

COMPITI E SUDDIVISIONE FONDI TRA LE UNITÀ DI RICERCA
prot. 2008X8NRH4

Coordinatore Scientifico	Livia BIANCONE
Ateneo	Università degli Studi di ROMA "Tor Vergata"
Titolo della Ricerca	Identificazione di varianti di suscettibilità e di indicatori di risposta a terapie biologiche in una popolazione adulta e pediatrica di pazienti affetti da malattia di Crohn e Rettocolite Ulcerosa e ricerca di indicatori subclinici di malattia nei parenti asintomatici
Finanziamento assegnato	Euro 127.680
Durata	24 Mesi

**Obiettivo della Ricerca
(come da progetto presentato)**

L'ipotesi di una regolazione geneticamente determinata della risposta immunitaria nelle IBD porta alla ricerca di aplotipi a rischio tesi alla diagnosi precoce ed identificazione di sottogruppi responsivi a terapie immunomodulatorie. Un nostro studio preliminare su una coorte di 190 pazienti con MDC e 190 controlli sani suggerisce che il polimorfismo dell'ICAMI G241R (G657A) e dell'IL-10-571 (C8700A) rappresentino varianti protettive per la MDC e che altri SNPs in altri geni possano modificare le caratteristiche fenotipiche della MDC (Borgiani P et al, Gastroenterology. 2007;133:1049-51). Fra queste, caratteristiche delle lesioni ed età di esordio della MDC. Mutazioni nel gene CARD15, che codifica per una proteina che induce l'attivazione del fattore NF-KB, sono un marker di suscettibilità per la MDC ileale stenotante. Non sono stati effettuati studi multigenici per identificare geni comuni fra diverse malattie immunomediate. L'identificazione di aplotipi comuni potrebbe essere utile nella diagnosi precoce o nelle forme overlap e per decidere l'appropriato regime terapeutico in relazione a polimorfismi genetici che influenzano la risposta alle terapie biologiche.

Obiettivi primari

1. Identificare nuove varianti di suscettibilità per la MDC e RCU, modificanti il fenotipo di malattia e la responsività a terapia immunomodulatorie specifiche.

Obiettivi specifici sono:

1.1 Confermare ed estendere mediante studio multicentrico nazionale, i risultati preliminari in una casistica più elevata (MDC n=500, RCU n=500) e controlli (n=500), analizzando i risultati in relazione al tipo di IBD (MDC vs RCU), mediante l'analisi dei polimorfismi di geni candidati. Questa analisi verrà effettuata con tecnologia RDB e genotipizzazione degli SNPs mediante Real Time PCR per l'identificazione di geni/alleli coinvolti nella patogenesi delle IBD, analizzando geni selezionati sulla base di caratteristiche biologiche, funzionali e di posizione, verranno ricercati aplotipi a rischio o varianti protettive per lo sviluppo di IBD mediante analisi di polimorfismi (SNPs) dei geni che codificano alcuni dei mediatori dell'infiammazione e molecole di adesione coinvolte nella patogenesi delle IBD. Identificare aplotipi di suscettibilità specifici per identificare più rapidamente i pazienti a rischio di MDC e RCU ed effettuare una precoce diagnosi differenziale.

1.2. Effettuare uno studio di associazione per verificare la presenza di alleli di suscettibilità all'IBD associati alla MDC e/o alla RCU, o di geni/alleli che influenzano la malattia in termini di localizzazione, comportamento, età d'esordio, manifestazioni extraintestinali. L'identificazione di alleli di suscettibilità per le IBD potrebbe portare alla identificazione di soggetti a rischio e ad una più tempestiva diagnosi e trattamento delle malattie.

1.3. Studiare le differenze fra le frequenze delle varianti di suscettibilità in relazione all'età d'esordio della malattia. A questo scopo, verranno studiati 300 pazienti con IBD di età pediatrica, in follow up presso l'Unità di Gastroenterologia Pediatrica (Prof. Frediani).

2. Obiettivi secondari

2.1. Ricercare relazioni fra geni candidati e fenotipo di malattia, mediante la costruzione di aplotipi specifici non solo per tipo di IBD (MDC vs RCU) ma per caratteristiche cliniche delle due malattie (MDC: tipo di lesioni, necessità di chirurgia, severità di recidiva; RCU: estensione delle lesioni, severità di decorso, necessità di chirurgia; MDC e RCU: steroide-dipendenza/refrattarietà, familiarità per IBD, età di insorgenza delle IBD, responsività a terapia immunomodulatoria). Verrà valutata la relazione fra aplotipi a rischio ed espressione tissutale di suddette mutazioni, mediante analisi di campioni di tessuto prelevati dalle lesioni intestinali in corso di esami endoscopici o di resezione chirurgica.

A questo scopo, nella stessa coorte di pazienti verranno valutate:

2.1.1. Correlazioni fra pattern di espressione del cluster di geni che codificano per mediatori dell'infiammazione e varianti fenotipiche della MDC. Questo consentirebbe di identificare alla diagnosi, il pattern prevalente e il trattamento più appropriato.

2.1.2. Il ruolo di varianti protettive o di suscettibilità per le IBD nel determinare le caratteristiche fenotipiche delle IBD in termini di severità di decorso, di recidiva ed età di insorgenza. A questo scopo, verranno valutati anche 150 pazienti con MDC e 150 con RCU di età pediatrica, in follow up presso l'Unità di Pediatria (Prof. Frediani).

2.1.3. La relazione fra aplotipi a rischio e responsività a terapie biologiche, quali gli anticorpi anti-TNF α . La relazione fra aplotipi a rischio ed espressione tissutale di suddette mutazioni.

2.1.4. La MDC e la RCU mostrano alcune analogie con altre malattie immunomediate, quali l'Artrite Reumatoide, AR; Artrite Psoriasica, AP; Psoriasi, PsA), responsive, come le IBD a farmaci anti-TNF. In una sottoanalisi (Unità Dr. Borgiani) verranno valutate nuove varianti genetiche di suscettibilità all'AR, AP e PsA rispetto alle IBD. Lo scopo è di identificare geni/alleli coinvolti nella patogenesi dell'AR, AP e PsA, ed identificare:

a. Varianti protettive, suscettibilità o modificanti il fenotipo di malattia per le IBD, AP, PsA.

b. Differenze nel pattern genetico mediante la costruzione di aplotipi specifici sia per ogni malattia, sia per sottogruppi di pazienti; c. identificare aplotipi di predisposizione a sindromi overlap; d. Possibile relazione fra geni candidati e suscettibilità o il fenotipo di malattia tramite l'utilizzo di aplotipi definiti dai polimorfismi localizzati nelle regioni funzionali del gene;

e. Differenze/somiglianze genetiche fra le malattie anche in termini di comportamento e risposta a terapie biologiche.

f. Costruire aplotipi di rischio specifici per ogni malattia, per la diagnosi precoce e identificazione di forme overlap.

g. Caratterizzare l'influenza delle varianti geniche dell'infiammazione nel determinare la risposta alle terapie anti-TNF.

2.1.5. In una popolazione siciliana di 200 pazienti con MDC è stata determinata la frequenza allelica del gene CARD15. Nell'Unità di Palermo (prof. M. Cottone), verrà verificata la frequenza allelica dei polimorfismi Arg381Gln del gene IL-23R e Ala197Thr del gene ATG16L e la loro correlazione con il CARD15 e correlata alla presenza di questi polimorfismi con il decorso clinico della MDC.

2.1.6. Verranno verificate differenze di frequenza delle suddette mutazioni fra popolazione adulta e pediatrica di pazienti con IBD afferente presso l'Unità di pediatria (Prof. Frediani), in cui verrà inoltre:

a. studiata l'associazione tra IBD e mutazioni dei geni IL23R e ATG16L1;

b. studiate le interazioni tra IL23R, ATG16L1 e CARD15;

d. caratterizzato il pattern di espressione trascrizionale e traduzionale dei geni IL23R, IL23 e dell'IL17 in biopsie intestinali;

f. valutate, nelle cellule mononucleari periferiche differenze tra le forme varianti di IL23 (rs11209026, rs7517847) nell'indurre IL17;

g. analizzata l'espressione genica di ATG16L1 nelle cellule epiteliali isolate dalle biopsie.

2.1.7. Valutare la prevalenza di 17 polimorfismi (SNPs) associati alle IBD (Barrett et al. (Nature Gen 2009), in pazienti con MDC, nei loro familiari di I grado, in soggetti non familiari conviventi e controlli sani.

2.1.8. Valutare nei familiari di I grado di pazienti con MDC la prevalenza di aumentata permeabilità intestinale, ispessimento di parete intestinale (Ecografia), di ASCA, pANCA e anti-OmpC, e la loro correlazione con i noti polimorfismi della MDC.

2.1.9. Verificare se l'espressione del recettore E α Ralfa e ERbeta e l'azione del 17beta-estradiolo può influenzare l'attività dell'NF-kB in colture di miofibroblasti di colon di pazienti con CD con polimorfismo IL23R-Arg381Gln e le varianti del CARD15.

