

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA IN

“GENETICA E MEDICINA MOLECOLARE”



TESI DI DOTTORATO

**STUDIO DI SNPs E DI ALOTIPI NEI GENI COINVOLTI NEL PATHWAY
DELL'INTERFERONE DI TIPO I IN SOGGETTI AFFETTI DA SCLEROSI
MULTIPLA ED EPATITE C**

**Candidata:
Capone Silvana**

**Relatore:
Prof. Lucia Sacchetti**

**Coordinatore:
Prof. Carmelo Bruno Bruni**

Anno accademico 2005-2006

Indice

Cap. 1 - Introduzione	pag. 1
1.1 SNPs-Caratteristiche generali e definizione	pag. 1
1.2 Applicazioni diagnostiche degli SNPs	pag. 2
1.3 Gli SNPs nella farmacogenetica	pag. 3
1.4 Il modello degli Interferoni	pag. 6
1.5 Meccanismi di azione dell'IFN:la via JAK-STAT	pag. 8
1.6 Alcuni esempi di patologie trattate con IFN	pag. 11
1.6.1 Epatite C	pag. 11
1.6.2 Sclerosi Multipla	pag. 12
1.7 Metodologie per lo studio degli SNPs in farmacogenetica	pag. 15
Cap. 2 Scopo del lavoro	pag. 17
Cap. 3 Materiali e metodi	pag. 18
3.1 Popolazione studiata	pag. 18
3.2 Identificazione SNPs	pag. 19
3.3 Estrazione del DNA da sangue periferico e quantizzazione	pag. 20
3.4 Analisi degli SNPs selezionati con la tecnica SNAPhot TM multiplex (Applied Biosystems)	pag. 22
3.5 Reazione di amplificazione	pag. 25
3.6 Reazione di "primer extension-minisequencing"	pag. 26
3.7 Elettroforesi capillare (ABI PRISM 3100 AVANT Genetic Analyzer)	pag. 27
3.8 Preparazione del campione	pag.29
3.9 Analisi degli SNPS nei pazienti con la tecnica Real-time PCR	pag. 29
3.10 Preparazione del campione	pag. 31
3.11 ABI PRISM 7700	pag. 31
3.12 Analisi statistica	pag. 35
Cap.4 Risultati	pag. 36
4.1 Sclerosi Multipla	pag. 45

4.2	Epatite C	pag. 46
4.3	Analisi Aplotipi	pag. 47
4.3.1	Popolazione di controllo	pag. 47
4.3.2	Popolazione di controllo vs pazienti affetti da Sclerosi Multipla	pag. 49
4.3.3	Popolazione di controllo vs pazienti affetti da Epatite C	pag. 51
Cap. 5	Discussione e Conclusioni	pag. 53
Cap. 6	Bibliografia	pag. 59

Cap.1 INTRODUZIONE

1.1 SNPs – Caratteristiche generali e definizione

I polimorfismi di singola base (Single Nucleotide Polimorphisms, SNPs) sono il tipo di variazione genetica più comune nell'uomo; rappresentano, infatti, il 90% di tutti i polimorfismi (1) e sono presenti nella popolazione con una frequenza allelica $\geq 1\%$ e con una densità nel genoma umano di 1 ogni 1.000 basi (2-4). Sono per la maggior parte polimorfismi biallelici (ossia presenti in due forme alternative) e vengono ereditati in modo mendeliano.

Attualmente i database pubblici (dbSNP) contengono circa 27 milioni di SNPs, 10 milioni dei quali sono stati validati ("rs" SNPs) (5).

Anche se la maggior parte delle variazioni nel genoma umano sono neutre e non hanno dunque effetto sulla regolazione dell'espressione di geni o sulla loro funzione, in alcuni casi gli SNPs presenti nelle regioni codificanti (cSNPs) e regolatorie dei geni possono alterare la funzione genica (6), determinando variazioni nelle caratteristiche individuali come ad esempio, una differente suscettibilità ad una malattia, o una differente risposta ai farmaci.

1.2 Applicazioni diagnostiche degli SNPs

La relativa semplicità delle tecniche di analisi degli SNPs e la loro abbondanza nel genoma umano, li ha resi oggetto di ricerca frequente negli ultimi anni. L'analisi degli SNPs comprende tre fasi:

1. Scoperta, ossia identificazione di SNPs sconosciuti. Durante questa fase, vengono identificati potenziali SNPs o per sequenze “*de novo*” o attraverso comparazione di sequenze presenti in *database*.
2. Validazione, che permette di confermare gli SNPs scoperti e di calcolarne la frequenza in una specifica popolazione.
3. Screening, ossia utilizzo degli SNPs per studi di associazione o analisi di linkage.

Gli SNPs sono molto utili come marcatori genetici per:

- L'identificazione di “geni malattia” mediante studi di linkage in famiglie.
- Studi di associazione casi-controllo.
- Analisi di perdita di eterozigotità a livello di tessuti tumorali.
- Screening di popolazione per una determinata malattia.

Milioni di polimorfismi sono stati identificati nell'ambito del progetto genoma umano e la maggior parte di essi sono stati organizzati in blocchi di *linkage disequilibrium* per alcune popolazioni grazie al progetto Hap-Map (6), che ha permesso la scoperta di oltre 2 milioni

di SNPs con genotipi accurati e completi da 269 individui provenienti da quattro differenti popolazioni. E' possibile che molti di questi SNPs potranno essere associati all'aumentato rischio di sviluppare malattie, facilitando così lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici, al fine di migliorare gli interventi terapeutici.

La crescente mole di dati disponibili sugli SNPs e sugli altri polimorfismi ha contribuito a determinare la variabilità nel genoma, ma molto più complessa rimane la comprensione del significato funzionale di tali variazioni, in particolare nella farmacogenetica.

1.3 Gli SNPs nella farmacogenetica

La farmacogenetica è un'area della genetica moderna che è strettamente focalizzata sullo studio dell'interazione tra geni e farmaci: essa si propone di individuare variazioni di sequenza del DNA che correlano la risposta positiva o negativa ad un farmaco o ad eventuali effetti collaterali.

E' ben noto che non è possibile prevedere sempre con certezza nel singolo paziente l'esito terapeutico di un determinato farmaco. La maggior parte dei pazienti avrà un miglioramento senza o con lievi ed accettabili effetti avversi, alcuni non risponderanno per nulla o avranno gravi effetti avversi da richiedere la sospensione del farmaco.

Questa variabilità nella risposta è dovuta ad una combinazione di fattori, tra i quali: costituzionali (età, sesso, funzioni renale ed epatica etc.), ambientali (dieta, interazione tra farmaci) e genetici che interagiscono con il farmaco.

Il sequenziamento completo del genoma umano ha creato la prospettiva di identificare i geni responsabili delle malattie e di sviluppare farmaci innovativi (più selettivi sui meccanismi eziopatogenetici delle malattie).

La scoperta del primo difetto molecolare farmacogenetico ha origine nel lavoro del gruppo di Eichelbaum (7) e Smith (8), che chiarirono il meccanismo che era alla base del fallimento della terapia con il farmaco antipertensivo debrisoquina; questo farmaco non è più utilizzato clinicamente, ma è ancora importante come modello di indagine farmacologico. L'ossidazione è la più importante via metabolica dei farmaci, catalizzata dal sistema enzimatico epatico citocromo P450 (CYP), costituito da enzimi localizzati sulle membrane del reticolo endoplasmatico liscio e presenti in tutte le cellule eucariotiche, ad eccezione degli eritrociti e delle cellule muscolari scheletriche. Nell'uomo vi sono circa 57 differenti citocromi (9), coinvolti, oltre che nel metabolismo di farmaci, additivi chimici e sostanze xenobiotiche, anche nella sintesi di numerose molecole endogene come le prostaglandine, steroidi, acidi grassi e leucotrieni (10) I 57 geni CYP450 attualmente noti sono presenti nella popolazione in varianti alleliche,

associate a livelli ridotti o elevati di attività enzimatica, che determinano variazioni del grado di metabolizzazione dei farmaci.

Il polimorfismo genetico riguardante il CYP2D6 fu scoperto intorno al 1977, usando appunto come farmaco la debrisoquina, osservazione che portò alla scoperta che tale variazione nel gene CYP2D6, alteravano l'espressione del corrispondente enzima, causando deficienze nel metabolismo di più di venti farmaci. Questo difetto autosomico recessivo si riscontrava nel 5-10% della popolazione caucasica dell'Europa e del Nord America (8) .

Varianti funzionali causate da SNPs in geni codificanti enzimi metabolizzanti, trasportatori, canali ionici e recettori di farmaci sono state associate a variazioni interindividuali nella risposta farmacologica, accrescendo negli ultimi anni l'interesse verso tali geni (11).

