di alcolici, infine, causa malnutrizione ed è lesivo per l'osso poiché ha effetti controproducenti sul metabolismo del calcio e delle proteine, ed ha effetti tossici sugli osteoblasti. (Christodoulou and Cooper, 2003).

1.4 Genetica dell'osteoporosi

La riduzione della densità minerale ossea, che è il maggior fattore di rischio per le fratture osteoporotiche (Marshall *et al.*, 1996), è fortemente controllata da fattori genetici. L'identificazione e la caratterizzazione di specifici loci o geni coinvolti

nella malattia e nei fenotipi associati contribuiscono non solo alla migliore comprensione della patogenesi dell'osteoporosi, ma anche allo sviluppo di una approfondita diagnosi, prevenzione e trattamento. Dal punto di vista genetico l'osteoporosi è considerata una malattia multifattoriale dovuta all'interazione di fattori genetici e ambientali. Questa malattia non mostra un'ereditarietà di tipo mendeliano ma risulta dagli effetti di una serie di geni ciascuno dei quali dà un piccolo contributo all'espressione del fenotipo (Guéguen *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2006). La determinazione dei meccanismi con i quali i fattori genetici influenzano la densità, la qualità e la geometria dell'osso, rappresenta un grande obiettivo. Esistono diverse interazioni gene-gene o gene-ambiente che determinano il fenotipo scheletrico e il rischio osteoporotico di ciascun individuo. Queste interazioni cambiano durante le diverse fasi di sviluppo dell'osso lungo il corso della vita ed è anche per questo che sono difficili da verificare con le tecniche di mappaggio genetico attualmente disponibili (Hobson and Ralston, 2001).

La componente genetica della variabilità della densità ossea è stata stimata essere il 70%-80%, mentre solo il 20-30% della variabilità di BMD si stima sia dovuta a cause ambientali (Eriksen, 2001). Poiché numerosi geni possono giocare un ruolo nel metabolismo osseo è verosimile che alcune varianti polimorfiche in questi geni siano associate a bassa densità minerale ossea (BMD) e quindi siano predisponenti al rischio di fratture. Tuttavia, anche se lo stesso rischio di fratture è un fenotipo fortemente ereditario, esso è indipendente dalla BMD ed è legato ad altri fattori genetici (Gluer *et al.*, 1994; Cummings *et al.*, 1995; Peacock *et al.*, 1994; Faulkner *et al.*, 1995; Karlsson *et al.*, 1996).

L'identificazione di geni che contribuiscono allo sviluppo della malattia ha potenzialmente importanti implicazioni scientifiche e terapeutiche. Nello studio dell'osteoporosi, come per altre malattie complesse, sono stati sviluppati diversi approcci per cercare di identificare i geni coinvolti nella variazione di BMD: studi di associazione, analisi di linkage su tutto il genoma (*genome-wide scan*) e per specifici geni candidati. Quello che emerge da tali indagini è la conferma del contributo genico nonostante si confermi il ruolo chiave dei fattori ambientali come la dieta e l'esercizio fisico. Tuttavia, è improbabile che ci sia un piccolo gruppo di geni con una grossa influenza sulla BMD. Le componenti genetiche dell'osteoporosi sono determinate più probabilmente da un insieme di molteplici geni con piccoli effetti individuali, ognuno dei quali verosimilmente responsabile per meno del 5% della varianza genetica nella popolazione in generale (Guéguen *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2006).

1.5 Metodi di studio nella genetica dell'osteoporosi

- Approccio del *genome-wide scan*

Attraverso questo metodo, l'intero genoma viene analizzato utilizzando pannelli di marcatori molecolari distribuiti sull'intero genoma. Se determinati alleli, ad un particolare locus, segregano con la malattia, è possibile dedurre che il gene responsabile della malattia è vicino o in linkage con il marcatore in esame. Ogni regione identificata mediante *genome-wide scanning* viene in genere analizzata inizialmente con circa 300 marcatori distanziati di 10 cM l'uno dall'altro. Tale regione deve poi essere progressivamente ristretta, fino alla identificazione del gene candidato. Questo approccio richiede che i marcatori siano altamente polimorfici. Genotipizzazioni con SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) richiedono infatti una maggiore densità di mappaggio rispetto ai marcatori STR (*Short Tandem Repeats*), in quanto risultano essere meno polimorfici rispetto a questi ultimi. L'approccio di "scansione" del genoma non solo guida la ricerca dei geni candidati accordando priorità ai geni che sono localizzati all'interno di regioni di linkage, ma permette anche di identificare nuove regioni cromosomiche all'interno delle quali non sono stati ancora riconosciuti geni candidati. Attraverso tale approccio sono stati identificati numerosi loci per caratteri quantitativi (QTL) relativi alla BMD. In particolare, in uno studio di "scansione" su tutto il genoma effettuato su 207 famiglie islandesi (1323 individui), è stato evidenziato un linkage (LOD score = 4.9) tra un microsatellite (D20S905) localizzato in 20p12 e il fenotipo bassa densità ossea combinato alle fratture osteoporotiche sia all'anca, sia alla spina dorsale. A questo punto la regione è stata ristretta aggiungendo 30 ulteriori marcatori e il LOD score è aumentato fino a 5.10 per un marcatore posizionato a 20.35 cM (D20S194) sul cromosoma 20 nei soggetti con un fenotipo più grave. La regione di 6.6 cM attorno al picco di LOD score conteneva sei geni conosciuti, dei quali BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2) era un forte candidato per lo studio, in quanto implicato nella formazione dell'osso e nella differenziazione degli osteoblasti. Gli autori hanno quindi eseguito uno studio di associazione caso-controllo utilizzando 41 microsatelliti e 119 SNPs che mappavano nella stessa regione. L'analisi di associazione ha indicato che il gene BMP2 era legato in modo significativo al rischio osteoporotico. Queste conclusioni indicano che la regione 20p12 è la maggior candidata nella popolazione islandese a contenere il gene, o i geni, che contribuiscono al rischio osteoporotico, e che il gene BMP2 è, in conclusione, uno di questi geni (Styrkarsdottir *et al.*, 2003). Il linkage con la regione 20p12 è stato confermato da

uno studio successivo eseguito su 1816 soggetti caucasici provenienti da 79 famiglie, anche se risultati migliori sono stati in questo caso ottenuti per le regioni 11q23 e Xq27 (Shen *et al.*, 2004). In un recente studio condotto su due famiglie maltesi con un'alta penetranza per l'osteoporosi, è stata eseguita un'analisi di linkage sull'intero genoma con 400 microsatelliti, la quale ha dato dei valori di LOD score significativi per 11p12 (Vidal *et al.*, 2007). Approcci di linkage effettuati sull'intero genoma hanno permesso di identificare altre regioni cromosomiche correlate alla BMD. Alcuni di questi risultati sono stati confermati da studi indipendenti (Koller *et al.*, 2000; Karasik *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2003; Econs *et al.*, 2004). Anche se l'analisi di linkage rispetto all'associazione ha un minore potere statistico, a suo vantaggio possiamo dire che il linkage verifica il coinvolgimento di una regione cromosomica nella determinazione del fenotipo in esame senza fare assunzioni a priori su un gene candidato e non assume l'associazione con un particolare allele di un polimorfismo, ma testa se i parenti, che sono geneticamente simili, lo sono anche da un punto di vista fenotipico.

- Approccio gene candidato

I singoli geni possono essere saggiati direttamente per il loro ruolo nella determinazione di un carattere di interesse. Nel caso dell'osteoporosi i geni candidati sono scelti tra quelli coinvolti nel rimodellamento dell'osso, come regolatori del metabolismo osseo e ormoni steroidei.

Lo svantaggio di questo approccio è che, nel caso dell'osteoporosi, si suppone che esistano molti geni coinvolti nella determinazione del fenotipo (Sowers *et al.*; 1992; Gueguen *et al.*, 1995). L'effetto singolo di ciascuno di questi geni su BMD è verosimilmente basso ed è responsabile solo di una piccola proporzione di varianza di BMD. Studi caso-controllo hanno comunque permesso di identificare polimorfismi in diversi geni candidati che sono associati ad una bassa BMD e quindi ad un aumentato rischio di fratture ossee, come proteine strutturali dell'osso (catena $\alpha 1$ del collagene di tipo I), recettori ormonali (recettore degli estrogeni, recettore della vitamina D (Brown *et al.*, 2001; Braga *et al.*, 2002).

