

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

BIOTECNOLOGIE DELLO SVILUPPO E DELLA RIPRODUZIONE

Ciclo XXI

**Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: BIO/17**

*Studio di geni potenzialmente coinvolti nell'insorgenza  
della labiopalatoschisi non sindromica*

**Presentata da: Dott.ssa Marzia Arlotti**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof.ssa Elisabetta Caramelli**

**Relatore**

**Prof. Furio Pezzetti**

**Esame finale anno 2009**

# INDICE

---

## **1. INTRODUZIONE**

1.1 Definizione e descrizione della patologia

1.2 Epidemiologia

1.3 Cenni embriogenetici

1.3.1 Sviluppo della faccia

1.3.2 Sviluppo del palato

1.3.3 Malformazioni congenite

1.4 Alterazioni dello sviluppo

1.5 Genetica delle schisi

## **2. SCOPO DELLA RICERCA**

## **3. MATERIALE**

## **4. METODI**

4.1 Metodi di mappaggio genico per patologie complesse

4.2 Metodi statistici

4.3 Approccio all'analisi epidemiologica

## **5. STUDIO DEI GENI COINVOLTI NELLA VIA METABOLICA DELL'ACIDO FOLICO**

5.1 Razionale

5.2 Risultati

5.3 Discussione

## **6. STUDIO DEL GENE MYH14**

6.1 Razionale

6.2 Risultati

6.3 Discussione

## **7. STUDIO DEL GENE JARID2**

7.1 Razionale

7.2 Risultati

7.3 Discussione

## **8. CONCLUSIONI**

## **9. BIBLIOGRAFIA**

## *1. Introduzione*

# 1. INTRODUZIONE

---

Tra le malformazioni congenite in generale e quelle orofacciali in particolare, le schisi labiopalatine occupano un posto di primaria importanza, non soltanto per la frequenza elevata con cui compaiono nella popolazione umana, ma anche perché ledono la morfologia e la funzione del volto, centro primario nella vita di relazione di un individuo. Inoltre, incidono sulla possibilità di alimentazione e sull'acquisizione della parola, compromettendo lo sviluppo psico-intellettuale del bambino. I problemi di un bambino che presenta questa malformazione sono veramente complessi e richiedono, per il trattamento e la riabilitazione, un approccio multidisciplinare e la stretta collaborazione tra pediatri, chirurghi, ortodontisti, foniatristi e psicologi. Data la complessità del problema, si comprende facilmente l'importanza di studi genetici volti all'individuazione delle cause determinanti l'insorgenza della malformazione, al fine di attuare un'efficace azione di prevenzione.

## 1.1 Definizione e descrizione della patologia

I termini labioschisi e palatoschisi indicano genericamente la presenza di una fessura labiale o palatina. La labiopalatoschisi è una malformazione della faccia che può colpire il labbro superiore, il processo alveolare, il palato duro e/o molle; queste strutture risultano quindi interessate da una fessurazione di ampiezza variabile.

Risulta possibile classificare l'insieme eterogeneo delle schisi labiopalatine; la prima grande divisione porta alla formazione di due categorie:

- 1) labioschisi con o senza palatoschisi o labiopalatoschisi (LPS o CL/P)
- 2) palatoschisi isolata (PS o CPO)

Questi due gruppi di malformazioni, pur essendo anatomicamente associabili, sono entità distinte sotto molteplici punti di vista: embriologico, epidemiologico, genetico ed eziopatogenetico. Per definizione, la LPS è una schisi mono- o bi-laterale del labbro superiore, che può estendersi fino al pavimento della narice, con o senza fessurazione del palato mentre, la palatoschisi, è una fessurazione del solo palato duro e/o molle, di estensione e ampiezza variabile.

Statisticamente sono stati rilevati i seguenti dati:

- nel 35-55% dei casi vi è associazione di schisi del labbro e del palato;
- nel 20-30% vi è schisi del solo labbro;
- nel 35-45% vi è schisi del solo palato.

## 1.2 Epidemiologia

I dati della letteratura riportano valori di prevalenza di LPS che oscillano tra 7 e 13/10000 nati vivi. Le discrepanze tra i valori presentati nei vari studi possono essere messe in relazione a diversi fattori come: la fonte di informazione usata per i vari studi (registri delle nascite, certificati di nascita, registri chirurgici, registri ospedalieri, sorgenti multiple), l'inclusione o meno dei casi di malformazioni multiple, fattori socio-economici, etnici e geografici. In particolare, valori elevati superiori a 101/10 000 si riscontrano nel Nord Europa, mentre in tutti i Paesi dell'area mediterranea si riscontrano tassi di prevalenza inferiori. Gli studi effettuati sugli Indiani d'America dimostrano che questa popolazione presenta la più alta frequenza di malformazione con valori intorno a 36/10000 nati. Alta la prevalenza anche tra gli Orientali, più spiccata nei Giapponesi (21/10000 nati) che nei Cinesi (17/10000 nati) (Hemery & Rimon, 1990). Al contrario, studi condotti sulla popolazione Africana hanno evidenziato un tasso di prevalenza relativamente basso, intorno a 3/10000 nati (Gorlin, 1990). L'ipotesi più accreditata che ci permette d'interpretare i diversi valori di incidenza della patologia nei diversi gruppi etnici è che la malformazione sia in qualche modo correlata al complesso poligenico che regola l'ampiezza del volto. La variabilità anatomica della forma del volto nelle diverse etnie potrebbe quindi condizionare una maggiore o minore predisposizione alla schisi (Poswillo, 1988). Ciò confermerebbe il ruolo preponderante dei fattori genetici rispetto ai fattori ambientali nell'eziopatogenesi della malformazione. Infatti, popoli diversi che vivono nella stessa area geografica e che sono quindi sottoposti alle stesse influenze ambientali, sono diversamente suscettibili alla patologia.

Per quanto riguarda la distribuzione tra i sessi, sembra che la labiopalatoschisi colpisca più frequentemente il sesso maschile. In generale, si può inoltre affermare che, più grave è il difetto preso in considerazione, maggiore è la proporzione dei maschi affetti. Ad esempio, se si considera la schisi del solo labbro, il rapporto maschi:femmine è di 1,5 e sale a 2 per la schisi labiopalatina completa; allo stesso modo, questo rapporto è maggiore

per la schisi bilaterale rispetto alla monolaterale. Tuttavia, questo dato non pare estensibile a tutte le etnie.

Sebbene nella maggioranza dei casi le malformazioni caratterizzate da schisi orali si presentino in forma isolata, in circa il 30% dei neonati con LPS sono presenti altri difetti congeniti (forme sindromiche) (Calzolari, 1988; Shaw, 1991; Stoll, 1991). Il manifestarsi di un determinato profilo di anomalie associate può essere ricondotto a vari gruppi:

1. sindromi genetiche ad eredità mendeliana, causate cioè da un singolo gene mutante che può essere autosomico, legato all'X, dominante o recessivo, come ad esempio la sindrome di Van der Woude (autosomica dominante);
2. sindromi che derivano da aberrazioni cromosomiche (es. trisomia del 13, del 18, del 21);
3. sindromi da teratogeni ambientali (es. sindrome feto-alcolica, sindrome da talidomide);
4. sequenze, cioè insiemi di anomalie multiple derivate da una singola precedente anomalia conosciuta o da forze meccaniche (es. sequenza di Pierre Robin);
5. associazioni, cioè un insieme di anomalie che si sa essere statisticamente correlate, ma che, allo stato attuale delle conoscenze, non possono essere considerate né come sindrome né come sequenza;
6. condizioni caratterizzate da malformazioni multiple non inquadrabili in sindromi o altre condizioni note.

E' comunque generalmente accettato che le malformazioni associate ai loci di suscettibilità delle schisi si riscontrino molto più frequentemente nei bambini con PS che in quelli affetti da LPS e ancora meno nei pazienti che presentano schisi del solo labbro (LS).

Sia in uno studio epidemiologico, che in uno studio genetico, la distinzione tra le forme isolate di schisi e le forme associate ad altre malformazioni è molto importante perché si presume che per i due gruppi ci sia una diversa eziologia.

### 1.3 Cenni embriogenetici

Per comprendere meglio i fenomeni che stanno alla base della manifestazione delle schisi labiopalatine è indispensabile conoscere i processi embriogenetici che portano alla costituzione delle diverse parti del volto.

### **1.3.1 Sviluppo della faccia**

La parte dell'embrione dove i cambiamenti della morfogenesi sono più appariscenti, è la faccia. All'inizio del secondo mese gli abbozzi degli occhi erano situati ai lati della testa e gli abbozzi del naso, delle orecchie e della bocca erano delle fessure che non avevano nulla di riconoscibile. Alla fine del secondo mese, invece, tutti questi hanno cambiato sia le loro posizioni sia le loro forme e si sono trasformati in strutture che hanno un aspetto chiaramente umano.

La faccia si sviluppa da cinque abbozzi, i *processi facciali*, che compaiono sulle pareti della *bocca primitiva* o *stomodeo* durante la quarta settimana di sviluppo embrionale.

I processi facciali sono:

1. Il *processo frontale* (in alto), che rappresenta il tetto dello stomodeo.
2. Due *processi mandibolari* simmetrici (in basso), derivanti dalla porzione inferiore del primo arco branchiale, che formano il pavimento dello stomodeo.
3. Due *processi mascellari* simmetrici (laterali), che rappresentano i lati dello stomodeo e derivano dalla parte superiore del primo arco branchiale.

I processi facciali dalla quarta all'ottava settimana di sviluppo sono sottoposti ad una serie di movimenti morfogenetici che ne cambiano la forma e le dimensioni fino a fondersi in regioni prestabilite dando origine alla struttura definitiva della faccia.

Alla fine della quarta settimana, a livello del processo frontale si differenziano due ispessimenti ectodermici simmetrici, i *placodi olfattivi* ed i due processi mandibolari si fondono al centro originando il mento e l'abbozzo del labbro inferiore. Durante la quinta settimana di sviluppo, il mesoderma che circonda i placodi nasali prolifera fino a formare, ai loro bordi, due protuberanze che origineranno i *processi nasali*. Le due metà rivolte verso il centro sono chiamati *processi naso-mediali*, mentre le due metà periferiche

prendono il nome di *processi naso-laterali*. I processi nasali mediali si accrescono verso il basso contemporaneamente ai processi mascellari che crescono uno verso l'altro in direzione della linea mediana. Alla fine della sesta settimana i due processi naso-mediali migrano verso il centro e si fondono dando origine al *massiccio mediano* della faccia. La porzione superiore del massiccio mediano darà origine al setto nasale, mentre la parte inferiore prende il nome di *processo intermascellare* perché disposta tra i due processi mascellari.

Il processo intermascellare è suddiviso in tre regioni:

1. Una regione esterna dalla quale prende origine il *filtro* del labbro superiore.
2. Una regione intermedia che rappresenta la porzione di mascella da cui spunteranno i denti incisivi.
3. Una porzione interna, che si affaccia nella cavità orale e forma il *palato primitivo*.

Durante la settima settimana di sviluppo embrionale si avrà la completa fusione dei processi naso-mediali tra loro e al tempo stesso con i processi mascellari. Al termine di questo evento di fusione si sono formate le narici, l'arco della mascella e il labbro superiore; inoltre, i bordi inferiori dei processi mascellari si fondono per un breve tratto con i sottostanti processi mandibolari, riducendo l'ampiezza dello stomodeo, mentre i bordi superiori si fondono con i processi naso-laterali portando alla formazione delle strutture di base delle guance, i *massicci laterali*, stabilendo la continuità tra le varie strutture della faccia. Le labbra e le guance sono invase dal mesenchima derivante dal secondo arco branchiale. Ciò origina i muscoli delle labbra e delle guance che sono innervati del nervo facciale.

### **1.3.2 Sviluppo del palato**

Il palato si sviluppa da due strutture: il *palato primario* o *lamina palatina* ed il *palato secondario*. La lamina palatina deriva dal segmento intermascellare. Il palato secondario deriva dai tratti posteriori dei processi mascellari ed è formato da due lamine che, nel corso della sesta settimana di sviluppo, crescono obliquamente verso il basso da ciascun lato della lingua, originando i *processi palatini*.

Durante il periodo di sviluppo compreso tra la settima e la nona settimana, l'abbozzo della lingua migra verso il basso ed i processi palatini cambiano direzione e migrano uno verso l'altro su un piano orizzontale. Alla decima settimana, i processi palatini si fondono tra loro, con il palato primitivo e con il setto nasale, a formare il *palato secondario*. Al

centro del palato secondario resta visibile la linea di fusione dei processi palatini che prende il nome di *rafe mediano*, mentre il punto d'incontro sulla linea mediana tra i palati primitivo e secondario delimita una piccola cavità detta *forame incisivo*. Il palato primitivo e la porzione anteriore del palato secondario, in seguito a processi di ossificazione membranosa, danno origine al *palato duro*, al contrario, la porzione posteriore del palato secondario non si ossifica e forma il *palato molle* e *l'ugola*.

### 1.3.3 Malformazioni congenite

Il *labbro leporino* e la *palatoschisi* sono le più comuni malformazioni responsabili di gravi deformazioni nell'aspetto facciale e difetti nel modo di parlare.

La faccia si sviluppa in seguito alla confluenza dei cinque processi facciali quindi, un difetto nella fusione di una qualsiasi coppia di questi processi produce una *fessura* o *schisi* in una o più parti della faccia.

Le deformazioni fessurali possono essere *anteriori* o *posteriori*, relativamente al forame incisivo. Le schisi poste davanti al forame incisivo sono dovute a parziale o mancata fusione dei processi mascellari con il processo nasale mediale da uno o da entrambi i lati. Questa categoria comprende il labbro leporino, la schisi del mascellare superiore e la schisi tra palato primario e secondario. Quelle posteriori al forame incisivo comprendono la schisi secondaria del palato e la fessurazione dell'ugola.

Le schisi anteriori possono coinvolgere un solo lato della faccia (labbro leporino unilaterale) o entrambi (labbro leporino bilaterale), inoltre, variano in gravità da una malformazione che interessa solo il labbro senza attraversare la gengiva (labbro leporino semplice), a deformazioni che si estendono dalle narici al forame incisivo (labbro leporino completo).

Il labbro leporino è causato dalla mancata fusione dei processi facciali dovuta a:

1. migrazione insufficiente delle cellule della cresta neurale della testa;
2. proliferazione scarsa delle cellule della cresta neurale della testa.

La palatoschisi deriva dalla mancata fusione dei processi palatini e può essere causata da:

1. proliferazione cellulare scarsa e inadeguata;
2. impossibilità dei processi palatini di cambiare direzione al momento giusto;
3. incapacità dei processi palatini di fondersi una volta venuti a contatto tra loro;
4. eccessivo allargamento della testa.

Il labbro leporino e la palatoschisi sono malattie poligeniche multifattoriali dovute a combinazioni di geni che predispongono con maggiore o minore intensità al manifestarsi del fenotipo schisato.

L'associazione del labbro leporino con la palatoschisi è piuttosto frequente, anche se i due fenomeni hanno cause embriogenetiche diverse, e porta alla formazione di una fessurazione che interessa tutto il tetto della bocca fino ad arrivare alle narici (*palatoschisi totale*). Quando la fessurazione si manifesta su un solo lato della faccia, si ha *palatoschisi totale unilaterale*, al contrario, se coinvolge entrambi i lati del volto, si ha *palatoschisi totale bilaterale*, più comunemente nota come "gola di lupo".

La mancata confluenza degli altri processi facciali porta al manifestarsi di anomalie del volto più rare ma ben documentate:

1. Il *labbro leporino mediano* è causato dall'incompleta fusione dei due processi nasali lungo la linea mediana.
2. La *schisi mediana del labbro inferiore* è il risultato di difetti di fusione tra i due processi mandibolari.
3. Le *schisi facciali oblique* sono dovute a difetti di fusione del processo naso-laterale con il processo mascellare.
4. La *macrostomia* ("bocca ingrandita") è il risultato della mancata fusione del processo mascellare con il sottostante processo mandibolare.
5. La *microstomia* è provocata dal processo opposto, in altre parole da un'eccessiva confluenza fra processo mascellare e mandibolare.



**Figura 1.1.** Schisi del labbro con o senza schisi del palato rappresentata in diverse etnie.

Schisi del labbro con o senza schisi del palato



**Schisi del palato**



## 1.4 Alterazione dello sviluppo

Compresi i modi con cui si formano le strutture come naso, labbro, mascellare superiore e palato, è necessario considerare i fattori che, interferendo con i processi embriogenetici, sono responsabili della manifestazione del fenotipo malato. Nel 30% dei casi l'evento malformativo è legato ad una predisposizione genetica mentre, nel restante 70% dei casi, i fattori esogeni sono la principale causa che porta alla manifestazione del fenotipo schisato.

### 1.4.1 Fattori esogeni

Fino ai primi anni '40, si riteneva che i difetti congeniti fossero causati principalmente da fattori ereditari. Solo in seguito a molti studi (Edwards, 2003) diventò evidente che le malformazioni congenite umane potevano essere causate da fattori ambientali, come l'assunzione di farmaci, di alcool e droghe durante il periodo periconcezionale.

I fattori esogeni esercitano sul feto un effetto teratogeno, infatti, sono in grado di attraversare la placenta e produrre difetti neonatali. Per avere effetto teratogeno devono agire tra la quinta e l'ottava settimana di sviluppo intrauterino. Dopo tale periodo, le strutture anatomiche della faccia si sono già formate e non sono più suscettibili a tal effetto.

### **Farmaci**

#### Steroidi

I farmaci corticosteroidi sono utilizzati per il trattamento e la cura di diverse patologie delle donne in età fertile. L'effetto teratogeno dei corticosteroidi è ampiamente documentato in letteratura, in seguito a lavori di sperimentazione condotti su diversi modelli animali. La teratogenicità di questa categoria di farmaci è stata dimostrata sia in seguito ad uso sistemico (Pradat, 2003), che topico (Edwards, 2003) durante il primo trimestre di gravidanza. In particolare, da uno studio condotto da Carmichael e Shaw (Carmichael & Shaw, 1999) è stato evidenziato un incremento del rischio di avere un figlio affetto da LPS e PS, in seguito all'assunzione materna di corticosteroidi durante il periodo

periconcezionale (un mese prima e tre mesi dopo il concepimento). Un altro studio fa notare la correlazione tra l'utilizzo materno di glucocorticoidi e l'insorgenza di schisi del palato medio nei neonati (Kallen, 2007).

### Anticonvulsivi

I farmaci anticonvulsivi somministrati per la cura dell'epilessia sono: fenitoina/idantoina, oxazolidinedione e acido valproico. È noto che le tre classi farmacologiche hanno effetto teratogeno sull'embrione durante le prime settimane di gestazione, inoltre, è stata chiaramente dimostrata la correlazione di questi farmaci con un aumento del rischio di difetti congeniti (Gorlin, 1990), quali la schisi del labbro e/o schisi del palato e altre gravi embriopatie che colpiscono i bambini nati da madri epilettiche in terapia. Secondo Pennel (Pennell, 2003), il rischio si riduce notevolmente sottoponendo la paziente a terapia monofarmacologica. Inoltre, da diversi studi è emersa una forte associazione tra l'insorgenza della malformazione oro facciale e l'utilizzo durante il periodo periconcezionale di *Diazepam* (Safra & Oakley, 1975) e di benzodiazepine in generale (Laegreid, 1990). Uno studio svolto dal nostro gruppo di ricerca (Scapoli, 2002) ha permesso di evidenziare un'efficace relazione tra la subunità  $\beta 3$  del recettore dell'acido gamma amminobutirrico (GABRB3), bersaglio delle benzodiazepine e l'insorgenza di CL/P, suggerendo che esso è coinvolto nell'insorgenza della patologia, anche se nessuno dei pazienti analizzati presenta malattie di tipo neurologico.

### Farmaci anti-infiammatori non steroidei

Studi condotti da diversi gruppi di ricerca hanno evidenziato l'effetto teratogeno dell'*aspirina* e l'associazione con l'eziologia di diverse embriopatie: difetti del tubo neurale, gastroschisi, CL/P e CPO (Saxen, 1975; Kozer, 2003; Norgard, 2005). Inoltre, da un recente studio (Ericson & Kallen, 2001), è stato dimostrato che l'uso del farmaco anti-infiammatorio *Naproxene*, durante le prime settimane di gestazione porta all'aumento del rischio di schisi oro facciale.

## **Alcool**

L'assunzione, anche moderata, di alcool in gravidanza può essere dannosa per lo sviluppo embrionale, causando una delle più note anomalie genetiche, indicata come "sindrome fetale da alcool", caratterizzata da ritardo nei processi di crescita pre- e post-natali, ritardo mentale e da importanti anomalie facciali. Diversi studi supportano l'ipotesi di associazione tra CL/P e il consumo di alcol materno durante il primo trimestre di gravidanza (Shaw & Lammer, 1999; Lorente, 2000; Werler, 1991) dimostrò che le schisi oro facciali rappresentano la malformazione, derivante dalle cellule della cresta neurale, maggiormente interessata dall'assunzione di alcool. Inoltre, Romitti e colleghi (Romitti, 1999) dimostrarono che l'assunzione di alcool, associata alle varianti alleliche TGFB3 e MSX1 nel figlio, aumenta ulteriormente il rischio di CL/P.

## **Fumo**

Il ruolo del fumo è stato analizzato in numerosi studi epidemiologici e, anche se esistono dati discordanti circa il tipo di schisi, il suo effetto nocivo mette d'accordo tutti (Shaw, 1996). Per quanto riguarda il fumo di sigaretta, anche se fino a qualche anno fa sembrava aumentare il rischio di avere un figlio affetto da schisi del labbro e/o del palato, se assunto nel primo trimestre di gravidanza (Wyszynski, 1997a), in questi ultimi anni gli stessi autori hanno dimostrato che si tratta invece di uno dei fattori che ha minor incidenza nell'insorgenza della patologia (Wyszynski & Wu, 2002). La tossicità del fumo durante l'embriogenesi varia in funzione delle dosi, della frequenza di esposizione e dei meccanismi di trasferimento delle tossine dalla madre all'embrione. Il fumo incrementa i livelli di monossido di carbonio, che presentando un'elevata affinità per l'emoglobina, determinando una riduzione dell'apporto di ossigeno ai tessuti embrionali durante la palatogenesi. Studi condotti sui topi hanno evidenziato che uno stato d'ipossia materna determina un evidente incremento di CL/P (Bailey, 1995).

Diversi gruppi di ricerca hanno ampiamente dimostrato che il fumo di sigaretta modifica l'espressione di geni candidati per le schisi labiopalatine, come TGFA, TGFB3 e MSX1 e l'effetto dannoso del fumo, associato a varianti alleliche nei figli, aumenta il rischio del manifestarsi del fenotipo schisato (Shaw, 1996; Romitti, 1999). Durante lo sviluppo

embrionale, il gene GSTP1 (glutathione S-transferasi P1) è espresso a livello della placenta ed è coinvolto nella detossificazione del tabacco dai componenti tossici in esso contenuti. Variazioni geniche determinano un'alterazione della funzionalità dell'enzima codificato; infatti, Krapels e collaboratori (Krapels, 2004) hanno dimostrato che il rischio di avere un figlio affetto da labiopalatoschisi non sindromica aumenta di tre volte nel caso di madri fumatrici con genotipo mutato rispetto a madri non fumatrici con almeno un allele funzionante. Il rischio aumenta di cinque volte quando sia madre che figlio hanno il genotipo mutato.