Stato dell'arte nel campo (come da progetto presentato)

12.1 La malattia di Crohn (MDC)[MIM 266600] e Rettocolite Ulcerosa (RCU) [MIM 191390] sono malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) ad eziologia sconosciuta, in cui la patogenesi appare legata ad una inappropriata risposta immunitaria, geneticamente determinata, nei confronti della flora batterica. La MDC è caratterizzata da un processo infiammatorio focale e transmurale che può interessare qualunque tratto del canale alimentare, di tipo prevalentemente stenotico, fistolizzante o infiammatorio. Nell'ambito di questa eterogeneità, la MDC mostra caratteristiche omogenee in termini di sede e caratteristiche delle lesioni nell'ambito dello stesso paziente, suggerendo che il fenotipo possa essere geneticamente determinato. La RCU invece interessa il retto con variabile estensione fino al cieco. L'attivazione dei linfociti T e macrofagi, con aumentati livelli di mediatori solubili rilasciati dai linfociti Th1 è una caratteristica della MDC, mentre nella RCU il pattern di risposta immunitaria è meno differenziato. Queste ha portato allo sviluppo di terapie biologiche in grado di modulare l'attività di alcuni dei mediatori coinvolti nella risposta immunoinfiammatoria. Fra questi gli anticorpi anti-TNF α , efficaci in circa due terzi dei pazienti con IBD anche se non esistono indici predittivi di risposta. Il pattern di risposta nella MDC appare correlata a variazioni (SNPs) in geni predisponenti deputati al controllo della risposta immunoinfiammatoria, associati a fattori ambientali. L'ipotesi patogenetica suggerisce che le IBD siano malattie poligeniche correlate e l'identificazione di aplotipi a rischio potrebbe consentire la differenziazione fra le 2 malattie nel 10% dei casi di colite indeterminata, e l'identificazione di sottogruppi responsivi a terapia biologiche. A supporto del ruolo di fattori genetici nello sviluppo della MDC vi sono dati epidemiologici e sperimentali. Fra i primi, l'aumentata prevalenza di MDC in familiari di pazienti con IBD (10%), nei gemelli omozigoti (60-80%) e differente prevalenza in alcune popolazioni. Studi su gemelli e molecolari hanno portato all'identificazione di determinanti genetici di suscettibilità alle IBD.

Le IBD appaiono ad oggi malattie multifattoriali complesse, che presentano una parte dei geni di suscettibilità in comune, ed altri geni di suscettibilità specifici (Frankel A. Nat Genet 2008, The WTCC Nature, 2007; Fierer Sa, Nat Genet 2008; Massey D. Gut 2008)

L'ipotesi di una regolazione geneticamente determinata della risposta immuno- infiammatoria nelle IBD porta alla ricerca di aplotipi a rischio. Abbiamo utilizzato un sistema di genotipizzazione multiplo in grado di studiare simultaneamente 51 polimorfismi di 35 geni codificanti per fattori attivi nell'infiammazione che sono candidati per posizione/funzione. Tale sistema si basa sulla tecnica del "Reverse Dot Blot" su supporto solido con rivelazione colorimetrica, utile nell'identificazione di geni coinvolti nella patogenesi della MDC. Abbiamo effettuato un studio preliminare su 190 pazienti con MDC e 190 controlli sani ed identificato i polimorfismi ICAM1 G241R (G657A) e IL-10 -571 (C8700A) come varianti protettive di malattia e che altri SNPs in altri geni possano modificare le caratteristiche fenotipiche della malattia. ICAM1 è coinvolto nell'adesione leucocitaria sulla superficie endovascolare. L'allele A protettivo riduce il legame con un'integrina che inibisce il rolling e la migrazione del linfocita verso il sito di infiammazione. L'IL-10 inibisce la risposta Th1 mediata caratteristica della MDC. L'allele A aumenta la produzione di IL-10 in tal modo riducendo l'infiammazione Th1 mediata. Infine, polimorfismi in altri geni sembrano poter modificare le caratteristiche fenotipiche della malattia. Dati epidemiologici sulle IBD suggeriscono un forte contributo genetico nella patogenesi ed una ereditarietà familiare che non segue il semplice modello mendeliano. Pertanto, le IBD sono classificate come malattie complesse. Differentemente dalle malattie in cui è coinvolta una sola coppia genica, dove la relazione causale tra mutazione e malattia è chiara, le malattie complesse derivano dall'interazione tra fattori genetici e non genetici. Circa il 30% di tutte le diagnosi di IBD vengono poste durante l'infanzia o adolescenza. Non sono ad oggi noti i meccanismi che regolano l'età di esordio delle IBD. Sebbene non sia stata dimostrata una differente eziopatogenesi nelle IBD pediatriche rispetto a quelle degli adulti, vi sono molte differenze fra le due forme. Le IBD pediatriche, in cui è assente l'influenza di molti fattori ambientali (es. il fumo), possono costituire un modello di studio ideale per la loro unicità sia da un punto di vista clinico che genetico e molecolare.

Diversi studi sulla genetica dell'IBD hanno identificato vari loci di suscettibilità IBD, soprattutto per il MDC (Hugot 1996; Satsangi 1996; Cho 1998; Hampe 1999; Ma 1999; Duerr 2000; Rioux 2001; Vavassori, Borgiani P et al, 2004; Vermeire 2001; Hampe 2002). Mutazioni nel gene CARD15 predispongono alla MDC, ma non rendono conto di tutti i casi e non sono presenti in tutte le popolazioni. Le mutazioni del CARD15 inducono un difetto d'attivazione dell'NF- κ B. Mutazioni del gene CARD15 sono state riportate associate alla MDC ileale stenotica. Tuttavia, questa associazione mostra ampie variabilità geografica, essendo stata anche osservata nella popolazione di pazienti MDC afferenti presso il l'Unità del coordinatore del Progetto (Prof. Biancone). (Vavassori et al., IBD 2004;10:116-21). Differentemente dalla MDC, nella RCU non è stata riportata una associazione con specifiche mutazioni, incluse del gene CARD15. Studi di GWA (genomic wide association) in una coorte di pazienti con MDC hanno riportato le più significative associazioni nel gene CARD15 e nella regione del gene IL23R nel cromosoma 1p31. Nella regione di questo gene la più significativa associazione è stata osservata per il polimorfismo ARG381Gln con il meno comune allele glutamina che conferisce protezione alla MDC. Oltre a questo polimorfismo, addizionali di SNPs sono stati indipendentemente associati con la MDC. L'associazione genetica con il pathway IL-23 coincide con progressi nella comprensione della patogenesi della MDC. L'IL-23 è stata associata con una linea cellulare di CD4 T cells, la linea TH17, coinvolta nella patogenesi del danno tissutale. Le cellule Th17 sono distinte dalle classiche Th1 e Th2 nel pattern citochinico. L'espressione di IL-23 per mezzo del TH17 effettore sembra essere stabile. L'espressione del recettore IL-23 (IL23R) stabilizza e rinforza la linea del Th17 e può svolgere un ruolo rilevante nel mantenimento di queste popolazioni. L'IL-23 amplifica la cascata infiammatoria diretta dalla risposta TH17. La produzione di IL-23 è sinergicamente rafforzata dalla coordinata stimolazione dei membri della famiglia CARD. In un GWA di circa 20000 SNP, è stato riportata una associazione fra polimorfismo del gene ATG16L1 e MDC. La proteina ATG16L1 è espressa nelle cellule epiteliali intestinali e nei CD4+ CD8+ linfociti. Il gene di questa proteina è parte di un pathway autofagico ed è stato implicato nell'eliminazione intracellulare dei batteri. Non è stata documentata un' associazione con il CARD15. Non vi sono dati su queste mutazioni nella MDC nell'area mediterranea.

12.2. Negli ultimi 2 anni l'applicazione delle nuove tecnologie ha permesso molti studi di GWA. Queste ricerche hanno già identificato nuovi geni di suscettibilità, alcuni specifici esclusivamente per la MDC o solo per la RCU; altri invece sono risultati essere geni di suscettibilità IBD (BIBL: vedi sopra) Fra questi ultimi ce ne sono alcuni, quale il gene di IL23R e molti altri che sono risultati contribuire anche alla suscettibilità oltre che alla MDC, anche alla RCU e alla Psoriasi ad altre patologie come l'AR e l'AP (Cargill, Am J Hum Genet 2007, Fisher sa, Nat genet 2008, Wolf N, J Med Genet 2008;45:114-116.). Il gene OCTN è stato associato sia alla MDC che all'AP, dimostrando come le due malattie possano avere dei geni comuni che controllano l'infiammazione. (Ho P, et al., Arthritis and Rheumatism 2005). E' stato inoltre riportato che 7 malattie fra le quali la MDC e l'AR condividono interi "genomic pathways", come la via di trasduzione del segnale del calcio. Nello specifico, MDC e AR hanno, dagli studi di GWA, ben 39 SNPs in comune, fra cui SNPs del gene di PTPN22 e VCAM1 che sembrano essere associati ad entrambe le patologie (Lettre G, Hum Mol Genet. 2008; Torkamani A. Genomics, 2008). L'evidenza che varianti geniche di NLRP3 che codifica per la criopirina, una proteina coinvolta nel controllo dell'infiammazione e che attiva l'IL-1, siano legate sia alla MDC che all'AR è un'ulteriore dimostrazione di come esistano varianti geniche comuni che hanno come risultato un'alterazione nel pattern citochinico e dunque degli equilibri omeostatici che regolano l'infiammazione. (Villani AC, et al., Nat Genet. 2009; Glinsky G.V. Cell Cycle. 2008) PAD4 è un altro gene associato in una popolazione di giapponesi, sia con l'AR che con la RCU, mentre IRF5, inizialmente studiato nell'AR, è stato associato ad entrambe le IBD. (Dideberg V, Hum Mol Genet. 2007).

Queste osservazioni supportano quindi la ricerca di geni comuni a differenti malattie immunomediate al fine di individuare un possibile "common soil" e identificare geni di suscettibilità patologia-specifici. Inoltre, le artriti associate con le IBD e l'AP costituiscono un gruppo di malattie reumatiche correlate e spesso sovrapponibili che insieme con l'AR e con la Psoriasi possono essere trattate mediante farmaci anti-TNF. Una chiara differenziazione fra queste forme patogenetiche, specialmente negli stadi precoci, spesso non può essere possibile, e una comune eziopatogenesi genetica potrebbe essere sospettata. Infine, tale variabilità genetica potrebbe influenzare la risposta clinica ai farmaci anti-TNF nelle varie patologie, con possibili prospettive di applicazioni di farmacogenetica e di "medicina personalizzata"

12.3. Le IBD mostrano stretta ricorrenza familiare che suggerisce la patogenesi genetica. I familiari di primo grado asintomatici presentano una aumentata frequenza di alterazioni tipiche della MDC come l'aumento della permeabilità intestinale e la presenza di autoanticorpi (ad es. anticorpi anti-Saccharomyces cerevisiae, ASCA e pANCA).