Infatti l'approfondimento delle conoscenze dei geni responsabili del metabolismo dei farmaci potrà permettere di migliorarne l'efficacia e la tollerabilità, personalizzando le terapie farmacologiche, specialmente quelle a maggiore rischio tossico. I campi di applicazione della farmacogenetica sono vari: cardiologia, pneumonologia, immunologia, psichiatria, neurologia, oncologia.

Oggi esistono già diversi studi di associazione tra polimorfismi SNPs e farmaci, in particolare antineoplastici, immunosoppressivi (12-14), tuttavia sono ancora scarse le informazioni relative ai polimorfismi SNPs

e la risposta agli interferoni (IFNs), che rappresentano una classe di farmaci utilizzati nel trattamento di varie patologie virali (es. epatite Cronica HCV), neoplastiche e non neoplastiche come la sclerosi multipla (MS).

1.4 Il modello degli Interferoni

Gli interferoni (IFNs) sono una famiglia di citochine a struttura strettamente affine, prodotti solo dai vertebrati (15) che sono in grado di evocare nelle cellule varie e complesse risposte metaboliche e biologiche. Oltre a possedere una caratteristica attività antivirale, gli IFNs esibiscono anche attività antitumorale e immunomodulatoria. Sono raggruppati in diversi tipi, i cui membri interagiscono con uno specifico recettore di membrana, costituito da due subunità eterologhe. L'interazione ligando-recettore attiva il pathway di trasduzione del segnale JAK-STAT e una cascata di effettori molecolari in grado di regolare l'attività trascrizionale di centinaia di geni, contribuendo così alle risposte pleiotropiche mostrate dagli IFNs.

Sono noti diversi membri della famiglia degli interferoni, e si è proceduti quindi ad una loro classificazione in tre diversi tipi:

- Interferoni di tipo I a cui appartengono: IFN- α , $-\beta$, $-\omega$, $-\epsilon$, $-\kappa$.
- Interferoni di tipo II a cui appartengono: IFN- γ
- Interferoni di tipo III a cui appartengono : IFN- λ 1- λ 2- λ 3

L'attività degli IFN di tipo I è stata originariamente descritta almeno 50 anni fa come fattore solubile prodotto da cellule trattate con virus inattivati, non replicanti, che diventano così abili a bloccare una conseguente infezione con virus replicanti (16). Come indicato dagli studi iniziali, gli IFNs tipo I prodotti dalle cellule infettate agiscono in maniera autocrina e paracrina al segnale della presenza dell'infezione virale. Dopo il legame con il recettore, gli IFNs attivano l'espressione inducibile di centinaia di geni, che insieme stabiliscono uno stato "antivirale".

Alcuni di questi geni producono delle proteine che hanno un'ampio effetto antivirale come per esempio, *la 2'-5'-oligoadenilatosintetasi (OAS) e la proteinachinasi*. Il primo enzima, attivato dal dsRNA virale promuove l'attivazione di una ribonucleasi L che demolisce l'RNA messaggero virale, mentre il secondo provvede a fosforilare, con conseguente inattivazione, il peptide che dà inizio alla sintesi proteica virale (17).

Gli IFNs possiedono anche attività immuno-modulanti ed antiproliferative, con un meccanismo prevalentemente paracrino sulle altre cellule presenti nelle immediate vicinanze.

Le attività antiproliferativa e citomodificatrice si esplicano soprattutto mediante la capacità degli IFNs di allungare il ciclo cellulare, di indurre il differenziamento, di modificare le proprietà delle membrane, di

aumentare i recettori e gli antigeni di membrana e di modificare il citoscheletro.

Alcuni studi hanno dimostrato gli effetti citotossici dell'IFN sulle cellule tumorali primarie e *in vivo* (18,19), ed è stato inoltre dimostrato che l'IFN è un diretto induttore dell'apoptosi (19,20).

Queste proprietà vengono sfruttate nella terapia antitumorale, anche se il potere antiproliferativo dei vari IFNs varia notevolmente in funzione della cellula tumorale su cui agisce, ed hanno una notevole rilevanza nella patogenesi di varie patologie virali, neoplastiche e non neoplastiche, quali epatite C, e sclerosi multipla.

1.5 Meccanismi di azione dell'IFN: la via JAK-STAT.

Una comune proprietà di entrambi i tipi di IFNs (tipo I e II) è di interagire con lo stesso recettore chiamato IFNAR (recettore di IFN- α/β), inducendo una risposta trascrizionale immediata attraverso la via di trasduzione JAK-STAT (21). Gli effetti degli IFNs, infatti, sono dovuti al controllo dell'espressione genica esercitato tramite una cascata di effettori molecolari (fig.1) che comprende il recettore di membrana, le Janus chinasi citoplasmatiche (JAK), e i fattori trascrizionali STATs che passano dal citoplasma al nucleo, dopo essere stati attivati tramite fosforilazione dall'azione delle chinasi JAKs (22).

Una chiara delucidazione della via JAK-STAT è stata possibile proprio attraverso una dettagliata indagine del segnale di trasduzione dell'IFN.

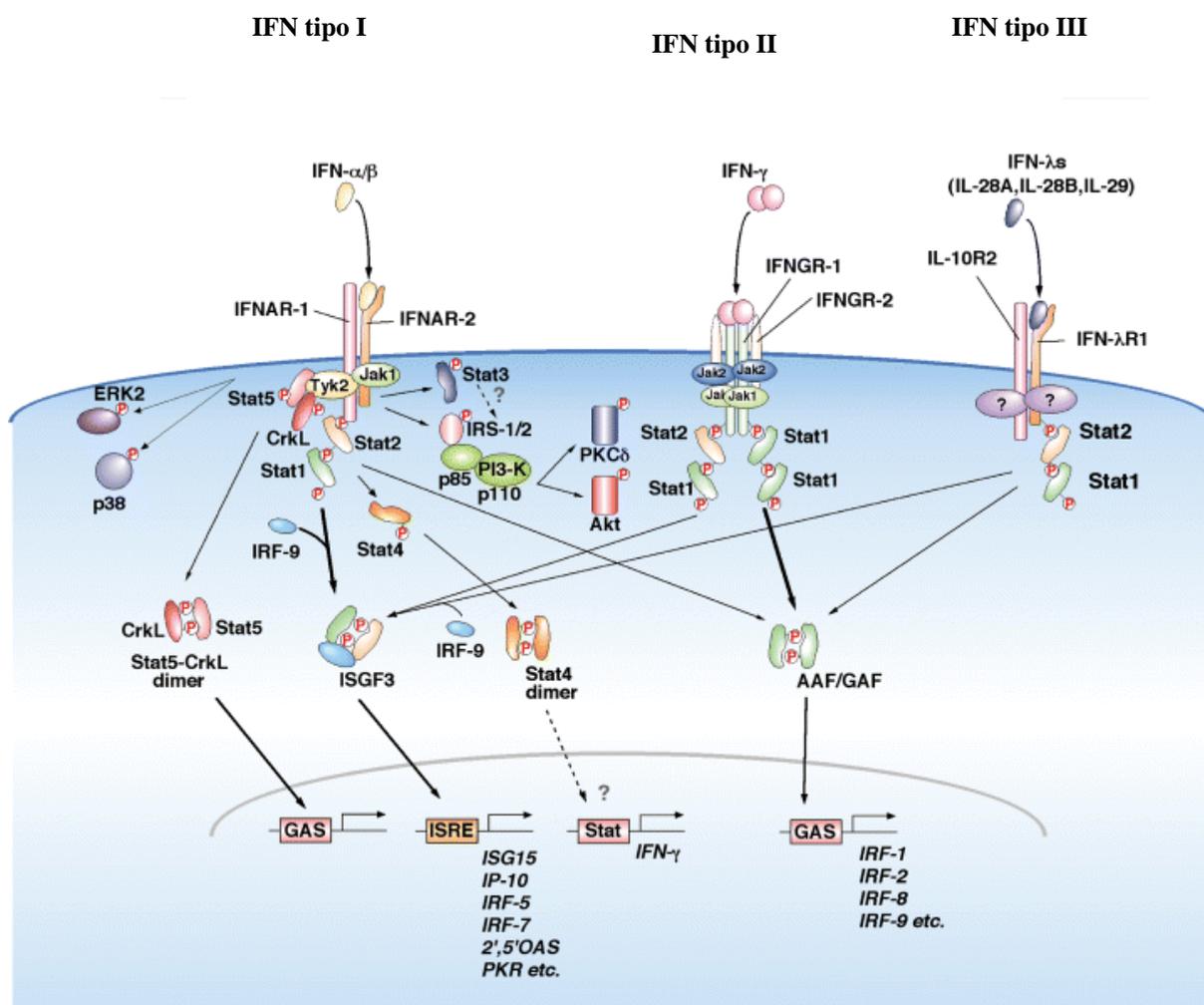


Fig.1 Componenti della via di trasduzione del segnale attivata dagli IFNs

La famiglia delle proteine STATs è stata inizialmente scoperta in base all'osservazione che due membri della famiglia, STAT1 e STAT2, sono attivati dall'alfa-interferone (23,24), mentre solo STAT1 è attivata dall'interferone-gamma (25,26). Inoltre, il ruolo fisiologico dei membri della famiglia Janus delle tirosina-chinasi è stato stabilito dimostrando che cellule mutagenizzate in modo da non esprimere Tyk2 (25) o Jak1 (27), non sono in grado di rispondere all'alfa-interferone e cellule mutanti non esprimenti Jak1 o Jak2 non rispondono all'interferone-gamma (28,29).