### **Caffeina**

Studi condotti su animali confermano l'effetto teratogeno della caffeina, ma nessuno studio epidemiologico ha evidenziato un'associazione tra l'utilizzo di caffeina durante il periodo periconcezionale e un aumento del rischio di malformazioni congenite (Nawrot, 2003), in particolare di schisi oro facciali (Rosenberg, 1987), nella popolazione umana.

### **Vitamine**

Nel corso delle prime dodici settimane di gestazione è molto importante assumere vitamine del gruppo B (B6, B12 e acido folico). L'importanza dell'assunzione di vitamine appartenenti al complesso B è supportata da diversi studi condotti su popolazioni di studio sia animali (Narukawa, 1988) che umane (Krapels, 2004). Inoltre, già negli anni '40 Nelson osservò come, in modelli animali, la carenza di folato fosse causa di morte fetale (Nelson, 1950).

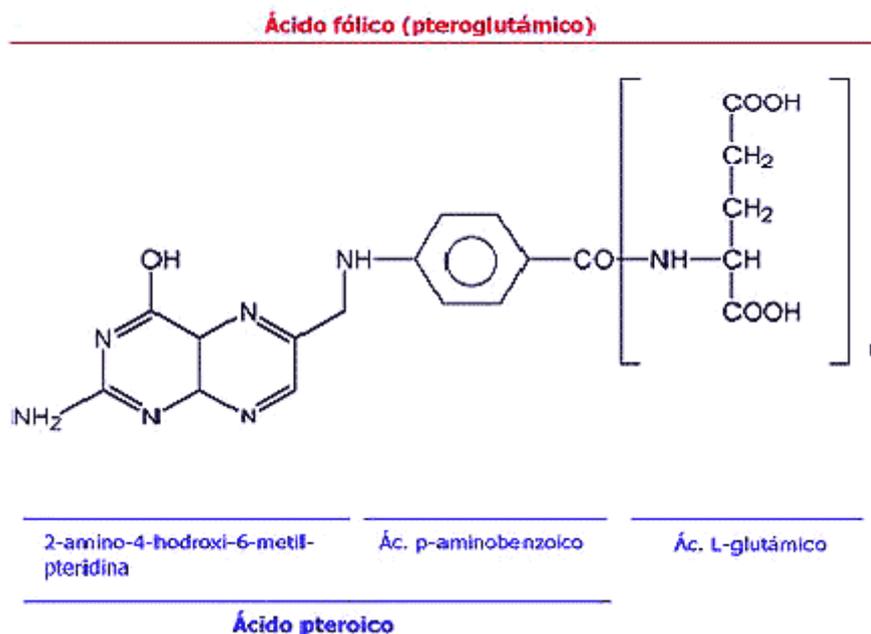
#### Vitamina B12

La vitamina B12 o cobalamina viene assunta con la dieta ed è contenuta, soprattutto, nelle carni di manzo e maiale ed in alimenti di origine animale come le interiora (fegato e reni) e le uova; è presente nei vegetali solo se questi sono contaminati da microorganismi. Il fabbisogno giornaliero di vitamina B12 è minimo ma essenziale; nell'adulto sano corrisponde a 2 µg, in gravidanza e durante il periodo di allattamento il fabbisogno aumenta rispettivamente a 2,2 µg e 2,6 µg. È stato dimostrato che l'assunzione di vitamine del complesso B contribuisce a diminuire il rischio di insorgenza di

labiopalatoschisi (Krapels, 2004), inoltre, la supplementazione con acido folico da solo o in combinazione con vit. B6 e B12 diminuisce i livelli di omocisteina plasmatica, determinando una riduzione del rischio di CL/P (Jacques, 1999).

### Acido folico

L'acido folico (o acido pteroilglutammico o vitamina M o vitamina B9 o folacina) venne scoperto nel 1939 dopo una serie di studi relativi alla terapia di una forma di anemia provocata artificialmente nei polli. La vitamina B9 è una molecola peptidica complessa costituita da una molecola di acido pterico, che si forma in seguito alla reazione di condensazione tra acido p-amino benzoico e una molecola di 2-amino-4-ossi-6-metilpterina e da una o più molecole di acido glutammico. Il legame tra queste due molecole è molto importante per l'attività biologica. Infatti, è proprio attraverso la rottura, per azione dell'enzima pteroilglutammato idrolasi e la riformazione del legame esistente tra acido pterico e acido glutammico, che l'acido folico può essere assorbito all'interno delle cellule come acido pteroilmonoglutammico. Inoltre, la vitamina B9 è insolubile in solventi organici ed è inattivata dalla luce e dalle radiazioni ultraviolette.



E' molto importante che tale vitamina sia apportata con la dieta, poiché non è prodotta dal nostro organismo. Si trova in abbondanza in molti alimenti: nelle verdure a foglia verde come i broccoli, gli spinaci, la lattuga, gli asparagi, nei legumi, nel lievito di birra, nei cereali, nel fegato ed in alcuni frutti come fragole, arance, limoni e kiwi. Il fabbisogno

giornaliero di acido folico per individui sani oscilla tra 0.2 mg a 0.4 mg, mentre sale a 0.8 mg durante la gravidanza e a 0.6 mg nel periodo dell'allattamento. Un incremento dell'assunzione di acido folico in gravidanza è necessario poiché il feto attinge alle riserve materne.

La vitamina B9 è fondamentale nella sintesi del DNA e delle proteine e nella formazione dell'emoglobina, gioca inoltre un ruolo importante nel differenziamento dei tessuti embrionali, tant'è che una carenza di folato nei primi mesi di gravidanza, aumenta fortemente il rischio d'insorgenza di difetti di chiusura del tubo neurale (NTD), associati a spina bifida e anencefalia (Beaudin & Stover, 2009). E' inoltre ormai accertato che tale condizione sia un importante fattore di suscettibilità nell'insorgenza della labiopalatoschisi (Pezzetti, 2004) In generale, è più alto il rischio di parto prematuro, di lesioni placentari e di ritardo nella crescita intrauterina, in caso di carenza di assunzione di acido folico da parte della madre.

Infine, occorre evidenziare l'esistenza di alcuni fattori che possono far aumentare il fabbisogno di acido folico o ridurre l'assorbimento, fra cui l'assunzione di alcuni farmaci (barbiturici, estro-progestinici), l'elevato consumo di alcool oltre a specifiche varianti di geni coinvolti nel metabolismo del folato, come il gene MTHFR, che codifica per l'enzima metilentetraidrofolato reduttasi, i recettori del folato (FOLR) e il gene TCN2, codificante per la transcobalamina 2.

## 1.5 Genetica delle schisi

### 1.5.1 Modelli di trasmissione

La labiopalatoschisi non sindromica è la malformazione cranio-facciale più frequente nella popolazione umana, ma la sua eziologia molto complessa è tuttora oggetto di studio. Il fatto che presenti una ricorrenza familiare, sostiene l'ipotesi che i fattori genetici giochino un ruolo chiave nell'insorgenza di questa malformazione congenita (Farrall & Holder, 1992; Murray, 1995).

Il modello genetico più studiato è il *multifattoriale a soglia* (Carter, 1969; Fraser, 1970). Secondo tale modello, la patologia è correlata a fattori genetici e ambientali, tant'è che fratelli di un probando che presentano un numero maggiore di fattori genetici di suscettibilità hanno un rischio più alto di manifestare la malformazione. Inoltre, è stato dimostrato che la percentuale di fratelli affetti aumenta con la severità con cui si manifesta la patologia nel probando, se il probando è femmina e se il probando ha un genitore o un fratello affetti (Carter, 1969; Fraser, 1970). Questo modello non è condiviso da alcuni autori, che rifiutarono il modello multifattoriale (Field, 2004) in favore di un modello misto che prevede il possibile coinvolgimento di un gene maggiore con o senza il contributo minore poligenico (Marazita, 1984; Marazita, 1986) ha condotto un importante studio epidemiologico su un campione di studio di 2.532 famiglie di probandi nati in Danimarca tra il 1941 e il 1971; l'analisi di segregazione, sia classica, sia complessa, ha escluso il modello multifattoriale a soglia sostenendo invece, per una parte delle famiglie, l'ipotesi di un gene maggiore recessivo o codominante; quest'analisi, infatti, evidenzia un certo grado di eterogeneità genetica e la presenza di un 50-60% di casi sporadici, ovvero di individui che presentano il fenotipo schisato nella cui famiglia non si riscontrano altri individui affetti dalla stessa malattia.

I due modelli sono entrambi attendibili. Alcuni ricercatori sostengono il modello di trasmissione misto con la presenza di un gene maggiore che appare in alcuni casi recessivo (Marazita, 1992) mentre in altri dominante (Hecht, 1991b). Altri autori sono invece a favore del modello di trasmissione multifattoriale che prevede la presenza di più geni, ognuno in grado di aumentare il rischio di ricorrenza di circa sei volte (Mitchell & Risch, 1992).

### 1.5.2 Tentativi di localizzazione genica

Risulta ormai evidente che la labiopalatoschisi non sindromica sia una patologia eterogenea (Murray, 1995) e che diverse regioni cromosomiche (1q, 2p, 4q, 6p, 14q, 17q, 19q) siano coinvolte nella sua eziologia.

Gli studi di *linkage* e di *associazione* condotti nel corso dell'ultimo decennio, hanno portato all'identificazione di dieci loci per le schisi, denominati OFC (Oral Facial Cleft).

Nella tabella A sono indicati i loci da OFC1 a OFC10 e la loro localizzazione cromosomica.

<b>Loci candidati per LPS</b>	<b>Localizzazione cromosomica</b>
OFC1	6p23-p24
OFC2	2p13
OFC3	19q13
OFC4	4q21-q31
OFC5/MSX1	4q16
OFC6/IRF6	1q32.3-q41
OFC7/PVRL1	11q23.3
OFC8/TP73L	3q28
OFC9	13q33.1-q34
OFC10/SUMO1	2q33
MTHFR	1q36
TGFB3	14q24
RARALFA	17q21.1

**Tabella A.** Loci di suscettibilità per la LPS.

Nel dettaglio:

### OFC1 (locus 6p23-p24)

Studi effettuati da diversi gruppi di ricerca hanno evidenziato risultati contrastanti relativi alla localizzazione sul braccio corto del cromosoma 6 del possibile "gene maggiore", primariamente responsabile dell'insorgenza delle schisi.

Lo studio preliminare condotto dal mio gruppo di ricerca (Carinci, 1995), che ha coinvolto un campione di studio costituito da 21 famiglie Italiane multigenerazionali di individui affetti da LPS, ha evidenziato eterogeneità genetica e la presenza di un locus di suscettibilità alla patologia, che mappa nella regione 6p23-p24.

Analisi di linkage al locus HLA, che mappa in 6p21.3, ha portato a risultati sia negativi che positivi (Van Dyke, 1980; Watanabe, 1984). Eiberg e colleghi (Eiberg, 1987) hanno studiato 58 alberi genealogici di famiglie danesi con LPS non sindromica, proponendo un modello di ereditarietà autosomica dominante. Il campione di studio è stato testato per la presenza di linkage con 42 marcatori polimorfici, ottenendo risultati significativi per tre marcatori: F13A in 6p23, ACP1 in 2p25 e PGD1 in 1p36.

Studi condotti su modelli animali evidenziano che il gene EDN1, che codifica per l'endotelina-1, potrebbe essere coinvolto nell'eziologia della labiopalatoschisi; le ricerche compiute da Pezzetti e colleghi (Pezzetti, 2000) hanno escluso la possibilità che il gene ECE1, che codifica per un enzima che effettua il taglio proteolitico dell'Endotelina 1 e mappa in 1p36, giochi un ruolo chiave nell'eziologia della LPS nell'uomo.

Risultati positivi sono invece stati ottenuti dal gruppo di Moreno (Moreno, 2004) che quello di Shultz (Schultz, 2004).

### OFC2 locus (2p13)

Il gene TGFA, codificante per il *Transforming growth factor alfa*, è stato il primo a risultare associato a LPS (Ardinger, 1989). Studi di associazione condotti da altri gruppi di ricerca, hanno dato risultati positivi in diverse popolazioni (Chenevix-Trench, 1992; Holder, 1992; Sassani, 1993), tuttavia tali evidenze non sono state confermate da studi successivi (Hecht, 1991a; Field, 1994; Wyszynski, 1997b). Più recentemente, risultati negativi sono stati ottenuti da uno studio di associazione condotto da Marazita e colleghi (Marazita, 2002). Lo studio prevedeva di verificare un'eventuale associazione tra marcatori al gene TGFA, che presentano associazione con la LPS nella popolazione Caucasica e la patologia, nella popolazione cinese. Risultati positivi sono stati ottenuti da uno studio di meta analisi

condotto da Mitchell (Mitchell, 1997). Shaw e colleghi nel (Shaw, 1996) non hanno trovato associazione tra il gene TGFA e la labiopalatoschisi, mentre da uno studio condotto dal mio gruppo di ricerca (Pezzetti, 1998) si osserva una probabile interazione tra il gene TGFA e un gene mappante in 6p23, nell'insorgenza della labiopalatoschisi non sindromica,

#### OFC3 (locus 19q13)

Il primo studio risale al 1995, quando Stein e colleghi hanno verificato la probabile presenza di linkage tra la LPS e 22 geni codificanti per fattori di crescita, oncogeni e proteine della matrice extracellulare. Per la maggior parte dei geni è stata esclusa l'ipotesi di linkage; risultati positivi sono stati osservati per i marcatori del protooncogene BCL3, un importante fattore di trascrizione e regolatore del ciclo cellulare che mappa nella regione cromosomica 19q13.2; infatti, 17 delle 39 famiglie impiegate come campione di studio, presentano linkage tra il marcatore D19S178 al gene BCL3 e la malformazione.

Studi più recenti hanno testato un'eventuale associazione tra mutazioni ai geni PVR e PVRL2. In uno studio condotto da (Warrington, 2006) è stata osservata un'associazione significativa per varianti rare ai geni PVR e PVRL2, nelle popolazioni del Sudamerica e dell'Iowa. Tuttavia, in seguito a sequenziamento genico, non è stato definito l'effettivo contributo delle singole varianti alla manifestazione del fenotipo schisato. Infine, dallo studio da me condotto nel corso del secondo anno di Dottorato, ho ottenuto dati negativi di associazione tra polimorfismi indagati al gene MYH14 e la LPS (Martinelli, 2008).

#### OFC4 (locus 4q21-q31)

Beiraghi (Beiraghi, 1994), indagando le regioni cromosomiche 4q25 e 4q13.3 in un campione di studio composto da 5 famiglie multigenerazionali con un'elevata incidenza di LPS, ha evidenziato valori di Lod Score positivi per i marcatori D4S192 e D4S175. Il modello di trasmissione proposto è quello a penetranza incompleta. La presenza di un locus di suscettibilità nella regione cromosomica 4q25-4q31.3 è confermata da uno studio successivo condotto da Mitchell e colleghi (Mitchell, 1995). Studi più recenti hanno evidenziato linkage tra LPS e il marcatore D4S1629, localizzato sul braccio corto del cromosoma 4, nella popolazione Cinese (Marazita, 2002). Risultati negativi per questa regione cromosomica sono stati ottenuti da Blanco e colleghi (Blanco, 2005), testando l'associazione tra marcatori microsatelliti mappanti in 4q e la LPS, nella popolazione Cilena.

### OFC5 (gene MSX1)

Negli ultimi anni, l'importanza del ruolo svolto del gene MSX1 nello sviluppo cranio-facciale è emerso grazie a studi condotti su modelli murini e umani. Molto interessanti i risultati ottenuti da questi studi, che mettono in risalto come, mutazioni a carico del gene MSX1, siano responsabili della manifestazione di caratteristiche fenotipiche quali: difetti nello sviluppo delle ossa nasali, frontali e parietali, agenesia e labopalatoschisi (Satokata & Maas, 1994) Kaartinen et al., (Kaartinen, 1995) (Vastardis, 1996). Studi di associazione e di linkage confermano il ruolo svolto da MSX1 nell'eziologia della LPS in diverse popolazioni. Uno studio condotto da Blanco (Blanco, 2001) evidenzia risultati positivi ottenuti realizzando uno studio caso-controllo sulla popolazione Cilena. Studi di linkage parametrico evidenziano risultati sia positivi (Stein, 1995a) sia negativi (Scapoli, 2002).

Alcuni autori sottolineano un'interazione tra il gene MSX1 e fattori ambientali, come l'esposizione al fumo di sigaretta e il consumo di alcool, durante il periodo periconcezionale e l'aumento del rischio di manifestazione della malformazione (Lidral, 1997) (Romitti, 1999).

Recentemente, Jezewski e colleghi (Jezewski, 2003), sequenziando l'intero gene, hanno identificato una mutazione a carico di esso, potenzialmente coinvolta nell'eziologia della malformazione facciale. Altre mutazioni al gene MSX1 sono state evidenziate da Suzuki (Suzuki, 2004) e Vieira (Vieira, 2005a) rispettivamente nelle popolazioni Vietnamita e Filippina. Diversi ricercatori hanno avvalorato l'ipotesi a favore dell'associazione tra il polimorfismo MSX1 CA e la patologia nelle popolazioni Colombiana e Cinese e Cilena (Otero, 2007) Wu et al., (Wu, 2007).

### OFC6 (gene IRF6)

Il gene IRF6 mappa nella regione cromosomica 1q32 e appartiene ad una famiglia di nove fattori di trascrizione che regolano l'espressione di interferone alfa e beta a seguito di un'infezione virale (Kondo, 2002). Mutazioni a carico del gene IRF6 sono la causa del manifestarsi della sindrome di Van der Woude (VWS), una patologia autosomica dominante che presenta schisi del labbro e/o del palato e fistola del labbro inferiore (Murray, 1990). Il contributo del gene IRF6 all'eziologia della LPS è noto per diverse popolazioni. Zuccherro (Zuccherro, 2004) ha ottenuto risultati per le popolazioni dell'Asia e del Sud America, solo recentemente il mio gruppo di ricerca ha confermato il coinvolgimento del gene IRF6 nella popolazione Italiana (Scapoli, 2005b); è stato possibile

riscontrare la overtrasmissione dell'allele più comune per gli SNP rs2013162 e rs2235375. Blanton (Blanton, 2005) e Park (Park, 2007), con i rispettivi gruppi di ricerca hanno ottenuto evidenze di associazione, osservando una significativa overtrasmissione dell'allele più frequente, nella popolazione indagata. Non è stata invece riscontrata associazione tra gene e malattia da Srichomthong e colleghi (Srichomthong, 2005) per il polimorfismo rs2235371 nella popolazione Thai e da Pegelow (Pegelow, 2008) nella popolazione Svedese. Infine, lo studio condotto da Jugessur e colleghi (Jugessur, 2008) sulla popolazione Norvegese, mette in evidenza che madri omozigoti per l'allele più frequente al polimorfismo rs4844880 presentano un incremento del rischio di 1.8 volte di avere figli affetti da LPS.

#### OFC7 (gene PVRL1)

Suzuki e colleghi (Suzuki, 1998) hanno identificato il gene PVRL1 e confermato il suo coinvolgimento nell'eziologia della LPS e nella manifestazione di una sindrome, ad ereditarietà autosomica recessiva, denominata CLPED1 (Cleft lip/palate-ectodermal dysplasia syndrome). La manifestazione clinica di tale sindrome prevede malformazioni quali schisi del labbro e/o del palato, sindattilia e altri difetti delle mani, displasia ectodermica e, in molti casi, ritardo mentale. PVRL1 codifica per la nectina 1, molecola espressa durante lo sviluppo del palato e responsabile dei meccanismi di adesione cellula-cellula. Molti studi hanno dimostrato l'associazione tra il gene PVRL1 e la labiopalatoschisi non sindromica, in diverse popolazioni, come quella Venezuelana (Sozen, 2001), quella Italiana per le varianti W185X e R199Q (Scapoli, 2004; Scapoli, 2006), dell'Iowa, Danese, Filipina (Avila, 2006) e Thai (Tongkobetch, 2008); non è stata trovata associazione tra polimorfismi studiati al gene PVRL1 e la patologia nella popolazione Taiwanese (Tseng, 2006).

#### OFC8 (gene TP73L)

Il gene TP73L codifica per la proteina tumorale p63 (Celli, 1999). Diversi autori hanno dimostrato che mutazioni al gene TP73L determinano l'insorgenza di sindromi che manifestano schisi facciale (Ianakiev, 2000; Leoyklang, 2006). Van Bokhoven & Brunner (van Bokhoven & Brunner, 2002) hanno esaminato le mutazioni al gene p63 che causano lo sviluppo delle suddette sindromi, stabilendo una correlazione genotipo-fenotipo,

specifica per ciascuna patologia.

#### OFC9 (locus 13q33.1-q34)

L'associazione tra la regione cromosomica 13q33.1-q34 e LPS è stata dimostrata da uno studio condotto da Radhakrishna e colleghi (Radhakrishna, 2006) su un campione di studio costituito da due famiglie multigenerazionali Indiane. Inoltre, è stato dimostrato che la LPS è molto comune in pazienti affetti da trisomia del cromosoma 13 (Berge, 2001).

#### OFC10 (gene SUMO1)

Diversi studi hanno evidenziato l'espressione del gene SUMO1 a livello del labbro superiore, del palato primario ed ai margini dell'epitelio mediale del palato secondario, nell'embrione di topo al giorno E13.5 di sviluppo embrionale; inoltre, altri studi condotti su modelli animali hanno confermato il ruolo di SUMO1 nella formazione del palato (Alkuraya, 2006). Gupta e colleghi (Gupta & Bei, 2006) hanno evidenziato la capacità di SUMO1 di regolare l'espressione del gene MSX1.

#### MTHFR (locus 1p36)

Il gene MTHFR (Metilentetraidrofolato riduttasi) mappa sul braccio corto del cromosoma 1 e riveste un ruolo chiave nella via metabolica del folato. Diversi studi hanno dimostrato che la mutazione C677T al gene MTHFR codifica per un enzima termolabile con ridotta attività associata ad alti livelli di omocisteina nel plasma. Van der Put e colleghi (van der Put, 1995) hanno dimostrato associazione tra una forma mutata del gene MTHFR e difetti di chiusura del tubo neurale; altri autori hanno messo in evidenza che l'omozigotità per la variante T è più frequente negli individui affetti da LPS (Tolarova & Cervenka, 1998; Mills, 1999). Infine, Martinelli e colleghi (Martinelli, 2001) hanno studiato il coinvolgimento della via metabolica del folato nell'eziologia della malformazione oro facciale, riscontrando che la mutazione C677T al gene MTHFR nelle madri, è un fattore di suscettibilità che aumenta il rischio di insorgenza della patologia nel figlio. Risultati non significativi per il polimorfismo C677T sono stati riscontrati da Reutter e colleghi (Reutter, 2008a) nella popolazione del centro Europa.

#### RARA (locus 17q21.1)

Esperimenti effettuati su modelli animali, indicano che l'acido retinoico modula lo

sviluppo della testa e che il suo recettore è importante nella palatogenesi (Damm, 1993; Studer, 1994). Chenevix-Trench e colleghi (Chenevix-Trench, 1992) hanno ottenuto la conferma che i geni TGFA e RARA non agiscono in sinergia nel determinare LPS, ma una eventuale mutazione in entrambi i geni sembrerebbe predisporre alla schisi il 50% dei casi studiati. Dati positivi di associazione sono stati ottenuti da Shaw e colleghi (Shaw, 1993), mentre da altri studi emerge che è possibile escludere completamente una relazione tra il gene RARA e la malattia (Vintiner, 1993; Stein, 1995b). Nessuna associazione è stata trovata da un studio condotto da Kanno e colleghi (Kanno, 2002) nella popolazione Giapponese.

