



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOSCIENZE
INDIRIZZO: GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELLO SVILUPPO
XX CICLO

CARATTERIZZAZIONE GENETICO-MOLECOLARE DI UN CAMPIONE DI SOGGETTI AFFETTI DA DISTURBI DELLO SPETTRO SCHIZOFRENICO/BIPOLARE PROVENIENTI DA CHIOGGIA

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. T. Pozzan

Supervisore: Ch.mo Prof.ssa M.L. Mostacciolo

Correlatore: Dott. G. Vazza

Dottoranda: Cinzia Bertolin

31 gennaio 2008

INDICE

INDICE	3
1 INTRODUZIONE	7
1.1 Caratteristiche Cliniche	8
a) Disturbi dello spettro schizofrenico.....	8
b) Disturbi dello spettro bipolare.....	9
c) Definizione della componente genetica nelle patologie dello spettro schizofrenico e bipolare.....	10
1.2 Teoria Del Continuum Psichiatrico	11
a) Ipotesi sulla eziopatologia.....	12
1.3 Studi Genetici	12
a) Analisi di linkage su tutto il genoma.....	14
b) Analisi di associazione in geni candidati.....	16
2 SCOPO DELLA RICERCA	19
3 MATERIALI E METODI	21
3.1 Presentazione del campione	21
a) Descrizione delle caratteristiche cliniche del campione.....	21
b) Raccolta dei campioni biologici.....	22
c) Informatizzazione delle notizie cliniche e molecolari del campione.....	22
3.2 Analisi complessa di segregazione	26
3.3 Estrazione del DNA	27
a) Quantificazione del dna.....	28
3.4 Amplificazione di sequenze di DNA mediante PCR	29
a) Verifica in agarosio dei prodotti di PCR.....	29
b) Genomiphi DNA amplification kit.....	30
3.5 Analisi degli aplotipi del cromosoma Y	31
a) Elettroforesi in gel denaturante di poliacrilammide.....	32
b) Colorazione argentica del gel di poliacrilammide.....	34
3.6 Analisi di linkage	35
a) Genome-wide search.....	35
b) Fine mapping.....	37
c) Lettura delle varianti alleliche.....	39
d) Multipoint linkage analysis.....	39

e) Stima di frequenze alleliche dei marcatori.....	40
f) Definizione delle soglie di significatività e suggestività.....	41
3.7 Analisi delle regioni cromosomiche 3q24-27 e 18q23	42
3.8 Valutazione della omogeneità genetica del campione raccolto	44
a) Arlequin versione 3.0.....	44
3.9 Sequenziamento della regione promotrice del gene ST8SIA2	46
3.10 Determinazione degli aplogruppi ed aplotipi mitocondriali	47
a) Analisi RFLP.....	47
b) Sequenziamento della regioneHVI.....	48
3.11 altri strumenti bioinformatici utilizzati	49
4 RISULTATI	53
4.1 Ricostruzione degli alberi genealogici ed individuazione di possibili legami di parentela tra le famiglie indagate	53
a) Alberi genealogici.....	53
b) Analisi del cromosoma Y.....	53
4.2 Analisi di segregazione complessa	55
4.3 Analisi di linkage su tutto il genoma	56
a) Genome-wide search.....	56
b) Fine-mapping.....	59
c) Analisi degli aplotipi nella regione 15q26.....	63
4.6 individuazione di ulteriori regioni in linkage "famiglie specifiche"	64
a) Cromosoma 3q24-27.....	65
b) Cromosoma 18q23.....	67
4.4 Stratificazione della popolazione	69
a) Verifica dell'omogeneità genetica dei controlli.....	69
b) Verifica dell'omogeneità genetica di affetti e controlli.....	69
4.5 Analisi di polimorfismi nella regione promotrice del gene ST8SIA2 (15q26)	70
4.6 Analisi del genoma mitocondriale	73
a) Determinazione degli aplogruppi medianteRFLP.....	73
b) Determinazione degli aplotipi mitocondriali.....	76
5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	81
6 RIASSUNTO DELL'ATTIVITA' SVOLTA	91
7 BIBLIOGRAFIA	95
APPENDICE A: ALBERI GENEALOGICI	101

1 INTRODUZIONE

I “disturbi psichici” rappresentano una delle principali cause di malattia e disabilità per la popolazione mondiale, in modo particolare per i paesi industrializzati. Con il termine “disturbi psichici” si indica un ampio spettro di situazioni caratterizzate da modelli comportamentali anomali che si manifestano soprattutto con sintomi psicotici.

Si designano dunque differenti condizioni cliniche, per le quali ai fini diagnostici è necessario fare riferimento ad una specifica classificazione, che fornisca una dettagliata descrizione dei singoli disturbi mentali. Tuttavia la classificazione delle malattie mentali è sempre risultata un problema molto controverso a causa della mancanza di precise conoscenze eziopatogenetiche, di chiari confini tra i vari disturbi e delle frequenti sovrapposizioni tra di essi.

I principali sistemi classificativi in uso sono sostanzialmente due:

- la decima edizione del manuale “International Classification Of diseases (ICD-10)” dell’organizzazione mondiale della sanità (OMS);
- la quarta edizione del “Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV)” pubblicato nel 2000 della associazione americana di psichiatria (American Psychiatric Association).

Il sistema diagnostico–classificatorio più diffuso e conosciuto a livello internazionale è senza dubbio il DSM-IV dal quale deriva una dettagliata classificazione dei diversi disturbi psichici tra i quali si distinguono:

- disturbi dello spettro schizofrenico (psicotici), che comprendono la schizofrenia ed il disturbo schizoaffettivo;
- disturbi dello spettro bipolare, detti anche disturbi dell’umore, quali la depressione ed il disturbo bipolare.

1.1 CARATTERISTICHE CLINICHE

a) Disturbi dello spettro schizofrenico

La schizofrenia identifica un insieme di disturbi psichici gravi, che riguardano un deterioramento di tutte le funzioni relative al comportamento, alla cognizione ed alle emozioni di una persona.

In generale, disturbi dello spettro schizofrenico sono caratterizzati da significative alterazioni nel rapporto tra il mondo interno, soggettivo, fatto di idee percezioni, sentimenti ed il mondo esterno fatto di oggetti persone, situazioni. In altri termini nei soggetti affetti da tali disturbi è evidente una inadeguata valutazione della realtà dei propri pensieri e dei propri sentimenti sino ad arrivare all'incapacità di discriminare ciò che è dentro da ciò che è fuori.

Non esistono sintomi che identificano in maniera specifica la schizofrenia (patognomici) ed i disturbi ad essa correlati, ma quelli caratteristici riguardano alterazione delle funzioni psichiche normali e si possono classificare in due grandi categorie: positivi e negativi.

I sintomi positivi sono deliri, allucinazioni, pensieri e comportamenti disorganizzati ed inopportuni; quelli negativi invece riflettono una diminuzione di motivazione e si manifestano come appiattimento della affettività, alogia (povertà di linguaggio) ed abulia (incapacità di svolgere azioni rivolte ad uno scopo). Nei singoli pazienti si possono manifestare sintomi di una o di entrambe le categorie. Inoltre spesso i pazienti mostrano un atteggiamento malinconico, disperato e abbattuto, definito umore disforico, che può sfociare in depressione, ansia o rabbia.

Infine, in alcuni pazienti, si manifesta un declino del funzionamento cognitivo, con compromissione dell'attenzione, del pensiero astratto e della capacità di risolvere i problemi.

La **schizofrenia** appare come una sindrome comprendente numerose entità nosologiche sottostanti. Per questo si distinguono 5 sottotipi di schizofrenia che definiscono la sintomatologia predominante al momento della valutazione:

- schizofrenia paranoie: rilevanti deliri e/o allucinazioni uditive, in un contesto comunque in cui le funzioni cognitive e di affettività del paziente sono preservate;
- schizofrenia disorganizzata: manifestazione di un eloquio ed un comportamento disorganizzato in cui l'affettività nel complesso risulta inadeguata ed inopportuna;
- schizofrenia catatonica: nella quale sono predominanti i sintomi motori; si può manifestare sia con la completa immobilità che con l'eccessiva attività che spesso si accompagna all'assunzione di posture bizzarre;

- schizofrenia indifferenziata: non soddisfa i criteri per gli altri sottotipi;
- schizofrenia residua: in cui vi è una presenza del disturbo ma una assenza di sintomi positivi rilevanti.

Nei singoli pazienti il sottotipo può variare nel tempo passando in genere dal tipo paranoie a quello disorganizzato o indifferenziato.

Il decorso della schizofrenia è caratterizzato da una scarsa probabilità di remissione completa. Tra i soggetti che rimangono ammalati alcuni sembrano avere un decorso relativamente stabile mentre altri mostrano un progressivo peggioramento.

L'esordio della patologia, se si considera il primo episodio psicotico, avviene in media tra i 20 e i 25 anni negli uomini e sotto i 30 per le donne, ma spesso questo è preceduto dallo sviluppo lento e graduale di alcuni sintomi premonitori (problemi sociali e comportamentali ,ecc.).

Strettamente collegato alla schizofrenia risulta essere il **disturbo schizoaffettivo**, caratterizzato dalla concomitanza di una componente psicotica e da sintomi ricorrenti nei disturbi dell'umore.

Nello specifico, la diagnosi di tale disturbo si basa su un periodo di malattia ininterrotto, che può durare anni, in cui il paziente manifesta deliri e allucinazioni (sintomi psicotici) ed un episodio depressivo (rilevante perdita di piacere o interesse tipica dei disturbi dell'umore).

L'esordio avviene di solito all'inizio dell'età adulta e l'incidenza è più elevata nelle donne che negli uomini. La prognosi è migliore rispetto a quella della schizofrenia, ma i soggetti affetti da disturbo schizoaffettivo evidenziano dopo la guarigione, a seguito di cure psichiatriche, un rischio maggiore di sviluppare in seguito un disturbo dell'umore puro o schizofrenia. Associati al disturbo schizoaffettivo vi possono essere: riduzione della resa lavorativa, diminuzione dei contatti sociali, trascuratezza nella cura di sé e aumento del rischio di suicidio.

Distinguere il disturbo schizoaffettivo dalla schizofrenia e dal disturbo dell'umore è spesso difficile: la diagnosi si basa sulla proporzione relativa dei sintomi riguardanti l'umore rispetto a quelli psicotici, che oltretutto frequentemente cambiano nel tempo.

b) Disturbi dello spettro bipolare

Questo è un gruppo eterogeneo di malattie ricorrenti che si distinguono sostanzialmente per l'alternarsi ciclico dell'umore (detti anche disturbi dell'umore).

Queste patologie sono caratterizzate da alterazioni pervasive dell'umore e comprendono i disturbi unipolari (depressivi) e quelli bipolari (maniaco-depressivi).

Nei **disturbi depressivi**, in generale, le fasi depressive sono contraddistinte da un umore

patologicamente basso, una marcata e profonda tristezza e dalla sensazione che non ci sia più nulla in grado di dare piacere. A volte la disperazione ed il senso di vuoto sono così marcati da indurre al suicidio.

In base alla gravità dei sintomi e alla durata di questi, secondo il manuale diagnostico DSM-IV, tra i disturbi depressivi è possibile distinguere: il disturbo depressivo maggiore, il disturbo distimico ed il disturbo dell'umore non altrimenti specificato.

I pazienti che soffrono di tali disturbi subiscono un disagio clinicamente significativo o una compromissione del funzionamento sociale, lavorativo o di altre aree importanti nella vita quotidiana.

Il **disturbo bipolare**, originariamente chiamato malattia maniaco-depressiva, è caratterizzato dalla presenza di fasi depressive seguite da fasi maniacali.

Queste ultime, sono caratterizzate da un umore particolarmente euforico, dalla sensazione che tutto sia possibile e da un ottimismo eccessivo. Il comportamento durante questi periodi diventa disorganizzato ed inconcludente.

Esistono diverse forme di disturbo bipolare che differiscono sostanzialmente per la durata relativa delle fasi depressive e maniacali:

- disturbo bipolare I: gli episodi maniacali sono preponderanti rispetto alle fasi depressive;
- disturbo bipolare II: gli episodi depressivi sono preponderanti rispetto alle fasi maniacali;
- disturbo ciclotimico: gli episodi maniacali sono accompagnati da sintomi depressivi.

Il 10-15% dei soggetti affetti da disturbo bipolare tenta il suicidio; sono comuni anche assenteismo e insuccesso lavorativo, divorzio o comportamenti antisociali episodici e difficoltà croniche nei rapporti interpersonali.

c) Definizione della componente genetica nelle patologie dello spettro schizofrenico e bipolare

In generale per valutare se un carattere sia geneticamente determinato si effettuano studi su famiglie, gemelli e adozioni.

I primi studi genetici riguardanti patologie psichiatriche sono stati condotti su gemelli monozigoti (MZ) e dizigoti (DZ) affetti da schizofrenia. Questi studi hanno permesso di rilevare che la concordanza in gemelli MZ (dove la condivisione del patrimonio genetico è del 100%) è estremamente superiore rispetto a quella dei DZ (33% rispetto al 4%) confermando la elevata componente genetica di queste patologie (Onstad et al., 1991). Successivamente sono state calcolate le percentuali di rischio di morbilità calcolate nei parenti di primo grado degli affetti da

psicosi che risultano sempre notevolmente maggiori rispetto a quelle rilevate nella popolazione (Gershon et al., 1982). Studi sulla adozioni infine dimostrano che il rischio di SZ in figli nati da genitori affetti, se allevati in famiglie in cui non è presente la patologia, permane in ogni modo superiore rispetto alla frequenza della malattia in generale (1%) (McDonald et al., 2003).

L'analisi statistica dei dati di concordanza e del rischio di sviluppare la patologia nei parenti dei probandi, ha permesso di stimare una ereditabilità compresa tra il 40% e l'80% nei disturbi dello spettro schizofrenico (Cardno et al., 1999) e tra il 60% e l'80% per quello bipolare (Smoller e Finn, 2003).

1.2 TEORIA DEL *CONTINUUM* PSICHIATRICO

L'inquadramento e la definizione dei confini nosografici dei disturbi dello spettro schizofrenico e bipolare sono stati e continuano ad essere oggetto di dibattito in ambito psichiatrico. Sono numerosi infatti gli aspetti che accomunano questi due disturbi psichici.

Si fa presente che sintomi depressivi possono essere riscontrati in pazienti con schizofrenia mentre sintomi psicotici possono essere riscontrati nei disturbi dell'umore. Inoltre recentemente Lake e Hurwitz (2007) hanno avanzato l'ipotesi provocatoria di eliminare la diagnosi di disturbo schizoaffettivo, poichè come evidenziato in precedenza, mostra caratteristiche in parte riconducibili alla SZ ed in parte al BPD.

Le difficoltà diagnostiche conseguenti a queste parziali sovrapposizioni cliniche hanno sicuramente favorito la nascita del concetto di *continuum* psicotico. Tale teoria prevede l'esistenza di uno spettro allargato comprendente numerose patologie psichiatriche, quali il disordine unipolare così come il bipolare, i disturbi schizoaffettivi ed infine la schizofrenia. In accordo con questa teoria, la componente genetica può essere concettualizzata con un modello multidimensionale nel quale, oltre ai geni di suscettibilità specifici per ciascuna patologia, è prevista l'esistenza di geni coinvolti nella patogenesi sia dei disturbi dello spettro schizofrenico sia di quello bipolare (Craddock e Owen, 2005).

Sono numerosi i dati che sembrano avvalorare questa ipotesi.

Le relazioni nosologiche tra sindromi psichiatriche possono essere valutate innanzi tutto attraverso studi familiari. Infatti, se due disturbi hanno una diversa eziologia genetica ci si aspetta che vengano trasmessi indipendentemente l'uno dall'altro; se invece sono correlati, si osserverà nelle famiglie con probandi affetti, una coaggregazione maggiore rispetto alla

popolazione generale. Nel caso specifico, valutando famiglie particolarmente ampie con soggetti affetti dalle patologie dello spettro allargato, indipendentemente dalla diagnosi, si può osservare come vi sia una ricorrenza per SZ, SA e BPD nei parenti di primo grado maggiore rispetto all'attesa (Craddock et al., 2005).

Inoltre risulta difficile da spiegare, se non con l'ipotesi del *continuum*, la sovrapposizione parziale rilevata in termini di risposta ai trattamenti farmacologici. Ad oggi i farmaci utilizzati nella cura dei disturbi dello spettro schizofrenico sono di due tipi: antipsicotici tipici ed atipici. Il fatto che i farmaci antipsicotici atipici siano utili nella terapia acuta e di mantenimento della SZ e del BPD suggerisce che vi siano dei meccanismi molecolari comuni che sono alla base di una possibile continuità nelle due situazioni patologiche. Benché infatti il trattamento di elezione del disturbo bipolare in fase acuta sia il litio ed altri stabilizzanti dell'umore, nella fase di mantenimento sono sempre più numerosi i dati che sostengono l'utilità di antipsicotici atipici.

a) Ipotesi sulla eziopatologia

Si fa presente che le prime ipotesi sul meccanismo eziopatologico che sottende a queste patologie sono state formulate su osservazioni prettamente farmacologiche. Rilevando le molecole che avevano effetti benefici nei pazienti affetti, si è potuto infatti ipotizzare quali fossero le vie biochimiche alterate in tali patologie.

Attualmente i meccanismi molecolari precisi da cui originano tali patologie non sono noti, tuttavia è comunemente accettato che sia i disturbi dello spettro schizofrenico che quelli dello spettro bipolare siano causati da anomalie dello sviluppo neuronale con conseguente compromissione della corretta connettività sinaptica. A conferma di ciò, tutti i geni candidati identificati fino ad oggi per queste patologie risultano essere riconducibili, direttamente o indirettamente, ad alterazioni dell'attività di trasmissione neuronale (Owen et al., 2007).

1.3 STUDI GENETICI

I disturbi dello spettro schizofrenico e bipolare vengono comunemente definiti patologie complesse e multifattoriali. Con tali termini vengono indicate una serie di malattie, tra le più comuni nella popolazione mondiale, causate da diversi geni e fattori ambientali di rischio che interagiscono creando un gradiente di suscettibilità genetica alla patologia.

La diffusione e la gravità delle patologie dello spettro schizofrenico e bipolare hanno condotto moltissimi gruppi di ricerca ad affrontarne lo studio nell'ultimo decennio. Il numero di articoli pubblicati in questi anni è enorme, i dati ottenuti sono solo in pochi casi coincidenti e le conclusioni raramente concordanti.

Evidentemente la eterogeneità genetica in queste patologie è estremamente elevata ed è probabile che la suscettibilità sia determinata, anziché da pochi loci principali, da molti loci minori che possono differire in popolazioni diverse. Il dibattito su quale sia la strategia migliore per rilevare loci/geni di suscettibilità è ad oggi tutt'altro che risolto.

Alcuni ricercatori sostengono che utilizzare criteri clinici estremamente rigidi nella definizione del campione sia una strategia vincente in quanto consente di ridurre al minimo il numero di loci indagati e pertanto, scegliere pazienti affetti da specifici endofenotipi diagnostici per studi di linkage ed associazione, può risultare vantaggioso.

Completamente opposta appare la strategia utilizzata da altri studiosi, che utilizzano indistintamente nel campione studiato soggetti affetti da schizofrenia (SZ), disturbo schizoaffettivo (SA) e disturbo bipolare (BPD). I pazienti in questo caso, vengono considerati come appartenenti ad un'unica classe fenotipica, in accordo con la teoria del *continuum*. L'ipotesi è che in questo modo sia possibile aumentare l'intensità dei segnali nei loci di suscettibilità condivisi dalle patologie dello spettro schizofrenico e bipolare, in modo da poterli rilevare con analisi genetiche.

Sempre al fine di ridurre l'eterogeneità genetica infine, numerosi gruppi di ricerca hanno ritenuto opportuno studiare popolazioni con un ridotto numero di fondatori. Tali popolazioni vengono definite isolate e appaiono particolarmente vantaggiose nello studio di patologie complesse perché in generale presentano una limitata diversità alplotipica e livelli particolarmente elevati di *linkage disequilibrium*, caratteristiche che in generale facilitano il mappaggio di geni malattia. Tuttavia va considerato il fatto che tali popolazioni possono presentare un disequilibrio forte ed esteso intorno a loci per rare patologie mendeliane, mentre per varianti più comuni i dati empirici non mostrano un disequilibrio particolarmente accentuato. A ciò si aggiunge il fatto che i risultati ottenuti in popolazioni così particolari talvolta sono difficilmente replicabili in altri campioni.

In conclusione si può osservare che, mentre studi di linkage ed associazione hanno permesso di scoprire i meccanismi molecolari di moltissime malattie mendeliane, il problema cruciale che emerge nello studio di patologie complesse è che ad oggi non è possibile definire un'unica metodica in grado di dare risultati certi. È comunemente accettato che tutti i dati positivi ottenuti, per essere considerati validi, devono essere confermati con approcci genetico-molecolari diversi

e su popolazioni differenti. Pertanto nessuna delle strategie descritte può essere considerata in assoluto la migliore ed è probabile che solo mediante una valutazione critica dei risultati (positivi e negativi) ottenuti con modalità diverse sarà possibile definire le cause genetiche che conferiscono suscettibilità alle patologie dello spettro schizofrenico e bipolare.

a) Analisi di linkage su tutto il genoma

Nelle analisi di linkage l'obiettivo principale è quello di riuscire ad identificare regioni cromosomiche che vengono cotrasmesse con la malattia.

Nelle analisi di tipo parametrico è possibile assumere un modello di ereditarietà mendeliana dominante o recessiva e pertanto deve essere definita la frequenza genica, la penetranza e la fenocopia di ciascun genotipo. Nei caratteri complessi tuttavia sono coinvolti più geni ciascuno dei quali potenzialmente potrebbe avere parametri diversi e pertanto, risulta impossibile definire correttamente tali valori. Per ovviare a questo problema, è possibile condurre una analisi di linkage senza modelli, detta non parametrica, che ricerca la presenza di alleli comuni tra individui affetti del campione analizzato costituito da famiglie nucleari (*ASP-Affected Sib Pairs*) o multigenerazionali (*APM-Affected Pedigree Member*). Una volta che con una analisi di linkage viene identificato un locus di suscettibilità, solitamente sono necessarie analisi ulteriori al fine di ridurre la regione critica individuata alla dimensione di qualche megabase (Mb) in modo da poter valutare la presenza in tali regioni, di buoni geni candidati (Strachan e Read, 2006).

In letteratura vengono riportati numerosissimi studi di linkage su tutto il genoma mirati ad individuare loci di suscettibilità coinvolti solo nella schizofrenia (SZ) o solo nel disturbo bipolare (BPD). Nello specifico per quanto riguarda il BPD sono state riportate da studi indipendenti, almeno 13 regioni che mostrano un linkage significativo con la patologia (4p, 6q, 8q, 10p, 10q, 12q, 13q, 16q, 16p, 18p, 18q, 21q, 22q) (Sanders et al., 2004; Cheng et al., 2006), mentre per la SZ i loci candidati sono ancora più numerosi e, ad eccezione di pochi cromosomi (12, 14, 16, 19, 20 e 21), si trovano sparsi in tutto il genoma (Prasad et al., 2002).

Piuttosto che riportare un'elencazione di tutti i risultati positivi di linkage pubblicati nell'ultimo decennio, in questa sede appare più opportuno riassumere 7 studi svolti al fine di identificare loci di suscettibilità comuni per i disturbi dello spettro schizofrenico e bipolare, ponendo particolare attenzione ai criteri diagnostici utilizzati nella raccolta del campione ed ai risultati ottenuti.

L'ipotesi che SZ e BPD potessero condividere una parte della suscettibilità genetica ha spinto

Bailer ad eseguire un *genome-wide scan* su 5 famiglie con SZ e 3 con BPD originarie dell'Austria. I risultati ottenuti con una analisi di linkage parametrica e non parametrica, indicavano la regione 3q29 come un locus di suscettibilità comune per entrambe le patologie oggetto di studio (Bailer et al., 2002; Schosser et al., 2007).

Il gruppo di Park invece ha preferito non utilizzare pedigree con ricorrenza di entrambi i disturbi, ma concentrarsi nello studio di famiglie bipolari che presentavano una sintomatologia in parte sovrapponibile alla SZ (psicosi). In questo caso i loci di suscettibilità identificati sono 9q31 e 8p21, seppure segnali suggestivi di linkage sono stati ottenuti anche in 5q33, 6q21, 8p12, 8q24, 13q32, 15q26, 17p12, 18q21 e 20q13 (Park et al., 2004).

Sempre partendo da famiglie in cui segregava il BPD, Cheng ha pubblicato i risultati di un GWS condotto in un ampio campione di pedigree raccolto dal NIMH (*National Institute of Mental Health*). Tale campione era costituito complessivamente da 1060 individui appartenenti a 154 famiglie multigenerazionali. Le dimensioni del campione in questo caso hanno permesso di valutare nell'analisi non solo i loci di suscettibilità per il BPD, ma anche quelli coinvolti nello sviluppo di specifici sintomi clinici. In tal modo è stato possibile rilevare 4 loci di suscettibilità per il BPD (10q25, 10p12, 16q24, 16p12-13) tra i quali, la regione 16p12 risultava essere specificamente in linkage nei soggetti che presentavano un fenotipo psicotico (Cheng et al., 2006).

Sklar nel 2004 ha pubblicato una analisi di linkage su tutto il genoma eseguita su un campione di famiglie proveniente dalle isole Azzorre, nelle quali era possibile rilevare sia soggetti affetti da SZ, sia pazienti che presentavano BPD con sintomi psicotici. I fenotipi malattia che sono stati indagati in questo studio sono stati la SZ pura e la presenza di psicosi, ed in entrambi i casi è stato ottenuto un segnale di linkage significativo nella regione 5q (Sklar et al., 2004). Queste isole rappresentano una realtà territoriale particolare in quanto, dal punto di vista storico, sono rimaste disabitate fino al 1400 quando iniziò la colonizzazione portoghese. La popolazione che vi abita viene dunque considerata un isolato genetico, che per il basso numero di fondatori e per la sua recente espansione, può risultare molto utile nel mappaggio dei caratteri complessi.

Considerazioni analoghe hanno condotto il gruppo di Camp a studiare un campione di 13 famiglie in cui vi erano diagnosi di SZ e BPD originari dell'arcipelago delle Palau (Micronesia). Con una analisi di linkage su tali famiglie sono stati individuati due loci di suscettibilità: 3q24-28 e 17q32 (Camp et al., 2001; Klei et al., 2005).

Con il fine dichiarato di voler identificare i loci che influenzano sia la suscettibilità alla SZ che al BPD, Hamshere e collaboratori hanno deciso di eseguire un GWS su un campione di famiglie con elevata ricorrenza di patologie dello spettro schizofrenico e bipolare, selezionate per la

presenza di un probando schizoaffettivo. Tale approccio ha permesso di rilevare un linkage significativo in 1q42 e segnali suggestivi in 22q11 e 19p13 (Hamshere et al., 2005).

Con il medesimo scopo infine, il gruppo di Maziade ha svolto una analisi di linkage *genome-wide* utilizzando 21 famiglie multigenerazionali provenienti dalla regione più orientale del Quebec, in cui segregavano SZ e BPD. I dati sono stati elaborati utilizzando classi fenotipiche diverse: nella classificazione “ristretta” (*narrow*) venivano utilizzati nell’analisi solo i pazienti con SZ (o con BPD), mentre nella classificazione “ampia” (*broad*) erano considerati affetti indistintamente soggetti con SZ e BPD. L’ipotesi è che utilizzando una definizione fenotipica allargata i loci di suscettibilità comuni alle due sindromi fossero più facilmente identificabili. In tal modo sono stati ottenuti picchi di linkage significativi in 18q12-21 e 15q26 (Maziade et al., 2005).

b) Analisi di associazione in geni candidati

L’analisi di associazione valuta il ricorrere di alleli e fenotipi tra persone non imparentate statisticamente superiore rispetto all’atteso. In tale analisi, in generale un campione di pazienti viene messo a confronto con un campione di controllo proveniente dallo stesso gruppo etnico: tali studi vengono definiti come “caso-controllo”.

Va fatto presente che quando si affrontano studi di associazione per le malattie complesse è difficile distinguere i fattori di suscettibilità genetici dai polimorfismi del DNA generalmente presenti nella popolazione. Per causare queste malattie infatti, nessuna singola variazione genica è necessaria o sufficiente, e pertanto un allele di suscettibilità potrà essere presente in un certo numero di controlli e assente in alcuni pazienti. Quelli che si ricercano per queste patologie sono solitamente polimorfismi in regioni del DNA non codificanti, con effetti modulatori sull’attività del promotore, sullo splicing o sulla stabilità dell’mRNA (Strachan e Read, 2006).

Di seguito vengono descritte le caratteristiche di alcuni geni per i quali vi sono forti evidenze di un coinvolgimento sia nella patogenesi di disturbi dello spettro schizofrenico che bipolare, quali DISC1, NGR1, G72/G30 e COMT.

DISC1 è stato per la prima volta descritto nel 2001 in un lavoro in cui veniva riportata una traslocazione bilanciata reciproca (1:11) (q42;14.3) che causava la rottura del gene e che

cosegregava con SZ ed altri disturbi psichiatrici in una grande famiglia scozzese (Blackwood et al., 2001).

L'ipotesi che tale gene influenzi la manifestazione del fenotipo psichiatrico, è stata successivamente confermata da un elevato numero di studi di linkage ed associazione indipendenti condotti su popolazioni diverse. Tutte le evidenze genetiche ad oggi indicano DISC 1 come un gene di suscettibilità per SZ, BPD, depressione maggiore ed altri diversi difetti cognitivi (Chubb et al., 2008). Tuttavia la funzione della proteina codificata da tale gene non è ancora completamente chiara, ma sembra probabile che interagisca con altre proteine, influenzando la crescita dei neuriti e lo sviluppo corticale.

NGR1 è un gene che mappa in 8p22-p11 e che codifica per la *neuregulina 1*, una proteina segnale che media le interazioni tra cellule a livello di molteplici organi e tessuti quali ad esempio, il cuore, il polmone, i muscoli ed il sistema nervoso centrale. Nel 2005 è stato pubblicato uno studio caso- controllo in cui un set di marcatori localizzati vicino al gene NGR1 ed uno specifico aplotipo definito da questi risulta essere associato al BPD in un ampio campione di soggetti (Green et al., 2005). Inoltre nello stesso studio gli stessi risultati sono stati confermati in un campione di soggetti affetti da SZ.

Con un approccio posizionale, Chumakov nel 2002 descrive un nuovo locus di suscettibilità per SZ in 13q33 in cui mappano due geni: G72 e DAAO. Nello stesso lavoro inoltre riporta i risultati positivi di associazione per G72/DAAO ottenuti da uno studio caso-controllo condotto su un campione di pazienti schizofrenici russi (Chumakov et al., 2002). Risultati di associazione positiva sono stati pubblicati anche relativamente a campioni di soggetti con BPD (Schumacher et al., 2004).

Il coinvolgimento del gene COMT nello sviluppo delle patologie psichiatriche è stato ampiamente descritto. Tale gene codifica per l'enzima *Catecol-O-Metiltransferasi*, enzima chiave nel metabolismo della dopamina. Studi in vitro hanno dimostrato che il polimorfismo Val158Met influenza significativamente la quantità di proteina prodotta e la sua attività catalitica (Chen et al., 2004). Va sottolineato inoltre che tale gene mappa in 22q11.2, in corrispondenza della microdelezione caratteristica dei pazienti affetti da sindrome Velocardiofaciale (VCFS). Gli individui con VCFS mostrano, oltre a difetti congeniti a livello del palato e del cuore, un rischio elevato di sviluppare disturbi psichiatrici. Nonostante numerose evidenze sono state riportate da diversi gruppi di ricerca a favore del fatto che tale polimorfismo sia coinvolto nella patogenesi di SZ, BPD, abuso di sostanze, disturbi ossessivo-compulsivi, anoressia nervosa e ADHD (*attention deficit hyperactivity disorder*), sono stati ottenuti anche risultati di associazione negativi (Hosak, 2007).

L'ipotesi più probabile è che il gene COMT non sia un gene coinvolto in tutti i disturbi mentali, ma il polimorfismo Val158Met appare agire con un effetto pleiotropico, unitamente ad altri fattori, nell'influenzare il comportamento umano.

2 SCOPO DELLA RICERCA

L'obiettivo principale dello studio è quello di individuare loci coinvolti nella eziopatogenesi della schizofrenia e del disturbo bipolare in un campione di soggetti tutti originari della città di Chioggia.

Grazie alla collaborazione intrapresa con il Dipartimento di Salute Mentale (CSM) di Chioggia (Dott.ssa Rampinelli) e con le strutture psichiatriche (CSM di Padova e Clinica Psichiatrica) operanti a Padova (Dott. Peruzzi e Prof.ssa Perini), sono state raccolte informazioni cliniche e campioni biologici di un elevato numero di individui affetti da disturbi psichiatrici.

La raccolta di tale campione, costituito da casi familiari ed isolati, può rappresentare un utile strumento per migliorare le conoscenze sulla genetica della schizofrenia e dei disturbi ad essa correlati secondo l'ipotesi proposta da Moller (2003) che individua nel continuum più classi fenotipiche.

Per tale scopo si è proceduto mediante:

1. Raccolta di informazioni cliniche ed anagrafiche nel campione oggetto di studio

E' stata organizzata una raccolta sistematica di notizie cliniche che ha coinvolto sia gli psichiatri del CSM di Chioggia che i medici di base. Ciò ha permesso di individuare 40 famiglie con elevata ricorrenza di schizofrenia e disturbo bipolare. Volendo approfondire lo studio genético-molecolare su tali famiglie, è risultato di fondamentale importanza procedere ad una attenta ricostruzione dei legami di parentela tra i soggetti affetti, sia attraverso la raccolta di dati anagrafici che caratterizzando i *lineages* paterni (cromosoma Y) di soggetti apparentemente non imparentati.

2. Definizione del modello ereditario nel campione di famiglie raccolte.

Poiché il modello ereditario della schizofrenia (SZ) e disturbo bipolare (BPD) è sconosciuto, risulta fondamentale individuare attraverso una analisi di segregazione complessa (CSA) il modello di trasmissione ereditario che meglio si adatta al campione oggetto di studio.

3. Analisi di linkage su tutto il genoma

In famiglie con elevata ricorrenza della malattia, è possibile effettuare una analisi molecolare su tutto il genoma atta ad individuare i loci cromosomici in linkage con la malattia (genome-wide search).

Lo strumento per individuare linkage è rappresentato dall'analisi di marcatori genetici che, equamente distribuiti su tutto il genoma, permettono di fornire informazioni in merito a possibili regioni candidate.