L'**analisi di linkage** consiste nel seguire nei diversi individui delle famiglie in esame la cosegregazione della malattia con uno o più marcatori molecolari, sfruttando il principio secondo cui due loci (ad esempio un marcatore e il gene malattia), se sufficientemente vicini nella stessa regione cromosomica, tendono ad essere trasmessi assieme nella progenie e a non essere separati durante la

ricombinazione. Il linkage con un locus può essere testato marcatore per marcatore (*two point analysis*) o attraverso una serie di marcatori (*multipoint analysis*). Il linkage viene valutato in base ai valori di LOD score (Z), ovvero del logaritmo in base 10 del rapporto tra la probabilità che due loci siano associati con frequenza di ricombinazione θ e la probabilità che due loci non siano associati. Valori di LOD score >3 indicano un'evidenza statisticamente significativa di associazione, valori <-2 indicano assenza di linkage e valori compresi tra -2 e $+3$ non permettono di trarre alcuna conclusione statisticamente significativa.

I marcatori attualmente più utilizzati nell'analisi di linkage sono i cosiddetti microsatelliti (STR), ovvero sequenze di DNA costituite da gruppi di 1-6 nucleotidi ripetuti in tandem da 10 a 50 volte, altamente polimorfici.

L'analisi di linkage si avvale sia di metodi parametrici, che non parametrici. I metodi parametrici sono più potenti ma necessitano di parametri che spesso non sono disponibili per le malattie complesse (frequenza del gene malattia, penetranza, classe di rischio, ecc.). Un errore nella specificazione di una o più di queste variabili può portare a falsi positivi o falsi negativi.

L'analisi non parametrica viene generalmente utilizzata nello studio dei caratteri complessi, dove non si devono considerare i parametri applicati all'analisi dei caratteri mendeliani classici (modello di eredità, frequenze alleliche nella popolazione, penetranza dei vari genotipi). La valutazione dell'ipotesi linkage/non linkage viene fatta mediante il calcolo del LOD score. Nell'analisi non parametrica viene considerato indicativo di linkage un valore di LOD score con $p \geq 0.05$ e altamente significativo un LOD score con $p = 0.01$ (Ott J, 1999).

Il metodo non parametrico più comunemente utilizzato consiste nell'analisi di famiglie con due fratelli affetti (*affected sib-pairs analysis*, ASP): avendo a disposizione i genitori, possiamo stabilire per ogni marcatore se i due fratelli hanno ereditato da un genitore lo stesso allele, oppure alleli diversi. Se i due fratelli hanno ereditato lo stesso allele, si dirà che esso è identico per discendenza (*identical by descent*, IBD) in quanto è ereditato dallo stesso genitore. Se i genitori non fossero disponibili, potremmo parlare solo di alleli identici per stato (*identical by state*, IBS). In assenza di linkage tra il presunto locus di suscettibilità e il locus marcatore, la probabilità che le coppie di fratelli condividano 2, 1 o 0 aplotipi è rispettivamente del 25%, 50% e 25%. Le coppie di fratelli affetti condivideranno la regione IBD con una probabilità maggiore rispetto a quanto atteso in una trasmissione indipendente.

Attraverso l'analisi di linkage si riesce quindi a identificare una regione cromosomica coinvolta nella determinazione del fenotipo di interesse;

successivamente è possibile individuare l'eventuale presenza di geni candidati all'interno di tale regione ed effettuare su di essi uno studio di associazione.

L'**associazione** testa se un particolare allele è coinvolto nella determinazione del fenotipo in esame .

Le associazioni tra fenotipo e marcatore si trovano confrontando le frequenze di un particolare allele marcatore in una serie di casi e in una serie di controlli sani (studi caso-controllo). Questo tipo di approccio può produrre dei risultati contrastanti nelle diverse popolazioni a causa della presenza di differenti alleli polimorfici in *Linkage Disequilibrium* con la mutazione causale. I risultati ottenuti dagli studi di associazione, se svolti su popolazioni diverse, possono quindi non essere in grado di confermare i fattori genetici.

La scelta del gruppo di controllo è inoltre cruciale, in quanto esiste il rischio di scegliere i componenti dei due gruppi in esame a partire da sotto-popolazioni geneticamente differenti.

Il test di trasmissione del disequilibrio (TDT) (Spielman RS *et al.*, 1993) è un particolare tipo di studio di associazione, che permette di esaminare la frequenza con la quale gli individui ereditano degli alleli che potrebbero essere la causa di patologie, a partire da genitori eterozigoti. Nell'analisi del TDT l'allele trasmesso viene considerato come caso, mentre l'allele non trasmesso agisce da controllo. Questo metodo rende il test del TDT immune da errori di stratificazione della popolazione, ma può essere utilizzato solo in presenza di genitori eterozigoti.

Finora sono stati effettuati numerosi studi di associazione e di linkage che si focalizzavano su geni funzionali candidati, codificanti per proteine strutturali dell'osso (catena $\alpha 1$ del collagene di tipo I, osteocalcina), paratormone, recettori ormonali (recettore degli estrogeni, recettore della vitamina D e recettore 1 del paratormone) e citochine (interleuchina 6, transforming growth factor β -1) coinvolte nel metabolismo osseo (Liu *et al.*, 2002).

1.6 Scopo della tesi

In questo lavoro di tesi è stata eseguita una analisi di linkage sul cromosoma 20 mediante 12 marcatori microsatelliti, utilizzando un campione di 118 famiglie italiane (per un totale di 567 soggetti) che presentavano bassa densità minerale ossea, misurata a livello dell'anca, della colonna vertebrale e del collo femorale.

Questo particolare cromosoma è stato scelto basandosi su un lavoro di "scansione" dell'intero genoma effettuato su 207 famiglie islandesi (1323 individui), nel quale si metteva in evidenza un linkage altamente significativo (LOD score = 5.1) tra il microsatellite D20S194 localizzato in 20p12 e il fenotipo bassa densità ossea combinato alle fratture osteoporotiche sia all'anca, sia alla spina dorsale.

Scopo del lavoro è pertanto quello di verificare se anche nel nostro campione sia presente un linkage significativo mediante una analisi non parametrica.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Reclutamento dei soggetti da analizzare

In questo lavoro di tesi sono riportati i dati relativi alla genotipizzazione di 567 soggetti facenti parte di 118 famiglie (60 nucleari, madre-padre-figli e 58 multiple), reclutati a partire da un probando osteopenico/osteoporotico provenienti dalla Divisione Riabilitazione Osteoarticolare dell'Ospedale di Vareggio sul Minicio (tab. 2.1).

	Colonna vertebrale (N° individui)	Collo del femore (N° individui)	Anca (N° individui)
Sani (T-score > -1.0)	132	116	188
Osteopenici (T-score tra -1.0 e -2.5)	220	243	272
Osteoporotici (T-score ≤ -2.5)	215	206	105

Tab. 2.1: Classificazione degli individui in osteoporotici ed osteopenici (secondo i criteri del WHO) utilizzando valori di BMD misurata a livello della colonna e del femore.

Tutti i soggetti hanno dato consenso informato per lo studio. Le informazioni relative a data di nascita, menopausa, numero di gravidanze, allattamento, fratture, esercizio fisico, fumo, assunzione di alcol, estrogeni e calcio sono state ottenute mediante la valutazione di un questionario compilato dai pazienti. Il comitato etico locale ha fornito la relativa approvazione.

Peso e altezza sono stati misurati durante una visita iniziale, usando uno stadiometro e una bilancia calibrata.

Sono stati assunti come criteri di esclusione dallo studio:

- Storia positiva di malattie endocrinologiche o metaboliche che colpiscono la massa ossea (iperparatiroidismo primario, ipertiroidismo, diabete, anoressia, artrite reumatoide);
- Trattamenti con ormoni tiroidei, farmaci citostatici, difosfonati, estrogeni, calcitonina o corticosteroidi;
- Apporto di calcio minore di 500 mg/giorno.

Misure della densità minerale ossea sono state effettuate a due siti femorali (collo femorale e anca) e alla porzione lombare della colonna vertebrale (L2-L4),

utilizzando la tecnica *dual-energy X-ray absorptiometry* (DEXA) mediante lo strumento Hologic DQR 2000 (4500) (Hologic Inc. Waltham, MA U.S.A.). Tutti i dati clinici dei soggetti reclutati sono stati raccolti in una banca dati messa a punto dal Dott. G. Malerba e dal Dott. L. Xumerle della Sezione di Biologia e Genetica dell'Università di Verona. Tale banca può essere costantemente integrata con i dati genetici ottenuti per i diversi marcatori.