#### TGFB3 (locus 14q24)

Diversi autori hanno ottenuto valori di linkage disequilibrium significativi in studi condotti sul gene TGFB3 e ciò ha permesso di ipotizzare un coinvolgimento del gene stesso nell'insorgenza della patologia (Lidral, 1998; Maestri, 1997). Il mio gruppo di ricerca ha ottenuto risultati borderline, pertanto non ci è possibile attestare con certezza il contributo di TGFB3 nell'insorgenza della LPS (Scapoli, 2002). Sono stati ottenuti risultati positivi da Reutter e colleghi (Reutter, 2008b) genotipizzando una popolazione del centro Europa e da Viera e colleghi (Vieira, 2003), che hanno evidenziato una probabile interazione tra i geni MSX1 e TGFB3 e l'incremento del rischio di insorgenza. Infine, nella popolazione Giapponese sono stati indagati sette geni candidati per le schisi: TGFB3, DLX3, PAX9, CLPTM1, TBX10, PVRL1 e TBX22; è stata trovata associazione significativa per il gene TGFB3 (Ichikawa, 2006).

## *2. Scopo della ricerca*

## 2. SCOPO DELLA RICERCA

---

Le schisi labiopalatine sono malformazioni ad eziologia molto complessa che occupano un posto di primaria importanza perché ledono la morfologia e la funzionalità del volto. La ricorrenza familiare delle forme non sindromiche mette in risalto l'importanza dei fattori genetici, ma nonostante diversi studi, non sono ancora noti il numero di geni coinvolti nell'eziologia della patologia ed il modello genetico di trasmissione. I modelli di trasmissione più accreditati, per spiegare sia i casi familiari che gli sporadici, sono due: uno evidenzia la presenza di un gene maggiore responsabile, con o senza il contributo di altri geni minori; l'altro, prevede il contributo di più geni, è cioè un modello oligogenico. Negli ultimi anni, i genetisti hanno rivolto i loro studi al mappaggio delle regioni cromosomiche potenzialmente coinvolte nell'eziologia e quindi nell'insorgenza della labiopalatoschisi (LPS).

Nel corso di questo triennio di Dottorato ho focalizzato i miei studi su geni considerati forti candidati per le schisi labiopalatine, nel tentativo di evidenziare eventuali mutazioni che concorrono nel determinare il fenotipo malato.

Risale a pochi anni fa la prima scoperta riguardante l'importanza dell'assunzione di acido folico durante il periodo periconcezionale e la riduzione del rischio di difetti di chiusura del tubo neurale (spina bifida) e labiopalatoschisi per il feto. In particolare, i ricercatori del mio gruppo (Pezzetti, 2004) hanno verificato una riduzione del rischio nell'insorgenza della LPS negli individui che presentano la variante T nel polimorfismo C677T del gene MTHFR; inoltre, è stato dimostrato che madri con una ridotta attività dell'enzima MTHFR (omozigoti/eterozigoti per la variante T) non forniscono all'embrione un adeguato apporto di acido folico, aumentando così il suo rischio di sviluppare il fenotipo schisato (Martinelli, 2001). In quest'ambito, durante il primo anno del mio corso di Dottorato mi sono occupata di verificare il ruolo svolto da quattro geni coinvolti nella via metabolica del folato. I geni oggetto del mio studio sono: TCN1 (transcobalamina 1), TCN2 (transcobalamina 2), MTR (metionina sintasi), MTRR (metionina sintasi reduttasi) e sono responsabili del processo di rimetilazione B12-dipendente dell'omocisteina, importante passaggio che regola la sintesi dei lipidi e la biosintesi delle basi puriniche e pirimidiniche.

Sulla base dei risultati ottenuti dal mio gruppo di ricerca indagando il gene codificante per la miosina non muscolare di tipo II (MYH9) (Martinelli, 2007), durante il secondo anno

di Dottorato, ho esteso la mia ricerca alla miosina 14 (MYH14), volendo verificare l'eventuale presenza di associazione tra la LPS e polimorfismi presenti in tale gene. Ho rivolto la mia attenzione alla miosina 14 in quanto presenta l'80% di omologia con il gene MYH9 e mappa in 19q13.2, nella regione candidata OFC3, ampiamente studiata dal nostro gruppo di ricerca (Pezzetti, 2007) e da altri autori (Stein, 1995a; Warrington, 2006).

Durante il terzo anno di dottorato ho ritenuto importante focalizzare i miei studi su geni che mappano nella regione cromosomica maggiormente candidata per le schisi labiopalatine: la regione 6p23-p24. Dai risultati ottenuti da un precedente studio di linkage condotto sul cromosoma 6 dal mio gruppo di ricerca (Scapoli, 1997), è stata dimostrata l'associazione tra il marcatore microsatellite D6S259 ed il locus OFC1. Esperimenti di espressione genica condotti sul topo, hanno portato all'identificazione di sette geni che mappano in un'area di 2Mb che include il marker D6S259. I geni identificati sono: SIRT5, NOL7, RANBP9, CCDC90A, RNF182, CD83 e JARID2. Successivamente, da esperimenti di ibridazione *in situ* condotti da nostri collaboratori sul modello murino e atti a valutare l'espressione dei geni candidati durante lo sviluppo del palato, è risultato che solo il trascritto del gene JARID2 è altamente espresso nelle cellule epiteliali attorno alle cavità nasali e nei processi palatini durante lo sviluppo del palato. Inoltre, come riportato per i geni MYH9 e TGFB3 (Martinelli, 2007), anche l'espressione di JARID2 è massima al giorno E14.5 di gestazione nel topo, durante i processi di fusione delle lamine palatine, per poi decrescere fino a scomparire subito dopo la loro fusione.

### *3. Materiali*

## 3. Materiali

---

### 3.1 Popolazione di Studio

Nell'ambito della ricerca da me condotta nel corso dei tre anni di Dottorato, ho verificato l'eventuale associazione tra geni, mappanti in diverse regioni cromosomiche, e l'insorgenza delle schisi labiopalatine.

Ogni indagine genetica prevede l'utilizzo di uno specifico campione di studio. In particolare, per lo studio condotto sui geni coinvolti nella via metabolica del folato (TCN1, TCN2, MTR, MTRR) e sul gene JARID2 (6p23), ho utilizzato un campione di studio costituito da 218 triadi, di cui 87 sporadiche e 131 famigliari; mentre per l'indagine condotta sul gene MYH14 ho utilizzato un campione di studio ampliato, che comprende 148 triadi sporadiche e 91 famigliari, per un totale di 239 probandi e dei loro genitori. Nessuno degli individui affetti indagati presenta altre patologie oltre la schisi, in quanto abbiamo volontariamente escluso tutti i casi sindromici, allo scopo di esaminare le cause genetiche alla base delle sola schisi.

Le triadi famigliari (costituite da padre, madre e figlio affetto) sono state estrapolate da alberi genealogici che presentano almeno due individui affetti, mentre i figli affetti appartenenti alla casistica degli sporadici non hanno nessun altro parente affetto da schisi.

I campioni di sangue dei probandi affetti da LPS provengono dal reparto di chirurgia Maxillo-Facciale degli Ospedali di Vicenza e Napoli, mentre i campioni di controllo provengono dalle Banche del Sangue dei rispettivi centri.

### 3.2 Estrazione del DNA

A ciascun probando ed ai suoi genitori sono stati prelevati circa 10 ml di sangue venoso periferico, poi conservati a -20°C in presenza di EDTA come anticoagulante. L'estrazione del DNA è stata effettuata secondo il protocollo manuale di Higuchi (Higuchi, 1989), che permette di eliminare i composti porfirinici derivati dall'eme, che interferiscono con l'attività della Taq Polimerasi durante la reazione di PCR.

Il protocollo prevede le seguenti tappe:

1) 0.5 ml di sangue venoso vengono miscelati a 0.5 ml di Lysis buffer (0.32 M di saccarosio, 10 mM di Tris-HCl pH7.5, 5 mM di MgCl<sub>2</sub>, 2.1% Triton X-100) in microtubi da 1.5 ml. Il tampone di lisi ha la funzione di frammentare le membrane plasmatiche che vanno quindi in soluzione, facendo precipitare i nuclei. La precipitazione dei nuclei è favorita da una preventiva agitazione al vortex ed una successiva centrifugazione a 12000 giri per 20".

2) Si rimuove il surnatante, mentre i nuclei precipitati, che formano il pellet, vengono risospesi in 1 ml di Lysis buffer. Si procede poi con ulteriori passaggi in vortex ed in centrifuga come descritto in precedenza, fintantoché non è più visibile traccia di emoglobina in soluzione, che potrebbe interferire con la reazione di amplificazione.

3) Si elimina il surnatante e si risospende il pellet in 0.5 ml di PCR buffer (50 mM di KCl, 10 mM di Tris-HCl pH 8.3, 2.5 mM di MgCl<sub>2</sub>, NP40 allo 0.45%, Tween 20 0.45%) al quale vengono aggiunti, al momento dell'uso, 0.1 mg/ml di proteinasi K. Il buffer di digestione lisa le membrane nucleari, liberando in soluzione il DNA, che si troverà quindi nel surnatante, in seguito a centrifugazione. La digestione avviene incubando a 50-60°C per circa un'ora.

4) Si porta quindi il lisato ad una temperatura di 95°C per 10 minuti (oppure a 70°C per 30 minuti) per inattivare la proteinasi K.

5) Si procede con una breve centrifugazione per precipitare i residui di membrane sul fondo. Il surnatante contenente il DNA viene infine trasferito in provette pulite e conservato a -20°C.

### 3.3 Progettazione di primer per l'amplificazione

Prima di procedere con l'amplificazione mediante PCR è necessario disegnare dei primer adatti all'amplificazione del frammento d'interesse, contenente il sito di restrizione. Una buona coppia di primer deve possedere alcuni requisiti essenziali:

- i singoli oligonucleotidi dovrebbero essere lunghi circa 20 paia di basi (pb), per assicurare una certa specificità.
- Non devono avere lunghe ripetizioni dello stesso nucleotide, che potrebbero provocare lo slittamento del primer.

- Dovrebbero avere una sequenza piuttosto omogenea, con una percentuale in citosine e guanine simile a quella del template.
- E' da evitare la presenza di sequenze complementari all'interno dei primer, che porterebbero alla formazione di strutture "a forcina" (hairpin); escludendo l'oligonucleotide dalla reazione.
- Non deve trattarsi di falsi primer, che potrebbero appaiarsi in più punti lungo il template.
- Non devono essere presenti regioni di complementarietà in 3' tra gli oligonucleotidi per evitare la formazione di dimeri di primer.

Negli ultimi anni, la fase di progettazione è stata velocizzata grazie all'impiego di programmi informatici. Il programma utilizzato durante la mia ricerca si chiama Primer3 ed è liberamente fruibile interfacciandosi al sito [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). L'operatore deve inserire nel form alcune informazioni, quali: la sequenza del template, la lunghezza del primer (massima e minima), la temperatura ideale di melting ( $T_m$ ) e la massima differenza di  $T_m$  tra i primer senso e antisenso.

Non sempre è disponibile in commercio (oppure lo è, ma a prezzi improbabili) un enzima di restrizione che presenti il suo sito di taglio in corrispondenza del polimorfismo d'interesse, rendendo così impossibile discriminare le varianti alleliche al polimorfismo stesso applicando questo approccio. Per superare tale ostacolo, durante la fase di elaborazione dei primer è possibile inserire una mutazione in grado di creare un sito di restrizione "artificiale". Questa strategia è stata da me sfruttata durante l'analisi del polimorfismo A66G al gene MTRR. In questi casi, i primer sintetizzati non devono essere del tutto complementari alla sequenza d'interesse ma presentare un mismatch (mancato appaiamento) in prossimità del polimorfismo da indagare. Durante il primo ciclo di amplificazione, il primer modificato appaierà comunque con il template, dal momento che la base non complementare è localizzata almeno in terz'ultima posizione per evitare un mancato appaiamento dell'estremità 3' del primer con il DNA, non permettendo alla Taq Polimerasi di agganciarsi e sintetizzare l'amplificato sul template di partenza. Il primo frammento neosintetizzato conterrà già la variante inserita grazie al primer modificato e fungerà da stampo per tutti i successivi cicli di amplificazione. La base alterata entrerà a far parte del sito di restrizione, che verrà comunque riconosciuto tale dall'enzima adatto, dipendentemente dalla presenza di una delle due varianti del polimorfismo in esame.

### 3.4 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una delle tecniche maggiormente utilizzate in biologia molecolare per studiare gli acidi nucleici. Ideata dallo studioso Kary Mullis alla metà degli anni ottanta (Saiki, 1988), ha permesso di ottenere buoni risultati nel campo della ricerca sul genoma umano. L'utilizzo della tecnica di PCR, permette di amplificare, selettivamente e ripetutamente, una sequenza bersaglio presente in una miscela di DNA, aumentando enormemente la sensibilità dei test genetici. Questa tecnica prevede l'utilizzo della Taq DNA polimerasi, una DNA polimerasi termoresistente ottenuta da un batterio che vive nelle sorgenti termali, *Thermophilus aquaticus*. La Taq DNA polimerasi utilizza il singolo filamento di DNA come stampo per sintetizzare un nuovo filamento complementare. Per avviare la reazione di sintesi, la Taq DNA polimerasi, necessita di un innesco a doppio filamento, costituito da una coppia di corte sequenze oligonucleotidiche (primer) complementari ciascuno ad una estremità della doppia elica. Vengono sintetizzati dei primer che fiancheggiano la regione di DNA da amplificare in modo che i nuovi filamenti di DNA che vengono sintetizzati a partire da ciascun primer, si estendano sino alla posizione del primer sul filamento di DNA opposto. Al termine di ogni ciclo, il numero di copie della sequenza compresa fra i siti di innesco si raddoppia, perciò la sequenza desiderata aumenta in maniera esponenziale.

Sperimentalmente, per ciascun campione di DNA, si prepara una miscela di reazione contenente i due primer, la Taq DNA polimerasi ed un'adatta quantità dei quattro nucleotidi precursori, il tutto tamponato da un idoneo buffer di reazione.

Una tipica applicazione della PCR, prevede tre fasi:

1. Fase di denaturazione. Il miscuglio di reazione è scaldato alla temperatura di 94-95°C per 5 minuti. A questa temperatura il DNA a doppio filamento si denatura formando delle singole eliche che serviranno da stampi per la sintesi di nuovo DNA.
2. Fase di appaiamento (annealing). La reazione procede ad una temperatura compresa tra i 50°C ed i 60°C (temperatura di annealing) per permettere ai primer di ibridarsi in corrispondenza delle sequenze complementari presenti sui

singoli filamenti di DNA e produrre il template su cui agirà la Taq DNA polimerasi.

3. Fase di estensione. I campioni sono mantenuti ad una temperatura di 72°C per 8 minuti. Questa temperatura rappresenta il valore ottimale per l'azione della Taq DNA polimerasi, che procede alla sintesi di DNA. Quando la sintesi è completata, l'intera miscela di reazione è ulteriormente riscaldata alla temperatura di 95°C, per circa 20 secondi, per separare i duplex di DNA neoformati. I singoli filamenti serviranno da stampo per un nuovo ciclo di sintesi di DNA. Ogni ciclo verrà ripetuto dalle 30 alle 40 volte, fino ad ottenere una quantità di DNA sufficiente a formare una banda ben distinta, in seguito a corsa elettroforetica su gel.

Nello specifico, i miei campioni sono stati sottoposti ad una denaturazione iniziale di 5' a 94°C affinché le due eliche complementari si separassero originando singoli filamenti; sono seguiti 35 cicli comprendenti la denaturazione a 95°C per 30", l'appaiamento dei primer alle sequenze complementari a temperature specifiche per ogni coppia, comprese tra i 56 ed i 58°C per 20" e la polimerizzazione a 72°C per 10" ad opera dell'enzima che sintetizza due eliche di DNA complementari in direzione 5'→3', agganciandosi all'ultimo nucleotide dei primer ibridati e utilizzando il DNA genomico come stampo. In ultimo, uno step a 72°C per 8-10' per terminare eventuali catene incomplete. In base alle caratteristiche di alcuni primer, tale protocollo ha subito delle variazioni, agendo principalmente sulla temperatura di appaiamento e sulla quantità di primer e, in secondo luogo, sulla quantità di enzima e di MgCl<sub>2</sub>.

### 3.5 Digestione enzimatica

La tecnica di digestione enzimatica è stata utile al fine di studiare i polimorfismi di restrizione contenuti nei frammenti di DNA precedentemente amplificati.

La digestione del DNA usando gli enzimi di restrizione si ottiene semplicemente incubando il DNA con l'enzima di restrizione in condizioni appropriate (quantità di enzima, concentrazione dei sali, durata e temperatura di reazione) indicate dal produttore. Le endonucleasi di restrizione, enzimi prodotti da batteri, sono in grado di riconoscere siti specifici sul DNA a doppio filamento e di tagliarlo in punti altrettanto specifici adiacenti o interni alle sequenze riconosciute, discriminando le varianti alleliche in base al numero di frammenti prodotti dal taglio enzimatico.

I ceppi batterici sono in grado di proteggersi dall'entrata di DNA esterno e virus invasivi, utilizzando da una parte enzima di restrizione, e dall'altra metilando il suo DNA. In questo modo, i siti di restrizione modificati non sono più riconosciuti dagli enzimi sintetizzati dal batterio stesso. In seguito ad infezione virale, l'enzima è in grado di tagliare solamente il genoma del virus, lasciando inalterato il proprio. Vista la loro origine, gli enzimi di restrizione prendono il nome dal batterio da cui vengono estratti. Possono essere classificati in due gruppi:

1. *Enzimi di restrizione di Tipo I*: sono in grado di riconoscere una sequenza oligonucleotidica specifica e di tagliare il DNA in posizioni non specifiche poste ad una certa distanza dalla sequenza segnale.

2. *Enzimi di restrizione di Tipo II*: riconoscono solo sequenze palindromiche (che presentano un asse di simmetria binario, quindi la sequenza di basi da 5' a 3' è identica a quella da 5' a 3' dell'elica complementare). Tagliano solamente all'interno del sito di riconoscimento con modalità diverse, creando due tipi di frammenti:

- tagliano entrambe le eliche di DNA a livello di due basi complementari originando estremità nette (blunt ends);
- eseguono tagli a "zig zag" creando frammenti di DNA che presentano due estremità a singola elica complementari (sticky ends).

Facendo particolare attenzione all'indagine molecolare condotta sui geni MTR, MTRR, TCN1 e TCN2, nelle seguenti tabelle sono riassunte le condizioni sperimentali e gli enzimi di restrizione usati per l'indagine di ogni singolo polimorfismo.

<b>Gene</b>	<b>Identificativo SNP</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Enzima di restrizione</b>	<b>Condizioni di digestione</b>
MTR	rs1805087	A2756G	<i>Hae</i> III (3U)	37°C per 2 h
MTRR	rs1801394	A66AG	<i>Nde</i> I (2U)	37°C per 2 h
TCN1	rs519221	T747+97986A	<i>Nsi</i> I (1U)	37°C per 2h

**Tabella B.** SNP indagati ai geni MTR, MTRR, TCN1.

<b>Gene TCN2</b>				
<b>Identificativo SNP</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Enzima di restrizione</b>	<b>Condizioni di digestione</b>	
rs9606756	A67G	<i>Rsa</i> I	37°C per 2 h	
rs1801198	C776G	<i>Bst</i> VI	60°C per 2 h	
rs7286680	T1107-394G	<i>Hae</i> III	37°C per 2 h	
rs10418	T444C	<i>Ava</i> II	37°C per 2h	

**Tabella C.** SNP indagati al gene TCN2.

Il protocollo di digestione prevede un volume finale di 20 µl, di cui: 5 µl di amplificato, 2 µl di buffer 10X fornito con l'enzima, 0.4 µl di Bsa 100X e l'enzima di restrizione. La digestione avviene a 37°C in bagnetto termostato, per circa due ore, per tutti gli enzimi utilizzati ad eccezione di *Bst*VI, che richiede una temperatura di 60°C.

I pattern elettroforetici attesi sono riassunti nelle seguenti tabelle:

<b>A1259G (Hae III)</b>	<b>Lunghezza in pb</b>	<b>A66G (Nde I)</b>	<b>Lunghezza in pb</b>
<b>amplificato</b>	177	<b>amplificato</b>	140
<b>wild type</b>	177	<b>wild type</b>	20-120
<b>eterozigote</b>	47-130-177	<b>eterozigote</b>	20-120-140
<b>doppio mutato</b>	47-130	<b>doppio mutato</b>	140

<b>rs7286680 introne 7 (Hae III)</b>	<b>Lunghezza in pb</b>	<b>A67G (Rsa I)</b>	<b>Lunghezza in pb</b>
<b>amplificato</b>	232	<b>amplificato</b>	151
<b>wild type</b>	30-41-161	<b>wild type</b>	21-130
<b>eterozigote</b>	30-41-161-191	<b>eterozigote</b>	21-29-101-130
<b>doppio mutato</b>	41-191	<b>doppio mutato</b>	21-29-101

<b>C776G (BstNI)</b>	<b>Lunghezza in pb</b>	<b>rs10418 UTR3' (Ava II)</b>	<b>Lunghezza in pb</b>
<b>amplificato</b>	145	<b>amplificato</b>	179
<b>wild type</b>	55-90	<b>wild type</b>	21-67-91
<b>eterozigote</b>	55-90-145	<b>eterozigote</b>	21-67-91-112
<b>doppio mutato</b>	145	<b>doppio mutato</b>	67-112

<b>rs51922 (Nsi I)</b>	<b>Lunghezza in pb</b>
<b>amplificato</b>	248
<b>wild type</b>	110-138
<b>eterozigote</b>	110-138-248
<b>doppio mutato</b>	248

### 3.6 Elettroforesi

I prodotti dell'amplificazione sono stati separati mediante migrazione elettroforetica. L'elettroforesi su gel di agarosio o di poliacrilammide viene utilizzata per separare e purificare molecole di interesse biologico come proteine e acidi nucleici, molecole di differente peso molecolare, carica e forma che, se sottoposte a un campo elettrico, migrano su un supporto inerte in modo differente. Il gel di poliacrilammide è dotato di un'alta definizione e di un elevato potere risolutivo, caratteristiche che permettono di identificare la presenza di mutazioni anche puntiformi.

Essendo la lunghezza media degli amplificati ottenuti nella ricerca da me condotta sul gene TCN2, di 200 coppie di basi, è stato necessario impiegare una tecnica elettroforetica ad alta definizione. A questo scopo sono stati utilizzati gel di poliacrilammide non denaturanti. L'acrilammide e la bis-acrilammide, in presenza di un catalizzatore come l'ammonio persolfato, polimerizzano formando lunghe catene, che si stabilizzano per la formazione di ponti molecolari in seguito all'aggiunta di Temed (N,N,N',N'-tetrametiletilendiammina) come iniziatore. Si forma così una sorta di rete, la cui porosità dipende dalla concentrazione di acrilammide.

Per i nostri scopi, sono stati usati gel non denaturanti a concentrazioni comprese tra 8 e 12%, con un rapporto tra acrilammide:bisacrilammide di 29:1. Per permettere ai campioni di migrare all'interno del campo elettrico, occorre utilizzare un tampone di corsa dotato di una forza ionica tale da garantire all'interno del gel una certa conduttanza elettrica. E' quindi importante che la concentrazione del tampone stesso all'interno del gel sia pari a quella del tampone di corsa. In tale contesto è stato utilizzato il Tris-borato EDTA (TBE) ad una concentrazione 1X.

