

INDICE

1	INTRODUZIONE	3
1.1	Variabilità genetica	3
1.2	Scopo del progetto	4
2	LESIONI CRONICHE E ULCERE VENOSE	5
2.1	Fisiopatologia	6
2.1.1	Eziopatogenesi	9
2.1.2	Diagnosi e Trattamenti	9
2.2	Basi molecolari	10
2.2.1	Il gene dell'HFE	12
2.2.2	Il gene della Ferroportina	14
2.2.3	Il gene del Fattore XIII della coagulazione	16
2.2.4	Il gene della Metalloproteasi 12	18
3	STRUMENTI PER LA GENOTIPIZZAZIONE: NANOGEN® WORKSTATION	20
3.1	Descrizione della strumentazione	22
3.2	PCR primer set, stabilizer e probe design	23
3.3	Preparazione dei campioni	25
3.4	Adressing su microchip	25
3.5	Ibridazione della cartridge e rivelazione della fluorescenza	26
3.6	Analisi dei dati	27
4	MATERIALI E METODI	29

4.1	Descrizione dei casi e dei controlli	29
4.1.1	Pazienti con Ulcere venose	29
4.1.2	Gruppo dei controlli	30
4.2	Estrazione del DNA e condizioni di PCR	31
4.3	Genotipizzazione	32
4.3.1	Genotipizzazione mediante piattaforma Nanogen Workstation	32
4.3.2	Genotipizzazione di conferma mediante RLFP	34
4.4	Analisi Statistica	35
5	RISULTATI	36
5.1	Variabilità genetica e ulcere venose	36
	Valutazione del rischio di sviluppare una lesione	36
5.1.1	HFE C282Y e H63D	36
5.1.2	FPN1 -8CG	38
5.1.3	MMP12 -82AG	39
5.1.4	FXIII V34L	39
6	ASSOCIAZIONE TRA GENOTIPI E DIMENSIONE DELLA LESIONE	39
6.1	FXIII V34L	39
6.2	MMP12 -82AG	40
6.3	FPN1 -8CG	41
6.4	Analisi Combinata	42
7	Approccio investigativo alla valutazione clinica di pazienti con CVI mediante analisi molecolare	43
8	DISCUSSIONE	44
9	CONCLUSIONI	49
10	BIBIOLGRAFIA	51

1 Introduzione

1.1 Variabilità genetica

La variabilità di sequenza è un elemento ricorrente nel genoma, ed uno degli obiettivi primari di tutti i genetisti è quello di correlare le variazioni fenotipiche a specifiche variazioni nella sequenza del DNA. Il genoma umano non è un'unica sequenza di basi ripetute, ma piuttosto l'insieme di numerose variazioni di un tema comune, ognuna delle quali può alterare l'assetto molecolare del prodotto genico ereditato e causare differenze fenotipiche specifiche. Le variazioni geniche nell'uomo sono estese ed inevitabili, si generano mediante mutazione del DNA e vengono fissate (se ritenute vantaggiose) nel tempo mediante processi biologici, demografici e storici. In particolare le variazioni geniche che sono sopravvissute nel corso delle generazioni, non sono casuali, ma sono state modellate dalla selezione naturale secondo il criterio del vantaggio competitivo. Solo una piccola parte di tutta la variabilità generata nell'evoluzione dell'uomo, generazione dopo generazione, rimane oggi a noi e ha un impatto notevole sul fenotipo normale e patologico (*Risch, 1996; Collins, 1997*).

Le più comuni variazioni geniche nell'uomo sono *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), inserzione o delezione di alcuni nucleotidi e variazioni nel numero di ripetizioni di brevi sequenze (mini- e micro-satelliti). L'obiettivo più arduo nell'evoluzione tecnologica degli ultimi anni è stato quello di sviluppare metodi efficaci, rapidi, affidabili ed a basso costo per l'identificazione e la classificazione di tutti i tipi di variazioni genetiche nell'uomo per utilizzare tali preziose informazioni nel campo della farmacogenetica/genomica.

1.2 Scopo del progetto

Lo scopo principale di questo progetto è quello di identificare geni coinvolti nella comparsa di lesioni croniche a livello degli arti inferiori e come varianti geniche funzionali possano influire sui processi di comparsa, progressione e guarigione della lesione stessa.

A tale scopo abbiamo considerato geni coinvolti nel processo coagulativo nella deposizione/rimodellamento della matrice extracellulare (ECM), nell'omeostasi del ferro e ne abbiamo studiato le più comuni varianti geniche.

L'identificazione dei genotipi è stata ottenuta mediante la piattaforma Nanogen® Workstation lavorando su *array* elettronici. Le frequenze alleliche dei polimorfismi individuati in pazienti affetti da ulcere venose degli arti inferiori, sono state successivamente stratificate e correlate con parametri clinici quali l'età di insorgenza della patologia, la gravità della malattia, la dimensione della lesione e la risposta alle terapie convenzionali in termini di tempi medi di guarigione della lesione al fine di identificare varianti geniche o combinazioni delle stesse coinvolte in senso protettivo o di rischio con il parametro clinico specifico.

Il secondo obiettivo della presente tesi è la realizzazione di un DNA-Array che includa quei polimorfismi genici con associazioni significative in qualsiasi processo della complessa eziopatogenesi della malattia in studio al fine di creare uno strumento diagnostico-molecolare per l'identificazione in anticipo di pazienti a rischio di lesioni croniche di origine vascolare. In pratica l'identificazione di marcatori molecolari con significativo ruolo prognostico.

2 Lesioni croniche e ulcere venose

Le ulcere venose (VLU) sono una manifestazione clinica severa dell'insufficienza venosa cronica (CVI). Quest'ultima è responsabile del circa 70% delle VLU degli arti inferiori. Altre cause circostanziali/ambientali sono significativamente associate, quali l'insufficienza arteriosa, il diabete mellito, l'artrite reumatoide, i traumi, le vasculiti e i tumori della pelle. Le "vene varicose", le "ulcere gravitazionali" e le "ulcere ipostatiche" sono spesso usate come sinonimi di ulcere venose.

La prevalenza delle VLU varia sensibilmente in funzione dell'etnia, dell'età, del sesso e di fattori ambientali o altre patologie concomitanti. Inoltre il 3-5% dei pazienti non hanno cause di ulcerazione ben definibili essendo questa una patologia multifattoriale con probabile componente ereditaria. L'impatto della patologia sul paziente è molto importante. La qualità di vita del soggetto affetto è direttamente compromessa in relazione al tempo speso per visite, ricoveri e giorni di lavoro persi fino ad arrivare nei casi più estremi al licenziamento. Rimane quindi un problema di salute e socio-economico di notevole importanza considerando poi che è molto comune nella popolazione lavorativamente attiva.

La sua elevata prevalenza ed il rilevante impatto socio-economico in termini di spesa per la sanità, e ridotta qualità della vita (*Fernandes Abbade, 2005*) sono aspetti importanti spesso sottovalutati definendo tale patologia come 'orfana' di trattamenti elettivi. Interventi terapeutici a lungo termine sono per lo più necessari per guarire e le recidive sono comuni con valori di percentuale tra il 54 e 78%. In Europa e negli USA, dove la prevalenza media è dell'1%, si stima una spesa di 1 miliardo di dollari l'anno, mentre nel Regno Unito circa il 14% delle spese sanitarie sono destinate alla loro cura.

2.1 Fisiopatologia

La guarigione delle ferite è un complesso processo multifasico composto da una serie di *steps* che si susseguono e sovrappongono tra loro: emostasi, infiammazione, angiogenesi, deposizione della ECM ed epitelizzazione (Singer, 1999). Il processo di riparazione delle lesioni è mediato da una cascata di segnali molecolari, primi tra questi le citochine ed i fattori di crescita, in grado di coordinare e regolare temporalmente le attività cellulari connesse con l'infiammazione, la proliferazione cellulare e la definitiva riparazione della ferita. Le VLU sono il frutto di un forte disequilibrio di una bilancia tra fattori che regolano il normale processo di guarigione e per questo motivo sono spesso utili per capire e decifrare il sottostante complicato processo fisiopatologico.

La pelle è un organo complesso composto da una varietà di tipi cellulari, immersi in una altrettanto complessa ed eterogenea ECM in continua proliferazione e differenziamento. Tali processi risultano essenziali sia per il naturale rinnovamento della pelle che come fisiologica risposta ai continui insulti ambientali. Quando la pressione venosa aumenta a causa di eventi primari o secondari, le cellule endoteliali sono le prime a percepirla giocando quindi un ruolo chiave nella successiva reazione infiammatoria. Nella CVI, lo *step* iniziale di infiammazione è probabilmente indotto da una alterazione emodinamica permanente. Aumenta successivamente il rilascio di fattori con funzione chemiotattica verso le cellule antinfiammatorie. Tutto porta ad un incremento di espressione delle molecole di adesione dei leucociti (Scott *et al*, 1991), al richiamo di macrofagi ed al reclutamento e proliferazione di cellule mesenchimali con successivo rimodellamento della ECM neosintetizzata. Un'incapacità del tessuto lesso di risolvere, controllare o modulare il processo infiammatorio porta all'ulcerazione del tessuto. Di contro, un'incontrollata deposizione della ECM causata dal *pathway* aberrante di citochine porta alla formazione di placche fibrotiche o sclerotiche (lipodermatosclerosi).

Fisiologia della guarigione delle ulcere

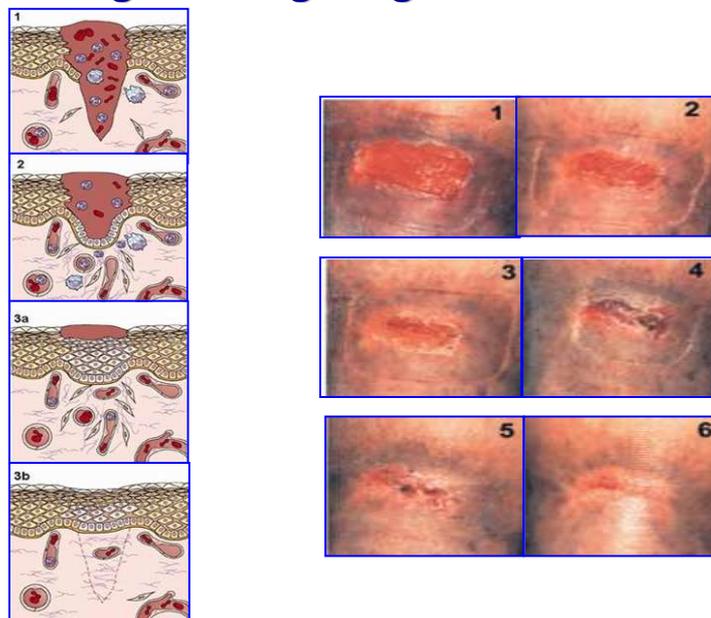


Fig 1. Normale processo nella guarigione di una lesione.

Fase infiammatoria: la componente iniziale della fase infiammatoria è l'emostasi che si verifica in seguito all'ulcerazione. Essa è causa della formazione di microcoaguli e del movimento di cellule infiammatorie all'interno del sito ulcerato. In ogni ferita l'adesione, l'aggregazione e la degranolazione delle piastrine e la formazione del coagulo di fibrina causano il rilascio di una varietà di mediatori, citochine e fattori di crescita piastrine-derivati (PDGF, VEGF, TGF- β , FXIII).

Angiogenesi e fase proliferativa: la fase di infiammazione confluisce nella fase proliferativa durante la quale il tessuto perso viene sostituito da tessuto neo formato. Si sviluppano nuove gemme epiteliali e la fibroplasia assicura che si formi una rete di nuovo tessuto connettivo. Il tessuto di granulazione risultante è quindi composto da cellule infiammatorie, fibroblasti, miofibroblasti, dendrociti e nuovi vasi sanguigni. L'angiogenesi in questo contesto è fortemente stimolata dalle condizioni di ipossia, presenza di ossido nitrico, fattori di crescita di fibroblasti e da chemochine e proteine infiammatorie dei macrofagi (Conway, 2001). Recentemente straordinarie proprietà proangiogeniche sono state attribuite al Fattore XIII della coagulazione (Dardik, 2003; Dardik, 2006).

Ri-epitelizzazione: nel giro di qualche ora le cellule epiteliali iniziano a proliferare, a migrare e a coprire l'area esposta, così da ricostruire l'integrità funzionale del tessuto. Cheratinociti immaturi producono metalloproteinasi di matrice (MMPs) e plasmina per staccarsi dalla membrana basale e facilitare così la loro stessa migrazione attraverso il letto della ferita aperta in risposta a chemoattrattori. Anche gli inibitori tissutali delle MMPs (TIMPs) svolgono un ruolo chiave nel rimodellamento finale della cicatrice.

Produzione della ECM e formazione della cicatrice: come evoluzione della fase di ri-epitelizzazione e con la generazione di nuovi vasi si ha la migrazione delle cellule che generano la ECM all'interno del tessuto di granulazione. I fibroblasti nei dintorni dell'ulcera iniziano a proliferare e dopo un certo periodo di latenza dall'insorgenza del danno, iniziano a migrare nella ECM dove si insediano e rimodellano la matrice. Essi producono elevate quantità di MMPs e TIMPs che degradano la matrice provvisoria (*Ravanti, 2000*). I fibroblasti, sotto lo stimolo di citochine e fattori di crescita, producono e sintetizzano altra matrice per sostituire il tessuto danneggiato con quello cicatriziale.

Fase di rimodellamento: anche questa fase è in parte mediata dall'azione delle citochine sintetizzate in base alla risposta infiammatoria locale. Inoltre, durante la fase di rimodellamento si producono collagene ed altri importanti costituenti della ECM, degradati e riorganizzati secondo programmi dettagliati governati dal delicato equilibrio tra MMPs e TIMPs (*Birkedal-Hansen, 1995*). Qualsiasi disequilibrio tra questi enzimi può portare o ad un eccesso o ad una insufficiente degradazione/deposizione di ECM sconfinando in un fenomeno patologico spesso riscontrato nelle lipodermatosclerosi e nelle ulcere (*Vaalamo, 1996; Weckroth, 1996*).