4. Valutazione del contributo del DNA mitocondriale nella patogenesi della SZ e BPD

Tale indagine è stata intrapresa in seguito ad alcune considerazioni. In primo luogo nel campione di famiglie raccolto si è potuto osservare la presenza di numerose fratrie con più soggetti affetti. Questo dato permette di ipotizzare una componente mitocondriale nella suscettibilità ai disturbi schizofrenico bipolare nel campione in esame. Inoltre recentemente diversi studi suggeriscono un possibile coinvolgimento dei polimorfismi mitocondriali nella patogenesi di disturbi psichiatrici. Mediante la caratterizzazione degli aplogruppi ed aplotipi mitocondriali è pertanto possibile valutare preliminarmente una distribuzione di polimorfismi mitocondriale diversa rispetto all'atteso.

3 MATERIALI E METODI

3.1 PRESENTAZIONE DEL CAMPIONE

a) Descrizione delle caratteristiche cliniche del campione

Tutti i soggetti analizzati durante lo studio sono originari di Chioggia e sono stati raccolti in collaborazione con il Centro di Salute Mentale, che rappresenta l'unica struttura di riferimento per i soggetti affetti da patologia psichiatrica in questa città. A partire dal 2003 ha avuto inizio in tale sede, una rivalutazione clinica dei pazienti affetti da disturbi dello spettro schizofrenico/bipolare secondo le linee guida del DSM-IV.

La raccolta sistematica di informazioni cliniche, eseguita dalla Dott.ssa S. Rampinelli e dalla Prof.ssa G. Perini, ha messo in luce l'esistenza di numerose famiglie in cui la ricorrenza di soggetti affetti da disturbi psichiatrici è molto elevata. In queste famiglie la patologia psichiatrica coinvolge più generazioni ed all'interno dello stesso nucleo è possibile osservare la cosegregazione di entità cliniche distinte quali schizofrenia (SZ), disturbo bipolare (BPD) e disturbo schizoaffettivo (SA).

Le diagnosi sono state confermate da due psichiatri indipendentemente e per ogni paziente è stata definita la classe clinica di appartenenza (SZ, BPD e SA) ed il sottotipo diagnostico rilevato.

Le informazioni raccolte hanno permesso di identificare 40 pedigree originari da Chioggia in cui è presente una elevata ricorrenza di disturbi riconducibili allo spettro schizofrenico/bipolare.

Su queste famiglie è stata eseguita una dettagliata ricostruzione anagrafica (fino alla terza generazione), consultando gli archivi disponibili presso l'Ufficio Anagrafe del Comune ed i registri parrocchiali, ottenendo informazioni esaustive riguardo la struttura delle famiglie. Tale ricostruzione è stata eseguita al fine di determinare con esattezza la numerosità delle fratrie e di documentare la reale origine chioggiotta dei fondatori.

b) Raccolta dei campioni biologici

La popolazione di Chioggia presenta dei presupposti adatti per intraprendere l'analisi di malattie complesse in quanto, sulla base di elementi storici e caratteristiche socioculturali, può essere considerata una "comunità chiusa". Si presuppone pertanto che in tale popolazione la minore eterogeneità genetica ed ambientale sottenda ad un background genetico comune condiviso dagli individui affetti. Tale condizione in generale viene considerata vantaggiosa nel momento in cui ci si propone di identificare i geni di suscettibilità di una patologia complessa.

Parallelamente alla raccolta di informazioni cliniche, si è proceduto alla raccolta, previa acquisizione del consenso informato scritto, di 149 campioni di sangue così suddivisi:

- 90 soggetti affetti da SZ, BP, o SA appartenenti alle 40 famiglie individuate;
- 16 soggetti non affetti appartenenti alle 40 famiglie;
- 35 casi sporadici (23 SZ, 6 BP, 4 SA).

Sono stati inoltre raccolti 130 campioni di sangue di soggetti sani (su base clinica) e non imparentati da almeno 2 generazioni con soggetti che presentavano patologie psichiatriche. Questi soggetti sono andati a costituire il campione dei controlli.

c) Informatizzazione delle notizie cliniche e molecolari del campione

Considerando la numerosità del campione si è cercato uno strumento in grado di archiviare tutte le notizie cliniche ed anagrafiche raccolte.

Per tale scopo è stato scelto il programma CYRILLIC versione 2.0. Questo è un software che consente di disegnare alberi genealogici anche molto grandi (fino a 10000 individui) e di diversificare graficamente la classe fenotipica dei pazienti. Per ogni individuo inserito sono state inoltre archiviate informazioni anagrafiche e cliniche come ad esempio l'età di nascita e di morte, il sesso, la classe fenotipica, il sottotipo diagnostico, l'età di esordio della malattia ed un codice identificativo dei soggetti per i quali si è raccolto il DNA. Inoltre, quando disponibili, sono state archiviate informazioni aggiuntive come ad esempio le diagnosi riferite di individui deceduti e la diagnosi di patologie non psichiatriche.

CYRILLIC permette inoltre di esportare selettivamente alcune delle informazioni sotto forma di tabelle. A titolo di esempio, di seguito, è stata riportata una tabella (Tab 3.1) in cui sono riassunti i dati di tutti i soggetti affetti di cui è disponibile un campione biologico raccolti in questo studio. In questo caso sono stati riportati i dati relativi alla famiglia di appartenenza ed il codice paziente

(COD.IND.), la diagnosi clinica (DIAGNOSI), la classe fenotipica di appartenenza (CLASSE), l'età di esordio e il sesso. Inoltre per ogni campione sono state specificate le indagini geneticomolecolari a cui è stato sottoposto: genome-wide search (GWS), determinazione degli aplogruppi mitocondriali (Hg) e analisi dei microsatelliti sul cromosoma Y (STR chrY).

COD. FAM	COD. IND.	CLASSE	DIAGNOSI	ESORDIO	SEX	GWS	Hg	STR chrY
F1	1.1	BPD	d.depressivo ricorrente	40	M	●	●	
	1.2	SZ	d.delirante paranoide	45	F	●		
	1.3	SZ	d.di personalità schizoide	25	F	●	●	
	1.4	BPD	d. bipolare I	23	M	●	●	●
	1.5	SA	d.schizoaffettivo	24	M	●		
	1.6	non affetto			M	●		
	1.7	SZ	schizofrenia paranoide	24	M	●		
	1.8	SA	schizoaffettivo	25	M	●		
	1.9	SZ	d.delirante	24	F	●		
F2	2.1	BPD	d. bipolare	30	F	●		
	2.2	SZ	schizofrenia paranoide	34	F	●		
	2.3	SZ	schizofrenia paranoide	35	M	●		●
	2.4	SZ	d.di personalità paranoide	23	F	●	●	
F3	3.1	BPD	d. bipolare I	24	M	●		●
	3.2	BPD	d. bipolare I	25	F	●	●	
	3.3	non affetto			F			
	3.4	SZ	schizofrenia	18	M			
F4	4.1	SZ	d.di personalità	26	F	●		
	4.2	SZ	schizofrenia	25	F	●		
	4.3	SZ	d.di personalità	23	M	●	●	
	4.4	SZ	d.di personalità paranoide	22	M	●	●	●
	4.5	SZ	d.di personalità	28	F	●	●	
	4.6	SZ	schizofrenia disorganizzata cronica	24	M	●		●
	4.7	SZ	d.schizofrenico paranoide	17	M	●		
	4.8	non affetto			F	●		
F5	5.1	non affetto			M			
	5.2	SZ	schizofrenia	23	M	●	●	●
	5.3	SZ	schizofrenia	25	F	●		
F6	6.1	SA	d.schizoaffettivo	28	F		●	
	6.2	SA	d.schizoaffettivo	22	F			
F7	7.1	SZ	schizofrenia	25	M	●	●	●
	7.2	SZ	d.di personalità schizoide	26	F	●		
	7.3	SZ	schizofrenia	24	M	●		
F8	8.1	SZ	d.schizoide	25	M	●	●	●
	8.2	SZ	schizofrenia paranoide	26	F	●		
F9	9.1	BPD	d. bipolare I	22	F	●	●	
	9.2	non affetto			M	●		●
	9.3	BPD	d.personalità paranoide + ciclotimia	29	F	●		
	9.4	non affetto			F	●		
F10	10.1	SZ	schizofrenia paranoide	28	M		●	●
F11	11.1	BPD	d. bipolare I	25	F	●	●	
	11.2	BPD	d. bipolare I	30	F			
	11.3	BPD	d. bipolare II	25	F	●		
	11.4	BPD	ciclotimia	25	M	●		●
F12	12.1	BPD	d. bipolare II	35	F		●	
F13	13.1	BPD	d. bipolare I	24	M	●	●	●
	13.2	SA	d.schizoaffettivo	24	M	●	●	
	13.3	SZ	d.personalità paranoide	23	F	●		
F16	16.1	SZ	schizofrenia	20	M	●	●	●
	16.2	SZ	schizofrenia	26	F	●		

COD. FAM	COD. IND.	CLASSE	DIAGNOSI	ESORDIO	SEX	GWS	Hg	STR chrY
F17	17.1	SZ	schizofrenia paranoide	26	F		•	
F18	18.1	SZ	psicosi ossessiva	34	F		•	
F19	19.1	SZ	schizofrenia	25	F		•	
F20	20.1	non affetto			M	•		
	20.2	SZ	schizofrenia	28	F	•	•	
	20.3	SZ	schizofrenia	24	M	•		•
F21	21.1	SZ	d.personalità paranoide	25	F	•		
	21.2	SZ	schizophrenia disorganizzata	28	M	•	•	•
F22	22.1	BPD	d.bipolare	25	F	•	•	
	22.2	BPD	ciclotimia	28	F	•		
	22.3	BPD	ciclotimia	26	F		•	
	22.4	non affetto			M			
	22.5	BPD	ciclotimico	28	F			
F23	23.1	SZ	d. delirante paranoide	45	F			
	23.2	SZ	d. delirante paranoide	35	M		•	•
	23.3	non affetto			F			
F24	24.1	SZ	psicosi ossessiva + oligofrenia	20	F	•	•	
	24.2	SZ	schizofrenia	21	M		•	•
	24.3	SZ	schizofrenia paranoide + oligofrenia	23	F	•		
	24.4	non affetto			F	•		
F25	25.1	SZ	schizofrenia paranoide	20	M	•	•	•
F26	26.1	BPD	ciclotimia	28	F	•	•	
	26.2	SZ	schizofrenia	20	M	•		
	26.3	SZ	d.personalità paranoide	25	M	•	•	•
	26.4	SZ	schizofrenia	19	F	•	•	
	26.5	SZ	d.personalità paranoide	23	M	•	•	
	26.6	non affetto	(demenza senile)		F	•		
F27	27.1	SZ	schizofrenia paranoide	21	M	•	•	•
	27.2	SA	d.schizoaffettivo	29	M	•	•	
F28	28.1	SZ	personalità paranoide	23	M		•	•
F34	34.1	SA	d.schizoaffettivo	27	F		•	
	34.2	SZ	schizofrenia	25	F		•	
F43	43.1	BPD	d. bipolare I	22	M			
F44	44.1	BPD	d. bipolare I	25	F		•	
	44.2	BPD	d.depressivo ricorrente	32	F			
F45	45.1	BPD	depressione nevrotica	38	M		•	•
	45.2	non affetto			M			
	45.3	non affetto			F			
F46	46.1	SZ	schizofrenia	25	M		•	
	46.2	BPD	d. borderline, depressione ricorrente	25	M			
	46.3	BPD	depressione ricorrente	28	M		•	
F47	47.1	BPD	ciclotimia	23	F		•	
	47.2	BPD	d. bipolare I	20	F			
F48	48.1	non affetto			F			
	48.2	SZ	schizofrenia	21	F		•	
	48.3	non affetto			F			
	48.4	non affetto			M			
F53	53.1	SZ	schizofrenia paranoide	19	M		•	
F55	55.2	SZ	schizofrenia	24	F		•	
	55.1	SZ	schizofrenia	22	M		•	
F56	56.1	SZ	schizofrenia	25	F		•	
F62	62.1	SZ	schizofrenia	16	M		•	
	62.2	SZ	schizofrenia	23	F			
F63	63.1	SZ	schizofrenia	25	F		•	
F64	64.1	SA	disturbo affettivo	24	F		•	
F69	69.1	SZ	schizofrenia	24	M		•	

COD. IND.		CLASSE	DIAGNOSI	ESORDIO	SEX	GWS	Hg	STR chrY
S01	29.1	SZ	schizofrenia	22	M		●	
S02	31.1	SA	d.schizoaffettivo	24	M		●	
S03	33.1	SZ	schizofrenia	20	M		●	
S04	35.1	SZ	schizofrenia paranoide	17	M		●	
S05	37.1	SZ	schizofrenia	22	M		●	
S06	38.1	SZ	schizofrenia	24	M		●	
S07	41.1	SZ	d.personalità paranoide	19	M		●	
S08	68.1	SA	d.schizoaffettivo	28	M		●	
S09	50.1	BPD	d.bipolare I	24	M		●	
S10	51.1	SZ	schizofrenia	23	M		●	
S11	52.1	SZ	schizofrenia	22	M		●	
S12	67.1	SZ	schizofrenia	24	M		●	
S13	54.1	SZ	schizofrenia	22	M		●	
S14	57.1	SZ	schizofrenia	20	M		●	
S15	58.1	SZ	schizofrenia	25	M		●	
S16	59.1	SZ	schizofrenia	23	M		●	
S17	60.1	SZ	schizofrenia	25	M		●	
S18	61.1	SZ	schizofrenia	24	M		●	
S19	40.1	BPD	depressione nevrotica	26	F		●	
S20	42.1	SZ	psicosi paranoide cronica	25	F		●	
S21	30.1	SA	d.schizoaffettivo	28	F		●	
S22	32.1	SZ	schizofrenia	24	F		●	
S23	36.1	SZ	schizofrenia	20	F		●	
S24	39.1	BPD	psicosi di tipo circolare	28	F		●	
S25	65.1	SZ	schizofrenia	23	M			
S26	66.1	SZ	disturbo delirante-psicosi	38	F			
S27	70.1	SZ	d. delirante paranoide	33	F		●	
S28	71.1	BPD	d. bipolare I	26	F		●	
S29	72.1	BPD	d. bipolare I	26	M		●	
S30	73.1	SA	d.schizoaffettivo	30	M		●	
S31	74.1	SZ	schizofrenia disorganizzata	26	F		●	
S32	75.1	SZ	d. borderline	17	M		●	
S33	76.1	BPD	d. borderline, depressione ricorrente	20	M		●	
S34	14.1	SA	d.schizoaffettivo	25	F		●	
S35	15.1	SZ	schizofrenia paranoide	28	M		●	

Tab. 3.1: Campione di cui è disponibile il DNA. Vengono descritti tutti gli individui costituenti il campione indicandone: la famiglia di appartenenza (COD.FAM.) ed un identificativo individuale (COD.IND.), la diagnosi clinica (CLASSE), l'età di esordio ed il sesso. Inoltre per ogni campione sono state specificate le indagini genetica molecolari a cui è stato sottoposto: genome-wide search (GWS), determinazione degli aplogruppi mitocondriali (Hg), analisi dei microsatelliti sul cromosoma Y (STR chrY).

3.2 ANALISI COMPLESSA DI SEGREGAZIONE

(in collaborazione con la Prof.ssa Chiara Scapoli dell'Università di Ferrara)

Per eseguire l'analisi complessa di segregazione (CSA) è stato utilizzato il programma POINTER il cui algoritmo utilizza l'approccio della scomposizione delle varianze e della stima di massima verosimiglianza per l'individuazione dei modelli di trasmissione (Lalouel et al., 1983).

POINTER è infatti in grado di testare modelli di ereditarietà della patologia molto diversi tra loro: sporadico, poligenico, multifattoriale e a singolo gene principale (dominante, recessivo o a dominanza intermedia).

Con tale programma, le unità di analisi sono rappresentate da famiglie nucleari semplici costituite da padre, madre e figli. Tali nuclei possono essere estrapolati anche da alberi genealogici complessi, in tal caso per ciascun nucleo deve essere identificato un "puntatore" (pointer) (Fig. 3.1).

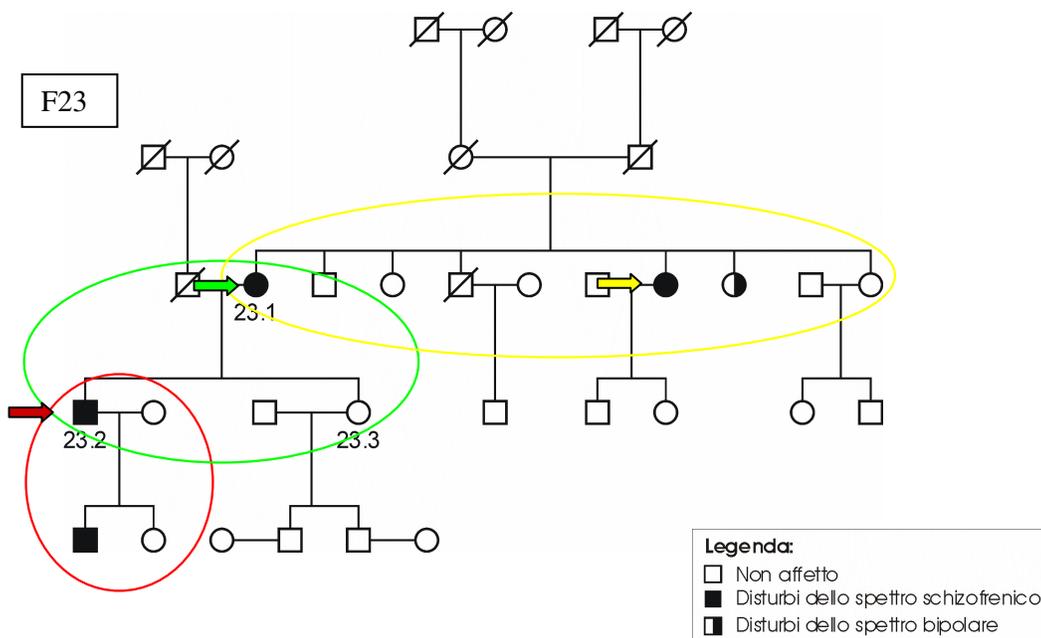


Fig. 3.1: Nella figura è stato riportato come esempio la suddivisione della famiglia F23 in 3 nuclei utilizzati nell'analisi eseguita con il programma POINTER. Le frecce colorate mettono in evidenza gli individui indicati come puntatori per ciascun nucleo d'analisi individuati durante la codifica di questa famiglia.

3.3 ESTRAZIONE DEL DNA

Il DNA è stato estratto da 5ml circa di sangue intero raccolto in apposite provette contenenti una soluzione anticoagulante (Potassio-EDTA 0.78 M) e conservato a -20°C. Il protocollo utilizzato è una modificazione del metodo *salting out* descritto da Miller (Miller et al., 1988).

Protocollo:

- ✓Una volta scongelato, trasferire il sangue in un tubo Falcon da 50ml e portare ad un volume di 40ml mediante aggiunta di N-N (NaCl 0.9%; Nonidet 0.1%).
- ✓Mescolare la soluzione per inversione e centrifugare 30min a 3800g (4°C).
- ✓Eliminare il surnatante e lavare il pellet con altri 40 ml di soluzione N-N.
- ✓Centrifugare per 30 min a 3800g (4°C).
- ✓Eliminare il surnatante.
- ✓Aggiungere 4 ml di buffer TEN (TrisHCL 10mM; EDTA 2mM, pH8; NaCl 400mM) e 600µl di SDS 10 % p/v.
- ✓Incubare a 80°C per 3 ore.
- ✓Aggiungere 1 ml di NaCl saturo.
- ✓Centrifugare per 10 min a 3800g (temperatura ambiente).
- ✓Trasferire il surnatante in una provetta Sterilin da 15ml .
- ✓Aggiungere un isovolume di cloroformio e mescolare per inversione.
- ✓Centrifugare per 10 min a 3800g (temperatura ambiente).
- ✓Trasferire con una pipetta sterile il surnatante (contenente DNA) in una Sterilin pulita e aggiungere un isovolume di isopropanolo.
- ✓Precipitare il DNA mediante un movimento oscillante della provetta; il DNA si addenserà e apparirà sotto forma di un flocculo biancastro.
- ✓Centrifugare per 15 min a 3800g (temperatura ambiente).
- ✓Eliminare il surnatante e lavare il pellet con 2ml di etanolo 70%.
- ✓Centrifugare per 10 min a 3800g (temperatura ambiente) e ripetere il lavaggio con etanolo 70%.
- ✓Aspirare il surnatante e far asciugare il pellet in stufa o all'aria.
- ✓Risospendere in 300-500 µl di buffer TE (1M Tris-HCl; 0.5M EDTA; pH 8.0).

a) Quantificazione del DNA

Le basi puriniche e pirimidiniche degli acidi nucleici assorbono radiazioni UV con un picco di intensità massima a 260 nm, è dunque possibile determinare la concentrazione di DNA nella soluzione madre mediante lettura della densità ottica (OD) alla lunghezza d'onda di 260 nm. Inoltre è stato valutato il rapporto delle densità ottiche a 260/280 nm: se questo rapporto è compreso tra 1.6 e 1.8 la lettura spettrofotometrica corrisponde con buona probabilità alla concentrazione di acidi nucleici. Un rapporto inferiore indica che nella soluzione sono presenti ancora molte proteine e il DNA deve essere ri-precipitato, un rapporto superiore indica che il campione potrebbe essere contaminato da cloroformio.

A tale scopo è stato utilizzato uno spettrofotometro GeneQuant Pro (Amersham).

Una volta misurate le concentrazioni di DNA nelle soluzioni madre, per ciascun campione sono state allestite delle diluizioni a 50 ng/μl da utilizzare nelle analisi molecolari.

3.4 AMPLIFICAZIONE DI SEQUENZE DI DNA MEDIANTE PCR

Salvo diversa indicazione, tutte le reazioni di PCR (*Polimerase chain reaction*) in seguito descritte, sono state effettuate utilizzando la miscela di reazione e le condizioni di amplificazione riportate nella tabella (Tab. 3.2).

Miscela di reazione		Programma standard di amplificazione	
DNA (50ng/ μ l)	1 μ l	Denaturazione iniziale	95°C x 12 min
dNTP _s (1mM)	2.5 μ l	Denaturazione	95°C x 30 sec
Buffer 10X	1.2 μ l	Appaiamento dei primers	T _m x 30 sec
Primer F e R (10pmol/ μ l)	0.4 μ l +0.4 μ l	Estensione	72°C x 30 sec
TaqGold (5u/ μ l)	0.08 μ l	Estensione finale	72°C x 10min
H ₂ O milliQ	6.42 μ l	Stabilizzazione	4°C x 10 min
Volume finale	12 μ l		

33 cicli

Tab. 3.2: A destra nella tabella vengono elencati i reagenti utilizzati nella miscela di amplificazione e i relativi volumi. A sinistra invece viene riportato un programma di amplificazione standard in cui per ogni fase vengono specificati temperatura e durata. La temperatura di melting (T_m) utilizzata non viene specificata poiché dipende dalla sequenza dei primers.

a) Verifica in agarosio dei prodotti di PCR

Per controllare la riuscita e la resa delle reazioni di PCR, un'aliquota di 2 μ l del prodotto di amplificazione è stata sottoposta ad elettroforesi orizzontale in gel di agarosio al 2% p/v, unitamente ad un appropriato marcatore di peso molecolare.

Il gel viene preparato mescolando l'agarosio in polvere, TAE1X (Tris-Acetato 0.04mM, EDTA 10mM pH=8) e bromuro d'etidio alla concentrazione finale di 0,5 μ g/ml.

Le bande nel gel sono state visualizzate ai raggi UV mediante l'utilizzo di un transilluminatore al fine di verificare la presenza dei frammenti di DNA amplificato ed il loro corretto peso molecolare.

b) GenomiPhi DNA amplification kit

Per alcuni dei soggetti indagati la quantità di DNA estratto non risultava sufficiente per eseguire il numero di analisi molecolari previste, pertanto si è deciso di amplificare il DNA genomico utilizzando il *GenomiPhi DNA Amplification Kit*.

Il Kit è fornito dalla ditta *Amersham Biosciences* e utilizza la DNA polimerasi del batteriofago Phi29, un enzima con un'elevata processività. La reazione di amplificazione che dura 18 ore, permette di ottenere diversi microgrammi di DNA ad alto peso molecolare (10-50Kb), partendo da pochi nanogrammi. Il DNA che si ottiene è una copia rappresentativa di tutto il campione di partenza.

Il *GenomiPhi DNA Amplification Kit* consiste nei seguenti componenti:

- *sample buffer*: soluzione 50mM Tris-HCl pH 8.2, 0.5M EDTA contenente esameri casuali i quali si appaiono al DNA stampo in modo non specifico, fungendo da primer per la sintesi di nuovo DNA;
- *reaction buffer*: contiene i deossinucleotidi e una serie di sali ad un pH ottimale per l'attività dell'enzima;
- *enzyme mix*: buffer a composizione non nota contenente i dNTPs, altri esameri casuali e l'enzima Phi29DNApolimerasi che catalizza la polimerizzazione.

Protocollo:

- ✓ aliquotare in una Eppendorf da 0.2ml 1 µl di DNA genomico-stampo e 9µl di *sample buffer*, i campioni così preparati sono posti per 3 minuti a 95°C in modo da denaturare i due filamenti di DNA;
- ✓ trasferire immediatamente in ghiaccio i campioni per impedire la rinaturazione del DNA stampo. In questa fase gli esameri casuali presenti nella miscela si appaiono in maniera non specifica al DNA a singolo filamento;
- ✓ preparare una premix contenente 9µl di *reaction buffer* e 1µl di *enzyme mix* per ogni campione ed aggiungere poi 10 µl di premix ad ogni DNA denaturato;
- ✓ incubare per 16-18 ore a 30°C. A tale temperatura l'enzima Phi29DNApolimerasi inizia la sua attività di sintesi e replica il DNA-stampo estendendo gli inneschi casuali.
- ✓ inattivare l'enzima a 65°C per 10.

Per poter quantificare, mediante misurazioni spettrofotometriche, il DNA amplificato col *Kit GenomiPhi*, è necessario prima purificare il DNA stesso; i residui di dNTPs e di esameri infatti,

interferiscono con le misure di assorbanza del DNA, portando alla lettura di valori di concentrazione più elevati rispetto a quelli reali.

La purificazione di DNA genomico è stata effettuata mediante precipitazione con etanolo-ammonio acetato, seguendo un protocollo standard suggerito dallo stesso manuale del *Kit GenomiPhi*.

3.5 ANALISI DEGLI APLOTIPI DEL CROMOSOMA Y

Nel cromosoma Y sono stati analizzati 8 microsatelliti altamente polimorfi: DYS19, DYS385, DYS389, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, YCAII. L'aplotipo definito dagli alleli di questi marcatori (noto come "aplotipo esteso") viene comunemente utilizzato nelle analisi di genetica forense ed ha una capacità del 90% di discriminare cromosomi Y appartenenti ad individui diversi nella popolazione europea (Butler et al., 2002).

Questi microsatelliti sono STRs (*Short Tandem Repeat*) ovvero corte ripetizioni in tandem di unità di-, tri- e tetra-nucleotidiche che mappano nella regione non ricombinante del cromosoma Y. I primers per i marcatori YCAII, DYS385, DYS389, riconoscono una regione duplicata del cromosoma Y e quindi amplificano ciascuno due diverse sequenze polimorfe (YCAII a/b, DYS385a/b, DYS389 I/II).

Le caratteristiche dei primers utilizzati (progettati utilizzando il programma PRIMER3) e le condizioni di amplificazione sono riportate in tabella (Tab. 3.3).

NOME	STR	PRIMER	Tm	RANGE
YCAII	di	F:TATATTAATAGAAGTAGTGA	45°C	a/b 135-163 bp
		R:TATCGATGTAATGTTATATTA		
DYS19	tetra	F:ACTACTGAGTTTCTGTTATAGTGTTTT	61°C	233-269 bp
		R:GTCAATCTCTGCACCTGGAAAT		
DYS385	tetra	F:AGCATGGGTGACAGAGCTA	61°C	a/b 242-306 bp
		R:GCCAATTACATAGTCCTCCTTTC		
DYS389	tetra	F:CCAACCTCATCTGTATTATCTATG	61°C	I 143-175 bp II 263-293 bp
		R:GTTATCCCTGAGTAGTAGAAGAATG		
DYS390	tetra	F:TATATTTTACACATTTTGGGCC	61°C	189-233 bp
		R:GTGACAGTAAAATGAAAACATTGC		
DYS391	tetra	F:TTCATCATAACCCATATCTGTC	61°C	93-121 bp
		R:GATAGAGGGATAGGTAGGCAGGC		
DYS392	tri	F:TAGAGGCAGTCATCGCAGTG	61°C	290-323 bp
		R:GACCTACCAATCCCATTCCTT		
DYS393	tetra	F: GTGGTCTTCTACTTGTGTCAATAC	61°C	109-133bp
		R: GAACTCAAGTCCAAAAAATGAGG		

Tab. 3.3: Caratteristiche dei microsatelliti utilizzati nell'analisi del cromosoma Y. Vengono specificate, la tipologia della ripetizione (STR), le sequenze dei primers le temperature di melting utilizzate (Tm) e la dimensione attesa dei prodotti (RANGE).

a) Elettroforesi in gel denaturante di poliacrilammide

I diversi alleli di questi marcatori sono stati separati mediante elettroforesi in un gel denaturante di poliacrilammide.

L'acrilammide viene fatta polimerizzare in presenza di piccole quantità di N-N'-metilen-bisacrilammide che per la sua struttura, funge da agente in grado di formare legami crociati e consente ai monomeri di acrilammide di polimerizzare, formando lunghe catene che si ramificano ogni qualvolta viene incorporata una molecola di bisacrilammide. Si ottiene così una matrice con legami crociati a struttura ben definita. A seconda del rapporto acrilammide/bisacrilammide e della concentrazione di acrilammide stessa, è possibile variare la dimensione delle maglie e quindi la capacità risolutiva del gel.

I gel denaturanti vengono fatti polimerizzare in presenza di urea che ha lo scopo di impedire l'abbiamento tra gli acidi nucleici. Il DNA denaturato quindi può migrare nel gel solo in funzione del suo peso in modo quasi completamente indipendente dalla composizione in basi.

Protocollo:

- ✓ Preparare due lastre di vetro (l'una più corta dell'altra su un lato) perfettamente pulite in modo che risultino sigillate su tre lati e tenute separate da appositi spaziatori.

- ✓ Sotto cappa chimica preparare una soluzione contenente: 10ml TBE5X, 17.5 ml di urea 8M, 22.5ml di acrilammide 29:1 o 19:1 (contenete urea 6M) al 40%.
- ✓ Aggiungere alla soluzione 400µl di APS (ammonio persolfato 10% p/v) e 40 µl di TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiammina) che catalizzano la reazione di polimerizzazione.
- ✓ Versare il gel tra le lastre di vetro ed inserire sul lato libero il pettine che permetterà di ottenere la riga di pozzetti ed aspettare la polimerizzazione.
- ✓ Montare le lastre su un apparato di elettroforesi verticale, versare sulle apposite vaschette il tampone di corsa TBE1X ed effettuare una breve pre-corsa a 300V per stabilizzare le condizioni di corsa del gel.
- ✓ Aliquotare 1-4µl di amplificato in eppendorf da 0.5ml ed un isovolume di *denaturing loading buffer 2X* (formammide 95% p/v pH=8, *Xylen-cyanol blue* 0.05% p/v, blu di bromofenolo 0.05% p/v, EDTA0.5M 1.9% v/v).
- ✓ Denaturare i campioni così preparati per 10 min a 95°C e quindi caricarli nel gel.
- ✓ L'elettroforesi viene effettuata applicando una differenza di potenziale di 500V per un tempo che varia dalle 2 alle 7 ore in base alle dimensioni dei frammenti amplificati.

Tutte le condizioni di corsa per i marcatori sul cromosoma Y sono riassunte in tabella (Tab.3.4).

NOME	RANGE	ACRILAMMIDE:bis-ACRILAMMIDE	CORSA
YCAII	a/b 135-163 bp	19:1	3h 500V
DYS19	233-269 bp	29:1	4h 30' 500V
DYS385	a/b 242-306 bp	29:1	4h 30' 500V
DYS389	I 143-175 bp II 263-293 bp	29:1	4h 500V
DYS390	189-233 bp	29:1	4h 30' 500V
DYS391	93-121 bp	19:1	3h 500V
DYS392	290-323 bp	29:1	8h 500V
DYS393	109-133bp	19:1	3h 500V

Tab. 3.4: Marcatori analizzati sul cromosoma Y. Dimensione attesa degli amplificati (RANGE), tipo di gel utilizzato nell'elettroforesi (rapporto acrilammide bis-acrilammide) e tempo di corsa necessario per la separazione degli alleli.

b) Colorazione argentica del gel di poliacrilammide

Le varianti alleliche dei marcatori microsatelliti analizzati mediante elettroforesi in gel di acrilammide, sono state evidenziate mediante colorazione argentica e successivamente digitalizzate con l'utilizzo di uno scanner.

Protocollo:

- ✓ Trasferire il gel in una vaschetta e coprire con una soluzione allo 0.17% di AgNO_3 (nitrato d'argento) per 25 min.
- ✓ Lavare per 2 min in acqua bidistillata per rimuovere l'argento che si è legato in eccesso.
- ✓ Eliminare l'acqua e versare 250ml di soluzione di sviluppo (NaOH al 3% p/v e formaldeide allo 0.27% v/v). La durata di questa fase (in genere 8-20 minuti) dipende dalla quantità di amplificato caricato.
- ✓ Lavaggio con una soluzione di acido acetico al 5% v/v per neutralizzare l'NaOH utilizzato durante lo sviluppo.

3.6 ANALISI DI LINKAGE

a) Genome-wide search

In questo lavoro è stata effettuata una ricerca su tutto il genoma (*Genome Wide Search*): tale metodica si basa sull'utilizzo di numerosi marcatori polimorfi (*CA repeats*) distribuiti omogeneamente lungo tutti i cromosomi. L'elevato grado di polimorfismo di lunghezza di queste sequenze, la distribuzione omogenea lungo l'intero genoma e la facilità di tipizzazione, le rendono particolarmente adatte a fungere da marcatori del DNA.