I gel di poliacrilammide utilizzati sono:

- Gel all'8%: 27 ml di acrilammide 30%, 10 ml di TBE 10X, 750  $\mu$ l di ammonio persolfato 10%, 50  $\mu$ l di temed e acqua bidistillata fino a 100 ml.
- Gel al 10%: 33.3 ml di acrilammide 30%, 10 ml di TBE 10X, 750  $\mu$ l di ammonio persolfato 10%, 50  $\mu$ l di temed e acqua bidistillata fino a 100 ml.
- Gel al 12%: 40 ml di acrilammide 30%, 10 ml di TBE 10X, 759  $\mu$ l di ammonio persolfato 10%, 50  $\mu$ l di temed e acqua bidistillata fino a 100 ml.

La polimerizzazione del gel avviene in un tempo di circa 40 minuti. Prima di caricare i campioni si effettua una precorsa di 15 minuti circa, per permettere al tampone di equilibrarsi all'interno del gel, poi si procede con il caricamento dei campioni, costituiti dal prodotto di digestione con addizionato il *loading buffer*.

Il loading buffer è una soluzione che contiene:

- uno zucchero (saccarosio, destrosio, ecc.), che conferisce pesantezza al DNA impedendone la fuoriuscita dai pozzetti evitando fenomeni di contaminazione tra campioni diversi.
- due coloranti (Blu di Bromofenolo e Xilene Cianolo), che migrando all'interno del gel come frammenti di DNA di diverse dimensioni, servono come riferimento per stimare la localizzazione del campione che si sta analizzando, all'interno dello stesso gel.

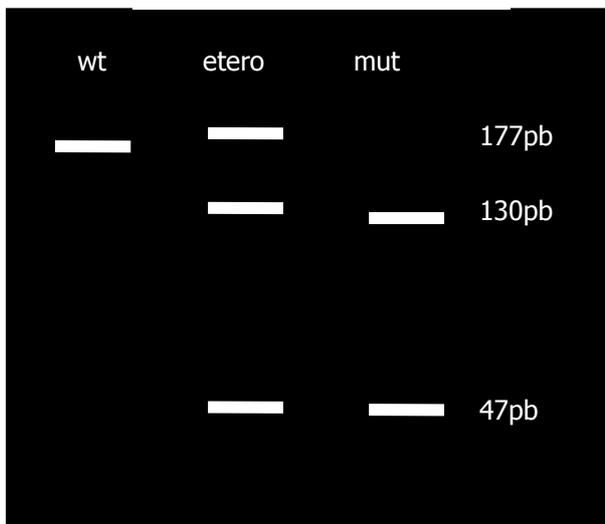
La corsa elettroforetica viene effettuata ad un wattaggio costante di 10 Watt.

La visualizzazione delle bande è stata effettuata con la colorazione al bromuro di etidio, immergendo il gel in una soluzione di TBE 1X alla quale viene aggiunto il colorante acridinico alla concentrazione di 1  $\mu$ g/ml. Il bromuro di etidio è in grado di intercalarsi tra le basi del DNA, rendendo visibili i frammenti con l'esposizione del gel alla luce UV.

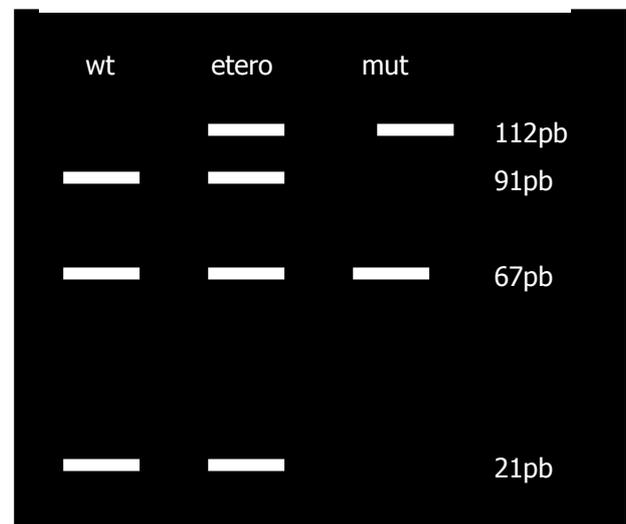
Con particolare riferimento all'indagine condotta sui geni coinvolti nella via metabolica del folato, occorre precisare che data la buona risoluzione delle bande visualizzate al transilluminatore, è stato possibile effettuare due o anche tre caricamenti distanziati di circa 40 minuti. Questo ha permesso di risparmiare sui costi e sul tempo dell'esperimento.

Gli schemi seguenti rispecchiano ciò che ci si attende di osservare al transilluminatore, anche se nella realtà i frammenti di DNA con dimensioni comprese tra 20-50 paia di basi (pb) non possono essere facilmente visualizzati poiché, essendo molto piccoli, migrano velocemente fuoriuscendo dal gel; inoltre, la quantità di colorante che si intercala non è sufficiente a renderli visibili alla luce UV.

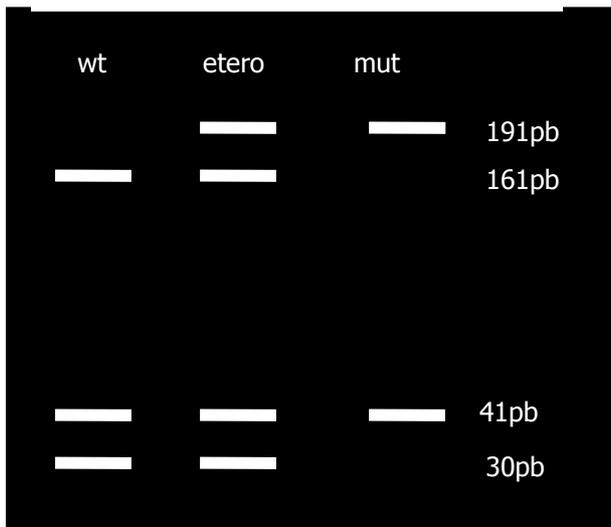
### A1295G (*Hae* III)



### rs10418 3'UTR (*Ava* II)



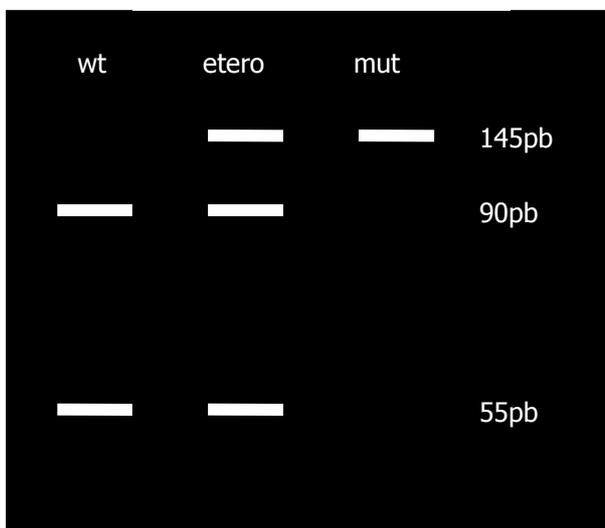
**rs7286680 Int.7 (*Hae* III)**



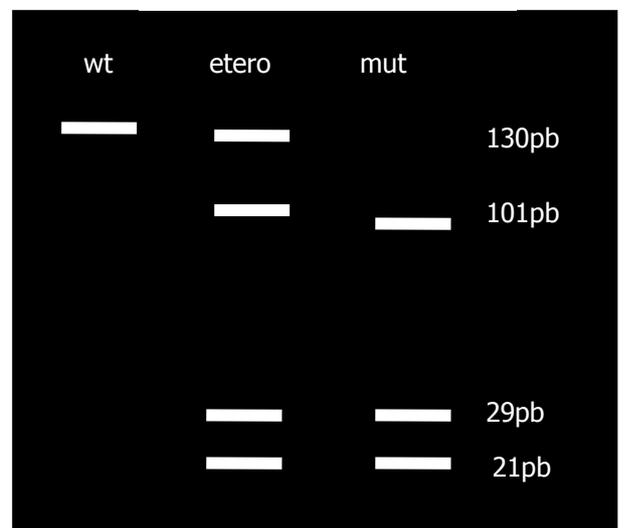
**A66G (*Nde* I)**



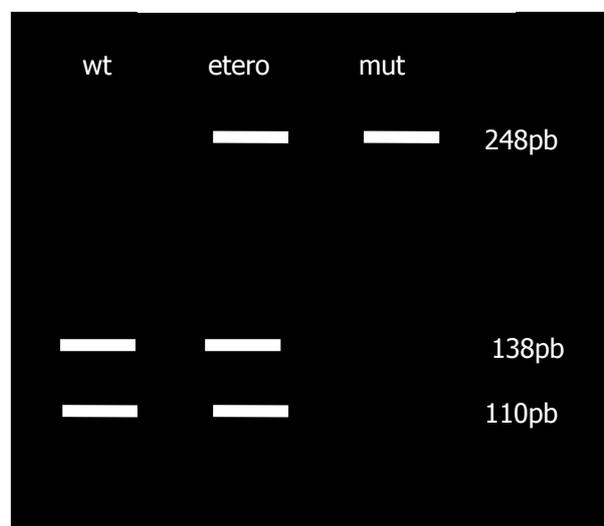
**G776C (*Bst*NI)**



**A67G (*Rsa* I)**



**rs519221 (*Nsi* I)**



### 3.7 SNP: Single Nucleotide Polymorphism

L'acronimo SNP sta per *Single Nucleotide Polymorphism*, cioè polimorfismo di un singolo nucleotide, con riferimento alla forma predominante di variazione genetica che segrega a livello molecolare. Gli SNP sono comunemente usati in numerose indagini biologiche, sia in campo biomedico che ecologico ed evolutivo, soprattutto nell'individuazione di loci responsabili della componente genetica della variazione fenotipica multifattoriale.

I polimorfismi di singoli nucleotidi sono marcatori bi-allelici (presentano cioè solo due varianti alleliche) che prevedono la sostituzione di una base azotata con un'altra (transizioni, transversioni), ma anche le delezioni e le inserzioni di basi singole sono considerate variazioni comuni. Dati recenti indicano che esistono più di dieci milioni di possibili SNP in tutto il genoma umano (circa uno SNP ogni 300 basi) ed è quindi considerato essere il marcatore genetico più frequente.

Gli SNP sono classificati secondo la natura del nucleotide coinvolto:

1. *SNP non codificanti*: si trovano all'interno del gene in regioni non trascritte 5' o 3' NTR, in regioni non tradotte 5' o 3' UTR, possono essere intronici e trovarsi tra due geni (SNP intragenici).
2. *SNP codificanti*: possono essere polimorfismi sinonimi (cioè che cambiano il codone, ma non l'amminoacido) oppure polimorfismi di sostituzione (cioè che cambiano l'amminoacido codificato). Sono rispettivamente causa di mutazioni sinonime e non sinonime.

Le mutazioni non sinonime si suddividono in:

- *Senso*: possono essere localizzate in un residuo non essenziale e quindi non determinare un fenotipo alterato oppure in un residuo essenziale e quindi variare la funzionalità proteica.
  - *Non senso*: causano una terminazione prematura della traduzione, per la presenza di un codone di stop.
3. *SNP di non sostituzione*: comprendono polimorfismi non codificanti e sinonimi capaci di alterare la funzione del gene, agendo sulla regolazione trascrizionale o

traduzionale, sullo splicing, sulla stabilità dell'RNA. Sono stati identificati vari loci del genoma umano in cui sono presenti SNP, a livello del promotore, associati a effetti sull'espressione genica e manifestazioni di tipo clinico.

Il 99% degli SNP si trova in regioni non codificanti, ove fungono da marcatori genetici.

Esistono banche dati costantemente aggiornate presso le quali è possibile ricercare SNP adeguati ai propri scopi.

- dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>): database creato dal National Human Genome Research Institute in collaborazione con NCBI.
- Orchid Biosciences, in Princeton, NJ: la primaria compagnia commerciale che si occupa di confermare gli SNP nei database pubblici.
- The SNP Consortium (<http://snp.cshl.org/>): la più densa mappa di SNP del genoma umano, mantenuta aggiornata dal Cold Spring Harbor Laboratory.

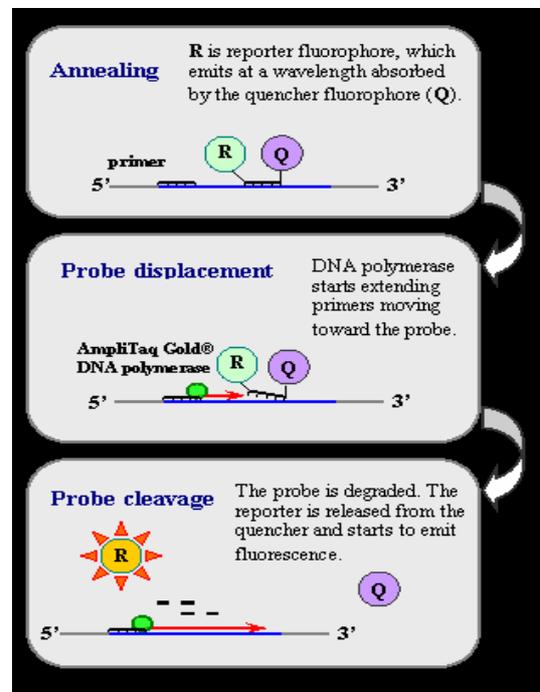
### 3.8 Real Time PCR: Metodo delle sonde TaqMan

Durante la fase sperimentale realizzata in laboratorio, ho estratto il DNA da sangue periferico (conservato in EDTA) degli individui affetti e dei loro genitori secondo il classico protocollo di estrazione manuale adottato nel nostro laboratorio (Higuchi, 1989).

Il DNA ottenuto dai leucociti è stato quindi tipizzato per uno o più SNPs al locus genico studiato. Gli SNP sono stati selezionati usando il Software SNPbrowser, tra i saggi validati proposti dalla ditta che ci ha fornito lo strumento.

La discriminazione allelica, per ciascuna mutazione, è stata valutata simultaneamente utilizzando per ogni locus una coppia di primer e una coppia di sonde marcate con due

differenti fluorocromi (FAM e VIC). Le reazioni di PCR sono state allestite in una miscela di 10 µl contenente 1 µl di DNA genomico, 5 µl di 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e 0,2 µl di 40X SNP Genotyping Assay Mix (specifico per ciascun polimorfismo). Le amplificazioni sono state realizzate utilizzando lo strumento Sequence Detection System ABI PRISM 7500 e il metodo TaqMan secondo il protocollo fornito dalla ditta Applied Biosystems. Nel corso della reazione di PCR la sonda fluorescente si appaia per complementarità al filamento bersaglio e,



durante l'estensione, è degradata con conseguente emissione di fluorescenza. Al termine della reazione di amplificazione la fluorescenza emessa da ciascun campione è scomposta nelle due componenti FAM e VIC, e il genotipo per ciascun locus è determinato dalla loro differenza ( $\Delta R_n$ ). In particolare, il prevalere di una componente fluorescente sull'altra è imputabile alla presenza di un genotipo omozigote, mentre la rilevazione di entrambe è legata alla presenza di un genotipo eterozigote.

### 3.9 Ibridazione *in situ*

Sviluppate alla fine degli anni '60 da Pardue e Gall e, indipendentemente, da John, queste tecniche di ibridazione degli acidi nucleici, si sono basate inizialmente sull'impiego di sonde radioisotopiche (sonde "calde"). A dispetto dell'ampio campo di applicazione e della sensibilità, l'uso di queste tecniche è stato relegato per lungo tempo al solo ambito della ricerca, soprattutto a causa dei problemi connessi con l'impiego di sonde "calde". Con l'avvento delle sonde "fredde", marcate con un tracciante non radioattivo, queste tecniche sono state ampiamente valorizzate e impiegate con successo anche in ambito diagnostico. Infatti, i limiti di sensibilità, connessi con l'uso di sonde "fredde", sono ormai stati superati dalla messa a punto di metodi di rivelazione e amplificazione che hanno consentito di raggiungere sensibilità paragonabili a quelle delle sonde "calde". Le sonde genetiche (calde e fredde) sono costituite da sequenze di DNA o RNA complementari a quelle da ricercare all'interno del tessuto.

Le tecniche d'ibridazione *in situ* permettono di rivelare sequenze specifiche di acidi nucleici in cellule e tessuti morfologicamente conservati mediante l'impiego di sonde geniche marcate con traccianti di diversa natura.

Queste tecniche associano la possibilità di localizzazione, a livello microscopico e ultramicroscopico, di geni di origine cellulare o esogena conservando pressoché inalterata la morfologia cellulare.

Il protocollo generale per una corretta esecuzione della tecnica d'ibridazione *in situ* si basa su alcuni passaggi fondamentali:

1. Preparazione dei vetrini
2. Fissazione del materiale in esame: per campioni costituiti da colture cellulari, sezioni criostatate o fresche (per la fissazione si utilizza paraformaldeide al 4%).
3. Trattamento preparatorio del materiale su vetrino:
  - trattamento con HCl per eliminare le proteine cellulari che potrebbero ostacolare la formazione del legame proteina-bersaglio;
  - trattamento con soluzioni detergenti per estrarre i lipidi di membrana resistenti alla fissazione;

- trattamento con RNAsi (DNAsi free) se si vuole ottenere un'ibridazione DNA-DNA specifica;
  - inattivazione di enzimi endogeni: si utilizza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> all'1% per inattivare la perossidasi;
  - trattamento proteolitico con proteinasi K o tripsina per eliminare completamente le proteine legate al bersaglio e favorire l'attacco della sonda;
  - disidratazione del vetrino con l'uso di alcool a gradazione crescente.
4. Denaturazione del bersaglio e della sonda: può essere compiuta trattando il bersaglio e la sonda con una base forte, oppure, il metodo più semplice prevede la denaturazione al calore. In questo caso è necessario ricoprire il vetrino, a contatto con la miscela d'ibridazione contenente la sonda, con un vetrino copri oggetto, opportunamente fissato con un collante trasparente, per evitare l'evaporazione della miscela con il riscaldamento.
  5. Ibridazione *in situ*: il vetrino è incubato a 37°C per 3-18 ore.
  6. Lavaggi post-ibridazione: servono per eliminare legami aspecifici sonda-bersaglio al termine della reazione d'ibridazione. Si utilizza una soluzione tampone, a diverse temperature, costituita da SSC 2X e formamide.
  7. Rivelazione diretta/indiretta dell'ibrido sonda-bersaglio: la rivelazione della molecola ibrida prevede l'utilizzo di diverse tecniche immunocitologiche e l'uso di un microscopio a fluorescenza.
  8. Osservazione microscopica: in seguito a montaggio dei vetrini in PBS e glicerina (nel rapporto 1:1) i preparati verranno osservati al microscopio a luce visibile.

### 3.10 Studi di espressione genica

Nell'ambito della mia ricerca ho utilizzato studi di espressione genica allo scopo di testare l'espressione di sette geni che mappano in un'area di 2Mb attorno al marcatore D6S259, di cui è stata dimostrata l'associazione con il locus OFC1.

Dalle lamine palatine di topo, al giorno E14.5 di sviluppo embrionale, è stato estratto RNA in seguito sottoposto a retro trascrizione per ottenere cDNA. Da diversi tessuti è stato ottenuto, per retro trascrizione, altro cDNA utilizzato come template per la produzione di sonde geniche necessarie per gli esperimenti di ibridazione *in situ*.

La tecnica usata per la costruzione di sonde ad RNA è rappresentata dalla sintesi di molecole di RNA monofilamento, mediante trascrizione in vitro di DNA stampo a doppio filamento, per mezzo di RNA polimerasi-DNA dipendente di origine fagica. La sintesi di sonde ad RNA è stata resa possibile dallo sviluppo di vettori plasmidici contenenti polilinkers localizzati a valle dei promotori di origine fagica. I promotori utilizzati per la mia ricerca derivano dai batteriofagi T3 e T7 di *Escherichia coli*. I batteriofagi codificano per una specifica RNA polimerasi-DNA dipendente in grado di riconoscere la sequenza specifica del proprio promotore. I prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione del genoma di geni candidati per la LPS, sono stati clonati in un vettore (pCRII-TOPO) dotato di promotori per le RNA polimerasi-DNA dipendenti batteriofagiche. La clonazione è stata eseguita utilizzando il TOPO TA Cloning kit (Invitrogen). In seguito, il plasmide è stato linearizzato mediante incubazione con gli enzimi di restrizione *Not I* e *Bam HI* e trascritto impiegando le RNA polimerasi T3 e T7, per ottenere rispettivamente le sonde senso e antisenso.

La fase successiva ha previsto l'espianto di embrioni di topo, tra i giorni E14.5 – E15.5 di sviluppo embrionale, da femmine gravide C57BL/6. Le teste degli embrioni sono state tagliate al microtomo per ottenere sezioni di tessuto dello spessore di venti micron. Le sezioni tissutali sono state trattate con un crioprotettore (PBS al 30% di glucosio), fissate in PBS con paraformaldeide al 4% per 15 minuti e poi sottoposte ad ibridazione *in situ*.

In parallelo, sono state utilizzate come controlli positivi sezioni di tessuto ibridate per verificare l'espressione dei geni MYH9 e TGFB3, attivati durante i processi di fusione delle lamine palatine di topo al giorno E14.5. I vetrini sono stati quindi montati con PBS al 70% di glicerolo, visualizzati al microscopio elettronico con obiettivo Nomarski (Axioplan; Zeiss) ed infine fotografati (AxioCam digital camera, Zeiss).

## *4. Metodi*

## 4. Metodi

---

### 4.1 Metodi di mappaggio genetico per le patologie complesse

Esistono due principali approcci che permettono di mappare geni che conferiscono suscettibilità genetica a diverse patologie umane: a) Analisi del Linkage e b) Studi di Linkage Disequilibrium o studi di associazione allelica.

**a) L'analisi del linkage** prende in esame la relazione specifica esistente tra due loci genici all'interno di alberi genealogici, cioè di nuclei familiari allargati, che siano informativi per la patologia di interesse.

L'analisi del linkage si avvale dell'identificazione di marcatori polimorfici nell'ambito di gruppi familiari: se i soggetti affetti trasmettono alleli di un dato marcatore in abbinamento all'allele-malattia, con una frequenza statisticamente superiore all'atteso, si conclude che il marcatore è concatenato ('linked') con il gene-malattia.

L'analisi fornisce una stima della distanza in centimorgan (cM) del locus polimorfico dal gene-malattia.

Per definire, su base statistica, l'esistenza di un 'linkage' sono necessari diversi gruppi familiari con numerosi soggetti affetti; inoltre, l'analisi comporta lo studio di diversi marcatori localizzati a monte, a valle o all'interno del gene candidato.

Per ciascun nucleo familiare, vengono valutate, quindi, due ipotesi alternative: la probabilità 'H' che tra due loci qualsiasi, tra quelli considerati, esista associazione, cioè linkage, con frequenza di ricombinazione pari a  $\theta$  e la probabilità alternativa 'H<sub>0</sub>', cioè che i due loci siano indipendenti. Il logaritmo decimale ( $\log_{10}$ ) del rapporto tra queste probabilità, corrisponde al "logarithmic odds" o, più semplicemente, *Lod score*, il cui valore indica quale delle due ipotesi alternative, sia quella più probabile (Morton, 1955).

$$Likelihood - Ratio = \frac{\theta \leq 0.5(\text{Linkage})}{\theta = 0.5(\text{no - Linkage})}$$

$$Z = \log_{10} LR$$

Attraverso il calcolo iterativo del Lod score, assumendo ogni volta un diverso valore di  $\theta$ , si ottiene il Maximun Likelihood Score (MLS), ovvero il valore di  $\theta$  che massimizza il valore del LR.