Il principale fattore di rischio di IBD è avere un parente di primo grado affetto dalla malattia con un rischio relativo di 25-42 nei parenti affetti da MDC e di 8-15 nella RCU rispetto alla colazione generale, supportando il ruolo di fattori genetici nello sviluppo delle IBD. L'identificazione di markers genetici o subclinici nelle famiglie di soggetti affetti da IBD è stata oggetto in questi ultimi anni di crescente interesse. Il follow up clinico e biochimico dei soggetti apparentemente sani, portatori di questi markers potrebbe infatti contribuire a comprendere meglio il ruolo dei fattori genetici, e contribuire ad identificare agenti infettivi ed ambientali predisponenti le malattie infiammatorie croniche intestinali, nonché ed identificare i fattori legati all'esordio della malattia.

E' noto che i familiari di primo grado asintomatici di primo grado dei pazienti affetti da IBD presentano frequentemente alterazioni tipiche della malattia di Crohn come l'aumento della permeabilità intestinale e la presenza di specifici autoanticorpi (ad es. anticorpi anti-Saccharomyces cerevisiae e pANCA) (15-18). In particolare, è noto che i parenti di primo grado apparentemente sani di pazienti affetti da malattia di Crohn, ma non altri membri della famiglia di soggetti affetti non legati geneticamente, vi è una aumentata permeabilità intestinale comparabile a quella dei pazienti affetti dalla malattia intestinale. Ciò sembra essere associato ad una predisposizione genetica, in particolare è stato osservato una sua associazione con la presenza di mutazione del gene CARD15 (3020insC) (19). Ciò indica che i fattori genetici possono rivestire un ruolo di rilievo nella alterazione della funzione della barriera intestinale nelle famiglie di soggetti affetti da IBD. Analogamente è stato osservato che anche i livelli sierici di ASCA e degli anticorpi anti-OmpC possono essere associati alle varianti del gene NOD2/CARD15. Tuttavia a tale riguardo i risultati sono scarsi e controversi e non esistono ancora dati riguardo alla loro eventuale associazione nei familiari di primo grado di soggetti affetti da IBD (2,20-26). Inoltre, il ruolo delle mutazioni genetiche riscontrate nelle IBD, diverse da quelle del gene NOD2/CARD15, sullo sviluppo di alterazioni biochimiche e subcliniche comunemente riscontrate nelle IBD è ancora da definire.

Non è chiaro se tali alterazioni siano associate ad uno specifico genotipo, né quale sia il loro significato clinico nei soggetti asintomatici. In particolare, non è noto il comportamento l'implicazione clinica di tali alterazioni nel tempo ed, in particolare il rischio di sviluppare una IBD. Infatti, sebbene sia stato ipotizzato che le alterazioni biochimiche delle IBD (l'alterata permeabilità intestinale o la presenza di anticorpi anti-Saccharomyces cerevisiae) conferiscano un aumentato rischio di sviluppare la malattia di Crohn, uno studio prospettico con follow-up a lungo termine di soggetti asintomatici a rischio, che valuti il peso delle alterazioni genetiche

ed ambientali le loro possibili interazioni, non è stato sino ad ora effettuato.

12.4. Gli estrogeni (E2) svolgono "in vitro" attività immunomodulatoria ed entrambi i recettori estrogenici (ER alfa e beta) sono presenti nell'intestino nei linfociti e T, B, macrofagi, fibroblasti, cellule muscolari lisce e mucosa gastrointestinale. L'E2 down-regola l'espressione dei geni dell'infiammazione. La riportata attività antinfiammatoria di E2 è stata attribuita all'interferenza di ERs con l'attività di NF- κ B. Dati clinici circa l'associazione tra IBDs e ormoni sessuali femminili sono contrastanti, mentre contraccettivi orali sembrano essere un fattore di rischio per la MDC.

Criteri di verificabilità (come da progetto presentato)

Al termine dello studio, l'ipotesi di partenza di possibili differenze significative tra le frequenze genotipiche, alleliche ed aplo-tipiche nei casi e nei controlli e nei vari sottogruppi fenotipici, nonché le differenze fra le frequenze genotipiche fra gli osservati e gli attesi assumendo il modello di Hardy-Weinberg verranno valutate utilizzando il Test d'indipendenza di Pearson.

L'associazione lineare verrà calcolata mediante Test di Mantel-Haenszel.

L'analisi dei fattori di rischio verrà valicata utilizzando il Test del Chi quadrato e l'analisi multivariata (regressione logistica). Per ogni O.R. verranno calcolati la probabilità 2-tailed e gli intervalli di confidenza al 95%.

L'analisi molecolare verrà eseguita tramite sequenziamento genico dei frammenti specifici per i polimorfismi da studiare.

Tutti i pazienti prospettivamente studiati sono inseriti in un data base che raccoglierà le seguenti variabili: fumo, sede, durata di malattia, manifestazioni extraintestinali, pattern, CARD15, età alla diagnosi, IL-23r e ATG16L. Gli outcome del decorso saranno l'intervento chirurgico ed il reintervento chirurgico. Verrà eseguita una analisi multivariata delle citate variabili. Le variabili che risulteranno significative all'univariata con un p minore di 0.2 verranno incluse in un modello multivariato usando il modello di COX.

Il riscontro di significative tra le frequenze genotipiche, alleliche ed aplo-tipiche nei casi e nei controlli e nei vari sottogruppi fenotipici valicata da suddetta analisi statistica rappresenterà un elemento di verifica della associazione fra specifici genotipi e MDC e/o RCU. Nell'ambito delle IBD, verranno verificate possibili correlazioni fra specifici genotipi e caratteristiche cliniche del MDC e RCU, nonché possibili differenze in relazione all'età di esordio delle malattie. Analogamente, verrà valutata la associazione con altre patologie immuno-mediate quali la AR, artrite psoriasica e psoriasi. I risultati possono essere validati mediante la analisi dello studio genotipico in relazione alle caratteristiche cliniche dei pazienti, i cui dati sono raccolti nel database comune presso il centro Coordinatore dell'Unità di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva, Università "Tor Vergata" di Roma (Prof. L. Biancone).

La diagnosi di MDC nei parenti non affetti di pazienti con IBD, sospettata sulla base di tests genetici e clinici (Unità prof. Bianchi Porro) verrà verificata mediante esami convenzionali (Colonscopia, esame radiologico seritato dell'intestino tenue)

Elenco delle Unità di Ricerca

Sede dell'Unità Università degli Studi di ROMA "Tor Vergata"

Responsabile Scientifico Livia BIANCONI

Finanziamento assegnato Euro 29.680

Compito dell'Unità (come da progetto presentato)

Presso l'Unità proponente verranno arruolati pazienti con MDC (n=300), RCU (n=300) e controlli sani (n=500) afferenti presso l'Unità di Gastroenterologia dell'Università Tor Vergata di Roma (responsabile Prof. Livia Biancone). Nell'insieme, nelle 4 unità di Gastroenterologia partecipanti allo studio (Prof. Biancone; Prof. Cottone; Prof. Frediani; Prof. Tonelli) verranno arruolati 1000 pazienti con MDC, 1000 con RCU e 1000 controlli sani. Tutti i pazienti saranno in regolare follow up presso i centri di riferimento e la diagnosi sarà stata posta in base a criteri clinici, endoscopici ed istologici convenzionali. Le caratteristiche cliniche dei pazienti verranno riportate in database comune alle 4 Unità, elaborate presso il centro coordinatore (Unità Prof. Biancone). Da ciascun paziente verranno prelevati 10 cc di

sangue in EDTA per l'isolamento del DNA. I campioni verranno posti a -80°C fino all'utilizzo. Tutti i campioni verranno analizzati per la ricerca di genotipi a rischio, presso l'Unità di Genetica, Università Tor Vergata di Roma (Prof. Borgiani). A tale scopo, i campioni congelati verranno trasportati presso l'Unità di genetica in ghiaccio secco. In particolare, è prevista la seguente articolazione del progetto di ricerca ed i seguenti tempi di realizzazione.

I. Nel corso del primo anno dello studio, presso l'Unità di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva, Università "Tor Vergata" di Roma, (Prof. Biancone) verranno svolte le seguenti parti del programma:

A1. Reclutamento, di almeno 300 pazienti con MDC (1000 totali) e 300 con RCU (1000 totali) in regolare follow up. La diagnosi di diagnosi, sede estensione ed attività clinica sarà stata valutata in base a criteri clinici, endoscopici, radiologici convenzionali.

A2. Classificazione di sottogruppi di pazienti con MDC e RCU in base a inserimento di dati clinici in database con parametri clinici comuni alle altre unità incluse nello studio;

A3. Valutazione della risposta clinica a terapie convenzionali, steroideo-dipendenza o steroideo-refrattarietà, reponsività a terapie immunomodulatorei convenzionali e/o terapie biologiche (anticorpi monoclonali anti-TNF).

A4. Reclutamento almeno 500 soggetti volontari sani di controllo, reclutati fra il personale medico, paramedico e tecnici di laboratorio afferenti presso suddetto Centro, il Centro ed i laboratori di genetica e di reumatologia della stessa Università.

A5. Prelevamento da ogni paziente con IBD e controllo sano, di campioni di sangue in EDTA. I campioni verranno congelati a -70°C.