Dal punto di vista operativo, si è utilizzato il set Human Linkage Mapping set v2.5-MD10 (Applied Biosystems) costituito da un totale di 382 microsatelliti fluorescenti altamente informativi (eterozigotà media di 0.8), distribuiti nel genoma con una distanza media di 10 cM. I marcatori di questo set sono coniugati (all'estremità 5' del primer forward) con 3 fluorofori diversi che permettono di discriminare i frammenti di DNA amplificati non solo sulla base del peso molecolare ma anche per la fluorescenza emessa quando eccitati da un laser. Ciò permette di analizzare in un'unica corsa elettroforetica più marcatori contemporaneamente che vengono quindi organizzati in gruppi, detti pannelli. Complessivamente il set utilizzato è costituito da 27 pannelli. I fluorofori utilizzati sono il FAM che emette fluorescenza ad una lunghezza d'onda di 540nm (blu), HEX che emette a 560 nm (verde) e NED che emette a 580 nm (giallo).

Una peculiarità dei marcatori appartenenti al kit utilizzato è quella di poter essere amplificati tutti con le stesse condizioni (Tab. 3.5) e questo contribuisce molto a standardizzare il disegno sperimentale che si utilizza per amplificarli. Le reazioni di PCR sono state allestite in piastre da 96 e 384 pozzetti utilizzando la stazione robotica miniprep60 (TECAN) e quindi amplificate in appositi termociclatori (PTC 200; MJ Research).

REAGENTI	VOLUMI(µl)	TEMPERATURA	TEMPO	
Buffer	1.2	95°C	12'	X 10 cicli
MgCl ₂	1.2	94°C	25''	
dNTPs	2.5	55°C	25''	
H ₂ O	1.62	72°C	45''	
Primers	0.4	89°C	25''	
TagGold	0.08	55°C	25''	X 25 cicli
DNA	5	72°C	45''	
Tot.	12	72°C	12''	
		4°C	10'	

Tab. 3.5: Nella tabella a sinistra sono riportati i reagenti utilizzati nella mix di reazione ed i rispettivi volumi; a destra invece è riportato il programma di amplificazione.

Le sequenze amplificate con tali primers sono state successivamente analizzate utilizzando il servizio di genotipizzazione del BMR-Genomics.

In un secondo momento si è ritenuto opportuno selezionare dal set Human Linkage Mapping set v2.5-HD5 (Applied Biosystems), 85 microsatelliti al fine di aumentare il numero di marcatori in regioni cromosomiche poco coperte dalla precedente analisi.

Tali marcatori sono stati ordinati sulla base del fluoroforo e delle dimensioni attese in paia di basi, e quindi organizzati in 7 pannelli contenenti ciascuno dai 10 ai 13 marcatori (Tab. 3.6).

	NOME	FLUO	RANGE
PANNELLO1	D3S1600	HEX	189-205
	D3S1309	HEX	138-156
	D3S1593	FAM	141-161
	D3S1555	FAM	225-245
	D3S3609	FAM	171-193
	D4S2994	FAM	99-131
	D22S1170	FAM	201-215
	D2S2354	FAM	263-283
	D3S3715	NED	143-155
	D3S3637	NED	184-214
	D3S3725	NED	80-108
	D3S3668	NED	243-265
	D6S1650	NED	116-136
PANNELLO2	D3S3697	HEX	203-228
	D3S3521	FAM	268-302
	D3S1265	FAM	220-244
	D10S1656	FAM	144-162
	D3S3592	NED	167-181
	D4S3022	NED	129-157
	D21S1922	NED	248-260
	D4S1586	NED	107-125
	D6S452	NED	269-288
D18S1107	NED	85-99	
PANNELLO3	D2S362	HEX	108-124
	D2S2202	HEX	245-255
	D11S914	HEX	281-293
	D5S618	HEX	159-179
	D5S2031	FAM	194-218
	D6S1721	FAM	261-281
	D6S282	FAM	107-133
	D14S980	FAM	162-192
	D3S3567	NED	267-289
	D4S2930	NED	223-241
	D14S990	NED	151-169
	D14S75	NED	123-148
	D21S1255	NED	312-332
PANNELLO4	D8S1743	HEX	91-121
	D21S1899	FAM	173-193
	D14S1044	FAM	230-244
	D15S988	FAM	101-121
	D18S468	FAM	279-291
	D8S1705	FAM	196-216
	D13S1241	FAM	329-349
	D9S289	FAM	77-95
	D10S570	FAM	295-313
	D22S277	NED	165-201
	D14S1037	NED	98-148
	D14S1050	NED	217-239

	NOME	FLUO	RANGE
PANNELLO5	D14S1036	HEX	131-149
	D13S1296	HEX	94-122
	D12S1583	FAM	227-255
	D12S1708	FAM	175-183
	D11S912	FAM	109-131
	D13S1320	FAM	265-275
	D9S1834	FAM	189-204
	D6S1573	FAM	278-298
	D22S1163	FAM	147-163
	D11S4094	NED	189-203
	D9S1781	NED	241-261
	D7S1870	NED	116-140
	D1S2877	NED	147-161
PANNELLO6	D20S851	HEX	69-91
	D10S1765	HEX	170-192
	D4S3046	HEX	99-111
	D4S2962	HEX	106-131
	D21S1911	HEX	137-159
	D6S259	FAM	275-293
	D8S543	FAM	117-141
	D20S902	FAM	303-319
	D16S3027	FAM	213-238
	D18S56	NED	109-123
D9S269	NED	177-195	
D9S269	NED	177-195	
PANNELLO7	D8S1779	HEX	197-211
	D8S256	HEX	108-136
	D17S1795	HEX	139-149
	D2S140	FAM	159-175
	D4S2924	FAM	263-279
	D8S1720	FAM	141-155
	D12S1675	FAM	218-232
	D22S1169	FAM	69-85
	D22S1174	NED	126-152
	D14S1040	NED	90-120
	D3S3685	NED	208-229
D16S500	NED	188-204	

Tab. 3.6: Organizzazione dei pannelli ed elenco dei marcatori del kit Human Linkage Mapping set v2.5-HD5 (Applied Biosystems) selezionati al fine di ottenere una copertura adeguata in tutte le regioni del genoma. Nel medesimo pannello sono stati inseriti marcatori

associati allo stesso fluoroforo (FLUO) ma con dimensioni degli alleli diverse (RANGE), o viceversa marcatori con range allelico sovrapponibile, ma associati a fluorofori diversi.

b) Fine mapping

Al fine di confermare e/o ridefinire le regioni risultate positive nell'analisi del genoma (GWS), sono stati analizzati altri 24 marcatori, selezionati tenendo conto della loro eterozigotità e della localizzazione, fisica e genetica, lungo il cromosoma. Tali marcatori, sono stati scelti tra quelli già noti nei database o individuati ex novo a partire da sequenze ripetute del genoma che, per le loro caratteristiche, potevano essere polimorfe e rappresentare quindi delle VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*).

Più nello specifico, sono stati aggiunti: 7 marcatori nel cromosoma 1p (distanza media di mappa tra marcatori consecutivi in questa regione 1.9cM), 6 in 1q (distanza media 3.5cM), 4 in 4p (distanza media 4cM) e 7 in 15q (distanza media 2.4cM).

L'elenco dei marcatori selezionati e le loro caratteristiche sono riportate in tabella (Tab. 3.7).

NOME	PRIMER	FLUO	RANGE	Tm
D4S1587	HLM v2.5-HD5	HEX	226-238	55°
D15S212	HLM v2.5-HD5	NED	345-359	55°
D4S2971	HLM v2.5-HD5	HEX	141-163	55°
D4S2912	HLM v2.5-HD5	FAM	175-201	55°
D4S428	HLM v2.5-HD5	NED	195-211	55°
D15S1014	HLM v2.5-HD5	NED	192-204	55°
D1S229	HLM v2.5-HD5	HEX	191-207	55°
D1S2709	HLM v2.5-HD5	HEX	199-205	55°
D1S507	HLM v2.5-HD5	FAM	191-211	55°
D1S2644	HLM v2.5-HD5	FAM	120-136	55°
D1S434	HLM v2.5-HD5	NED	136-150	55°
D1S2833	HLM v2.5-HD5	FAM	80-100	55°

NOME	PRIMER	FLUO	RANGE	Tm
D1S228	F: ACTGCAACATTGAAATGGCA R: TAGTATTTTACAGGGACCATAG	HEX	128-140	57°
D15S207	F: ACTTCCTCAATCCCAAGAA R: TTTTGAAGTGAAGATGGAGC	HEX	160-174	57°
D1S2672	F: ATCCATCTTGGTGGCTTTG R: GTGGGTGTGGGACCATTCC	FAM	134-158	56°
D1S251	F: GTCTCCAGCCTGCCAC R: GACCAAGCAACTTCACTCC	FAM	249-271	57°
D1S1592	F: GGTGACAGGTATTGACTGCC R: TTGAGGGCAGAGATTGTCTC	FAM	233-245	57°
D1S409	F: CTGATTCTAGGTTGGTCACT R: AGCCACAGTAAATATTGTT	FAM	320-345	57°
D1S2850	F: CGAAGGTGTACTGGGACTGG R: AATCAGGATCATGCTACAGGG	TAMRA	135-150	59°
D15S203	F: GAGGTGGGAGGATGTTTG R: CATTCCACTGGCTCACTC	TAMRA	172-195	63°
D15S966	F: TGCTGCTCACGAACTTTT R: CCTCTTGGGAACTGTGTAGTATT	TAMRA	210-252	55°
D1S436	F: TGAATGTGTCTCCAGTGTTAGC R: CTGTAGAGCAATCTGGCAATATGT	HEX	198-245	63°
N15S1Q	F: GCCAGTCTCCTCTGTGAA R: TCCACCCTCTTATGCTCC	HEX	308-333	59°
D15S657	F: TCTACATTGGACAGAAATGGG R: GATACACATTCTGATTCATGCC	HEX	330-360	55°

Tab. 3.7: Marcatori utilizzati nel fine mapping delle regioni 1p, 1q, 4p, 11q. La seq dei primer dei marcatori appartenenti al set Human Linkage Mapping set v2.5-HD5 (HLM v2.5-HD5) non sono disponibili, negli altri casi invece vengono riportate le sequenze dei primers utilizzati. Per tutti inoltre vengono specificate le condizioni con cui sono stati amplificati unitamente ai range allelici.

c) Lettura delle varianti alleliche

I dati grezzi ottenuti dalla genotipizzazione al sequenziatore sono stati elaborati mediante l'utilizzo del programma *Genotyper 3.5* che permette di visualizzare, in un grafico bidimensionale, le varianti alleliche di ogni marcatore sotto forma di picchi di fluorescenza. I picchi che corrispondono alle varianti alleliche vengono etichettati dall'operatore, ottenendo la dimensione dell'allele in bp.

Una volta identificati e controllati tutti gli alleli di un pannello, è possibile creare una tabella riassuntiva in cui sono riportati, per ciascun marcatore, i genotipi di ogni individuo.

Per effettuare l'analisi di linkage è necessario che gli alleli di un marcatore siano indicati con un numero progressivo anziché con la loro dimensione in bp. Per convertirli è stato utilizzato il programma *Linkage Designer* creato da Guy Van Camp costituito da un foglio di lavoro Excel contenente una serie di macro. Il programma considera singolarmente i marcatori elencati nella tabella creata da *Genotyper* e analizzandone gli alleli, li separa in intervalli numerati progressivamente. Una volta ottenuta la corretta numerazione, i dati vengono trasferiti in un foglio Excel in cui sono riportati in formato numerico gli individui di ogni famiglia, le relazioni tra loro, il sesso e il fenotipo. Questo file costituisce uno degli input file dei programmi utilizzati nel calcolo del LOD score.

d) Multipoint Linkage Analysis

Per l'analisi di linkage è stato utilizzato il programma GENEHUNTER-PLUS (Kruglyak et al., 1996).

GENEHUNTER è in grado di effettuare un'analisi parametrica in più famiglie calcolando sia il LOD score a due punti che quello a più punti (*multipoint LOD score*). Inoltre effettua l'analisi di linkage non parametrica (NPL) considerando la segregazione di alleli identici per discendenza (IBD) tra soggetti affetti della stessa famiglia.

Questo programma riesce a calcolare contemporaneamente il lod score parametrico a più punti (*multipoint*) e NPL se vengono forniti due input file:

- nel *parameter file* sono riportati i parametri che definiscono il modello della malattia (frequenza allelica, penetranza e fenocopia) e i dati relativi ai marcatori (numero, frequenza degli alleli e distanza genetica tra di essi). In questo lavoro la distanza tra i marcatori è stata definita utilizzando la mappa genetica Rutgers (<http://compgen.rutgers.edu/maps/>).

- il *pedigree file* contiene i dati relativi ad ogni individuo (relazioni di parentela, sesso e fenotipo) e i genotipi ottenuti per ogni marcatore.

Per individuare regioni in linkage si è ritenuto più proficuo procedere con l'approccio "*affected only*", che prevede di considerare esclusivamente i membri affetti, ponendo come sconosciuto il fenotipo dei soggetti non ammalati. Il LOD score parametrico è stato calcolato sia con modello dominante (vettore di penetranza 0.01, 0.8, 0.8) che recessivo (vettore di penetranza 0.01, 0.01, 0.8).

Il programma GENEHUNTER inoltre, consente di calcolare per i modelli parametrici, un valore di LOD score che viene corretto sulla base dell'eterogeneità dei segnali di linkage ottenuti dalle varie famiglie analizzate. Questo tipo di LOD score, definito HLOD (Heterogeneity LOD score), permette da un lato di minimizzare gli errori dovuti a test multipli e dall'altro di massimizzare i segnali ottenibili nel caso in cui buona parte delle famiglie indagate mostrasse linkage. Ogni valore di HLOD pertanto viene associato ad un parametro α ($0 < \alpha < 1$) che è proporzionale al numero di famiglie analizzate che contribuiscono al segnale di linkage.

e) Stima di frequenze alleliche dei marcatori

Nel calcolo del LOD score non parametrico, la corretta definizione delle frequenze alleliche dei singoli marcatori risulta di fondamentale importanza per la determinazione probabilistica della porzione di alleli uguali per discendenza (IBD) e quelli invece uguali per stato (IBS).

Per ottenere una stima il più possibile realistica di tali frequenze nel campione di popolazione indagato, è stato utilizzato il programma CC-QLS (*Case Control Quasi-Likelihood Score*) che, sulla base delle parentele esistenti fra gli individui del campione, individua le diverse varianti alleliche e ne stima la relativa frequenza.

Questo programma è stato ideato per effettuare studi di associazione caso-controllo includendo anche individui imparentati fra di loro (Bourgain et al.2003).

CC-QLS necessita di 2 input file:

- il *pedigree file* contiene i dati relativi a tutti gli individui, ai loro genitori e gli alleli riconducibili ad ogni marcatore;
- un secondo file contiene il coefficiente di *Kinship* per ogni individuo analizzato. Questo coefficiente è legato al grado di parentela tra gli individui di una famiglia e definisce la probabilità che uno stesso allele condiviso tra tali soggetti sia identico per discendenza.

L'output fornisce la stima delle frequenze di tutti gli alleli per ciascun marcatore analizzato,

corretta da eventuali *bias* dovuti alla presenza nel campione di individui tra loro parenti. In questo modo è possibile ottenere una miglior stima delle frequenze alleliche sfruttando i dati ottenuti dalla genotipizzazione di famiglie.

Tali frequenze sono state inserite nel *parameter file* del programma GENEHUNTER ed utilizzate nell'analisi di linkage.

f) Definizione delle soglie di significatività e suggestività

Per stimare la significatività dei risultati ottenuti, anche alla luce del numero di marcatori analizzati e dei test multipli applicati, sono state effettuate delle simulazioni su tutto il genoma.

Mediante il programma MERLIN (*Multipoint Engine for Rapid Likelihood Inference*) sono state generate 1000 repliche dell'analisi sull'intero genoma in cui per ciascun marcatore sono stati attribuiti alleli in modo casuale nell'ipotesi di assenza di linkage (Abecasis, 2002).

Alcuni parametri quali la struttura delle famiglie, il numero dei marcatori analizzati e il numero e la frequenza di ciascun allele sono stati mantenuti costanti in ogni simulazione. Ciò ha permesso di ottenere dati che rispecchiassero completamente l'analisi condotta sul campione.

Successivamente, per ciascun marcatore di ogni replica è stato calcolato il LOD score con il programma GENEHUNTER registrando i valori massimi ottenuti in ognuna delle 1000 analisi del genoma.

In tal modo si sono potuti ricavare i valori empirici di P e le soglie di suggestività e significatività, intese come quei valori di LOD score ottenuti in modo casuale rispettivamente una volta (suggestività) e 0.05 volte (significatività) per "genome scan".

3.7 ANALISI DELLE REGIONI CROMOSOMICHE 3q24-27 E 18q23

Al fine di caratterizzare maggiormente le regioni cromosomiche 3q24-27 e 18q23 sono stati analizzati un totale di 29 marcatori (18 sul cromosoma 3 e 11 sul 18) localizzati all'interno di tali intervalli (Tab. 3.8 e Tab. 3.9).

Poiché alcuni tratti cromosomici richiedevano una elevata caratterizzazione, non disponendo di microsatelliti informativi noti, sono state appositamente disegnate 8 coppie di primers fiancheggianti sequenze di DNA con ripetizioni di-, -tri e tetra-nucleotidiche (3s145.587, 3S144.006, 3s144.572, 3s144.973, 18S73.255, 18S73.597, 18s73.318, 18s73.661).

Cromosoma 3					
NOME		PRIMER	FLUO	bp	Tm
D3S1282	F:	CTGAGATTAAGTTTATTGGGG	FAM	288	53°
	R:	AATATAATCATGCTATCTCCA			
D3S1246	F:	CATTCTGATACATTACAGTC	non marcato	127	51°
	R:	AATCTGAACAGTAATGAAGG			
D3S1574	F:	CCATTTGGGAAAATCCTGAA	HEX	189	62.5°
	R:	AGGGTTAACTCCCCTACCC			
D3S1556	F:	CACGCCAGCCTTATTCT	HEX	250	63.5°
	R:	ATTAGCTAGGCACGGTGGTG			
D3S1306	F:	TTGAATACCCTCCAAGCAC	FAM	243	60°
	R:	AGGGCTGCTGCTAGAGATTG			
D3S1275	F:	TGCAGATCTTGGGATTCTTG	FAM	198	60°
	R:	TGGTTGGCCACATACACTTG			
D3S3523	F:	TGGATGAGAGGCCAGATAC	FAM	290	58°
	R:	TGAAAATGCAAAGGAGCTAAA			
D3S1576	F:	GCTTTGGACGCAGGAAGATA	HEX	290	59°
	R:	AGAACA AAAAGGGAAGA ACCC			
D3S3694	F:	TTCATCCATCTTCGCACAAA	FAM	192	60°
	R:	CATCTTCACAACAGCCAAGC			
3s145.587	F:	TCCTTTCCCTAGGTGCCTTT	FAM	132	60°
	R:	CAGCCTGTGAGACAGCTTGA			
3s144.006	F:	GCGGACTCCACCTCAGAAC	non marcato	213	60°
	R:	CAGTGACAGAATGGGTATTTTGA			
3s144.572	F:	GAGAGGAGGAAGTTCACAGCA	FAM	366	60°
	R:	CCATTGTGAAAGCGATGATG			
3s144.973	F:	GTCCAAGACAGCCTCAGAGC	non marcato	161	59.5°
	R:	GCAAAGTAGCACCAGGGATG			
D3S1299	F:	TTGGGGGAAAAATTGAAAGA	non marcato	174	59.5°
	R:	TGGTTAGTATCCTTCCAGACCTTC			
D3S3689	F:	AGGCTGAGGAAAGGAAAT	non marcato	148	55°
	R:	TGTAGAGATGTTAATGGGGACATC			
D3S1605	F:	CTCATTGCTTAAGGTTTGATC	non marcato	152	55°
	R:	TAGACTTCCACCCTGGCT			
D3S3579	F:	GGGAAATTTGAGCAACCTG	non marcato	191	59.5°
	R:	TTGAAACTCACTGGGGATTG			
D3S3673	F:	TTCAGCCTGTGACGTTAATAG	HEX	137	55°
	R:	GGCCCTAGATGGTTATGTG			

Tab. 3.8: Caratteristiche dei microsatelliti utilizzati nell'analisi della regione 3q24-26. Vengono specificate le sequenze dei primers, il fluoroforo di marcatura (FLUO), le temperature di melting utilizzate (Tm) e la dimensione attesa dei prodotti (bp).

Cromosoma 18				
NOME	PRIMER	FLUO	bp	Tm
D18S1371	F: CCCCTCCTTCCTCTCTCTC	non marcato	215	60°
	R: GCCTGTGTCTGACTGTTGG			
D18S1009	F: GAATGCTCCCTTATCATGCTC	non marcato	158	60°
	R: ATTCTGGTGTGGGAGACAAA			
D18S554	F: CCAATAGGGAAGAAGTTTGCA	TET	315	57.5°
	R: TGACCCTACCCTCAATTCTG			
D18S50	F: TGCCATTTGCTGTTTCTG	non marcato	239	60°
	R: GCTCATTATAATACTCAGGGCAAC			
18S73.255	F: GCGGAACCCCATGTCTACTA	non marcato	293	60°
	R: GGACACTGAGAAATCAGGATCA			
18S73.597	F: AGAAGGGCGTTCATCATCAG	non marcato	187	60°
	R: CCCCTAAGAAGTCCATAGATCA			
D18S461	F: CACCCTGTCCATGCTC	NED	165	54°
	R: CACATATCACTTTGGGTTG			
D18S1122	F: CCCTATCTTGCTTCTCCTTG	HEX	300	58°
	R: CCTATTCATTTGTAGCCATCAGA			
D18S1141	F: TCTTTTGACAAATAACCCC	FAM	275	54°
	R: GGACAGTGGGAGACCT			
18s73.318	F: TGCCCATCAGTCAAAGAGTG	non marcato	127	59°
	R: CCCAGTCACTGTGAATACCATT			
18s73.661	F: TTCCTGAGTCTTTGGGGATG	non marcato	162	59°
	R: AACAGATTGTGCCACTGTGC			

Tab. 3.9: Caratteristiche dei microsatelliti utilizzati nell'analisi della regione 18q23. Vengono specificate le sequenze dei primers, il fluoroforo di marcatura (FLUO), le temperature di melting utilizzate (Tm) e la dimensione attesa dei prodotti (bp).

I marcatori marcati con un fluoroforo sono stati analizzati mediante il servizio di fornito dal BMR-Genomics mentre per quelli non marcati la genotipizzazione è stata ottenuta tramite corsa in gel denaturante di poliacrilammide secondo le condizioni riportate in Tab.3.10 e successiva colorazione argentea (vedi paragrafo 3.5-b).

NOME	STR	bp	ACRILAMMIDE:bis-ACRILAMMIDE	CORSA
D3S1246	di	127	19:1	3h 500V
3s144.973	di	161	29:1	4h 500V
D3S1299	di	174	29:1	3h30' 500V
D3s3579	di	191	29:1	4h 500V
D3S1605	di	152	19:1	4h 500V
3s144.006	di	213	29:1	4h 500V
D3S3689	di	148	19:1	4h 500V
D18S1371	tetra	215	29:1	3h 500V
D18S1009	di	158	19:1	4h 500V
D18S50	di	240	29:1	4h30' 500V
18S73.255	tri	295	29:1	5h 500V
18S73.597	di	187	19:1	4h 500V
18s73.318	di	127	19:1	3h 500V
18s73.661	tetra	162	18:1	4h 500V

Tab. 3.10: Marcatori non fluorescenti analizzati sui cromosomi 3 e 18. Vengono riportati la lunghezza della ripetizione, il rapporto acrilammide bis-acrilammide e il tempo di corsa che ha permesso di separare in modo efficiente gli alleli dei marcatori.

3.8 VALUTAZIONE DELLA OMOGENEITA' GENETICA DEL CAMPIONE RACCOLTO

Al fine di testare l'omogeneità genetica del campione in esame, 96 soggetti sani provenienti dalla città di Chioggia sono stati confrontati a livello molecolare con 23 individui affetti (Pritchard e Rosenberg, 1999).

Per tale scopo sono stati selezionati 22 markers tra quelli appartenenti al set Human Linkage Mapping set v2.5-MD10 e -HD5 (Applied Biosystems). La scelta è stata fatta in modo che i markers analizzati:

- avessero una elevata informatività;
- fossero compatibili per dimensioni e fluorofori in modo da poter essere letti in un numero ridotto di pannelli (pannello A e B);
- mappassero fuori dalle regioni trovate in linkage nel genome-wide scan.

Le condizioni di amplificazione utilizzate sono quelle descritte in tabella (Tab. 3.11). Gli amplificati sono stati poi genotipizzati tramite il servizio fornito dal BMR-Genomics.

PANNELLO A			PANNELLO B		
NOME	MARCATURA	RANGE	NOME	MARCATURA	RANGE
D18S1102	NED	96-108	D12S336	NED	117-135
D1S2877	NED	147-161	D10S189	NED	184-200
D20S115	NED	238-250	D5S416	NED	289-301
D7S516	NED	308-328	D8S549	HEX	78-88
D14S70	HEX	103-119	D9S1682	HEX	152-162
D19S210	HEX	175-195	D12S1723	HEX	201-219
D2S142	HEX	239-259	D11S914	HEX	281-293
D9S287	HEX	299-317	D14S292	FAM	88-104
D13S218	FAM	145-157	D5S2027	FAM	184-206
D17S949	FAM	214-232	D11S1320	FAM	264-280
D4S1575	FAM	292-310	D6S308	FAM	328-356

Tab. 3.11: Caratteristiche dei marcatori genotipizzati nel campione dei controlli e loro organizzazione in 2 pannelli da 11 marcatori ciascuno.

Lo studio della struttura genetica del campione della popolazione di Chioggia è stato effettuato mediante l'analisi molecolare della varianza (AMOVA) utilizzando il programma ARLEQUIN.

a) ARLEQUIN versione 3.0

Arlequin (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>) è un software utilizzato nelle analisi di genetica delle popolazioni.

L'utilizzo di questo programma permette di eseguire un ampio numero di test statistici in modo da ottenere informazioni in merito alle caratteristiche genetiche e demografiche di una popolazione.

Utilizzando questo software è stata eseguita l'analisi molecolare della varianza (AMOVA). L'AMOVA è uno strumento utile per verificare come sia distribuita la variabilità genetica tra popolazioni, utilizzando le distanze molecolari dei diversi aplotipi. A partire da dati molecolari come microsatelliti, RFLP o alberi filogenetici è in grado di stimare il grado di differenziamento genetico all'interno della stessa popolazione e tra gruppi di popolazioni diverse.

L'AMOVA produce stime delle componenti della varianza ed analoghi dell'F-statistico, designati come θ -statistico, che riflettono la correlazione dei diversi aplotipi per i differenti livelli di suddivisione della popolazione (individui, popolazioni e gruppi di popolazioni). La significatività dei componenti della varianza (e quindi la distanza genetica) e del θ -statistico viene testata usando 1000 o 10000 permutazioni dei dati di partenza (Excoffer et al., 1992).

La struttura della popolazione è quantificata da un termine statistico noto come F_{st} . Esso significa "indice di fissazione" e misura la riduzione di eterozigotità di una sottopopolazione dovuta alla deriva genetica, per cui mostra una tendenza alla fissazione dell'allele. Si ottiene confrontando le sottopopolazioni alla popolazione totale. Viene usato per quantificare la proporzione della variazione genetica che è presente tra le sottopopolazioni e all'interno della popolazione totale. E' un termine usato come misura della differenza genetica tra le popolazioni (indice di differenziazione genetica). Per valori di F_{st} compresi tra 0 e 0.01 si individua una assente o piccola divergenza tra le popolazioni, per valori superiori a 0.1 vi è una grande divergenza.

3.9 SEQUENZIAMENTO DELLA REGIONE PROMOTRICE DEL GENE ST8SIA2

Le varianti alleliche degli SNPs (rs3759916, rs3759915 e rs3759914) localizzati nella regione promotrice del gene ST8SIA2 (Ref Seq: [NM_006011.3](#)) sono state analizzate mediante sequenziamento diretto di una regione di 551 bp, utilizzando i primer e le condizioni riportate in tabella (Tab. 3.12).

Una aliquota di 2.5µl dell'amplificato è stata poi purificata mediante l'aggiunta di 0.5µl di EXO (esonucleasi I) e 0.5µl SAP (fosfatasi alcalina) in modo da eliminare nucleotidi e primers non incorporati nella reazione di amplificazione. I campioni così preparati sono stati inviati al servizio di sequenziamento BMR-Genomics.

NOME	PRIMER	Tm	bp
SIAT8B_F	AGGACATTCCATGTAGCTTCTCAA	65°C	551
SIAT8B_R	CCAGGTGCTGATCTTTATCTCCATTT		

Tab. 3.12: Caratteristiche dei primers utilizzati per amplificare la regione promotrice del gene ST8SIA2.

Per la lettura e l'analisi delle sequenze ottenute, si è utilizzato il programma SeqMan2, che consente di visualizzare i cromatogrammi e di allineare contemporaneamente più sequenze nucleotidiche, in modo da facilitare il riconoscimento di differenze presenti nella sequenza.

3.10 DETERMINAZIONE DEGLI APLOGRUPPI ED APLOTIPI MITOCONDRIALI

Per identificare gli aplogruppi mitocondriali presenti nel campione di individui affetti si è scelto di determinare l'assetto allelico di alcuni specifici polimorfismi del genoma mitocondriale, tramite taglio enzimatico, e nella regione ipervariabile 1 (HVI), tramite sequenziamento diretto.

a) Analisi RFLP

L'analisi dei polimorfismi è stata condotta in modo da discriminare progressivamente aplogruppi diversi mediante tagli enzimatici specifici (Fig. 3.2). I polimorfismi diagnostici selezionati nell'analisi sono quelli che permettono di identificare i più comuni aplogruppi mitocondriali europei (De Benedictis et al., 1999).

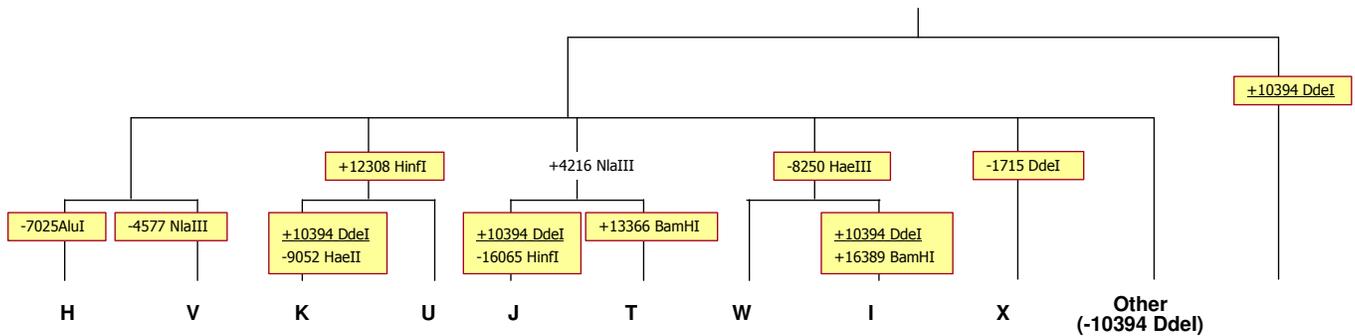


Fig. 3.2: Lo schema si propone di illustrare l'approccio metodologico con cui sono stati eseguiti i saggi di restrizione che permettono di identificare i principali aplogruppi europei. Nei riquadri gialli sono messe in evidenza le posizioni paia di basi dei polimorfismi analizzati e l'enzima utilizzato per l'analisi.

Le sequenze dei primers utilizzati e le condizioni di amplificazione sono riportati in tabella (Tab. 3.13).

NOME	PRIMER	Tm
10394 DdeI	F: TTATGTCATCCCTCTTATTAA	60°
	R: GGGAGGATATGAGGTGTGAGC	
7025 AluI	F: CACTCCACGGAAGCAATA	57°
	R: TGATGGCAAATACAGCTCCT	
4577 NlaIII	F: CCCATCCTAAAGTAAGGTCAGC	58°
	R: AGCTATTAGAAGGATTATGGATGC	
12308 HinfI	F: GGCTTACGACCCCTTATTACCG	58°
	R: ATTACTTTTATTGGAGTTGCACCAAGATT	
9052 HaeII	F: TCCCCATACTAGTTATTATCGAAACC	59°
	R: GGAAGGTTAATGGTTGATATTGC	
16065 HinfI	F: GGGGAAGCAGATTGGGTA	60°
	R: AGGGTTGATTGCTGTACTTGC	
8250 HaeIII	F: CGGGGTATACTACGGTCAA	59°
	R: TTTAGTTGGGGCATTCACTG	
16389 BamHI	F: GCACATTACAGTCAAATCCCTTC	59°
	R: TGATGTCTTATTTAAGGGGAACG	
1715 DdeI	F: GCTAAACCTAGCCCCAAACC	60°
	R: TGGCTCTCCTTGCAAAGTTATT	
13366 BamHI	F: GCCCACTAATCCAACTCTAACA	59°
	R: TTTTGAGTAGTCCTCCTATTTTTCG	

Tab. 3.13. Caratteristiche dei primers utilizzati per amplificare le porzioni del genoma mitocondriale da sottoporre a digestione.

b) Sequenziamento della regione HVI

In questo studio sono stati valutati i polimorfismi presenti nella HVI (Hypervariable Region I) dell'ansa D attraverso il sequenziamento diretto di un frammento di 465 bp.

La sequenza dei primers e le condizioni di amplificazione utilizzati sono riportati in tabella (Tab. 3.14).

NOME	PRIMER	Tm
HVI_F:	CTCCACCATTAGCACCCAAA	59°C
HVI_R:	GCACTCTGTGCGGGATATT	

Tab. 3.14: Caratteristiche dei primers, utilizzati per amplificare una porzione della HVI del DNA mitocondriale.

Una aliquota di 2.5µl prodotto di amplificazione è stata purificata mediante l'aggiunta di 0.5µl di EXO (esonucleasi I) e 0.5µl SAP (fosfatasi alcalina) e quindi inviati al servizio di sequenziamento BMR-Genomics. L'analisi e l'allineamento delle sequenze è stata effettuata con i programmi SeqMan2 e MEGA4.

3.11 ALTRI STRUMENTI BIOINFORMATICI UTILIZZATI

CHROMAS

(non disponibile in rete)

Programma utilizzato per la visualizzazione dei cromatogrammi ottenuti dal sequenziamento diretto. Esso permette di visualizzare i picchi di fluorescenza e di valutare l'intensità e la qualità del segnale ottenuto.

ENSEMBL

(<http://www.ensembl.org/index.html>)

Ensembl è un joint project di EMBL- European Bioinformatics Institute (EBI) e il Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI) per lo sviluppo di un software che produce e mantiene annotazioni di vari genomi eucariotici.