Inoltre, studi di gene knockout in topi, hanno definito il ruolo biologico delle proteine STATs nelle cellule normali. In particolare, i topi STAT1^{-/-} sono vitali, ma presentano un'alterata risposta agli IFNs e mostrano suscettibilità alle infezioni virali e batteriche (29,30). Inoltre presentano una più alta incidenza di insorgenza dei tumori indotti da agenti chimici, rispetto ai topi normali, in accordo con l'attività antiproliferativa di STAT1 (30,31).

La regolazione trascrizionale di migliaia di geni effettori a valle del pathway Jak-STAT o di altri pathways, contribuiscono agli effetti pleiotropici mostrati dagli IFNs. (32).

1.6 Alcuni esempi di patologie trattate con IFN

1.6.1 Epatite C

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) è la principale causa di epatite Cronica, di cirrosi epatica, di insufficienza epatica terminale, di carcinoma epatico nel mondo: si calcola, infatti, che l'infezione sia presente nella popolazione mondiale in circa 170 milioni di persone. Di questi individui, il 20-50% sviluppa cirrosi epatica e carcinoma epatocellulare (34,35).

Il quadro clinico dell'infezione da HCV ed il grado di malattia del tessuto epatico sono il risultato di complesse interazioni tra il virus e la risposta immunitaria dell'individuo affetto. Sebbene la risposta cellulare ed immunitaria siano presenti durante le fasi acuta e cronica dell'infezione da HCV, l'organismo difficilmente è in grado di sradicare il virus.

La risposta immunitaria innata rappresenta la prima fase di difesa dell'organismo contro i virus e pertanto gioca un ruolo cruciale nel controllare l'infezione virale.

Attualmente la terapia si basa sull'uso dell'alfa-interferone pegilato (PEG-IFN) (una formulazione di interferone a lento rilascio, ottenuta coniugando l'alfa-Interferone con un polimero inerte, il Polietilenglicole PEG) in associazione alla ribavirina. Con tale terapia la risposta sostenuta virologica è del 42-46% per il genotipo 1 (con un ciclo di terapia di un anno) e del 70-80% per i genotipi 2 e 3 (ciclo di terapia di sei mesi) (36, 37). Indipendentemente dal genotipo, circa il 60% dei pazienti con

infezione cronica da HCV non risponde alla terapia (non responders) o recidiva al termine del trattamento (relapsers) (38).

Gli Interferoni di tipo I sono componenti ben caratterizzati della risposta immunitaria innata contro le infezioni virali: la loro attività antivirale si esplica sia attivando i geni responsabili dell'interruzione della replicazione virale (39) sia modulando il sistema immunitario (40), per cui, un fallimento della risposta cellulare indotta dagli Interferoni può generare un favorevole microambiente per l'infezione e la replicazione di HCV.

I meccanismi molecolari che sono alla base del fallimento alla terapia con α -IFN non sono ben conosciuti, tuttavia, alcuni lavori suggeriscono che oltre ai fattori virali (genotipo del virus e carica virale) e a caratteristiche quali sesso, etnia, età, obesità, vi siano diversi fattori genetici che negativamente regolano la cascata del segnale indotta dall'interferone α (41).

1.6.2 Sclerosi Multipla

La sclerosi multipla (SM) è una malattia del sistema nervoso centrale caratterizzata da una serie di disturbi clinici che derivano dalla demielizzazione e infiammazione delle vie assoniche in diverse regioni cerebrali.

Essa è caratterizzata da un pattern clinico variabile, che porta ad una progressiva disfunzione neurologica; sono affetti più di due milioni di

persone nel mondo ed attualmente è considerata la causa maggiore di disabilità nella popolazione giovane adulta.

La SM ha un'eziologia autoimmunitaria, tuttavia, l'esatto meccanismo attraverso cui l'attivazione del sistema immunitario causa il danno neuronale non è del tutto conosciuto. Nell'uomo una possibile spiegazione della malattia si basa sul fatto che un individuo geneticamente predisposto può essere temporaneamente infettato da un microrganismo (forse da un virus) che esprime una molecola strutturalmente simile ad una componente della mielina. Per neutralizzare questo antigene l'organismo mette in atto una risposta immunitaria che comporta la distruzione anche della mielina normale. Inoltre le interazioni fra l'infezione e le componenti nutrizionali, climatiche e/o altri fattori ambientali possono influire considerevolmente sulla suscettibilità alla malattia (42).

La sclerosi multipla si può presentare come disordine ricorrente, dove le fasi acute sono intervallate da lunghi periodi di quiescenza (Relapsing-Remitting, RR) o può presentarsi come disordine progressivo fin dall'esordio (Primary Progressiv, PP) (43).

La forma RR è proporzionalmente più frequente nei giovani e nelle donne, ma ultimamente si è osservato che entrambe le forme della malattia portano ad uno stato deficitario con un grado variabile di disabilità (44).aggiungere ref

Sfortunatamente non esiste una cura definitiva per la sclerosi multipla, ma sono disponibili terapie immunomodulatorie che migliorano i disturbi associati alla patologia.

Attualmente i pazienti sono trattati con IFN-beta-1a ed 1b (IFN- β) che riduce le ricadute cliniche, rallenta la progressione alla disabilità e riduce il numero totale di lesioni captanti il gadolinio registrate su MRI (magnetic resonance imaging) (45,46). I primi tentativi di utilizzo degli interferoni nella terapia della sclerosi multipla risalgono alla fine degli anni '70, e trovarono il loro razionale nella teoria che fosse una persistente o latente infezione virale a causare la malattia. Il primo studio che ha suggerito un'efficacia di questo farmaco è stato condotto da Jacobs nel 1981 (47). Negli anni successivi la ricerca si è concentrata nello sviluppo di molecole di sintesi efficaci o anche attraverso somministrazione sottocutanea, intramuscolare ed endovenosa. La somministrazione di interferone beta ricombinante 1B ed 1A in pazienti con sclerosi multipla riacutizzante-remittente è stata approvata dal Food and Drugs Administration (FDA). I criteri per il trattamento stabiliti dal Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology, stabiliscono di utilizzare l'IFN in pazienti con sclerosi multipla clinicamente definita, in forma riacutizzante-remittente, in una forma attiva di malattia e con EDSS tra 1 e 5.5. La scala EDSS (Expanded –Disability Status Scale) si propone di valutare il grado di

disabilità del paziente affetto, e varia da 0 (paziente normale) a 10 (morte causata da SM). Questi criteri di inclusione hanno subito modifiche negli anni successivi, allargando la cerchia dei pazienti trattabili (48).aggiungere lavoro criteri

Comunque per l' IFN- β l'effetto terapeutico è solo parziale, molti pazienti esibiscono una notevole variabilità alla risposta, mentre il 20% dei pazienti non risponde affatto (non responder).

Riguardo la risposta alla terapia con interferone (49), vengono considerati non responder pazienti che avevano avuto ricadute nei primi due anni di terapia e/o avevano avuto una progressione di un punto all'EDSS; invece, pazienti con minore EDSS e minore attività di malattia sembrano rispondere meglio alla terapia, considerando come misure di outcome la progressione di un punto all'EDSS ed il tempo trascorso dalla prima ricaduta.

1.7 Metodologie per lo studio degli SNPs in farmacogenetica

Negli ultimi anni, la scoperta degli SNPs e lo sviluppo di metodi di genotipizzazione ad alta processività hanno permesso di tipizzare migliaia di marcatori presenti sul genoma alquanto rapidamente e con bassi costi.

Infatti, anche se gli SNPs sono biallelici e, dunque, meno informativi dei marcatori genetici usati attualmente (ad esempio le STR),

essi sono presenti con una più alta densità nel genoma e sono associati ad un più basso rischio di errore nella genotipizzazione.

Attualmente vi sono molte tecniche di genotipizzazione ed in generale in ognuna si distinguono due fasi:

- 1) preparazione del campione (sintesi di prodotti alleli specifici);
- 2) separazione ed individuazione di tali prodotti.

La fase di preparazione del campione in genere si basa su procedure enzimatiche (*5' nuclease assay*, *primer extension* etc.) o su ibridazioni allele specifiche. Queste fasi possono essere poi accoppiate a diversi sistemi di analisi o interpretazione, come fluorescenza o determinazione della massa e quindi a diversi tipi di strumentazioni, quali: elettroforesi capillare, spettrometro di massa e microchip.