2.1.1 Eziopatogenesi

L'eziopatogenesi delle ulcere venose è direttamente correlata alle anomalie circolatorie proprie della CVI, principalmente causata da disfunzione della pompa muscolare della cava che causa stasi, reflusso ed ipertensione venosa. Tale pompa muscolare è il meccanismo primario del ritorno venoso dagli arti inferiori al cuore (*Gross, 1993*).

La disfunzione della pompa può verificarsi prevalentemente in seguito ad una insufficienza venosa profonda (primaria o post-trombotica) (*Zimmet, 1999*).

Sono state elaborate numerose teorie sulle patogenesi delle ulcere venose. La più antica si basava sulla stasi venosa e lo *shunt* arterio-venoso. Una teoria successiva invece considerava l'ipossia tessutale la principale causa fisiologica ed infine le speculazioni più recenti sostengono il processo infiammatorio (*Fernandes Abbade, 2005*). Nonostante le numerose ipotesi proposte, il reale meccanismo di sviluppo è ancora sconosciuto e l'eziopatogenesi è ancora oggetto di intenso studio.

2.1.2 Diagnosi e trattamenti

L'ulcera venosa è una lesione dalla forma irregolare, inizialmente superficiale, ma con tendenza a diventare profonda e con bordi ben definiti. La pelle circostante risulta eritromatosa o iperpigmentata con un variabile grado di indurimento (lipodermatosclerosi acuta o cronica). Solitamente è osservabile anche un essudato giallastro contenente siero e fibrina. Dimensione e localizzazione variano, anche se solitamente si localizza nella posizione distale degli arti inferiori.

Possono essere classificate in base al grado di gravità in 6 classi CEAP:

- Classe C1: presenza di telangiectasie e vene reticolari
- Classe C2: vene varicose
- Classe C3: edema
- Classe C4: alterazioni cutanee dovute a disordini venosi (iperpigmentazione, eczema, lipodermatosclerosi)

- Classe C5: alterazioni cutanee e ulcere cicatrizzate
- Classe C6: alterazioni cutanee e ulcere attive

La classificazione si completa con i simbolo *A* per asintomatiche o *S* per sintomatiche. Le ulcere si definiscono sintomatiche, quando si ha la presenza di dolore, crampi muscolari e prurito. La classificazione eziologica invece, divide le ulcere venose in tre categorie: congenite, primarie (senza nessuna causa identificabile) e secondarie (causate da eventi trombotici o traumatici). Le maggiori complicazioni delle ulcere croniche sono le osteomieliti e raramente le trasformazioni neoplastiche.

I trattamenti elettivi che si usano nella cura delle ulcere, mirano soprattutto a guarire la lesione e ad evitare le recidive. La cura della ferita è molto importante, così come la rimozione chirurgica delle cuffie di fibrina e dei tessuti devitalizzati alla base o ai bordi dell'ulcera. Tale procedura chirurgica riduce il rischio di infezione e favorisce la guarigione. Dopo la guarigione è essenziale prevenire la recidiva che nel 30% dei pazienti avviene nel primo anno e nel 78% nel secondo anno (*Mayer, 1994*) qualora il trattamento non sia appropriato. Le principali misure adottate per evitare le complicanze più frequenti sono una ottimale pratica chirurgica per eliminare o attenuare l'elevata pressione venosa nell'area ulcerata e l'uso delle calze elastiche associate ad una buona terapia fisica riabilitativa.

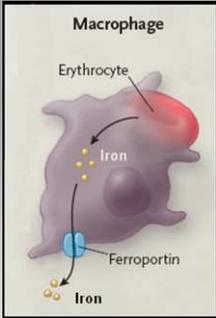
2.2 Basi molecolari

In accordo con le recenti ipotesi, la formazione di lesioni croniche include un complesso processo *multisteps* che parte dall'ipertensione e dalla stasi venosa portando poi all'apertura della lesione cutanea. Tutto ciò avviene in combinazione con una serie di fattori di rischio e altre patologie concomitanti, che promuovono lo stress ossidativo cellulare favorendo la degenerazione tessutale. Una peculiarità delle VLU è la degradazione incontrollata della ECM causata da una sfrenata espressione delle MMPs (MMP-1, MMP-2 e MMP-9) non opportunamente controbilanciata da una adeguata attività degli inibitori TIMPs. Inoltre un cronico e costante sovraccarico di

ferro interstiziale, tipico delle CVI, è fortemente responsabile dell'attivazione delle stesse MMPs così come dell'aumentato potenziale ossidativo nei fluidi interstiziali che circondano la lesione, sito principale in cui la risposta infiammatoria ha inizio.

La suscettibilità individuale in questa patologia è ampia e senza dubbio la familiarità e l'etnia hanno un ruolo chiave nella comparsa, nella progressione e nella risposta al trattamento delle VLU. Tutto questo suggerisce il coinvolgimento di geni peculiari non ancora completamente identificati.

Local iron overload
clinical evidences...



Il **macrofago** accumula il ferro degli eritrociti senescenti ed il suo rilascio è **ferroportina** mediato

L'**epcidina** regola il rilascio del ferro ferroportina mediato

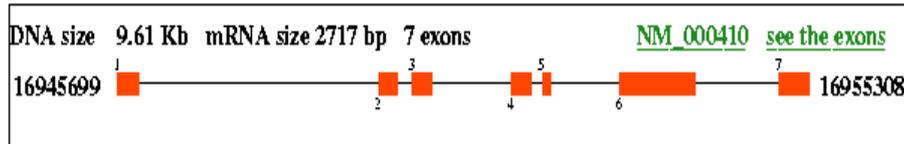
L'**HFE** modula l'attività dell'**epcidina**



..severe complication of CVI..

Fig 2. Il ruolo del macrofago nel sovraccarico locale di ferro.

Il gene dell'HFE



Gene	HFE	Variant 1
DNA :	9.61 Kb	NT_007592
mRNA :	2717 bp	NM_000410
CDS :	1932 bp	NP_000401

Il gene dell'HFE (*High Iron, Fe; HFE; locus 6p21.3*) codifica per una proteina di membrana simile alle proteine del MHC di classe-I. E' in grado di legare la β_2 -microglobulina, evento necessario per la sua espressione sulla superficie cellulare e delle membrane endosomiali. L'HFE è in grado di interagire con il recettore della transferrina di tipo 1 (TfR-1) (*Gross, 1998*) e difetti al suo interno anche lievi causano effetti deleteri sull'omeostasi del ferro. La variante HFE C282Y, distrugge uno dei ponti disolfuro della molecola compromettendo il proprio legame con la β_2 -microglobulina (*Waheed, 1997*). Questo ostacola una corretta interazione dell'HFE con il TfR-1. Inoltre anche l'azione dell'epcidina (HEPC), il principale ormone coinvolto nella omeostasi del ferro, è modulata da HFE, che a sua volta regola la quantità di ferro rilasciato, ferroportina-mediato, ad opera dei macrofagi, degli epatociti e degli enterociti nel circolo ematico (*Fleming, 2005*). Tutti i soggetti omozigoti per C282Y sono geneticamente predisposti ad un sovraccarico di ferro che può depositarsi in diversi tessuti e organi causando danni e patologie specifiche.

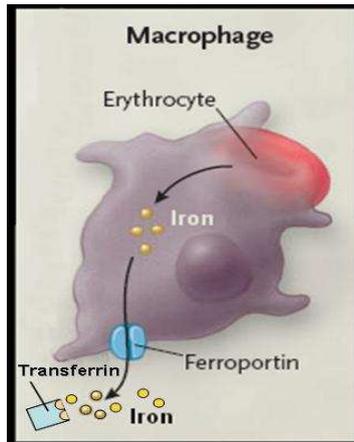


Fig 3. Un macrofago nell'atto di fagocitare un globulo rosso. Ferroportine e Transferrina in basso.

Il nostro gruppo ha effettuato studi sulle due più comuni varianti geniche dell'HFE, nello specifico la variante C282Y e H63D, in pazienti affetti da CVI primaria. Questi polimorfismi sono ben caratterizzati e il loro ruolo nell'emocromatosi è ben documentato attribuendo un ruolo patologico prevalentemente alla condizione di omozigosi (*Pietrangelo, 2004*). Gli studi effettuati dal nostro gruppo hanno dimostrato come tali varianti siano associate ad un aumentato rischio di sviluppo di ulcerazioni venose agli arti inferiori con CVI anche in condizione di eterozigosi (*Zamboni et al, 2005*). Il gene HFE C282Y esprime un recettore di membrane difettoso che altera l'omeostasi del ferro creando un sovraccarico locale a livello dei macrofagi localizzati nella lesione (*Zamboni et al, 2006*). Questa osservazione ci ha permesso di speculare l'ipotesi che un'aumentata concentrazione di ferro libero locale e la concomitante generazione di radicali liberi possano indurre una eccessiva degradazione ferro-mediata della ECM a causa delle MMPs con successiva formazione della lesione.

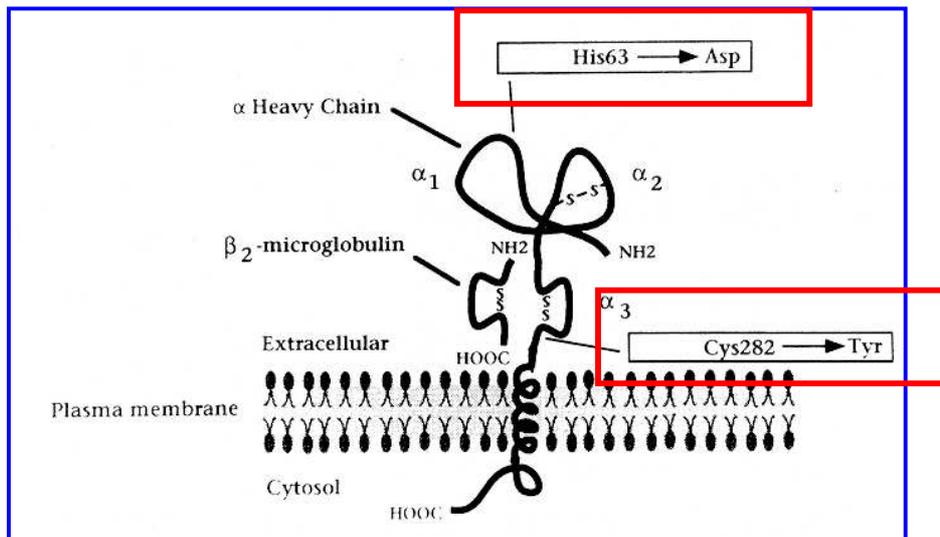
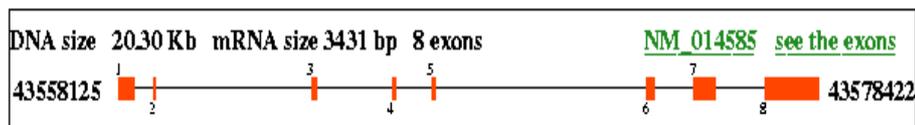


Fig 4. Il recettore HFE e i due più comuni difetti molecolari.

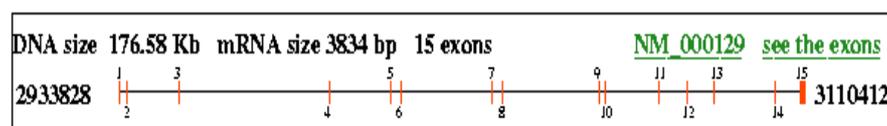
2.2.1 Il gene della Ferroportina



Gene	SLC40A1	Variant 1
DNA :	20.30 Kb	NT_005403
mRNA :	3431 bp	NM_014585
CDS :	1716 bp	NP_055400

Il gene della Ferroportina (*FPN1*; locus 2q32) codifica per una proteina transmembrana ed al contrario delle altre proteine implicate nell'omeostasi del ferro, è l'unica conosciuta responsabile della fuoriuscita di ferro dalla cellula dei mammiferi. (*Dnovan A et al , 200; McKie et al, 2000, Lee P et al,2002*). La *FPN1* è espressa nel macrofago e nelle cellule ciliate dell'intestino. La sua espressione è finemente regolata a differenti livelli. Il suo mRNA contiene nella regione non tradotta 5'-UTR una regione denominata *iron regulatory element* (IRE) che interagisce con particolari

2.2.2 Il gene del Fattore XIII della coagulazione



Gene	F13A1	Variant 1
DNA :	176.58 Kb	NT_034880
mRNA :	3834 bp	NM_000129
CDS :	2199 bp	NP_000120

Il gene del fattore XIII della coagulazione (*FXIII A1*; locus 6p24.2-p23), codifica per una proteina che svolge il suo ruolo principale nelle ultime fasi della cascata coagulativa. Stabilizzando la maglia fibrinica del coagulo, conferisce un'ideale barriera meccanica alla fuoriuscita di sangue in seguito ad una lesione, garantendo così la continuità vasale (Ichinose, 2001; Bereczky, 2003). E' una pro-transglutaminasi presente in circolo sotto forma di tetramero composto da due subunità-A e due subunità-B (A2B2) associate fra loro in modo non covalente. Il sito attivo dell'enzima è presente nella subunità-A, che nella sua forma attivata per taglio proteolitico da parte della trombina (FXIIIa), catalizza la formazione di legami covalenti ϵ -(γ -glutamil)-lisina tra polimeri di fibrina appartenenti a catene proteiche differenti. La subunità FXIIIB, non possiede attività enzimatica, è implicata nella stabilizzazione in circolo della subunità-A nell'ambiente acquoso del plasma umano evitandone una precoce attivazione fungendo in pratica da *carrier*. Il FXIIIa possiede numerosi substrati fisiologici, oltre al suo substrato elettivo la fibrina, tra cui ricordiamo collagene, trombospondina, vitronectina, osteopontina e numerosi altri costituenti della ECM di diversi tessuti. Ciò attribuisce al FXIII differenti e specifici ruoli a livello delle differenti localizzazioni dei specifici substrati considerati.