2.2 Estrazione e quantificazione del DNA

Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico con il metodo del *salting out* (Miller *et al.*, 1988). La concentrazione di DNA è stata quindi determinata mediante letture spettrofotometriche a 260nm (Spectrophometer 7800 Jas.Co) e la qualità della preparazione del DNA è stata valutata misurando il rapporto tra la D.O. a 260nm e la D.O. a 280nm.

2.3 Genotipizzazione

In questo studio i soggetti in esame sono stati genotipizzati per 12 marcatori polimorfici microsatelliti (ripetizioni dinucleotidiche CA) distribuiti lungo tutto il cromosoma 20.

Il DNA dei soggetti da analizzare è stato amplificato mediante PCR, utilizzando dei primer forward marcati in 5' con un fluoroforo. Successivamente i frammenti derivati da ciascuna amplificazione sono stati analizzati su un sequenziatore automatico ABI PRISM 377. Tutte le genotipizzazioni sono state effettuate "in cieco" dall'operatore, ignorando cioè la struttura della famiglia.

2.4 Scelta dei marcatori

In tabella 2.2 sono riportate le informazioni relative alla posizione dei marcatori lungo il cromosoma 20, il *range* di dimensioni atteso e all'eterozigosità massima, secondo la mappa di Marshfield (www.marshfieldclinic.org).

	Marcatore	Posizione Sex-ave (cM) **	Range di dimensioni (bp) *	Massima Eterozigosità *	Numero di cromosomi *
p-ter	D20S117	2.83	150-182	0.8400	54
	D20S905	17.19	79-97	0.7700	28
	D20S846	18.79	269-285	0.7800	28
	D20S115	21.15	232-238	0.6500	56
	D20S189	30.56	295-309	0.7500	56
	D20S118	39.25	169-179	0.8100	56
cen	D20S195	50.81	237-261	0.8100	56
	D20S119	61.77	104-118	0.8200	52
	D20S178	66.16	244-256	0.8300	54
	D20S196	75.01	145-176	0.8100	56
	D20S100	84.78	194-218	0.7500	56
q-ter	D20S171	95.70	123-149	0.7800	44

Tab. 2.2: Descrizione marcatori distribuiti lungo il cromosoma 20.

(**) Dati ottenuti da Marshfield database (www.marshfieldclinic.org) e (*) GDB (Genome Database, www.gdb.org/)

Nella tabella 2.3 è riportata la sequenza dei primers ricavata da Genome Database (www.gdb.org/), utilizzati per ciascun marcatore e il fluoroforo con cui è stato marcato il primer forward.

Marcatori	Primers	Fluoroforo
D20S100	F 5' TTGGGTTTACTTGTGCCTT3' R 5'CGTGATTTTCATTTCTTGCTG3'	TET
D20S115	F 5'CCGGAGTTAGTTTTATTATCTTGC3' R 5'CCTGTCCAGAAGTGCATATTG3'	FAM
D20S117	F 5'GAACCAACCCTGCTGC3' R 5'TCCAGAGATCACCC3'	HEX
D20S118	F 5'AGCTATATTTGTCAATGTGAGTTGT3' R 5'GTCCGTGATAGAGCAGAGTG3'	FAM
D20S119	F 5'CTGACACAGTTTCAGTATCTCTATC3' R 5'TTCCAGATTTAGGGGTGTATG3'	TET
D20S171	F 5'TATAGGTGAGGACCCTGAGG3' R 5'ACACCAAGCCATGTAACCTG3'	FAM
D20S178	F 5'GCCATGTCCATACAGAAC 3' R 5'GGATTCCTGAAAAGTGAAG3'	TET
D20S189	F 5'AGCTACACCAGTTGTCAGCG3' R 5'GAATGGATGTGGCATCTTCT3'	TET
D20S195	F 5'GTACCTCCTCCAGGCTTC 3' R 5'AGGGTGTATGTGTGCAT3'	HEX
D20S196	F 5'TTGGTGACCCTGAGACAGAGTG3' R 5'AACGAACTACCTGTTGATTTGCTCC3'	TET
D20S846	F 5'TAGCCCGGTGTGTGGA3' R 5'TAGCAACCAAGTGCCGA3'	FAM
D20S905	F 5'AGCTTGAGGAGCAGTGTCTT3' R 5'TCAGCAGATCCCACCA3'	FAM

Tab. 2.3: Descrizione dei primers utilizzati per l'amplificazione del microsatellite.

Abbiamo scelto il fluoroforo per ogni amplificato in base al *range* di pesi molecolari attesi, in modo da non avere sovrapposizioni delle dimensioni dell'amplificato di 2 microsatelliti con uguale spettro di emissione.

Le PCR sono state realizzate in un volume finale di 15µl e utilizzando l'enzima AmpliTaqGold polimerasi (Applied Biosystems). AmpliTaqGold è una Taq

polimerasi modificata che permette la realizzazione di *Hot Start PCR* per ottenere la specificità dell'amplificato. L'enzima viene fornito in stato inattivo legato ad un anticorpo; solo dopo attivazione al calore il legame con l'anticorpo si rompe e la Taq polimerasi si attiva.

E' stata preparata un'unica miscela di reazione, in quantità determinata dal numero di campioni più il controllo negativo e successivamente aliquotata in ciascun tubicino.

Per ogni microsatellite sono state utilizzate 2.5 pmoli di ciascun primer, 0.2 mM di dNTPs mix e 60 ng di DNA genomico; la concentrazione del magnesio, la quantità di enzima e la temperature di annealing sono state messe a punto per ciascuna coppia di primer (tab. 2.4).

In una percentuale variabile di molecole, l'AmpliTaqGold, come altre DNA polimerasi, catalizza l'addizione di un singolo nucleotide (di solito un'adenosina) alla terminazione 3' delle due eliche di un frammento di DNA a doppia elica. Questa addizione templatato-indipendente, porta alla sintesi di un prodotto di PCR "+ A". Il fenomeno è dovuto a diversi fattori, quali la temperatura e la durata dell'estensione finale e alla sequenza del templatato stesso. L'assegnazione delle dimensioni degli alleli risulta in questo modo inconsistente o non corretta, forzando l'utilizzatore a controllare tutti i picchi e ad assegnare manualmente le grandezze rischiando di falsare i risultati. Per ovviare a questo problema, ci sono essenzialmente quattro metodi:

1. modificare le condizioni dei cicli di PCR per promuovere o inibire l'addizione del nucleotide A al 3'
2. modificare la concentrazione del magnesio nella miscela di reazione per inibire o promuovere l'addizione
3. modificare il 5' terminale del primer reverse per promuovere o inibire l'addizione del nucleotide A al 3' all'elica complementare
4. trattare enzimaticamente i prodotti di PCR per rimuovere il +A

Alcuni dei microsatelliti utilizzati in questa tesi presentavano questo artefatto; in questi casi si è scelto di eliminare dai cicli di PCR l'estensione finale di 30 minuti a 72°C per inibire l'addizione del +A (tab. 2.4).

Marcatore	Temperatura di Annealing	Concentrazione di MgCl₂	Taq Gold	Estensione Finale 72°C per 30'
D20S100	55°C	2.5mM	0.75U	si
D20S115	60°C	3.0mM	0.75U	si
D20S117	55°C	3.0mM	0.375U	si
D20S118	55°C	3.0mM	0.75U	no
D20S119	55°C	2.5mM	0.75U	no
D20S171	50°C	3.0mM	0.75U	si
D20S178	50°C	2.5mM	0.75U	si
D20S189	60°C	3.0mM	0.75U	si
D20S195	55°C	2.5mM	0.75U	si
D20S196	55°C	3.0mM	0.75U	si
D20S846	48°C	2.5mM	0.75U	si
D20S905	50°C	2.5mM	0.75U	no

Tab. 2.4: Condizioni di amplificazione dei marcatori

I campioni amplificati con AmpliTaqGold polimerasi sono stati quindi sottoposti a cicli di amplificazione in thermal cycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Per tutti si è utilizzata una *hot-start* a 95°C per 10 minuti, poi denaturazione 94°C per 15 secondi, altri 15 secondi alla temperatura di annealing specifica per ogni marcatore ed infine 72°C per 30 secondi, il tutto per 10 cicli. Per i successivi 30 cicli si è utilizzata una denaturazione a 89°C per 15 secondi, mentre le condizioni di annealing e di estensione sono state mantenute uguali a quelle dei primi 10 cicli.