Haplopainter

(<http://haplopainter.sourceforge.net/html/index.html>)

E' uno strumento informatico che consente di disegnare aplotipi in pedigree complessi.

E' particolarmente utile perché è in grado di processare i file di output prodotti dai più comuni programmi di linkage quali GeneHunter, Merlin e Allegro.

Una volta caricati i dati di interesse è possibile modificare i colori e le impostazioni degli aplotipi, visualizzando ad esempio solo le informazioni relative ad alcuni marcatori.

N.C.B.I. (National Center for Biotechnology Information)

(<http://www.ncbi.nlm.gov>)

Divisione del National Library of Medicine (NLM), situato presso il National Institute of Health (NIH), USA. Fondato nel 1988 per decisione governativa con lo scopo di fornire un supporto alla ricerca nella biologia molecolare, gestisce database pubblici e sviluppa software per l'analisi dei dati genomici. Tra tutti gli strumenti disponibili presso il sito del NCBI sono risultati particolarmente utili:

- DbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database): database che identifica e cataloga SNPs (polimorfismi di singoli nucleotidi) di genomi di vari organismi;
- ENTREZ: sistema di ricerca che permette di recuperare informazioni relative a sequenze nucleotidiche e proteiche, mappe, strutture ed informazioni tassonomiche. ENTREZ fornisce inoltre un importante strumento, PUBMED, un programma di ricerca che consente di accedere a tutte le citazioni bibliografiche contenute in MEDLINE.
- OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man): database mondiale delle malattie ereditarie della National Library of Medicine (NLM). Nato come MIM alla J.Hopkins University, è stato successivamente sviluppato ed introdotto in rete dalla N.C.B.I.

NEB CUTTER V2.0

(<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)

Software on-line fornito dal New England Biolabs utile quando si vuole sottoporre una sequenza a taglio enzimatico. Esso consente di inserire una sequenza di DNA della lunghezza massima di 200kb e di individuare tutti i siti di taglio per tutti gli enzimi di restrizione presenti in essa.

MEGA4

(<http://www.megasoftware.net/mega.html>)

MEGA4 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) è un programma largamente utilizzato in genetica di popolazione che permette di analizzare sequenze di DNA o proteine per ricavarne informazioni filogenetiche. In questo lavoro è stato utilizzato fondamentalmente per allineare le sequenze e metterne in evidenza i siti variabili.

Inoltre questo software è in grado di costruire matrici di distanze in base alle differenze nucleotidiche riscontrate tra sequenze, raggruppando quelle con una distanza minore.

MITOMAP

(<http://www.mitomap.org/>)

MITOMAP (the Human Mitochondrial Genome Database) è un database aggiornato con tutti i polimorfismi riscontrati ad oggi sulla sequenza del DNA mitocondriale. I dati contenuti sono ricavati dalla letteratura e vi si possono trovare informazioni in merito a specifiche malattie mitocondriale e alle relative mutazioni patologiche note. Inoltre sono riportate le variazioni comuni presenti nel mtDNA riscontrate in soggetti utilizzati per studi di genetica di popolazione. Nel database sono indicati i polimorfismi, le mutazioni puntiformi, le inversioni, le inserzioni, le delezioni e i riarrangiamenti complessi del DNA mitocondriale; per ciascun evento mutazionale viene riportata anche la regione nella quale è avvenuto.

PRIMER 3

(<http://frodo.wi.mit.edu/>)

Programma gestito e distribuito dalla WI/MIT che consente, inserendo la sequenza di interesse, di progettare una o più coppie di primers specifici con le caratteristiche specificate dall'operatore (T_m, sequenza bersaglio, dimensione dell'amplificato, ecc).

SeqMan2 (DNASar)

(non disponibile in rete)

Programma utilizzato per l'analisi delle sequenze ottenute dal sequenziamento diretto. Importando le sequenze nel formato ABI, è possibile costruire un contiguo e confrontare in

modo rapido i frammenti amplificati a partire dal DNA di individui diversi, evidenziandone così le differenze.

Tandem Repeat Finder

(<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>)

Questo è un programma che permette di localizzare le ripetizioni in tandem in una sequenza di DNA. L'input file è costituito da una sequenza in formato FASTA. L'output consiste in una tabella in cui vengono riassunte tutte le caratteristiche delle repeats trovate: la localizzazione sulla sequenza, la dimensione, il numero di copie e la composizione nucleotidica. E' un programma molto veloce che può analizzare una sequenza di alcune megabasi in pochi secondi.

The Rutgers Combined Linkage-Physical Map of The Human Genome

(<http://compgen.rutgers.edu/maps/>)

Mappa genetica ad alta risoluzione che raccoglie il più ampio set di marcatori polimorfici (14,759) per i quali sono disponibili i dati genotipici. E' stata creata tenendo in considerazione i dati molecolari provenienti dalle famiglie CEPH e deCODE, dati di SNPs e altri tipi di informazioni posizionali basate sulla sequenza del genoma umano ormai completamente disponibile. La posizione dei marcatori nella mappa è quindi supportata sia dagli eventi di ricombinazione che dal confronto con la sequenza genomica. Per queste caratteristiche viene considerata ad oggi lo strumento più aggiornato a cui fare riferimento per conoscere le posizioni genetiche dei marcatori nel genoma umano.

UCSC Human Genome Browser

(<http://www.genome.ucsc.edu>)

Database fornito dalla suite di UCSC Genome Bioinformatics. Permette di analizzare porzioni genomiche, in qualsiasi scala, e di visualizzare moltissime informazioni di tali sequenze, tra le quali la presenza di geni noti e predetti con relativa suddivisione in esoni ed introni, ESTs e mRNA, grado di conservazione, ecc. Inoltre vengono riportati tutti gli SNPs e marcatori microsatelliti noti, con la loro localizzazione non solo fisica ma anche genetica secondo le mappe DeCode, Rutgers e Marshfield). Tra i vari strumenti messi a disposizione dell'utente inoltre, molto utile è il programma Blat, che permette una ricerca della sequenza indagata, la cui posizione è visualizzata nella mappa fisica del genoma.

4 RISULTATI

4.1 RICOSTRUZIONE DEGLI ALBERI GENEALOGICI ED INDIVIDUAZIONE DI POSSIBILI LEGAMI DI PARENTELA TRA LE FAMIGLIE INDAGATE

a) Alberi genealogici

Sono stati identificati nelle città di Chioggia 40 famiglie all'interno delle quali la ricorrenza di disturbi psichiatrici risultava essere particolarmente elevata. Di queste famiglie è stato ricostruito l'albero genealogico fino alla terza/quarta generazione, utilizzando le informazioni disponibili presso l'Ufficio Anagrafe del Comune ed i registri parrocchiali.

In "Appendice A" vengono riportati gli alberi genealogici delle 40 famiglie oggetto di studio, ricostruiti con il programma CYRILLIC.

b) Analisi del cromosoma Y

La popolazione di Chioggia si caratterizza per avere una chiara ricorrenza dello stesso cognome, che ha determinato l'usanza molto antica di associare allo stesso, un soprannome identificativo delle diverse famiglie chiamato "detto". Al fine di risalire quindi a possibili legami di parentela non emersi dalla ricerca anagrafica, si è selezionato dal campione di casi familiari disponibili un gruppo di 22 individui maschi non imparentati rappresentativi dei *lineages* paterni.

In tali soggetti sono stati analizzati 9 marcatori microsatelliti localizzati sul cromosoma Y; la combinazione delle varianti alleliche individuate per tutti i marcatori definiscono il cosiddetto "aplotipo esteso" il quale, secondo dati di letteratura (Butler et al., 2002), presenta una capacità di discriminazione del 90%. L'elenco delle varianti alleliche identificate in ogni marcatore per ciascun individuo è riportato in tabella (Tab.4.1).

	COD.IND.	DYS393	DYS19	DYS391	DYS389I	DYS389II	DYS390	DYS385a/b	DYS392	YCAIIa/b
Y1	20.3	2	1	1	3	3	2	5/9	3	2/2
Y2	25.1	2	1	1	2	2	2	6/9	3	2/2
Y3	27.1	2	1	1	2	3	3	4/5	2	4/2
Y4	26.3	2	1	2	1	1	3	½	3	4/2
Y5	10.1	2	2	1	2	2	1	5/9	1	2/2
Y6	13.1	2	2	1	2	2	3	4/9	1	2/2
Y7	3.1	2	2	2	2	2	1	6/9	3	2/2
Y8	4.6	2	2	2	2	2	2	6/9	1	2/2
Y9	7.1	2	2	2	2	3	2	5/9	1	2/2
Y10	16.1	2	3	1	2	2	2	¾	3	4/2
Y11	1.4	3	1	2	1	1	3	7/8	3	4/2
	2.3	3	1	2	1	1	3	7/8	3	4/2
	9.2	3	1	2	1	1	3	7/8	3	4/2
Y12	45.1	3	1	2	3	3	3	3/7	3	3/2
	4.4	3	1	2	3	3	3	3/7	3	3/2
Y13	23.2	3	2	1	2	3	2	6/7	1	½
Y14	28.1	3	2	2	2	2	2	5/6	3	3/2
Y15	8.1	3	2	2	1	1	3	7/8	3	4/2
Y16	21.2	3	3	2	3	3	2	3/10	3	5/2
Y17	5.2	3	1	2	3	2	3	3/7	3	3/2
Y18	11.4	2	2	2	4	3	4	6/7	3	4/2
Y19	24.2	3	2	1	3	2	3	6/6	3	½

Tab. 4.1: Tabella degli aplotipi. In corrispondenza ad ogni marcatore vengono riportate le varianti alleliche individuate. I marcatori *DYS385* ed *YCAII* per le loro caratteristiche si comportano come marcatori biallelici.

Dall'analisi di queste combinazioni alleliche risulta evidente che su un totale di 22 individui indagati, appartenenti a nuclei familiari indipendenti, sono stati trovati 19 diversi aplotipi di cui 2 rappresentati più volte. Più nel dettaglio, lo stesso aplotipo definito Y11 è condiviso dalle famiglie 1, 2 e 9, mentre Y12 rappresenta l'aplotipo delle famiglie 4 e 45.

Su queste famiglie è stata dunque approfondita la ricerca nei registri anagrafici del comune e negli archivi parrocchiali al fine di individuare antenati in comune. Purtroppo non è stato possibile verificare questa ipotesi e quindi questi pedigree sono stati considerati non uniti da legami di parentela nelle indagini successive.

4.2 ANALISI DI SEGREGAZIONE COMPLESSA

Sulle 40 famiglie con elevata ricorrenza di patologie psichiatriche identificate, è stata eseguita una analisi di segregazione complessa per accertare il modello di trasmissione dei disturbi dello spettro schizofrenico e bipolare nella popolazione di Chioggia.

Questa analisi è stata eseguita con il programma POINTER che ha permesso di valutare quale fosse il modello di trasmissione più probabile per descrivere la segregazione della patologia all'interno delle famiglie.

Sono stati considerati nell'analisi complessivamente 553 individui appartenenti a 96 nuclei familiari.

I risultati ottenuti indicano che un modello sporadico, in cui la patogenesi della malattia sia determinata unicamente da fattori ambientali, possa essere escluso.

L'analisi di segregazione conferma invece, come la componente genetica sia determinante per la patogenesi della malattia psichiatrica nelle 40 famiglie oggetto di studio. Suggestisce inoltre che un gene di suscettibilità maggiore più una componente residuale poligenica rappresenta il miglior modello di ereditarietà per spiegare l'elevata ricorrenza di schizofrenia e disturbo bipolare nel campione di famiglie esaminato (Scapoli et al., 2006).

4.3 ANALISI DI LINKAGE SU TUTTO IL GENOMA

a) Genome-wide search

Supportati dai risultati ottenuti con l'analisi di segregazione, si è deciso di effettuare un'analisi di linkage su tutto il genoma. A questo scopo, sono state scelte le 16 famiglie che, per la loro struttura genealogica, per il numero di individui affetti e per la disponibilità dei campioni ematici, risultavano essere le più informative ai fini di una analisi di linkage.

Il campione in cui è stata effettuata l'analisi è costituito complessivamente da 57 individui di cui 51 affetti (26 maschi e 25 femmine). Nello specifico, 33 individui avevano ricevuto diagnosi di schizofrenia, 14 di disturbo bipolare e 4 di disturbo schizoaffettivo.

Sulla base dei fenotipi clinici presenti in ciascun nucleo, le famiglie selezionate sono state così classificate (Tab. 4.2):

- 7 nuclei in cui tutti i soggetti affetti presentano diagnosi riconducibili esclusivamente allo spettro schizofrenico;
- 2 nuclei in cui tutti i soggetti affetti presentano diagnosi riconducibili esclusivamente allo spettro bipolare;
- 7 nuclei in cui sono presenti individui affetti da disturbi dello spettro schizofrenico, bipolare e schizoaffettivo (famiglie miste).

N°FAM	FENOTIPO	N°AFFETTI	N°SANI
1	Misto	8	1
2	Misto	4	-
3	Misto	2	-
4	SZ	7	1
5	Misto	2	-
7	SZ	3	-
8	SZ	2	-
9	Misto	2	2
11	BP	3	-
13	Misto	3	-
16	SZ	2	-
21	SZ	2	-
22	BP	2	-
24	SZ	2	1
26	Misto	5	1
27	SZ	2	-

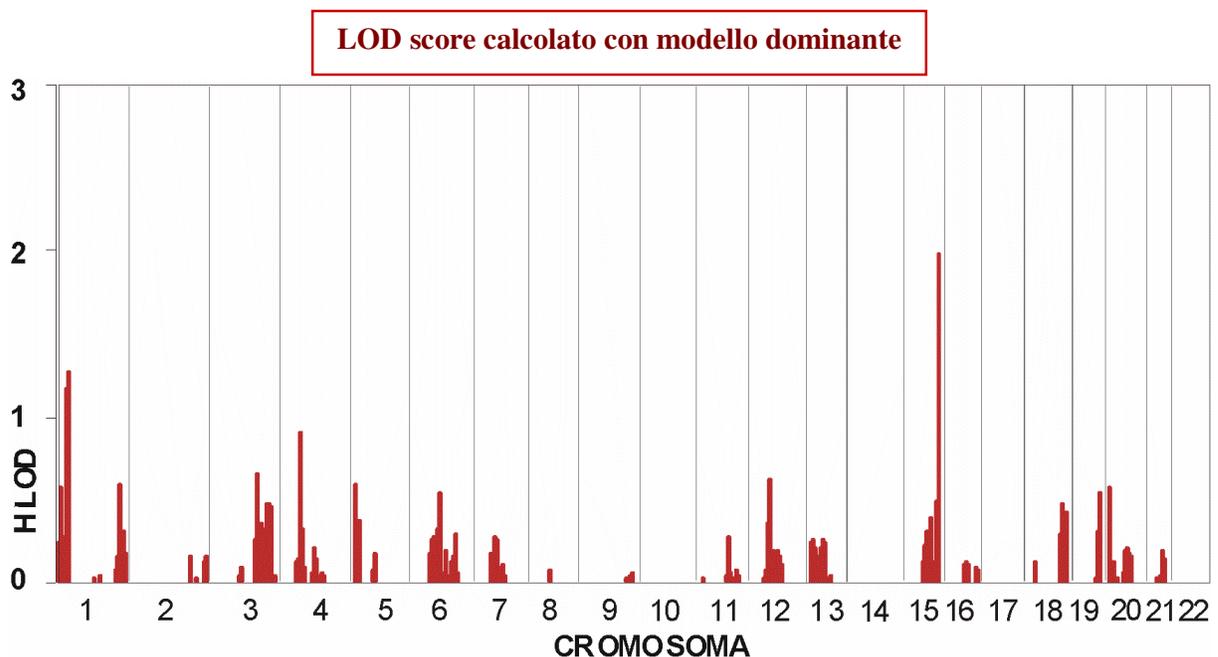
Tab. 4.2: In tabella sono state riportate alcune informazioni in merito alle famiglie selezionate per l'analisi di linkage su tutto il genoma. Relativamente ad ogni famiglia viene riportato: il numero identificativo (N°FAM), il fenotipo psichiatrico che segrega ed infine il numero dei soggetti affetti e non affetti considerati nell'analisi.

Nel campione appena descritto, sono stati genotipizzati 467 marcatori microsatelliti altamente polimorfi, distribuiti con una distanza media di 7.5 cM su tutto il genoma.

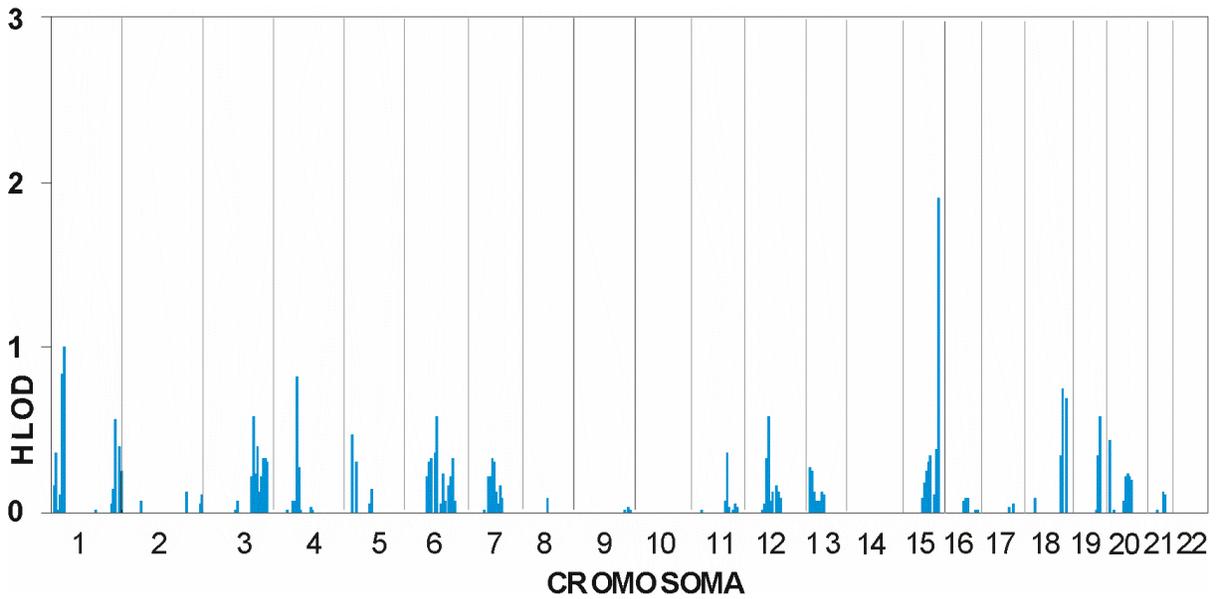
I dati ottenuti sono stati elaborati statisticamente con il programma GeneHunter mediante il quale è stato eseguito il calcolo del LOD score con un approccio *multipoint affected only*. Sono stati testati i modelli parametrici, dominante e recessivo, ed il non parametrico (NP). Si fa presente che i valori di LOD score ottenuti mediante una analisi di linkage in cui non vengono definiti i parametri di penetranza e frequenza dell'allele malattia (NP) sono fortemente influenzati dalle frequenze alleliche dei marcatori analizzati. Per tale motivo per tutti i calcoli eseguiti in questo studio sono state utilizzate frequenze realistiche stimate con il programma CCQLs.

Per i modelli parametrici, si è scelto di calcolare un LOD score (HLOD) che tiene in considerazione l'eterogeneità dei segnali di linkage ottenuti dalle varie famiglie del campione al fine massimizzare i segnali ottenibili.

Vengono di seguito riportati i grafici (Fig. 4.1) che illustrano i valori di HLOD ottenuti in ciascun cromosoma con i modelli parametrico dominante (in rosso), parametrico recessivo (in blu) ed i valori di NPL ottenuti dall'analisi non parametrica (in nero).



LOD score calcolato con modello recessivo



LOD score non parametrico

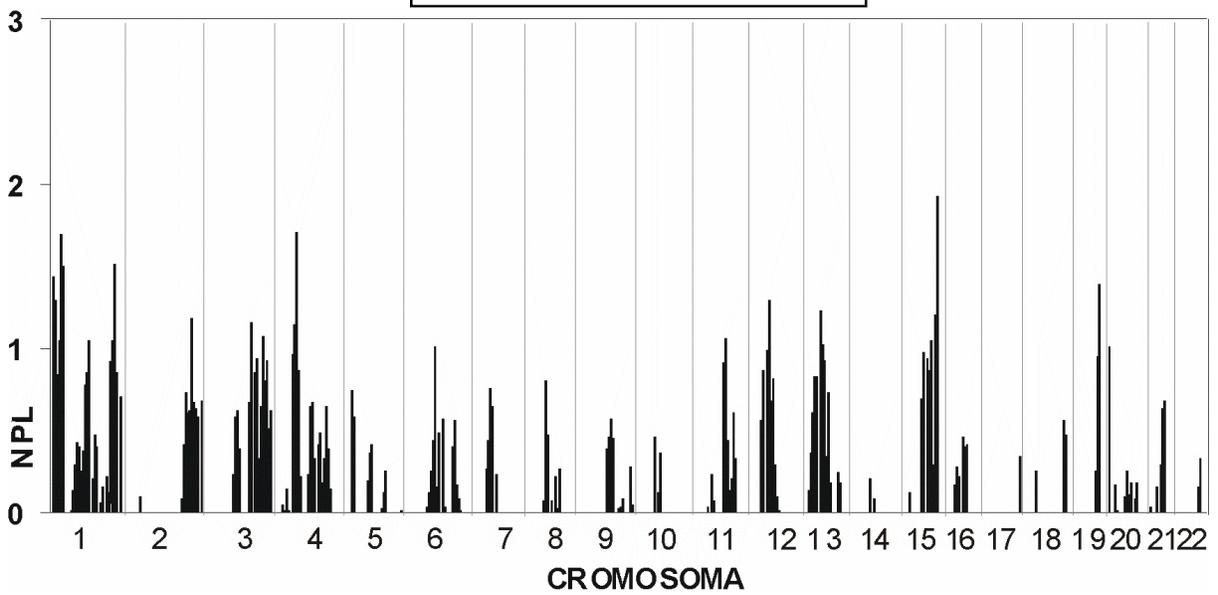


Fig. 4.1: Nei grafici vengono riportati i valori di HLOD ottenuti dal calcolo del LOD score con modello parametrico dominante (in rosso) e recessivo (in blu) e quelli ottenuti con analisi non parametrica (in nero).

Dall'analisi dei grafici è possibile notare che i risultati positivi ottenuti con i tre diversi modelli sono nel complesso coincidenti, e che i segnali di linkage maggiori sono stati ottenuti con l'analisi non parametrica.

Sulla base di tale considerazione sono state dunque eseguite delle simulazioni al fine di avere una indicazione statistica della significatività dei valori di NPL ottenuti. Queste analisi sono state svolte tenendo conto sia delle caratteristiche dei marcatori analizzati che della struttura delle 16 famiglie. In tal modo si è potuto stabilire che solo valori di NPL maggiori a 2.1 ottenuti in questa analisi potevano essere considerati segnali suggestivi di linkage.

In base a questo dato, nessuno dei segnali di linkage ottenuti risultava essere statisticamente suggestivo.

b) Fine-mapping

Nonostante una prima analisi di linkage su tutto il genoma non avesse evidenziato picchi significativi e suggestivi, si è deciso comunque di proseguire l'analisi e di indagare maggiormente quelle regioni in cui il valore di LOD score non parametrico fosse superiore ad 1,5 (valore soglia arbitrario).

Sulla base di tale criterio sono state selezionate le regioni 1p36, 1q43, 4p14 e 15q26 e sottoposte a *fine-mapping*. Questa analisi è stata eseguita per verificare se i deboli segnali ottenuti in questi loci fossero casuali oppure indicativi di un linkage che poteva a priori non essere stato rilevato per la scarsa informatività dei marcatori genotipizzati.

Per tale scopo sono stati analizzati 24 microsatelliti aggiuntivi così distribuiti:

- 7 marcatori nella regione 1p36 (D1S464, D1S228, D1S507, D1S2672, D1S436, D1S1592, D1S2644);
- 6 in 1q43 (D1S229, D1S2833, D1S251, D1S2709, D1S2850, D1S409);
- 4 in 4p14 (D4S2912, D4S1587, D4S2971, D4S428);
- 7 in 15q26 (D15S207, D15S257, D15S1014, D15S212, D15S966, D15S203, N15S1Q).

In tale modo, in queste regioni la distanza media tra marcatori adiacenti è stata ridotta ad una distanza media di circa 3 cM.

Nelle figure che seguono (Fig. 4.2 e Fig. 4.3) vengono riportati relativamente ad ognuna di queste regioni, i valori di LOD score non parametrico ottenuto nel GWS (linea nera) e dopo il fine-mapping (linea rossa).

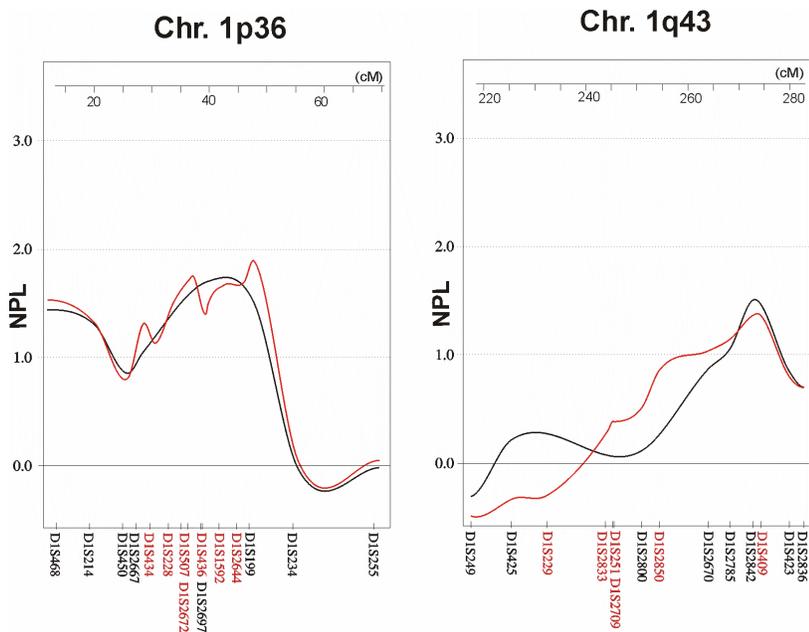


Fig. 4.2: Curve di LOD score non parametrico (NPL) ottenute nel GWS (linea nera) e dopo il fine mapping (linea rossa) nel cromosoma 1p e 1q. I marcatori aggiuntivi sono segnalati in rosso.

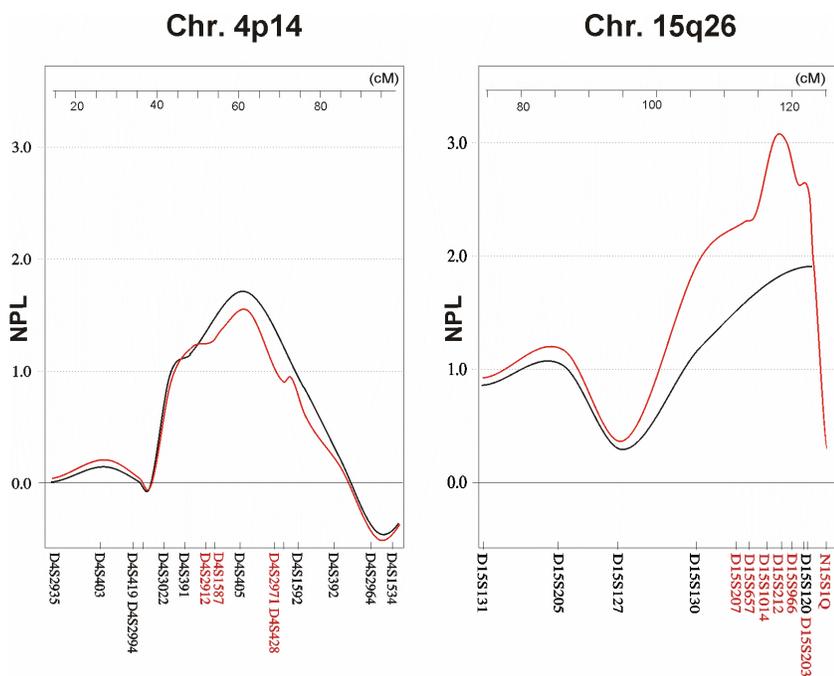


Fig. 4.3: Curve di LOD score non parametrico (NPL) ottenute nel GWS (linea nera) e dopo il fine mapping (linea rossa) nel cromosoma 4p e 15q. I marcatori aggiuntivi sono segnalati in rosso.

In particolare, mentre il valore di NPL nel cromosoma 1p aumenta debolmente da 1.69 a 1.89, nelle regioni 1q e 4p i segnali di linkage diminuiscono sensibilmente passando rispettivamente da 1.51 a 1.38 e da 1.71 a 1.54.

Un risultato particolarmente degno di nota è stato invece ottenuto nel cromosoma 15q26. In questa regione infatti la genotipizzazione di 7 marcatori aggiuntivi ha permesso di incrementare il valore di NPL da 1.93 ad 3.05. Il picco di linkage individuato raggiunge il suo massimo tra i marcatori D15S1014 e D15S212 a 117 cM (Tab. 4.3).

Marker	Localizzazione genetica (cM)	NPL nel GWS	NPL dopo fine-mapping	P nominale
D15S127	94,64	0,29	0,36	0,35
D15S130	106,11	1,21	2,00	0,03
D15S207	112,37	-	2,30	0,01
D15S657	113,82	-	2,35	0,01
D15S1014	116,86	-	3,05	0,00
D15S212	118,52	-	2,99	0,00
D15S966	121,79	-	2,65	0,01
D15S120	122,34	1,93	2,52	0,01
D15S203	123,54	-	1,95	0,03
N15S1Q	127,5	-	1,31	0,10

Tab. 4.3: Valori di LOD score non parametrico ottenuti nella regione 15q26 prima e dopo il fine-mapping.

Va considerato inoltre che il risultato positivo in questa regione viene confermato anche dai risultati ottenuti con l'analisi di tipo parametrico: con modello recessivo si raggiunge infatti un LOD score massimo di 2.43 (alpha 0.91) mentre con modello dominante un LOD score di 2.12 (alpha 0.82) (Fig. 4.4).

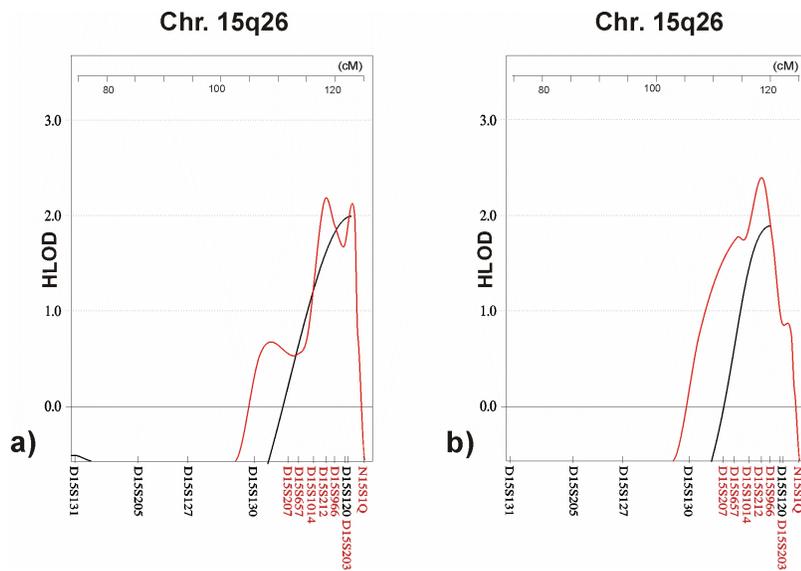


Fig. 4.4: Valori di HLOD ottenuti nella regione 15q26 prima e dopo il fine-mapping con modello parametrico dominante (a) e parametrico recessivo (b).

Si è ritenuto opportuno quindi, alla luce di questo risultato, ripetere le simulazioni utilizzando la nuova griglia di marcatori analizzati (467 analizzati nel GWS e 24 nel *fine-mapping*).

In tal modo si è potuto determinare che un valore di NPL pari a 2.2 può essere considerato suggestivo di linkage, mentre un NPL di 3.15 è da considerarsi significativo.

In base a queste considerazioni, i dati relativi al cromosoma 1 e al cromosoma 4 non possono essere considerati né suggestivi né significativi e attribuibili pertanto ad un rumore di fondo.

Il dato ottenuto sul cromosoma 15q26 invece è da considerarsi un segnale statisticamente suggestivo di linkage con un valore di P empirico pari a 0.07.

I limiti della regione critica da indagare in uno studio in cui la patologia è complessa ed il campione è costituito da più famiglie non vengono definiti dall'individuazione dei marcatori ricombinanti, come classicamente avviene negli studi di patologie mendeliane. In questi casi la regione critica viene considerata l'intervallo definito dal valore massimo di NPL-1 (intervallo di confidenza del 95%).

Nel caso del picco di linkage identificato nella regione 15q26 pertanto, la regione critica è delimitata dai marcatori D15S130 (NPL=2) e D15S203 (NPL=1.95) e comprende un intervallo di 15cM (tra 107cM e 122cM).

c) Analisi degli aplotipi nella regione 15q26

Tenuto conto dei risultati ottenuti nel GWS per la regione 15q26 si è proceduto alla ricostruzione degli aplotipi al fine di valutare se fosse possibile individuare uno o più aplotipi comuni segreganti con il disturbo psichiatrico relativamente ai soggetti affetti. Per tale scopo si è ritenuto di considerare l'insieme delle famiglie indagate (16) pur partendo dal presupposto che, non essendo stato individuato un antenato comune in tali nuclei familiari, risultasse difficile trovare un aplotipo condiviso.

I risultati di tale indagine non hanno infatti permesso di concludere che la regione oggetto di studio (15q26) fosse cosegregante all'interno delle famiglie.