A6. In un sottogruppo di 100 pazienti con MDC, 100 con RCU e 20 controlli (pazienti sottoposto a colonscopia per screening del cancro del colon), saranno prelevati, nel corso di endoscopie o di resezione chirurgica, campioni biotipici di mucosa di ileo e colon lesi o indenni. Tutte le endoscopie nella popolazione adulta verrà effettuata presso il centro di Gastroenterologia (Unità Prof. Biancone: operatore Prof. L. Biancone) ed i pazienti sottoposti a resezione presso la Cattedra di Chirurgia (Unità Prof. Biancone; Dr. G. Sica). Le endoscopie saranno effettuate con videocolonoscopio per adulti (Olympus; Unità Prof. Biancone) in sedazione cosciente i.v. petidina (1-2 mg/kg) e midazolam (0.1 mg/kg) e dopo consenso informato del paziente o degenitori per pazienti età <18 anni.

Dalle biopsie e pezzi operatori di pazienti con MDC, RCU e controlli verrà inoltre effettuato quanto segue:

1. ISOLAMENTO DELLE CELLULE EPITELIALI

Presso l'Unità di Gastroenterologia, Università Tor Vergata, verranno isolate le cellule epiteliali da biopsie endoscopiche e la loro coltivazione "in vitro".

2. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELL'mRNA DEI GENI IL23R, IL23 E IL17 NELLE BIOPSIE MUCOSALI

Nelle stesse cellule epiteliali così isolate verrà estratto l'RNA totale mediante Real Time PCR per l'analisi quantitativa dell'RNA.

3. IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE IL23R, IL23 E IL17 (WESTERN BLOT)

I campioni di mucosa intestinale verranno lisati (vedi metodi) e l'identificazione delle proteine IL23R, IL23 e IL17 valutata mediante western blot (vedi metodi)

4. ISOLAMENTO DELLE CELLULE MONONUCLEATE DI SANGUE PERIFERICO

(PBMNC)

Nella stessa Unità verrà inoltre valutati i livelli di espressione genica di IL17, IL23 e IL23R nelle PBMNC isolate da pazienti portatori delle forme varianti e del gene wild type.

A7. Invio per l'analisi genotipica, i campioni in EDTA congelati in azoto liquido presso l'Unità di Genetica medica (Unità Dr.ssa Paola Borgiani).

Sede dell'Unità	Università degli Studi di ROMA "Tor Vergata"
Responsabile Scientifico	Paola BORGIANI
Finanziamento assegnato	Euro 26.000

Compito dell'Unità (come da progetto presentato)

Ad oggi non sono stati effettuati molti studi multigenici per identificare geni comuni fra diverse malattie immunomediate/infiammatorie. L'identificazione di aplotipi comuni potrebbe risultare utile nel riconoscere rapidamente le diverse distinte forme patogenetiche o le varie forme overlap e per decidere l'appropriato regime terapeutico in relazione a polimorfismi genetici che influenzano la risposta agli anti-TNF.

13.1 La malattia di Crohn e la rettocolite ulcerosa: identificazione di nuove varianti di suscettibilità e modificanti il fenotipo di malattia

Questo lavoro è volto ad identificare nuove varianti di suscettibilità per la MDC e per la RCU.

Questo studio intende estendere i nostri risultati preliminari su una coorte più ampia di pazienti (n=300 MDC, n=300 RCU) confrontati con un gruppo di controllo (n=300).

Questa unità si servirà anche della tecnologia RDB e di genotipizzazione degli SNPs mediante Real Time PCR (sistema Taqman) per l'identificazione di alleli coinvolti nella suscettibilità all'IBD, andando a studiare geni precedentemente selezionati sulla base di caratteristiche biologiche, funzionali e di posizione.

2) Verrà effettuato uno studio di associazione per verificare la presenza di alleli di suscettibilità associati alla MDC e/o alla RCU, o di geni/alleli specifici che influenzano la malattia in termini di localizzazione, del comportamento, età d'esordio, manifestazioni extraintestinali, prognosi alla chirurgia.

3) Saranno identificati aplotipi di suscettibilità specifici per identificare più rapidamente i pazienti a rischio MDC e RCU dando un contributo a una precoce diagnosi differenziale.

4) I pazienti con MDC comprenderanno anche 100 casi pediatrici forniti dall'Unità del Prof. Cucchiara e verranno studiate le differenze fra le frequenze delle varianti di suscettibilità a seconda dell'età d'esordio della malattia.

13.2 La malattia di Crohn, la rettocolite ulcerosa ed altri disordini immunomediate/infiammatori (Artrite Reumatoide, Artrite Psoriasica e Psoriasi) trattati mediante farmaci anti-TNF

Questo lavoro è volto ad identificare nuove varianti genetiche di suscettibilità all'AR, all'AP alla Psoriasi tramite le metodiche precedentemente descritte e di paragonare questi risultati con quelli relativi la MDC e con la RCU.

5) Lo scopo è di identificare geni/alleli coinvolti nella patogenesi dell'AR, dell'AP e della Psoriasi, andando a studiare geni precedentemente selezionati sulla base di caratteristiche biologiche, funzionali e di posizione.

6) Unendo i risultati ottenuti da 1-5 sarà effettuata una valutazione delle differenze/somiglianze genetiche fra le varie malattie immunomediate/infiammatorie, anche in termini di comportamento clinico e risposta ai farmaci biologici.

7) Si verificherà l'esistenza di aplotipi di rischio comuni e specifici per ogni singola malattia, che potranno contribuire alla diagnosi differenziale

8) e per riconoscere le forme overlap.

- Selezione dei pazienti (vedi anche altre Unità operative)

I pazienti IBD e relativi controlli verranno selezionati dalle altre Unità Operative afferenti al Progetto : 100 AR, 100 AP, 100 Psoriasici verranno selezionati anche dalla nostra unità operativa (Dr.ssa Guarino, Dr.ssa Greco e Prof. Perricone) . Si terrà conto anche della terapia con anti-TNF.

- Analisi del DNA:

La nostra Unità analizzerà il DNA genomico dopo estrazione da sangue periferico dei pazienti mediante 2 diverse metodiche:

una metodica basata sulla "Reverse Dot Blot" su supporto solido con rivelazione colorimetrica e l'altra basata sulla tecnica real time PCR.

La Prima tecnica era già stata sperimentata dalla RMS per genotipizzazione di polimorfismi coinvolti nelle suscettibilità per malattie cardiovascolari (Tobin et al., 2004). Nell'RDB l'ibridazione avviene tra un ASO probe "ammino modificato", il quale presenta un NH₂ al 5' terminale, e il DNA bersaglio che durante la PCR viene marcato con un nucleotide biotinilato (dUTP-Botina). L'estrazione di DNA genomico di ciascun campione viene effettuata da sangue periferico, prelevato in una quantità di 5 ml e addizionato con EDTA 0.5% per evitarne la coagulazione. Vengono utilizzate le tecniche standard di estrazione con fenolo/cloroformio e precipitazione etanolica.

I geni si amplificano mediante Polimerase Chain Reaction (PCR) usando una Master Mix comprendente un pannello di primers biotinilati di tutti i geni da analizzare (oltre agli altri componenti necessari per la reazione di PCR).

Le fasi dell'RDB sono:

1) Attivazione della membrana (o filtro), 2) Caricamento degli ASO-probe sulla membrana, 3) Amplificazione del DNA (PCR) e marcatura con Biotina, 4)

Denaturazione, 5) Ibridazione

6) Lavaggi, 7) Incubazione con Streptavidina coniugata con Fosfatasi alcalina, 8) Eliminazione della Streptavidina in eccesso, 9) Colorazione con Color Development Solution

10) Analisi dei risultati. La lettura dei risultati avviene attraverso l'uso di uno scanner e di uno specifico software (StripScan, 5.0) che fornisce direttamente i risultati simultanei dei genotipi

di tutti i loci analizzati, esportabile anche come file Excel.

La seconda tecnica prevede un saggio di discriminazione allelica con ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System. Tale sistema è il risultato della combinazione, in un unico strumento, di un "thermal cycler", di un rivelatore a fluorescenza laser, di software applicativi specifici e della rivoluzionaria tecnologia "TaqMan". La tecnologia del TaqMan assay (5' exonuclease detection assay) consente la rilevazione dell'amplificato simultaneamente alla sua amplificazione. È un saggio di amplificazione modificato in cui, grazie al particolare disegno delle sonde marcate con i fluorocromi e all'attività 5'-3' esonucleasica della AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, è possibile produrre durante la PCR un segnale fluorescente con intensità direttamente proporzionale al target di reazione. Al termine della reazione i risultati sono immediatamente disponibili sul computer, senza ulteriori manipolazioni del campione, eliminando il rischio di contaminazione.

Chimica del TaqMan Assay:

Due coloranti fluorescenti, un colorante reporter (R) e un colorante quencher (Q), sono legati alle sonde costruite in modo complementare al filamento contenente lo SNP da discriminare. Per ogni SNP vengono disegnate due sonde:

1. Sonda 1 complementare all'allele A

2. Sonda 2 complementare all'allele B

Il disegno delle sonde e dei primer avviene mediante utilizzo del programma Primer express. 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Forster, 1948; Lakowicz, 1983). Durante la reazione di PCR le sonde fluorogeniche si annilano alle sequenze complementari tra i siti dei primers forward e reverse. Al momento dell'estensione del filamento solamente le sonde che si sono ibridizzate saranno tagliate dall'attività 5'-3' esonucleasica dell' AmpliTaq Gold DNA

Polymerase ed emetteranno la fluorescenza. Infatti il clivaggio delle sonde ibridizzate determina la separazione del reporter dal quencher cui segue un aumento del segnale di emissione del reporter che sarà registrato ad ogni ciclo dall'ABI 7000. Al termine della reazione di PCR verrà eseguito un saggio di discriminazione allelica post-corsa. Ultimato anche questo ultimo "step" con l'impiego dell'ABI 7000 SDS software sarà possibile determinare rapidamente la componente allelica di ciascun campione analizzato.