2.5 Controllo degli amplificati

Il controllo qualitativo delle amplificazioni è stato effettuato mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% e colorazione con bromuro di etidio (0.2 µg/ml). La corsa è stata effettuata in TAE 1X (tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M, pH 8) a 7 volt/cm per circa 15 minuti.

2.6 Elettroforesi sul sequenziatore ABI PRISM 377

Lo strumento è costituito da un apparecchio per elettroforesi integrato con un sistema per il rilevamento della fluorescenza, un computer Power Macintosh, che include i software per la raccolta e l'analisi dei dati, e una stampante. I software utilizzati per analizzare i polimorfismi sono GeneScan e Genotyper.

Durante la corsa elettroforetica i frammenti di DNA passano attraverso la regione del gel che si trova davanti al sistema di rilevamento della fluorescenza, dove un laser eccita le molecole fluorescenti. Queste ultime emettono la luce ad una determinata lunghezza d'onda che viene poi raccolta dal sistema. Una serie di lenti raccoglie la luce emessa e la focalizza sullo spettrografo, il quale separa la luce attraverso una *charge couple device* (CCD) camera. Essa è in grado di distinguere fino a quattro lunghezze d'onda per pozzetto.

Per questo lavoro sono stati utilizzati i fluorofori FAM, TET, HEX con cui sono marcati i primer forward di ciascun amplificato e TAMRA con cui è marcato lo standard di peso molecolare. Ognuno di questi fluorofori ha un proprio caratteristico spettro di emissione e gli spettri sono parzialmente sovrapposti in quanto i fluorofori emettono fluorescenza nello stesso intervallo di lunghezza d'onda; vengono quindi distinti solo i massimi di emissione (fig 3).

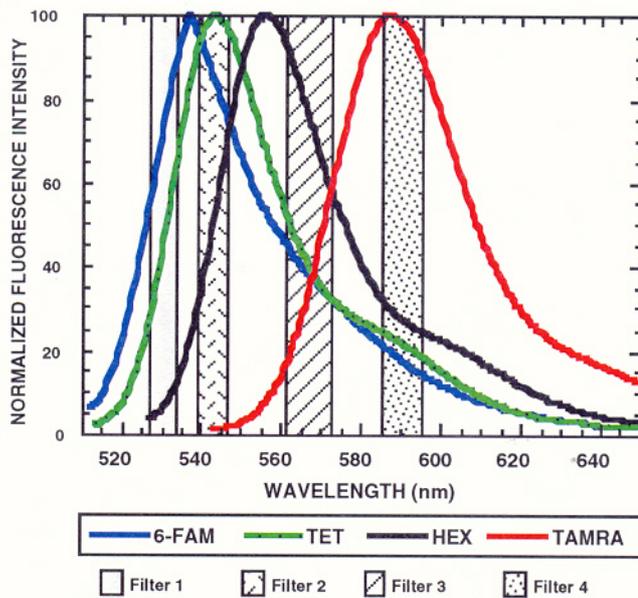


Fig. 3: spettri di emissione dei fluorofori utilizzati in questo lavoro di tesi. In ordinata abbiamo l'intensità di fluorescenza e in ascissa la lunghezza d'onda espressa in nm.

Il software GeneScan è lo strumento che viene utilizzato nell'analisi preliminare dei dati derivati dalla corsa elettroforetica dei frammenti con ABI PRISM 377. Utilizza il marcatore di peso molecolare (GeneScan 350 Tamra, Applied Biosystem), interno a ciascun campione, per generare una retta di taratura, da cui inferisce la dimensione di ogni frammento sulla base della sua mobilità nel gel. GeneScan è inoltre in grado di distinguere contemporaneamente quattro diversi fluorofori per ciascun campione. I risultati ottenuti con GeneScan possono essere importati e filtrati dal sofisticato algoritmo presente nel software Genotyper, che provvede a creare delle tabelle esportabili e utilizzabili per le successive analisi da parte dei programmi di linkage.

2.6.1 Gel di poliacrilamide

Per l'analisi dei frammenti derivanti dalle varie amplificazioni è stato utilizzato un gel denaturante (urea 6M) di acrilamide/bis-acrilamide (19:1) al 4% e TBE 1X. Le sostanze utilizzate per il gel vengono sciolte in presenza di amberlite (Serva), una resina che serve a deionizzare l'acrilamide. La soluzione viene poi filtrata e degasata; quest'ultimo procedimento serve per eliminare l'ossigeno, il quale agirebbe come trappola di radicali liberi, inibendo la polimerizzazione.

A 50 ml di soluzione vengono aggiunti 250 μ l di APS 10% e 35 μ l di TEMED; la soluzione viene velocemente versata nel supporto di vetri precedentemente preparato, e il gel viene lasciato polimerizzare per circa due ore.

2.6.2 Preparazione dei campioni da caricare su ABI PRISM 377

Le singole PCR relative a ciascun campione vengono raggruppate in un pool, secondo i seguenti rapporti di diluizione:

Marcatore	Diluizione
D20S100	1:20
D20S115	1:20
D20S117	1:3
D20S118	1:20
D20S119	1:15
D20S171	1:10
D20S178	1:15
D20S189	1:15
D20S195	1:5
D20S196	1:20
D20S846	1:15
D20S905	1:15

Tab. 2.5: Diluizioni effettuate sui campioni marcati con i diversi fluorocromi prima del caricamento su gel di poliacrilammide.

Un'aliquota di 1.5 μ l di pool di PCR è stata mescolata a 2.5 μ l di formamide deionizzata, a 0.5 μ l di marcatore di peso molecolare (GeneScan 350 Tamra, Applied Biosystems) e a 0.5 μ l di *loading buffer* (blu destrano 50 mg/ml, EDTA 50mM, Applied Biosystems). La miscela ottenuta è stata denaturata per 10 minuti a 95°C e quindi posta subito in ghiaccio. 3 μ l di tale miscela sono stati successivamente caricati nei pozzetti del gel di poliacrilamide per la corsa elettroforetica ed è stato aggiunto TBE 1X (Tris-base 89 mM, Na₂EDTA 2mM, Acido borico 89mM) come tampone di corsa.

2.7 Riassegnazione delle dimensioni alleliche

Le genotipizzazioni effettuate utilizzando ABI PRISM 377 sono generalmente semi-automatizzate, cioè le dimensioni degli alleli vengono stabilite attraverso i software Genescan/Genotyper e attraverso delle correzioni manuali. I risultati di tali applicazioni sono però spesso ambigui e le dimensioni degli alleli in un esteso gruppo di individui generalmente non ricadono all'interno di gruppi discreti, bensì vengono presentati come valori continui. Questa dispersione allelica può essere causata da vari fattori quali la variabilità dei diversi gel, o l'introduzione di un +A alla terminazione 3' da parte della Taq polimerasi durante l'amplificazione. Il risultato che si ottiene nella genotipizzazione, è che le dimensioni degli alleli possono non corrispondere a quelle che si dovrebbero osservare in base alla segregazione.

I dati derivanti da ciascuna corsa elettroforetica devono quindi essere corretti prima di essere utilizzati per ulteriori analisi. Nel laboratorio dove ho svolto il lavoro di tesi sono stati messi a punto dal dott. L. Xumerle dei programmi che permettono di effettuare la riassegnazione delle dimensioni alleliche (*binning*), raggruppando i dati in classi alleliche, con una certa variabilità attorno a ciascun allele. Vengono stabiliti dei *range* di valori entro i quali inserire i valori continui di ciascun allele (cioè quelli forniti dal programma Genotyper) convertendoli in etichette alleliche (numeri interi) in modo tale da farli rientrare in gruppi discreti. Le etichette alleliche vengono generate arrotondando tutti gli alleli osservati per eccesso o per difetto. In base alla numerosità delle categorie pari o dispari, si decide se considerare tutti gli alleli corretti, come pari o dispari e si genera una lista di alleli putativi. Per ogni individuo si cerca di ricostruire il genotipo corretto, basandosi sulla distanza dei suoi alleli osservati dal valore della classe allelica e sul confronto con il genotipo dei parenti.

2.8 Analisi statistica

L'analisi non parametrica viene generalmente utilizzata nello studio dei caratteri complessi, dove non si devono considerare i parametri applicati all'analisi dei caratteri mendeliani classici. La valutazione dell'ipotesi linkage/non linkage viene fatta mediante il calcolo del LOD score.