4.6 INDIVIDUAZIONE DI ULTERIORI REGIONI IN LINKAGE “FAMILIE SPECIFICHE”

L'analisi di linkage su tutto il genoma è stata svolta valutando il campione di famiglie senza distinguere il contributo di ciascun nucleo familiare al fine del calcolo totale del LOD score. In questo modo però, potrebbero essere state perse informazioni in merito a regioni del genoma in cui il linkage riguardava solo specifiche famiglie. Queste regioni appaiono particolarmente interessanti perché potrebbero rappresentare loci di suscettibilità minori, in cui cioè sono presenti geni che contribuiscono alla patogenesi delle malattie psichiatriche solamente in alcuni pedigree. Per testare questa ipotesi, i valori di linkage ottenuti da ogni singola famiglia nell'analisi su tutto il genoma sono stati riesaminati. Sono state successivamente selezionate quelle regioni cromosomiche in cui i segnali di linkage sembravano sovrapporsi in due o più famiglie. Infine nelle regioni così individuate è stata approfondita l'analisi molecolare aumentando il numero di marcatori genotipizzati e ricostruendo gli aplotipi con lo scopo di confermare la presenza di un locus di suscettibilità per schizofrenia e disturbo bipolare in queste famiglie.

Con questo approccio si sono messe in evidenza due regioni cromosomiche, 3q24-26 e 18q23, che presentano chiari segnali di linkage in 2 delle 16 famiglie oggetto di studio (Tab. 4.6).

Cromosoma	Famiglia	NPL max	Marker	Banda citogenetica
3	F2	3.48	D3S1555	3q24
3	F26	3.35	D3S1565	3q26.31
18	F1	3.08	D18S462	18q23
18	F26	2.06	D18S462	18q23

Tab. 4.6: Valori massimi di LOD score non parametrico (NPL max) ottenuti nelle regioni 3q24-26 e 18q23 ed i marcatori sui quali sono stati calcolati. Nello specifico relativamente al cromosoma 3 sono stati riportati i dati relativi alle famiglie F2 e F26 mentre per il cromosoma 18 sono stati riportati i valori di NPL ottenuti dalle famiglie F1 e F26.

Verranno di seguito riportati separatamente i risultati ottenuti dall'analisi così eseguita sul cromosoma 3 e 18.

a) Cromosoma 3q24-27

Due famiglie (F2 e F26) presentavano valori di LOD score superiori a 3 in una regione del genoma relativamente ampia (3q24-26). Il limite centromerico di tale regione risulta definito dal picco di linkage della famiglia F2 che registra il massimo valore di NPL *multipoint* (NPL=3.5) in corrispondenza del marcatore D3S1555 (3q24), mentre il limite telomerico è in corrispondenza del marcatore D3S1265 (3q26.31) nel quale la famiglia F26 ottiene un NPL di 3.35.

La regione critica identificata in questo modo, si estende per circa 40 cM all'interno dei quali erano stati genotipizzati 10 marcatori microsatelliti. E' risultato quindi necessario in primo luogo aumentare il numero di marcatori analizzati nelle famiglie F2 e F26 oggetto di studio in questa fase dell'analisi. A tale scopo sono stati genotipizzati 18 nuovi marcatori che hanno portato la distanza media tra microsatelliti in questa regione da 3.7 cM a 0.9 cM.

Il calcolo del LOD score ha confermato l'esistenza di un linkage nel braccio lungo del cromosoma 3 in entrambe le famiglie F2 e F26.

Successivamente si è voluta valutare la possibilità che nel campione fossero presenti anche altre famiglie in linkage in questa regione, ma che non avessero ottenuto segnali indicativi a causa della scarsa informatività dei marcatori utilizzati.

A tale scopo sono stati selezionati i microsatelliti D3S1576, D3S3694, 3S145.587 e D3S3523 che presentavano elevata eterozigosità e genotipizzati negli individui delle rimanenti 14 famiglie. I valori di NPL relativi ai marcatori analizzati in tutte le famiglie vengono riportati in tabella (Tab. 4.7).

Marker	F1	F2	F3	F4	F5	F7	F8	F9	F11	F13	F16	F21	F22	F24	F26	F27	TOT
D3S3637	-0,8	1,6	1,4	-0,6	0,0	-0,5	0,8	-0,3	0,8	0,0	0,7	0,0	-1,4	-0,7	-0,4	-0,7	0,0
D3S1576	-0,8	1,6	1,4	-0,5	0,0	-0,5	0,0	-0,3	0,8	1,2	0,7	0,0	-1,3	0,2	-0,4	-0,8	0,3
D3S1309	-0,8	3,0	1,4	-0,5	0,0	-0,5	0,1	-0,2	0,8	1,3	0,5	-0,1	-1,2	0,6	-0,4	-0,9	0,8
D3S3694	-0,8	3,3	1,3	-0,5	0,0	-0,5	0,1	-0,1	0,8	1,4	0,4	-0,1	-1,0	0,7	-0,4	-1,0	0,9
D3S1569	-0,8	3,4	0,6	-0,5	0,0	-0,5	0,0	0,0	0,8	1,3	-0,6	-0,1	-0,8	0,7	-0,4	-1,0	0,6
3S145,587	-0,8	3,5	0,0	-0,4	0,0	-0,5	0,0	0,0	0,8	1,3	-0,8	-0,1	-0,8	0,7	-0,4	-1,0	0,4
D3S1593	-0,8	3,5	0,0	-0,3	0,0	-0,5	0,0	0,0	0,7	1,3	-1,0	-0,1	-0,8	0,7	-0,4	-1,0	0,3
D3S1555	-0,4	3,5	0,0	0,3	0,1	-0,5	1,2	0,0	-0,1	1,2	-1,0	0,0	-0,7	0,7	0,6	-1,0	1,0
D3S1279	-0,1	3,5	0,0	0,8	0,0	-0,5	1,3	0,0	-0,1	1,2	0,0	-0,1	-0,5	0,7	0,7	-0,9	1,5
D3S3668	0,2	3,5	1,4	0,7	0,0	1,3	1,4	-1,1	-0,8	0,7	0,7	-0,2	-0,1	0,6	0,7	-1,0	2,0
D3S1614	0,2	3,4	1,4	0,7	0,0	1,3	1,4	-1,4	-0,8	0,5	0,9	-0,2	-0,1	-0,2	0,7	-1,0	1,7
D3S3523	0,5	3,2	1,4	0,7	0,0	1,3	1,4	-1,4	-0,7	0,4	0,9	-0,2	0,0	-0,7	1,9	-1,0	1,9
D3S3725	-0,3	1,6	1,4	0,7	0,0	1,3	1,4	-1,4	-0,7	0,0	0,9	-0,1	0,0	-0,7	3,4	-1,0	1,6
D3S1565	-0,3	1,2	1,4	0,7	-0,1	1,3	1,4	-1,4	-0,7	-0,6	0,1	-0,2	0,0	-0,7	3,4	-1,0	1,2

Tab. 4.7: Valori di LOD score non parametrico calcolati con approccio multipoint per i marcatori analizzati nella regione 3q24-26. I 4 marcatori aggiuntivi indagati in tutte le famiglie in questa fase dell'analisi sono riportati in rosso.

Va considerato che i valori di NPL ottenuti dalla F2 e F26 continuano ad essere i più elevati, tuttavia con tale analisi è stato possibile mettere in evidenza deboli segnali di linkage, prima non rilevati, anche in altre famiglie (F3, F4, F7, F8, F13 e F16).

Per valutare più nel dettaglio la segregazione degli alleli nella regione 3q24-27 si è ritenuto utile inoltre procedere alla ricostruzione degli aplotipi in tutte le 16 famiglie.

Con tale analisi si è voluto valutare se, nell'ambito delle famiglie studiate, i segnali di linkage in questa regione fossero dovuti alla presenza di un aplotipo condiviso. Con questo approccio è stato possibile identificare un aplotipo costituito da 3 marcatori consecutivi (D3S1569, 3S144.973, 3S145.587) che individuano un intervallo di 1 Mb, condiviso in 4 famiglie su 16 (Fig. 4.5).

Le fasi degli aplotipi sono state ricostruite con il programma GeneHunter e poi disegnati con l'utilizzo del software HaploPainter. Si fa presente che vengono di seguito riportate solo le porzioni di albero utili alla ricostruzione degli aplotipi per le famiglie indagate e che gli individui affetti sono presentati allo stesso modo senza distinzione della classe fenotipica.

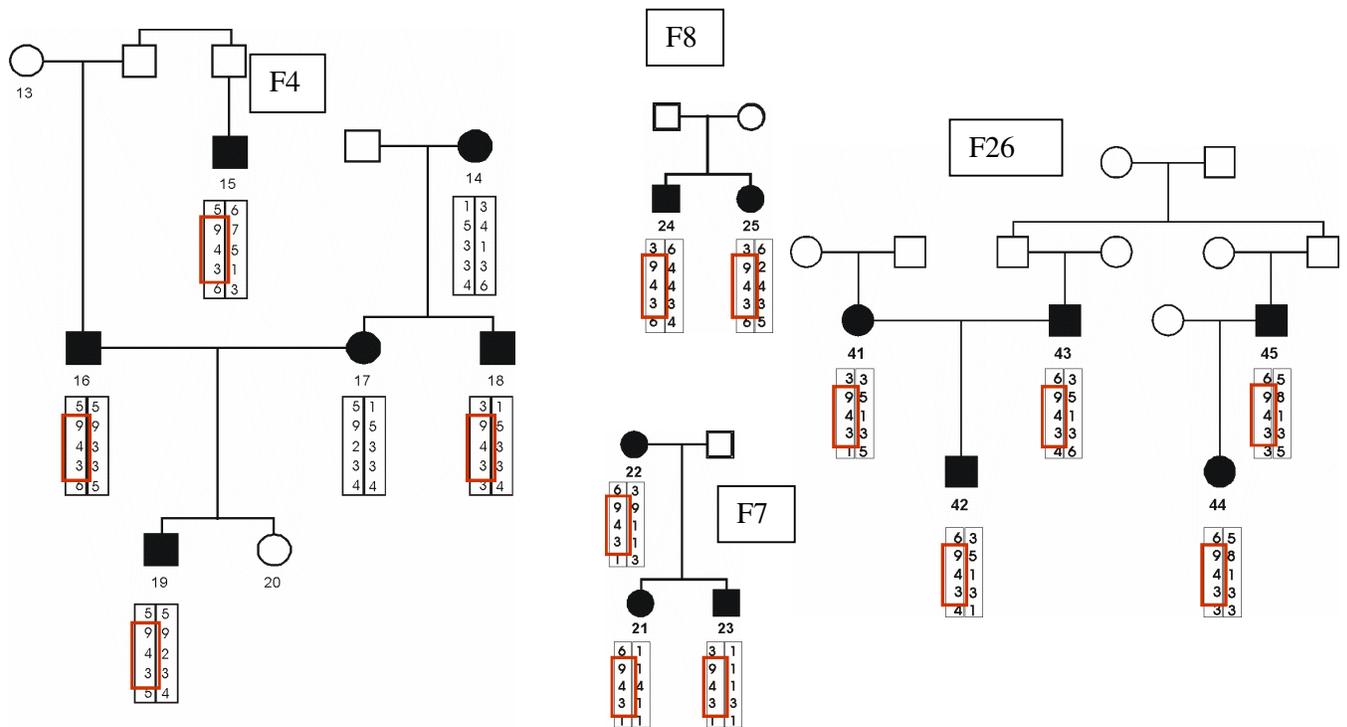


Fig. 4.5: Ricostruzione degli aplotipi nella regione 3q24-27 relativamente alle famiglie F4, F7, F8 e F26. Vengono riportati gli alleli relativi ai marcatori 3S144.006, D3S1569, 3S144.973, 3S145.587 e D3S1593. I rettangoli rossi mettono in evidenza la ricorrenza degli stessi alleli nei marcatori D3S1569, 3S144.973, 3S145.587.

b) Cromosoma 18q23

La regione 18q23 è un altro locus cromosomico apparso interessante in seguito alla valutazione dei segnali di linkage nelle singole famiglie.

In questa regione infatti 2 famiglie, la F1 e la F26, ottengono un valore di LOD score elevato ($P < 0.05$) in corrispondenza dello stesso marcatore (Tab. 4.6).

Analizzando i valori di LOD score ottenuti nei marcatori adiacenti al picco di linkage, in queste famiglie si è potuta identificare una regione critica di 15 cM, definita dai marcatori D18S1161 e D18S70. In questa regione sono stati disegnati 11 nuovi marcatori microsatelliti, successivamente amplificati e genotipizzati negli individui delle famiglie F1 e F26.

Questa analisi più fine ha permesso di:

- ✓ confermare la presenza del segnale di linkage in corrispondenza del marcatore D18S462 in entrambe le famiglie;

✓ aumentare il valore di NPL massimo ottenuto che passa rispettivamente da 3.08 a 3.9 nella F1 e da 2.06 a 3.4 nella F26.

Per verificare se nelle altre famiglie l'assenza del segnale di linkage fosse dovuto alla scarsa informatività dei marcatori analizzati, nei rimanenti 14 pedigree sono stati genotipizzati 2 marcatori aggiuntivi (D18S554 e 18S73.597). Con tale approccio però si sono potuti rilevare solo dei deboli segnali positivi di linkage in altre 4 famiglie (F2, F4, F11 e F18).

Di seguito vengono riportati i valori di LOD score non parametrico calcolato con approccio *multipoint* relativamente ai marcatori D18S1161, D18S554, D18S462, 18S73.597 e D18S70 per tutte le 16 famiglie (Tab. 4.8).

Marker	F1	F2	F3	F4	F5	F7	F8	F9	F11	F13	F16	F18	F21	F26	F27	F22	TOT
D18S1161	1.5	0.9	-1.4	1.0	-0.2	-0.5	0.1	-1.4	0.6	-0.7	-1.0	0.5	-0.3	3.3	-1.0	-0.6	0.2
D18S554	3.9	1.0	-1.4	1.1	-0.1	-0.5	-0.1	-1.4	0.7	-0.7	-1.0	0.6	-0.2	3.4	-1.0	-1.4	0.7
D18S462	3.9	1.0	-1.4	1.1	-0.1	-0.5	-0.1	0.0	0.7	-0.7	-1.0	0.5	-0.1	3.4	-1.0	-1.4	1.1
18S73.597	3.9	1.0	-1.4	1.1	-0.1	-0.5	-0.1	0.0	0.7	-0.7	-1.0	0.5	-0.1	3.3	-1.0	-1.4	1.1
D18S70	3.7	0.1	-1.4	1.2	-0.2	-0.5	-0.1	0.0	0.7	-0.6	-0.8	-0.7	-0.2	3.2	-0.8	-1.4	0.8

Tab. 4.8: In tabella si riportano per tutte le famiglie i valori di LOD score non parametrico calcolati per i marcatori con approccio multipoint. Sono evidenziate le famiglie per cui i valori di LOD score sono risultati >0. In rosso sono stati evidenziati i 2 marcatori aggiuntivi indagati in tutte le famiglie in questa fase dell'analisi.

L'incremento del numero di marcatori in questa regione ha permesso di rilevare, in aggiunta ai segnali della famiglia F1 e F26, deboli segnali di linkage per le famiglie F2 e F11.

In questa regione inoltre a differenza della regione 3q24-26, non è stato possibile individuare un aplotipo condiviso nei diversi pedigree.

4.4 STRATIFICAZIONE DELLA POPOLAZIONE

Prima di intraprendere studi di associazione caso-controllo, risulta necessario assicurarsi che nel campione di popolazione da analizzare non sia presente una stratificazione, cioè che non vi sia la coesistenza di due o più sottogruppi con diverse frequenze alleliche all'interno della stessa.

Per tale scopo 22 marcatori microsatelliti sono stati genotipizzati, in 96 individui sani (controlli) e 23 soggetti affetti (casi). I dati molecolari ottenuti sono stati confrontati eseguendo un'analisi molecolare della varianza (AMOVA) al fine di :

- a) verificare la presenza di sottopopolazioni nei campioni dei controlli;
- b) verificare che il campione dei controlli fosse geneticamente sovrapponibile a quello dei casi.

a) Verifica dell'omogeneità genetica dei controlli

Al fine di escludere la presenza di differenze genetiche nel campione dei controlli è stata stimata la varianza molecolare (AMOVA) tra sottogruppi del campione in esame.

A tale scopo, per 50 volte, il campione di 96 individui è stato suddiviso in 2 gruppi ciascuno formato da 48 soggetti selezionati casualmente. Per ogni coppia di sottogruppi è stata stimata la varianza molecolare con il test AMOVA (software Arlequin). L'indice di fissazione calcolato con questo test è risultato non significativo per ogni confronto a coppie.

L'AMOVA è poi stata effettuata *locus by locus*, cioè confrontando le frequenze alleliche relativamente ad ogni marcatore per tutti i confronti a coppie. Anche in questo caso i dati ottenuti non hanno rilevato differenze significative e tutti i valori di P associati sono risultati < 0.05 .

b) Verifica dell'omogeneità genetica di affetti e controlli

Dopo aver verificato che il campione dei controlli non presenta stratificazione, si è voluto valutare se questa fosse presente tra il gruppo di soggetti affetti e quello dei controlli. I dati genotipici di questi due gruppi sono stati dunque confrontati con il test AMOVA ed i risultati ottenuti vengono riportati in tabella (Tab. 4.4).

La varianza tra i due gruppi, stimata in base a tale test, è dello 0% ed il valore di P associato è pari a 0.46752. La differenza pertanto non risulta significativa.

Fonte di variazione	Gradi di libertà	Somma dei quadrati	Componenti della varianza	Percentuale di variazione
interpopolazione	1	7.131	-0.0002 Va	0.00
intrapopolazione	236	1686.449	7.14597 Vb	100
Totale	237	1693.580	7.14577	

Indice di fissazione: -0.00003

Test di significatività P=0.46752 con 10000 permutazioni

Tab.4.4: Campioni degli affetti e dei controlli confrontati con il test dell'AMOVA.

E' stato successivamente eseguito il test AMOVA *locus by locus* che ha confermato l'assenza di stratificazione tra questi due gruppi di individui fenotipicamente diversi.

4.5 ANALISI DI POLIMORFISMI NELLA REGIONE PROMOTTRICE DEL GENE ST8SIA2 (15q26)

Tenuto conto dei dati di stratificazione sopra illustrati, si è ritenuto di procedere con la ricerca di alleli di suscettibilità in geni già individuati in associazione con SZ o BPD relativamente alla regione 15q26.

Da una analisi dei dati disponibili nell'ambito di disturbi psichiatrici era emerso che Arai e collaboratori nel 2005 avevano pubblicato un'associazione del gene ST8SIA2 (Ref Seq: [NM_006011.3](#)), con la schizofrenia nella popolazione giapponese. In particolare l'associazione coinvolgeva due polimorfismi localizzati nella regione promotrice del gene (rs3759916 e rs3759914) (Fig. 4.6).

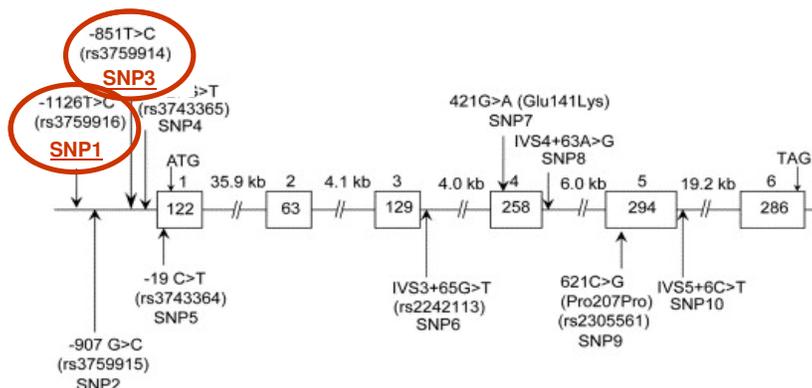


Fig. 4.6: Mappa del gene ST8SIA2. Vengono riportati gli SNPs testati nel lavoro di Arai(Arai et al., 2005) e la loro posizione sul gene; in rosso sono evidenziati i due SNPs per i quali è stata riportata una associazione significativa.

Benché questo gene sia localizzato a 2Mb dalla regione critica individuata con l'analisi di linkage, si è ritenuto opportuno verificare se tali polimorfismi fossero coinvolti nel conferire suscettibilità anche nella popolazione oggetto di studio.

Allo scopo di valutare l'ipotesi di associazione è stato sequenziato un frammento di 551 bp localizzato nel promotore del gene, in modo da ottenere informazioni in merito ai tre polimorfismi di interesse. L'analisi è stata condotta su:

- ✓ 56 individui non imparentati affetti da disturbi dello spettro schizofrenico-bipolare ed appartenenti sia ai casi famigliari (23 casi indice) che sporadici;

- ✓ 50 soggetti non affetti (controlli), originari tutti dalla città di Chioggia e non consanguinei.

In tabella (Tab. 4.5) vengono riportate le frequenze alleliche e genotipiche calcolate relativamente agli SNPs rs3759916, rs3759915 e rs3759914 nei due campioni analizzati. Inoltre sono riportati i dati relativi a un polimorfismo C>A in posizione -988, non presente nel database di riferimento (dbSNP).

Nel campione di affetti e nei controlli di Chioggia, gli SNPs sono risultati poco o per nulla polimorfi e pertanto scarsamente informativi, differentemente da quanto riportato per la popolazione giapponese.

Tuttavia, per verificare che i dati ottenuti non fossero da attribuire ad una peculiarità del campione originario di Chioggia, si è ritenuto opportuno estendere l'analisi ad un campione di 50 soggetti sani provenienti da tutta Italia.

Il test esatto di Fisher è stato effettuato al fine di valutare se le frequenze alleliche rilevate tra i gruppi di soggetti analizzati, differissero significativamente ($P_{value} < 0.01$).

		Popolazione di Chioggia		Popolazione italiana		Popolazione Giapponese	
		Casi n° (freq.)	Controlli n° (freq.)			Casi n° (freq.)	Controlli n° (freq.)
rs3759916							
Genotipi	T/T	55 (0,98)	48 (0,96)		48 (0,96)	86 (0,46)	56 (0,36)
	C/T	1 (0,02)	2 (0,04)		2 (0,04)	79 (0,42)	67 (0,43)
	C/C	0	0		0	23 (0,12)	33 (0,21)
Alleli	T	111 (0,99)	98 (0,98)	(p=0,60)	98 (0,98)	251 (0,67)	179 (0,57)
	C	1 (0,01)	2 (0,02)		2 (0,02)	125 (0,33)	133 (0,43)
SNP -988C>A							
Genotipi	C/C	55 (0,98)	48 (0,96)		48 (0,96)	/	/
	C/A	1 (0,02)	2 (0,04)		2 (0,04)	/	/
	A/A	0	0		0	/	/
Alleli	C	111 (0,99)	98 (0,98)	(p=0,60)	98 (0,98)	/	/
	A	1 (0,01)	2 (0,02)		2 (0,02)	/	/
rs3759915							
Genotipi	C/C	52 (0,93)	47 (0,94)		42 (0,84)	47 (0,25)	36 (0,23)
	C/G	4 (0,07)	3 (0,06)		7 (0,14)	97 (0,52)	71 (0,46)
	G/G	0	0		1 (0,02)	44 (0,23)	49 (0,31)
Alleli	C	108 (0,97)	97 (0,97)	(p=1)	91 (0,91)	191 (0,51)	143 (0,46)
	G	4 (0,03)	3 (0,03)		9 (0,09)	185 (0,49)	169 (0,54)
rs3759914							
Genotipi	T/T	56 (1)	50 (1)		50 (1)	88 (0,47)	55 (0,35)
	C/T	0	0		0	77 (0,41)	68 (0,44)
	C/C	0	0		0	23 (0,12)	33 (0,21)
Alleli	T	112 (1)	100 (1)	(p=1)	100 (1)	253 (0,67)	178 (0,57)
	C	0	0		0	123 (0,33)	134 (0,43)

Tab. 4.5: Frequenze genotipiche e alleliche di 4 SNPs localizzati nella regione promotrice del gene SIAT8B relative al campione di Chioggia e Italiani; nel riquadro rosso vengono riportate inoltre le frequenze degli SNPs osservate nel campione giapponese (Arai et al., 2005)

Confrontando le frequenze alleliche e genotipiche di questi SNPs non è stato dunque possibile rilevare differenze significative tra i diversi gruppi di riferimento.

4.6 ANALISI DEL GENOMA MITOCONDRIALE

Poiché in letteratura alcuni studi suggeriscono un contributo del genoma mitocondriale nella patogenesi delle malattie psichiatriche, si è scelto di testare l'ipotesi che la suscettibilità a questi disturbi sia dovuta non solo a polimorfismi nel DNA nucleare ma anche ad uno specifico assetto di SNPs nel DNA mitocondriale.

a) Determinazione degli aplogruppi mediante RFLP

Lo studio degli aplogruppi mitocondriali (Hg) è stato condotto analizzando 10 polimorfismi (SNPs) mediante amplificazione e successiva restrizione enzimatica secondo le modalità riportate nei "materiali e metodi".

Il campione indagato è composto da 86 individui non imparentati tra di loro in linea materna e dunque potenzialmente rappresentativi di altrettanti *lineages* mitocondriali diversi.

Nello specifico i soggetti analizzati possono essere così suddivisi:

✓53 individui appartenenti alle 40 famiglie (in alcuni pedigree infatti è possibile identificare più di un *lineage* materno in base alla struttura e alla dimensione dell'albero genealogico);

✓33 casi sporadici.

L'elenco degli 86 pazienti studiati viene di seguito riportato unitamente al risultato ottenuto dall'analisi di restrizione dei siti polimorfi indagati (Tab. 4.9). La combinazione di tali risultati ha permesso di attribuire ad ogni individuo un aplogruppo specifico.

	Hg	+10394 DdeI	-7025 AluI	+12308 HinfI	-9052 HaeII	-8250 HaeIII	+16389 BamHI	+13366 BamHI	-1715 DdeI	-16065 HinfI	-4577 NlaIII
1.1	altro	-	+	-		+		-	+	+	+
1.3	H	-	-								
1.4	altro	-	+	-		+		-	+	+	+
2.4	H	-	-								
3.2	H	-	-								
4.3	H	-	-								
4.4	U	-	+	+	+						
4.5	H	-	-								
5.2	I	+		-		-	+				
6.1	V	-	+	-		+			+	+	-
7.1	V	-	+	-		+			+	+	-
8.1	H	-	-								
9.1	I	+	+	-		-	+				
10.1	H	-	-								
11.1	H	-	-								
12.1	X	-	+	-		+			-		
13.1	J	+	+	-		+			+	-	
13.2	K	+	+	+	-						
14.1	H	-	-								
15.1	altro	-	+	-		+			+	+	+
16.1	H	-	-								
17.1	altro	+	+	-		+			+	+	+
18.1	H	-	-								
19.1	H	-	-								
20.2	K	+	+	+	-						
21.2	H	-	-								
22.1	H	-	-								
22.3	K	+		+	-						
23.2	H	-	-								
24.1	altro	-	+	-		+		-	+	+	+
24.2	T	-	+	-		+		+			
25.1	K	+	+	+	-						
26.1	U	-	+	+	+						
26.3	W	-	+	-		-	-				
26.4	J	+	+	-		+			+	-	
26.5	T	-	+	-		+		+			
27.1	H	-	-								
27.2	H	-	-								
28.1	H	-	-								
29.1	T	-	+			+		+			
30.1	H	-	-								
31.1	K	+	+	+	-						
32.1	H	-	-								
33.1	K	+	+	+	-						
34.1	U	-	+	+	+						
34.2	H	-	-								
35.1	T	-	+			+		+			
36.1	H	-	-								
37.1	H	-	-								
38.1	X	-	+	-		+			-		
39.1	X	-	+	-		+			-		
40.1	T	-	+			+		+			
41.1	altro	+	+	-		+			-		
42.1	H	-	-								
44.1	V	-	+	-		+			+	+	-
45.1	H	-	-								
46.1	J	+		-		+			+	-	
46.3	H	-	-								
47.1	U	-	+	+	+						
48.2	U	-	+	+	+						

Hg	+10394 DdeI	-7025 AluI	+12308 HinfI	-9052 HaeII	-8250 HaeIII	+16389 BamHI	+13366 BamHI	-1715 DdeI	-16065 HinfI	-4577 NlaIII
50.1	K	+		+	-					
51.1	H	-	-							
52.1	X	-	+	-		+		-		
53.1	J	+		-		+		+	-	
54.1	altro	+		-		+		+	+	+
55.1	H	-	-							
55.2	U	-	+	+	+					
56.1	altro	-	+	-		+			+	+
57.1	I	+		-		-	+			
58.1	T	-	+	-		+				
59.1	T	-	+	-		+				
60.1	V	-	+	-		+		+	+	-
61.1	V	-	+	-		+		+	+	-
62.1	W	-	+	-		-				
63.1	altro	+		-		+		-		
64.1	I	+		-		-	+			
67.1	H	-	-							
68.1	X	-	+	-		+		-		
69.1	U	-	+	+	+					
70.1	J	+		-		+			-	
71.1	H	-	-							
72.1	H	-	-							
73.1	H	-	-							
74.1	H	-	-							
75.1	H	-	-							
76.1	U	-	+	+	+					

Tab. 4.9: Risultati dell'analisi degli aplogruppi eseguita mediante RFLP di polimorfismi specifici.

Considerando i risultati ottenuti, si sono calcolate le frequenze relative ai diversi aplogruppi riportate nella tabella (Tab.4.10).

	Pazienti Chioggia (%)	Controlli Italia (%)	P-values
H	34 (0,40)	646 (0,44)	0,47
K	7 (0,08)	114 (0,08)	0,87
U	8 (0,09)	186 (0,13)	0,37
J	5 (0,06)	126 (0,09)	0,38
T	7 (0,08)	143 (0,10)	0,65
I	4 (0,05)	36 (0,02)	0,20
W	2 (0,02)		
Altro (-10394)	15 (0,17)	235 (0,16)	0,12
Altro (+10394)	4 (0,05)		

Tab. 4.10: Frequenze degli aplogruppi più comuni, calcolate nel campione di soggetti affetti provenienti da Chioggia. Vengono riportati inoltre i dati disponibili in letteratura calcolati in un campione di soggetti sani appartenenti alla popolazione italiana, gruppo CT1 riportato da Ghezzi (Ghezzi et al., 2005).

Al fine di valutare se le frequenze degli aplogruppi individuati, differissero significativamente rispetto a quelle della popolazione italiana è stato effettuato il test del χ^2 . Per i dati relativi alla popolazione italiana ci si è avvalsi delle frequenze riportate da Ghezzi (Ghezzi et al., 2005). Il

test è stato eseguito combinando in un'unica classe gli aplogruppo più rari I e W e tutti quelli definiti genericamente come altro (+ e – 10394).

I valori di P ottenuti vengono riportati in tabella (Tab. 4.10). Non è stato possibile dunque rilevare differenze statistiche significative nella distribuzione degli aplogruppi nei soggetti affetti originari di Chioggia rispetto a soggetti sani.

b) Determinazione degli aplotipi mitocondriali

A priori non è possibile escludere l'ipotesi che in alcuni individui affetti vi siano delle mutazioni a livello del DNA mitocondriale, che geneticamente contribuiscono sviluppare il fenotipo schizofrenico e/o bipolare. In tal caso, ci si potrebbe aspettare che i mitocondri che portano tali mutazioni siano condivisi da più individui affetti non imparentati tra loro.

Con tale premessa, per ottenere informazioni più dettagliate, si è proceduto al sequenziamento diretto della regione ipervariabile 1 (HVI) al fine di determinare gli aplotipi mitocondriali di tutti gli 86 soggetti indagati.

I siti variabili riscontrati nel tratto di sequenza analizzato (da 16015 bp a 16393 bp) sono stati annotati e vengono di seguito riportati in tabella (Tab. 4.11).