L'ibridazione con probe allele-specifici è ampiamente usata nella maggior parte dei metodi per l'analisi degli SNPs, ma il principio della reazione di primer extension viene utilizzato in un crescente numero di applicazioni per la sua alta specificità nel distinguere le varianti alleliche di un singolo SNP; inoltre, tra le varie fasi di preparazione, la primer extension è quella più flessibile e facilmente automatizzabile.

Cap. 2 SCOPO DEL LAVORO

La complessità dei differenti meccanismi di azione dell'IFNs, rende difficile la comprensione del coinvolgimento di questi ultimi nella sclerosi multipla ed epatite C.

Precedenti evidenze sperimentali hanno suggerito che variazioni genetiche nel pathway di trasduzione del segnale attivato dall'IFN-I e II potrebbero essere implicate nella suscettibilità alla sclerosi multipla e nella risposta alla terapia nell'epatite C, anche se fino ad ora sono stati riportati dati contrastanti (50-55).

Al fine di investigare l'implicazione di tale pathway nella suscettibilità alla sclerosi multipla ed epatite C, è stato effettuato con la metodica Taqman, uno screening di 35 SNPs nei geni IFNAR-1, IFNAR-2, STAT-1, STAT-2 e IRF-1, geni implicati nel meccanismo di azione degli IFNs, in una popolazione di pazienti affetti da sclerosi multipla ed epatite C della stessa area geografica.

La fase preliminare del lavoro è stata quella di validare gli SNPs selezionati in una popolazione di controllo della stessa area geografica dei pazienti al fine di determinare la frequenza allelica relativa a ciascun polimorfismo investigato. A tale scopo è stata implementata la metodica dello SnaPshotTM Multiplex System (Applied Biosystems) che si basa sulla tecnica di preparazione del campione per primer extension

“minisequencing”, e sull’analisi del prodotto di PCR per elettroforesi capillare .

Cap.3 MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione studiata

La popolazione di controllo consiste di 118 soggetti non correlati e originari del sud Italia di cui 59 sono maschi e 59 sono femmine (con età media di 47 anni \pm 8,6DS), in apparente buono stato di salute e senza storie pregresse per malattie neoplastiche e/o degenerative. Per tutti i campioni era presente il consenso, rilasciato da ciascun individuo, all’utilizzo del proprio campione biologico per finalità di ricerca scientifica e in modo anonimo. Tali campioni sono stati pertanto utilizzati, in forma del tutto anonima, come gruppo controllo per la validazione degli SNPs.

I pazienti MS, 110 femmine e 72 maschi (con età media 47 \pm 8,6DS), sono stati reclutati presso la Clinica Neurologica dell’Università di Napoli *Federico II*; la diagnosi della medesima patologia è stata effettuata secondo i criteri di Poser (56). Tutti i pazienti arruolati in questo studio sono stati trattati secondo gli attuali protocolli e classificati come *responders* e *non responders*.

I pazienti affetti da epatite C cronica, 59 maschi e 59 femmine (con età media $47 \pm 8,6$ DS), sono stati reclutati presso il Dipartimento di Malattie Infettive della nostra Università; la diagnosi della medesima patologia si è basata sulla positività del virus HCV nel siero dei suddetti pazienti e sulla presenza di ipertransaminasemia.

Tutti i pazienti arruolati in questo studio sono stati trattati con terapia antivirale secondo gli attuali protocolli e classificati come *sustained responders* e *non responders*.

3.2 Identificazione SNPs

Nell'ambito dei geni coinvolti nel meccanismo d'azione degli IFNs (via JAK-STAT), sono stati selezionati le due subunità del recettore (IFNAR1 e IFNAR2), e i fattori trascrizionali STAT1, STAT2 e IRF1.

Sui geni selezionati sono stati identificati nel database dbSNPs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) i potenziali SNPs.

Sono stati identificati 59 potenziali SNPs localizzati nei geni selezionati

Lo spazio medio tra i markers selezionati tra le regioni esaminate è di 3361 bp (669-9738 bp), considerando che l'85% del genoma umano Europeo si estende per blocchi di 10 KB o maggiori (57).

Il disegno degli oligonucleotidi per la reazione di amplificazione e la genotipizzazione mediante reazione di primer extension ha avuto successo per 56 dei 59 SNPs potenziali.

L'analisi ha rivelato che 42 degli SNPs selezionati (71%) sono polimorfici nella popolazione controllo studiata, come definito dalle frequenze alleliche $> 1\%$ dell'allele minore. Le frequenze alleliche per ogni SNP sono risultate identiche nei maschi e nelle femmine.

Per la fase di screening delle due popolazioni affette, sono stati eliminati, tra i polimorfismi validati, quelli che erano presenti con una bassa frequenza nella popolazione di controllo e potevano dare problemi di significatività nel calcolo statistico, riducendo così a 35 gli SNPs analizzati nelle popolazioni affette.

3.3 Estrazione del DNA da sangue periferico e quantizzazione.

Il metodo di estrazione utilizzato prevede l'uso della tecnica del *Salting Out* per la precipitazione e l'allontanamento delle proteine.

Protocollo di estrazione:

- Aggiungere ad ogni volume di sangue 5 ml di soluzione di lisi per i globuli rossi (NaCl 0.2%)
- Agitare delicatamente per inversione ed incubare i campioni a $+4^{\circ}\text{C}$ per 30 minuti.
- Centrifugare i campioni per 15 minuti a $+4^{\circ}\text{C}$ a 1500xg.

- Eliminare il sovranatante evitando che il pellet, contenente i globuli bianchi, si stacchi dal fondo della provetta.
- Ripetere l'operazione 2/3 volte.
- Per ogni 2 ml di sangue iniziale, aggiungere un volume di soluzione di lisi per i globuli bianchi (10mM Tris, 10mM EDTA, 100mM NaCl-pH 8.4).
- Aggiungere 65 µl di SDS 20% (Sodiododecilsolfato), 20 µl di proteinasi K per ogni ml di soluzione di lisi dei globuli bianchi.
- Agitare i campioni su vortex ed incubare per 15 min. a 60°C.
- Aggiungere 670 µl di NaCl saturo per ogni ml di buffer di lisi dei globuli bianchi.
- Agitare su vortex e centrifugare per 15 minuti a +4°C a 1500x g.
- Decantare il sovrinatante e precipitare il DNA aggiungendo due volumi di etanolo freddo.
- Mescolare per capovolgimento fino alla comparsa della “nuvola” di DNA e prelevare quest'ultima con una pipetta Pasteur precedentemente uncinata sulla fiamma.
- Lavare la “nuvola” di DNA, immergendo brevemente la punta della Pasteur in etanolo al 70%.
- Lasciare asciugare all'aria per qualche minuto e risospendere in un adeguato volume di acqua sterile. Qualora la “nuvola” non si

dovesse formare a causa della frammentazione del DNA , occorre incubare i campioni a -20°C per 30 minuti e quindi centrifugare per 30 minuti a $10000\times g$ ed a $+4^{\circ}\text{C}$. Successivamente allontanare il sovrantante e risospendere il pellet in acqua sterile.

Il DNA estratto da ciascun campione è stato quantificato spettrofotometricamente.

- Per la quantizzazione spettrofotometrica, il DNA estratto, opportunamente diluito, è stato quantizzato mediante lettura a 260nm , lunghezza d'onda a cui specificamente assorbono gli acidi nucleici.

$$[\text{DNA}] (\text{ng}/\mu\text{l}) = A_{260} \times f.d^a \cdot x 50^b$$

^a Fattore di diluizione ; ^b Quantità di DNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$) la cui assorbanza a 260 nm è pari ad 1;

Inoltre il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e a 280 nm , che deve essere compreso tra 1.7 e 2.00, forniva indicazioni sul grado di contaminazione proteica del campione.

3.4 Analisi degli SNPs selezionati con la tecnica SNAPshotTM Multiplex (Applied Biosystems).

Nella figura 2 sono elencate le fasi di preparazione del campione per l'analisi degli SNPs.

a) Amplificazione (PCR)



Purificazione amplificato



b) SnaPshot ddNTP reazione di Primer Extension



Rimozione dei ddNTPs non incorporati



c) Elettroforesi e analisi con Genescan

Fig.2 Fasi di preparazione del campione per l'analisi degli SNPs

Il kit ABI PRISM SnapShot Multiplex è disegnato in modo da essere utilizzato per la determinazione fino ad un massimo di dieci SNPs, localizzati in posizioni note su uno o dieci singoli amplificati.

La chimica del kit si basa su una reazione di estensione (figura 3) , con dideossinucleotidi fluorescenti, di un oligonucleotide non marcato complementare al template contenente il SNP.