L'analisi di linkage non parametrica è stata condotta utilizzando la statistica NPL (*Non Parametric Linkage*) per fenotipi qualitativi. Questo metodo è implementato nel programma MERLIN (*Multipoint Engine for Rapid Likelihood Interference*), un programma che esegue analisi di linkage non parametrica *singlepoint* e *multipoint* (Abescasis *et al.*, 2002).

A differenza di altri programmi MERLIN ha il vantaggio di utilizzare un algoritmo molto rapido per la stima del grado di condivisione allelica ed è inoltre utile per l'analisi di un elevato numero di loci.

L'analisi qualitativa confronta il grado di condivisione allelica tra individui imparentati affetti, rispetto a quello atteso in caso di segregazione indipendente dei marcatori con la malattia.

L'analisi di linkage qualitativa è stata eseguita dopo aver suddiviso i soggetti in due classi (affetti/non affetti) a seconda del loro valore di BMD espresso in T-score. Sul campione l'analisi è stata ripetuta due volte: la prima scegliendo come valore di cut-off, $T\text{-score} \leq -1.0$ e successivamente $T\text{-score} \leq -2.5$. Con $T\text{-score} \leq -1.0$ o $T\text{-score} \leq -2.5$ consideriamo affetti i soggetti con BMD che si scosta rispettivamente di -1.0 o -2.5 deviazioni standard dalla media del gruppo di riferimento (giovani adulti). Questi valori di soglia di T-score sono stati scelti in quanto rappresentano quelli indicati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) per la diagnosi di osteopenia e osteoporosi (Kanis *et al.*, 1994).

Inoltre l'analisi *multipoint*, che permette di valutare simultaneamente un maggior numero di ricombinazione tra i differenti marcatori considerati correggendo per la frazione di doppi ricombinanti, è stata effettuata su tutti gli individui affetti e anche solo sulle coppie di fratelli affetti (*sib-pairs*) a livello della colonna, dell'anca e del collo del femore .

3 RISULTATI

3.1 Descrizione del campione

Gli individui analizzati nel presente lavoro sono stati valutati per diverse variabili (tab. 3.1). Oltre al valore di BMD, misurato a livello dell'anca, del femore e della colonna ed espresso sia in valore assoluto (g/cm^2) che in valore relativo (T-score), si sono considerate anche altre covariate quali l'età e l'indice di massa corporea (BMI). Nella tabella vengono riportati i valori medi e la deviazione standard (DS) relativamente a tali variabili, considerando sia i probandi che i non probandi.

Fenotipo		Probando (\pmDS)	Non probando (\pmDS)
Età (anni)		57 ± 14	50 ± 17
BMI (Kg/m^2)		24 ± 3.6	25 ± 4.0
BMD anca (g/cm^2)		0.7 ± 0.12	0.86 ± 0.15
BMD collo del femore (g/cm^2)		0.6 ± 0.97	0.75 ± 0.14
BMD colonna (g/cm^2)		0.74 ± 0.12	0.9 ± 0.16
T-score	Anca	-2.4 ± 0.9	-1.3 ± 1.1
	Collo del femore	-3.0 ± 0.9	-1.7 ± 1.2
	Colonna	-3.1 ± 1.1	-1.8 ± 1.4

Tab. 3.1: Statistica descrittiva relativa a 567 soggetti appartenenti a 118 famiglie. Il T-score indica il numero di deviazione standard (DS) dalla media in funzione del picco di massa ossea teorico di un giovane adulto di 30 anni circa.

3.2 Genotipizzazione

In tabella 3.2 è riportato il numero di individui genotipizzati per ogni specifico marcatore e l'eterozigosità osservata nella popolazione analizzata. L'eterozigosità osservata (calcolata sui fondatori) è comparabile a quella riportata in banche dati (Genome Database, www.gdb.org/, vd. tab. 2.2).

	Marcatore	N° Individui genotipizzati	N° Fondatori	Eterozigosità osservata
p-ter	D20S117	421	83	0.8840
	D20S905	446	91	0.7400
	D20S846	468	88	0.7800
	D20S115	470	91	0.7570
	D20S189	359	81	0.7240
cen	D20S118	383	76	0.6870
	D20S195	425	87	0.8610
	D20S119	443	88	0.7560
	D20S178	383	84	0.8510
	D20S196	393	80	0.8280
	D20S100	375	75	0.7520
q-ter	D20S171	437	90	0.8120

Tab. 3.2: Tabella riassuntiva del numero di individui e fondatori genotipizzati e dell'eterozigosità osservata.

Un nucleo familiare composto da 3 individui, padre, madre e figlio, è stato eliminato per l'eccessivo numero di marcatori che non mostravano segregazione mendeliana.

Le famiglie che hanno mostrato errori di segregazione per taluni marcatori sono state considerate come non genotipizzate per quei marcatori. Gli errori di segregazione sono da attribuirsi alla errata interpretazione di genotipi da parte dell'algoritmo di *binning*.

Le frequenze genotipiche di ciascun polimorfismo sono risultate in equilibrio di Hardy-Weinberg.

3.3 Eliminazione dell'artefatto +A

In una percentuale variabile di molecole l'AmpliTaqGold, come altre DNA polimerasi, catalizza l'addizione di un singolo nucleotide (di solito un'adenosina) alla terminazione 3' delle due eliche di un frammento di DNA a doppia elica. Questa addizione può dare problemi di interpretazione dei tracciati elettroforetici, in quanto si presentano dei picchi anomali.

Questo artefatto si è stato osservato in tre dei marcatori utilizzati in questo lavoro di tesi (D20S118, D20S119, D20S905). In tutti e tre l'inibizione dell'addizione del +A è stata ottenuta eliminando dai cicli di PCR l'estensione finale di 30 minuti a 72°C.

Nella figura 4 sono riportati due esempi di tracciati elettroforetici ottenuti con il sequenziatore ABI PRISM 377 ed estrapolati dal programma Genotyper per il marcatore D20S905. In entrambi i casi si tratta dello stesso individuo denominato C129. Nel primo tracciato (a) si possono notare oltre ai picchi principali, dei picchi secondari derivanti dall'addizione di +A. Nel tracciato elettroforetico sottostante (b) si può notare come i picchi secondari siano stati eliminati togliendo dai cicli di amplificazione l'estensione finale di 72°C.

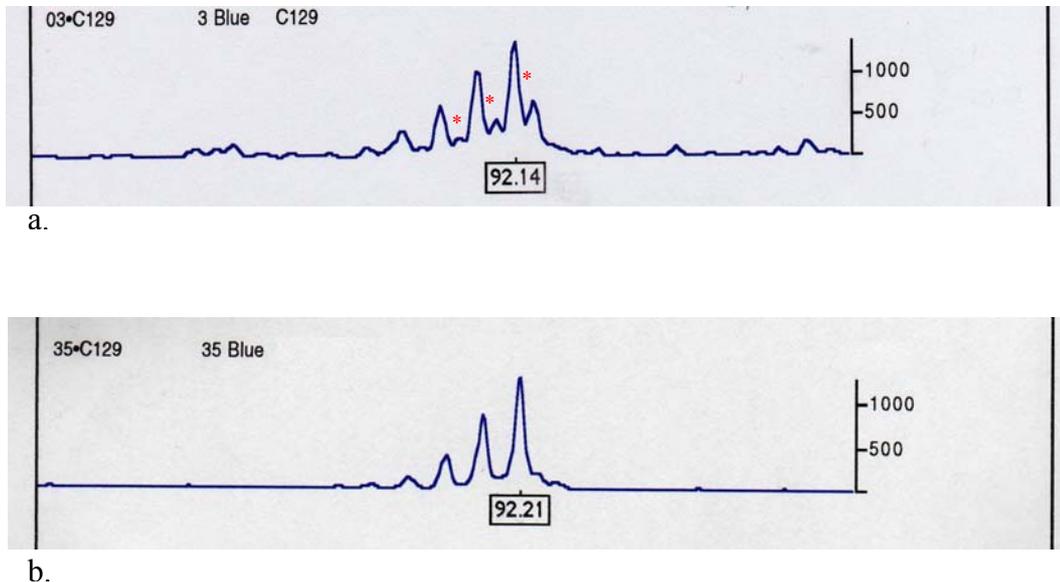


Fig. 4: Esempio di tracciato elettroforetico relativo a frammenti di DNA dell'individuo C129 amplificati con il marcatore D20S905. In ordinata è indicata l'intensità relativa di fluorescenza espressa in unità (RFU), mentre in ascissa vengono indicate le dimensioni dei frammenti esprese in paia di basi.