- Analisi Statistica

Le differenze tra le frequenze genotipiche, alleliche ed aplotipiche nei casi e nei controlli o nei vari sottogruppi fenotipici, nonché le differenze fra le frequenze

genotipiche fra gli osservati e gli attesi assumendo il modello di Hardy-Weinberg verranno valutate tramite il Test d'indipendenza di Pearson. L'associazione lineare verrà calcolata mediante Test di Mantel-Haenszel. L'analisi dei fattori di rischio verrà inoltre calcolata tramite il Test del Chi quadrato e l'analisi multivariata (regressione logistica). Tutte le analisi statistiche (ed il calcolo dell'O.R.) saranno effettuate mediante l'ausilio di programmi software specifici quali SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences) e GraphPad Prism 4.0. Per ogni O.R. la probabilità 2-tailed e gli intervalli di confidenza al 95% verranno calcolati. La correzione per paragoni multipli sarà effettuata utilizzando il fattore di correzione di Bonferroni moltiplicando il valore di P per il numero delle variabili.

- Analisi degli aplotipi

Gli aplotipi verranno costruiti usando il programma Mendel Software, Department of Biostatistic University of Michigan, Ann Arbor, MI.

- Protezione della Privacy e Riservatezza nella ricerca genetica

Il progetto osserverà i principi e le misure, conformi alle linee guida etico-politiche, per proteggere la privacy e la riservatezza dei dati di ogni singolo individuo ottenuti dalla ricerca genetica nelle seguenti modalità.

- La partecipazione è interamente volontaria e non impedisce la partecipazione ad altre prove cliniche;

- Il soggetto deve firmare espliciti consensi informati prima di prendere parte a qualsiasi ricerca genetica;

- Ai partecipanti verrà reso noto lo specifico utilizzo del proprio campione;

- I dati dei partecipanti sono identificati solo tramite un codice numerico;

- Data la fase iniziale del progetto, nessun risultato sarà fornito ai partecipanti;

- I database sono protetti da due password e soltanto il personale autorizzato ne avrà accesso.

- Una volta confermata l'importanza dei risultati, questi saranno pubblicati e resi disponibili per la Comunità medica in modo tempestivo e responsabile.

Identificazione dei dati e del campione

In questo progetto useremo campioni codificati. In questo caso, ci sono password che consentono di mettere in relazione il campione biologico con i dati clinici (escluso il nome) della persona da cui proviene. Soltanto il ricercatore clinico conosce la password che collega il nome del paziente al primo codice.

Consenso informato della ricerca genetica clinica

Il processo del consenso informato è una componente importante di protezione del soggetto. Attraverso il consenso informato i potenziali partecipanti vengono dettagliatamente informati circa il contributo che la loro partecipazione può dare, gli eventuali rischi e il beneficio personale. Specifici consensi informati firmati saranno richiesti per ogni paziente, prima che sia condotta la ricerca genetica, in osservanza dei decreti e delle leggi vigenti e degli accordi internazionali inerenti la ricerca che coinvolga esseri umani. Il consenso informato è ottenuto e validato attraverso l'approvazione del comitato etico. La struttura del consenso informato include le informazioni relative a:

- Proposta dello studio e scopo della ricerca

- Procedure (ad esempio prelievo del sangue, storia clinica)

- Rischi

- Benefici

- Misure di protezione della privacy dei soggetti e della riservatezza dei dati

- Natura volontaria di partecipazione al progetto ed opzioni di ritiro dal progetto.

Inoltre il consenso informato include la dichiarazione che i soggetti partecipanti non trarranno benefici finanziari dalla partecipazione allo studio.

Sede dell'Unità

Università degli Studi di FIRENZE

Responsabile Scientifico

Ferdinando FICARI

Finanziamento assegnato

Euro 24.000

Compito dell'Unità (come da progetto presentato)

Il meccanismo di azione che guida gli effetti anti-infiammatori degli estrogeni sono stati ampiamente dimostrati in differenti tessuti, e consiste essenzialmente nell'inibizione dell'attività dell'NF-kB: lo scopo del nostro studio sarà quello di valutare se la espressione del recettore ERalfa e ERbeta e l'azione del 17beta-estradiolo possono influenzare l'attività dell'NF-kB e l'espressione delle citochine proinfiammatorie in colture di miofibroblasti di colon derivati da pazienti con CD portatori del polimorfismo IL23R-Arg381Gln e le mutazioni del CARD15 (R702W, G908R, L1007fsinsC). In questo modo sarà possibile effettuare una correlazione tra i suddetti polimorfismi con l'espressione delle citochine proinfiammatorie e con la diversa capacità dell'estrogeno di ridurre l'espressione delle citochine in cellule derivate da pazienti con i diversi polimorfismi. Mentre il ruolo di IL-17 nell'indurre la secrezione di IL-6, IL-8 e MCP-1 nei miofibroblasti umani di colon normale è stata descritta, confermando un ruolo centrale di queste risposte nella patogenesi della infiammazione intestinale (11), c'è poca informazione disponibile riguardo alle funzioni immunologiche dei miofibroblasti umani derivati da colon affetto da Crohn, visto che sono disponibili solo modelli di IBDs murini o di ratto (30, 31).

Lo studio si articolerà in:

Prima fase.

1) Arruolare almeno 180 pazienti affetti da IBD e destinati ad interventi chirurgico, oltre ad un adeguato numero di controlli.

2) Analisi del polimorfismo IL23RArg381Gln e delle varianti del CARD15/NOD2 (R702W, G908R, L1007fsinsC) su pazienti non IBD (controllo), pazienti con UC (controllo) e da CD. L'analisi verrà effettuata tramite sequenziamento automatico capillare

Seconda fase: studi "in vitro"

3) Selezionare frammenti di tessuto di colon di pazienti affetti da IBD sottoposti ad intervento chirurgico oltre che selezionare un adeguato numero di pazienti non IBD.

4) Studio dell'espressione di ERalfa e ERbeta in miofibroblasti intestinali di pazienti non-IBD, con UC e CD aventi i suddetti polimorfismi. Lo studio sarà effettuato mediante QRT-PCR e western blotting.

5) Dato che vari studi sottolineano un differente ruolo giocato dall'espressione del ERalfa e ERbeta in vari modelli di infiammazione "in vitro" e "in vivo", imputando a ERalfa e ERbeta un ruolo protettivo o induttivo dell'infiammazione (25-28), sarà effettuata una correlazione tra la espressione di ERalfa e ERbeta e quella delle citochine proinfiammatorie IL-1, IL-6, IL-8 e TNFalfa in miofibroblasti di colon derivati da pazienti non-IBD, con UC e CD aventi i suddetti polimorfismi. Lo studio verrà effettuato con QRT-PCR e western blotting

6) Per valutare l'effetto dell'estrogeno nel ridurre la infiammazione miofibroblasti di colon di pazienti non-IBD, con UC e CD aventi i suddetti polimorfismi saranno coltivati in presenza e assenza di 17beta-estradiolo: sarà quindi studiata la possibile inibizione dell'attività dell' NF-kB da parte dell'estrogeno e di conseguenza la ridotta espressione di IL-1, IL-6, IL-8 e TNFalfa. Lo studio verrà condotto mediante electrophoretic gel mobility assay, QRT-PCR e western blotting. In questo modo, se si dimostrerà una diversa espressione delle citochine proinfiammatorie, le colture primarie di miofibroblasti intestinali derivati da IBD potrebbero diventare un buon modello "in vitro" per la caratterizzazione di tali patologie.

7) Un altro aspetto che sarà valutato è se l'azione di NF-kB nei miofibroblasti intestinali di pazienti non-IBD, con UC e CD portatori dei suddetti polimorfismi può essere ridotta da molecole che selettivamente inibiscono la sua attività trascrizionale legandosi a ERs, ma che sono prive della consueta attività estrogenica, come ad esempio WAY-169916 che è un potente agente antinfiammatorio "in vivo" e "in vitro". Il possibile uso di molecole con attività antinfiammatoria senza gli effetti collaterali associati con l'uso dei glucocorticoidi o degli estrogeni può essere terapeuticamente utile nel trattamento delle IBDs. Così i miofibroblasti stimolati con WAY-169916 e con 17beta-estradiolo saranno analizzati per valutare l'attività di NF-kB e l'espressione delle citochine nelle due diverse condizioni; inoltre l'eventuale inibizione dell'attività di WAY-169916 da parte dell' ICI dimostrerà che effettivamente WAY-169916 funziona in maniera ER-dipendente. Lo studio verrà condotto mediante electrophoretic gel mobility assay, QRT-PCR e western blotting.

8) Studio dell'espressione dei fattori necessari al reclutamento delle cellule immunitarie, come granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), in miofibroblasti intestinali derivati da pazienti non-IBD, con UC e CD aventi i suddetti polimorfismi. Lo studio sarà condotto con QRT-PCR e western blotting.

terza fase: studi "ex-vivo" . Analisi dell'espressione dei ERs e delle citochine infiammatorie nei tessuti intestinali derivati da pazienti non-IBD, con UC e CD aventi i suddetti polimorfismi.

MATERIALI E METODI.