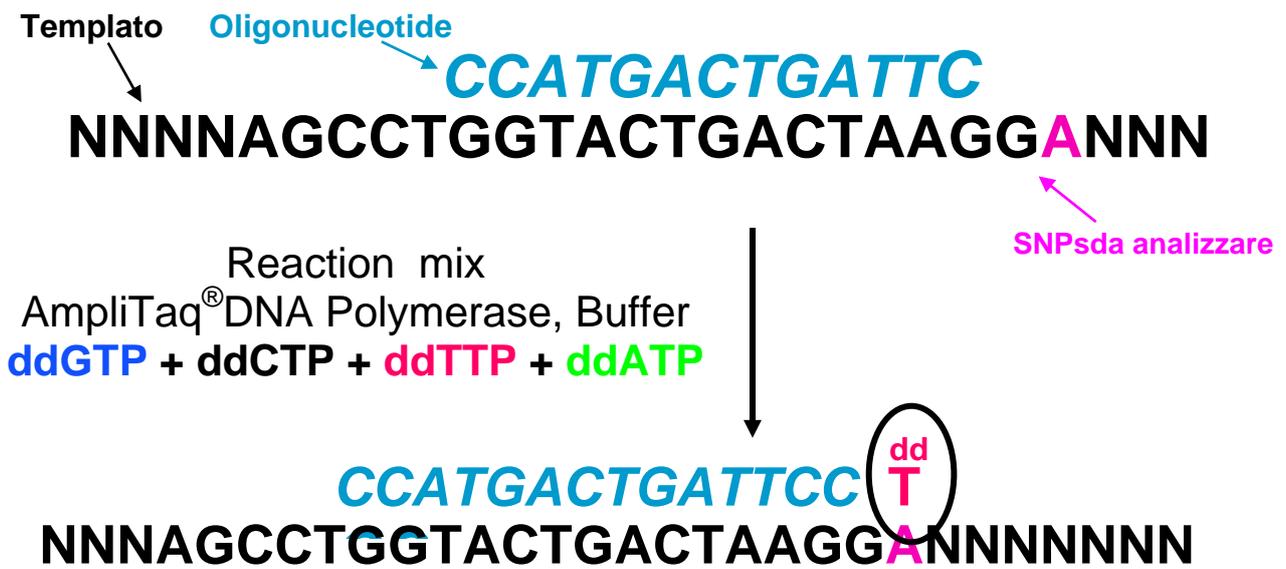


Fig. 3 Reazione di *primer extension*

3.5 Reazione di amplificazione

Ciascun locus è stato amplificato mediante l'utilizzo di primer specifici individuati mediante l'uso del programma Oligo 4.0. Mediante un sintetizzatore automatico di DNA ABI 394 sono stati sintetizzati gli oligonucleotidi specifici rispettivamente con senso e antisenso, per amplificare le regioni dei geni selezionati contenenti gli SNPs trovati in banca dati.

Le condizioni di amplificazione sono le seguenti:

Denaturazione iniziale: 95°C per 5 min

- Denaturazione : 94°C per 30 sec.
- Annealing : specifica per i singoli SNP.
- Estensione : 72°C per 45 sec.

Estensione finale : 72°C per 10 min.

Le fasi di denaturazione, annealing ed estensione sono state ripetute per 35 cicli.

La miscela di reazione ($V_f = 50 \mu\text{l}$) conteneva 200 ng di DNA stampo, 400 nM di ciascun primer, 200 μM di ciascun dNTP, 1 E. U. di Taq polimerasi, 1.5 mM MgCl_2 , 10mM Tris-HCl e 10 mM KCl.

3.6 Reazione di “*primer extension-minisequencing*”

I frammenti amplificati sono stati preparati per la reazione di primer extension mediante purificazione, incubando 15 μ l dell'amplificato con 5U di esonucleasi (Amersham) e 2U di fosfatasi alcalina (Amersham) a 37 °C per 1h e 75°C per 15 min..

La reazione di primer extension è stata effettuata nelle seguenti condizioni:

Amplificato 1+2 (0.28 pmol/ognuno)		3 μ l
Snapshot ready reaction mix		5 μ l
Mix primer extension	2 μ M	1 μ l
H ₂ O		1 μ l
Volume finale		10 μ l

La miscela di reazione è stata incubata a:

96 °C per 10 sec.

50 °C per 5 sec. 25 cicli

60 °C per 30 sec.

La miscela di reazione viene purificata incubando con 1U di fosfatasi alcalina a 37°C per 60 min. e a 75°C per 15 min.

3.7 Elettroforesi capillare (ABI PRISM 3100 AVANT Genetic Analyzer).

Lo strumento è un analizzatore genetico automatizzato che consiste di un apparato per l'effettuazione dell'elettroforesi capillare, un computer Macintosh che include software diversi per la raccolta e l'analisi dei dati e una stampante a colori (fig 4).



Fig. 4 ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer

Lo strumento è capace di determinare la sequenza basica, o misurare e quantizzare i frammenti di DNA.

I campioni amplificati e caricati sullo strumento vengono introdotti cineticamente (fig.5) in un capillare (o in quattro capillari contemporaneamente nella versione 3100 dello strumento), ripieno di un polimero specifico. I frammenti di DNA fluorescenti migrano attraverso il polimero e si separano in base al differente peso molecolare. Durante questa fase i fluorocromi legati al DNA vengono eccitati da un Argon laser ed emettono luce a lunghezze d'onda specifiche per ciascun

fluorocromo. Tale luce viene registrata da una CCD camera in modo che tutti i tipi di fluorescenza (relativi ai differenti fluorocromi utilizzati) possono essere evidenziati contemporaneamente. Il software analizza l'intensità della luce e la memorizza come segnali elettrici per una successiva elaborazione. I frammenti di DNA vengono rappresentati come picchi su un elettroferogramma. La posizione del picco è indice del peso molecolare del frammento, l'altezza dei picchi è un indice grossolano della quantità del prodotto amplificato, il colore consente di distinguere frammenti diversi con uguale peso molecolare.

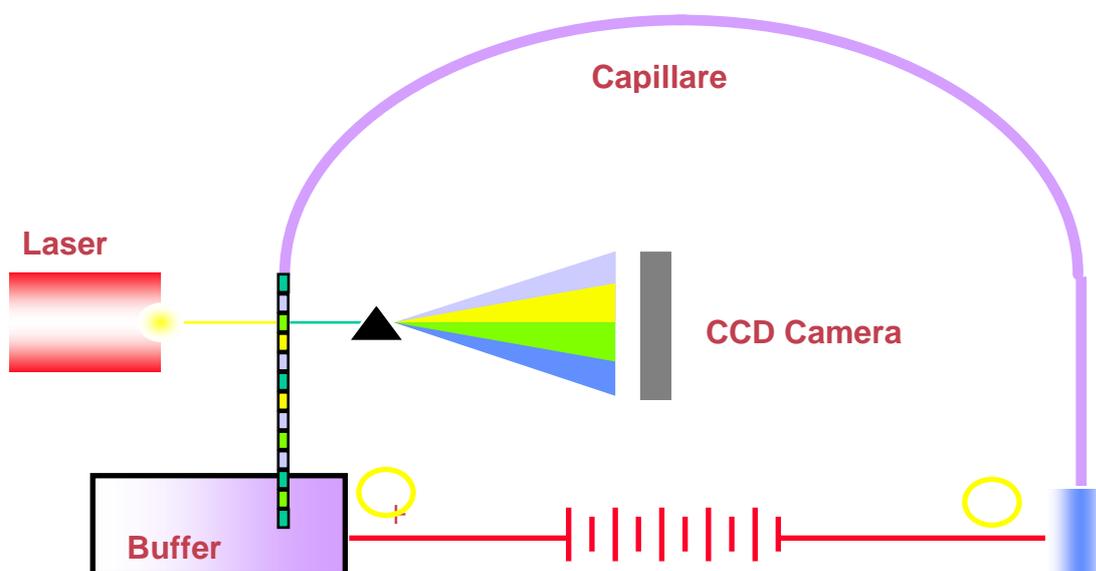


Fig. 5 Componenti dell'ABI PRISM 3100 AVANT

3.8 Preparazione del campione

Un'aliquota di 1 μ l della reazione SNAPshot *primer extension* viene aggiunta a 9 μ l di formammide in piastre da 96 pozzetti (optical microamp plate dell'Applied Biosystem). La miscela viene denaturata a 95°C per 5 min. e caricata su 3100 AVANT ABI PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystem). L'elettroforesi è effettuata a 60°C usando il polimero POP4, dye set E5 e il modulo SNP1_POP5. L'analisi dei dati viene effettuata utilizzando il GeneScan Analysis Software versione 3.1 e GeneScan-120 LIZ.

3.9 Analisi degli SNPs nei pazienti con la tecnica Real-Time PCR

La genotipizzazione degli SNPs sui campioni di controllo e sui campioni dei pazienti è stata effettuata mediante la Real-time PCR utilizzando la metodica TaqMan, una tecnica di rivelazione basata sull'ibridazione di oligonucleotidi fluorescenti.