Per l'intero campione in studio, la probabilità complessiva di linkage, si ottiene dal prodotto delle probabilità in ciascuna famiglia, per cui, trattandosi di logaritmi, i Lod score possono essere sommati tra famiglie.

Morton ha dimostrato che i Lod score rappresentano il calcolo statistico più attendibile per calcolare il linkage nell'ambito degli alberi genealogici, individuando un Lod score di 3 quale soglia stabilita per accettare statisticamente il linkage, con una probabilità di errore del 5%. Il linkage può essere escluso se il Lod score è minore di -2. Valori compresi fra -2 e +3 non consentono di rigettare o accettare, rispettivamente, l'ipotesi di linkage tra i geni, pertanto i loci considerati sono indipendenti (Morton, 1955).

Il metodo del Lod score si distingue in: parametrico e non parametrico (NPL).

L'analisi dei Lod score viene definita "parametrica" perchè richiede un preciso modello genetico, in cui vengono precisate le modalità di eredità, le frequenze geniche e la penetranza di ciascun genotipo al locus malattia. L'analisi del linkage viene generalmente utilizzata per identificare geni responsabili di malattie monogeniche, con elevata penetranza, nella cui insorgenza non sono coinvolti fattori ambientali. L'utilizzo di questo approccio quindi, è poco efficace nell'identificare geni associati a malattie multifattoriali (Gray, 2000). La presenza, infatti, di un limitato numero di generazioni in una famiglia e, di conseguenza, il numero ridotto di eventi di ricombinazione, non permette di individuare la presenza di linkage in così brevi distanze genetiche nei pedigree.

***b) Gli studi di Linkage Disequilibrium (LD) o studi di associazione,*** invece, si basano su una misura statistica che esprime l'associazione non casuale tra gli alleli di loci situati a breve distanza lungo il cromosoma, confronta individui non imparentati, ovvero non appartenenti a gruppi familiari comuni ed infine, non essendo un metodo parametrico, non necessita di alcuna assunzione circa il modello genetico.

Inoltre, gli studi di associazione sono più facili da condurre rispetto all'analisi di linkage perchè non sono necessarie famiglie con più casi o particolari strutture familiari ed è pertanto possibile raggiungere dimensioni campionarie più elevate. Inoltre, poichè il LD è un fenomeno che interessa un breve segmento di genoma, se si individua un'associazione, essa definisce una piccola regione candidata in cui cercare il gene di suscettibilità.

Il vantaggio dell'analisi del LD è che permette di individuare, se è presente, l'associazione di uno o più SNP con un gene candidato: tale LD è il risultato di centinaia di eventi di ricombinazione, che hanno interessato tale regione cromosomica e che si sono verificati nel corso delle generazioni passate (Balding, 2005).

L'elevata frequenza degli SNP nel genoma umano, unita alla loro presunta stabilità in termini di tasso di mutazione relativo, rende tali polimorfismi tra i più adatti per questo tipo studi (Maniatis, 2004). Pertanto, uno degli approcci attualmente impiegati per l'analisi genetica di una patologia complessa, utilizza gli SNP come marcatori in LD con i geni implicati nella patologia in esame. In generale, l'estensione del LD attorno a ciascun marcatore genetico dipende fortemente dalla storia della popolazione considerata pertanto, processi stocastici come il flusso genico, la deriva genetica, mutazioni multiple e la selezione naturale, possono modificare la relazione esistente tra LD ed i loci genetici (Lonjou, 2003; Maniatis, 2004). La conoscenza dell'estensione del LD attorno ad uno SNP in una popolazione è di fondamentale importanza per gli studi di mappaggio basati sull'associazione (Matise, 2007). Approcci puramente teorici, che non tengono conto degli effetti della selezione naturale e degli effetti migratori della popolazione, indicano che tale valore può perdere di significatività a distanze superiori alle 3 Kilobasi (Collins, 2004) e che, pertanto, nell'intero genoma umano, sarebbero necessari circa 500000 SNP per uno screening

completo (Gray, 2000). Predizioni basate, invece, su dati empirici suggeriscono che sarebbero sufficienti 30000 SNP per lo screening del genoma, in quanto il LD sufficiente per l'identificazione di geni associati a patologie complesse si estenderebbe fino a 200 kilobasi attorno ad uno SNP (Wang, 2005).

Per analizzare in dettaglio il contributo di un gene candidato può essere necessaria l'analisi di 5-10 SNP all'interno del gene e nei suoi pressi (Nowotny, 2001), ma lo studio delle malattie complesse, ha una migliore risoluzione attraverso l'analisi degli aplotipi di più SNP in LD tra loro e con la patologia stessa.

## 4.2 Metodi statistici

Al fine di verificare un'eventuale associazione tra i polimorfismi analizzati ed il fenotipo schisato, i dati sperimentali sono stati sottoposti ad elaborazione statistica.

### Equilibrio di Hardy-Weinberg

Una popolazione è in equilibrio di Hardy-Weinberg quando le frequenze alleliche e quelle genotipiche non subiscono variazioni da una generazione a quella successiva.

Queste condizioni vengono soddisfatte quando la popolazione:

- è *panmitica*, ovvero c'è incrocio casuale tra individui, quindi assortimento casuale dei gameti;
- è *infinita* o, comunque, molto ampia;
- è costituita da individui appartenenti a una specie *diploide*, a *riproduzione sessuale* e con *generazioni separate*;
- in essa sono assenti fenomeni di *migrazione*, di *mutazione* e di *selezione naturale*

Il rispetto di tutte queste condizioni risulta molto difficile, in quanto l'accoppiamento è influenzato da vari fattori come, ad esempio, la vicinanza geografica o fattori culturali; non esistono, inoltre, popolazioni infinite e molte di esse sono a generazioni sovrapposte: ne è un esempio la specie umana. Inoltre, i fenomeni di mutazione e selezione sono necessari per garantire la variabilità genetica della popolazione e la sua evoluzione. E' improbabile, infine, che una popolazione non sia interessata da fenomeni migratori, perché ciascun

individuo appartenente ad una popolazione è libero di muoversi, portando con sé i propri geni, escluso il caso in cui ci siano evidenti ostacoli geografici (Barrai, 1987).

Il principio di Hardy-Weinberg, per un locus biallelico L (A,a), può essere espresso dalla seguente equazione:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Dove:

p e q = frequenze alleliche

$p^2$  = frequenza genotipica dell'omozigote AA

$2pq$  = frequenza genotipica dell'eterozigote Aa

$q^2$  = frequenza genotipica dell'omozigote aa.

Il principio di Hardy-Weinberg, che può essere applicato anche a loci con tre o più alleli, verrà espresso, in questo caso, dal quadrato di un polinomio, con tanti termini quanti sono gli alleli al locus considerato.

Per verificare se la popolazione in esame è in equilibrio di Hardy-Weinberg, viene utilizzato il test statistico del  $\chi^2$ ; espresso dalla seguente formula:

$$\chi^2_{[g.l.]} = \sum (O_i - A_i)^2 / A_i$$

dove  $O_i$  è la frequenza osservata nella classe i-esima e  $A_i$  è la frequenza attesa nella classe i-esima in base all'ipotesi formulata. I gradi di libertà (g.l.) si calcolano sottraendo una unità al numero di classi in cui è diviso il campione; sottraendo un ulteriore grado di libertà per ognuno dei parametri stimati per il calcolo del  $\chi^2$ .

Il  $\chi^2$  ottenuto dall'analisi dei dati sperimentali, viene confrontato con i valori tabulati, ai quali corrispondono determinate probabilità; nella tabella del  $\chi^2$ , per un solo grado di libertà, il valore di 3.841 corrisponde alla soglia di significatività del 5%, pertanto un valore di  $\chi^2$  uguale o maggiore di 3.841 può essere osservato, per effetto di deviazioni casuali, solo il 5% delle volte.

## Test del $\chi^2$ di indipendenza

Supponiamo di avere due serie di dati di tipo qualitativo (per esempio categorie A e B) raccolte in condizioni diverse (tempo 1 e tempo 2). Le due serie, associate in una tabella di contingenza 2 X 2, potranno essere confrontate tramite il  $\chi^2$  di indipendenza. Il test per la verifica dell'ipotesi di indipendenza ci consente di stabilire se le distribuzioni delle frequenze per la variabile colonna, in una tabella di contingenza, sono indipendenti dalla variabile riga e viceversa. In tale procedura si assume che un campione sia estratto da un'unica popolazione e che tutti gli elementi del campione siano assegnati esattamente ad una determinata modalità riga e ad una modalità colonna. L'ipotesi nulla è che le due variabili siano indipendenti, quella alternativa è che siano dipendenti.

Una delle applicazioni di questo test statistico consiste nel verificare se esista un'associazione tra un determinato polimorfismo ed una patologia. Nel presente lavoro vengono confrontate due categorie di osservazioni (gruppo di casi, cioè di pazienti affetti da LPS e gruppo di controllo, con individui sani) e i due alleli, osservati ad uno specifico locus SNP. Si può, pertanto, costruire una tabella 2 X 2, come la seguente:

<b>ALLELI</b>	<b>CASO</b>	<b>CONTROLLO</b>	<b>TOTALE</b>
<b>1</b>	a	b	a+b=R <sub>1</sub>
<b>2</b>	c	d	c+d=R <sub>2</sub>
<b>TOTALE</b>	a+c=C <sub>1</sub>	b+d=C <sub>2</sub>	a+b+c+d=N

Dove 'a' è la frequenza osservata per l'allele 1, nei casi; 'b' è la frequenza osservata per l'allele 1, nei controlli; 'c' è la frequenza osservata per l'allele 2, negli affetti; 'd' è la frequenza osservata per l'allele 2, negli individui non affetti.

Il valore del  $\chi^2$  ha un grado di libertà ed assume il valore di:

$\chi^2 =$	$\frac{( ad-bc -1/2 N)^2 N}{(a+b)(a+c)(c+d)(b+d)}$
------------	--

Il valore del  $\chi^2$  di indipendenza indica se debba essere accettata o rifiutata l'ipotesi di indipendenza tra le due classi considerate; se il  $\chi^2$  è significativo, è probabile che esista un'associazione tra polimorfismo allelico e la condizione in cui sono stati osservati i due gruppi di dati; ci fornisce la probabilità che la differenza tra quanto da noi osservato e quanto atteso secondo la legge di Hardy-Weinberg, sia dovuto al caso.

### 4.3 Approccio all'analisi epidemiologica

#### Rapporto crociato di rischio: Odd Ratio

Negli studi volti a verificare l'esistenza di un'associazione statistica tra un determinato polimorfismo e lo stato di salute /malattia, si possono formulare due diverse ipotesi:

- a)** che vi sia associazione tra un determinato allele o un determinato genotipo con la patologia in esame;
- b)** che non vi sia associazione tra le due variabili.

Le misure per quantificare l'entità di tale associazione sono numerose e le più utilizzate sono il rapporto di prevalenza, il Rischio Relativo e l'Odd Ratio.

La misura statistica, comunque, più utilizzata in genetica epidemiologica è il "rapporto incrociato" o "odd ratio" (O.R.). Il termine "odd" può essere reso con "probabilità a favore"; l'odd, in pratica, corrisponde al rapporto fra il numero di volte in cui l'evento si verifica o si è verificato, ed il numero di volte in cui l'evento non si verifica o non si è verificato. Tale misura si calcola in maniera simile al rapporto di prevalenza, con la differenza che si considerano i semplici rapporti (odd) e non le proporzioni.

Negli studi caso-controllo, che cercano di verificare l'esistenza di un'associazione statistica tra un determinato polimorfismo e lo stato di salute/malattia, si possono formulare due diverse ipotesi, cioè che vi sia associazione tra un determinato allele o un determinato genotipo con la patologia in esame, oppure che non vi sia associazione tra le due variabili.

In relazione ai dati 'R' ottenuti, verrà accettata l'ipotesi più verosimile; per verosimiglianza di un'ipotesi (H) si intende la probabilità 'p' di ottenere quei dati osservati 'R', se è vera l'ipotesi 'H', quindi:  $p(R|H)$ .

Per valutare p viene applicato il test dell'Odd Ratio (O.R.), che può essere espresso come il rapporto tra la verosimiglianza dell'ipotesi  $H_i$  e la verosimiglianza dell'ipotesi alternativa  $H_{non-i}$ , cioè che la prima ipotesi sia sbagliata:

$$Odd = H_i/H_{non-i}$$

Nella presente analisi, quindi, l'O.R. viene calcolato sui dati sperimentali, utilizzando la formula:

$$\text{Odds ratio} = \frac{a/b}{c/d} = \frac{a}{b} * \frac{d}{c} = \frac{ad}{bc}$$

→

	sì malattia	no malattia
sì esposizione	a	b
no esposizione	c	d

L'Odd Ratio può assumere valori tra zero e l'infinito: un valore minore dell'unità indica un'associazione negativa, pertanto l'allele è 'protettivo' nei confronti della patologia; se il test assume il valore di uno, troviamo la stessa proporzione dell'allele tra gli individui sani e malati; quindi il polimorfismo è 'indipendente' dalla patologia. Un valore maggiore di uno indica un'associazione tra l'allele e la malattia, esso aumenta il 'rischio' dell'insorgenza della patologia: l'associazione è tanto più elevata quanto più il valore dell'O.R. è grande (Figura Y).

**Interpretazione:**



Figura Y. Valori che l'O. R. può assumere e interpretazione in termini di associazione negli studi caso-controllo.

*5. Studio di geni coinvolti nella via metabolica  
dell'acido folico*

## 5.1 RAZIONALE

---

Negli ultimi anni sono state investigate diverse regioni cromosomiche per la presenza di geni candidati. Tra queste, la regione 1p36, in cui mappa il gene MTHFR, che codifica per l'enzima metilentetraidrofolato reduttasi. Tale enzima svolge un ruolo chiave nella via metabolica del folato, convertendo il 5,10-metilentetraidrofolato in 5-metiltetraidrofolato. In uno studio pubblicato qualche anno fa dal mio gruppo di ricerca, riguardante due polimorfismi (C677T e A1298C) del gene MTHFR, ci è stato possibile dimostrare che mutazioni a carico del gene stesso aumentano il rischio per le madri portatrici di tali varianti di avere figli affetti da labiopalatoschisi (Martinelli, 2001). La variante 677T del gene MTHFR si traduce in un prodotto proteico recante la sostituzione amminoacidica Ala222Val. Il gene che presenta la variante T codifica per una forma termolabile dell'enzima con ridotta attività, responsabile di bassi livelli plasmatici di folati e alti livelli di omocisteina plasmatica. Il gene MTHFR recante la variante A1298C sembra invece codificare per un enzima che agisce sul metabolismo del folato solo durante i periodi di maggior richiesta dello stesso (gravidanza ed embriogenesi).

L'apporto corretto di acido folico è introdotto nell'organismo con la dieta e il suo ingresso nelle cellule è regolato da specifici recettori di membrana che svolgono anche la funzione di trasportatori di acido folico. Uno studio successivo condotto sempre dal mio gruppo e focalizzato sul ruolo di due membri della famiglia dei recettori del folato (FOLR1, FOLR2), indispensabili per il trasporto intercellulare e per il processo d'internalizzazione del folato nelle cellule materne, rendendolo disponibile per il feto, ha escluso il coinvolgimento degli stessi recettori nell'eziologia della LPS (Scapoli, 2005a).

Sulla base dei risultati finora ottenuti è stato appurato che, difficoltà di assimilazione o carenze di acido folico a livello materno, imputabili a mutazioni a carico di geni della catena del folato, determinano un aumento del rischio di sviluppare schisi. E' quindi riconosciuto che l'assimilazione di acido folico da solo o in associazione a vitamine del gruppo B (B6, B12) durante il periodo periconcezionale, abbassa i livelli di omocisteina nel plasma, riducendo fortemente il rischio di schisi, di difetti di chiusura del tubo neurale e l'insorgenza di anomalie a carico degli apparati cardiovascolari e urinari (Jacques, 1999; Krapels, 2004).

Sulla base dei risultati finora ottenuti, durante il primo anno di Dottorato ho verificato l'associazione tra la LPS e polimorfismi presenti in quattro geni coinvolti nella via

metabolica del folato, responsabili del processo di rimetilazione B12-dipendente dell'omocisteina. I geni oggetto del mio studio sono stati: TCN1 (transcobalamina 1), TCN2 (transcobalamina 2), MTR (metionina sintasi) e MTRR (metionina sintasi riduttasi).

Le transcobalamine sono glicoproteine acide del plasma che rivestono un ruolo di notevole importanza nel trasporto della vitamina B12 (cobalamina), dal lume intestinale ad altri distretti cellulari, attraverso il circolo ematico. Esistono tre diversi tipi di transcobalamine (TCN1, TCN2 e TCN3) che differiscono tra loro per la componente oligosaccaridica e per la specificità morfologica e funzionale. La transcobalamina di tipo 1 interviene nei processi di internalizzazione della cobalamina negli epatociti, ma le effettive trasportatrici della cobalamina in tutto l'organismo sono le molecole di transcobalamina 2, anche se la TCN1 è presente in quantità maggiore e lega  $\frac{3}{4}$  della vitamina B12 rispetto alla TCN2.

I geni MTR e MTRR sono responsabili della rimetilazione a metionina del 50% dell'omocisteina formata. La MTRR catalizza la riduzione e la metilazione della cobalamina a metilcobalamina ristabilendo l'attività della metionina sintasi. Polimorfismi a geni codificanti per enzimi coinvolti nella via metabolica del folato/omocisteina, come MTHFR, MTR e MTRR, costituiscono un alto fattore di rischio di predisposizione alla schisi. In un recente studio caso-controllo, Pezzetti *et al.* (Pezzetti, 2004), ha osservato un'elevata frequenza (0.5) della variante 677T al gene MTHFR in madri italiane di pazienti affetti da LPS. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che per madri omozigoti e eterozigoti per la variante allelica 677T al gene MTHFR il rischio di avere figli affetti da LPS, si abbassa notevolmente (Jugessur, 2003). Al contrario, altri studi rilevano una mancata associazione tra le varianti 677T al gene MTHFR (Gaspar, 1999; Vieira, 2005b) e 2756G al gene MTR (Brandalize, 2007) e il fenotipo schisato.

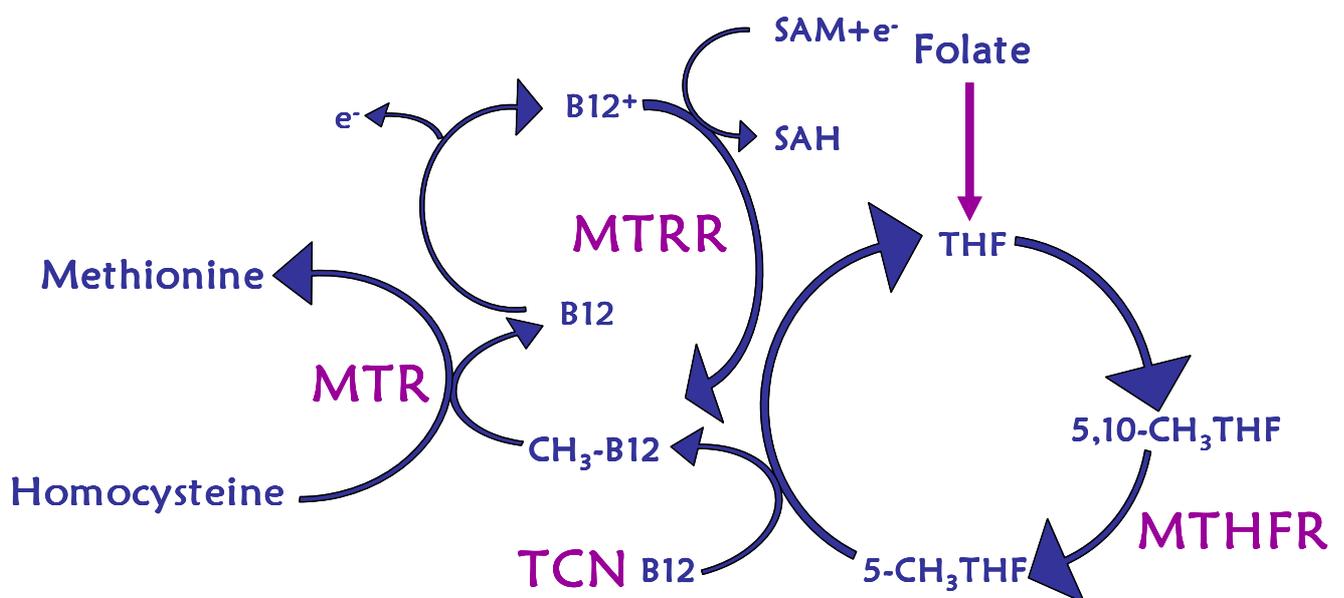
### Via metabolica dell'acido folico/omocisteina

Il metabolismo dell'omocisteina inizia con l'immissione dell'acido folico attraverso la dieta. Nelle cellule, i folati si trovano per lo più poliglutammati, poiché in questa forma hanno una maggiore affinità per gli enzimi folato dipendenti.

Il THF viene interconvertito quindi nei suoi derivati, i quali prendono parte ad un elevato numero di reazioni, svolgendo sempre la funzione di accettori-donatori di unità carboniose. Il folato è rapidamente ridotto da tetraidrofolato (THF) a 5,10-metilentetraidrofolato e, per

azione dell'enzima 5-10-metilenetetraidrofolato riduttasi (MTHFR), convertito in 5-metilentetraidrofolato. Queste reazioni portano alla formazione di gruppi metilici usati per la sintesi della metionina e necessari per la metilazione del DNA. Al successivo passaggio della via metabolica, l'enzima metionina sintasi, codificato dal gene MTR, catalizza la reazione di rimetilazione dell'omocisteina a metionina. La vitamina B12 (cobalamina) è il co-fattore della reazione; infatti, il complesso TCN-B12 si occupa del trasporto dei gruppi metilici coinvolti in questa reazione. La metionina è indispensabile per la produzione di S-adenosilmetionina (SAM), donatore universale di gruppi metilici implicato in processi di metilazione che coinvolgono il DNA, diverse proteine e fosfolipidi.

Lo schema seguente mostra come il Folato sia necessario per la sintesi della metionina.



## 5.2 RISULTATI

Durante la prima fase della ricerca, il DNA estratto dai leucociti del sangue periferico dei pazienti e dei loro genitori è stato tipizzato impiegando quattro SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), uno per ciascun gene, per testare l'associazione con la malattia.

Per la tipizzazione dei polimorfismi, ho utilizzato la tecnica di digestione con endonucleasi di restrizione. Il sito polimorfico, che introduce/elimina un sito di restrizione, viene amplificato mediante reazione di PCR (Reazione a Catena della Polimerasi). L'amplificato è stato quindi incubato con l'enzima di restrizione specifico e i prodotti della digestione sono stati separati elettroforeticamente su gel di poliacrilammide all'8% e resi visibili in seguito a colorazione con etidio bromuro e osservazione ai raggi UV.