Il coinvolgimento del FXIII nei processi di guarigione delle ferite e nella riparazione dei tessuti fu segnalato per la prima volta nel 1960 in un *report* di un

paziente che presentava anomala e ritardata guarigione di ferite chirurgiche (Thies, 1967). Esistono pochi studi sull'effetto di bassi livelli di FXIII e guarigione delle ferite, ma nel complesso suggeriscono da una parte che bassi livelli di molecola in circolo possono essere causa di scarsa o anomala guarigione delle lesioni e dall'altra sottolineano l'effetto benefico del FXIII utilizzato come trattamento farmacologico topico sulla guarigione di ferite (Herouy, 2000; Wozniak, 1999; Peschen, 1998).

Alcuni studi recentemente condotti nel nostro laboratorio, riguardanti il possibile coinvolgimento del FXIII nei processi di *wound-healing*, hanno dimostrato in un modello parziale di lesione cronica in vitro, come il FXIII sia in grado di contrastare l'effetto degenerativo delle MMPs in fibroblasti in coltura e favorire così la rigenerazione del monostrato (Zamboni et al, 2004). Inoltre su pazienti affetti da VLU è stata dimostrata una significativa ed inversa associazione tra le dimensioni della lesione ulcera venosa e la variante genica V34L nel gene del FXIII (Gemmati et al, 2004). La sostituzione della Val con una Leu, in posizione 34, strettamente associata al sito di attivazione della trombina [Gly37-Arg38], è responsabile di una maggiore velocità di attivazione del FXIII alterando le proprietà di cross-linking su substrati specifici (Kohler et al, 1998). Esistono altre varianti geniche del FXIII e recenti studi del nostro gruppo hanno associato differenti varianti alleliche a tempi medi più brevi di guarigione delle lesioni (Gemmati et al, 2006).

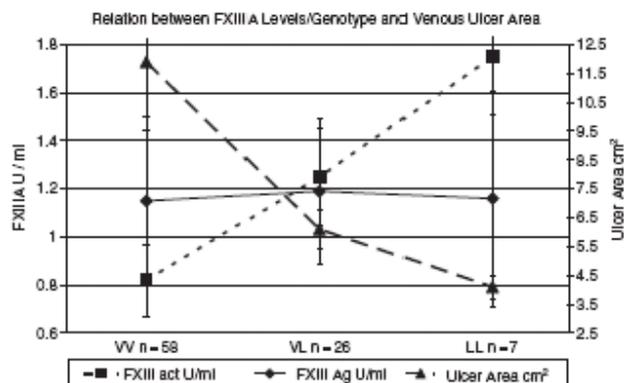
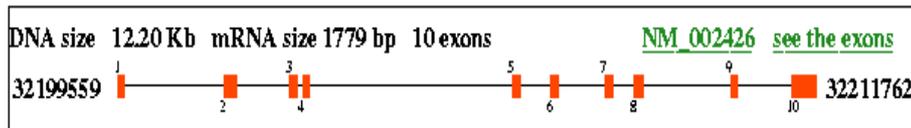


Fig 6. Relazione tra i livelli di fattore XIII, genotipo e le dimensioni dell'ulcera.

2.2.3 Il gene della Metalloproteasi 12



Gene	MMP12	Variant 1
DNA :	12.20 Kb	NT 033899
mRNA :	1779 bp	NM 002426
CDS :	1412 bp	NP 002417

Il gene della Metalloproteasi 12 (*MMP12*; locus *11q22.3*) codifica per una proteina detta anche la Metalloelastasi di matrice. Numerosi substrati della MMP12 sono componenti della ECM. Tra questi ricordiamo il collagene, la fibronectina, la laminina, l'elastina, la vitronectina, oltre al precursore del TNF, e l'angiostatina. E' secreta dal macrofago attivato che grazie alla proteolisi esercitata dalla MMP12 penetra nel tessuto lesso (*Shapiro et al, 1993; Raffetto et al 2008*). La sua sintesi è regolata a livello trascrizionale e post-trascrizionale.

Le MMPs assieme a specifici inibitori (TIMPs) sono implicati nel rimodellamento vascolare e la MMP12 in particolare interviene nei processi di angiogenesi convertendo il plasminogeno ad angiostatina, un potente inibitore dell'angiogenesi.

Il rimodellamento tessutale è un complesso processo multifasico implicato sia in stati fisiologici che patologici legati ai meccanismi propri della guarigione delle ferite, dello sviluppo fetale, dei processi responsabili dell'infiammazione, dell'invasione tumorale e delle metastasi. Un'attività proteolitica generalmente controllata propria di differenti tipi cellulari è una delle caratteristiche peculiari di queste condizioni.

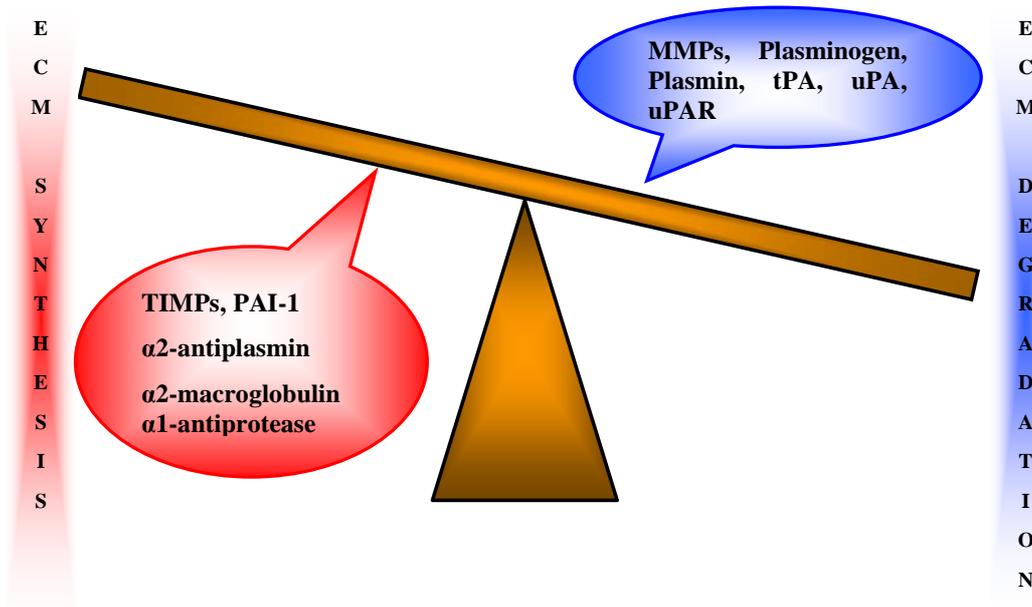


Fig 7. Bilancia tra i principali attori nei processi di sintesi/degradazione della ECM.

L'espressione della MMPs può essere indotta da particolari stimoli come IL-1, TNF- α , PDGF, e EGF che stimolano l'espressione di molte MMPs tramite segnali che dipendono, almeno in parte, da una particolare proteina attivante (AP-1) legante un sito specifico nel promotore delle MMP. Quasi tutte le MMPs contengono questo sito. AP-1 prende parte alla trascrizione basale ed indotta dal promotore. La trascrizione basale così come l'induzione delle MMPs si basa sull'interazione e cooperazione del sito AP-1 con altri elementi attivanti. La presenza del polimorfismo MMP12 -82AG in prossimità del sito di legame per la proteina AP1 nel promotore della MMP12 ci ha spinto ad investigare l'eventuale ruolo di tale variante nell'eziopatogenesi delle VLU.

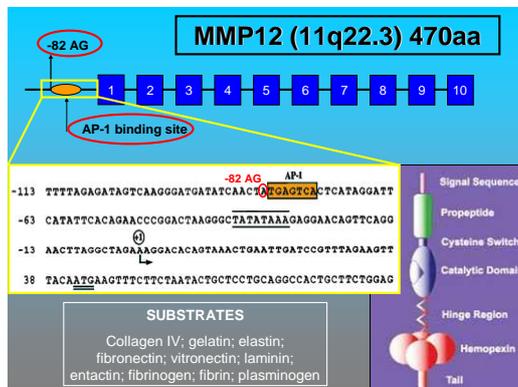


Fig 8. Relazione tra MMP12 -82AG e sito di legame con la proteina AP1 nel promotore del gene.

3 Strumenti per la genotipizzazione: Nanogen® Workstation

La diagnostica molecolare è stata rivoluzionata dallo sviluppo di tecnologie altamente avanzate per lo studio del DNA/RNA. I dispositivi di DNA microarray, biochip e lab-on-a-chip rappresentano la nuova generazione di tecnologie che rivoluzioneranno il modo di realizzare le analisi molecolari. Tali dispositivi sono già stati utilizzati nel più ampio range di applicazioni dalla ricerca in biologia molecolare e genetica e nei laboratori clinici di diagnostica (Southern, 2001; Wang, 2000; Meldrum, 2000) . Lo sviluppo della tecnologia e dei metodi di analisi basati sulla nuova generazione di DNA array è il risultato di una sinergia tra la microelettronica, microfabbricazione, studi sui microfluidi, sistemi di microelettromeccanica, chimica, biologia molecolare, genomica e scienze informatiche.

Una tecnologia di microarray basata sull'uso di microelettronica per l'identificazione di SNPs, short tandem repeat (STR) e mutazioni all'interno di sequenze geniche coinvolte in patologie è stata sviluppata e perfezionata da Nanogen® (San Diego, CA) (Sosnowski, 2002). L'approccio che sfrutta l'elettronica attiva permette l'accelerazione del trasporto di molecole di DNA in una qualsiasi posizione selezionata della superficie dell'array. Inoltre l'effetto concentrazione del template, prodotto dall'indirizzamento attivo, favorisce la reazione di ibridazione (Edman, 1997; Sosnowski, 1997; Gilles, 1999). Attraverso l'uso di un campo elettrico i campioni che possiedono carica elettrica vengono attivamente depositati su dei siti test di una cartridge. Il NanoChip® è un sito multiplo, singolarmente controllato composto da 10×10 microelettrodi (Fig 9A) ricoperti da uno strato di permeazione sottile di hydrogel contenente streptavidina (Fig 9B). Gli ampliconi biotinilati sono depositi in modo automatizzato sul chip e indirizzati elettronicamente (indirizzamento attivo) ai pad selezionati mediante l'applicazione diretta di corrente positiva. Gli ampliconi

rimangono poi fissati ai pad in seguito alla reazione biotina-streptavidina. Il DNA di ogni pad viene poi ibridato con una miscela di oligonucleotidi opportunamente disegnati e marcati (Cy5 e Cy3) per la corretta discriminazione tra Wild type e Mutante. L'applicazione di un protocollo di ibridazione mediante stringenza termica e la successiva scansione e quantificazione della fluorescenza emessa, permette quindi l'identificazione del genotipo dei pazienti in esame.

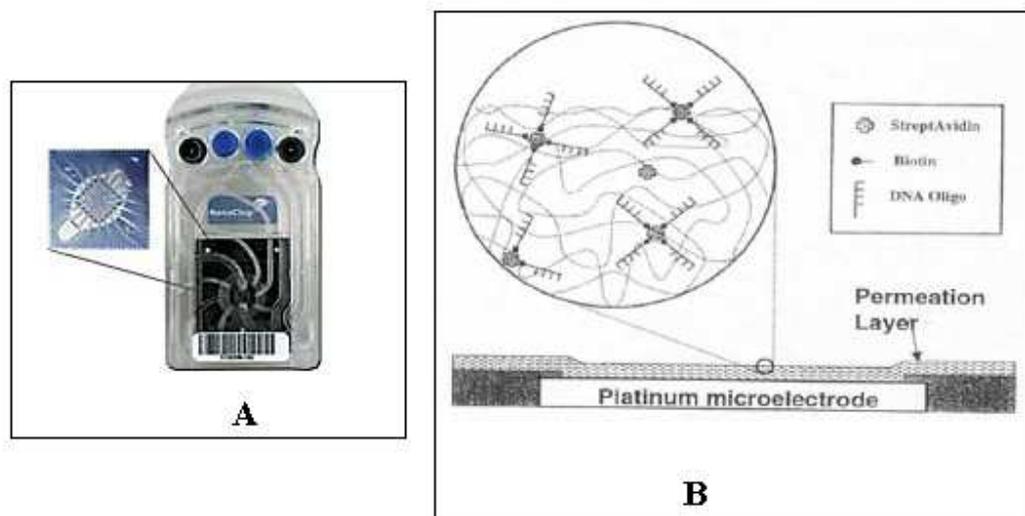


Fig 9A. Struttura della cartridge ed immagine del chip contenente i 100 siti test (pads); **9B.** sezione trasversale del pad ed ingrandimento dell'hydrogel contenete molecole di streptavidina.

Un aspetto importante del trasporto del DNA e dell'ibridazione su tali array è la composizione del buffer di trasporto e di ibridazione. Per facilitare il trasporto elettroforetico rapido del DNA e la sua successiva ibridazione speciali buffer zwitteronici devono essere utilizzati per favorire condizioni di bassa conduttività. Si è sperimentato che l'istidina è particolarmente efficace in questi sistemi. Infatti raggiunge la sua forma zwitteronica a pH neutri ed ha una bassa conduttività favorendo il trasporto rapido di molecole di DNA in campi a bassa forza e mostrando inoltre una buona capacità tampone. La capacità di ibridare del DNA ai siti test si pensa sia dovuta allo stesso effetto tampone dell'istidina nei pressi della superficie dell'elettrodo. Infatti quando il microarray viene attivato, gli elettrodi caricati positivamente producono ioni idrogeno (H^+) e le molecole di istidina che si trovano nell'intorno del microelettrodo, tamponando l'ambiente acido, si protonano e

acquistano una carica positiva netta (Fig 10). Nella sua forma cationica si crede che l'istidina sia in grado di stabilizzare l'ibridazione ai siti test (Gurtner, 2002).

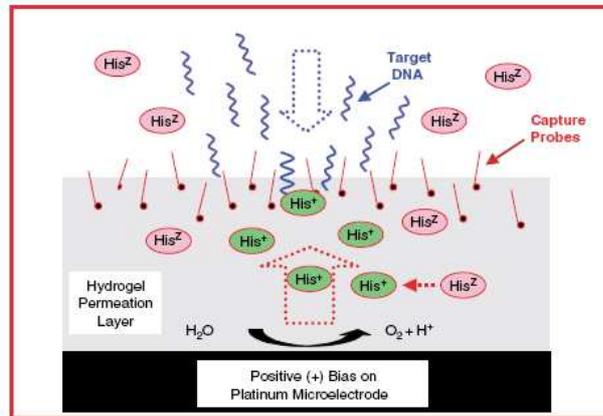


Fig 10. Meccanismo di ibridazione elettronica nel buffer di istidina zwitteronica.