Il saggio TaqMan (**Fluorogenic 5' Nuclease Assay**), è una PCR Real-time che utilizza l'attività 5' nucleasica di una DNA polimerasi per idrolizzare una sonda ibridizzata alla sequenza bersaglio del gene da amplificare. Solitamente viene sfruttata l'attività esonucleasica della Taq polimerasi, ma è possibile impiegare un qualsiasi enzima dotato di un'attività nucleasica con proprietà simili. Essa consente la rilevazione dell'amplificato contemporaneamente alla sua amplificazione, producendo

un segnale fluorescente con intensità direttamente proporzionale al target di reazione.

Essa si avvale dell'uso di una sonda complementare alla sequenza target posta tra i siti di legame dei primers e marcata alle due estremità con due differenti fluorocromi, al 5' il *reporter* (6'-carbossi-fluoresceina, FAM) ed al 3' il quencher (6'-carbossi-tetrametil-rodamina, TAMRA).

La molecola quencher ha la capacità di inibire la fluorescenza dell'altra molecola fin quando entrambe si trovano sulla stessa sonda integra. Nel corso dell'amplificazione però la sonda viene distrutta mediante idrolisi dell'attività esonucleasica 5'-3' associata alla polimerasi AmplitaqGoldTM. L'enzima infatti, quando incontra l'estremità 5' della sonda, effettua il distacco del reporter; in questo modo il fluoroforo va in soluzione, non subisce più l'inibizione del quencher ed emette fluorescenza. In base a questo meccanismo l'intensità di fluorescenza emessa dipende dai ripetuti cicli di PCR ed è direttamente proporzionale alla quantità del target di reazione amplificato.

3.10 Preparazione del campione

Il protocollo prevede, per l'identificazione degli SNPs, che in ogni tubo di reazione vengano pipettati:

- 900nM di ciascun primers
- 200nM di ciascuna sonda
- 12.5 µl di TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystem)
- 1 µl di Dna (~ 30 ng)

per un volume finale di 25 µl.

La piastra di PCR costituita da 96 pozzetti viene inserita nel termocycler, del quale vengono fissati i parametri:

- la Taq polimerasi viene attivata ad una temperatura di 95°C per 10 minuti
- il DNA viene denaturato alla stessa temperatura per circa 15 secondi
- la fase di annealing/estensione ha luogo ad una temperatura di 60°C per un minuto.

Sono previsti 40 cicli di reazione (58).

3.11 Strumentazione utilizzata per il rilevamento della fluorescenza (ABI PRISM 7700)

Il rilevamento del segnale luminoso avviene ad opera dell'ABI PRISM 7700 o 7900 (figura 6) Sequence Detection System, che rileva la fluorescenza direttamente nei tubi di reazione. L'ABI PRISM è il

risultato della combinazione, in un unico strumento, di un thermocycler, di un rilevatore a fluorescenza laser e di programmi (softwares) applicativi per l'elaborazione dei dati (figura 7); tale macchinario è quindi in grado di funzionare contemporaneamente da termociclatore e da fluorimetro.



Figura 6. ABI PRISM Sequence detection system 7900

Lo strumento usa un sistema di fibre ottiche connesse ad ognuno dei 96 tubi di reazione. Una sorgente di luce laser eccita i cromofori legati alle molecole da rilevare presenti in ogni tubo e un dispositivo ad accoppiamento di carica (CCD= charge-coupled device) misura l'intensità del segnale fluorescente di ogni campione. Le camere CCD sono costituite da chips di silice sensibili alla luce che trasformano i fotoni che arrivano sulla superficie del chip in segnali elettronici digitali utili per ottenere dati in tempo reale durante la reazione di PCR. L'utilizzo di un tale dispositivo rende non necessaria ogni manipolazione

post-amplificazione e questo comporta l'eliminazione dei problemi di contaminazione carry-over (dato che i tubi di reazione restano chiusi dall'inizio alla fine) e la diminuzione dei tempi di ottenimento dei risultati (59, 60).

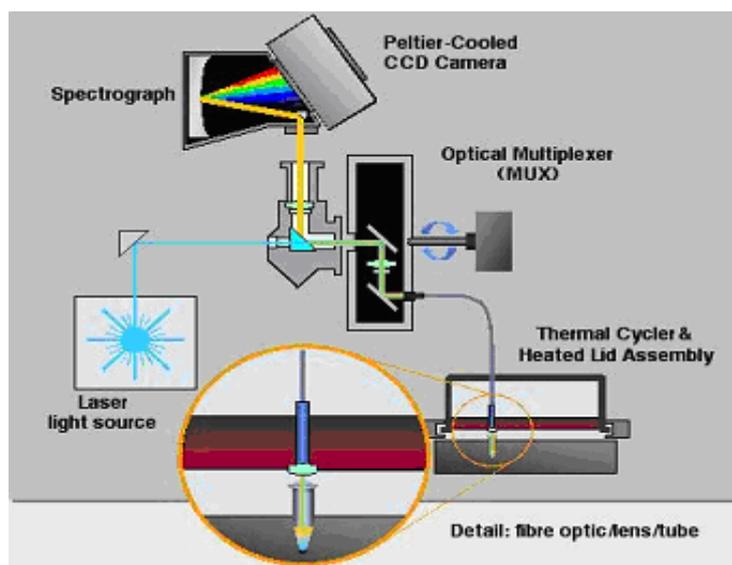


Figura 7. Struttura dell'ABI PRISM 7700 Sequence Detection System

Lo strumento acquisisce lo spettro di emissione del campione per tutta la durata della reazione e converte la variazione di fluorescenza in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di reazione; visualizzando graficamente i dati si ottiene una curva sigmoide. E' opportuno correggere le fluttuazioni della fluorescenza dovute a cambiamenti nella concentrazione o nel volume dei tubi di reazione che creano un segnale di fondo (background) evidente soprattutto durante i primi cicli della reazione di PCR. A tale scopo il programma divide l'intensità del segnale emesso dal reporter con l'intensità della fluorescenza di fondo

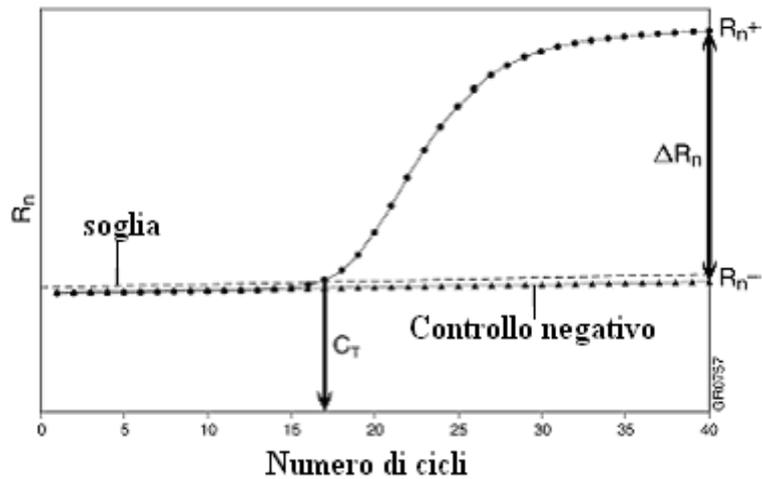
per ottenere un rapporto definito come R_n (normalizzazione del segnale emesso dal reporter). La differenza tra il valore R_n della reazione contenente tutti i componenti incluso il DNA stampo (R_{n+}) e il valore R_n del campione privo del template (R_{n-}) viene definito ΔR_n : tale valore rappresenta la magnitudine del segnale generato nel corso della reazione di PCR. Durante la fase esponenziale del processo di PCR, il ciclo in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter dovuto, non a mera variazione del rumore di fondo del sistema, ma a specifico evento di amplificazione è definito ciclo soglia ($C_t = \text{threshold cycle}$) della reazione; C_t rappresenta il ciclo in cui si è verificato un incremento significativo del valore ΔR_n .

$$\Delta R_n = (R_{n+}) - (R_{n-})$$

$$R_{n+} = \frac{\text{Intensità dell'emissione del Reporter}}{\text{Intensità dell'emissione del Quencher}} \quad \text{PCR con target}$$

$$R_{n-} = \frac{\text{Intensità dell'emissione del Reporter}}{\text{Intensità dell'emissione del Quencher}} \quad \text{PCR senza target}$$

Durante la reazione di amplificazione, l' R_n aumenta con l'aumentare del numero di copie dell'amplicone finché non viene raggiunto un plateau



(figura 8) (61).

Figura 8. Cinetica di reazione del saggio TaqMan: la freccia indica il ciclo in cui la reazione entra nella fase esponenziale del processo di PCR.

3.12 Analisi statistica

I dati relativi alle frequenze genotipiche nelle popolazioni studiate sono stati elaborati mediante il programma statistico SPSS 14.0 (Chigaco, IL, USA) ed è stato applicato il test del χ^2 per valutare le associazioni tra gli SNPs studiati e le variabili categoriche.