I risultati ottenuti in laboratorio sono stati analizzati ed elaborati mediante specifici programmi statistici per lo studio del linkage disequilibrium (TDT). Il TDT risulta significativo ( $P = 0,01$ ) solamente per il polimorfismo C776G al gene TCN2, mettendo in evidenza la trasmissione più frequente, rispetto l'atteso, dell'allele C tra gli individui affetti (rapporto T/NT = 111/75), mentre la non significatività del TDT conferma un non coinvolgimento per quanto riguarda i geni MTR, MTRR e TCN1.

I dati ottenuti sono riportati nella seguente tabella:

Gene	Identificativo SNP	Polimorfismo	Cambio aminoacidico	Freq. allelica	T/NT	<i>P</i> TDT
<b>MTR</b>	rs1805087	A2756G	Asp919Gly	0.84	51/47	0.69
<b>MTRR</b>	rs1801394	A66G	Ile22Met	0.50	112/109	0.84
<b>TCN1</b>	rs519221	T747+97986A	-	0.75	84/75	0.48
<b>TCN2</b>	rs1801198	C776G	Pro259Arg	0.60	111/75	0.01

**Tabella D.** Dati ottenuti dall'analisi del TDT.

In un secondo momento, in base a risultati incoraggianti, sono stati selezionati tre nuovi marcatori per approfondire lo studio del gene TCN2 (Tab. B). L'analisi degli SNP addizionali per il gene TCN2 non ha evidenziato ulteriori dati significativi. Inoltre, dall'analisi degli aplotipi emerge una significativa associazione tra il polimorfismo C776G (Pro259Arg) al gene TCN2 e la patologia, confermando il ruolo di TCN2 nello sviluppo della malformazione.

I dati ottenuti sono riassunti nella seguente tabella:

Identificativo SNP	Polimorfismo	Cambio aminoacidico	Freq. allelica	T/NT	<i>P</i> TDT	2 SNP <i>P</i>	3 SNP <i>P</i>	4 SNP <i>P</i>
rs9606756	A67G	Ile23Val	0.90	34/36	0.81	0.05	0.002	0.002
rs1801198	C776G	Pro259Arg	0.60	111/75	0.01	0.01	0.002	-
rs7286680	T1107-394G	-	0.53	84/102	0.19	0.26	-	-
rs10418	*T444C	-	0.25	79/68	0.36	-	-	-

**Tabella E.** Dati ottenuti dall'analisi degli aplotipi per i marcatori al locus TCN2.

Per tutti i soggetti caratterizzati per la mutazione C776G sono state ricavate le frequenze genotipiche per il calcolo dell'equilibrio di Hardy-Weinberg. In base ai valori di Chi quadro, non sono state rilevate deviazioni dall'equilibrio di H-W.

I valori sono riportati nella seguente tabella:

Individui	N	Genotipo			Frequenza		$\chi^2$	<i>P</i>
		C776C	C776G	G776G	776C	776G		
Controlli	289	89	150	50	0.57	0.43	Ref.	Ref.
Padri	206	79	96	31	0.62	0.38	2.39	0.12
Madri	212	76	93	43	0.58	0.42	0.11	0.74
Pazienti	218	85	110	23	0.64	0.36	5.78	0.02

**Tabella F.** Frequenze genotipiche, alleliche e Chi quadro.

Si può notare che, per i pazienti affetti da LPS, il Chi quadro è significativo ( $P < 0.05$ ); quindi, la frequenza dell'allele C nel gruppo dei pazienti affetti è significativamente più alta, rispetto al gruppo di controllo.

Sulla popolazione di controllo è stato calcolato l'Odd ratio, mediante tabelle di contingenza 2 X 2 per gli eterozigoti e gli omozigoti, in cui il fattore di rischio è rappresentato dal genotipo degli individui portatori dell'allele C.

<b>Gruppi</b>	<b>Odd ratio</b>	<b>Intervallo di confidenza</b>
<b>CG</b>	1.59	0.92 - 2.77
<b>CC</b>	2.08	1.17 - 3.70
<b>CG-CC</b>	1.77	1.04 - 3.01

**Tabella G.** Odd ratio e relativi intervalli di confidenza.

I valori di Odd ratio risultano non significativi per gli individui CG, mentre appaiono significativi nel caso di individui omozigoti per l'allele C e, complessivamente, per tutti gli individui portatori dell'allele C (omo- o eterozigoti) osservati contemporaneamente. Ciò significa che la presenza dell'allele C può costituire un aumento del rischio per l'insorgenza della LPS negli individui portatori di tale variante allelica del marcatore rs1801198 mappante al locus TCN2.

## 5.3 DISCUSSIONE

---

L'apporto giornaliero di folato e vitamine del gruppo B, durante il periodo periconcezionale, riduce fortemente il rischio di insorgenza di difetti del tubo neurale e malformazioni congenite (Botto, 2004). Uno studio di Van Rooij e colleghi (van Rooij, 2003) ha dimostrato che esiste associazione tra la LPS e la concentrazione plasmatica di folato, di omocisteina e delle vitamine B6 e B12, evidenziando la probabile correlazione tra i livelli di concentrazione plasmatica di queste molecole e l'insorgenza di mutazioni a carico di geni coinvolti nella via metabolica del folato.

E' stato appurato che il genotipo materno al gene MTHFR influenza la manifestazione del fenotipo schisato (Martinelli, 2001; Pezzetti, 2004). Uno studio successivo, focalizzato sul ruolo di due membri della famiglia dei recettori del folato (FOLR1, FOLR2), indispensabili per il trasporto intercellulare e per il processo di internalizzazione del folato nelle cellule materne, rendendolo disponibile per il feto, ha escluso il coinvolgimento degli stessi recettori nell'eziologia della LPS (Scapoli, 2005a).

Sulla base di questi risultati, durante il primo anno di Dottorato ho verificato l'associazione tra la LPS e polimorfismi presenti in quattro geni coinvolti nella via metabolica del folato, responsabili del processo di rimetilazione B12-dipendente dell'omocisteina. I geni oggetto del mio studio sono: TCN1 (transcobalamina 1), TCN2 (transcobalamina 2), MTR (metionina sintasi) e MTRR (metionina sintasi reduttasi). Per la mia ricerca ho utilizzato un campione di studio di 218 triadi italiane (padre, madre e probando). I campioni di DNA sono stati tipizzati per un totale di 7 SNP. L'analisi del linkage disequilibrium evidenzia un coinvolgimento del gene TCN2 nell'eziologia della malformazione, ma non supporta il ruolo dei geni TCN1, MTR e MTRR. Dall'analisi degli aplotipi spicca la significativa associazione tra il polimorfismo C776G (Pro259Arg) al gene TCN2 e la LPS; inoltre, si osserva la overtrasmissione dell'allele C agli individui affetti. Non sono stati ottenuti risultati significativi per nessun altro SNP.

Le transcobalamine sono glicoproteine acide plasmatiche che hanno ruolo e importanza diversa nel trasporto della vitamina B12 (cobalamina) dal lume intestinale alle varie cellule attraverso il circolo ematico. Il complesso transcobalamina 2- vitamina B12 viene rilasciato nei fluidi corporei attraverso la membrana basale delle cellule epiteliali intestinali, attraverso un meccanismo di esocitosi mediata da recettori. Sembra che la cellula sia in grado di regolare la produzione di transcobalamina 2 in funzione della richiesta di

cobalamina. A basse concentrazioni di vitamina B12 aumenta la sintesi di transcobalamina 2 per favorirne il trasporto.

La vitamina B12 è essenziale per un corretto metabolismo delle unità monocarboniose; infatti, la metilcobalamina svolge il ruolo di cofattore, trasportando i gruppi metilici dal 5-metiltetraidrofolato all'omocisteina, nella reazione catalizzata dall'enzima metionina sintasi, per la rigenerazione della metionina. La reazione di metilazione dell'omocisteina potrebbe essere inibita dalla ridotta produzione di 5-metiltetraidrofolato, dovuta alla presenza delle varianti alleliche del polimorfismo al gene MTHFR. Anche la scarsa disponibilità di vitamina B12, a causa di malassorbimento o di scarso apporto della stessa con la dieta, potrebbe essere un fattore limitante per questa reazione.

Diversi studi hanno dato risultati contrastanti riguardo ad una probabile relazione tra il polimorfismo C776G al gene TCN2 in proporzione alla quantità di cobalamina circolante e legata alla transcobalamina a formare un complesso (Afman, 2002; Fodinger, 2003 #184; Winkelmayr, 2004).

Due studi condotti dal mio gruppo di ricerca, hanno ampiamente dimostrato che polimorfismi a carico dei geni MTHFR e TCN2, incrementano il rischio d'insorgenza della LPS, sarebbe quindi interessante approfondire lo studio, verificando se l'interazione tra il genotipo materno al gene MTHFR ed il genotipo del figlio affetto al gene TCN2, possa influenzare il rischio di manifestare il fenotipo schisato.

## *6. Studio del gene MYH14*

## 6.1 RAZIONALE

---

I risultati ottenuti in un recente studio (Martinelli, 2007), condotto dal mio gruppo di ricerca, indicano il gene della miosina 9 (MYH9), codificante per la catena pesante della miosina non muscolare di tipo IIA, come fattore di predisposizione alla labiopalatoschisi non sindromica. Il gene MYH9 risulta espresso in tutte le cellule dell'organismo ed esperimenti di ibridazione *in situ* e di immunistoichimica hanno rilevato la presenza del trascritto, ad elevati livelli, nell'epitelio delle lamine palatine di topo prima della loro fusione ed a livello di tessuti di derivazione epiteliale dei denti, dei follicoli piliferi e delle ghiandole lacrimali. Uno studio di associazione condotto su un campione di 218 triadi (padre, madre e figlio affetto) ha confermato l'associazione tra il gene MYH9 e la malattia.

Sulla base dei risultati ottenuti per il gene MYH9, durante il secondo anno di Dottorato, ho esteso la mia ricerca al gene MYH14, che codifica per la catena pesante della miosina non muscolare di tipo IIC, allo scopo di verificare l'eventuale associazione tra LPS e polimorfismi mappanti sul gene. Ho rivolto la mia attenzione alla miosina 14 in quanto presenta l'80% di omologia con il gene MYH9 e mappa in 19q13.2, all'interno della regione candidata OFC3 (Oral Facial Cleft 3), ampiamente studiata dal mio gruppo di ricerca (Pezzetti, 2007) e da altri autori (Stein, 1995a; Warrington, 2006).

## 6.2 RISULTATI

Durante la fase sperimentale realizzata in laboratorio ho estratto il DNA da sangue periferico (conservato in presenza di EDTA) degli individui affetti e dei loro genitori secondo il classico protocollo di estrazione manuale.

Il DNA ottenuto dai leucociti è stato tipizzato per sei SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) mappanti al locus MYH14, mediante l'utilizzo dello strumento ABI PRISM 7500 Sequence Detection System e il metodo delle sonde TaqMan.

I dati genetici relativi ai campioni di riferimento sono stati utilizzati per l'analisi statistica ed elaborati mediante specifici programmi statistici (TDTPHASE, compreso nel pacchetto UNPHASED versione 2.403). UNPHASED è in grado di analizzare le frequenze genotipiche per verificare l'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE). Una volta verificato l'equilibrio, il programma esegue l'analisi statistica necessaria a verificare la presenza di eventuale linkage disequilibrium (LD) tra alleli e malattia. Successivamente, esegue un'analisi che verifica la presenza di LD anche per gli aplotipi e la patologia. Sia l'analisi mediante il TDT sia l'analisi degli aplotipi, condotta considerando la trasmissione di blocchi di due o tre SNP, ha fornito risultati non significativi per tutti i marcatori allelici analizzati. Da sottolineare che, dall'analisi statistica, è emerso che i marcatori rs4801822, rs7251148 e rs653584 non sono in equilibrio di Hardy-Weinberg.

I risultati sono riassunti nella tabella H:

	Identificativo SNP	Localizzazione cromosomica	Distanza in pb	Variazione allelica	HWE <i>P</i>	T/NT	TDT <i>P</i>	2 SNP <i>P</i>	3 SNP <i>P</i>
<b>1</b>	rs671662	Chr19:55402781	15601	A/T	.26	83/86	.82	.78	.86
<b>2</b>	rs4801822	Chr19:55418382	25228	G/A	.01	114/128	.37	.79	.81
<b>3</b>	rs11670669	Chr19:55443610	19811	A/G	.75	102/98	.78	.43	.07
<b>4</b>	rs3745504	Chr19:55463421	19746	T/C	.16	97/79	.17	.17	.46
<b>5</b>	rs653584	Chr19:55483167	17394	G/A	.02	94/79	.25	.68	-
<b>6</b>	rs7251148	Chr19:55500561	-	T/G	.01	103/92	.43	-	-

**Tabella H:** Sono riportati i codici di identificazione degli SNP indagati nello studio del gene MYH14, la posizione che occupano sul cromosoma 19, la distanza espressa in paia di basi che ha uno SNP rispetto al successivo, la variazione allelica e tutti i risultati ottenuti dell'analisi statistica.

## 6.3 DISCUSSIONE

---

Durante il secondo anno di Dottorato ho investigato il gene MYH14, codificante per la catena pesante della miosina non muscolare di tipo IIC, per verificare una potenziale associazione tra polimorfismi correlati al gene studiato e le schisi labiopalatine.

Ho deciso di focalizzare i miei studi sul gene MYH14 perché mostra l'80% di omologia con MYH9 e mappa sul braccio lungo del cromosoma 19, in una delle regioni candidate per le schisi identificata come OFC3 (Martinelli, 2007). A tal proposito ho proceduto alla genotipizzazione per sei SNPs intragenici, utilizzando un campione di studio costituito da 239 triadi Italiane.

I dati ottenuti sperimentalmente sono stati sottoposti ad indagine statistica per lo studio del linkage disequilibrium (TDT). L'analisi mediante il TDT ha fornito risultati non significativi per ognuno dei marcatori biallelici analizzati; inoltre, anche dall'analisi degli aplotipi, condotta considerando la trasmissione di blocchi di due o tre SNP, anche il  $P$  globale risulta non significativo. Questi risultati confermano che tra il gene MYH14 e la patologia, nella popolazione in studio da me indagata, non è stata rilevata associazione. Da sottolineare che, dall'analisi statistica, è emerso che i marcatori rs4801822, rs653584 e rs7251148 non sono in equilibrio di Hardy-Weinberg.

La deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, potrebbe essere legata ad errori di genotipizzazione, immediatamente esclusi effettuando un test di rigenotipizzazione random sullo stesso campione di studio. Inoltre, secondo Nielsen e colleghi (Nielsen, 1998), in alcuni casi, il linkage disequilibrium (LD) può determinare una condizione di disequilibrio di HW.

E' possibile pertanto concludere che, in base agli studi effettuati, il gene MYH14 non sembra essere coinvolto nell'eziologia della LPS; tuttavia, sarebbe interessante procedere con ulteriori studi per individuare le cause del discostamento dall'equilibrio di Hardy-Weinberg.

## *7. Studio del gene JARID2*

## 7.1 RAZIONALE

---

Il locus OFC1 che mappa sul braccio corto del cromosoma 6 rappresenta una delle regioni cromosomiche più indagate per le schisi. Già da uno studio pioneristico di Eiberg (Eiberg, 1987) sono stati ottenuti risultati significativi di linkage tra il fattore XIII della coagulazione, che mappa nella regione 6p24-23, e la LPS. Inoltre, sono state evidenziate delezioni di specifiche regioni del cromosoma 6, risultate essere correlate con l'insorgenza della malattia (Moreno, 2004). Il nostro gruppo di ricerca ha precedentemente condotto uno studio di linkage dimostrando che nel 60% delle famiglie analizzate la malattia segrega con alleli di marcatori genetici in 6p23 (Scapoli, 1997).

Sulla base dei risultati positivi ottenuti dall'analisi di linkage, durante il terzo anno di Dottorato, ho focalizzato i miei studi su questa regione allo scopo di individuare il gene responsabile della trasmissione della LPS. L'approccio sperimentale è stato misto, in quanto ha usato in parte l'approccio tipico del clonaggio posizionale ed in parte un approccio di tipo funzionale. La strategia di selezione tra i geni candidati è stata basata sulla valutazione della loro attività e le fasi dello sviluppo embrionale della regione oro facciale. E' stata valutata, infatti, l'espressione genica durante le fasi di crescita, avvicinamento e fusione delle lamine palatine in embrioni di topo.

## 7.2 RISULTATI

---

Lo studio di linkage ha indicato una regione candidata di circa 2 mega basi (Scapoli, 1997). L'analisi bioinformatica ha rivelato che sono sette i geni noti che mappano in quest'area e quindi inizialmente sono stati considerati tutti geni candidati. I geni sono: SIRT5, NOL7, RANBP9, CCDC90A, RNF182, CD83 e JARID2.

L'analisi dell'espressione genica è stata inizialmente condotta mediante RT-PCR usando come templatato cDNA ottenuto dalle lamine palatine di embrione di topo al giorno 14.5 di gestazione. L'amplificato del gene JARID2 è già evidente al trentesimo ciclo di PCR, mentre l'espressione dei geni SIRT5, RANBP9 e CD83 si evidenzia solamente dopo 35 cicli di amplificazione. In seguito, per valutare meglio la localizzazione spaziale dell'espressione di JARID2 e valutarne il decorso temporale, è stata utilizzata la tecnica dell'ibridazione dell'mRNA *in situ*. È stato osservato che JARID2 è molto espresso nelle cellule epiteliali attorno alle cavità nasali e nei processi palatini embrionali durante la loro convergenza e successivamente alla loro fusione, l'espressione decresce rapidamente. Questi risultati lasciano supporre un ruolo specifico di JARID2 negli eventi morfogenetici del cavo orale.

Il passo successivo è stato quello di supportare i risultati ottenuti dagli studi di espressione testando la relazione tra il gene JARID2 e l'evento malformativo. È stato condotto uno studio di associazione con un campione di 218 triadi (padre, madre e probando) di cui 131 erano casi sporadici e 87 erano casi famigliari.

Inizialmente, sono stati selezionati nove SNP all'interno del gene JARID2 utilizzando Applied Biosystems SNPbrowser Software. Dato che i risultati erano incoraggianti, sono stati inclusi nell'analisi altri quattro SNP, di cui: due polimorfismi di inserzione/delezione (marcatori 7 e 10) individuati con screening di mutazione e due SNP (marcatori 12 e 13) scelti all'interno del gene DTNBP1 che mappa 2 Kb a valle di JARID2 (Figura 7.1). I genotipi per tutti gli SNP sono stati ottenuti una tecnica di PCR fluorescente con utilizzo dello strumento ABI PRISM 7500 Sequence Detection System e il metodo TaqMan secondo i protocolli forniti dall'azienda. I polimorfismi di inserzione/delezione sono stati genotipizzati mediante gel di poliacrilammide.

In Tabella I sono riassunte le caratteristiche dei marcatori.

<b>marcatore</b>	<b>Identificativo SNP</b>	<b>Localizzazione cromosomica</b>	<b>polimorfismo</b>	<b>MAF</b>
<b>1</b>	rs6915344	Chr6:15348423	C/T	0.403
<b>2</b>	rs9464779	Chr6:15362784	T/C	0.490
<b>3</b>	rs2072820	Chr6:15482523	T/C	0.497
<b>4</b>	rs2237149	Chr6:15520044	C/A	0.382
<b>5</b>	rs2299043	Chr6:15565149	G/A	0.316
<b>6</b>	rs2237138	Chr6:15571374	T/C	0.330
<b>7</b>	c.49442_48del	Chr6:15576711	in/del	0.340
<b>8</b>	rs2076056	Chr6:15595761	C/G	0.321
<b>9</b>	rs2282819	Chr6:15611488	G/A	0.289
<b>10</b>	rs3455301	Chr6:1562379	in/del	0.241
<b>11</b>	rs2072821	Chr6:1562015	G/C	0.253
<b>12</b>	rs2056942	Chr6: 15650277	C/A	0.241
<b>13</b>	rs35861734	Chr6:15716490	A/C	0.242

**Tabella I.** Caratteristiche dei marcatori

I genotipi ottenuti sono stati analizzati con il programma FBAT per verificare l'associazione alla malattia. Il calcolo dei  $P$  nell'analisi di associazione per ogni singolo marcatore, è stata condotta usando 100000 permutazioni di Monte-Carlo e i valori sono riassunti nella seguente tabella:

<b>marcatore</b>	<b>Identificativo SNP</b>	<b>Z score</b>	<b><math>P</math></b>
<b>1</b>	rs6915344	-1.781	0.0858
<b>2</b>	rs9464779	0.420	0.75238
<b>3</b>	rs2072820	2.434	0.01720
<b>4</b>	rs2237149	-2.523	0.01370
<b>5</b>	rs2299043	3.230	0.00089
<b>6</b>	rs2237138	3.677	0.00012
<b>7</b>	c.49442_48del	-1.755	0.08893
<b>8</b>	rs2076056	3.681	0.00023
<b>9</b>	rs2282819	-2.286	0.02297
<b>10</b>	rs3455301	1.229	0.20040
<b>11</b>	rs2072821	-1.249	0.22333
<b>12</b>	rs2056942	0.474	0.56145
<b>13</b>	rs35861734	0.000	0.97672

**Tabella L.** Valori di  $P$  per ogni singolo marcatore

Si osserva che sei marcatori su undici danno valori significativi di associazione; inoltre, per i marcatori rs2299043, rs2237138, rs2076056, sono stati riscontrati indici di significatività statistica molto elevata ( $P$  inferiori a 0.001).

L'utilizzo del test statistico FBAT-MM ha permesso di valutare complessivamente l'associazione tra la patologia e tutti i marcatori analizzati. L'analisi è stata condotta separatamente, prima sul totale dei 13 marcatori e poi sui 9 marcatori del gene JARID2, escludendo i marcatori rs2056942 e rs35861734 che mappano nel gene adiacente DTNP1 (i valori di  $P$  sono rispettivamente 0.56145 e 0.97672).

Calcolo del Linkage disequilibrium

Per l'analisi del linkage disequilibrium tra i marcatori è stato utilizzato il programma statistico Haploview.

Sono stati individuati tre blocchi di aplotipi: il primo include i marcatori 1 e 2, il secondo i marcatori da 4 a 9 e il terzo i marcatori 12 e 13. L'analisi di associazione tra gli aplotipi di ogni blocco e la LPS è stata condotta usando il programma HBAT ed implementando 1000000 di permutazioni di Monte-Carlo.

I risultati ottenuti dall'analisi degli aplotipi sono riassunti nella seguente tabella:

Blocco 1		Blocco 2						Blocco 3	
1	2	4	5	6	7	8	9	12	13
$P=0.045$		$P=0.000019$						$P=0.71$	

**Tabella M.** Risultati dell'analisi degli aplotipi

Per i primi due blocchi si osserva un  $P$  significativo, a conferma dell'esistenza di associazione tra il gene JARID2 e l'eziologia della LPS, mentre per il terzo blocco si osserva un valore di  $P$  non significativo, indice di una mancanza di associazione tra il gene DTNBP1 e la malattia. Il blocco 2 presenta valori altamente significativi di  $P$  anche in seguito a correzione con il metodo di Bonferroni ( $P = 0.00019 \times 3 = 0.00057$ ). L'analisi con HBAT ha permesso di evidenziare la overtrasmissione dell'aplotipo 3 (h 3) agli individui affetti; si osserva anche una minore trasmissione dell'aplotipo 9 (h 9) rispetto all'atteso, che potrebbe indicare un effetto protettivo sul rischio di sviluppare la patologia (Tabella N ).