MITO	Hg	SubHg	COD. IND.	ANALISI con RFLP	POLIMORFISMI HVI
M1	H		36,1	-10394DdeI,-7025AluI	
	H		27,1	-10394DdeI,-7025AluI	
	H		18,1	-10394DdeI,-7025AluI	
	H		37,1	-10394DdeI,-7025AluI	
	H		51,1	-10394DdeI,-7025AluI	
	H		34,2	-10394DdeI,-7025AluI	
	H		72,1	-10394DdeI,-7025AluI	
	H		73,1	-10394DdeI,-7025AluI	
M2	H		8,1	-10394DdeI,-7025AluI	93C,
	H		32,1	-10394DdeI,-7025AluI	93C,
M3	H	H12	42,1	-10394DdeI,-7025AluI	287T,
M4	H		1,3	-10394DdeI,-7025AluI	362C,
	H		55,1	-10394DdeI,-7025AluI	362C,
M5	H		3,2	-10394DdeI,-7025AluI	185T,
M6	H	H1a	74,1	-10394DdeI,-7025AluI	162G,
M7	H		67,1	-10394DdeI,-7025AluI	93C, 129A, 316G,
M8	H	H1f	27,2	-10394DdeI,-7025AluI	93C,189C,
M9	H	H3a	19,1	-10394DdeI,-7025AluI	126C, 239G,
M10	H		10,1	-10394DdeI,-7025AluI	169T,239T,
M11	H		23,2	-10394DdeI,-7025AluI	170G,256T,295T,
M12	H		71,1	-10394DdeI,-7025AluI	249C,362C,
M13	H	H8	30,1	-10394DdeI,-7025AluI	288C,362C,
	H	H8	4,3	-10394DdeI,-7025AluI	288C,362C,
	H	H8	46,3	-10394DdeI,-7025AluI	288C,362C,
M14	H	H11	28,1	-10394DdeI,-7025AluI	311C,319A,
M15	H		75,1	-10394DdeI,-7025AluI	320T,368C,
M16	H		2,4	-10394DdeI,-7025AluI	176T,219G,
M17	H	H5	14,2	-10394DdeI,-7025AluI	189C, 304C,
M18	H	H1b	22,1	-10394DdeI,-7025AluI	189C,356C,362C,
	H	H1b	21,2	-10394DdeI,-7025AluI	189C,356C,362C,
	H	H1b	16,1	-10394DdeI,-7025AluI	189C,356C,362C,
	H	H1b	11,1	-10394DdeI,-7025AluI	189C,356C,362C,
	H	H1b	45,1	-10394DdeI,-7025AluI	189C,356C,362C,
M19	H	H1b	4,5	-10394DdeI,-7025AluI	189C,300G,356C,362C,
M20	V		6,1	-10394DdeI,-4577NlaIII	
M21	V		60,1	-10394DdeI,-4577NlaIII	298C
	V		61,1	-10394DdeI,-4577NlaIII	298C
M22	V		7,1	-10394DdeI,-4577NlaIII	298C, 320T,
M23	V		44,1	-10394DdeI,-4577NlaIII	201T,256T,
M24	I	I3	57,1	+10394DdeI,-8250HaeIII,+16389BamHI	86C,129A,223T,391A,
	I	I3	5,2	+10394DdeI,-8250HaeIII,+16389BamHI	86C,129A,223T, 391A
M25	I	I1	9,1	+10394DdeI,-8250HaeIII,+16389BamHI	129A,172C,223T,311C,391A,
	I	I1	64,1	+10394DdeI,-8250HaeIII,+16389BamHI	129A,172C,223T,311C,391A,
M26	J		26,4	+10394DdeI,-16065HinfI	69T,126C,
	J		53,1	+10394DdeI,-16065HinfI	69T,126C,

MITO	Hg	SubHg	COD. IND.	ANALISI con RFLP	POLIMORFISMI HVI
M27	J		70,1	+10394DdeI,-16065HinfI	69T,126C ,189C
M28	J		13,1	+10394DdeI,-16065HinfI	69T,126C ,261T,
M29	J		46,1	+10394DdeI,-16065HinfI	69T,126C ,242T,290T,
M30	K		22,3	+10394DdeI,+12308HinfI,-9052HaeII	93C, 224C,311C ,
M31	K		31,1	+10394DdeI,+12308HinfI,-9052HaeII	224C,311C ,
	K		25,1	+10394DdeI,+12308HinfI,-9052HaeII	224C,311C ,
	K		20,2	+10394DdeI ,+12308HinfI,-9052HaeII	224C,311C ,
	K		33,1	+10394DdeI,+12308HinfI,-9052HaeII	224C,311C ,
M32	K		13,2	+10394DdeI,+12308HinfI,-9052HaeII	162G, 224C,311C ,
M33	K		50,1	+10394DdeI,+12308HinfI,-9052HaeII	178C, 224C ,246T,304C, 311C ,
M34	T	T2	26,5	-10394DdeI,+13366BamHI	126C,294T,296T ,304C,362C
M35	T	T2	35,1	-10394DdeI,+13366BamHI	126C , 129A, 294T,296T ,304C,
M36	T		58,1	-10394DdeI,+13366BamHI	126C ,292T, 294T ,311C,
M37	T	T2	59,1	-10394DdeI,+13366BamHI	126C ,292T, 294T,296T ,311C,
M38	T	T2	29,1	-10394DdeI,+13366BamHI	126C ,184T,189C, 294T,296T ,
M39	T	T1a	40,1	-10394DdeI,+13366BamHI	126C,163G,186T,189C,294T ,
M40	T	T1a	24,2	-10394DdeI,+13366BamHI	126C,163G,186T,189C,294T ,311C,
M41	U		48,2	-10394DdeI,+12308HinfI	356C,362C,
M42	U	U5a	69,1	-10394DdeI,+12308HinfI	256T,270T
M43	U	U5b	76,1	-10394DdeI,+12308HinfI	93C,168T,189C, 270T ,
M44	U	U5a	47,1	-10394DdeI,+12308HinfI	192T, 256T,270T ,301T,
M45	U	U5a	55,2	-10394DdeI,+12308HinfI	189C,192T, 256T,270T ,
M46	U	U4	26,2	-10394DdeI,+12308HinfI	154C,179T,311C, 356C ,
M47	U	U2e	34,1	-10394DdeI,+12308HinfI	51G,129C ,183C,209C,260T, 362C ,
M48	U	U2e	4,4	-10394DdeI ,+12308HinfI	51G ,92C, 129C ,182C,183C, 189C,362C ,
M49	W		26,3	-10394DdeI,-8250HaeIII	187T, 223T, 249C,287T,292T,
M50	W		62,1	-10394DdeI,-8250HaeIII	145A,176G, 223T, 356C,390A,
M51	X	X2	12,1	-10394DdeI,-1715DdeI	189C , 223T, 278T ,
M52	X	X2	68,1	-10394DdeI,-1715DdeI	134T, 189A , 223T, 278T ,
M53	X	X2	38,1	-10394DdeI,-1715DdeI	183C, 189C , 223T, 266T, 278T ,
M54	X	X2	52,1	-10394DdeI,-1715DdeI	182C, 183C ,189C, 223T, 278T ,
	X	X2	39,1	-10394DdeI,-1715DdeI	182C, 183C ,189C, 223T, 278T
M55	N	N1a	41,1	+10394DdeI,-1715DdeI	147G,172C,223T ,292T, 355T ,
	N	N1a	63,1	+10394DdeI,-1715DdeI	147G,172C,223T ,292T, 355T
M56	altro	HV1	56,1	-10394DdeI	67T ,189C,
M57	altro		1,4	-10394DdeI	37G, 298C, 311C,
M58	altro	HV2	15,1	-10394DdeI	217C , 243C, 261T,
M59	altro		24,1	-10394DdeI	71T,172C,320T,
M60	altro	preHV1	1,1	-10394DdeI	104A, 126C ,192T, 362C ,
M61	altro		54,1	+10394DdeI	
M62	altro	C4a1	17,1	+10394DdeI	129A,223T,298C,327T ,

Tab. 4.11: Tabella riassuntiva in cui sono stati riportati tutti i siti polimorfi trovati sia con l'analisi eseguita mediante RFLP che con il sequenziamento diretto della HVI

relativamente ad ogni individuo. Inoltre, sono specificate nelle prime colonne a sinistra rispettivamente un codice per identificare l'assetto aplotipico (MITO), l'aplogruppo (Hg) ed il sottoaplogruppo (SubHg) a cui l'individuo appartiene (in grassetto sono evidenziati i polimorfismi diagnostici dei vari sotto-aplogruppi). I riquadri infine mettono in evidenza gli individui che sembrano presentare lo stesso mitocondrio.

Questi dati hanno permesso di identificare la presenza di 62 *lineages* mitocondriali diversi sugli 86 teorici attesi. Si è riscontrata infatti la presenza del medesimo assetto aplotipico in alcuni soggetti analizzati (evidenziati in azzurro in tabella), i quali alla luce delle indagini eseguite finora potrebbero condividere lo stesso mitocondrio e quindi presentare gli stessi alleli di suscettibilità.

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La eziopatogenesi dei disturbi psichiatrici, quali schizofrenia (SZ) e disturbo bipolare (BPD), è uno dei problemi attualmente più dibattuti e controversi in ambito scientifico.

Tale interesse è giustificato dal fatto che, queste patologie sono fortemente debilitanti, solitamente non regrediscono e rappresentano una delle 10 maggiori cause di malattia nel mondo. Ciascuna di esse infatti colpisce circa l'1% della popolazione umana e presenta una frequenza di suicidio tra gli individui affetti di circa il 10 % (DSM-IV).

Diversi studi confermano la presenza di una componente genetica nella eziologia di SZ e BPD. Studi su famiglie, gemelli e adozioni, mettono in evidenza una elevata ereditabilità (tra il 60% e l'80%) ed è comunemente accettato che molti geni di suscettibilità e differenti fattori ambientali contribuiscono alla insorgenza della malattia psichiatrica (Smoller e Finn, 2003). Tali patologie infatti, vengono definite multifattoriali e complesse in quanto oltre al condizionamento su base ambientale, risulta avere un ruolo determinante la componente genetica intesa come la presenza di variazioni nel DNA associate ad una maggiore suscettibilità allo sviluppo della malattia. Ne deriva che la definizione dei fattori genetici coinvolti in tali disturbi psichiatrici è affidata ad una serie di indagini tra loro complementari quali studi citogenetici, analisi di linkage e di associazione.

Dal punto di vista clinico, la SZ e il BPD sono state storicamente classificate come due entità cliniche distinte e tale distinzione è stata mantenuta anche negli studi genetici finalizzati all'identificazione di fattori di suscettibilità. Solo recentemente, è stato preso in considerazione un modello alternativo che prevede l'esistenza di un *continuum* fenotipico in cui lo spettro schizofrenico e quello bipolare si sovrappongono con il disturbo schizoaffettivo (Moller, 2003). Sulla base di tale modello si può ipotizzare che la componente genetica possa comprendere fattori di suscettibilità specifici per ciascun disturbo ed altri comuni per l'intero *continuum*.

Come descritto in Introduzione, sono stati condotti diverse analisi di linkage allo scopo di rilevare geni di suscettibilità condivisi da SZ e BPD. Le regioni cromosomiche individuate in tali studi sono: 3q29, 9q31 e 8p21, 16p12, 5q, 3q28 e 17q32, 1q42, 18q12-21 e 15q26.

Questi dati sono potenzialmente di grande interesse, ma al momento necessitano di essere replicati da gruppi indipendenti e su altre popolazioni per poter essere considerati definitivi.

Infatti, il numero elevato delle regioni identificate mediante analisi di linkage, suggerisce l'esistenza di una considerevole eterogeneità genetica che complica lo studio di queste patologie.

In un lavoro della Peltonen del 2000, si evidenzia come ricercare loci di suscettibilità utilizzando un campione proveniente da una piccola popolazione possa risultare particolarmente efficace in quanto, in tale campione, è possibile ipotizzare una minore eterogeneità allelica e di locus, e ridurre la variabilità dovuta a stili di vita, cultura ed ambiente differenti.

Date tali premesse il campione di soggetti affetti da disturbi dello spettro schizofrenico e bipolare, originari da Chioggia e oggetto del presente studio, appare particolarmente interessante. Chioggia è una cittadina della laguna veneziana con una popolazione attuale di circa 52000 individui, che può essere considerata una popolazione “chiusa” in base a considerazioni storiche, geografiche e sociali. In particolare tra i suoi abitanti è possibile rilevare la ricorrenza elevata degli stessi cognomi che sembra riflettere una bassa immigrazione ed un’alta endogamia nella città.

In base a queste considerazioni quindi è possibile ipotizzare che i soggetti affetti provenienti da tale realtà territoriale, possano condividere un numero limitato di alleli di suscettibilità e pertanto costituiscano un campione particolarmente adatto a studi genetici.

Inizialmente questo studio è stato orientato verso la raccolta di dettagliate informazioni cliniche e alla caratterizzazione dei legami di parentela presenti nel campione di famiglie con elevata ricorrenza di disturbi psichiatrici. Successivamente tale campione è stato indagato con metodiche genetico-molecolari al fine di individuare geni di suscettibilità per i disturbi dello spettro schizofrenico e bipolare.

Innanzitutto si è inteso, attraverso una analisi complessa di segregazione (CSA), individuare il modello di trasmissione genetica che meglio si adattava al campione di famiglie raccolto nella popolazione di Chioggia.

Il campione utilizzati in questa analisi è costituito complessivamente da 40 pedigree, per un totale di 207 soggetti affetti, in cui SZ e/o BPD e/o SA presentavano ricorrenza in più generazioni. Mediante CSA, sono stati valutati diversi modelli (sporadico, poligenico, a singolo locus) ed è stato possibile verificare che la segregazione della patologia, nelle famiglie indagate, è compatibile con un modello poligenico, nel quale tuttavia si evidenzia la presenza di un gene maggiore di suscettibilità che sembra interagire in maniera additiva con una componente poligenica residua (Scapoli et al., 2006).

Tale risultato permette di considerare il campione raccolto un buono strumento per intraprendere studi genetici volti ad individuare loci di suscettibilità. La possibile presenza di un gene maggiore aumenta infatti la probabilità di identificarlo utilizzando metodi di studio classici della genetica molecolare, quale è l’analisi di linkage.

Supportati da tali considerazioni, si è deciso di intraprendere uno studio di linkage su tutto il genoma (GWS) al fine di identificare loci di suscettibilità per SZ/BPD, in un subset di 16 famiglie particolarmente informative per la ricorrenza della malattia in più generazioni. Per tale scopo, sono stati selezionati ed analizzati 465 marcatori microsatelliti distribuiti equamente su tutto il genoma con una distanza media di 7.5 cM.

La scelta dell'approccio da utilizzare nell'analisi dei dati è, nello studio di malattie complesse, di cruciale importanza in quanto è necessario tener conto del possibile coinvolgimento di più geni. Ognuno di questi infatti potrebbe contribuire in modo diverso alla eziopatogenesi della malattia e presentare caratteristiche dissimili per quanto riguarda penetranza e frequenza degli alleli di suscettibilità. Per tale motivo si è scelto di effettuare un'analisi di linkage sia parametrica che non parametrica (NP). Questa ultima presenta il vantaggio di considerare nell'analisi solamente gli individui affetti, ricercando tra di essi la presenza di segmenti cromosomici condivisi, senza dover definire parametri di penetranza. Inoltre per ridurre al minimo i risultati casuali (falsi positivi e negativi) si è scelto di effettuare il calcolo del LOD score con un approccio *multipoint* nel quale il dato ottenuto in una specifica posizione, viene estrapolato considerando la segregazione dei marcatori adiacenti.

L'analisi statistica dei dati ottenuti dalla genotipizzazione dei marcatori microsatelliti sull'intero genoma, eseguita con approccio *multipoint* parametrico e non parametrico (NPL), ha permesso di rilevare deboli segnali di linkage in 4 regioni cromosomiche (1p, 1q, 4p e 15q).

L'assenza di segnali significativi in questa fase dello studio, può essere la conseguenza dell'utilizzo di una griglia di marcatori non sufficientemente densa. Inoltre l'osservazione che in queste regioni la distanza tra marcatori adiacenti a volte fosse superiore a 10 cM, ha reso necessaria una analisi più approfondita (*fine-mapping*), nella quale si è ritenuto utile aumentare la densità dei marcatori.

In questa fase, la genotipizzazione di un numero relativamente basso di marcatori aggiuntivi (24) nelle 4 regioni indagate, ha reso possibile ottenere informazioni più dettagliate sull'effettivo segnale di linkage. Nello specifico i dati ottenuti in 1p, 1q e 4p non sono stati confermati e pertanto riconducibili a probabili eventi casuali.

Il valore di NPL ottenuto nella regione 15q26 invece è aumentato passando da 1.93 a 3.05 (P nominale=0.00197). Una dettagliata analisi dei valori di LOD score ottenuti in ciascuna famiglia, evidenzia che questo segnale di linkage è supportato praticamente da tutti i pedigree: 14 su 16 mostrano una condivisione degli alleli tra gli affetti maggiore rispetto a quella attesa, senza distinzione tra famiglie pure SZ/BPD e miste.

Tali evidenze portano ad indicare questa regione come un locus di suscettibilità per SZ/BPD nel campione indagato. Per definire correttamente la valenza statistica di tale risultato sono state inoltre eseguite delle simulazioni mediante il programma MERLIN. In questo modo si è potuto definire che il valore di NPL di 3.05, ottenuto in 15q26, è suggestivo di linkage e corrisponde ad un valore di P empirico di 0.07.

Va sottolineato che, nell'ambito delle malattie complesse, anche l'identificazione di loci già descritti rappresenta un risultato di rilievo in quanto la replica di risultati positivi ottenuti da studi indipendenti rappresenta, al momento attuale, lo strumento migliore per confermare la presenza di un gene di suscettibilità. Pertanto, nonostante il dato ottenuto sul cromosoma 15 non raggiunga la soglia di significatività, esso appare particolarmente rilevante in quanto tale regione è già stata riferita in linkage da altri gruppi. In particolare nel 2004, Park e collaboratori (Park et al., 2004), mediante una analisi di linkage svolta in un campione di famiglie in cui vi era comorbidità di BPD e psicosi, hanno riportato un linkage suggestivo per il marcatore D15S652 (15q26.1), localizzato a soli 0.63 cM rispetto al locus identificato in questo studio. Inoltre recentemente, in un'analisi di linkage su tutto il genoma (GWS) condotta in 21 famiglie provenienti dall'est Quebec è stato rilevato un linkage significativo sul marcatore D15S1014 (NPL=4.55) (Maziade et al., 2005). Tale segnale è stato ottenuto utilizzando un fenotipo allargato, in cui venivano considerati allo stesso modo soggetti affetti da SZ, BPD e SA. E' interessante notare che in questo caso il segnale è perfettamente sovrapponibile con il dato ottenuto nell'analisi di famiglie di Chioggia ed il picco di linkage è posizionato esattamente nello stesso marcatore. Va inoltre segnalato che la regione 15q26 è localizzata in prossimità del telomero e che talvolta la griglia di microsatelliti analizzati nei GWS riportati in letteratura, non prevede l'analisi di marcatori in tale posizione. Pertanto, il fatto che solamente tre studi finora abbiano riportato un linkage (suggestivo o significativo) in 15q26, potrebbero riflettere un *bias* sperimentale che non permette di rilevare segnali positivi nelle regioni più telomeriche di questo cromosoma. Da tale osservazione si può concludere che il risultato finale di una analisi di linkage è fortemente influenzato dai marcatori utilizzati e che ciò va tenuto presente quando ci si appresta a confrontare dati ottenuti da studi diversi.

Alla luce dei risultati presentati in questo studio e delle considerazioni fatte finora, è possibile concludere che la regione 15q26 appare essere un locus di suscettibilità per i disturbi dello spettro schizofrenico e bipolare.

Data la natura particolarmente complessa delle patologie in esame, è probabile che nel campione analizzato, siano presenti loci di suscettibilità che contribuiscono alla manifestazione della

malattia solamente in alcune famiglie (famiglie-specifici). Per tale motivo, si è ritenuto utile eseguire una rivalutazione dei dati molecolari ottenuti dalla genotipizzazione dei microsatelliti nelle 16 famiglie oggetto di studio nel GWS, ricercando regioni in cui più famiglie mostravano chiari segnali di linkage.

In tal modo sono state selezionate le regioni 3q24-27 e la 18q23. Entrambe queste regioni appaiono in linkage in 2 delle 16 famiglie analizzate, mentre i valori di LOD score ottenuti dagli altri pedigree sono risultati negativi o scarsamente informativi.

La regione sul cromosoma 3, appare particolarmente interessante alla luce del fatto che numerosi studi riportano la regione 3q24-ter come un locus di suscettibilità per le patologie psichiatriche. Ad esempio, una analisi di linkage su tutto il genoma eseguita su 7 pedigree con SZ provenienti da un'isola della Micronesia, individua un linkage suggestivo in 3q24-28 (Camp et al., 2001). Inoltre, Bailer nel 2002, ha pubblicato i risultati di un GWS condotto su 8 pedigree originari dall'Austria, 5 con ricorrenza di SZ e 3 con BPD, riportando la regione 3q come un locus di suscettibilità comune a SZ e BPD.

In 3q24-27 l'aumento del numero dei marcatori in tutte le famiglie, ha permesso non solo di confermare un valore di NPL superiore a 3 nelle famiglie inizialmente in linkage (F2 e F26), ma anche di rilevare segnali di linkage in altri pedigree, che non erano emersi con la griglia di marcatori utilizzata nel GWS. E' importante notare che, riducendo la distanza di mappa tra i marcatori e quindi aumentando l'informatività di questa regione, il valore di NPL complessivo delle 16 famiglie aumenta da 1.2 a 2.0. Quindi, la regione 3q24-27, che da una prima analisi del genoma aveva ottenuto valori di LOD score così bassi da non essere selezionata per il *fine-mapping*, con l'analisi di soli 4 marcatori microsatelliti aggiuntivi ottiene un risultato vicino alla soglia di suggestività. Tale osservazione permette di verificare nuovamente l'importanza del numero di marcatori da analizzare nel genoma quando si vogliono effettuare analisi di linkage di questo tipo. Ad oggi lo strumento più fine che si ha a disposizione, è rappresentato da un'analisi di linkage su tutto il genoma mediante l'utilizzo di 10000 SNPs. Questi marcatori, nonostante siano biallelici, quindi molto meno informativi dei microsatelliti se considerati singolarmente, sono estremamente numerosi e consentono di ottenere una copertura del genoma estremamente accurata. Sicuramente sarebbe interessante in futuro, poter usufruire di tale strumento per poter ri-analizzare le famiglie del campione oggetto di studio al fine di ottenere informazioni più dettagliate in merito ai loci già individuati e/o in merito ad altri possibili loci non rilevati con la metodica utilizzata.

La ricostruzione degli aplotipi nella regione 3q24-27 inoltre, ha permesso di rilevare la presenza di un aplotipo apparentemente uguale, dato dagli alleli di 3 marcatori consecutivi, in 4 delle 16

famiglie analizzate. Tale risultato potrebbe essere dovuto semplicemente al caso. Tuttavia considerando le peculiarità del campione oggetto di studio, tale dato potrebbe fare ipotizzare che il segmento cromosomico individuato derivi da un antenato comune e che la sua presenza in soggetti diversi apparentemente non imparentati sia la conseguenza di un *linkage disequilibrium* con alleli di suscettibilità.

Relativamente al cromosoma 18q23, un aumento del numero di marcatori in tutte le famiglie e la ricostruzione degli aplotipi, ha portato nuove informazioni sui valori di LOD score preliminarmente ottenuti: in due famiglie (F1 e F26) i valori di NPL si confermano superiori a 3 in corrispondenza del marcatore D18S462 (P nominale < 0.05). Pertanto è possibile concludere che il locus identificato in 18q23 appare coinvolto nella patologia solamente in due famiglie del campione indagato.

Tenuto conto dei dati nella loro globalità solo per la regione 15q26 si è deciso di proseguire con l'analisi di possibili geni candidati. Va segnalato che uno studio eseguito da Arai e collaboratori, ha riportato una associazione tra schizofrenia ed il gene ST8SIA2 (che mappa in 15q26), utilizzando un campione di pazienti giapponesi (Arai et al., 2006).

La proteina codificata da questo gene è una glicosiltransferasi, localizzata nel Golgi e coinvolta nella produzione di acido polisialico, un modulatore delle proprietà adesive della molecola di adesione neurale (NCAM1). La NCAM1 è una proteina notoriamente coinvolta nello sviluppo del sistema nervoso centrale in quanto influenza i processi di adesione tra neuroni, la fascicolazione e crescita dei neuriti. Questo gene è stato identificato, attraverso un approccio non posizionale, considerando esclusivamente il suo coinvolgimento funzionale nello sviluppo neuronale.

Mediante uno studio di caso controllo gli autori hanno identificato due SNPs (rs3759916 e rs3759914) localizzati nel promotore di tale gene in associazione con la SZ. Inoltre con una analisi in vitro, hanno valutato il ruolo funzionale di tali SNPs dimostrando che l'aplotipo costituito dagli alleli in associazione (rispettivamente -1126T e -851T) provoca un aumento dell'attività trascrizionale del gene ST8SIA2. Recentemente, un gruppo di ricerca indipendente (Tao et al., 2007) ha confermato l'associazione degli stessi polimorfismi in un campione di soggetti cinesi affetti da SZ.

Tenuto conto di questi dati, è risultato interessante andare a valutare quali fossero le frequenze di tali SNPs in un campione di pazienti e controlli di Chioggia.

Si fa presente che, quando si vogliono confrontare le caratteristiche genetica molecolari di due gruppi di individui con diverse caratteristiche fenotipiche (affetti-sani), ci si deve assicurare che

le differenze osservate non siano imputabili alla presenza di sottogruppi o sottopopolazioni (Pritchard e Rosenberg, 1999). Pertanto prima di eseguire una analisi di questo tipo, risulta fondamentale valutare l'omogeneità genetica dei controlli e dei pazienti originari di Chioggia. A tal fine si è proceduto con una analisi statistica (AMOVA) che ha permesso di escludere una stratificazione criptica, in quanto le differenze rilevate nella distribuzione delle frequenze alleliche dei microsatelliti indagati, non sono risultate significative nei due campioni oggetto di studio. Alla luce di questo risultato, si è proceduto ad analizzare i polimorfismi presenti nella sequenza del promotore del gene ST8SIA2.

L'analisi è stata svolta mediante sequenziamento diretto dei 2 SNP (rs3759914 e rs3759916) in 106 soggetti (56 affetti e 50 controlli) provenienti da Chioggia ed in 50 individui sani di diversa provenienza. Confrontando le frequenze alleliche e genotipiche di questi SNP non è stato possibile rilevare differenze significative tra i diversi gruppi analizzati, in quanto tali marcatori nella popolazione italiana, sono risultati non essere polimorfi. In particolare, lo SNP rs3759914 non appare mai in eterozigosi nel campione analizzato e pertanto non può essere utilizzato per studi di associazione, mentre lo SNP rs3759916 presenta una MAF (*minor allele frequencies*) di 0.03. In uno studio di associazione, il potere di rilevare associazione positiva per un allele di suscettibilità dipende da diverse variabili, quali la dimensione del campione, la MAF dell'allele e il rischio che uno specifico allele di suscettibilità determini il fenotipo malattia. Relativamente allo SNP rs3759916, che mostra un grado di polimorfismo così basso, è stato stimato che sarebbe necessario analizzare un campione di 2000 casi e 2000 controlli per rilevare una associazione significativa nella popolazione italiana (calcoli eseguiti con il programma Power Calculator assumendo un rischio relativo di 1.5 ed una probabilità di rilevare associazione del 70%).

Dai dati preliminari da noi ottenuti risulta pertanto improbabile che gli SNPs rs3759916 e rs3759914 del gene ST8SIA2 risultino direttamente coinvolti nella patogenesi della SZ a differenza di quanto rilevato nella popolazione giapponese e cinese per la quale era stato ottenuto un p significativo.

Negli ultimi anni, è stata avanzata l'ipotesi che particolari polimorfismi a livello del DNA mitocondriale siano coinvolti nella patogenesi dei disturbi psichiatrici. Tale teoria risulta pertinente in quanto un alterato stato energetico delle cellule del sistema nervoso centrale, può provocare cambiamenti della loro funzionalità, modificando la plasticità dei circuiti neuronali. Inoltre è stato dimostrato che l'attività mitocondriale svolge un ruolo fondamentale durante il neurosviluppo, influenzando la sinaptogenesi e la polarità neuronale (Ben-Shachar, 2004).

Sebbene molte malattie mitocondriali siano causate direttamente da una mutazione a livello del mtDNA, ne esistono altre in cui la malattia sembra associata preferenzialmente ad alcuni aplogruppi. E' stato ipotizzato che alcuni di questi aplogruppi agiscano come fattori di rischio nella patogenesi di queste malattie (Herrnstadt e Howell, 2004).

Nello studio da me eseguito si è pertanto voluto valutare se la suscettibilità a disturbi dello spettro schizofrenico e bipolare non potesse essere attribuita anche ad una specifica combinazione di polimorfismi nel DNA mitocondriale. A tale scopo sono stati caratterizzati gli aplogruppi (Hg) di appartenenza di 86 soggetti affetti non imparentati in linea materna originari di Chioggia. La distribuzione delle frequenze degli Hg nel campione di affetti analizzati è risultata perfettamente sovrapponibile con quella di un ampio e rappresentativo campione della popolazione italiana generale (1486 individui) riportata in letteratura (Ghezzi et al., 2005). Anche se sarebbe più opportuno eseguire un confronto con un gruppo di soggetti sani di Chioggia, questo risultato preliminare fa presupporre che non siano presenti differenze significative nel campione esaminato.

Recentemente è stato pubblicato uno studio eseguito su 142 soggetti affetti da SZ e 190 controlli italiani (Magri et al., 2007) in cui si è valutato un coinvolgimento degli Hg mitocondriali sulla patogenesi della malattia. Anche in questo lavoro, non è stato possibile osservare una distribuzione degli Hg diversa rispetto all'attesa ma, il numero elevato di soggetti analizzati ha permesso di stratificare i dati per età di insorgenza e di rilevare che gli affetti con Hg J e Hg T mostrano un esordio più precoce. Questo dato fa capire come in questo tipo di indagini risulti fondamentale analizzare un campione numeroso, in modo da poter valutare anche specifici endofenotipi che caratterizzano dei sottogruppi di soggetti tra loro omogenei da un punto di vista clinico.

Inoltre, si è voluto valutare se nel campione analizzato fossero presenti mitocondri condivisi da più soggetti affetti non imparentati. A tale scopo, sono stati caratterizzati gli aplotipi mitocondriali mediante sequenziamento della regione ipervariabile I. A fronte degli 86 aplotipi attesi se ne sono rilevato solo 65, in quanto si è osservata la ricorrenza in più soggetti affetti degli stessi aplotipi (vedi Tab:4.11 nella sezione risultati). Considerando la numerosità del campione, è altamente probabile che alcuni individui presentino i polimorfismi dei mitocondri più comuni nella popolazione europea (per esempio quelli della sequenza H di riferimento). In altri termini, l'osservazione di ben 8 soggetti nel aplotipo definito M1 probabilmente riflette il fatto che tale mitocondrio è molto comune nella popolazione analizzata e non è da mettere in relazione con la patologia. Tuttavia, nel campione indagato, è possibile rilevare anche la presenza di alcuni

aplotipi “rari” apparentemente condivisi da soggetti affetti, come gli aplotipi M24, M25, M54 e M55 (vedi Tab:4.11 nella sezione risultati).

Si presuppone che sequenziando la regione ipervariabile II e aumentando il numero di polimorfismi indagati si potranno ottenere dati più conclusivi relativamente alla possibilità di discriminare tra gli aplotipi realmente condivisi.

Sarà interessante infine procedere al sequenziamento completo dei mitocondri in quei soggetti che, sulla base dei polimorfismi mitocondriali finora caratterizzati, appaiono presentare lo stesso mtDNA, in modo da poter evidenziare possibili alleli di suscettibilità condivisi che potrebbero essere riconducibili alle patologie dello spettro schizofrenico e bipolare.

In conclusione, lo studio compiuto ha preso in esame una serie di elementi con la finalità di dare un significato in termini genetico-molecolari della elevata ricorrenza del disturbo psichiatrico in un campione ben caratterizzato dal punto di vista clinico ed anagrafico. Seppure i dati riportati non possono definirsi definitivi, alcuni risultati già acquisiti fanno capire che la strada intrapresa è corretta. In futuro sicuramente andrà rivalutato lo strumento di indagine adottato nell’analisi di linkage (microsatelliti vs SNP), la numerosità delle famiglie (campione potenziale 40 pedigree) e la suddivisione di queste sulla base di una migliore classificazione clinica che privilegi gli endofenotipi rispetto alle classi fenotipiche diagnostiche attualmente adottate.

6 RIASSUNTO DELL'ATTIVITA' SVOLTA

L'obiettivo principale dello studio è quello di individuare loci coinvolti nella eziopatogenesi della schizofrenia e del disturbo bipolare in un campione di soggetti tutti originari della città di Chioggia.

Grazie alla collaborazione intrapresa con il Dipartimento di Salute Mentale (CSM) di Chioggia, sono state raccolte informazioni cliniche e campioni biologici di un elevato numero di individui affetti da disturbi psichiatrici (schizofrenia, disturbo bipolare e disturbo schizoaffettivo).

In accordo con l'ipotesi che alcuni geni conferiscano suscettibilità sia ai disturbi dello spettro schizofrenico sia a quelli dello spettro bipolare, nel campione oggetto di studio è stata svolta una indagine genetico-molecolare con lo scopo di aumentare le informazioni attualmente disponibili. Tali indagini hanno permesso di:

1) Caratterizzare da un punto di vista clinico ed anagrafico famiglie con elevata ricorrenza di patologie dello spettro schizofrenico e bipolare. A tale fine, si è proceduto ad una attenta ricostruzione dei legami di parentela tra i soggetti affetti, sia attraverso la raccolta di dati anagrafici che caratterizzando i *lineages* paterni di soggetti apparentemente non imparentati attraverso l'utilizzo di marcatori microsatelliti sul cromosoma Y.

2) Definire il modello ereditario nel campione di 40 famiglie raccolte mediante una analisi di segregazione complessa (in collaborazione con la Prof. Chiara Scapoli), individuando il *pattern* di trasmissione che meglio si adattava al campione oggetto di studio. I risultati di tale indagine hanno suggerito una segregazione della patologia compatibile con un modello poligenico, nel quale tuttavia si evidenzia la presenza di un gene maggiore di suscettibilità che sembra interagire in maniera additiva con una componente poligenica residua.

3) Ricercare loci di suscettibilità con uno studio di linkage su tutto il genoma (GWS) in 16 famiglie multigenerazionali (57 individui). Per tale scopo sono stati genotipizzati un totale di 489 marcatori microsatelliti (465 nell'analisi iniziale e 24 nel *fine-mapping*) ed è stato effettuato il calcolo del LOD score *multipoint* parametrico e non parametrico (NPL). In base ai dati ottenuti, il segnale di linkage più rilevante è stato individuato nella regione cromosomica 15q26. Nello specifico in tale locus, si è ottenuto un valore di NPL massimo di 3.05, sul marcatore D15S1014, che corrisponde ad un valore di P empirico (calcolato mediante simulazioni) di 0.07.

In 15q26 è localizzato il gene ST8SIA2. Poiché recentemente è stata riportata l'associazione tra due polimorfismi promotoriali di tale gene e la Sz in un campione di soggetti giapponesi e cinesi, si è ritenuto di valutare quali fossero le frequenze di tali SNP in 106 soggetti (56 affetti e 50 controlli) provenienti da Chioggia ed in 50 individui sani di diversa provenienza. Con tale analisi

si è rilevato che gli SNP studiati non risultano polimorfi nella popolazione indagata, differentemente da quanto accade in quelle orientali, e pertanto risulta improbabile il loro diretto coinvolgimento nella patogenesi della SZ nel campione italiano.

Per testare la presenza di altri loci di suscettibilità inoltre, sono stati rivalutati i dati molecolari ottenuti nel GWS per distinguere quali fossero i valori di LOD score ottenuti da ciascuna famiglia. In tal modo sono state selezionate le regioni 3q24-27 e la 18q23, nelle quali 2 famiglie su 16 mostravano chiari segnali di linkage. L'aggiunta di marcatori informativi e la ricostruzione degli aplotipi in 3q24-27 ha permesso non solo di confermare un valore di NPL superiore a 3 nelle famiglie inizialmente in linkage, ma anche di ottenere segnali positivi in altri pedigree e di rilevare la presenza di un possibile aplotipo condiviso (in 4 famiglie su 16). Relativamente alla regione 18q23 invece, con una indagine analoga non si sono ottenuti altri segnali degni di nota.

4) Valutare il contributo del DNA mitocondriale nella patogenesi della SZ e BPD. Mediante la caratterizzazione degli aplogruppi ed aplotipi (HVI) mitocondriali di 86 casi indice, non è stato possibile rilevare una distribuzione di polimorfismi mitocondriali diversa rispetto all'atteso. Tuttavia sono stati identificati 12 *lineages* che sembrano condivisi in diverse famiglie e questo dato potrebbe essere riconducibile prevalentemente a 2 eventi:

- queste famiglie condividono un antenato comune;
- questi mitocondri condivisi potrebbero avere dei polimorfismi di sequenza coinvolti nella predisposizione genetica a disturbi dello spettro schizofrenico e bipolare.

In conclusione lo studio compiuto ha preso in esame una serie di elementi con la finalità di dare un significato in termini genetico-molecolari della elevata ricorrenza del disturbo psichiatrico in un campione ben caratterizzato dal punto di vista clinico ed anagrafico. Seppure i dati riportati non possono definirsi definitivi, alcuni risultati già acquisiti fanno capire che la strada intrapresa è corretta. In futuro sicuramente andrà rivalutato lo strumento di indagine adottato nell'analisi di linkage (Illumina SNP-based Linkage panel version IV), la numerosità delle famiglie (campione potenziale 40 pedigree) e la suddivisione di queste sulla base di una migliore classificazione clinica che privilegi gli endofenotipi rispetto alle classi fenotipiche diagnostiche attualmente adottate.