Il software "Haploview 3.2" è stato utilizzato per generare, secondo l'algoritmo di Gabriel (57), gruppi di aplotipi contenenti SNPs che viaggiano in "linkage disequilibrium" (valore di D' maggiore o uguale a 0.8). Inoltre è stato applicato un test di permutazione per evidenziare possibili differenze nella distribuzione degli aplotipi tra i due gruppi studiati. Il test di permutazione verifica l'ipotesi nulla che gli aplotipi dei

casi e dei controlli hanno la stessa distribuzione, vs l'alternativa che le distribuzioni siano differenti. Gli aplotipi dei pazienti affetti da sclerosi multipla ed epatite C ed i controlli , sono stati permutati 100.000 volte.

Cap. 4 RISULTATI

I dati relativi all'associazione genotipica tra la popolazione di controllo e i pazienti affetti da sclerosi multipla ed Epatite C , per i 35 SNPs valutati nei geni IFNAR1, IFNAR2, STAT-1, STAT-2, ed IRF-1, sono riportati rispettivamente in tab.1 e tab.2.

Le distribuzioni genotipiche degli SNPs nelle popolazioni analizzate sono in equilibrio di Hardy-Weinberg (dati non mostrati).

Tabella 1 Associazione genotipica tra la popolazione di controllo ed i pazienti affetti da sclerosi multipla (MS) per i 35 SNPs nei geni: IFNAR-1, IFNAR-2, STAT-1, STAT-2 e IRF-1.

GENE	SNP ID	Genotipi	Controlli, n (%)	MS, n (%)	P-value
IFNAR-1	rs# 2243590	TT	18 (22.2)	38 (22.1)	.336
		CT	33 (40.7)	85 (49.4)	
		CC	30 (37.0)	49 (28.5)	
	rs# 2252931	AA	4 (4.9)	11 (6.2)	.249
		AG	41 (50.6)	70 (39.5)	
		GG	36 (44.4)	96 (54.2)	
	rs# 2243600	GG	34 (58.6)	107 (59.1)	.873
		GT	22 (37.9)	65 (35.9)	
		TT	2 (3.4)	9 (5.0)	
IFNAR-2	rs# 2300370	AA	10 (18.9)	18 (11.0)	.239
		AG	26 (49.1)	77 (47.2)	
		GG	17 (32.1)	68 (41.7)	
	rs# 2248412	AA	38 (74.5)	121 (74.7)	.962
		AG	10 (19.6)	33 (20.4)	
		GG	3 (5.9)	8 (4.9)	
	rs# 2834154	AA	22 (44.9)	70 (38.9)	.509
		AC	20 (40.8)	90 (50.0)	
		CC	7 (14.3)	20 (11.1)	
	rs# 2154430	CC	25 (49.0)	68 (37.8)	.311
		CT	21 (41.2)	85 (47.2)	
		TT	5 (9.8)	27 (15.0)	
	rs# 2236756	AA	18 (42.9)	72 (40.2)	.944
		AC	19 (45.2)	86 (48.0)	
		CC	5 (11.9)	21 (11.7)	
	rs# 2284549	AA	8 (18.2)	15 (9.6)	.249
		AT	16 (36.4)	70 (44.6)	
		TT	20 (45.5)	72 (45.9)	
	rs# 2284551	AA	5 (12.2)	17 (9.4)	.722
		AG	16 (39.0)	82 (45.3)	
		GG	20 (48.8)	82 (45.3)	
rs# 2834163	AA	20 (39.2)	72 (40.0)	.805	
	AG	23 (45.1)	86 (47.8)		
	GG	8 (15.7)	22 (12.2)		

Tabella 1 (continua)

GENE	SNP ID	Genotipi	Controlli, n (%)	MS, n (%)		P-value
IFNAR-2	rs# 2236757	AA	6 (10.7)	15 (9.0)		.694
		AG	27 (48.2)	72 (43.4)		
		GG	23 (41.1)	79 (47.6)		
	rs# 2236758	AA	8 (14.3)	26 (14.6)		.820
		AG	25 (44.6)	87 (48.9)		
		GG	23 (41.1)	65 (36.5)		
STAT-1	rs# 2066802	TT	115 (97.5)	149 (83.7)	OR= 7.46, 95% CI= 2.22-25.10	.000*
		CT	3 (2.5)	29 (16.3)		
		CC	-	-		
	rs# 2066801	CC	64 (98.5)	181 (100)		.264
		AC	1 (1.5)	-		
		AA	-	-		
	rs# 2066805	AA	72 (97.3)	168 (93.3)		.171
		AG	2 (2.7)	12 (6.7)		
		GG	-	-		
	rs# 2066800	AA	72 (97.3)	173 (97.2)		.663
		AG	2 (2.7)	5 (2.8)		
		GG	-	-		
	rs# 2066797	AA	40 (83.3)	164 (91.6)		.063
		AG	7 (14.6)	15 (8.4)		
		GG	1 (2.1)	-		
	rs# 2066795	CC	50 (61.7)	115 (63.5)		.772
		CT	29 (35.8)	59 (32.6)		
		TT	2 (2.5)	7 (3.9)		
	rs# 1547550	CC	20 (20.8)	17 (9.5)	OR= 1.69, 95% CI= 1.01-2.81	.016*
		CG	42 (43.8)	76 (42.5)		
		GG	34 (35.4)	86 (48.0)		
rs# 2066793	CC	45 (81.8)	127 (70.2)		.200	
	CT	9 (16.4)	44 (24.3)			
	TT	1 (1.8)	10 (5.5)			
rs# 2066803	GG	49 (89.1)	158 (93.5)		.395	
	GT	6 (10.9)	10 (5.9)			
	TT	-	1 (0.6)			

Tabella 1 (continua)

GENE	SNP ID	Genotipi	Controlli, n (%)	MS, n (%)		P-value	
STAT-2	rs# 2066818	GG	58 (98.3)	171 (95.0)		.245	
		GT	1 (1.7)	9 (5.0)			
		TT	-	-			
	rs# 2066819	GG	57 (98.3)	172 (95.0)		.255	
		AG	1 (1.7)	9 (5.0)			
		AA	-	-			
	rs# 2020854	AA	55 (93.2)	169 (93.9)		.531	
		AG	4 (6.8)	11 (6.1)			
		GG	-	-			
	rs# 2066811	AA	58 (98.3)	179 (99.4)		.434	
		AG	1 (1.7)	1 (0.6)			
		GG	-	-			
	rs# 2066808	TT	44 (91.7)	171 (94.0)		.384	
		CT	4 (8.3)	11 (6.0)			
		CC	-	-			
IRF-1	rs# 2070721	AA	29 (60.4)	64 (35.8)	OR= 2.05, 95% CI= 1.03-4.09	.008*	
		AC	14 (29.2)	82 (45.8)			
		CC	5 (10.4)	33 (18.4)			
	rs# 2070723	TT	41 (48.2)	79 (46.5)		.295	
		CT	41 (48.2)	76 (44.7)			
		CC	3 (3.5)	15 (8.8)			
	rs# 2070727	GG	26 (49.1)	99 (56.6)		.135	
		GT	26 (49.1)	76 (43.4)			
		TT	1 (1.9)	-			
	rs# 2070728	GG	26 (49.1)	83 (47.4)		.171	
		AG	26 (49.1)	75 (42.9)			
		AA	1 (1.9)	17 (9.7)			
	rs# 2070729	TT	5 (9.4)	33 (18.3)		.189	
		GT	23 (43.4)	82 (45.6)			
		GG	25 (47.2)	65 (36.1)			
rs# 2070730	CC	37 (36.3)	79 (44.6)		.328		
	CT	56 (54.9)	81 (45.8)				
	TT	9 (8.8)	17 (9.6)				

Tabella 1 (continua)

GENE	SNP ID	Genotipi	Controlli, n (%)	MS, n (%)	P-value
IRF-1	rs# 2070731	AA	25 (47.2)	76 (45.8)	.454
		AG	26 (49.1)	75 (45.2)	
		GG	2 (3.8)	15 (9.0)	
	rs# 839	GG	40 (48.2)	82 (45.1)	.175
		AG	40 (48.2)	81 (44.5)	
		AA	3 (3.6)	19 (10.4)	

* Valore statisticamente significativo

Tabella 2 Associazione genotipica tra la popolazione di controllo ed i pazienti affetti da epatite C (pazienti HCV) per i 35 SNPs nei geni: IFNAR-1, IFNAR-2, STAT-1, STAT-2 e IRF-1