- 1) Reclutamento dei pazienti. 180 pazienti affetti da IBD e destinati ad intervento chirurgico saranno raccolti presso l'Unità di Chirurgia dell'Università di Firenze, diretta dal Prof. Francesco Tonelli. La diagnosi sarà fatta secondo criteri convenzionali che prevedono indagine endoscopica, istologia e radiologica. Pazienti affetti da altre malattie autoimmuni concomitanti saranno esclusi. Tutti i soggetti dovranno fornire il consenso informato firmato. Sarà reclutato anche un adeguato numero di controlli.
- 2) Analisi dei polimorfismi. IL polimorfismo IL23RArg381Gln. Questo polimorfismo sarà analizzato per discriminazione allelica usando la tecnica TaqMan e specifiche sonde MGB (code C_1272298_10; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e ABI PRISM 7000. L'equilibrio di Hardy-Weinberg per ciascun SNP sarà testato con il test di Pearson X2 così come il confronto delle frequenze genotipi/alleli tra caso controllo.
- 3) Analisi dei polimorfismi. Varianti del gene CARD15/NOD2. Un campione di sangue venoso sarà ottenuto da pazienti e controlli. Il DNA sarà estratto con NucleoSpin Blood QuickPure, (Mackerey-Nagel, Duren, Germany) da 3 ml di sangue intero e la reazione di PCR per il gene NOD2/CARD15 sarà eseguita per l'analisi dei seguenti polimorfismi R702W, G908R, L1007fsinsC. I primers saranno scelti sottoponendo le sequenze esoniche al sito www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3_www.cgi web site. I prodotti di PCR saranno purificati (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche Basel, Switzerland) e usati nella reazione di sequenziamento (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits, Perkin-Elmer Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) seguendo le istruzioni fornite dalla ditta. I frammenti saranno analizzati usando un sequenziatore ABI 3100 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e le sequenze saranno confrontate con quelle pubblicate per il NOD2/CARD15 (GenBank accession number AF 178930) usando Sequence Navigator analysis software (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Per la variante G908 i prodotti di PCR saranno digeriti con HhaI e dopo 4 ore di incubazione a 37°C, i campioni saranno corsi su gel di agarosio al 2,5% per permettere la separazione dei frammenti.
- 4) QRT-PCR. RNA totale sarà ottenuto da 2x10⁶ cellule usando "RNAwiz isaolation reagent" (Ambion, Austin, TX) e seguendo le istruzioni fornite dalla ditta. 10µg di RNA totale di ciascun campione sarà trattato con DNAasi con DNA-free kit (Ambion, Austin, TX, USA) e 10ng/µl saranno preparati per la successiva reazione di QRT-PCR. 2 µl di di RNA saranno amplificati usando one-step Brilliant® SYBER® Green QRT-PCR Master Mix kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) e saranno usati 200 nM degli appropriati primers forward e reverse. Le reazioni saranno eseguite in MX3000P multiplex quantitative PCR (Stratagene, La Jolla, CA, USA). I dati saranno analizzati usando MXPro™ QPCR software.
- 5) Western blotting. Cellule e tessuti saranno lisati (M-PER Mammalian protein extraction reagent, Pierce, Rockford, USA). Aliquote di campione di circa 50 µg di proteina saranno corsi su un gel di poliaccrilamide-SDS (SDS-PAGE) (12%) ed elettro-trasferito su membrana di nitrocellulosa. Le membrane saranno incubate per 1 ora a temperatura ambiente con una diluizione 1:100 di anticorpo primario per ciascuna delle citochine e per un gene housekeeping. Le membrane saranno sottoposte a lavaggio e quindi incubate con una diluizione 1:5000 di un anticorpo secondario fluorescente IRDye™ TM 800 (Molecular Probes, Rockland Immunochemicals, Pennsylvania, USA) e/o Alexa Fluor 700 (Molecular Probes, Oregon, USA), incubati al buio. Le immagini saranno acquisite con Odyssey Infrared Imaging System e sarà eseguita l'analisi quantitativa con il software dell'Odyssey, come specificato nel manuale fornito dalla ditta.
- 6) Colture primarie. Frammenti prelevati dal pezzo operatorio da pazienti sani e pazienti CD con entrambe le varianti alleliche, saranno raccolti in tubi sterili con mezzo di coltura a temperatura ambiente e trasferiti in laboratorio dove saranno ridotti in piccoli frammenti (1-4 mm²) con l'utilizzo di bisturi e forbici. I frammenti saranno trasferiti in una capsula Petri e lasciati aderire, dopo di che saranno coperti da mezzo di coltura e incubati in un incubatore per cellule a 37°C in atmosfera umidificata al 5% CO₂. Le cellule originate dai frammenti saranno coltivate fino a confluenza e staccate con una soluzione di tripsina /EDTA.
- 7) Stimolazione delle cellule con 17beta-estradiolo e altre molecole. I miofibroblasti saranno coltivati in mezzo di coltura completo e dopo 24 ore saranno lavati con PBS, stimolati in terreno privo di phenol-red, come ad esempio Optimum I (GIBCO) addizionato dell'1% di CS-FCS, 0.1% DMF, 0.1% etanolo e appropriate concentrazioni di 17beta-estradiol (1pM-1µM) per un adatto periodo di tempo e incubate a 37°C in atmosfera al 5% CO₂. Le cellule saranno quindi staccate e lisate per l'estrazione delle proteine come descritto al punto 5).
- 8) Estratti nucleari e electrophoretic gel mobility shift assays. Estratti nucleari saranno preparati da miofibroblasti derivati da tessuti di pazienti sani e CD con entrambi le varianti alleliche. Sarà usato un oligo di consenso per il nuclear factor AGTTGAGGGGACTTCCAGC. Gli oligonucleotidi saranno marcati all'estremità 5' con T4 polynucleotide chinasi (Promega) e [32P]ATP (Amersham). La reazione di binding sarà eseguita come precedentemente descritto (22). Antisieri che specificamente riconoscono ciascun fattore trascrizionale saranno forniti da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Esperimenti con oligonucleotidi non marcati saranno usati in eccesso di 100 volte rispetto a quelli marcati.

Sede dell'Unità	Università degli Studi di MILANO (CESSATO DAL SERVIZIO)
Responsabile Scientifico	Gabriele BIANCHI PORRO
Finanziamento assegnato	Euro 24.000

**Compito dell'Unità
(come da progetto presentato)**

SCOPI DELLO STUDIO

Scopi primari

- 1) Valutare e confrontare la prevalenza di 17 diversi polimorfismi (SNPs) significativamente associati alle IBD, come riportato nella metanalisi di Barrett et al. (Barrett et al. Nat Genet 2009), nei pazienti affetti da malattia di Crohn, in loro familiari consanguinei di primo grado e in soggetti conviventi non consanguinei e controlli sani.
- 2) Valutare nei familiari di primo grado di pazienti affetti da malattia di Crohn la prevalenza di marker biochimici della malattia di Crohn come l'aumentata permeabilità intestinale e la presenza di anticorpi anti-Saccharomyces cerevisiae, ALCA, AMCA, pANCA e anti-OmpC, e la loro correlazione con i polimorfismi noti della malattia.
- 3) Valutare con metodiche non invasive la presenza di alterazioni subcliniche correlate alla malattia di Crohn come flogosi della parete intestinale (rilevabili mediante ecografia intestinale ed il dosaggio della calprotectina fecale), la proteina C reattiva e la velocità di eritrosedimentazione e valutare questi parametri prospetticamente in un follow-up di 2 anni.

Scopi secondari

- 1) Istituire un database di soggetti asintomatici (parenti di primo grado di pazienti affetti da malattia di Crohn, parenti non legati geneticamente ai pazienti affetti e soggetti di controllo) a rischio genetico per malattia di Crohn da seguire prospetticamente dal punto di vista clinico, biochimico ed ecografico.
- 2) Valutare e confrontare l'incidenza della malattia di Crohn tra i soggetti con caratteristiche genotipiche e fenotipiche a rischio di IBD e i soggetti senza tali caratteristiche.
- 3) Ricercare nei soggetti con insorgenza o diagnosi di malattia di Crohn durante il follow-up eventuali concause infettive, implicate nell'esordio della malattia.

PAZIENTI E METODI

DISEGNO DELLO STUDIO
Il progetto comprende due fasi distinte:

1) La prima è rappresentata da uno studio epidemiologico caso - controllo.

2) La seconda è rappresentata da uno studio prospettico.

Casi: Saranno rappresentati da 200 pazienti affetti da malattia di Crohn e da 200 loro familiari di primo grado.

Controlli: Saranno 200 congiunti o conviventi non consanguinei dei pazienti affetti da malattia di Crohn e 200 controlli sani, comparabili per sesso ed età.

Casi e controlli saranno arruolati consecutivamente presso l'ambulatorio IBD ed il reparto della Cattedra di Gastroenterologia dell'Ospedale "L.Sacco" ove sono regolarmente seguiti oltre 2000 pazienti affetti da malattia di Crohn.

I familiari di primo grado dei pazienti saranno contattati direttamente o telefonicamente, ed invitati a partecipare allo studio.

Per ciascun soggetto che aderirà allo studio è previsto:

a) consenso informato scritto alla partecipazione allo studio

b) la raccolta di un questionario comprendente la storia clinica del paziente, le abitudini dietetiche, la presenza di eventuali sintomi e solo nei pazienti affetti da malattia di Crohn, le caratteristiche della malattia e la sua valutazione clinica attuale

c) raccolta di campioni di sangue per la valutazione dei markers biochimici e la valutazione delle mutazioni genetiche a rischio di malattia di Crohn

d) raccolta di un campione di feci per la determinazione della calprotectina fecale

e) ecografia intestinale

f) l'esecuzione di test di permeabilità intestinale mediante lattulosio e mannitolo mediante raccolta delle urine

PAZIENTI

Criteri di inclusione

Casi: 200 pazienti affetti da malattia di Crohn e da 200 loro familiari di primo grado.

Controlli: 200 congiunti o conviventi non consanguinei dei pazienti affetti da malattia di Crohn e 200 controlli sani, comparabili per sesso ed età.

Età compresa tra 18 anni e 70 anni

Criteri di esclusione

Nota o sospetta diagnosi di IBD o presenza di sintomatologia addominale sospetta per tale malattia nei familiari di primo grado e nei conviventi sani dei pazienti affetti da malattia di Crohn

Colite indeterminata

METODI

I dati clinici nei casi e nei controlli saranno raccolti con un questionario standardizzato.

Nei pazienti affetti da malattia di Crohn saranno valutati inoltre la sede, l'estensione e l'età all'esordio ed il comportamento della malattia.

Questionario

I casi eleggibili e i controlli che accetteranno di partecipare allo studio, completeranno un questionario sotto la supervisione di un intervistatore addestrato. Saranno rilevati dati riguardanti le misure antropometriche (BMI), abitudine al fumo e all'alcol, abitudini dietetiche e altre caratteristiche dello stile di vita, variabili socio-demografiche e cliniche.