L'analisi degli aplotipi al blocco due è stata condotta separatamente su famigliari e sporadici. L'analisi di associazione degli aplotipi risulta statisticamente significativa per entrambi i gruppi; si osservano valori di  $P = 0.0007$  e  $P = 0.02$  rispettivamente per i casi famigliari e sporadici.

#### Calcolo del fattore di rischio

Il rischio genotipico per marcatori ogni marcatore è stato calcolato con le formule proposte da (Scherag, 2002). Il valore più significativo è stato ottenuto per il marcatore 8 (rs2076056), per il quale si osserva un valore di rischio relativo 1.83 (I.C. 95% = 0.99-3.41) e 3.10 (I.C.95% = 0.28-0.81) rispettivamente per gli individui portatori della variantei allelica al marcatore 8, in eterozigosi e in omozigosi. Il rischio attribuibile risulta 0.55 (I.C. 95% = 0.28-0.81).

### Screening di mutazione

Dall'analisi di associazione sono stati ottenuti risultati incoraggianti per cui è stato condotto uno screening per la ricerca di mutazioni genetiche in JARID2. Il campione in questo caso era di 25 individui non correlati tra loro: 10 sono stati selezionati perché sono portatori di uno o due degli aplotipi che da questo studio sono risultati overtrasmessi; 15 sono stati selezionati perché presentano il più elevato valore di Lod Score, ottenuto dall'analisi di linkage con i marcatori studiati nella regione cromosomica 6p23 (Scapoli, 1997). Sono state individuate quattro mutazioni sinonime all'esone 7 (rs34326651, rs7768621, rs742099, rs2235258, una non sinonima rs35474598 e due introniche (marcatori 7 e 10) più frequenti. Il tipo di variazioni osservate tende ad escludere un ruolo specifico di queste varianti nell'insorgenza della LPS. Tuttavia non è possibile escludere un ruolo potenziale di questi polimorfismi in meccanismi di controllo dell'espressione genica e di processi di maturazione dell'RNA. Abbiamo quindi studiato l'effetto di SNP sui meccanismi di splicing del messaggero codificante per il gene JARID2 (figura 7.3).

## 7.3 DISCUSSIONE

---

Studi effettuati da diversi gruppi di ricerca hanno evidenziato risultati che suggeriscono la localizzazione sul braccio corto del cromosoma 6 di un gene implicato nello sviluppo delle schisi (Scapoli, 1997; Moreno, 2004).

Ipotizzando che il gene responsabile delle schisi sia espresso durante lo sviluppo del palato, per questo studio è stato scelto un approccio che prevede l'indagine di sette geni candidati durante i processi di fusione delle lamine palatine.

Gli esperimenti d'ibridazione *in situ* hanno rivelato la massima espressione del trascritto del gene JARID2 nelle cellule epiteliali attorno alle cavità nasali e nei processi palatini, durante lo sviluppo del palato nel topo. Inoltre, come riportato per i geni MYH9 e TGFB3 (Martinelli, 2007), anche l'espressione di JARID2 è massima al giorno 14.5 di sviluppo embrionale durante i processi di fusione delle lamine palatine per poi decrescere fino a scomparire subito dopo la loro fusione (Figura 7.2).

Il passo successivo è stato quello verificare il coinvolgimento del gene JARID2 con la malattia attraverso uno studio di associazione. Si evidenziano una overtrasmissione di alcuni aplotipidi e alleli al gene JARID2, indice di un coinvolgimento del gene con la patologia. Una significativa associazione è stata verificata sia in casi famigliari che in casi sporadici; valori di associazione più significativi sono stati evidenziati nel gruppo dei casi famigliari, ciò è a sostegno dell'ipotesi che i fattori genetici svolgono un ruolo preponderante nei casi famigliari, mentre i fattori ambientali concorrono maggiormente nel determinare il fenotipo schisato nei casi sporadici.

Complessivamente il rischio attribuibile, calcolato per il marcatore 8 è 0.55 (I.C.=95% 0.28-0.81) mentre il rischio relativo calcolato per eterozigoti e omozigoti sono rispettivamente 1.83 (I.C. 95% = 0.99-3.41) e 3.10 (I.C.95% = 0.28-0.81).

Il gene JARID2 codifica per un fattore di trascrizione con un dominio di interazione AT-Rich (ARID) associato a due regioni di omologia JmjC e JmjN appartenenti alla famiglia di jumonji (Lee, 2000). Sebbene il ruolo e la funzione di JARID2 non siano noti, esperimenti condotti su topi knockout hanno rilevato un contributo importante del gene nello sviluppo del cuore, del fegato, nei processi ematopoietici e nei meccanismi di chiusura del tubo neurale nell'embrione di topo (Jung, 2005). In topi knockout per il gene JARID2 sono state spesso osservate malformazioni cardiache con difetti di sedimentazione interventricolare. Questo risulta estremamente rilevante se si considera che il setto interventricolare si

accresce e si fonde in corrispondenza del pavimento endocardico inferiore, dividendo il ventricolo in due camere identiche in un processo che molto assomiglia alla separazione tra cavità orale e cavità nasali per la fusione dei processi palatini.

I dati ottenuti nell'ambito della mia indagine supportano fortemente il coinvolgimento di JARID2 sia nel normale sviluppo orofacciale che nella determinazione della LPS. Ulteriori sforzi sono necessari per arrivare all'identificazione delle mutazioni che causano la malformazione. Questo passo potrebbe da una parte costituire la prova definitiva del ruolo di JARID2 e dall'altra aprire nuove possibilità di applicazione in campo clinico.

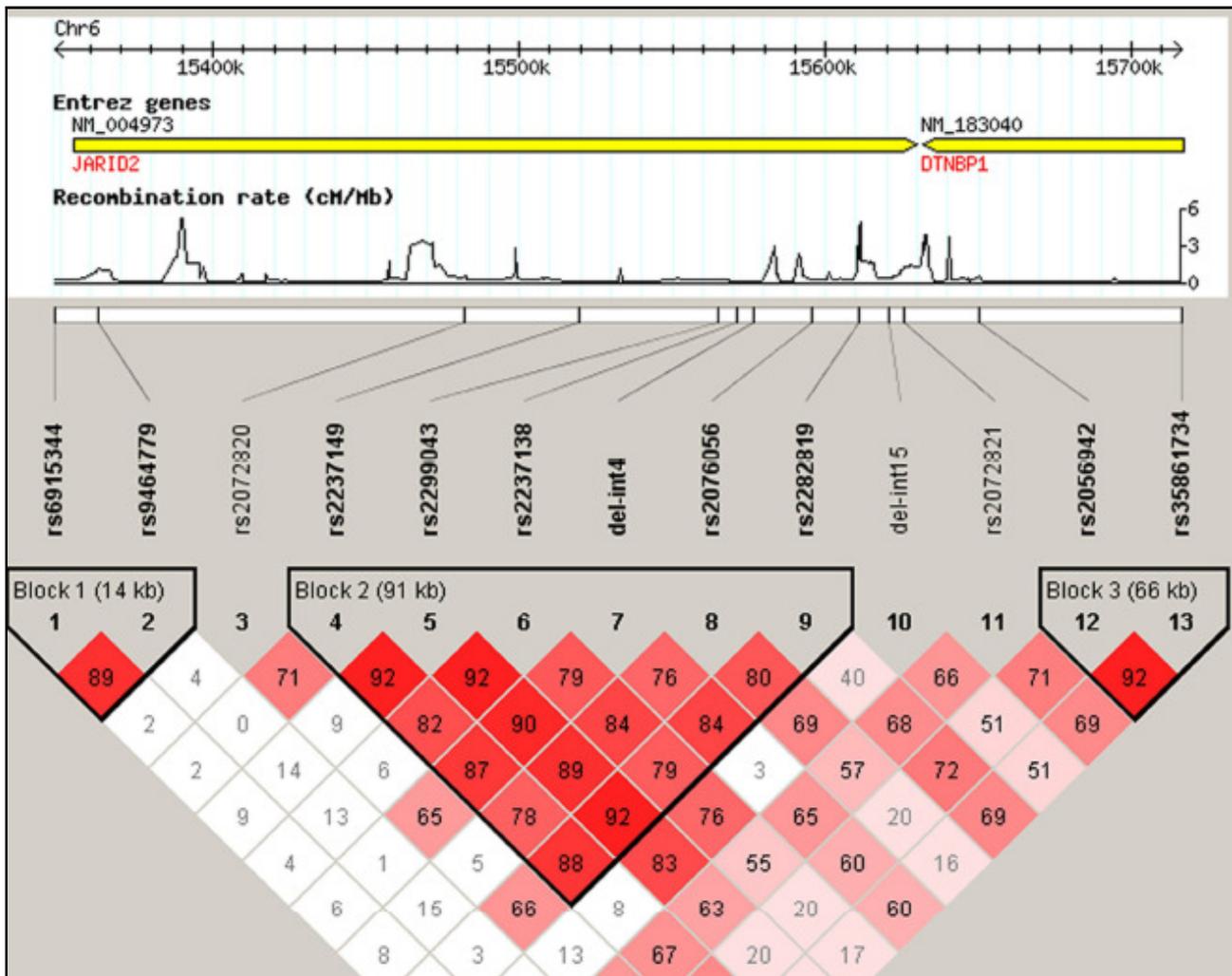
haplotype	Marker						freq <sup>a</sup>	P value <sup>b</sup>
	4	5	6	7	8	9		
h1	c	g	t	in	c	g	0.27	1.0
h2	c	a	c	in	g	g	0.26	1.0
h3	a	g	t	del	c	a	0.21	0.000108
h4	a	g	t	del	c	g	0.06	1.0
h5	a	g	t	in	c	g	0.04	1.0
h6	a	g	t	in	c	a	0.02	1.0
h7	c	a	c	in	c	g	0.02	1.0
h8	c	g	t	del	c	g	0.01	1.0
h9	a	g	t	del	g	a	0.01	0.035226

**Tabella N.** Risultati dell'analisi di associazione degli aplotipi per il blocco 2 con frequenza > 1%.

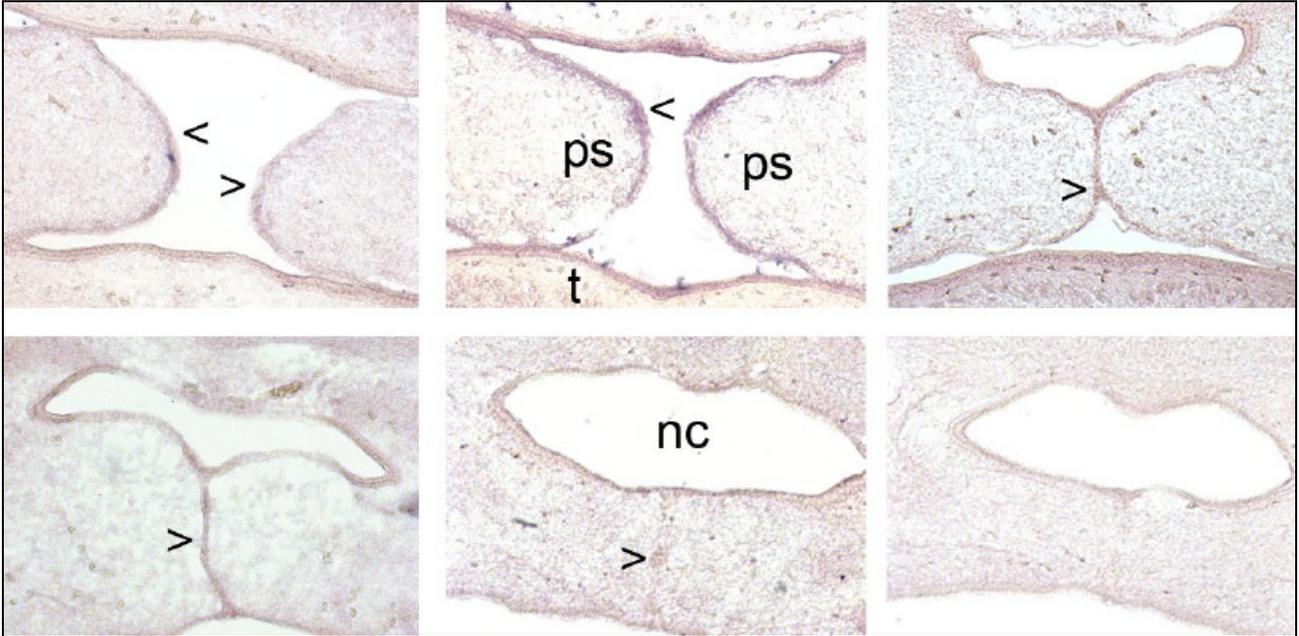
L'aplotipo h3 mostra associazione positiva, mentre l'aplotipo h9 mostra associazione negativa.

freq<sup>a</sup> = frequenza aplotipica stimata.

P value<sup>b</sup> = valore corretto di Pvalue per il test multiplo.

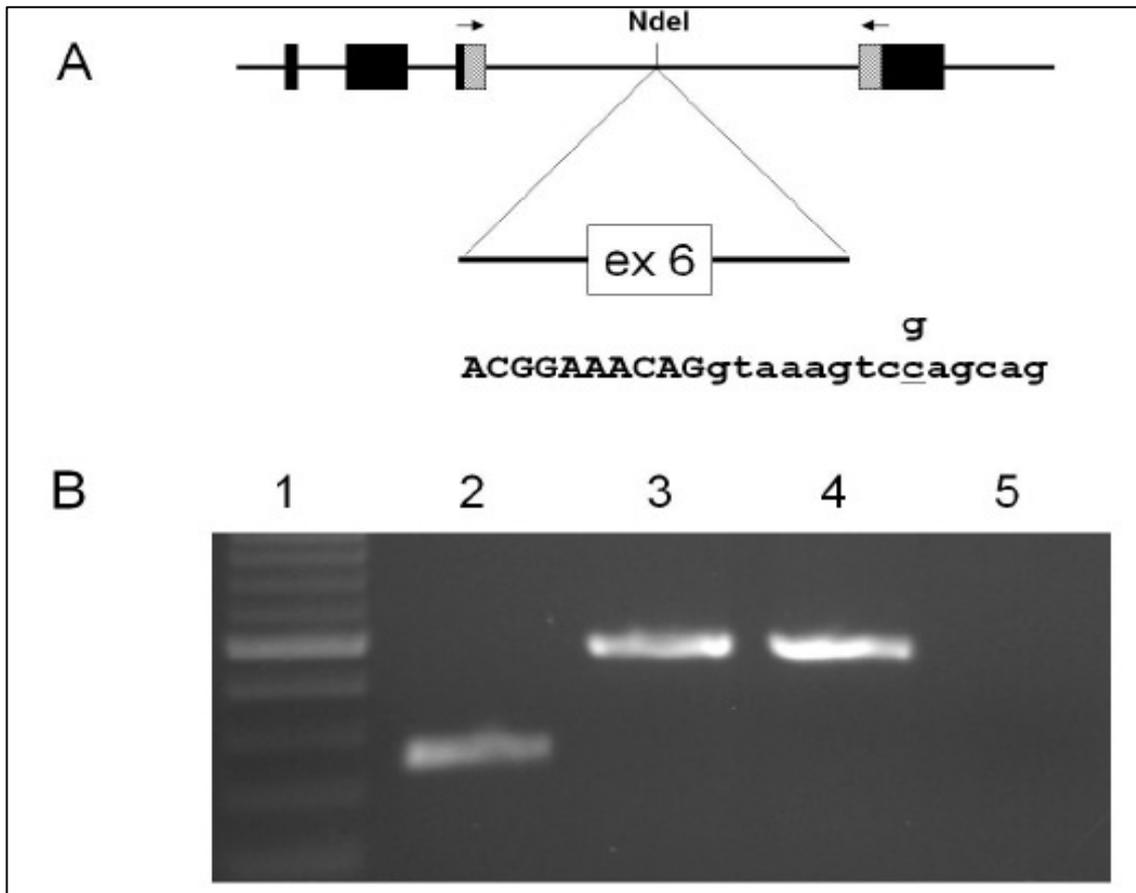


**Figura 7.1.** Schematizzazione dei risultati dell'analisi del linkage disequilibrium. Dall'alto verso il basso: coordinate del cromosoma 6, localizzazione dei geni all'interno della regione cromosomica, posizione degli SNP indagati in questo studio e blocchi degli aptotipi.



**Figura 7.2.** Ibridazione *in situ*. Espressione di JARID2 a livello delle lamine palatine nel topo al giorno E14.5 e E15.5 di sviluppo embrionale. Il segnale d'ibridazione risulta massimo lungo il margine antero-posteriore delle lamine palatine (ps) durante i processi di fusione, per poi decrescere fino a scomparire al termine dei processi di fusione al giorno E15.5.

Ps. Lamina palatina; nc. Cavità nasali; t. Lingua



**Figura 7.3.** L'effetto dello SNP rs2076056 sui meccanismi di splicing del messaggero codificante per il gene JARID2.

L'amplificato dell'esone 6, contenente le due varianti, è stato inserito mediante l'utilizzo dell'enzima di restrizione *NdeI*, in un vettore di espressione andando a costituire un minigene formato da tre esoni, del quale sono stati testati i meccanismi di splicing in relazione alla variante nucleotidica presente nel polimorfismo.

La banda 1 identifica il marcatore molecolare 100bp DNA ladder; New England, Biolabs); la banda 2 mostra la lunghezza dell'amplificato (239pb) del minigene pTBNde; le bande 3 e 4 identificano la lunghezza delle varianti (C e G) al gene JARID2. Entrambe danno un amplificato di 475pb. La banda 5 è un controllo negativo.

## 8. CONCLUSIONI

---

Nel corso di questo triennio ho rivolto i miei studi a geni fortemente candidati per l'insorgenza della labiopalatoschisi non sindromica, nel tentativo di evidenziare eventuali mutazioni che concorrono nel determinare il fenotipo. Il lavoro di ricerca svolto nel corso di questo periodo formativo, mi ha permesso di raccogliere risultati interessanti riguardanti l'eziologia delle schisi labiopalatine, e si è concluso con la pubblicazione dei dati ottenuti.

Martinelli M, Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Baciliero U, Padula E, Carinci P, Morselli PG, Carinci F.

**Study of four genes belonging to the folate pathway: transcobalamin 2 is involved in the onset of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate.**

*Hum Mutat. 2006 Mar;27(3):294.*

Martinelli M, Arlotti M, Palmieri A, Scapoli L, Savoia A, Di Stazio M, Pezzetti F, Masiero E, Carinci F.

**Investigation of MYH14 as a candidate gene in cleft lip with or without cleft palate.**

*Eur J Oral Sci. 2008 Jun;116(3):287-90.*

Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Palmieri A, Arlotti M, Savoia A, Bianco A M, Carinci P, Carinci F.

**Expression and association data strongly support JARID2 involment in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.**

*Submitted*

## 9. BIBLIOGRAFIA

---

- Afman L A, Lievers K J, Van Der Put N M, Trijbels F J & Blom H J.  
**Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects.**  
*Eur J Hum Genet (2002) 10:433-8.*
- Alkuraya F S, Saadi I, Lund J J, Turbe-Doan A, Morton C C & Maas R L.  
**SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate.**  
*Science (2006) 313:1751.*
- Ardinger H H, Buetow K H, Bell G I, Bardach J, Vandemark D R & Murray J C.  
**Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate.**  
*Am J Hum Genet (1989) 45:348-53.*
- Avila J R, Jezewski P A, Vieira a R, Orioli I M, Castilla E E, Christensen K, et al.  
**PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations.**  
*Am J Med Genet A (2006) 140:2562-70.*
- Bailey L J, Johnston M C & Billet J.  
**Effects of carbon monoxide and hypoxia on cleft lip in A/J mice.**  
*Cleft Palate Craniofac J (1995) 32:14-9.*
- Balding D.  
**The impact of low-cost, genome-wide resequencing on association studies.**  
*Hum Genomics (2005) 2:79-80.*
- Barrai I, Schiliro G, Beretta M, Mazzetti P, Russo A & Russo Mancuso G.  
**Population structure of Sicily: beta-thalassemia and HbS.**  
*Hum Genet (1987) 75:1-3.*
- Beaudin a E & Stover P J.  
**Insights into metabolic mechanisms underlying folate-responsive neural tube defects: A minireview.**  
*Birth Defects Res A Clin Mol Teratol (2009).*
- Beiraghi S, Foroud T, Diouhy S, Bixler D, Conneally P M, Delozier-Blanchet D, et al.  
**Possible localization of a major gene for cleft lip and palate to 4q.**  
*Clin Genet (1994) 46:255-6.*
- Berge S J, Plath H, Van De Vondel P T, Appel T, Niederhagen B, Von Lindern J J, et al.  
**Fetal cleft lip and palate: sonographic diagnosis, chromosomal abnormalities, associated anomalies and postnatal outcome in 70 fetuses.**  
*Ultrasound Obstet Gynecol (2001) 18:422-31.*
- Blanco R, Chakraborty R, Barton S A, Carreno H, Paredes M, Jara L, et al.  
**Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population.**  
*Hum Biol (2001) 73:81-9.*
- Blanco R, Suazo J, Santos J L, Carreno H, Palomino H & Jara L.  
**No evidence for linkage and association between 4q microsatellite markers and nonsyndromic cleft lip and palate in Chilean case-parents trios.**  
*Cleft Palate Craniofac J (2005) 42:267-71.*

Blanton S H, Cortez A, Stal S, Mulliken J B, Finnell R H & Hecht J T.

**Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate.**

*Am J Med Genet A (2005) 137A:259-62.*

Botto L D, Olney R S & Erickson J D.

**Vitamin supplements and the risk for congenital anomalies other than neural tube defects.**

*Am J Med Genet C Semin Med Genet (2004) 125C:12-21.*

Brandalize a P, Bandinelli E, Borba J B, Felix T M, Roisenberg I & Schuler-Faccini L.

**Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil.**

*Braz J Med Biol Res (2007) 40:787-91.*

Calzolari E, Milan M, Cavazzuti G B, Cocchi G, Gandini E, Magnani C, et al.

**Epidemiological and genetic study of 200 cases of oral cleft in the Emilia Romagna region of northern Italy.**

*Teratology (1988) 38:559-64.*

Carinci F, Pezzetti F, Scapoli L, Padula E, Baciliero U, Curioni C, et al.

**Nonsyndromic cleft lip and palate: evidence of linkage to a microsatellite marker on 6p23.**

*Am J Hum Genet (1995) 56:337-9.*

Carmichael S L & Shaw G M.

**Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies.**

*Am J Med Genet (1999) 86:242-4.*

Carter C O.

**Genetics of common disorders.**

*Br Med Bull (1969) 25:52-7.*

Celli J, Duijf P, Hamel B C, Bamshad M, Kramer B, Smits a P, et al.

**Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome.**

*Cell (1999) 99:143-53.*

Chenevix-Trench G, Jones K, Green a C, Duffy D L & Martin N G.

**Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci.**

*Am J Hum Genet (1992) 51:1377-85.*

Collins A, Lau W & De La Vega F M.

**Mapping genes for common diseases: the case for genetic (LD) maps.**

*Hum Hered (2004) 58:2-9.*

Damm K, Heyman R A, Umesono K & Evans R M.

**Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants.**

*Proc Natl Acad Sci U S A (1993) 90:2989-93.*

Edwards M J, Agho K, Attia J, Diaz P, Hayes T, Illingworth A, et al.

**Case-control study of cleft lip or palate after maternal use of topical corticosteroids during pregnancy.**

*Am J Med Genet A (2003) 120A:459-63.*

Eiberg H, Bixler D, Nielsen L S, Conneally P M & Mohr J.