.....

In order to identify susceptibility loci for schizophrenia (SZ) and bipolar disorder (BPD), we collected clinical informations and biological sample of patients affected by SZ, BPD and schizoaffective disorder (SA), in collaboration with Mental Health Centre of Chioggia.

Recent findings, emerging from genetic studies, support the evidence that these diseases share a number of susceptibility genes. According to this theory, we carried out genetic and molecular analysis to better understand schizophrenia and its associated disorders in their genetic context.

By performing these analyses we were able to:

1) Collect clinical and anagraphical informations about the 40 pedigrees with high loading for schizophrenia and bipolar disorder. For each family, pedigree structure was traced back to three generations using both church registers and demographical records. Additionally, we genotyped microsatellite markers on chromosome Y to evaluate the possibility of common male ancestor.

2) Assess the weight of genetic component and the mode of inheritance of SZ/BPD, in the pedigrees. We performed a complex segregation analysis (in collaboration with Prof. Scapoli); the results suggest that a main additive gene, plus a residual polygenic component is the best fitting hereditary model for the collected sample (Scapoli et al., 2006).

3) Find susceptibility loci with a genome wide search (GWS) in 16 multigenerational pedigrees with a high loading of the diseases (57 subjects). We genotyped 489 microsatellite markers (465 in the first scan and 24 in the fine-mapping analysis) and we calculated, using a multipoint approach, LOD score parametric and non parametric (NPL). The higher LOD score was obtained on chromosome 15q26, with a peak on marker D15S1014 (NPL=3.05), that reaches the statistical criteria for suggestive linkage (genomic P value of 0.07).

In this region (15q26) mapped the gene ST8SIA2. Recently, two SNPs located in the promoter of the gene were reported in association with schizophrenia in a Japanese and Chinese sample. In order to test the frequencies of these polymorphisms, we performed a preliminary analysis in a sample of 156 Italian subjects: 56 patients and 100 healthy subjects (50 from Chioggia and 50 from other Italian regions). The SNPs analyzed resulted to be rare or not polymorphic at all, both in Chioggia and in the general Italian population, so they are unlikely to be directly involved in schizophrenia in our population.

In order to test the possibility that some families share minor susceptibility loci not identified in the previous analysis, we evaluated linkage data for each single family separately. We found that 2 of the 16 pedigrees showed high LOD score values in 3q24-27 and 18q23, therefore in these regions a further investigation, increasing the marker density and analysing the haplotypes, were carried out. In this way, we were able to reveal on chromosome 3q24-27 a putative common haplotype shared between a subset of families. With a similar approach on chromosome 18q23 we were not able to identify a good segregation shared among other pedigrees.

4) Evaluate a possible involvement of mitochondrial polymorphisms in the pathogenesis of psychiatric disease. We characterized the mt haplogroups (Hg) and haplotypes (HVI region) of

86 index cases; the distribution of the Hg were similar to those reported for a large sample of the general Italian population so we were not able to find any significant differences in the distribution of the haplogroups. Interestingly, we identified 12 *lineages* that seem to be shared between different families. These data suggest that:

- families that share the same mtDNA could have a same maternal ancestor;
- the shared mitochondria could carry a particular set of polymorphisms that influence the genetic predisposition to SZ and BPD.

In conclusion, in this study we collected a sample of families originating from Chioggia with high loading of schizophrenia and bipolar disorder. This sample was the object of genetic and molecular analysis (complex segregation analysis, linkage analysis, mtDNA characterization) in order to obtain information on the susceptibility loci involved in the pathogenesis of these disorders. The preliminary results are encouraging, therefore the sample will be further investigated in order to carry out more accurate analysis. The next step will be to use a more sensitive instrument for the linkage study (Illumina SNP-based Linkage panel version IV), to increase the sample size and to introduce a more detailed classification of the clinical cases.

7 BIBLIOGRAFIA

Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees.

Nat Genet. 2002 Jan;30(1):97-101.

American Psychiatric Association. DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fourth Edition.

American Psychiatric Association Washington DC, 1994.

Arai M, Yamada K, Toyota T, Obata N, Haga S, Yoshida Y, Nakamura K, Minabe Y, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Mori N, Yoshikawa T, Itokawa M. Association between polymorphisms in the promoter region of the sialyltransferase 8B (SIAT8B) gene and schizophrenia.

Biol Psychiatry. 2006 Apr 1;59(7):652-9.

Bailer U, Leisch F, Meszaros K, Lenzinger E, Willinger U, Strobl R, Gebhardt C, Gerhard E, Fuchs K, Sieghart W, Kasper S, Hornik K, Aschauer HN. Genome scan for susceptibility loci for schizophrenia.

Neuropsychobiology. 2000;42(4):175-82.

Ben-Shachar D, Laifenfeld D. Mitochondria, synaptic plasticity, and schizophrenia.

Int Rev Neurobiol. 2004;59:273-96. Review.

Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family.

Am J Hum Genet. 2001 Aug;69(2):428-33.

Bourgain C, Hoffjan S, Nicolae R, Newman D, Steiner L, Walker K, Reynolds R, Ober C, McPeck MS. Novel case-control test in a founder population identifies P-selectin as an atopy-susceptibility locus.

Am J Hum Genet. 2003 Sep;73(3):612-26.

Butler JM, Schoske R, Vallone PM, Kline MC, Redd AJ, Hammer MF. A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers.

Forensic Sci Int. 2002 Sep 10;129(1):10-24.

Camp NJ, Neuhausen SL, Tiobech J, Polloi A, Coon H, Myles-Worsley M. Genomewide multipoint linkage analysis of seven extended Palauan pedigrees with schizophrenia, by a Markov-chain Monte Carlo method.

Am J Hum Genet. 2001 Dec;69(6):1278-89.

Cardno AG, Jones LA, Murphy KC, Sanders RD, Asherson P, Owen MJ, McGuffin P. Dimensions of psychosis in affected sibling pairs.

Schizophr Bull. 1999;25(4):841-50.

Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE, Weinberger DR. Functional analysis of genetic

variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain.

Am J Hum Genet. 2004 Nov;75(5):807-21.

Cheng R, Juo SH, Loth JE, Nee J, Iossifov I, Blumenthal R, Sharpe L, Kanyas K, Lerer B, Lilliston B, Smith M, Trautman K, Gilliam TC, Endicott J, Baron M. Genome-wide linkage scan in a large bipolar disorder sample from the National Institute of Mental Health genetics initiative suggests putative loci for bipolar disorder, psychosis, suicide, and panic disorder.

Mol Psychiatry. 2006 Mar;11(3):252-60.

Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK. The DISC locus in psychiatric illness.

Mol Psychiatry. 2008 Jan;13(1):36-64.

Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, Bougueleret L, Barry C, Tanaka H, La Rosa P, Puech A, Tahri N, Cohen-Akenine A, Delabrosse S, Lissarrague S, Picard FP, Maurice K, Essioux L, Millasseau P, Grel P, Debailleul V, Simon AM, Caterina D, Dufaure I, Malekzadeh K, Belova M, Luan JJ, Bouillot M, Sambucy JL, Primas G, Saumier M, Boubkiri N, Martin-Saumier S, Nasroune M, Peixoto H, Delaye A, Pinchot V, Bastucci M, Guillou S, Chevillon M, Sainz-Fuertes R, Meguenni S, Aurich-Costa J, Cherif D, Gimalac A, Van Duijn C, Gauvreau D, Ouellette G, Fortier I, Raelson J, Sherbatich T, Riazanskaia N, Rogaev E, Raeymaekers P, Aerssens J, Konings F, Luyten W, Macciardi F, Sham PC, Straub RE, Weinberger DR, Cohen N, Cohen D. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Oct 15;99(21):13675-80.

Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis.

J Med Genet. 2005 Mar;42(3):193-204. Review.

Craddock N, Owen MJ. The beginning of the end for the Kraepelinian dichotomy.

Br J Psychiatry 2005; 186:364-366

De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, Bonafe M, Monti D, Baggio G, Bertolini S, Mari D, Mattace R, Franceschi C. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans.

FASEB J. 1999 Sep;13(12):1532-6.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data.

Genetics. 1992 Jun;131(2):479-91.

Gershon ES, Hamovit J, Guroff JJ, Dibble E, Leckman JF, Sceery W, Targum SD, Nurnberger JI Jr, Goldin LR, Bunney WE Jr. A family study of schizoaffective, bipolar I, bipolar II, unipolar, and normal control probands.

Arch Gen Psychiatry. 1982 Oct;39(10):1157-67.

Ghezzi D, Marelli C, Achilli A, Goldwurm S, Pezzoli G, Barone P, Pellecchia MT, Stanzione P, Brusa L, Bentivoglio AR, Bonuccelli U, Petrozzi L, Abbruzzese G, Marchese R, Cortelli P, Grimaldi D, Martinelli P, Ferrarese C, Garavaglia B, Sangiorgi S, Carelli V, Torroni A, Albanese

A, Zeviani M. Mitochondrial DNA haplogroup K is associated with a lower risk of Parkinson's disease in Italians.

Eur J Hum Genet. 2005 Jun;13(6):748-52.

Green EK, Raybould R, Macgregor S, Gordon-Smith K, Heron J, Hyde S, Grozeva D, Hamshere M, Williams N, Owen MJ, O'Donovan MC, Jones L, Jones I, Kirov G, Craddock N. Operation of the schizophrenia susceptibility gene, neuregulin 1, across traditional diagnostic boundaries to increase risk for bipolar disorder.

Arch Gen Psychiatry. 2005 Jun;62(6):642-8.

Hamshere ML, Bennett P, Williams N, Segurado R, Cardno A, Norton N, Lambert D, Williams H, Kirov G, Corvin A, Holmans P, Jones L, Jones I, Gill M, O'Donovan MC, Owen MJ, Craddock N. Genomewide linkage scan in schizoaffective disorder: significant evidence for linkage at 1q42 close to DISC1, and suggestive evidence at 22q11 and 19p13.

Arch Gen Psychiatry. 2005 Oct;62(10):1081-8.

Hosák L. Role of the COMT gene Val158Met polymorphism in mental disorders: a review.

Eur Psychiatry. 2007 Jul;22(5):276-81.

Herrnstadt C, Howell N. An evolutionary perspective on pathogenic mtDNA mutations: haplogroup associations of clinical disorders.

Mitochondrion. 2004 Sep;4(5-6):791-8.

Klei L, Bacanu SA, Myles-Worsley M, Galke B, Xie W, Tiobech J, Otto C, Roeder K, Devlin B, Byerley W. Linkage analysis of a completely ascertained sample of familial schizophrenics and bipolars from Palau, Micronesia.

Hum Genet. 2005 Aug;117(4):349-56.

Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach.

Am J Hum Genet. 1996 Jun;58(6):1347-63.

Lalouel JM, Rao DC, Morton NE, Elston RC. A unified model for complex segregation analysis.

Am J Hum Genet. 1983 Sep;35(5):816-26.

Lake CR, Hurwitz N. Schizoaffective disorder merges schizophrenia and bipolar disorders as one disease: there is no schizoaffective disorder.

Curr Opin Psychiatry. 2007 Jul;20(4):365-79. Review.

McDonald C, Murphy KC. The new genetics of schizophrenia.

Psychiatr Clin North Am. 2003 Mar;26(1):41-63. Review.

Magri C, Gardella R, Barlati SD, Valsecchi P, Sacchetti E, Barlati S. Mitochondrial DNA haplogroups and age at onset of schizophrenia.

Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007 Jun 5;144(4):496-501.

Maziade M, Roy MA, Chagnon YC, Cliche D, Fournier JP, Montgrain N, Dion C, Lavallée JC, Garneau Y, Gingras N, Nicole L, Pirès A, Ponton AM, Potvin A, Wallot H, Mérette C. Shared and specific susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder: a dense genome scan in Eastern Quebec families.

Mol Psychiatry. 2005 May;10(5):486-99.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.

Nucleic Acids Res. 1988 Feb 11;16(3):1215.

Moller HJ. Bipolar disorder and schizophrenia: distinct illnesses or a continuum?

J Clin Psychiatry 2003; 64[suppl 6]: 23-27.

Onstad S, Skre I, Torgersen S, Kringlen E. Twin concordance for DSM-III-R schizophrenia.

Acta Psychiatr Scand. 1991 May;83(5):395-401.

Owen MJ, Craddock N, Jablensky A. The genetic deconstruction of psychosis.

Schizophr Bull. 2007 Jul;33(4):905-11. Review.

Park N, Joo SH, Cheng R, Liu J, Loth JE, Lilliston B, Nee J, Grunn A, Kanyas K, Lerer B, Endicott J, Gilliam TC, Baron M. Linkage analysis of psychosis in bipolar pedigrees suggests novel putative loci for bipolar disorder and shared susceptibility with schizophrenia.

Mol Psychiatry. 2004 Dec;9(12):1091-9.

Peltonen L, Palotie A, Lange K. Use of population isolates for mapping complex traits.

Nat Rev Genet 2000; 1:182-190.

Prasad S, Semwal P, Deshpande S, Bhatia T, Nimgaonkar VL, Thelma BK. Molecular genetics of schizophrenia: past, present and future.

J Biosci. 2002 Feb;27(1 Suppl 1):35-52. Review.

Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies.

Am J Hum Genet. 1999 Jul;65(1):220-8.

Sanders AR, Duan J, Gejman PV. Complexities in psychiatric genetics.

Int Rev Psychiatry. 2004 Nov;16(4):284-93. Review.

Scapoli C, Rampinelli S, Vazza G, Peruzzi P, De Sanctis G, Di Florio A, Bertolin C., Mostacciolo MI. Genetic inheritance of schizophrenia and bipolar disorder in an Italian population isolate.

Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006 vol. 141B, pp. 719-720

Schosser A, Fuchs K, Scharl T, Leisch F, Bailer U, Kasper S, Sieghart W, Hornik K, Aschauer HN. Additional support for linkage of schizophrenia and bipolar disorder to chromosome 3q29.

Eur Neuropsychopharmacol. 2007 May-Jun;17(6-7):501-5.

Schumacher J, Jamra RA, Freudenberg J, Becker T, Ohlraun S, Otte AC, Tullius M, Kovalenko S, Bogaert AV, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nöthen MM, Cichon S. Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder.

Mol Psychiatry. 2004 Feb;9(2):203-7.

Sklar P, Pato MT, Kirby A, Petryshen TL, Medeiros H, Carvalho C, Macedo A, Dourado A, Coelho I, Valente J, Soares MJ, Ferreira CP, Lei M, Verner A, Hudson TJ, Morley CP, Kennedy

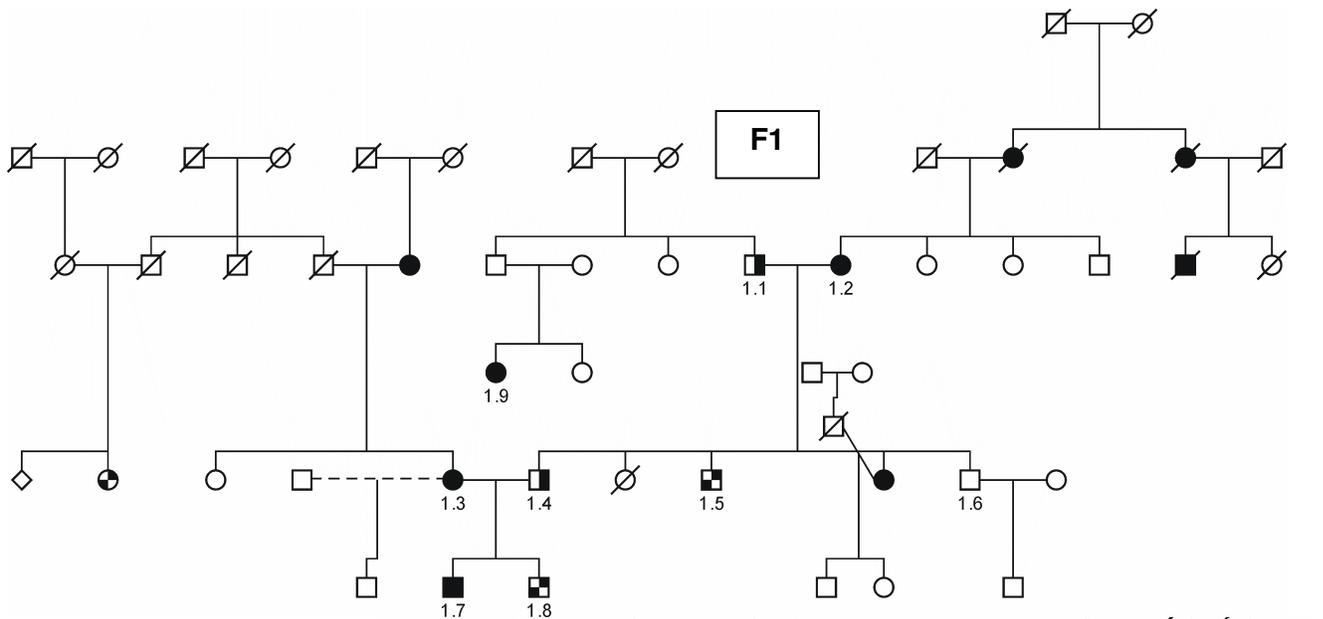
JL, Azevedo MH, Lander E, Daly MJ, Pato CN. Genome-wide scan in Portuguese Island families identifies 5q31-5q35 as a susceptibility locus for schizophrenia and psychosis. *Mol Psychiatry*. 2004 Feb;9(2):213-8.

Smoller JW, Finn CT. Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. *Am J Med Genet (Semin Med Genet)* 2003; **123**:48-58.

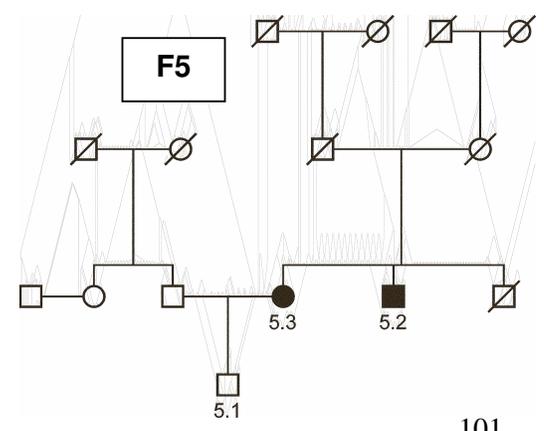
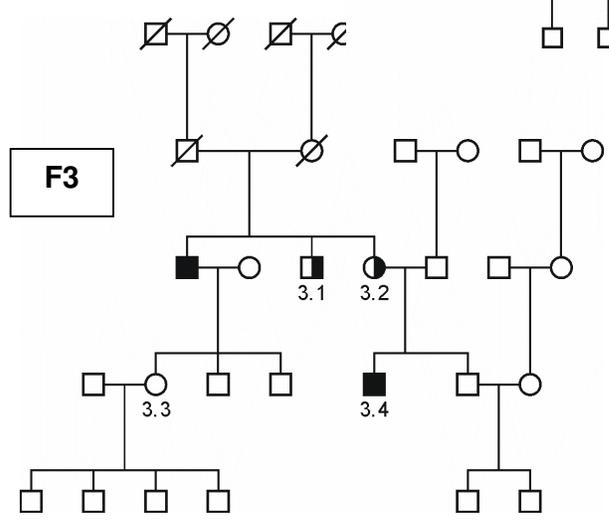
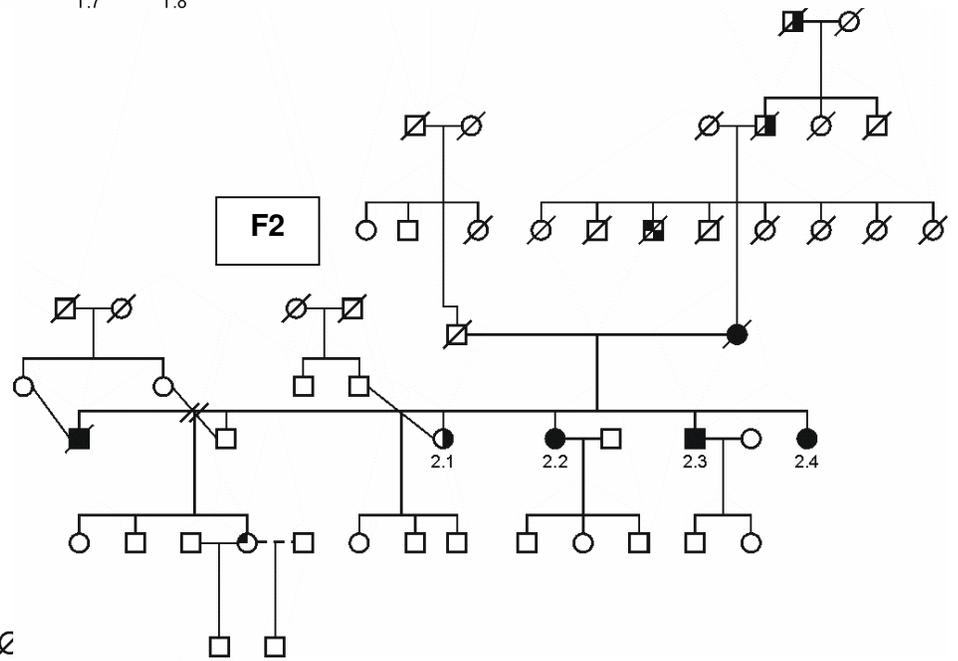
Strachan T, Read AP. *Genetica umana molecolare*(3[^]edizione).
UTET, 2006

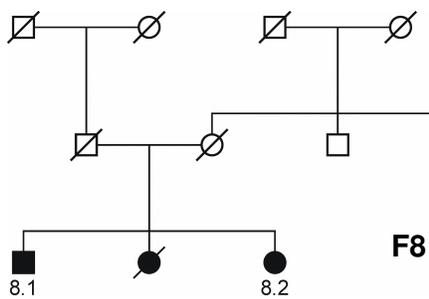
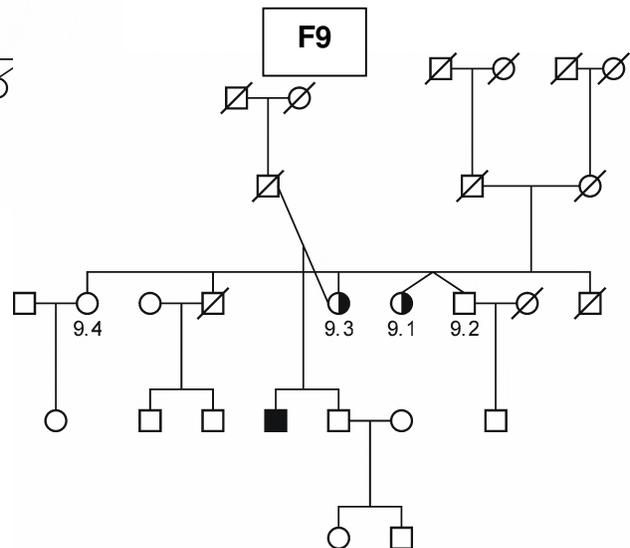
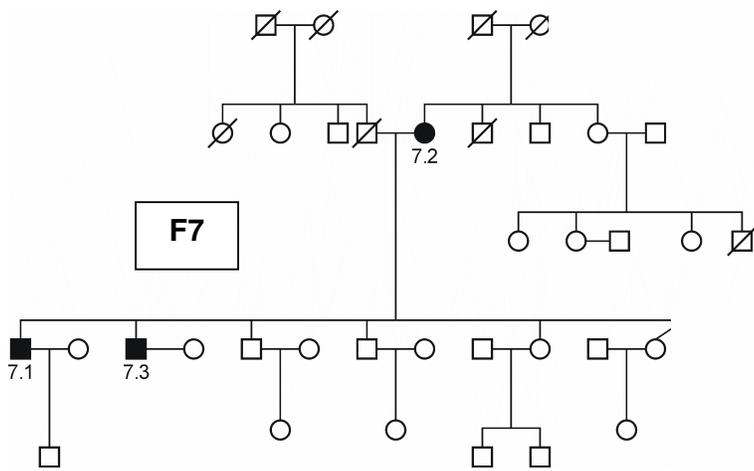
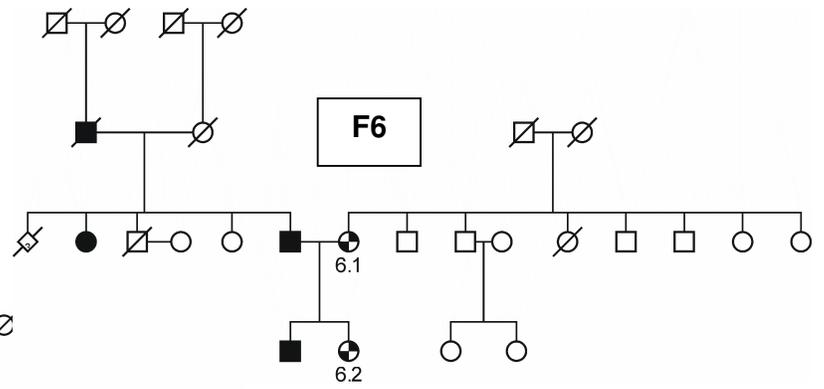
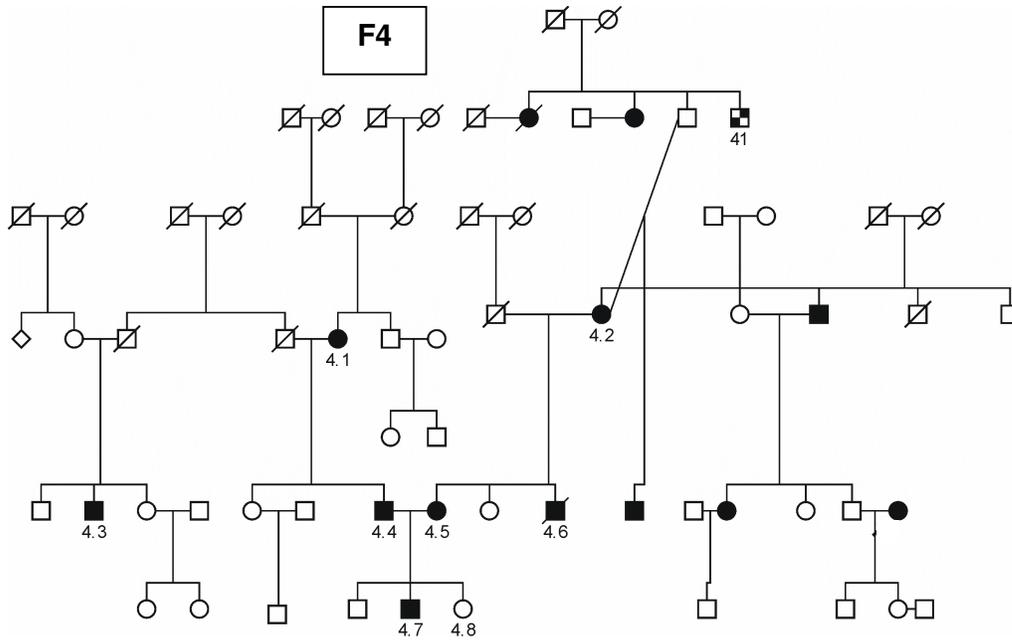
Tao R, Li C, Zheng Y, Qin W, Zhang J, Li X, Xu Y, Shi YY, Feng G, He L. Positive association between SIAT8B and schizophrenia in the Chinese Han population. *Schizophr Res*. 2007 Feb;90(1-3):108-14.

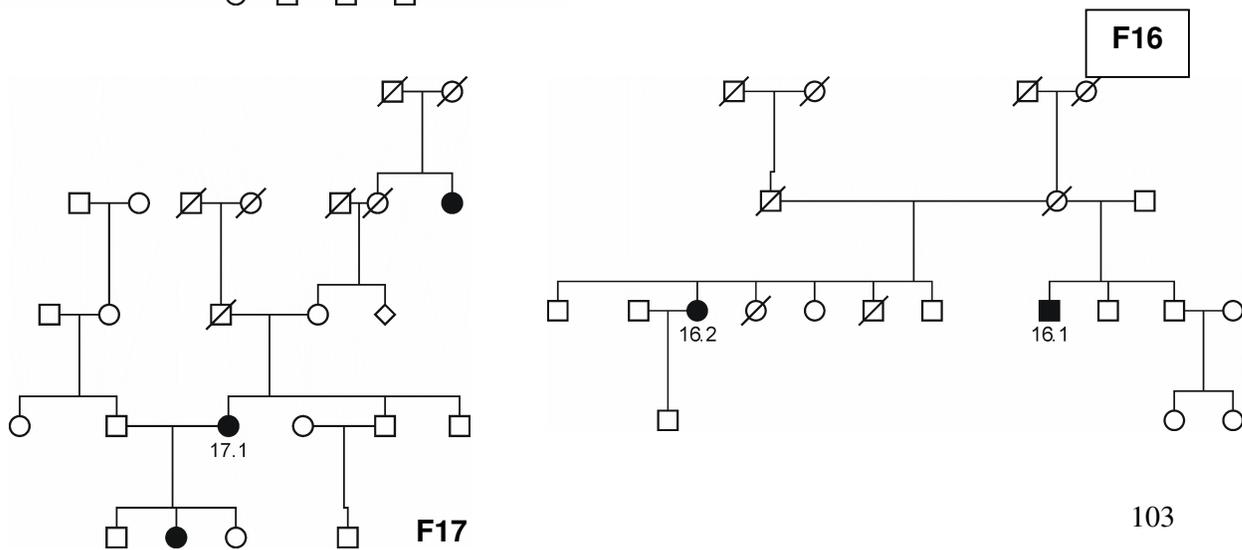
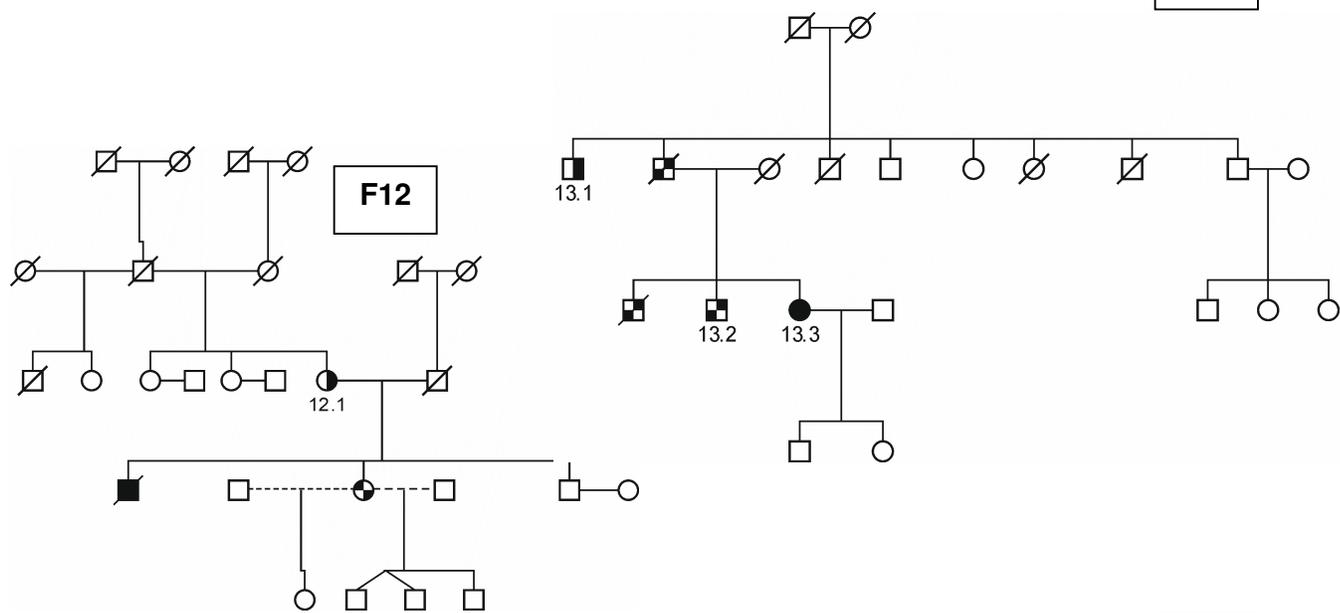
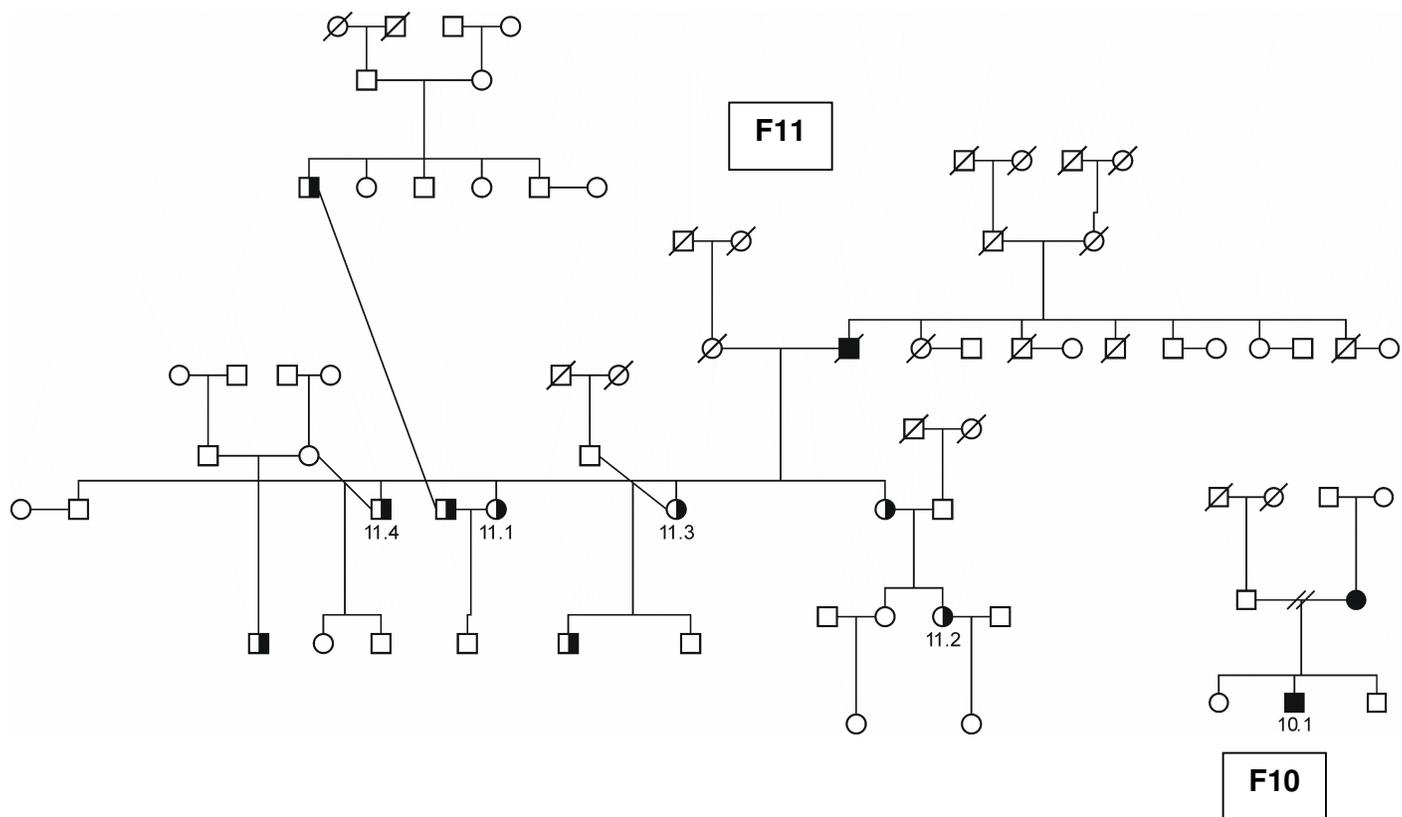
APPENDICE A: ALBERI GENEALOGICI