Saranno rilevate durata e caratteristiche di eventuali sintomi intestinali presenti o pregressi e di sintomi dispeptici.

Sarà studiato il consumo abituale di 10 tipi di gruppi di cibo (latte, carne, carote, vegetali crudi, frutti, uova, carne conservata, pesce, formaggio e cereali), secondo quattro categorie (meno di 3 volte al mese, 1 o 2-3 volte per settimana, e 4 o più volte alla settimana).

L'abitudine al fumo sarà stimata sulla base del numero medio di sigarette fumate al giorno. Per l'analisi, saranno definite quattro categorie come segue: non fumatore, ex fumatore, fumatori di 20 sig. / giorno e fumatori di >20 sig. / giorno. I fumatori saranno definiti come individui che avevano fumato almeno una sigaretta o un sigaro al giorno per almeno un anno ed ex fumatori coloro che avevano smesso di fumare da almeno un anno, prima dello studio.

Il consumo di alcol quotidiano sarà calcolato stimando l'ammontare di etanolo presente in ciascuna bibita alcolica bevuta giornalmente. L'occupazione abituale sarà raggruppata in 4 categorie del lavoro: professionisti (ad es. imprenditori e dirigenti), impiegati (ad es. impiegati, personale medico, insegnanti, commercianti, artigiani), lavoratori manuali (ad es. lavoratori specializzati, agricoltori, bottegai, camerieri) e lavoratori non specializzati.

Esami biochimici

Per ciascun soggetto incluso nello studio verrà prelevato un campione di sangue venoso per l'analisi dei polimorfismi a rischio di malattia di Crohn, e gli anticorpi IgG anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA), anticorpi antineutrofili citoplasmatici (ANCA), ALCA, AMCA e anticorpi anti-OmpC oltre a proteina C reattiva e VES. Sarà inoltre raccolto campioni di feci per la determinazione della calprotectina.

Le determinazioni dei markers biochimici saranno effettuate utilizzando kit commerciali.

Analisi dei polimorfismi a rischio

Verranno analizzati i 17 polimorfismi (SNPs) presenti sugli 11 loci di suscettibilità individuati nel lavoro di meta-analisi di Barrett (Barrett et al. Nat Genet.

2008;40:955-62), mediante la tecnica di discriminazione allelica TaqMan (Applied Biosystem). La metodica utilizza l'attività 5' esonucleasica della Taq DNA

Polimerase in combinazione con una PCR di ibridazione competitiva. Le reazioni di PCR saranno effettuate in ABI7700 sequence detector utilizzando 1X TaqMan Universal PCR Master Mix, 1X Genotyping Assay Mix e 50 ng DNA genomico in un volume totale di 15 ul. Dopo una iniziale denaturazione a 50 °C per 2 minuti e 10 minuti a 94 °C, la reazione verrà amplificata per 40 cicli (15 secondi a 94 °C, 60 secondi a 60°C).

Il DNA genomico sarà estratto da sangue periferico utilizzando kit commerciali (Qiagen).

L'analisi dei polimorfismi verrà effettuata con la collaborazione del Laboratorio di ricerca e della Divisione di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva della casa del Sollievo e della Sofferenza di S.Giovanni Rotondo (Dir. Dr. Vito Annesse), un centro ad alto livello e con nota esperienza internazionale nella determinazione dei polimorfismi associati alle malattie infiammatorie croniche intestinali.

L'analisi statistica dei dati, sarà effettuata mediante test di Hardy-Weinberg. Il linkage disequilibrium, l'analisi degli aplotipi, il rischio cumulativo prospettico, la correlazione genotipo/fenotipo saranno effettuati utilizzando i software Arlequin, SPSS e Haploview.

Ecografia intestinale

L'ecografia sarà effettuata da operatori esperti nella valutazione delle pareti intestinali e con strumentazione ecografica di ultima generazione.

L'esame sarà effettuato senza preparazione intestinale, e senza ricorrere a spasmolitici o introduzione intraluminale di acqua.

Sarà definita patologica o dubbia per la presenza di malattia infiammatoria intestinale la presenza di pareti intestinali con spessore superiore a 4,5 mm.

Ai pazienti con alterazioni ecografiche, sintomatologia minima o alterazioni della calprotectina fecale sarà offerta l'opportunità di effettuare ileocolonscopia con biopsie.

Test di permeabilità intestinale con lattulosio e mannitolo

Il test sarà condotto come riportato in letteratura (Buher et al. Gut 2006) mediante somministrazione serale di lattulosio e mannitolo seguita dalla raccolta delle urine notturne.

Sede dell'Unità	Università degli Studi di ROMA "La Sapienza" (CESSATO DAL SERVIZIO)
Responsabile Scientifico	Tullio FREDIANI
Finanziamento assegnato	Euro 24.000

Compito dell'Unità (come da progetto presentato)

Testo italiano

Lo studio sarà eseguito su pazienti pediatriche con MC a CU in fase attiva e su un adeguato gruppo di controllo ed avrà i seguenti obiettivi:

- studiare l'associazione tra le forme varianti dei geni candidati IL23R e ATG16L1 e le IBD;
- studiare le interazioni genetiche tra IL23R, ATG16L1 e CARD15;
- caratterizzare il pattern di espressione trascrizionale e traduzionale dei geni IL23R, IL23 e della citochina conseguentemente indotta, IL17, in biopsie mucosali prelevate endoscopicamente dai pazienti;
- valutare, nelle cellule mononucleari del sangue prelevato dai pazienti, eventuali differenze tra le forme varianti di IL23 (rs11209026, rs7517847) nell'indurre IL17;
- analizzare l'espressione genica di ATG16L1 nelle cellule epiteliali isolate dalle biopsie.

Dal 2005 esiste una collaborazione tra l'Unità di Gastroenterologia e Epatologia Pediatrica della "Sapienza" Università di Roma (coordinata dal Prof. Salvatore Cucchiara) e la Sezione di Tossicologia e Scienze Biomediche dell'ENEA (Ente Nazionale per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente) per lo studio dell'immunità innata intestinale in bambini con IBD. Lo studio oggetto del protocollo di ricerca coinvolgerà la suddetta Sezione e sarà coordinata dalle dott.sse Laura Stronati e Anna Negroni.

L'Unità di Gastroenterologia e Epatologia Pediatrica della "Sapienza" Università di Roma ha un'esperienza eccellente nel campo della genetica e della biologia molecolare delle IBD pediatriche, come documentato dalle seguenti pubblicazioni:

- Parrello T, Monteleone G, Cucchiara S. Up-regulation of IL-12 beta 2 chain in Crohn's disease. *Journal of Immunology* 2000;15:7234-7239.
 - Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease. *The Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2007;44:171-9
 - Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O et al. Role of CARD15, DLG5 and OCTN genes polymorphisms in children with inflammatory bowel diseases. *World Journal Gastroenterology* 2007;3:1221-9
 - Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Vecchi M, D'Inca R, Guagnozzi D, Tonelli F, Cucchiara S et al. Sequential evaluation of thiopurine methyltransferase, inosine triphosphate pyrophosphatase, and HPR1 genes polymorphisms to explain thiopurines' toxicity and efficacy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2007;26:737-45
 - Levine A, Kugathasan S, Annese V, Biank V, Leshinsky-Silver E, Davidovich O, Kimmel G, Shamir R, Orazio P, Karban A, Broeckel U, Cucchiara S. Pediatric onset Crohn's colitis is characterized by genotype-dependent age-related susceptibility. *Inflammatory Bowel Disease* 2007, in press
 - Stronati L, Cucchiara S, Negroni A et al. Mucosal Nod2 expression and NFkB activation in pediatric Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Disease* 2007, in press.
- Saranno studiati 300 pazienti (range età: 3-16 anni) con MC e CU, riferiti all'Unità di Gastroenterologia e Epatologia Pediatrica della "Sapienza" Università di Roma. Il work-up diagnostico sarà eseguito secondo protocolli internazionali unanimemente accettati, che prevedono la diagnosi definitiva di IBD attiva basata principalmente sulla valutazione endoscopica e istologica dell'intestino e la esclusione di malattie infettive, sistemiche e immunologiche (Hill et al, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40:1-19). Verrà utilizzata la classificazione di Montreal per la malattia di Crohn (Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19:5-36).
- Per tutti i pazienti verranno prese in considerazione le seguenti caratteristiche cliniche: storia familiare, età alla diagnosi, durata del follow-up, in caso di MC sia la localizzazione (ileale, ileo-colonica, colonica, tratto GI superiore) che il tipo di malattia (fistolizzante, stenotante, infiammatorio [non-fistolizzante e non-stenotante]), in caso di CU l'estensione (proctosigmoide, colite sinistra, pancolite), presenza di fistole perianali, manifestazioni extra-intestinali (presenza o assenza di manifestazioni extra-intestinali, in particolare di artropatia), pregressi interventi chirurgici addominali (colectomia nel caso della colite ulcerosa e resezione intestinale nella MC). Considerando le possibili alterazioni delle caratteristiche cliniche durante il decorso della malattia, saranno inclusi nell'analisi genotipo/fenotipo solo pazienti con almeno tre anni di follow-up dalla comparsa dei sintomi ed almeno un anno di follow-up dalla diagnosi certa. Un adeguato gruppo di controllo sarà costituito da una popolazione di 100 bambini sottoposti ad investigazione per sintomi addominali ricorrenti, non dovuti ad allergie alimentari, malassorbimento o infiammazione idiopatica.
- In un sottogruppo di 20 bambini con MC attiva e 20 controlli, saranno prelevati nel corso di endoscopie gastrointestinali campioni di mucosa ileale e colonica. Le endoscopie saranno effettuate con un videocolonoscopio pediatrico (Pentax, Amburgo, Germania) dopo sedazione cosciente con i.v. petidina (1-2 mg/kg) e midazolam (0.1 mg/kg) e dopo consenso informato dei genitori.