Diverse applicazioni della tecnologia Nanogen® nella identificazione di variazioni geniche sono state già riportate in letteratura in diversi ambiti che spaziano dalla microbiologia alla genetica umana (Santacroce, 2000; Pollak, 2001, Erali, 2003; Westin, 2001; Cooper, 2003).

3.1 Descrizione della strumentazione

La piattaforma Nanogen® Workstation è composta da 2 strumentazioni il Loader ed il Reader, interfacciate tra loro da un PC dotato del software per la gestione e il data analysis (Fig 11).



Fig 11. Nanogen® Workstation.

Il Loader permette di indirizzare in 4 differenti canali 4 cartridge in contemporanea per un totale di 400 campioni. Il Loader è composto da una parte automatizzata per l'aspirazione e la distribuzione dei campioni ed una parte elettrica che controlla l'applicazione della corrente a livello dei pad delle cartridge. Esiste inoltre un carello che alloggia le bottiglie per i buffer necessari e la bottiglia di scarico.

Il Reader è composto da una parte termica per la creazione delle condizioni di ibridazione ed una parte ottica. Il detector della fluorescenza possiede due differenti laser per l'eccitazione (532 nm e 635 nm). I raggi laser sono rapidamente sparati pad per pad sull'array e mediante un sistema ottico di tipo confocale si è in grado di acquisire la fluorescenza di emissione delle sonde (550-600 nm per il verde, 660-720 nm per il rosso).

3.2 PCR primer set, stabilizer e probe design

La detection di SNPs richiede 4 componenti: gli ampliconi, un oligo nucleotide chiamato stabilizer e due sonde chiamate reporter, uno specifico per il wild type e uno per il mutante (Fig 12).

I reporter sono disegnati in modo da essere complementari al 3'-end del nucleotide target polimorfico o mutato e sono marcati al 5'-end con i fluorofori Cy-3 e Cy-5. Un'ulteriore evoluzione che facilita e riduce i costi di acquisto dei reporter è l'utilizzo degli universal reporter, essi sono delle sequenze nucleotidiche standard associate ai due fluorofori che sono in grado di ibridare con sequenze complementari che vengono sintetizzate associate alle sonde wild type e mutante. In tal caso le sonde perdono il nome di reporter e vengono denominate discriminator (Fig 12).

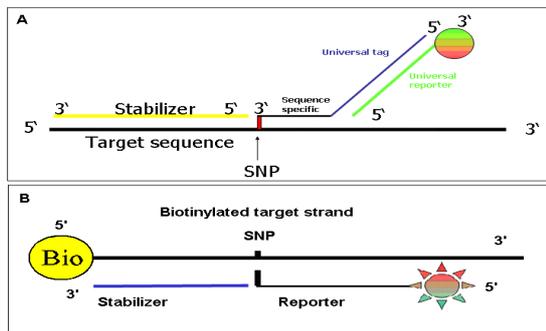


Fig 12. Rappresentazione schematica delle interazioni tra amplicone e gli oligo utilizzati nella discriminazione allelica. **A:** Utilizzo dei discriminator e degli universal reporter; **B:** Utilizzo dei reporter marcati direttamente con i fluorofori.

Lo stabilizer è disegnato in modo da ibridare in maniera continua al 3'-end dei reporter/discriminator. Quando i reporter e lo stabilizer ibridano specificamente al loro target le interazioni definite di base-stacking che si instaurano tra le due basi giustapposte dei due oligo rendono l'ibridazione più stabile. Per questo motivo è importante durante il probe design considerare le diverse energie di base-stacking che si instaurano tra le differenti coppie di basi (vedi tabella).

Base	stacking energies kcal/mol (5'→3')		
GC -14.6	GT -10.5	GG -8.3	GA -9.8
CT -6.8	CG -9.7	CA -6.6	CC -8.3
TC -9.8	TT -5.4	TG -6.6	TA -3.8
AG -6.8	AA -5.4	AC -10.5	AT -6.6

Tabella delle base stacking energy per ciascuna coppia di basi azotate.

I primer invece devono essere scelti in modo da amplificare la regione genomica contenente lo SNP di interesse ed è essenziale che uno dei due primer sia biotinilato in modo da ottenere un filamento dell'amplicone biotinilato che sarà poi quello che rimarrà fissato mediante legame con streptavidina al pad. È essenziale progettare stabilizer e discriminator tali da poter essere complementari e quindi ibridare al filamento legato al pad.

Durante la progettazione degli oligo è importante evitare la possibili strutture secondarie nelle sequenze dello stabilizer, discriminator e nell'amplicone che

potrebbero compromettere la successiva ibridazione; bisogna inoltre tenere in considerazione i range di lunghezza degli oligo e le loro temperature di melting al fine di favorire al meglio l'ibridazione e ottenere così la migliore discriminazione fra i possibili genotipi. La grandezza dell'amplicone ad esempio deve avere un range di 150-500 bp e per frammenti superiori a 137 bp è richiesto un processo di desalificazione prima dell'indirizzamento su chip.

3.3 Preparazione dei campioni

Il DNA genomico deve essere estratto ed è possibile farlo sia seguendo protocolli home-made tradizionali che utilizzando ormai i diffusissimi kit commerciali. Successivamente si realizza la PCR utilizzando il set di primer disegnato ottimizzando il termociclo e la composizione della mix di amplificazione al fine di ottenere l'amplicato specifico con la maggior resa possibile. Come già anticipato se i campioni hanno una dimensione superiore alle 137 bp devono essere desalificati altrimenti è sufficiente diluire secondo la quantificazione ottenuta il prodotto di PCR nel buffer di indirizzamento.

3.4 Addressing su microchip

I campioni amplificati in PCR devono essere caricati su una piastra o da 96 o da 384 pozzetti tenendo conto che devono avere una concentrazione di tampone di istidina di 50 mM e che la capacità in DNA di ciascun singolo pad è nel range di 5-40 nM. È possibile creare delle multiplex ed indirizzare così nello stesso pad diversi ampliconi contenenti diverse SNPs.

Per la corretta determinazione dei genotipi è essenziale indirizzare un controllo negativo (solo il buffer di istidina 50 mM) per il calcolo del background che dovrà essere poi sottratto ai segnali registrati e un controllo positivo eterozigote con il quale effettuare l'operazione di normalizzazione dei due segnali di fluorescenza. Qualora non si abbiano campioni a genotipo noto è possibile creare un eterozigote artificiale

mescolando in parti uguali oligonucleotidi sintetici contenenti o il nucleotide WT o il nucleotide Mut.

Il protocollo di indirizzamento viene impostato nel software di gestione del Loader creando le mappe della piastra di partenza e quella del chip che ne risulterà. Tutti i protocolli di indirizzamento sono composti da tre fasi: *Capture* per l'indirizzamento della sola istidina, *Target/Amplicon* per l'indirizzamento dei campioni ed infine *Passive* per la denaturazione degli ampliconi, che devono essere resi a singolo filamento. Bisogna impostare alcuni parametri importanti come l'intensità di corrente e la durata dell'attivazione del pad. La durata dipende da cosa si indirizza, sarà di 60 sec per il controllo negativo, di 120 o più secondi per gli ampliconi in base alla lunghezza e di 300 secondi almeno per la fase di denaturazione con l'NaOH. La denaturazione oltre ad essere chimica utilizzando NaOH a concentrazione 0.1-0.3 N, può essere anche elettrica facendo applicare ai pad indirizzati una corrente negativa che rimuova i legami del double-strand.

3.5 Ibridazione della cartridge e rivelazione della fluorescenza

Quando il protocollo di indirizzamento è completato la cartridge deve essere lavata per almeno tre volte con High Salt Buffer (HSB) prima di essere incubata con la miscela di ibridazione (reporter mix). La reporter mix è composta dagli oligo già descritti: discriminator wt e mutante, stabilizer, universal reporter e HSB.

Esistono diversi protocolli di ibridazione effettuabili e per ogni SNP e set di oligo è necessario sperimentarne diversi al fine di selezionare il più discriminante. Esistono comunque due tipi di protocolli di ibridazione: increasing temperature e touch down. Nell'increasing temperature il chip viene incubato per 3-5 minuti a temperatura ambiente così che si verifichi una ibridazione totale e aspecifica, si rimuove poi la reporter mix e all'interno del Reader si aumenterà la temperatura raggiungendo la temperatura considerata discriminante. Mantenendo costante la temperatura discriminante si realizzano una serie di lavaggi ad alta stringenza così da rimuovere tutte le ibridazioni aspecifiche. Nel touch down invece il chip viene inserito nel Reader

con la reporter mix, il chip viene portato alla temperatura di 56 °C così che tutti gli oligo siano denaturati e si diminuisce la temperatura gradualmente fino a raggiungere quella considerata discriminante. Anche in questo caso si realizzano lavaggi in condizioni di stringenza favorendo le ibridazioni specifiche. Al termine del protocollo di ibridazione si procede con la fase di scansione durante la quale la fluorescenza emessa dopo eccitazione delle sonde per singolo pad viene registrata.

Poiché è possibile indirizzare delle multiplex è possibile anche ibridare in successione le diverse SNP presenti per Pad con diverse e specifiche reporter mix. Tra una ibridazione e la successiva è essenziale lo stripping della sonda precedente. Sul Reader è possibile effettuare tre diversi protocolli di stripping: termico (incremento della temperatura e lavaggio per rimuovere le sonde), chimico (utilizzo del NaOH e lavaggi) o elettrico (applicazione di un voltaggio negativo e lavaggi).

3.6 Analisi dei dati

L'analisi quantitativa dei risultati dell'ibridazione viene realizzata mediante un software dedicato. In automatico egli sottrae il background, ossia la fluorescenza registrata nel pad dell'istidina ad ogni campione. Se il rapporto segnale-rumore è superiore a 5:1 il valore viene considerato accettabile. Si esegue poi la normalizzazione con il campione eterozigote così che il suo rapporto Cy3/Cye5 diventi 1 e di conseguenza tutti gli altri campioni vengono aggiustati secondo tale normalizzazione. Sono inoltre impostati dei range di designazione: se il rapporto Cye3/Cy5 è tra 1:1 e 1:2 il campione risulta eterozigote, per rapporti 1:5 o 5:1 i campioni saranno designati come wild type e mutante. Se i campioni non rispettano questi range non vengono designati.

La visualizzazione dei risultati viene data sia in forma di istogramma (Fig 13) per singolo scan che come trend di fluorescenza se si considerano diversi scan dello stesso campione, ad esempio acquisiti a diverse temperature.

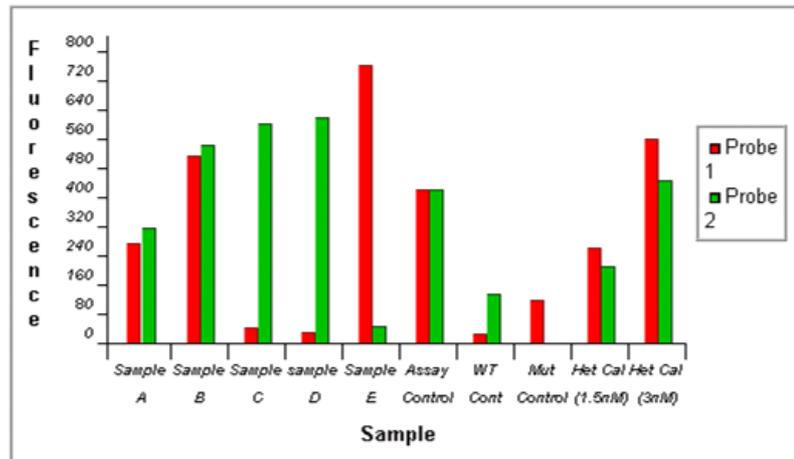


Fig 13. Rappresentazione grafica ad istogramma dei segnali di fluorescenza registrati dal sistema di microscopia confocale del Reader.

4 Materiali e Metodi

4.1 Descrizione dei casi e dei controlli

4.1.1 Pazienti con Ulcere venose

Sono stati analizzati un totale di 638 soggetti classificati secondo lo schema in figura.

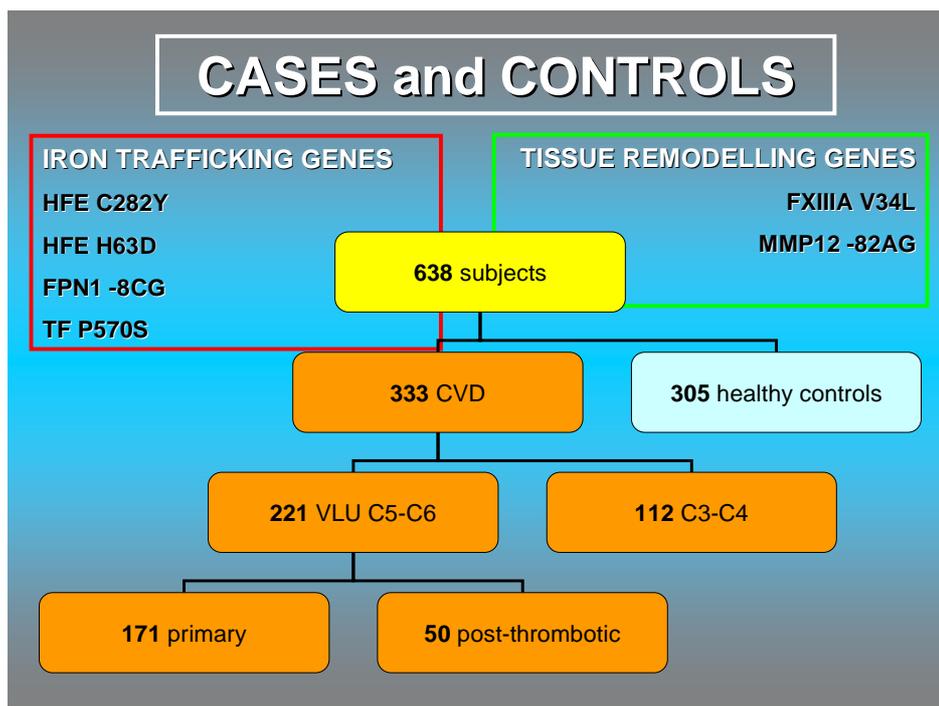


Fig 14. Diagramma schematico delle differenti popolazioni in studio.