**Suggestion of linkage of a major locus for nonsyndromic orofacial cleft with F13A and tentative assignment to chromosome 6.**

*Clin Genet (1987) 32:129-32.*

Ericson A & Kallen B A.

**Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in early pregnancy.**

*Reprod Toxicol (2001) 15:371-5.*

Farrall M & Holder S.

**Familial recurrence-pattern analysis of cleft lip with or without cleft palate.**

*Am J Hum Genet (1992) 50:270-7.*

Field L L, Ray a K, Cooper M E, Goldstein T, Shaw D F & Marazita M L.

**Genome scan for loci involved in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in families from West Bengal, India.**

*Am J Med Genet A (2004) 130A:265-71.*

Field L L, Ray a K & Marazita M L.

**Transforming growth factor alpha: a modifying locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate?**

*Eur J Hum Genet (1994) 2:159-65.*

Fraser F C.

**The genetics of cleft lip and cleft palate.**

*Am J Hum Genet (1970) 22:336-52.*

Gaspar D A, Pavanello R C, Zatz M, Passos-Bueno M R, Andre M, Steman S, et al.

**Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: results from a case-control study in Brazil.**

*Am J Med Genet (1999) 87:197-9.*

Gorlin R J, Cohen M M J & Levin L S *Syndromes of the head and neck.* (1990) New York: Oxford University Press.

Gray I C, Campbell D A & Spurr N K.

**Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics.**

*Hum Mol Genet (2000) 9:2403-8.*

Gupta V & Bei M.

**Modification of Msx1 by SUMO-1.**

*Biochem Biophys Res Commun (2006) 345:74-7.*

Hecht J T, Wang Y P, Blanton S H, Michels V V & Daiger S P.

**Cleft lip and palate: no evidence of linkage to transforming growth factor alpha.**

*Am J Hum Genet (1991a) 49:682-6.*

Hecht J T, Yang P, Michels V V & Buetow K H.

**Complex segregation analysis of nonsyndromic cleft lip and palate.**

*Am J Hum Genet (1991b) 49:674-81.*

Hemery a E H & Rimon D L *Principles and practice of medical genetic.* (1990): Churchill Livingstone.

Higuchi R (1989) Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: *PCR technology) PCR technology.* New York: Stocton Press.

Holder S E, Vintiner G M, Farren B, Malcolm S & Winter R M.

**Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate.**

*J Med Genet (1992) 29:390-2.*

Ianakiev P, Kilpatrick M W, Toudjarska I, Basel D, Beighton P & Tspouras P.

**Split-hand/split-foot malformation is caused by mutations in the p63 gene on 3q27.**

*Am J Hum Genet (2000) 67:59-66.*

Ichikawa E, Watanabe A, Nakano Y, Akita S, Hirano A, Kinoshita A, et al.

**PAX9 and TGFB3 are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: population-based and family-based candidate gene analyses.**

*J Hum Genet (2006) 51:38-46.*

Jacques P F, Selhub J, Bostom a G, Wilson P W & Rosenberg I H.

**The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations.**  
*N Engl J Med (1999) 340:1449-54.*

Jezewski P A, Vieira a R, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'brien S E, et al.

**Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate.**  
*J Med Genet (2003) 40:399-407.*

Jugessur A, Rahimov F, Lie R T, Wilcox a J, Gjessing H K, Nilsen R M, et al.

**Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and haplotype-based analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway.**  
*Genet Epidemiol (2008) 32:413-24.*

Jugessur A, Wilcox a J, Lie R T, Murray J C, Taylor J A, Ulvik A, et al.

**Exploring the effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene variants C677T and A1298C on the risk of orofacial clefts in 261 Norwegian case-parent triads.**  
*Am J Epidemiol (2003) 157:1083-91.*

Jung J, Mysliwiec M R & Lee Y.

**Roles of JUMONJI in mouse embryonic development.**  
*Dev Dyn (2005) 232:21-32.*

Kaartinen V, Voncken J W, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, et al.

**Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction.**  
*Nat Genet (1995) 11:415-21.*

Kallen B.

**The safety of antidepressant drugs during pregnancy.**  
*Expert Opin Drug Saf (2007) 6:357-70.*

Kanno K, Suzuki Y, Yang X, Yamada A, Aoki Y, Kure S, et al.

**Lack of evidence for a significant association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and the retinoic acid receptor alpha gene in the Japanese population.**  
*J Hum Genet (2002) 47:269-74.*

Kondo S, Schutte B C, Richardson R J, Bjork B C, Knight a S, Watanabe Y, et al.

**Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes.**  
*Nat Genet (2002) 32:285-9.*

Kozer E, Costei a M, Boskovic R, Nulman I, Nikfar S & Koren G.

**Effects of aspirin consumption during pregnancy on pregnancy outcomes: meta-analysis.**  
*Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol (2003) 68:70-84.*

Krapels I P, Van Rooij I A, Ocke M C, Van Cleef B A, Kuijpers-Jagtman a M & Steegers-Theunissen R P.

**Maternal dietary B vitamin intake, other than folate, and the association with orofacial cleft in the offspring.**  
*Eur J Nutr (2004) 43:7-14.*

Laegreid L, Olegard R, Conradi N, Hagberg G, Wahlstrom J & Abrahamsson L.

**Congenital malformations and maternal consumption of benzodiazepines: a case-control study.**  
*Dev Med Child Neurol (1990) 32:432-41.*

Lee Y, Song a J, Baker R, Micales B, Conway S J & Lyons G E.

**Jumonji, a nuclear protein that is necessary for normal heart development.**  
*Circ Res (2000) 86:932-8.*

Leoyklang P, Siriwan P & Shotelersuk V.

**A mutation of the p63 gene in non-syndromic cleft lip.**

*J Med Genet (2006) 43:e28.*

Lidral a C, Murray J C, Buetow K H, Basart a M, Schearer H, Shiang R, et al.

**Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines.**

*Cleft Palate Craniofac J (1997) 34:1-6.*

Lidral a C, Romitti P A, Basart a M, Doetschman T, Leysens N J, Daack-Hirsch S, et al.

**Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans.**

*Am J Hum Genet (1998) 63:557-68.*

Lonjou C, Zhang W, Collins A, Tapper W J, Elahi E, Maniatis N, et al.

**Linkage disequilibrium in human populations.**

*Proc Natl Acad Sci U S A (2003) 100:6069-74.*

Lorente C, Cordier S, Goujard J, Ayme S, Bianchi F, Calzolari E, et al.

**Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group.**

*Am J Public Health (2000) 90:415-9.*

Maestri N E, Beaty T H, Hetmanski J, Smith E A, Mcintosh I, Wyszynski D F, et al.

**Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models.**

*Am J Med Genet (1997) 73:337-44.*

Maniatis N, Collins A, Gibson J, Zhang W, Tapper W & Morton N E.

**Positional cloning by linkage disequilibrium.**

*Am J Hum Genet (2004) 74:846-55.*

Marazita M L, Field L L, Cooper M E, Tobias R, Maher B S, Peanchitlertkajorn S, et al.

**Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in China: assessment of candidate regions.**

*Cleft Palate Craniofac J (2002) 39:149-56.*

Marazita M L, Hu D N, Spence M A, Liu Y E & Melnick M.

**Cleft lip with or without cleft palate in Shanghai, China: evidence for an autosomal major locus.**

*Am J Hum Genet (1992) 51:648-53.*

Marazita M L, Spence M A & Melnick M.

**Genetic analysis of cleft lip with or without cleft palate in Danish kindreds.**

*Am J Med Genet (1984) 19:9-18.*

Marazita M L, Spence M A & Melnick M.

**Major gene determination of liability to cleft lip with or without cleft palate: a multiracial view.**

*J Craniofac Genet Dev Biol Suppl (1986) 2:89-97.*

Martinelli M, Arlotti M, Palmieri A, Scapoli L, Savoia A, Di Stazio M, et al.

**Investigation of MYH14 as a candidate gene in cleft lip with or without cleft palate.**

*Eur J Oral Sci (2008) 116:287-90.*

Martinelli M, Di Stazio M, Scapoli L, Marchesini J, Di Bari F, Pezzetti F, et al.

**Cleft lip with or without cleft palate: implication of the heavy chain of non-muscle myosin IIA.**

*J Med Genet (2007) 44:387-92.*

Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G, et al.

**C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers?**

*Am J Med Genet (2001) 98:357-60.*

- Matise T C, Chen F, Chen W, De La Vega F M, Hansen M, He C, et al.  
**A second-generation combined linkage physical map of the human genome.**  
*Genome Res (2007) 17:1783-6.*
- Mills J L, Kirke P N, Molloy a M, Burke H, Conley M R, Lee Y J, et al.  
**Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts.**  
*Am J Med Genet (1999) 86:71-4.*
- Mitchell L E.  
**Transforming growth factor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reappraisal.**  
*Genet Epidemiol (1997) 14:231-40.*
- Mitchell L E, Healey S C & Chenevix-Trench G.  
**Evidence for an association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and a gene located on the long arm of chromosome 4.**  
*Am J Hum Genet (1995) 57:1130-6.*
- Mitchell L E & Risch N.  
**Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis.**  
*Am J Hum Genet (1992) 51:323-32.*
- Moreno L M, Arcos-Burgos M, Marazita M L, Krahn K, Maher B S, Cooper M E, et al.  
**Genetic analysis of candidate loci in non-syndromic cleft lip families from Antioquia-Colombia and Ohio.**  
*Am J Med Genet A (2004) 125A:135-44.*
- Morton N E.  
**Sequential tests for the detection of linkage.**  
*Am J Hum Genet (1955) 7:277-318.*
- Murray J C.  
**Face facts: genes, environment, and clefts.**  
*Am J Hum Genet (1995) 57:227-32.*
- Murray J C, Nishimura D Y, Buetow K H, Ardinger H H, Spence M A, Sparkes R S, et al.  
**Linkage of an autosomal dominant clefting syndrome (Van der Woude) to loci on chromosome 1q.**  
*Am J Hum Genet (1990) 46:486-91.*
- Narukawa T, Natsume N, Miura S & Kawai T.  
**Decrease in cleft lip and palate by vitamin B12 in CL/FR mice.**  
*Aichi Gakuin Dent Sci (1988) 1:29-34.*
- Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A & Feeley M.  
**Effects of caffeine on human health.**  
*Food Addit Contam (2003) 20:1-30.*
- Nelson E W.  
**Toxemias of pregnancy.**  
*Miss Doct (1950) 28:233-5.*
- Nielsen D M, Ehm M G & Weir B S.  
**Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus.**  
*Am J Hum Genet (1998) 63:1531-40.*
- Norgard B, Puho E, Czeizel a E, Skriver M V & Sorensen H T.

**Aspirin use during early pregnancy and the risk of congenital abnormalities: a population-based case-control study.**

*Am J Obstet Gynecol* (2005) 192:922-3.

Nowotny P, Kwon J M & Goate a M.

**SNP analysis to dissect human traits.**

*Curr Opin Neurobiol* (2001) 11:637-41.

Otero L, Gutierrez S, Chaves M, Vargas C & Bermudez L.

**Association of MSX1 with nonsyndromic cleft lip and palate in a Colombian population.**

*Cleft Palate Craniofac J* (2007) 44:653-6.

Park J W, Mcintosh I, Hetmanski J B, Jabs E W, Vander Kolk C A, Wu-Chou Y H, et al.

**Association between IRF6 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations.**

*Genet Med* (2007) 9:219-27.

Pegelow M, Peyrard-Janvid M, Zucchelli M, Fransson I, Larson O, Kere J, et al.

**Familial non-syndromic cleft lip and palate--analysis of the IRF6 gene and clinical phenotypes.**

*Eur J Orthod* (2008) 30:169-75.

Pennell P B.

**Antiepileptic drug pharmacokinetics during pregnancy and lactation.**

*Neurology* (2003) 61:S35-42.

Pezzetti F, Martinelli M, Scapoli L, Carinci F, Palmieri A, Marchesini J, et al.

**Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.**

*Hum Mutat* (2004) 24:104-5.

Pezzetti F, Palmieri A, Martinelli M, Scapoli L, Arlotti M, Baciliero U, et al.

**Linkage disequilibrium analysis of two genes mapping on OFC3: PVR and PVRL2.**

*Eur J Hum Genet* (2007) 15:992-4.

Pezzetti F, Scapoli L, Martinelli M, Carinci F, Bodo M, Carinci P, et al.

**A locus in 2p13-p14 (OFC2), in addition to that mapped in 6p23, is involved in nonsyndromic familial orofacial cleft malformation.**

*Genomics* (1998) 50:299-305.

Pezzetti F, Scapoli L, Martinelli M, Carinci F, Brunelli G, Carls F P, et al.

**Linkage analysis of candidate endothelin pathway genes in nonsyndromic familial orofacial cleft.**

*Ann Hum Genet* (2000) 64:341-7.

Poswillo D.

**The aetiology and pathogenesis of craniofacial deformity.**

*Development* (1988) 103 Suppl:207-12.

Pradat P, Robert-Gnansia E, Di Tanna G L, Rosano A, Lisi A & Mastroiacovo P.

**First trimester exposure to corticosteroids and oral clefts.**

*Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* (2003) 67:968-70.

Radhakrishna U, Ratnamala U, Gaines M, Beiraghi S, Hutchings D, Golla J, et al.

**Genomewide scan for nonsyndromic cleft lip and palate in multigenerational Indian families reveals significant evidence of linkage at 13q33.1-34.**

*Am J Hum Genet* (2006) 79:580-5.

Reutter H, Birnbaum S, Lacava a D, Mende M, Henschke H, Berge S, et al.

**Family-based association study of the MTHFR polymorphism C677T in patients with nonsyndromic cleft lip and palate from central Europe.**

*Cleft Palate Craniofac J (2008a) 45:267-71.*

Reutter H, Birnbaum S, Mende M, Lauster C, Schmidt G, Henschke H, et al.

**TGFB3 displays parent-of-origin effects among central Europeans with nonsyndromic cleft lip and palate.**

*J Hum Genet (2008b) 53:656-61.*

Romitti P A, Lidral a C, Munger R G, Daack-Hirsch S, Burns T L & Murray J C.

**Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts.**

*Teratology (1999) 59:39-50.*

Rosenberg L, Werler M M, Kaufman D W & Shapiro S.

**Coffee drinking and myocardial infarction in young women: an update.**

*Am J Epidemiol (1987) 126:147-9.*

Safra M J & Oakley G P, Jr.

**Association between cleft lip with or without cleft palate and prenatal exposure to diazepam.**

*Lancet (1975) 2:478-80.*

Saiki R K, Chang C A, Levenson C H, Warren T C, Boehm C D, Kazazian H H, Jr., et al.

**Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes.**

*N Engl J Med (1988) 319:537-41.*

Sassani R, Bartlett S P, Feng H, Goldner-Sauve A, Haq a K, Buetow K H, et al.

**Association between alleles of the transforming growth factor-alpha locus and the occurrence of cleft lip.**

*Am J Med Genet (1993) 45:565-9.*

Satokata I & Maas R.

**Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development.**

*Nat Genet (1994) 6:348-56.*

Saxen I.

**Prolonged in vitro closure of the mouse secondary palate by salicylates.**

*Scand J Dent Res (1975) 83:202-8.*

Scapoli L, Marchesini J, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Palmieri A, et al.

**Study of folate receptor genes in nonsyndromic familial and sporadic cleft lip with or without cleft palate cases.**

*Am J Med Genet A (2005a) 132A:302-4.*

Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Bodo M, Tognon M, et al.

**Linkage disequilibrium between GABRB3 gene and nonsyndromic familial cleft lip with or without cleft palate.**

*Hum Genet (2002) 110:15-20.*

Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M, et al.

**Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population.**

*Am J Hum Genet (2005b) 76:180-3.*

Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Vaccari C, Marchesini J, Pezzetti F, et al.

**Study of the PVRL1 gene in Italian nonsyndromic cleft lip patients with or without cleft palate.**

*Ann Hum Genet (2006) 70:410-3.*

Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Carinci F, Marchesini J, Martinelli M, et al.

**Investigation of the W185X nonsense mutation of PVRL1 gene in Italian nonsyndromic cleft lip and palate patients.**

*Am J Med Genet A (2004) 127A:211.*

Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Martinelli M, Carinci P & Tognon M.

**Evidence of linkage to 6p23 and genetic heterogeneity in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.**

*Genomics (1997) 43:216-20.*

Scherag A, Dempfle A, Hinney A, Hebebrand J & Schafer H.

**Confidence intervals for genotype relative risks and allele frequencies from the case parent trio design for candidate-gene studies.**

*Hum Hered (2002) 54:210-7.*

Schultz R E, Cooper M E, Daack-Hirsch S, Shi M, Nepomucena B, Graf K A, et al.

**Targeted scan of fifteen regions for nonsyndromic cleft lip and palate in Filipino families.**

*Am J Med Genet A (2004) 125A:17-22.*

Shaw D, Ray A, Marazita M & Field L.

**Further evidence of a relationship between the retinoic acid receptor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (CL +/- P).**

*Am J Hum Genet (1993) 53:1156-7.*

Shaw G M, Croen L A & Curry C J.

**Isolated oral cleft malformations: associations with maternal and infant characteristics in a California population.**

*Teratology (1991) 43:225-8.*

Shaw G M & Lammer E J.

**Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts.**

*J Pediatr (1999) 134:298-303.*

Shaw G M, Wasserman C R, Lammer E J, O'malley C D, Murray J C, Basart a M, et al.

**Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants.**

*Am J Hum Genet (1996) 58:551-61.*

Sozen M A, Suzuki K, Tolarova M M, Bustos T, Fernandez Iglesias J E & Spritz R A.

**Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela.**

*Nat Genet (2001) 29:141-2.*

Srichomthong C, Siriwan P & Shotelersuk V.

**Significant association between IRF6 820G->A and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Thai population.**

*J Med Genet (2005) 42:e46.*

Stein J, Mulliken J B, Stal S, Gasser D L, Malcolm S, Winter R, et al.

**Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families.**

*Am J Hum Genet (1995a) 57:257-72.*

Stein J D, Hecht J T & Blanton S H.

**Exclusion of retinoic acid receptor and a cartilage matrix protein in non-syndromic CL(P) families.**

*J Med Genet (1995b) 32:78.*

Stoll C, Alembik Y, Dott B & Roth M P.

**Epidemiological and genetic study in 207 cases of oral clefts in Alsace, north-eastern France.**

*J Med Genet* (1991) 28:325-9.

Studer M, Popperl H, Marshall H, Kuroiwa A & Krumlauf R.

**Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of Hoxb-1.**

*Science* (1994) 265:1728-32.

Suzuki K, Bustos T & Spritz R A.

**Linkage disequilibrium mapping of the gene for Margarita Island ectodermal dysplasia (ED4) to 11q23.**

*Am J Hum Genet* (1998) 63:1102-7.

Suzuki Y, Jezewski P A, Machida J, Watanabe Y, Shi M, Cooper M E, et al.

**In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate.**

*Genet Med* (2004) 6:117-25.

Tolarova M M & Cervenka J.

**Classification and birth prevalence of orofacial clefts.**

*Am J Med Genet* (1998) 75:126-37.

Tongkobpetch S, Suphapeetiporn K, Siriwan P & Shotelersuk V.

**Study of the poliovirus receptor related-1 gene in Thai patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate.**

*Int J Oral Maxillofac Surg* (2008) 37:550-3.

Tseng Y T, Hsiao H H, Hsiao H P, Tsai W C & Chiu H H.

**A study of PVRL1 mutations for non-syndromic cleft lip and/or palate among Taiwanese patients.**

*Int J Oral Maxillofac Surg* (2006) 35:453-5.

Van Bokhoven H & Brunner H G.

**Splitting p63.**

*Am J Hum Genet* (2002) 71:1-13.

Van Der Put N M, Steegers-Theunissen R P, Frosst P, Trijbels F J, Eskes T K, Van Den Heuvel L P, et al.

**Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida.**

*Lancet* (1995) 346:1070-1.

Van Dyke D C, Goldman A S, Spielman R S, Zmijewski C M & Oka S W.

**Segregation of HLA in sibs with cleft lip or cleft lip and palate: evidence against genetic linkage.**

*Cleft Palate J* (1980) 17:189-93.

Van Rooij I A, Swinkels D W, Blom H J, Merkus H M & Steegers-Theunissen R P.

**Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts.**

*Am J Obstet Gynecol* (2003) 189:1155-60.

Vastardis H, Karimbux N, Guthua S W, Seidman J G & Seidman C E.

**A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis.**

*Nat Genet* (1996) 13:417-21.

Vieira a R, Avila J R, Daack-Hirsch S, Dragan E, Felix T M, Rahimov F, et al.

**Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate.**

*PLoS Genet* (2005a) 1:e64.

Vieira a R, Murray J C, Trembath D, Orioli I M, Castilla E E, Cooper M E, et al.

**Studies of reduced folate carrier 1 (RFC1) A80G and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms with neural tube and orofacial cleft defects.**

*Am J Med Genet A (2005b) 135:220-3.*

Vieira a R, Orioli I M, Castilla E E, Cooper M E, Marazita M L & Murray J C.

**MSX1 and TGFβ3 contribute to clefting in South America.**

*J Dent Res (2003) 82:289-92.*

Vintiner G M, Lo K K, Holder S E, Winter R M & Malcolm S.

**Exclusion of candidate genes from a role in cleft lip with or without cleft palate: linkage and association studies.**

*J Med Genet (1993) 30:773-8.*

Wang L, Liu S, Niu T & Xu X.

**SNPHunter: a bioinformatic software for single nucleotide polymorphism data acquisition and management.**

*BMC Bioinformatics (2005) 6:60.*

Warrington A, Vieira a R, Christensen K, Orioli I M, Castilla E E, Romitti P A, et al.

**Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate.**

*J Med Genet (2006) 43:e26.*

Watanabe T, Ohishi M & Tashiro H.

**Population and family studies of HLA in Japanese with cleft lip and cleft palate.**

*Cleft Palate J (1984) 21:293-300.*

Werler M M, Lammer E J, Rosenberg L & Mitchell a A.

**Maternal alcohol use in relation to selected birth defects.**

*Am J Epidemiol (1991) 134:691-8.*

Winkelmayr W C, Skoupy S, Eberle C, Fodinger M & Sunder-Plassmann G.

**Effects of TCN2 776C>G on vitamin B, folate, and total homocysteine levels in kidney transplant patients.**

*Kidney Int (2004) 65:1877-81.*

Wu P A, Li Y L, Fan G Z & Wang K.

**[Association study on microsatellite polymorphisms of MSX1 gene and nonsyndromic cleft lip and palate].**

*Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi (2007) 24:325-7.*

Wyszynski D F, Duffy D L & Beaty T H.

**Maternal cigarette smoking and oral clefts: a meta-analysis.**

*Cleft Palate Craniofac J (1997a) 34:206-10.*

Wyszynski D F, Maestri N, Lewanda a F, Mcintosh I, Smith E A, Garcia-Delgado C, et al.

**No evidence of linkage for cleft lip with or without cleft palate to a marker near the transforming growth factor alpha locus in two populations.**

*Hum Hered (1997b) 47:101-9.*

Wyszynski D F & Wu T.

**Use of US birth certificate data to estimate the risk of maternal cigarette smoking for oral clefting.**

*Cleft Palate Craniofac J (2002) 39:188-92.*

Zuccherro T M, Cooper M E, Maher B S, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, et al.

**Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate.**

*N Engl J Med (2004) 351:769-80.*