1. STUDIO DEL GENOTIPO

Campioni di DNA genomico saranno ottenuti da linfociti di sangue periferico in accordo ai protocolli standard. Saranno sottoposti a screening gli SNPs rs11209026, rs7517847 (IL23R), and rs2241880 (ATG16L1, T300A) utilizzando il saggio Applied Biosystems 7700 TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le forme varianti di CARD15 (R702W, L1007fsinsC, e G908W) saranno determinate utilizzando la tecnica cromatografica DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) (Wave System, Transgenomic Ltd, UK) e l'analisi dei polimorfismi (RFLP)(G908R), come descritto in Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, et al, *Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:171-9).

Le reazioni di PCR del saggio TaqMan saranno effettuate in un volume totale di 5 microl seguendo il seguente protocollo di amplificazione: un ciclo di denaturazione a 95 °C per 10 min, seguito da 40 cicli di denaturazione a 92°C per 15 sec, avvolgimento e allungamento a 60°C per 60sec. Dopo la PCR, il genotipo di ciascun campione sarà automaticamente attribuito, misurando la fluorescenza allele-specifica nel Sequence Detection System ABI Prism 7700, utilizzando il software SDS 1.3.1 per la discriminazione allelica (Applied Biosystem). Il genotipo ottenuto con il saggio di discriminazione allelica TaqMan sarà confermato dal sequenziamento diretto di campioni selezionati di ciascun genotipo, utilizzando l'Analizzatore Genetico ABI Prism 3100 (Applied Biosystem). 96 campioni di controllo per ciascun SNP saranno tipizzati due volte, per verificare la correttezza della genotipizzazione, mostrando il 99% di genotipi identici.

2. TRATTAMENTO DELLE BIOPSIE MUCOSALI

I campioni di biopsie mucosali saranno conservati in RNA Later (Ambion, Austin, TX, USA), prima di procedere all'estrazione dell'RNA. I campioni per l'analisi delle proteine saranno congelati in azoto liquido, immediatamente dopo il prelievo.

3. ISOLAMENTO DELLE CELLULE EPITELIALI PRIMARIE

Il fattore ATG16L1 è ampiamente espresso nell'epitelio intestinale (Xavier RJ and Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Nature* 2007;448:427-434). Pertanto, l'espressione di ATG16L1 verrà analizzata nelle cellule epiteliali intestinali isolate dalle biopsie di un sottogruppo di 10 bambini con MC e confrontata con un adeguato gruppo di controllo.

L'isolamento delle cripte epiteliali sarà effettuato da biopsie endoscopiche di un gruppo di dieci bambini con CD attiva, e di un adeguato gruppo di controllo. La mucosa, dopo essere stata lavata in soluzione tamponata (PBS), sarà trattata con 1.5 mM EDTA in soluzione salina di Hanks priva di calcio e magnesio e agitata per 10' a 37°C. Verrà scartato il sovrantante contenente i detriti cellulari e la maggior parte delle cellule dei villi. Dopo avere ripetuto questo passaggio, la mucosa sarà agitata in vortex e lasciata sedimentare per 15 min. Infine le cellule saranno raccolte e lavate due volte in PBS.

4. ESPRESSIONE DELL'mRNA DEI GENI IL23R, IL23 E IL17 NELLE BIOPSIE MUCOSALI

1) Estrazione dell'RNA totale

Per l'estrazione dell'RNA totale dalle biopsie intere e dalle cellule isolate verrà utilizzato l' Rneasy kit della Qiagen (Qiagen, Germany). Il protocollo prevede l'aggiunta alle cellule di 350 microl di un tampone di lisi RLT contenente 10 microl/ml di beta-mercaptoetanolo, seguita da 250 microl di etanolo 100%. L'intero volume viene applicato alla colonna e centrifugato ad alta velocità per 1 min. Dopo avere scartato il liquido defluito dalla colonna, si ripete il passaggio. Dopo avere trasferito la colonna in una nuova provetta eppendorf, si eluisce l'RNA con 50 microl di H2O2 trattata con dietilpyrocarbonato (DEPC) e si conserva a -20 °C. L'RNA totale estratto sarà analizzato mediante elettroforesi in gel di agarosio e quantizzato e mediante spettrofotometro.

2) Real Time PCR per l'analisi quantitativa dell'RNA

Il cDNA sarà sintetizzato a partire da 1 microg di RNA totale, utilizzando il Superscript 3 First Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). I livelli di espressione genica e del controllo interno beta-actina saranno analizzati mediante PCR quantitativa utilizzando il SYBR Green (Applied Biosystem, Foster City, CA, Usa), primers gene-specifici e un sistema di rilevamento di sequenze *Abi-Prism 7300* (Applied Biosystem). Le amplificazioni saranno effettuate in 25 microl di volume totale contenete 2x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), 250 nM di ciascun primer e 2,5 microl di cDNA. Tutte le reazioni saranno ripetute due volte. Si utilizzeranno i seguenti parametri di amplificazione: 50°C per 2 min, 10 min a 95°C, seguiti da 40 cicli composti ciascuno da 15s a 95°C e 60s a 60°C. Ciascun ciclo di reazioni conterrà sia controlli negativi che positivi. I valori del ciclo soglia saranno calcolati in base ai grafici delle amplificazioni e i valori di espressione genica saranno normalizzati per l'espressione del controllo endogeno beta-actina. Le coppie di primer specifici per ogni gene sono state individuate utilizzando il Software Primer Express V.3.0 fornito dall'Applied Biosystem. Le sequenze dei primers sono: per IL23R: forward 5'-ACAGGGCACCTTACTTCTGACAA -3', reverse 5'-AGCAAAGACGATCATTCCCAAT -3'; per IL23 forward: 5'-TTCTGCTTGCAAAGGATCCA-3, reverse: 5'-TCCGATCCTAGCAGCTTCTCA -3'; per IL17 forward: 5'-GGAACGTGGACTACCACATGAA-3', reverse: 5'GCGCAGGACCAGGATCTCT-3'; per ATG16L1 forward 5'-TGGACAATGCGCGGATT -3', reverse 5'-GCGTAGATCCAGAGTTTGAGAGT-3' per beta-actina forward 5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3', reverse 5'-ACTGTGTTGGCGTACAGGT-3'.

5. IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE IL23R, IL23 E IL17 (WESTERN BLOT)

I campioni di mucosa intestinale verranno lisati in 20 microl 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, 0.1 mM sodium vanadate, 0.1% Triton- X100, 1 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF) e 10 microg/ml leupeptin. Quantità equivalenti di proteine saranno separate mediante elettroforesi in polyacrilamide (SDS-PAGE) e trasferite su filtro polivinilidene difluoride (PVDF, Amersham, Usa) seguendo il protocollo di Baldi A, De Luca A, Claudio PP et al. (The RB2/p130 gene product is a nuclear protein whose phosphorylation is cell cycle regulated. J Cell Biochem 1995;59:402-408). Un kit di reazione chemiluminescente ECL (Amersham) rivelerà i segnali specifici. Verranno utilizzati anticorpi policlonali (Abcam, Cambridge, UK)per IL23R e IL23, per l'IL17 sarà utilizzato in anticorpo monoclonale Santa Cruz (Santa Cruz, CA,USA). Un'anticorpo monoclonale anti-beta-actina (Sigma, St. Louis, MO, USA) verrà usato per controllare la quantità di proteine caricate su gel.

6. ISOLAMENTO DELLE CELLULE MONONUCLEATE DI SANGUE PERIFERICO (PBMNC)

Secondo dati recenti (McGovern D, Powrie F. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. 2007,Gut,56,1333-6), il IL23R e l'IL23 avrebbero un ruolo chiave nel processo infiammatorio in quanto in grado di stimolare la produzione di una potente citochina proinfiammatoria, l' IL17, da parte della sottopopolazione di linfociti TH17. Non è ancora noto se le forme varianti rs 11209026 e rs7517847 del IL23R siano in grado di alterare l'induzione di IL17 da parte di IL23. Allo scopo di dare una risposta a questo quesito, verranno condotti esperimenti su cellule mononucleate di sangue periferico isolate da pazienti portatori delle forme varianti e pazienti portatori del gene wild type.

PBMNC saranno isolate da campioni di sangue eparinizzato mediante centrifugazione in gradiente di Ficoll usando colonne Histopaque 1077 (Sigma). Successivamente le cellule isolate saranno lavate due volte con un tampone fosfato (PBS) freddo per rimuovere le piastrine e risospese in terreno di coltura RPMI 1640 supplementato con 10% siero bovino fetale e coltivate (a 37°C, 5% CO2) in piastre di coltura standard. La vitalità cellulare sarà valutata con il metodo di esclusione dal trypan blue. Le cellule saranno poi stimolate con lipopolisaccaride (LPS) batterico e TNFalfa; per 12, 24 e 48 ore e l'RNA totale verrà estratto mediante il kit Rneasy precedentemente descritto. Saranno effettuate reazioni di PCR quantitativa (Real Time PCR) per valutare i livelli di espressione genica di IL17, IL23 e IL23R.

7. ANALISI STATISTICA

Le frequenze allele-genotipo e genotipo/fenotipo saranno analizzate con il test chi-quadro e il test di Fisher, utilizzando il software SPSS ver.1.5. Il test di equilibrio di Hardy-Weinberg e l'analisi del disequilibrio da associazione di marcatori saranno effettuati mediante il software Arlequin ver 2.0. I coefficienti di disequilibrio di associazione degli SNP, le frequenze di aplotipo e il test di disequilibrio di trasmissione (TDT) saranno stimati usando Haploview (Barrett T, Fry B, Maller J et al. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics 21, 263-5). Il contributo individuale di IL23R, ATG16L1 e CARD15 verrà determinato mediante analisi di regressione logistica. L'analisi dell'espressione genica verrà effettuata mediante il test di Mann-Whitney.