Il tracciato superiore (a.) mostra la coda +A (*), mentre in quello inferiore (b.) l'artefatto è stato eliminato.

3.4 Riassegnazione delle dimensioni alleliche

Nella figura 5 viene riportato un esempio di riassegnazione delle dimensioni alleliche, applicato su DNA amplificati con il marcatore D20S119 e relativi agli individui della famiglia 47. Le dimensioni alleliche, ottenute dai tracciati elettroforetici forniti dal software Genotyper, sono state convertite in numeri interi arrotondando per eccesso o per difetto in accordo con l'algoritmo di *binning* sviluppato nel laboratorio dove è stato svolto il lavoro.

L'algoritmo, analizzando l'intero campione, è in grado di indicare la migliore strategia di categorizzazione degli alleli, fissando quindi una etichettatura omogenea per tutti gli alleli osservati su tutto il campione e per ogni marcatore.

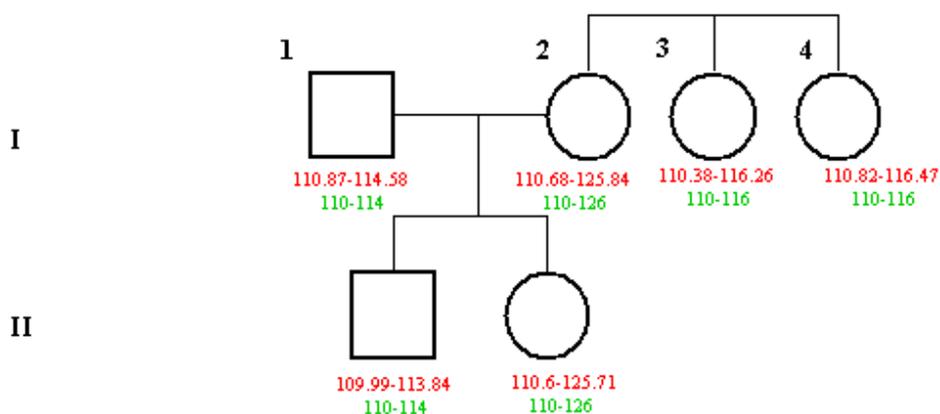


Fig. 5: Pedigree e genotipi relativi al marcatore D20S119 per la famiglia 47.

Le dimensioni alleliche fornite dal programma Genotyper sono riportate in rosso, mentre quelle ottenute dopo riassegnazione sono contraddistinte dal colore verde.

3.5 Analisi di linkage non parametrica qualitativa

Nell'analisi di linkage qualitativa sono stati stabiliti dei valori di cut-off per BMD ai diversi siti, in base ai quali classificare affetti o non affetti gli individui. Sono stati scelti dei valori di T-score tenendo conto dei criteri dati dall'organizzazione mondiale della sanità, che considera osteoporotici gli individui con T-score minore o uguale a -2.5 ed osteopenici quelli con T-score compreso tra -1.0 e -2.5 .

È stata eseguita un'analisi di linkage non parametrica *multipoint* su tutti i siti (anca, collo del femore e colonna vertebrale) sia utilizzando tutti gli individui affetti (*all*), sia per le coppie di fratelli affetti (*sib-pairs*).

I risultati più interessanti sono stati ottenuti a livello dell'anca impostando un T-score < -1.0 (LOD = 1.48; p-value = 5×10^{-3}).

Nella tabella 3.3 sono riportati i valori più interessanti di LOD score e i p-value associati, calcolati quando si è utilizzato un cut-off con T-score < -1.0 a livello dell'anca.

Imponendo un valore più restrittivo per la definizione degli affetti (T-score < -2.5), le analisi non hanno dato valori significativi.

Marcatore	Posizione marcatore (cM)	All		Sib-pairs	
		Lod score	p-value	Lod score	p-value
D20S196	75.01	1.07	0.013	0.95	0.02
D20S100	84.78	1.48	0.005	1.22	0.009
D20S171	95.70	0.75	0.03	0.65	0.04

Tab. 3.3: Analisi di linkage non parametrica qualitativa effettuata considerando affetti gli individui con valori di T-score < -1.0 a livello dell'anca.

All si riferisce a tutti gli individui affetti, mentre *sib-pairs* alle coppie di fratelli affetti.

Le famiglie analizzate sono 73.

La figura 6 mostra i valori di LOD score ottenuti dall'analisi *multipoint* di linkage non parametrica (T-score < -1.0) per il fenotipo misurato all'anca, lungo la mappa di marcatori utilizzati.

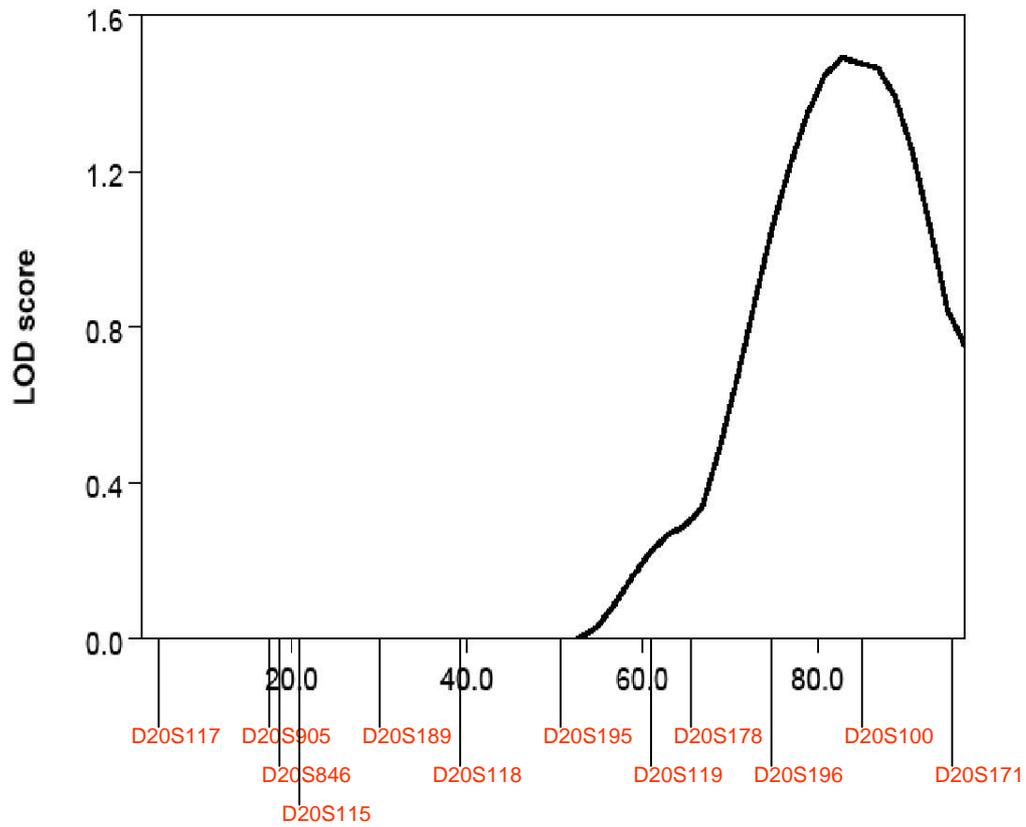


Fig. 6: Analisi *multipoint* di linkage non parametrica di marcatori del cromosoma 20 con la densità ossea (T-score < -1.0) misurata a livello dell'anca per tutti gli individui affetti (*all*). In ordinata sono riportati i valori di LOD score e in ascissa la posizione dei marcatori lungo tutto il cromosoma espressa in cM.

4 DISCUSSIONE

L'osteoporosi è una malattia d'importanza sempre più rilevante dal punto di vista sanitario e sociale, visti gli elevati tassi di disabilità che comporta e la grande spesa per il sistema sanitario. L'interesse è quindi concentrato nel trovare profili di rischio e pianificare interventi di prevenzione e di terapia appropriati e tempestivi.

Nella patogenesi dell'osteoporosi i fattori genetici giocano un ruolo importante, determinando l'80-85% della varianza della densità minerale ossea (BMD) mentre il rimanente 20% è dovuto a fattori ambientali (Hunter *et al.*, 2001; Sowers *et al.*, 1992; Gueguen *et al.*, 1995). La bassa BMD rappresenta uno dei maggiori fattori di rischio per fratture ed è uno dei criteri diagnostici dell'osteoporosi.