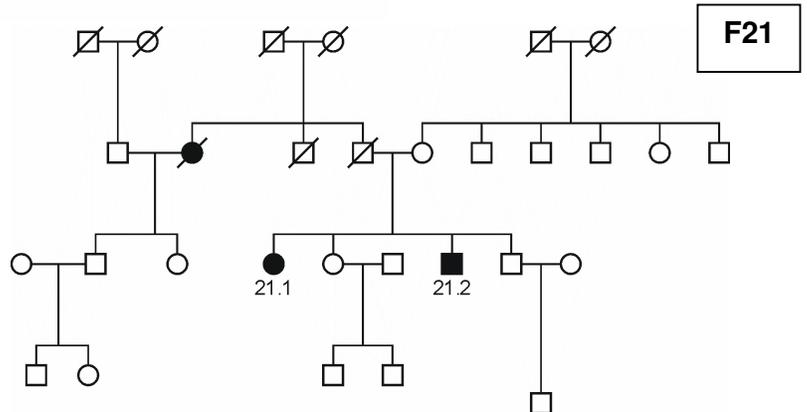
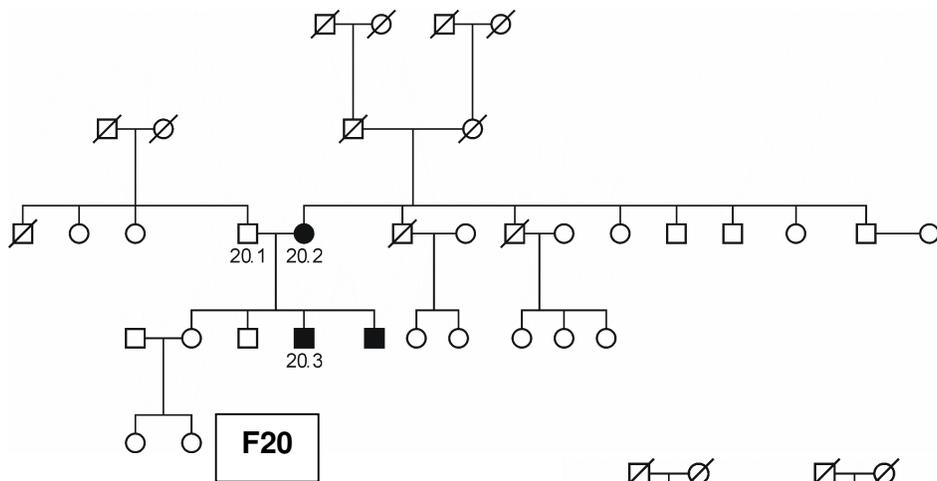
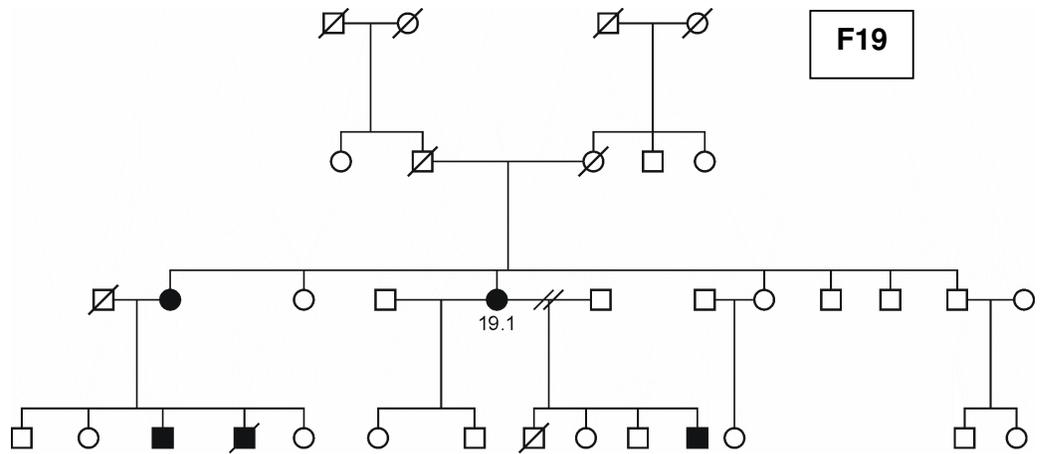
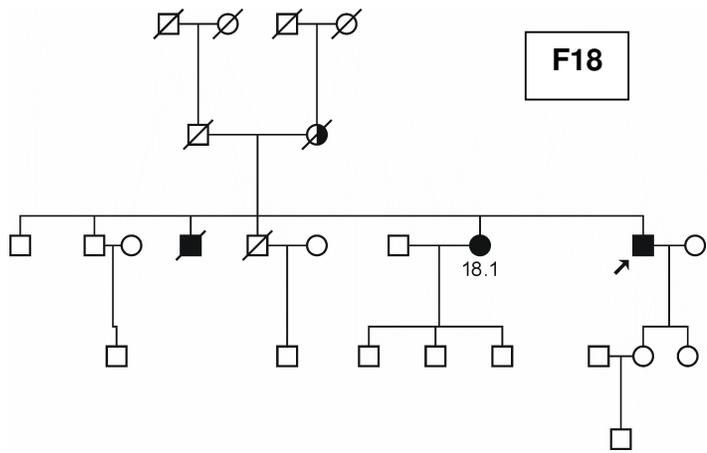


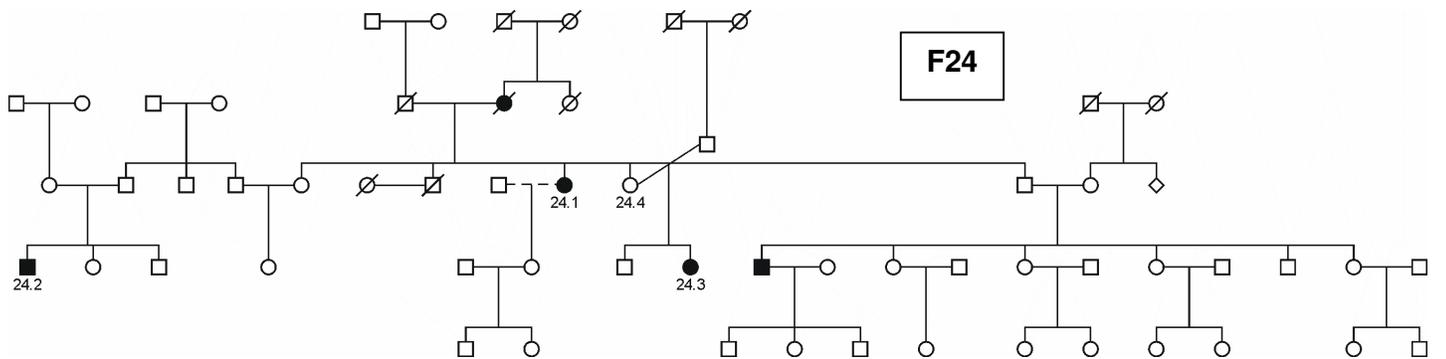
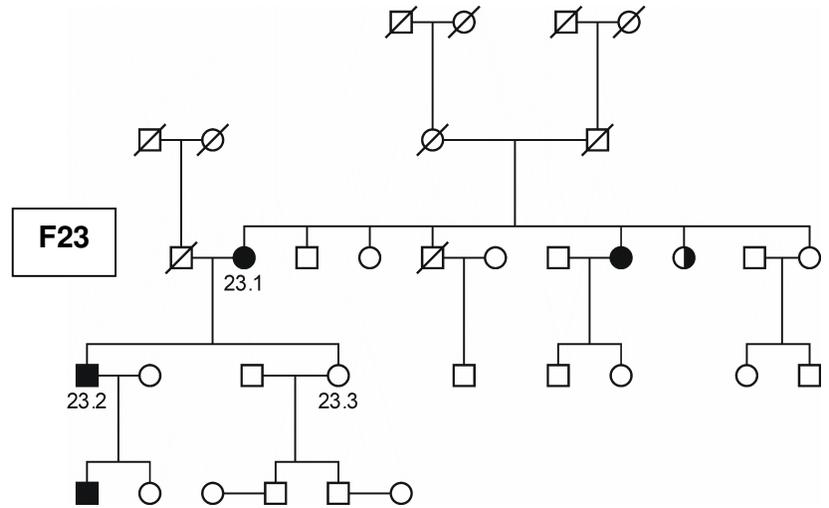
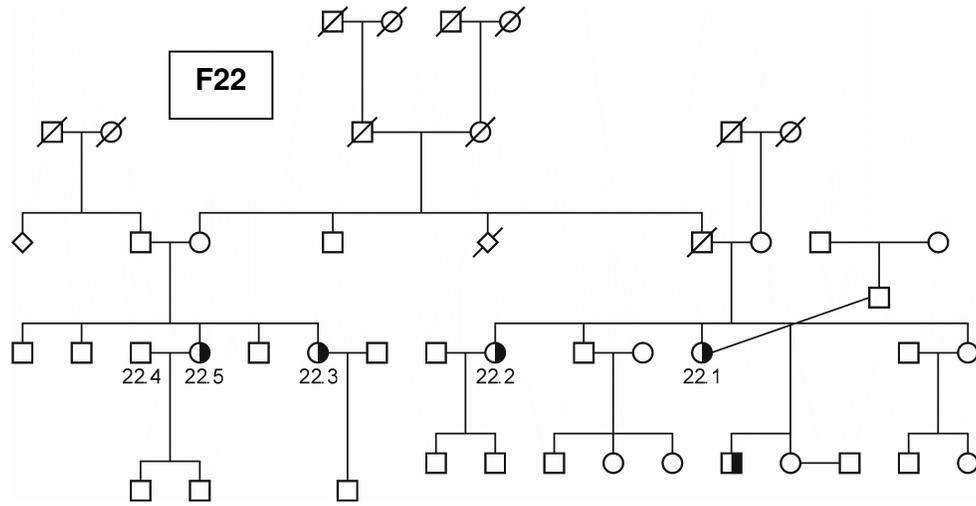
- Legenda:**
- Non affetto
 - Disturbi dello spettro schizofrenico
 - ◼ Disturbi dello spettro bipolare
 - ◻ Disturbo schizoaffective

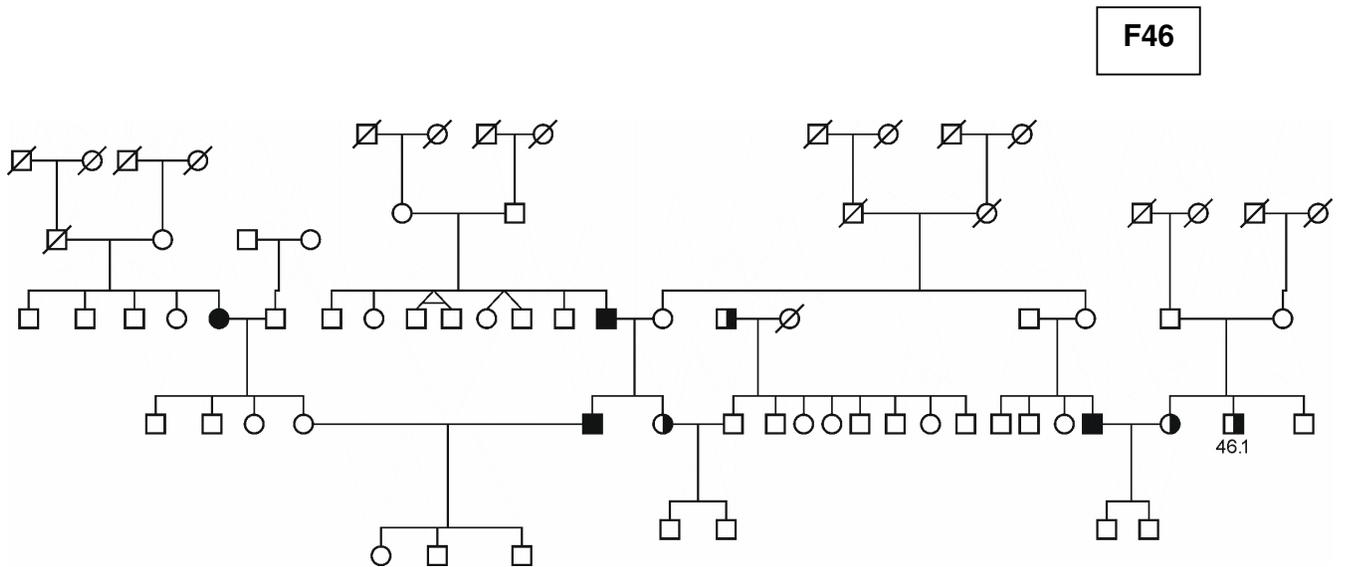
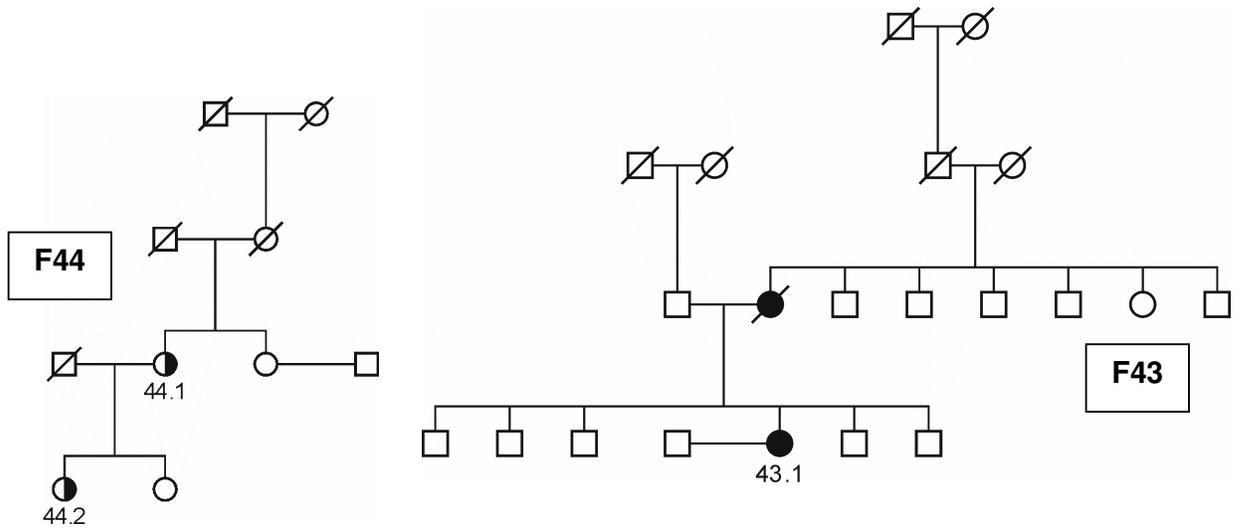
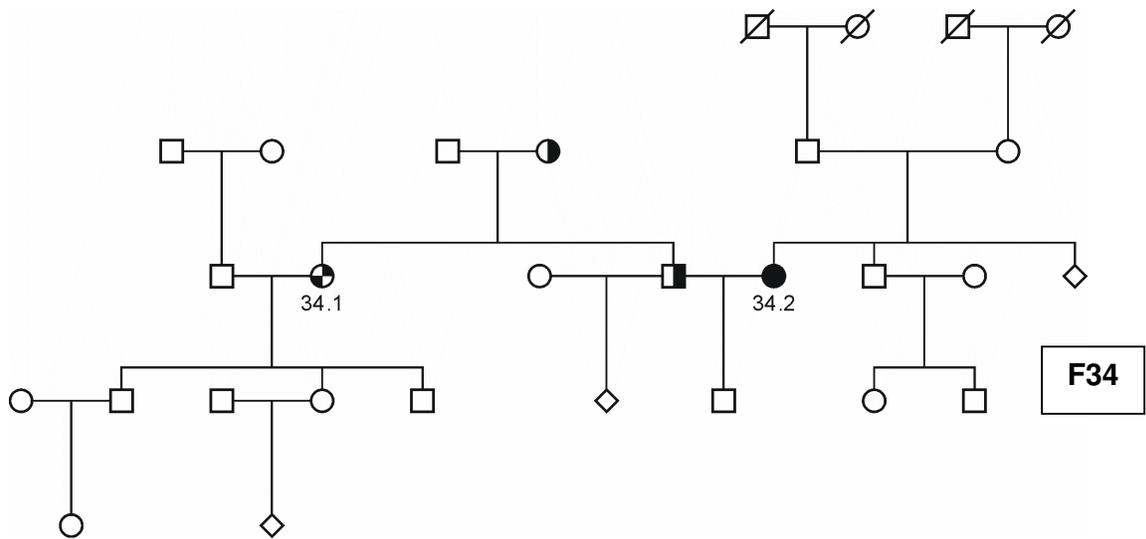


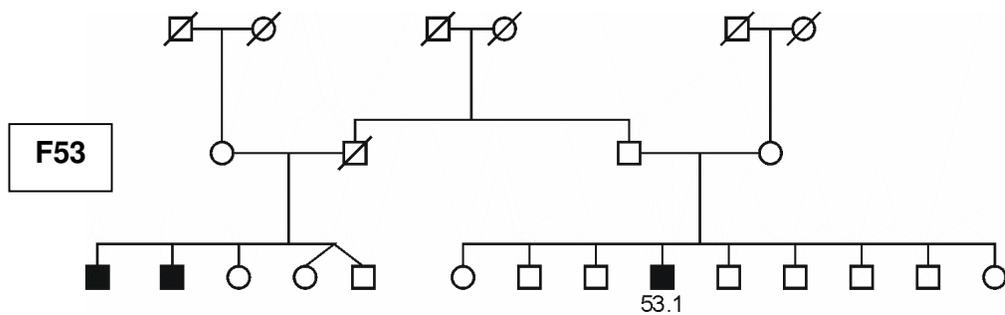
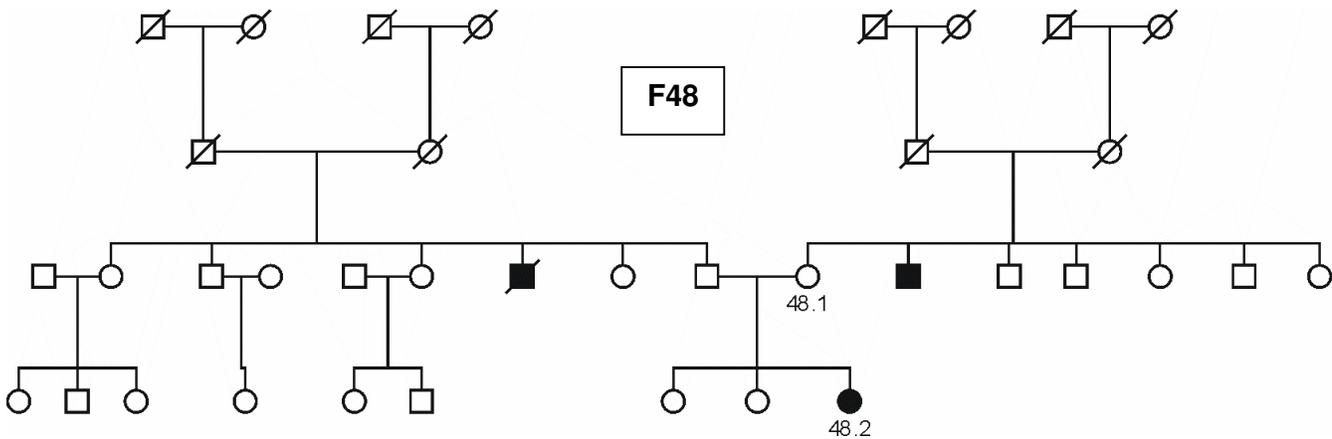
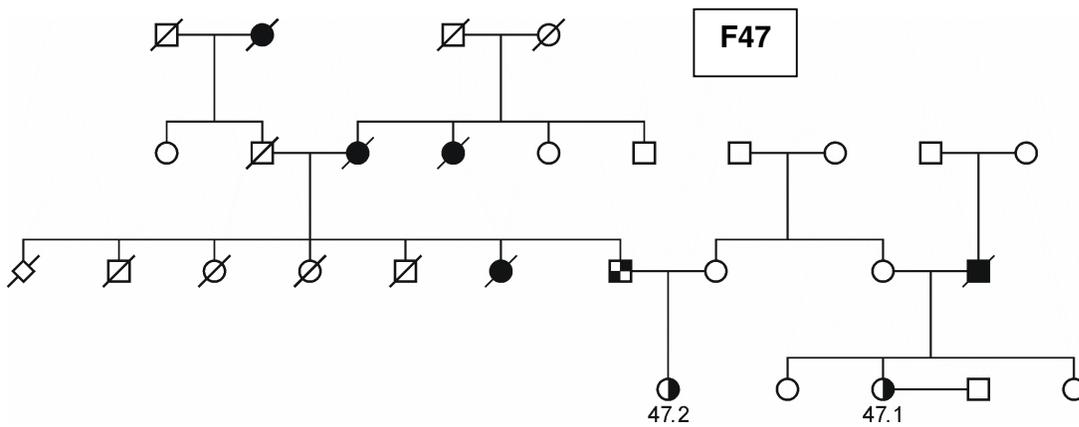
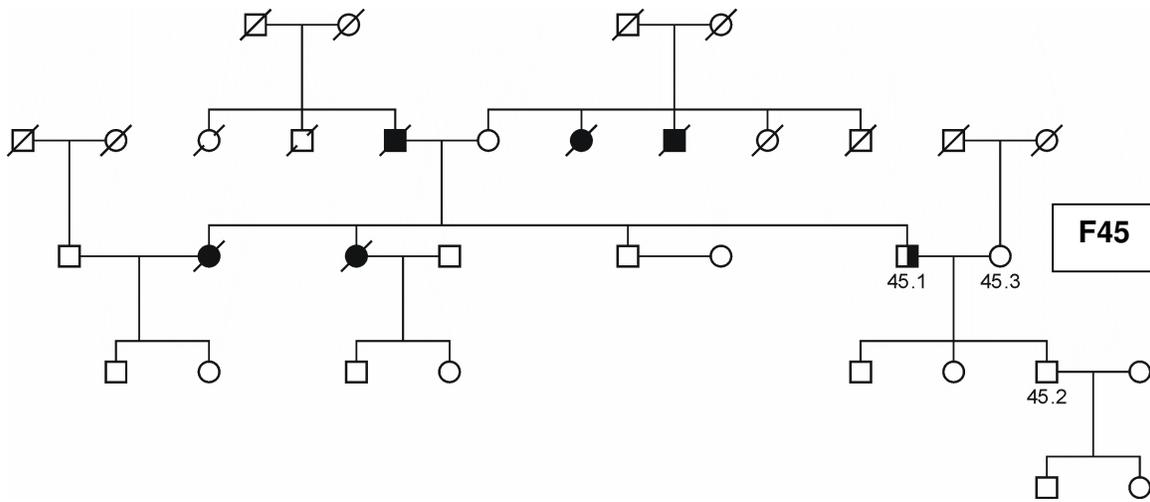


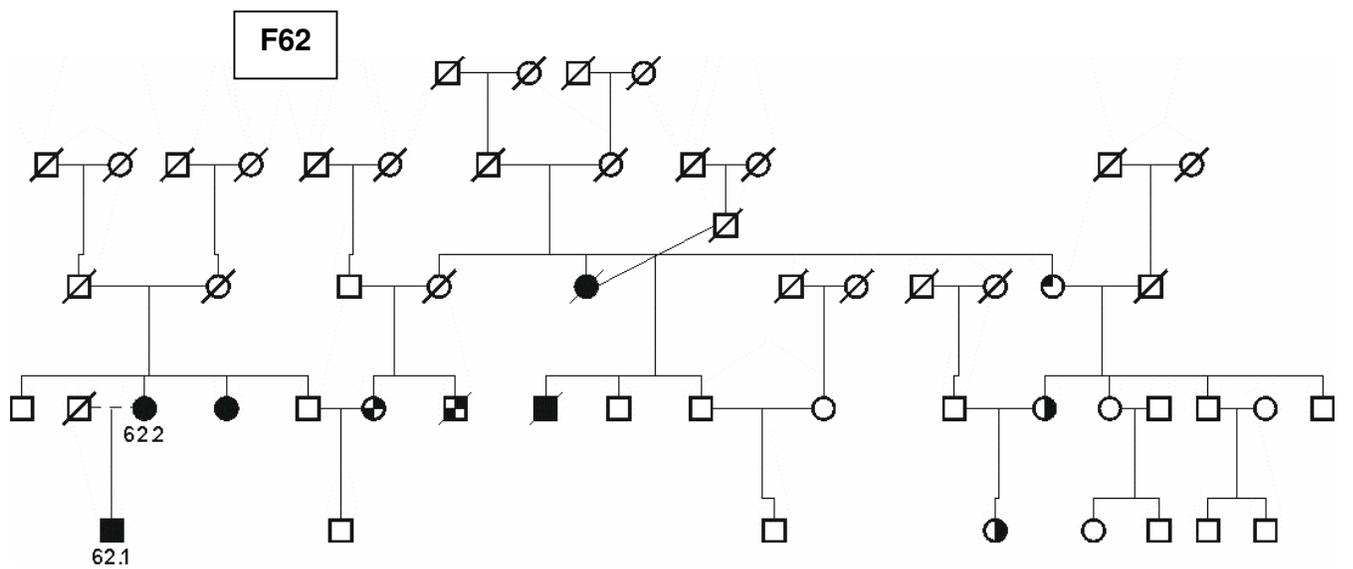
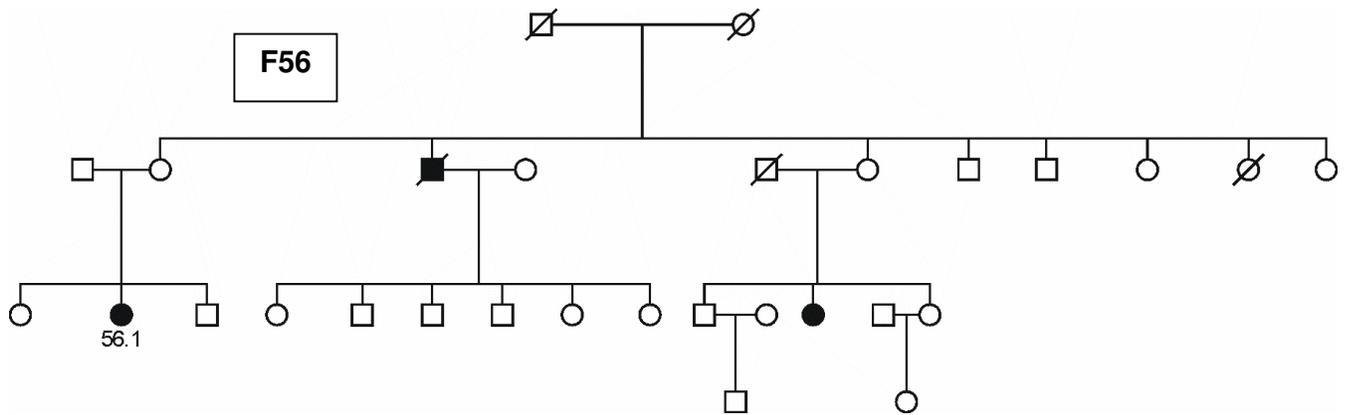
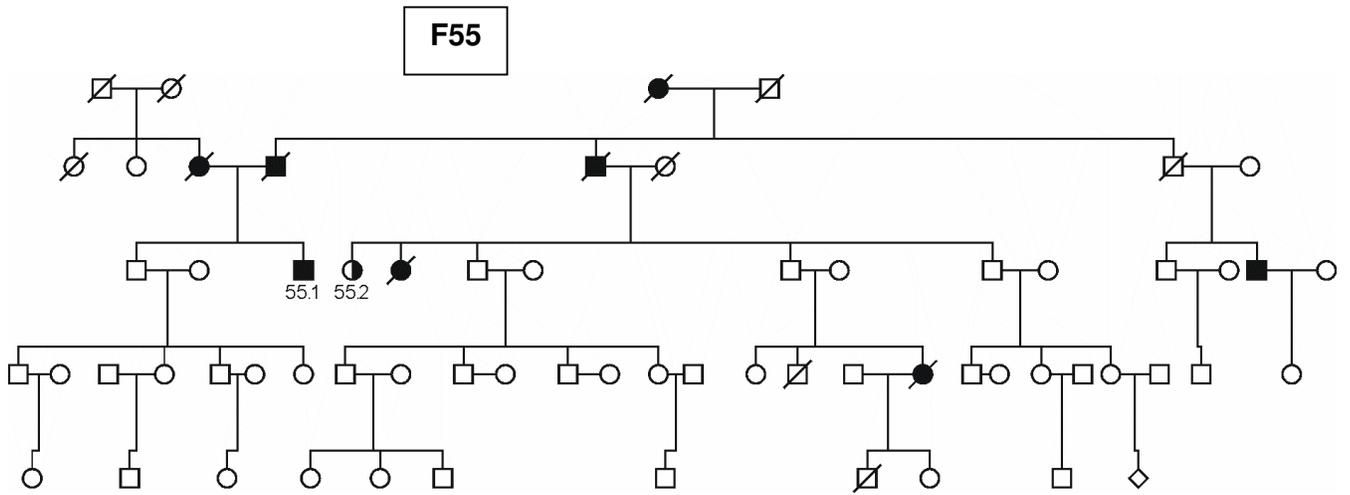


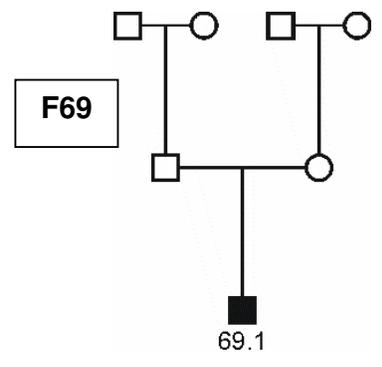
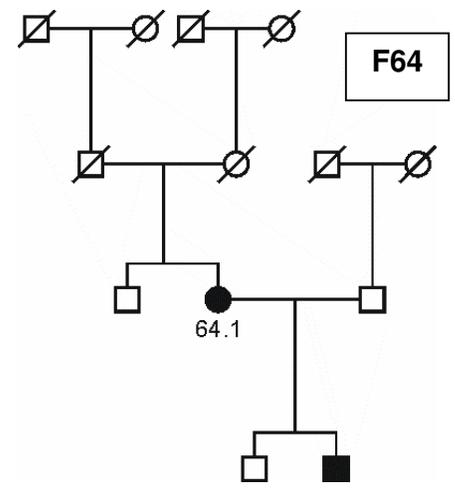
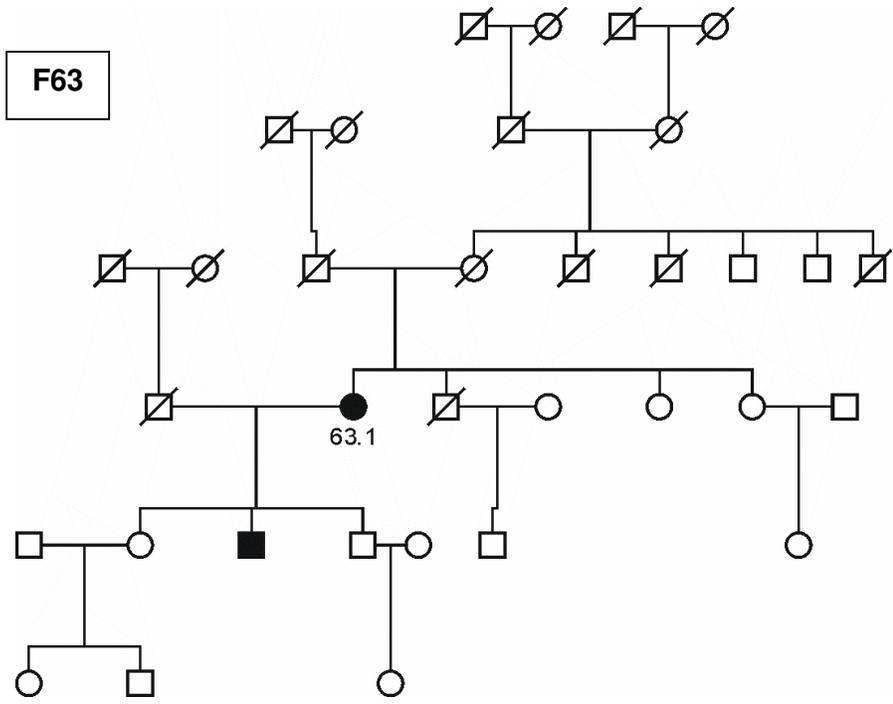












APPENDICE B: PUBBLICAZIONI

Vazza G, **Bertolin C**, Scudellaro E, Vettori A, Boaretto F, Rampinelli S, De Sanctis G, Perini G, Peruzzi P, Mostacciolo ML. Genome-wide scan supports the existence of a susceptibility locus for schizophrenia and bipolar disorder on chromosome 15q26.
Mol Psychiatry. 2007 Jan;12(1):87-93.

Vazza G, Merlini L, **Bertolin C**, Zortea M, Mostacciolo ML. A novel 9-bp insertion in the GJB1 gene causing a mild form of X-linked CMT with late onset.
Neuromuscul Disord. 2006 Dec;16(12):878-81.