Un totale di 333 pazienti (età media, 60.5 ± 14.5 anni; 65% femmine) affetti da CVD e classificati secondo le classi cliniche CEAP da C3 a C6, sono stati arruolati nello studio nel periodo 2005-2007 dal Centro Malattie Vascolari dell'Università di

Ferrara. Tutti i casi selezionati sono stati sottoposti ad esame eco-color Doppler, secondo le linee guida dell'*Europeum Venous Forum & American Venous Forum* (Nicolaidis et al, 2000). In base ai criteri di selezione delle linee guida, la casistica è stata categorizzata come segue: 221 pazienti affetti da VLU (C5-C6) di cui 171 con CVD primaria, e 50 con CVD post-trombotica e 112 pazienti affetti da CVD (C3-C4). Per la selezione dei pazienti al fine di evitare ulteriori fattori confondenti con effetti negativi sui processi di guarigione delle lesioni, sono stati applicati i seguenti criteri di esclusione: diabete, arteriopatia periferica ostruttiva con indice caviglia-braccio (ABI) inferiore a 0.9, anemia emolitica, ipoferritinemia o malnutrizione, inabilità a camminare, insufficienza cardiaca, epatica, renale o polmonare grave, somministrazione cronica di cortisonici in concomitanza a malattie infiammatorie croniche o malattie autoimmuni. Successivamente all'arruolamento e prima di qualsiasi trattamento/intervento farmacologico o chirurgico, l'area della lesione fu misurata mediante un software idoneo a calcolare aree irregolari (Vistrak Capture, Smith & Nephew UK Limited, London, UK). L'età di insorgenza della lesione ed una completa anamnesi fu registrata alla prima visita svolta presso il Centro delle Malattie Vascolari.

4.1.2 Gruppo dei controlli

La popolazione totale di controllo è composta di 305 soggetti volontari sani con storia personale e familiare negativa per malattia vascolare. Il gruppo di controllo è stato uniformato al gruppo dei casi per numero di soggetti, per sesso, età e provenienza geografica. Tutti i partecipanti allo studio provengono dall'Italia e mostrano identica etnicità. Infine, tutti i soggetti arruolati nella ricerca, casi e controlli, hanno fornito consenso informato scritto di partecipazione allo studio, inoltre approvato dal locale Comitato Etico.

4.2 Estrazione del DNA e condizioni di PCR

Il DNA è stato isolato da sangue intero periferico prelevato in Na-citrato secondo estrazione e purificazione automatica con BioRobot EZ1 (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Questo sistema, completamente automatizzato, sfrutta la tecnologia delle biglie magnetiche per la purificazione di DNA dopo uno step di lisi cellulare ottenuto in *single-cartridge*.

Tutti i cicli di PCR sono stati eseguiti in un termociclatore amplificatore di DNA *Peltier Thermal Cycler* (PTC-200; M.J. Research, Inc., Watertown, MA) e sono stati completati con uno *step* finale di 5 min alla temperatura di 72°C. La denaturazione iniziale è stata di 10 min a 95°C per le reazioni di amplificazione realizzate con la Hot Start Taq polimerasi Gold dell'Applied Biosystems (Applied Biosystems Group, Foster City, CA, USA) e di 5 min per la Taq standard Fast Start della Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd Group, Basel, Switzerland). La Hot Start Taq polimerasi Gold è stata utilizzata per la genotipizzazione mediante piattaforma Nanogen, mentre la Fast Start Taq polimerasi è stata utilizzata per la genotipizzazione mediante restrizione del prodotto di PCR.

SNP	SEQUENZA (5'-3')	DIMENSIONE
FPN1 -8CG (Fw) Bio	CCAGTTCCTTGCACTCCTG	129 bp
FPN1 -8CG (Rv)	CATCCTCTCTGGCGGTTG	
HFE C282Y (Fw)	CGAACCTAAAGACGTATTGCC	183 bp
HFE C282Y (Rv) Bio	CCCAATAGATTTTCTCAGCTCCT	
HFE H63D (Fw)	GTTTGAAGCTTTGGGCTACG	115 bp
HFE H63D (Rv) Bio	CCACATCTGGCTTGAAATTCT	
MMP12 -82AG (Fw) Bio	GCCTAAGTTCCTGAACTGTTCC	129 bp
MMP12 -82AG (Rv)	AGTCATGCTTTTGTTCATGTT	
FXIII A1 V34L (Fw)	GACCTTGTAAGTCAAAAATGTC	195 bp
FXIII-A1 V34L (Rv) Bio	ACCCAGAGTGGTGGGGAA	

Sequenza dei primers utilizzati per l'analisi mediante Nanogen e dimensione dell'amplicone.

Sono riportati i primers per l'amplificazione dei polimorfismi presi in esame esotto sono riportati i rispettivi termocicli. Primers diversi ed ampliconi diversi sono stati ottenuti per i due differenti metodi di genotipizzazione.

SNP	TERMOCICLO
FPN1 -8CG	95°C 30''- 56°C 15''-72°C 30'' per 35 cicli
HFE C282Y	95°C 30''- 56°C 15''-72°C 15'' per 35 cicli
HFE H63D	95°C 30''- 56°C 15''-72°C 30'' per 35 cicli
MMP12 -82AG	95°C 30''- 51°C 15''-72°C 30'' per 35 cicli
FXIII-A1 V34L	95°C 30''- 56°C 15''-72°C 15'' per 35 cicli

Cicli di amplificazione per specifico SNPs.

4.3 Genotipizzazione

4.3.1 Genotipizzazione mediante piattaforma Nanogen Workstation

Gli ampliconi contenenti il sito polimorfo dei geni in esame ed amplificati con un primer biotinitato, sono stati genotipizzati attraverso il sistema della Nanogen. Un volume da 5 a 10 µl di reazione di PCR è stato miscelato con un buffer di istidina per un volume ed una concentrazione finale rispettivamente di 60 µl e 50 mM. Circa 150-200 ng di ciascun amplicone sono stati indirizzati sulla cartridge (tipo H2) mediante il Nanogen Loader ed utilizzando i parametri di default. La denaturazione chimica dei doppi filamenti di DNA dell'amplicone, effettuata al termine del protocollo di indirizzamento, è stata realizzata utilizzando una soluzione basica di NaOH 0.1N applicata per 5 min sulla cartridge. I protocolli di ibridazione sono sotto riportati:

FPN1 -8CG	HFE C282Y	HFE H63D	MMP12 -82AG	FXIII-A V34L
<ul style="list-style-type: none"> • 56 C • Incubazione 60 s • 42 C • Incubazione 30 s • 6 lavaggi con HSB • 25 C • Scansione 	<ul style="list-style-type: none"> • 56 C • Incubazione 60 s • 50 C • Incubazione 30 s • 3 lavaggi con HSB • 25 C • Scansione 	<ul style="list-style-type: none"> • 56 C • Incubazione 60 s • 40 C • Incubazione 30 s • 4 Lavaggi con HSB • 25 C • Scansione 	<ul style="list-style-type: none"> • 56 C • Incubazione 60 s • 42 C • Incubazione 30 s • 6 lavaggi con HSB • 25 C • Scansione 	<ul style="list-style-type: none"> • 56 C • Incubazione 60 s • 42 C • Incubazione 30 s • 4 lavaggi con HSB • 25 C • Scansione

La reporter mix contiene la totalità di sonde e oligo necessari alla fase di ibridazione e discriminazione dei genotipi di ciascun amplicone e gli *universal reporter* associati alle cianine Cy3 e Cy5.

FUNZIONE	SEQUENZA
FPN1 -8CG Discriminator wild type	5'- <i>CTGAGTCCGAACATTGAG</i> -AAAGGTCATGACACTAG -3'
FPN1 -8CG Discriminator mutato	5'- <i>GCAGTATATCGCTTGACA</i> -AAAGGTCATGACACTAC-3'
FPN1 -8CG Stabilizer	5'-GCGACCCCGCTGGCTCTTCTGCGGCTGCTA-3'
HFE C282Y Discriminator wild type	5'- <i>CTGAGTCCGAACATTGAG</i> AGAGATATACGTG-3'
HFE C282Y Discriminator mutato	5'- <i>GCAGTCTATCGCTTGACA</i> CAGAGATATACGTA-3'
HFE C282Y Stabilizer	5'-CCMGGTGGAGCACCCAGGCCT-3'
HFE H63D Discriminator wild type	5'- <i>CTGAGTCCGAACATTGAG</i> TCGTGTTCTATGATC -3'
HFE H63D Discriminator mutato	5'- <i>GCAGTATATCGCTTGACA</i> TCGTGTTCTATGATG -3'
HFE H63D Stabilizer 1	5'-ATGAGWGTCCCGTGTGGAGCCCCGAA-3'
HFE H63D Stabilizer 2	5'-TGGGCTACGTGGATGACCAGCT-3'
MMP12 -82AG Discriminator wild type	5'- <i>CTGAGTCCGAACATTGAG</i> -TTTGGGATGATATCAACTA-3'
MMP12 -82AG Discriminator mutato	5'- <i>GCAGTATATCGCTTGACA</i> -TTTGGATGATATCAACTG-3'
MMP12 -82AG Stabilizer	5'-TGAGTCACTCATAGGATTCATATTCACAGAACCCGG-3'
FXIII-A V34L Discriminator wild type	5'- <i>CTGAGTCCGAACATTGAG</i> TTTGCTTCAGGGCG-3'
FXIII-A V34L Discriminator mutato	5'- <i>GCAGTATATCGCTTGACA</i> TTTAGCTTCAGGGCT-3'
FXIII-A V34L Stabilizer	5'-TGGTGCCCCGGGGCGTCAC-3'

Oligonucleotidi utilizzati nella reporter mix. In corsivo sono riportati gli *universal tail* riconosciuti dagli *universal reporter*.

La fase di ibridazione delle sonde e della rilevazione della fluorescenza sono state realizzate nel Nanogen Reader con uno specifico protocollo di ibridazione del tipo *touch down* ottimizzato per ciascuna SNP. In ogni seduta di ibridazione un campione di controllo con genotipo eterozigote noto è stato utilizzato per la normalizzazione della fluorescenza durante l'analisi dei dati e le successive designazioni dei genotipi ai campioni analizzati sono state effettuate da un software dedicato fornito dalla Nanogen settando i parametri di analisi a livello di diagnostica. Circa un 20% dei campioni in studio per ogni genotipo è stato analizzato in doppio a conferma dei risultati ottenuti.

4.3.2 Genotipizzazione di conferma mediante RLFP

Circa un 20% degli genotipi ottenuti mediante piattaforma Nanogen Workstation sono stati riconfermati in modo randomizzato selezionando all'interno dei diversi genotipi ottenuti per ciascun gruppo. La conferma è stata realizzata mediante analisi RLFP, che implica il riconoscimento della variazione nucleotidica relativa al sito polimorfo attraverso specifico enzima di restrizione.

I protocolli di genotipizzazione per HFE C282Y e H63D e per FXIII V34L sono stati realizzati come precedentemente riportato in letteratura (Gemmati *et al*, 2004). Per quanto riguarda il polimorfismo FPN1 -8CG lo stesso amplicone ottenuto per l'analisi in Nanogen è stato sottoposto a digestione enzimatica da parte dell'enzima *Bst*UI. Infine, per la variante MMP12 -82AG, il primer mutagenizzato MMP12 -82AG (Fw) 5'TAGTCAAGGGATGATATCAGCT-3' è stato associato con il primer MMP12 -82AG (Rv) 5'GCCTAAGTTCCTGAACTGTTTCCT-3'. Sono di seguito riportate le caratteristiche degli ampliconi, dei relativi prodotti di digestione e l'enzima di taglio utilizzato per ciascuna SNP analizzata. Tutte le digestioni sono state realizzate in accordo con le metodiche consigliate dalla casa produttrice degli enzimi di restrizione (New England Biololabs Inc., Beverly, MA, USA).

SNP	DIMENSIONI AMPLICONE	ENZIMA DI RESTRIZIONE	FRAMMENTI DI RESTRIZIONE	REFERENZE
FPN1 -8CG	129 bp	<i>Bst</i> UI	129 (Wt) 85+44 (Mut)	In questo lavoro
HFE C282Y	390	<i>Rsa</i> I	250+140 (Wt) 50+111+29 (Mut)	Settin, 2006
HFE H63D	208 bp	<i>Bcl</i> II	138+70 (Wt) 208 (Mut)	Settin, 2006
MMP12 -82AG	100 bp	<i>Pvu</i> II	100 (Wt) 80+20 (Mut)	In questo lavoro
FXIII-A1 V34L	192	<i>Dde</i> I	192 (Wt) 164+28 (Mut)	Gemmati, 2004

Enzimi e frammenti di restrizione per la genotipizzazione di ciascun SNP.

4.4 Analisi statistica

I dati continui (età dei casi e dei controlli) sono stati rappresentati come media \pm deviazione standard (SD) ed è stata verificata l'assenza statisticamente significativa di differenze tra le diverse popolazioni a confronto tramite il test *T di Student*. *P-values* inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Le variabili categoriche (distribuzione dei genotipi) sono state rappresentate in termini di numero e percentuale e la significatività statistica delle differenze è stata realizzata mediante il test del *Chi-quadro*.

I gruppi dei differenti genotipi analizzati furono categorizzati come segue: wild-type, eterozigote e omozigote mutato. Al fine di stimare il rischio di sviluppare la patologia associato alla presenza dell'allele polimorfo, è stato utilizzato il calcolo dell'Odds Ratio (OR) e dell'intervallo di confidenza stimato al 95% (CI 95%). Il valore dell'Odds Ratio e l'intervallo di confidenza del 95% sono stati calcolati mediante il modello di regressione logistica multipla. In seguito la relazione tra i genotipi selezionati e le caratteristiche cliniche della patologia sono state investigate sia mediante analisi singola che combinata con lo scopo di verificare possibili correlazioni ed interazioni tra gruppi di geni e manifestazioni cliniche. Infine, mediante studi intracaso, abbiamo investigato la presenza di eventuali associazioni tra particolari polimorfismi e parametri clinici come l'età di insorgenza della lesione e la dimensione della lesione stessa.