La difficoltà riscontrata nel ricercare buoni marcatori genetici di suscettibilità all'osteoporosi deriva dalla natura complessa e multifattoriale della malattia. Nella determinazione della massa ossea sono coinvolti probabilmente numerosi geni, ciascuno dei quali determina un piccolo contributo sull'espressione del fenotipo, a sua volta influenzato dall'interazione gene-gene e gene-ambiente (Geuguen, 1995).

Sono stati fino ad ora eseguiti numerosi studi utilizzando il fenotipo BMD sia con l'approccio di associazione gene candidato, che si focalizzavano su geni funzionali candidati codificanti per proteine strutturali dell'osso e citochine coinvolte nel metabolismo osseo (Liu *et al.*, 2002), sia mediante analisi di linkage *genome-wide scan*, i quali hanno rivelato la potenziale associazione del fenotipo con diverse regioni cromosomiche. Tuttavia i risultati sono rimasti pressoché inconsistenti e solo pochi sono stati replicati (Lee *et al.*, 2006). Questo può essere dovuto alle dimensioni del campione di individui presi in esame nei singoli studi, all'eterogeneità delle componenti genetiche tra i diversi siti scheletrici, tra i due sessi e tra i diversi gruppi etnici (Duncan *et al.*, 2003), ai metodi di analisi, alla definizione del fenotipo, ai diversi marcatori utilizzati. Inoltre, molti di questi loci possono avere un piccolo effetto locus-specifico sulla suscettibilità, quindi può essere difficile trovare dati consistenti senza usare un largo numero di famiglie o ricorrere a meta-analisi (Altmuller *et al.*, 2001).

Un lavoro di "scansione" dell'intero genoma eseguito su una popolazione islandese composta da 1327 individui suddivisi in 207 famiglie (Styrkarsdottir *et al.*, 2003) aveva evidenziato un risultato altamente significativo (LOD score = 5.10, p-value = 6.3×10^{-7}) a livello dell'anca e della colonna vertebrale, per il microsatellite D20S194 localizzato in 20p12. E' successivamente stato condotto uno studio di associazione caso-controllo che ha permesso di evidenziare una

associazione con il gene BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2) che mappa in questa regione.

Styrkarsdottir e collaboratori sono stati inoltre i primi ad usare per il loro studio il fenotipo bassa densità minerale ossea combinato alle fratture osteoporotiche, ovvero un'analisi qualitativa, mentre fino a quel momento BMD era stato utilizzato come tratto continuo.

In un lavoro successivo eseguito su 1816 soggetti caucasici provenienti da 79 famiglie, è stato riportato un LOD score = 2.33 (p-value = 6×10^{-4}) a livello dell'anca in 20p12, anche se risultati migliori sono stati osservati su 11q23 e Xq27 (Shen *et al.*, 2004).

In questo lavoro di tesi è stata effettuata un'analisi di linkage qualitativa mediante la "scansione" del cromosoma 20 con 12 marcatori microsatelliti per il carattere bassa densità minerale ossea (BMD), misurata a livello del collo femorale, dell'anca e della porzione lombare della colonna vertebrale. Lo studio è stato eseguito su una popolazione italiana composta da 567 individui provenienti da 118 famiglie. Il reclutamento delle famiglie è avvenuto a partire da un probando osteopenico o osteoporotico. Il campione, costituito da soggetti italiani, residenti in Veneto e prevalentemente di origine veneta, è rappresentativo del normale *range* di variabilità della BMD nella nostra popolazione.

I microsatelliti utilizzati in questo studio sono stati selezionati perchè distribuiti lungo tutto il cromosoma (distanziati in media di circa 8.44 cM) e presentano un'eterozigosità osservata tra il 68.7% e 88.4%.

I soggetti genotipizzati sono stati utilizzati per uno studio di linkage non parametrico qualitativo, utilizzando il programma MERLIN, un programma che esegue analisi di linkage non parametrica *multipoint* (Abescasis *et al.*, 2002). L'analisi confronta il grado di condivisione allelica tra individui imparentati affetti, rispetto a quello atteso in caso di segregazione indipendente dei marcatori con la malattia. L'analisi di linkage è stata condotta sia utilizzando l'informazione di tutti gli individui affetti, sia considerando le sole coppie di fratelli affetti (*sib-pairs*). In questo modo si è cercato di utilizzare la massima informazione disponibile per la stima della condivisione allelica (misurata in tutte le possibili coppie di individui affetti nei diversi gradi di parentela), sia di misurare la condivisione in individui di età simili (coppie di fratelli) per ridurre il possibile effetto ambientale di fattori sconosciuti che possono essersi modificati nel tempo.

Nel presente lavoro i risultati più interessanti sono stati ottenuti a livello dell'anca impostando per gli individui affetti un T-score < -1.0. La regione del cromosoma 20 lungo la mappa cromosomica per la quale si sono osservati i risultati migliori

di LOD score si trova tra 75.01 e 95.70 cM (secondo la mappa di Marshfield, www.marshfieldclinic.org), comprendente i marcatori D20S196, D20S100 e D20S171. Il valore massimo di LOD osservato è di 1.48 ($p\text{-value} = 5 \times 10^{-3}$) per il marcatore D20S100 (84.78 cM, 20q13.3). L'analisi è stata effettuata sia prendendo in considerazione tutti gli individui affetti, sia le coppie di fratelli affetti con risultati paragonabili. Imponendo un valore più restrittivo per la definizione di individuo affetto ($T\text{-score} < 2.5$), le analisi non hanno mostrato valori significativi; questo avviene molto probabilmente perché il campione di famiglie preso in esame diviene molto piccolo e quindi con un minore potere statistico.

I valori di LOD score da noi osservati non superano comunque il livello accettato per un linkage significativo ($\text{LOD score} > 3$) e sono semplicemente indicativi di un possibile coinvolgimento della regione cromosomica in 20q13.3 con la bassa densità minerale ossea.

I risultati del presente studio non hanno permesso di confermare quelli di Stykarsdottir e collaboratori. Questo potrebbe essere dovuto a molteplici fattori, quali i diversi criteri di definizione del fenotipo malattia dei soggetti in esame, la numerosità dei campioni analizzati e l'appartenenza a diverse popolazioni, in cui alla determinazione del fenotipo BMD potrebbero essere coinvolti geni diversi.

Il fenotipo dei soggetti dello studio islandese è stato classificato in modo diverso rispetto a quello del nostro campione: nell'articolo gli affetti sono definiti tali rispetto a valori di Z-score (numero di deviazioni standard dalla media della popolazione di riferimento in funzione dei valori medi per un collettivo della stessa età e sesso). Venivano in base a questo considerati affetti individui con Z-score < -1 in presenza di fratture osteoporotiche.

Anche la numerosità più ridotta del nostro campione può aver contribuito alla diversità dei risultati.

In conclusione, i dati riportati nel nostro set di famiglie italiane non permettono di confermare il linkage sul cromosoma 20 trovato dallo studio islandese in 20p12, ma hanno dato un segnale indicativo di linkage in una regione (20q13.3) che necessita un approfondimento mediante ulteriori studi.

Le prospettive future saranno quindi quelle di espandere il campione di individui e famiglie e analizzare con marcatori più fitti la regione 20q13.3 per cercare una conferma dei risultati ottenuti.

BIBLIOGRAFIA

Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. (2002)

Merlin-rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees.

Nat. Genet 30:97-101

Altmuller J, Palmer LJ, Fischer g, Scherb H, Wjst M. (2001)

Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find.

Am J Hum Genet. 69(5):936-50

Braga V, Sangalli A, Malerba G, Mottes M, Mirandola S, Gatti D, Rossini M, Zamboni M, Adami S. (2002)

Relationship between VDR (BmsI and FolkI), COL1A1 and CTR polymorphism and bone mass, bone turnover markers and sex hormones in men.

Calcif. Tissue Int. 70: 457-462

Brown MA, Haughton MA, Grant SFA, Gunnell AS, Henderson NK, Eisman JA. (2001)

Genetic control of bone density and turnover: role of the Collagen 1a1, Estrogen receptor and Vitamin D receptor genes.

J.Bone Miner. Res. 16:758-764

Cauley JA, Lucas FL, Kuller LH, Vogt MT, Browner WS, Cummings SR. (1996)

Bone mineral density and risk of breast cancer in older women: the study of osteoporotic fractures.

JAMA 276: 1404-1408

Christodoulou C and Cooper C. (2003)

What is osteoporosis?

Postgrad. Med. J. 79: 133-138

Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, Cauley J, Black D, Vogt TM. (1995)

Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group.