5 Risultati

5.1 Variabilità genetica e ulcere venose

Considerando che circa il 10% dei pazienti affetti da CVI progredisce verso l'apertura di una lesione cutanea e che l'ipotesi del sovraccarico locale di ferro non spiega completamente perché solo in alcuni pazienti si instauri un'ulcera venosa, la variabilità genetica interindividuale potrebbe essere una chiave di lettura in grado di chiarire le differenze cliniche osservate tra paziente e paziente. A tale scopo sono stati investigati i seguenti polimorfismi genici:

HFE [C282Y, H63D]

FPN1 [-8CG]

FXIII A [V43L]

MMP12 [-82AG]

Valutazione del rischio di sviluppare una lesione

5.1.1 HFE C282Y e H63D

Nei pazienti affetti da ulcere (n=221) la prevalenza del polimorfismo C282Y era significativamente aumentata rispetto al gruppo dei controlli (9.5% vs 2.2%; $P=0.001$). Inoltre, confrontando il solo sottogruppo dei pazienti affetti da ulcere primarie (n=171) con il sottogruppo di pazienti con CVI senza lesione (n= 112; C3-C4), il valore di rischio aumentava sensibilmente (10.5% vs 1.8%; $P=0.001$).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata nella distribuzione dei genotipi per il polimorfismo HFE H63D e l'esigua rappresentazione di doppi *carriers* nel gruppo dei controlli non ha reso possibile l'analisi statistica. E' tuttavia da sottolineare che due soggetti nel gruppo dei pazienti con VLU mostrarono la contemporanea presenza dell'allele polimorfico nei due polimorfismi del gene dell'HFE.

Le tabelle riportate di seguito mostrano i valori di rischio di ulcerazione associato alla presenza della variante C282Y nel gruppo intero di VLU e nel sottogruppo di VLU primarie.

VLU (C5-C6) vs controlli			VLU primarie (C5-C6) vs CVI (C3-C4)		
HFE C282Y			HFE C282Y		
	Casi (%) (n= 221)	Controlli (%) (n= 221)		Casi (%) (n= 171)	Controlli (%) (n= 112)
CC	200 (90.5)	216 (97.7)	CC	153 (89.5)	110 (98.2)
CY	20 (9.1)	5 (2.2)	CY	17 (9.9)	2 (1.8)
YY	1 (0.45)	0 (0)	YY	1 (0.6)	0 (0)
<i>P value*</i>	0.001		<i>P value*</i>	0.001	
OR (CI 95%)	4.5 (1.3-14.9)		OR (CI 95%)	6.5 (1.56-26.5)	

Tab 1. Distribuzione dei genotipi e valori di rischio associati per l'intero gruppo di VLU (Sn) e per il sottogruppo di VLU primarie (Dx). * i valori di P e OR sono stati ottenuti confrontando il genotipo wild type CC con l'eterozigote e l'omozigote (CY+YY).

Il rischio di sviluppare una lesione in pazienti con CVI raggiunge valori di circa 4.5- volte, quando nel paziente CVI è presente la variante C282Y. Valori più alti di circa 6.5- volte si ottengono nel sottogruppo di pazienti con CVI primaria se confrontati con pazienti CVI in assenza di lesione (C3-C4). A causa dell'esiguo numero di CVI post-trombotiche non è stato possibile calcolare nessun valore di rischio.

5.1.2 FPN1 -8CG

Nei pazienti affetti da ulcere (n=221) la prevalenza del polimorfismo FPN1 -8CG in omozigosi era significativamente più alta rispetto al gruppo dei controlli (8.6% vs 2.3%; $P=0.005$). La significatività era mantenuta anche confrontando il sottogruppo dei pazienti affetti da ulcere primarie (n=171) con un gruppo di controlli appaiato per numero, sesso ed età (9.4% vs 2.3%; $P=0.005$). Il confronto del sottogruppo di pazienti con ulcera primaria (C5-C6) *versus* il sottogruppo con CVI in assenza di lesione (C3-C4) restituiva apprezzabili differenze solo rispetto alla distribuzione allelica (43% vs 31.2%).

VLU (C5-C6) vs controlli			VLU primarie vs Controlli		
FPN1 -8CG			FPN1 -8CG		
	Casi (%) (n= 221)	Controlli (%) (n= 221)		Casi (%) (n= 171)	Controlli (%) (n= 171)
CC	126 (57.0)	148 (67.0)	CC	96 (56.1)	115 (67.2)
CG	76 (34.0)	68 (30.8)	CG	59 (34.5)	52 (30.4)
GG	19 (8.6)	5 (2.3)	GG	16 (9.4)	4 (2.3)
<i>P value*</i>	0.005		<i>P value*</i>	0.005	
OR (CI 95%)	5.2 (1.9-15.0)		OR (CI 95%)	4.98 (1.82-14.9)	

Tab 2. Distribuzione dei genotipi e valori di rischio per l'intero gruppo di VLU (Sn) e per il sottogruppo di VLU primarie (Dx). * I valori di OR sono ottenuti confrontando il genotipo wild type CC con l'omozigote polimorfico GG.

Il rischio di sviluppare una lesione in pazienti con CVI raggiunge valori di circa 5.2-volte quando è presente la variante -8GG. Valori confrontabili si ottengono nel sottogruppo di pazienti con CVI primaria se confrontati con il gruppo dei controlli sani. A causa dell'esiguo numero di CVI post-trombotiche non è stato possibile calcolare nessun valore di rischio.

5.1.3 MMP12 -82AG

Una differenza significativa si evidenziava confrontando la distribuzione genotipica nel gruppo di pazienti con ulcera primaria (n=171) con quella nei controlli sani (n=171): [casi: AA n=139(81.3%), AG n=26(15.2%), GG n=6(3.5%); controlli: AA n=118(69%), AG n=49(28.7%), GG n=4(2.3%); P=0.010]. Inoltre, la frequenza dei pazienti con genotipo omozigote -82AA era sovra rappresentata restituendo un significativo rischio associato circa 2-volte (OR= 1.96; CI 95%, 1.18-3.22; P=0.01).

5.1.4 FXIII-A V34L

La distribuzione genotipica del FXIIIIV34L non restituì nessuna differenza significativa tra i gruppi di pazienti considerati, così come nessun genotipo risultò associato a particolari fenotipi clinici in studio.

6.0 Associazione tra genotipo e dimensione della lesione

6.1 FXIII-A V34L

In un sottogruppo di pazienti con ulcera (n=167) era disponibile la dimensione della lesione registrata al momento dell'arruolamento. Considerando la stratificazione delle medie delle dimensioni della lesione nei tre sottogruppi con differente genotipo per il polimorfismo FXIIIIV34L, si ottenne un trend significativo tra allele L34 e dimensione media della lesione: la media della lesione nel sottogruppo di pazienti diminuiva all'aumentare del numero di alleli L34 presenti nel genotipo del paziente (P-trend=0.001).

FXIII V34L AND ULCER SIZE

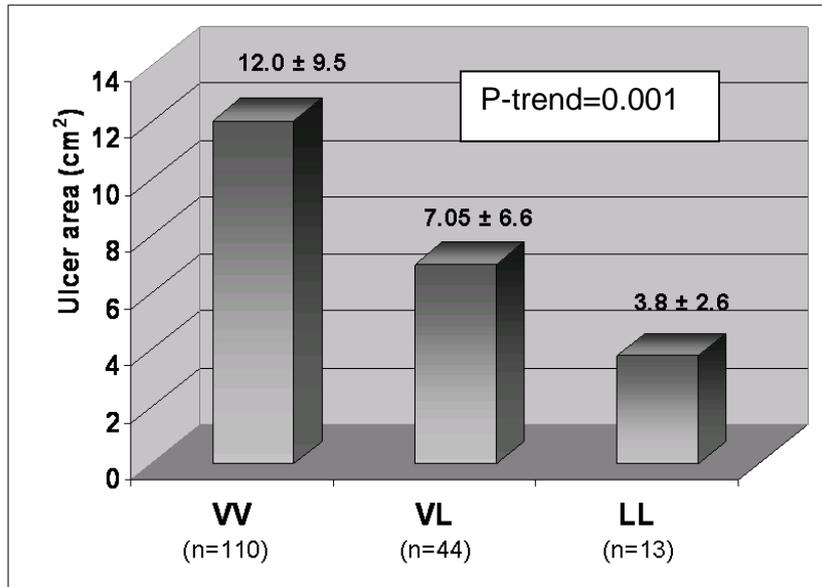


Fig 15. Medie e DS delle dimensioni delle lesioni stratificate per i tre differenti genotipi. In dettaglio VV vs VL, P=0.005; VV vs LL, P=0.008; VL vs LL, P= 0.01.

6.2 MMP12 -82AG

Nello stesso sottogruppo di pazienti, ed analogamente a quanto osservato per il polimorfismo del FXIII, stratificando le dimensioni della lesione per il genotipo del polimorfismo MMP12 -82AG, si osserva un'associazione della dimensione ad un particolare genotipo. Nello specifico, il genotipo omozigote -82GG se confrontato con i restanti genotipi mostra dimensioni medie della lesione significativamente inferiori (GG vs AA + AG; P=0.001). E' comunque da osservare il ridotto numero di pazienti con genotipo -82AA omozigote, per tale ragione il presente risultato va interpretato con estrema cautela.

MMP12 -82AG and ULCER SIZE

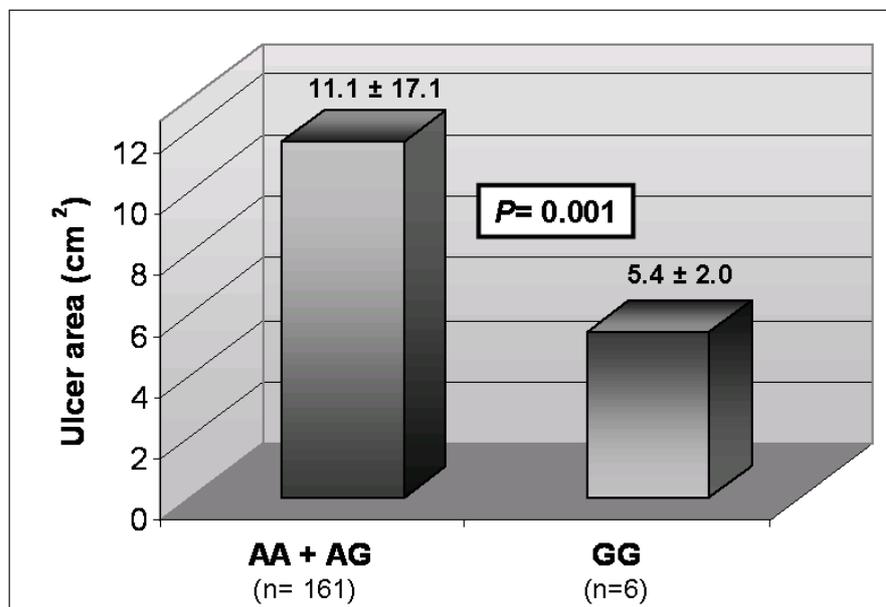


Fig 16. Relazione tra il genotipo MMP12 -82AG e la dimensione medie delle lesioni.

6.3 FPN1 -8CG

La stratificazione del polimorfismo FPN1 -8CG restituiva al contrario un non significativo ($P=0.30$) ma apprezzabile trend nel senso di un aumento della ampiezze medie della lesione all'aumentare del numero di alleli polimorfici -8G nel genotipo dei pazienti. Nello specifico, [CC, $n=101$: $10 \pm 19.26 \text{cm}^2$; CG, $n=56$: $12.0 \pm 25.6 \text{cm}^2$; GG, $n=10$: $13.6 \pm 14.2 \text{cm}^2$].

6.4 Analisi combinata

Al fine di riconoscere eventuali effetti combinati dei differenti alleli considerati sui fenotipi clinici in studio, abbiamo analizzato l'intero gruppo di pazienti con CVI (n=333). Di questi, il 3% (n=10) era portatore della variante HFE C282Y e FPN1-8CG (considerati come pazienti con almeno due alleli polimorfici nei due differenti geni). Sebbene la percentuale risultava estremamente bassa, è da sottolineare che i doppi *carriers* (n=10) furono riscontrati esclusivamente nei pazienti con lesione (n=221), aumentando in questo caso la percentuale ad un valore di 4.52%. Un confronto tra pazienti CVI con ulcera (C5-C6) *versus* pazienti CVI senza lesione (C3-C4) restituiva una sovra rappresentazione di doppi *carriers* nel gruppo con lesione (P=0.052).

Allo stesso modo, considerando il sottogruppo di pazienti in cui era disponibile la dimensione della lesione (n=167), i pazienti doppi-*carrier* per gli alleli MMP12 -82G e FXIII 34L, (n=17), mostravano una più piccola dimensione della lesione ($9\text{cm}^2 \pm 10$) se confrontati con il gruppo di 69 pazienti doppi-wildtype ($15.5\text{ cm}^2 \pm 15.5$).

Questi risultati, sebbene con significatività statistica *borderline*, principalmente dovuta al ridotto numero di pazienti portatori in combinazione di differenti varianti geniche, sono in linea con il ruolo protettivo attribuito agli stessi alleli in analisi singola.

7. Approccio investigativo alla valutazione clinica di pazienti con CVI mediante analisi molecolare

La seguente tabella mostra in modo riassuntivo gli effetti dei marcatori molecolari utilizzati nella presente tesi sui principali parametri clinici delle VLU.

Summary of the main findings in the present and previous studies.					
SNPs	VLU risk (primary CVD)	Lesion onset (primary CVD)	Lesion size	Healing time (hemodynamic correction)	Ref.
<i>HFE</i> <i>C282Y</i>	Y-allele ↑ risk (6-7x)	--	--	No effect after correction	[1,3,5]
<i>HFE</i> <i>H65D</i>	--	D-allele ↓ age onset (~10y)	--	--	[2,5]
<i>FPN1</i> <i>-8CG</i>	GG-genotype ↑ risk (~5x)	--	GG-genotype ↑ size (NS)	--	[6]
<i>MMP12</i> <i>-82AG</i>	AA-genotype ↑ risk (~2x)	--	GG-genotype ↓ size (~2x)	--	[6]
<i>FXIII</i> <i>V34L</i>	--	--	L-allele ↓ size (~3.5x)	VV-genotype ↑ HT (~2x)	[4,3,5]
<i>HFE/</i> <i>FPN1</i>	Y/G-carriers ↑ risk (NS)	--	--	--	[6]
<i>FXIII/</i> <i>MMP12</i>	--	--	L/G-carriers ↓ size (NS)	--	[6]

References

1. Zamboni *et al*; *J Vasc Surg* 2005;42:309-14.
2. Zamboni , *et al*; *Free Radic Biol Med* 2006;40: 1869-73.
3. Gemmati *et al*; *J Vasc Surg* 2006;44:554-62.
4. Gemmati *et al*; *Wound Repair Regen* 2004;12:512-7
5. Zamboni and Gemmati ; *Thromb Haemost* 2007;98:131-7.
6. Gemmati *et al*; *J Vasc Surg* 2009;50: 1444-51.

8 Discussione

Molte delle limitazioni nel trattamento delle VLU sono principalmente dovute alla scarsa conoscenza dei meccanismi molecolari che sono alla base della loro insorgenza. L'identificazione di diversi caratteri genetici indipendenti, o possibili fattori di rischio/suscettibilità, responsabili dell'insorgenza di questa patologia, diventa quindi di importanza rilevante nel supporto diagnostico e di prevenzione della patologia. Chiarire quali sono i geni che possono avere un ruolo patogenetico nell'esordio e progressione della malattia in studio, potrebbe aprire la strada a nuovi trattamenti terapeutici o a procedure cliniche alternative a quelle convenzionalmente in uso.

Escludendo la malattia cronica venosa, l'età avanzata ed il genere femminile, forti evidenze per una concreta predisposizione alla comparsa di lesioni ulcerose non esistono. Per quello che riguarda la genetica, geni candidati potrebbero essere quelli implicati nei processi infiammatori, fattori di crescita cellulari, nell'angiogenesi, nell'apoptosi. Al contrario, un recente studio (*Charles, et al 2008*) che confrontava lesioni croniche *versus* lesioni guarite in tempi fisiologici, non riscontrava differenze significative tra i profili di espressione dei geni classicamente ritenuti implicati nei processi di guarigione delle lesioni (PDGF, KGF, FGF ed altri).

Pochi dati sono presenti in letteratura su SNPs e VLU (*Ashworth et al 2005; Nagy et al, 2005; Fallace et al, 2006; Ashworth et al, 2008*). Il nostro gruppo ha proposto recentemente (*Zamboni and Gemmati, 2007*) un meccanismo molecolare eziopatogenico sulle VLU che implica un sovraccarico di ferro locale (CVI) mediante il quale la catena dell'infiammazione e delle MMPs degrada la matrice extracellulare determinando la morte del tessuto e l'apertura della lesione.

Il nostro gruppo si è occupato negli ultimi anni dell'associazione tra due varianti del gene HFE (C282Y e H63D) e due varianti del gene del FXIII A (V34L e P564L)

con l'insorgenza di ulcera nelle malattie venose croniche. Dalle numerose ricerche, è emerso che HFE (C282Y) e FXIII A (V34L) hanno rispettivamente un ruolo significativo nel predire il rischio di ulcerazione e nel modulare la dimensione della lesione in pazienti affetti da CVI. Inoltre, è stato osservato come in pazienti affetti da ulcere primarie e sottoposti ad intervento chirurgico il FXIII A VV34 assumeva un ruolo predittivo di ritardato tempo di guarigione con un rischio associato stimato di circa 5 volte (Gemmati, 2006).

Questi studi pionieristici dimostrano come, sebbene le VLU siano patologie complesse e multifattoriali dove fattori ambientali e stile di vita assumono un ruolo determinante nell'evolvere della patologia, il background genetico individuale assume un valore decisivo.

Con il presente studio abbiamo voluto ampliare il numero di geni e di SNPs con altri geni chiave del metabolismo del ferro, quali la ferroportina (FPN-1 -8CG), o coinvolti nel rimodellamento della matrice, quali la Metalloproteasi-12 (MMP-12 -82AG). Le varianti geniche selezionate per avere un ruolo significativo in associazione con le ulcere venose sono inserite in un DNA-array che verrà proposto ed utilizzato nel campo delle lesioni di origine vascolare come strumento prognostico adiuvante il clinico impegnato nel trattamento di tali patologie complesse.

I marcatori genici identificati dal DNA-Array sono implicati nella **suscettibilità** (HFE, FPN1, MMP12), nel **tempo di guarigione** (FXIII), e nella **dimensione della lesione** (FXIII e MMP12). Sebbene questi SNPs risultano associati con apprezzabile e significativo potenziale statistico, ulteriori geni e SNPs potranno essere inseriti nel presente DNA-array dopo validazione.

La selezione dei geni da investigare necessita di essere implementata sulle basi di una profonda conoscenza della malattia in studio, e quella delle varianti geniche sulle basi del loro fenotipo associato (se noto).

Per esempio, l'osservazione che il sovraccarico di ferro ha un ruolo nell'insorgenza delle VLU, ci ha spinto ad investigare il ruolo dei SNPs nei geni di HFE e FPN1. Inoltre abbiamo in studio altri tre geni dell'omeostasi del ferro, la transferrina (TF), il recettore per la transferrina (TFR), e l'epcidina (HEPCN).

Sebbene le varianti in studio sono considerate ‘mutazioni asintomatiche’ per malattie sistemiche del ferro, noi le associamo in presenza di un forte fattore ambientale (il sovraccarico di ferro da CVI) che ne ‘esacerba’ e slatentizza il potenziale patologico. In pazienti con CVI, la sovrapposizione del locale sovraccarico di ferro in presenza delle varianti dell’HFE facilita l’insorgenza della malattia ulcerativa ed anticipa significativamente l’età di insorgenza. Le mutazioni dell’HFE modificano la stabilità dei depositi di ferritina e il sistema di regolazione dell’epcidina determinando un aumento del flusso di ferro extracellulare (*Drakesmith et al, 2005; Morua et al, 1998*). Noi ipotizziamo che la lesione tissutale origina da un aumentato rilascio di ferro e conseguente produzione di radicali liberi. Allo stesso modo, la variante nel promotore della FPN1 essendo molto vicina alla regione IRE del gene potrebbe interferire nella regolazione dell’espressione del gene stesso e sbilanciare significativamente il delicato equilibrio omeostatico del ferro. Nessun fenotipo biologico è stato ancora attribuito a questa variante, noi ipotizziamo e riassumiamo i nostri risultati in questo modo: ì. un ruolo diretto dello SNP sulla regione IRE che rende instabile l’interazione con le IRP determinando una ‘incomprensione’ del segnale di espressione; ìì. un ruolo indiretto dello SNP in associazione con un differente difetto molecolare non ancora noto.

Le MMPs, assieme ai loro inibitori tissutali (TIMPs) sono implicati nel rimodellamento vascolare e nelle malattie vascolari (*Raffetto et al, 2008*). La MMP12 è secreta dal macrofago, digerisce numerosi componenti della matrice extracellulare, modula la migrazione del macrofago nella matrice e blocca l’angiogenesi. Il polimorfismo -82AG nel promotore del gene è molto vicino al sito di legame per un fattore di trascrizione, la proteina attivante AP1. Per questa ragione, potrebbe influenzare la loro reciproca interazione con potenziali effetti sull’espressione del gene. Una più alta attività del promotore è descritta in presenza dell’allele -82A se confrontata con quella dell’allele -82G; questo determina potenziali maggiori livelli di espressione sia basali che in presenza di stimolo. In esperimenti di transfezione, la risposta dell’allele -82A era più alta quando le cellule erano stimulate con insulina o con PMA (*phorbol myristate acetate*) (*Jormsjo et al, 2000*). Sebbene sono registrati piccoli cambiamenti tra i due alleli nell’attività del promotore, questi potrebbero

risultare sufficienti ed avere effetti significativi in lesioni croniche. Di conseguenza, la ridotta espressione della MMP12 nel paziente con genotipo -82GG è in accordo con la ridotta estensione della lesione trovata in questo sottogruppo di pazienti. Al contrario, nessun rischio di ulcerazione era attribuito ai pazienti portatori dell'allele -82A nel nostro gruppo di pazienti, ma solo nel sottogruppo degli omozigoti -82AA. Questo è in linea con il fatto che l'allele-A in singola copia non ha la 'forza' sufficiente per essere causativo di ulcerazione, ma solo quando agisce in omozigosi. Comunque, una volta che la lesione è apparsa, ne può modulare l'estensione: Infatti i pazienti portatori dell'allele-A (AA + AG) mostrano maggiori ampiezze medie della lesione.

Il FXIII rafforza le interazioni tra le proteine della matrice extracellulare contro gli attacchi proteolitici delle MMPs, favorendo la migrazione e la proliferazione dei fibroblasti, l'angiogenesi e la guarigione. Il grado di queste funzioni associate al FXIII dipende strettamente dalle varianti presenti nel gene (*Gemmati et al, 2004; Zamboni e Gemmati, 2007*). E' ipotizzabile che, una più alta attività del FXIII al sito di lesione (p.e. FXIII V34L) potrebbe meglio promuovere la chiusura della lesione coadiuvando le numerose *pathways* sopra menzionate con positivi effetti sulla dimensione della lesione e sui tempi di chiusura.

A prescindere da specifici genotipi o gruppi di genotipi, l'estensione della lesione potrebbe essere influenzata anche da precedenti trattamenti praticati al paziente prima della nostra osservazione. Per queste ragioni, nel presente studio sono stati arruolati solo pazienti che si presentavano alla nostra osservazione prima che qualsiasi trattamento farmacologico o chirurgico venisse adottato ed in concomitanza era registrata la dimensione della lesione. Inoltre, al fine di ridurre al massimo i fattori confondenti con effetti sui parametri in studio, i pazienti erano arruolati con stretti parametri di inclusione come riportato nella sezione dei Materiali e Metodi.

Sulla base dei risultati descritti, potrebbero essere attivati programmi di prevenzione nella malattia CVD primaria mediante l'utilizzo del proposto DNA-array nella fase iniziale di valutazione del paziente. La pratica clinica potrebbe potenzialmente essere influenzata dai risultati ottenuti dalla valutazione del DNA-array. Un esempio è fornito dall'utilizzo dei SNPs HFE e FPN1. Un risultato positivo

per uno o l'altro test, suggerisce indicazioni e priorità per correzione chirurgica dell'insufficienza venosa superficiale, e le vene varicose primarie potrebbero essere trattate più appropriatamente prima che si instauri una lesione in quei pazienti con genotipi critici.

L'analisi simultanea di selezionati SNPs, potrebbe fornire importanti informazioni utili nel predire la comparsa di una lesione stratificando i pazienti in base al loro potenziale di guarigione.

9 Conclusioni

In questa tesi abbiamo voluto indagare se la variabilità genetica, responsabile delle differenti attività dei geni possa avere un ruolo nell'insorgenza, nella progressione e nella guarigione di lesioni tissutali di origine vascolare in pazienti con CVI agli arti inferiori. Identificati alcuni geni coinvolti nell'eziopatogenesi delle ulcere venose, quali HFE e FPN1, coinvolti nel *pathway* della regolazione del ferro, e FXIII e MMP12, coinvolti nei processi riparativi di rimodellamento della matrice extracellulare, abbiamo eseguito uno studio epidemiologico caso-controllo ed intra-caso utilizzando per la *detection* dei marcatori molecolari selezionati uno strumento diagnostico-molecolare quale il DNA-array.

La scelta di questi geni è giustificata dalla fisiopatologia delle ulcere venose e dal modello di ulcerazione proposto dal nostro gruppo che considera il sovraccarico di ferro locale, causato principalmente dalla stasi venosa, come *trigger* innescante una serie di reazioni responsabile di uno stato infiammatorio persistente che causerebbe attivazione della cascata delle MMPs, degradazione incontrollata della matrice extracellulare, morte cellulare e quindi apertura di una lesione. I radicali liberi ed i mediatori infiammatori compromettono fortemente l'equilibrio tra le attività enzimatiche, che intervengono nella fase di guarigione della lesione. Ciò quindi porterebbe ad un'iperattività delle MMPs non controbilanciata dai suoi inibitori fisiologici (TIMPs). Il tutto è responsabile del persistere della lesione nella sua condizione di ferita con ritardato tempo di guarigione.

Emerge inoltre dal presente studio come in patologie complesse influenzate da fattori ambientali, la genetica svolge un ruolo decisivo nella prognosi, diagnosi e nei trattamenti terapeutici. Dai risultati ottenuti dal presente studio si sono ricavate

preziose informazioni prognostiche e diagnostiche per tale patologia complessa considerata fino a pochi anni fa orfana per trattamento.

L'introduzione di ulteriori marcatori molecolari permetterà e renderà la progettazione e creazione del proposto DNA-array una realtà concreta con ricadute cliniche significative nel campo di tutte le patologie caratterizzate da lesioni tessutali a componente vascolare ed infiammatoria.

E' comunque da sottolineare che sebbene significativi i nostri risultati devono essere considerati preliminari ed i proposti marcatori devono essere interpretati con cautela e sottoposti ad ulteriori *trials* investigativi prima di una conferma definitiva.

10 Bibliografia

Abboud, S., Haile, D.J., 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*, **27**, 19906-12.

Ashworth JJ, Smyth JV, Pendleton N, Horan M, Payton A, Worthington J, et al. Polymorphisms spanning the 0N exon and promoter of the estrogen receptor-beta(ERbeta) gene ESR2 are associated with venous ulceration. *Clin Genet* 2008;73:55-61.

Ashworth JJ, Smyth JV, Pendleton N, Horan M, Payton A, Worthington J, et al. The dinucleotide (CA) repeat polymorphism of estrogen receptor beta but not the dinucleotide (TA) repeat polymorphism of estrogen receptor alpha is associated with venous ulceration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;97:266-70.