N England J Med 332:767-773

Duncan EL, Cardon LR, Sinsheimer JS, Wass JA, Brown MA. (2003)

Site and gender specificity of inheritance of bone mineral density.

J Bone Miner Res. 18(8):1531-8

Econs MJ, Koller DL, Hui SL, Fishburn T, Conneally PM, Johnston CC Jr, Peacock M, Foroud TM. (2004)

Confirmation of linkage to chromosome 1q for peak vertebral bone mineral density in premenopausal white women.

Am J Hum Genet. 74(2):223-8

Eriksen EF. (2001)

Osteoporosis pathogenesis.

European Calcified Tissue Society

Faulkner KG, Cummings SR, Nevitt MC, Pressman A, Jergas M, Genant HK (1995)

Hip axis length and osteoporotic fractures.

J Bone Miner Res. 10(3):506-8

Ferrari SL, Rizzoli R. (2005)

Gene variants for osteoporosis and their pleiotropic effects in aging.

Molecular Aspects of Medicine 26: 145-167

Garnero P and Delmas PD. (1998)

Biochemical markers of bone metabolism. Applications for osteoporosis.

Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 27: 303-323

Gueguen R, Jouanny P, Guilemin F, Kuntz C, Pourel J, Siest G. (1995)

Seregration analysis and variance components of bone mineral density in healthy families.

J Bone Miner Res. 12: 2017-2022

Glüer CC, Cummings SR, Pressman A, Li J, Glüer K, Faulkner KG, Grampp S, Genant HK. (1994)

Prediction of hip fractures from pelvic radiographs: the study of osteoporotic fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group.

J Bone Miner Res. 9(5):671-7

Kanis JA, Melton LJ 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. (1994)

The diagnosis of osteoporosis.

J Bone Miner Res. 9(8):1137-41

Karasik D, Myers RH, Cupples LA, Hannan MT, Gagnon DR, Herbert A, Kiel DP. (2002)

Genome screen for quantitative trait loci contributing to normal variation in bone mineral density: the Framingham Study.

J Bone Miner Res. 17(9):1718-27

Karlsson KM, Sernbo I, Obrant KJ, Redlund-Johnell I, Johnell O. (1996)

Femoral neck geometry and radiographic signs of osteoporosis as predictors of hip fracture.

Bone. 18(4):327-30

Koller DL, Econs MJ, Morin PA, Christian JC, Hui SL, Parry P, Curran ME, Rodriguez LA, Conneally PM, Joslyn G, Peacock M, Johnston CC, Foroud T. (2000)

Genome screen for QTLs contributing to normal variation in bone mineral density and osteoporosis.

J.Clin.Endocrinol. Metab 85(9):3116-20

Hanley DA, Brown JP, Tenenhouse A, Olszynski WP, Ioannidis G, Berger C, Prior JC, Pickard L, Murray TM, Anastassiades T, Kirkland S, Joyce C, Joseph L, Papaioannou A, Jackson SA, Poliquin S, Adachi JD. (2003)

Associations among disease conditions, bone mineral density, and prevalent vertebral deformities in men and women 50 years of age and older: cross-sectional results from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study.

*J Bone Miner Res.*18(4):784-90

Hobson EE, Ralston SH. (2001)

Role of genetic factors in the pathophysiology and management of osteoporosis.

Clin. Endocrinology 54: 1-9

Horsman A, Marshall DH, Peacock M. (1985)

A stochastic model of age-related bone loss and fractures.

Clin. Orthop. 195: 207-215

Hunter DJ, de Lange M, Andrew T, Snieder H, MacGregor AJ, Spector TD. (2001)

Genetic variation in bone mineral density and calcaneal ultrasound: a study of the influence of menopause using female twins.

Osteoporos Int. 12:406-11

Jones G, Nguyen T, Sambrook PN, Kelly PJ, Gilbert C, Eisman JA. (1994)

Symptomatic fracture incidence in elderly men and women: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study (DOES).

Osteoporos Int. 4(5):277-82

Lee HL, Young HR, Seong JC, Jong DJ, Gwang GS. (2006)

Meta-analysis of genome-wide linkage studies for bone mineral density.

Journal of Human Genetics 51(5):480-6

Liu YZ, Liu YJ, Recker RR, Deng HW. (2002)

Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update.

J Endocrinol. 177(2):147-96

Marshall D, Johnell O, Wedel H. (1996)

Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures.

BMJ. 18;312(7041):1254-9

McFarlane SI, Muniyappa R, Shin JJ, Bahtiyar G, Sowers JR. (2004)

Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle bones and boned arteries, is there a link?

Endocrine 23: 1-10

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988)

A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.

Nucleic Acids Res. 16(3):1215

Ott J (1999)

Analysis of Human Genetic Linkage.

Johns Hopkins Univ Pr (1999)

Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. (2002)

Genetics of osteoporosis.

Endocrine reviews 23 (3): 303-326

Peacock M, Turner CH, Liu G, Manatunga AK, Timmerman L, Johnston CC Jr. (1994)

Better discrimination of hip fracture using bone density, geometry and architecture.

Osteoporos Int. 5(3):167-73

Pocock NA, Eisman JA, Hopper JI, Yates GM, Sambrook PN, Ebert S. (1987)

Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study.

J. Clin Invest 80: 706-710

Ralston SH. (2005)

Genetic determinants of osteoporosis.

Curr Opin Rheumatol. 17(4):475-9

Roux C, Breuil V, Orcel P, Fardellone P. (2004)

Diagnosis of osteoporosis.

Rev. Prat. 54 (19): 2107-19

Sexson SB, Lehner JT. (1988)

Factors affecting hip fracture mortality.

J. Orthopaed. Trauma 10:298-305

Shen H, Zhang YY, Long JR, Xu FH, Liu YZ, Xiao P, Zhao LJ, Xiong DH, Liu YJ, Dvornyk V, Rocha-Sanchez S, Liu PY, Li JL, Conway T, Davies KM, Recker RR, Deng HW. (2004)

A genome-wide linkage scan for bone mineral density in an extended sample: evidence for linkage on 11q23 and Xq27.

J Med Genet. 41(10):743-51

Sowers MR, Boehnke M, Jannausch ML, Crutchfield M, Corton G, Burns TL. (1992)

Familiality and partitioning the variability of femoral bone mineral density in women of child-bearing age.

Calcif Tissue Int. 50:110-4

Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. (1993)

Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM).

Am. J. Hum. Genet. 52: 506-516

Stewart TL, Ralston SH. (2000)

Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis.

J Endocrinol. 166(2):235-45.

Styrkarsdottir U, Cazier JB, Kong A, Rolfsson O, Larsen H, Bjarnadottir E, Johannsdottir VD, Sigurdardottir MS, Bagger Y, Christiansen C, Reynisdottir I, Grant SF, Jonasson K, Frigge ML, Gulcher JR, Sigurdsson G, Stefansson K. (2003)

Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2.

PLoS Biol. 1(3):E69

Vidal C, Galea R, Brincat M, Anastasi AX. (2007)

Linkage to chromosome 11p12 in two Maltese families with a highly penetrant form of osteoporosis.

Eur J Hum Genet. 15(7):800-9

Wilson SG, Reed PW, Bansal A, Chiano M, Lindersson M, Langdown M, Prince RL, Thompson D, Thompson E, Bailey M, Kleyn PW, Sambrook P, Shi MM, Spector TD. (2003)

Comparison of genome screens for two independent cohorts provides replication of suggestive linkage of bone mineral density to 3p21 and 1p36.

Am J Hum Genet. 72(1):144-55

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof.ssa Mottes per avermi dato l'opportunità di svolgere questo lavoro di tesi e per la sua grande disponibilità e pazienza.

Grazie a Giovanni Malerba per l'analisi statistica dei dati e per la revisione della tesi e a Luciano Xumerle per lo sviluppo dell'algoritmo del *binning*.

...E al cia[n]o per l'aiuto pratico ad ogni problema e il sostegno morale nelle pause caffè.

Grazie a tutte le amiche e amici di laboratorio per aver reso davvero piacevole tutto questo periodo, per avermi sempre aiutata e avermi sempre fatto coraggio.

Un grazie alle amiche e agli amici nuovi e di sempre, che hanno vissuto con me il percorso che mi ha portato fino a qui, con i suoi alti ed i suoi bassi.

Infine un grazie infinito alla mia famiglia per aver reso possibile tutto questo, in primo luogo ai miei genitori e ai miei nonni che non hanno mai perso la fiducia in me e mi hanno sempre spronata e a mia sorella e mio fratello che mi hanno sempre supportata e soprattutto sopportata.