Bereczky, Z., Katona, E., Muszbek, L., (2003-2004). Fibrin stabilization (factor XIII), fibrin structure and thrombosis. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, **33**, 430-7

Birkedal-Hansen, H., (1995). Proteolytic remodelling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **7**, 728-735

Camaschella, C., (2005). Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood*, **106**, 3710-17.

Chandler, S., Cossin, J., Lury, J., Wells, G., 1996. Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumor necrosis factor-alpha fusion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **228**, 421-429.

Charles CA, Tomic-Canic M, Vincek V, Nassiri M, Stojadinovic O, Eaglstein WH, et al. A gene signature of nonhealing venous ulcers: potential diagnostic markers. *J Am Acad Dermatol* 2008;59:758-71.

Collins, F.S., Guyer, M.S., and Chakravarti, A.; (1997) Variations on a theme: cataloguing human DNA sequence variations. *Science*, **278**, 1580-1581

Conway, E.M., Collen, D., and Carmeliet, P., (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc. Res.*, **49**, 507-521

Cooper, K.L., and Goering, R.V., (2003) Development of a universal probe for electronic microarray and its application in characterization of the *Staphylococcus aureus* polC gene. *J. Mol. Diagn.*, **5**, 28-33

Dardik R, Loscalzo J, Inbal A. (2006) Factor XIII (FXIII) and angiogenesis *J. Thromb. Haemost.*, **4**,19-25.

Dardik, R., Solomon, A., Loscalzo, J, et al., (2003). Novel proangiogenic effect of factor XIII associated with the suppression of thrombospondin 1 expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 1472-1477.

De Domenico, I., Ward, D.M., Musci, G., Kaplan, J., (2006a). Iron overload due to mutations in ferroportin. *Haematologica*, **91**, 92-5

De Domenico, I., McVey Ward, D., Nemeth, E., Ganz, T., Corradini, E, Ferrara, F., Musci, G., Pietrangelo, A., Kaplan J., (2006b). Molecular and clinical correlates in iron overload associated with mutations in ferroportin. *Haematologica*, **91**, 1092-1095

Deicher, R., e Horl, W.H. (2006). New insights into the regulation of iron homeostasis. *Eur J Clin Invest*, **36**, 301-9.

Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000; **403**:776-81.

Drakesmith H, Schimanski LM, Ormerod E, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards J P, et al. Resistance hepcidin is conferred by haemochromatosis-associated mutations ferroportin. *Blood* 2005;106:1092-7.

Edman, C.F., Raymond, D.E., Wu, D.J. et al., (1997) Electric field directed nucleic acid hybridization on microchip. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4907-4914.

Emerit, J., Beaumont, C., Trivin, F.(2001). Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother* **55**, 333-39

Erali, M., Schmidt, B., Lyon, E., and Wittwer, C.; (2003) Evaluation of electronic microarray for genotyping Factor V, Factor II, and MTHFR. *Clin. Chem.*, **49**, 732-739

Fernandes Abbade, L.P., Lastoria, S., (2005). Venous ulcer: epidemiology, diagnosis and treatment. *The International Society of Dermatology*, **44**, 449-456

Fleming, R.E., Bruce, R., Bacon, M.D., (2005) Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med.*, **352**, 1741-1744

Gemmati D, Tognazzo S, Catozzi L, Federici F, De Palma M, Giancesini S, Scapoli GL, De Mattei M, Liboni A, Zamboni P., (2006). Influence of gene polymorphisms in ulcer healing process after superficial venous surgery. *J Vasc Surg.*, **44**,554-562

Gemmati, D, Tognazzo, S., Serino, M.L., Fogato, L., Carandina, S., De Palma, M., Izzo, M., De Mattei, M., Ongaro, Scapoli, G.L., Caruso, A., Liboni, A., Zamboni, P., (2004). Factor XIII V34L polymorphism modulates the risk of chronic venous leg ulcer progression and extension. *Wound Rep. Reg.*, **12**, 213-218

Gilles, P.N., Wu, D., Foster, C.B., Dillon P.J., and Chanock, S.J.; (1999) Single conductor microchip. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 365-370

Gross, C.N., Irrinki, A., Feder, J.N., Enns, C.A., (1998). Co-traffic of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation. *J Biol Chem.*, **272**, 22068-22074

Gross, E.A., Wood, C.R., Lazarus, G.S., et al., (1993). Venous leg ulcers: an analysis of underlying venous diseases. *Br. J. Dermatol.*, **129**, 270-274

Gurtner, C., Tu, E., Jamashidi, N., Haigiss R.W., Onofrey, T.J., Edman, C.F., et al., (2002) Microelectronic array devices and techniques for electric field enhanced DNA hybridization in low-conductance buffers. *Electrophoresis*, **23**, 1543-1550

Herouy, Y., Hellstern, M.O., Vanscheidt, W., Schopf, E., Norgauer, J., (2000). Factor XIII-mediated inhibition of fibrinolysis and venous leg ulcers. *Lancet*, **355**, 1970-1

Ichinose, A. (2001). Physiopathology and regulation of factor XIII. *Thromb. Haemost.*, **86**, 57-65

Inbal, A., Dardik, R., (2006). Role of coagulation factor XIII (FXIII) in angiogenesis and tissue repair. *Pathophysiol. Heamost. Thromb.*, **35**, 162-165.

Jormsjo, S., Ye, S., Moritz, J., Walter, D.H., Dimmeler, S., Zeiher, A.M., Henney, A., Hamsten, A., Eriksson, P., 2000. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest artery coronary disease. *Circ. Res.*, **86**, 998-1003.

Kang, S., Cho, S., Chung, J.H., Hammerberg, C., Fisher, G.J., Voorhees, J.J., (2005). Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor- κ B and activator protein-1 in inflammatory acne lesions in vivo. *Am. J. of Pathol.*, **166**, 1691-1699.

Kohler, H.P., Ariens, R.A., Whitaker, P., and Grant, P.J., (1998). A common coding polymorphism in the FXIII A-subunit gene (FXIII Val34Leu) affects cross-linking activity. *Thromb. Haemost.*, **80**, 704

Lee, P.L., Gelbart, T., West, C., Halloran, C., Beutler, E., (2002). Seeking candidate mutations that affect iron homeostasis. *Blood Cells Mol Dis*, **29**, 471-487

Lee, P.L., Gelbart, T., West, C., Halloran, C., Felitti, V., Beutler, E., (2001). A study of genes that may modulate the expression of hereditary hemochromatosis: transferrin receptor-1, ferroportin, ceruloplasmin, ferritin light and heavy chains, iron regulatory proteins (IRP)-1 and -2, and hepcidin. *Blood Cells Mol Dis*, **27**, 783-802.

Mayer, W., Jochmann, W., and Partsch, H., (1994). Varicose ulcer: healing in conservative therapy: a prospective study. *Wien. Med. Wochenschr.*, **144**, 250-252.

McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D. et al., (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*, **5**, 299-309.

Meldrum, G.; (2000). Automation for genomics, part two: sequencers, microarrays and future trends. *Genome Res.*, **10**, 1288-1303

Mok, H., Jelinek, J., Pai, S., Cattanach, B.M., Prchal, J.T., Youssoufian, H. et al., (2004). Disruption of ferroportin 1 regulation causes dynamic alterations in iron homeostasis and erythropoiesis in polycythaemia mice. *Development*, **131**, 1859-68.

Moura E, Noordermeer MA, Verhoeven N, Verheul AFM, Marx JJM. Iron release from human monocytes after erythrophagocytosis vitro: an investigation in normal subjects and hereditary haemochromatosis patients. *Blood* 1998;92:2511-19.

Nagy N, Szolnoky G, Szabad G, Bata-Csorgo Z, Dobozy A, Kemeny L, et al. Single nucleotide polymorphisms of the fibroblast growth factor receptor 2 gene in patients with chronic venous insufficiency with leg ulcer. *J Invest Dermatol* 2005;124:1085-8.

Nemeth, E., Ganz, T., (2006). Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr*, **26**, 323-42.

Nicolaides, A.N., (2000). Investigation of chronic venous insufficiency: A consensus statement (France, March 5-9, 1997). *Circulation*; **102**, E126-63

Peschen, M., Thimm, C., Weyl, A., Weiss, J.M., Kurz, H., Augustin, M., Simon, J.C., Schopf, E., Vanscheidt, W., (1998). Possible role of coagulation factor XIII in the pathogenesis of venous leg ulcers. *Vasa*, **27**, 89-93

Pietrangelo, A., (2004). Hereditary hemochromatosis-A new look at an old disease. *N. Engl. J. Med.*, **350**, 2383-2397

Pollak, E. S., Feng, L., Abadian, H., and Fortina, P.; (2001) Microarray-based genetic analyses for studying susceptibility to arterial and venous thrombotic disorders. *Ital. Hearth J.*, **2**, 568-572

Powell, W.C., Matrisan, L.M., (1996). Complex role of metalloproteinases in tumor progression. Attempts to understand metastasis formation. In *Metastasis related molecules*. Springer Verlag, Heidelberg, 1-21.

Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2008;75:346-59.

Raventi, L., and Kahari, V., (2000). Matrix metalloproteinases in wound repair. *Int. J. Mol. Med.*, **6**, 391-407

Risch, N. and Merikangas, K.; (1996) The future of genetics studies of complex human diseases. *Science*, **273**, 1516-1517.

Santacroce, R., Ratti, A., Caroli, F. et al.; (2002) Analysis of clinically relevant single-nucleotide polymorphisms by use of microelectronic array technology. *Clin. Chem.*, **48**, 2124-2130

Scott, H.J., McMullin, G.M., Coleridge Smith, P.D., et al., (1991). A histological study of white blood cells and their association with lipodermatoclerosis and ulceration. *Br. J. Surg.*, **78**, 210-211

Settin, A., El-Bendary, M., Abo-Al-Kassem, R., and El Baz, R., (2006). Molecular analysis of A1AT (S and Z) and HFE (C282Y and H63D) gene mutations in Egyptian cases with HCV liver cirrhosis. *J. Gastrointestin. Liver. Dis.*, **15**, 131-5

Shapiro, S.D., (1998). Matrix metalloproteinases degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 602-608.

Singer, A.J., and Clark, R.A.F., (1999). Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.*, **341**, 738-746

Sosnowski, R., Heller, M.J., Tu, E., Forster, A.H., and Radtkey, R., (2002). Active microelectronic array system for DNA hybridization, genotyping and pharmacogenomic application. *Psychiatric genetics*, **12**, 181-192

Sosnowski, R.G., Tu, E., Butler, W.F., O'Connell, J.P., and Heller M.J.; (1997) Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1119-1123

Southern, E.M., in: Rampal, J. B. (Ed.), (2001,)DNA Arrays: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology:, Humana Press, Totowa, NJ, **170**, 1-15

Thies, H.A., Busch, H., Koch, G., (1967). Postoperative complications due to acquired factor XIII deficiency. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch.*, **87**, 135-40

Tognazzo, S., Gemmati, D., Palazzo, A., Catozzi, L., Carandina, S., Legnaro, A., Tacconi, G., Scapoli, G.L., Zamboni, P., (2006). Prognostic role of factor XIII gene variants in nonhealing venous leg ulcers. *J. Vasc. Surg.*, **44**, 815-819.

Vaalamo, M., Weckroth, M., Puolakkainen, P., et al., (1996).Pattern of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing human cutaneous wounds., *Br. J. Dermatol.*, **135**, 52-59

Waheed, A., Parkkila, S., Zhou, X.Y., et al., (1997). Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta₂-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in cos-7 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 12384-12389

Wang, J.; (2000). Survey and summary: from DNA biosensors to gene chip. *Nucleic Acid Res.*, **28**, 3011-3016

Wallace HJ, Vandongen YK, Stacey MC. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism associated with increased susceptibility to venous leg ulceration. *J Invest Dermatol* 2006;126:921-5.

Weckroth, M., Vaheri, A., Lauharanta, J., et al., (1996). Matrix mettalloproteinases, gelatinase and collagenase, in chronic leg ulcers. *J. Invest. Dermatol.*, **106**, 1119-1124

Westin, L., Miller, C., Vollmer, D., et al.; (2001) Antimicrobial resistance and bacterial identification utilizing a microelectronic chip array. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 1097-1104

Wozniak, G., Noll, T., Brunner, U., Hehrlein, F.W., (1999). Topical treatment of venous ulcer with fibrin stabilizing factor: experimental investigation of effects on vascular permeability. *Vasa*, **28**, 160-3

Yan, C., Boyd, D.D., (2007). Regulation of matrix metalloproteinases gene expression. *J. Cell Physiol.*, **211**, 19-26.

Ye, S., (2000). Polymorphisms in metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.*, **19**, 623-629.

Zacharski, L.R., Chow, B.K., Howes, P.S., Shamayeva, G., Baron, J.A., Dalman, R.L. et al. (2007). Reduction of iron stores and cardiovascular outcomes in patients with peripheral arterial disease: a randomized controlled trial. *JAMA*; **297**, 603-10

Zamboni, P., De Mattei, M., Ongaro, A., Fogato, L., Carandina, S., De Palma, M., Tognazzo, S., Scapoli, G.L., Caruso, A., Liboni, A., and Gemmati, D., (2004). Factor XIII contrasts the effects of metalloproteinases in human dermal fibroblast cultured cells. *Vasc. Endovascular Surg.*, **38**, 431-438

Zamboni, P., Izzo, M, Tognazzo, S., Carandina, S., De Palma, Catozzi, L., Caggiati, A., Scapoli, G.L., and Gemmati, D., (2006). The overlapping of local iron overload and HFE mutation in venous leg ulcer pathogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 1869-1873

Zamboni, P., Tognazzo, S., Izzo, M, Pancaldi, F., Scapoli, G.L., Liboni, A., and Gemmati, D., (2005). Haemochromatosis C282Y gene mutation increases the risk of venous leg ulceration. *J. Vasc. Surg.*, **42**, 309-314.

Zamboni P, Gemmati D. Clinical implications of gene polymorphisms in venous leg ulcer: a model in tissue injury and reparative process. *Thromb Haemost.* 2007;98:131-7. Review.

Zimmet, S., (1999). Venous leg ulcers: modern evaluation and management. *Dermatol. Surg.*, **25**, 236-241.