GENE	SNP ID	Genotipo	Controlli, n (%)	HCV, n (%)	P-value	
IFNAR-1	rs# 2243590	TT	18 (22.2)	11 (18.6)	.276	
		CT	33 (40.7)	32 (54.2)		
		CC	30 (37.0)	16 (27.1)		
	rs# 2252931	AA	4 (4.9)	7 (7.4)		.624
		AG	41 (50.6)	42 (44.2)		
		GG	36 (44.4)	46 (48.4)		
	rs# 2243600	GG	34 (58.6)	57 (60.6)		.649
		GT	22 (37.9)	31 (33.0)		
		TT	2 (3.4)	6 (6.4)		
IFNAR-2	rs# 2300370	AA	10 (18.9)	14 (15.9)	.836	
		AG	26 (49.1)	42 (47.7)		
		GG	17 (32.1)	32 (36.4)		
	rs# 2248412	AA	38 (74.5)	64 (75.3)		.550
		AG	10 (19.6)	19 (22.4)		
		GG	3 (5.9)	2 (2.4)		
	rs# 2834154	AA	22 (44.9)	33 (34.7)		.486
		AC	20 (40.8)	47 (49.5)		
		CC	7 (14.3)	15 (15.8)		
	rs# 2154430	CC	25 (49.0)	45 (47.9)		.775
		CT	21 (41.2)	36 (38.3)		
		TT	5 (9.8)	13 (13.8)		
	rs# 2236756	AA	18 (42.9)	32 (34.4)		.602
		AC	19 (45.2)	46 (49.5)		
		CC	5 (11.9)	15 (16.1)		
	rs# 2284549	AA	8 (18.2)	8 (9.6)		.295
		AT	16 (36.4)	39 (47.0)		
		TT	20 (45.5)	36 (43.4)		
	rs# 2284551	AA	5 (12.2)	12 (12.6)		.339
		AG	16 (39.0)	49 (51.6)		
		GG	20 (48.8)	34 (35.8)		
rs# 2834163	AA	20 (39.2)	30 (35.3)	.890		
	AG	23 (45.1)	40 (47.1)			
	GG	8 (15.7)	15 (17.6)			
rs# 2236757	AA	6 (10.7)	8 (8.6)	.848		
	AG	27 (48.2)	43 (46.2)			
	GG	23 (41.1)	42 (45.2)			

Tabella 2 (continua)

GENE	SNP ID	Genotipo	Controlli, n(%)	HCV, n(%)		P-value
IFNAR-2	rs# 2236758	AA	8 (14.3)	15 (16.5)		.832
		AG	25 (44.6)	43 (47.3)		
		GG	23 (41.1)	33 (36.3)		
STAT-1	rs# 2066802	TT	115 (97.5)	58 (86.6)	OR= 5.95, 95% CI= 1.55-22.81	.006*
		CT	3 (2.5)	9 (13.4)		
		CC	-	-		
	rs# 2066801	CC	64 (98.5)	95 (100)		.406
		AC	1 (1.5)	-		
		AA	-	-		
	rs# 2066805	AA	72 (97.3)	88 (96.7)		.597
		AG	2 (2.7)	3 (3.3)		
		GG	-	-		
	rs# 2066800	AA	72 (97.3)	90 (95.7)		.460
		AG	2 (2.7)	4 (4.3)		
		GG	-	-		
	rs# 2066797	AA	40 (83.3)	89 (93.7)		.093
		AG	7 (14.6)	6 (6.3)		
		GG	1 (2.1)	-		
	rs# 2066795	CC	50 (61.7)	67 (72.0)		.346
		CT	29 (35.8)	24 (25.8)		
		TT	2 (2.5)	2 (2.2)		
	rs# 1547550	CC	20 (20.8)	9 (11.5)	OR= 2.30, 95% CI= 1.24-4.24	.026*
		CG	42 (43.8)	50 (64.1)		
		GG	34 (35.4)	19 (24.4)		
	rs# 2066793	CC	45 (81.8)	66 (71.0)		.105
		CT	9 (16.4)	27 (29.0)		
		TT	1 (1.8)	-		
	rs# 2066803	GG	49 (89.1)	64 (97.0)		.085
		GT	6 (10.9)	2 (3.0)		
		TT	-	-		

Tabella 2 (continua)

GENE	SNP ID	Genotipo	Controlli, n (%)	HCV, n (%)		P-value
STAT-2	rs# 2066818	GG	58 (98.3)	89 (93.7)		.176
		GT	1 (1.7)	6 (6.3)		
		TT	-	-		
	rs# 2066819	GG	57 (98.3)	89 (93.7)		.181
		AG	1 (1.7)	6 (6.3)		
		AA	-	-		
	rs# 2020854	AA	55 (93.2)	87 (91.6)		.485
		AG	4 (6.8)	8 (8.4)		
		GG	-	-		
	rs# 2066811	AA	58 (98.3)	93 (97.9)		.673
		AG	1 (1.7)	2 (2.1)		
		GG	-	-		
	rs# 2066808	TT	44 (91.7)	62 (91.2)		.601
		CT	4 (8.3)	6 (8.8)		
		CC	-	-		
IRF-1	rs# 2070721	AA	29 (60.4)	24 (25.3)	OR= 2.59, 95% CI= 1.23-5.43	.000*
		AC	14 (29.2)	49 (51.6)		
		CC	5 (10.4)	22 (23.2)		
	rs# 2070723	TT	41 (48.2)	27 (40.3)	OR= 4.80, 95% CI= 1.26-18.20	.043*
		CT	41 (48.2)	30 (44.8)		
		CC	3 (3.5)	10 (14.9)		
	rs# 2070727	GG	26 (49.1)	35 (55.6)		.460
		GT	26 (9.1)	28 (44.4)		
		TT	1 (1.9)	-		
	rs# 2070728	GG	26 (49.1)	26 (41.3)	OR= 9.81, 95% CI= 1.21-79.40	.037*
		AG	26 (49.1)	27 (42.9)		
		AA	1 (1.9)	10 (15.9)		
	rs# 2070729	TT	5 (9.4)	18 (27.3)		.013*
		GT	23 (43.4)	31 (47.0)		
		GG	25 (47.2)	17 (25.8)		
rs# 2070730	CC	37 (36.3)	36 (41.4)		.315	
	CT	56 (54.9)	39 (44.8)			
	TT	9 (8.8)	12 (13.8)			
rs# 2070731	AA	25 (47.2)	36 (40.4)		.125	
	AG	26 (49.1)	40 (44.9)			
	GG	2 (3.8)	13 (14.6)			

rs# 839	GG	40 (48.2)	38 (40.4)	OR= 4.67, 95% CI= 1.29-16.87	.038*
	AG	40 (48.2)	42 (44.7)		
	AA	3 (3.6)	14 (14.9)		

* Valore statisticamente significativo

4.1 Sclerosi Multipla

I dati relativi all'associazione genotipica tra la popolazione di controllo e i pazienti MS per i 35 SNPs studiati hanno rivelato la presenza di alcuni genotipi a rischio nel gene STAT-1 e IRF-1.

STAT-1 E' stato osservato un valore statisticamente significativo per due polimorfismi nel gene STAT1 (C13737T, rs# 2066802, e G43145C rs# 1547550).

Il polimorfismo rs# 2066802 di STAT-1 mostra un OR di 7.46 per gli eterozigoti C/T con un intervallo di confidenza compreso tra 2.22 e 25.10 (Tab.1).

Il polimorfismo rs# 1547550 ha mostrato un OR di 1.69 per gli omozigoti GG con un intervallo di confidenza compreso tra 1.01 e 2.81.

IRF-1 Il polimorfismo rs# 2070721 nel gene IRF1 mostra un OR di 2.05 per gli eterozigoti A/C, con un intervallo di confidenza compreso tra 1.03 e 4.09 (Tab.1).

4.2 Epatite C

La comparazione tra i controlli ed i pazienti affetti da Epatite C ha rivelato associazioni statisticamente significative con il rischio malattia per i geni STAT-1 e IRF-1.

STAT-1 E' stato osservato un valore statisticamente significativo nel gene STAT-1 per i polimorfismi C/T rs# 2066802 e C/G rs # 1547550 (Tab.2).

Il polimorfismo rs# 2066802 mostra un OR di 5.95 per gli eterozigoti C/T, con un intervallo di confidenza compreso tra 1.55 e 22.81. Il polimorfismo rs# 1547550 mostra un OR di 2.30 per gli eterozigoti C/G, con un intervallo di confidenza compreso tra 1.24 e 4.24.

IRF-1 E' stato osservato un valore statisticamente significativo nel gene IRF-1 per i polimorfismi : rs# 2070721, rs# 2070723, rs# 2070728, AG rs# 839.

Il polimorfismo rs# 2070721 mostra un OR di 2.59 per gli omozigoti C/C con un intervallo di confidenza compreso tra 1.23 e 5.43.

Il polimorfismo rs# 2070723 mostra un OR di 4.80 per gli omozigoti C/C con un intervallo di confidenza compreso tra 1.26 e 18.20.

Il polimorfismo rs# 2070728 mostra un OR di 9.81 per gli omozigoti A/A con un intervallo di confidenza compreso tra 1.21 e 79.40.

Il polimorfismo rs# 839 mostra un OR di 4.67 per gli omozigoti i A/A con un intervallo di confidenza compreso tra 1.29 e 16.87

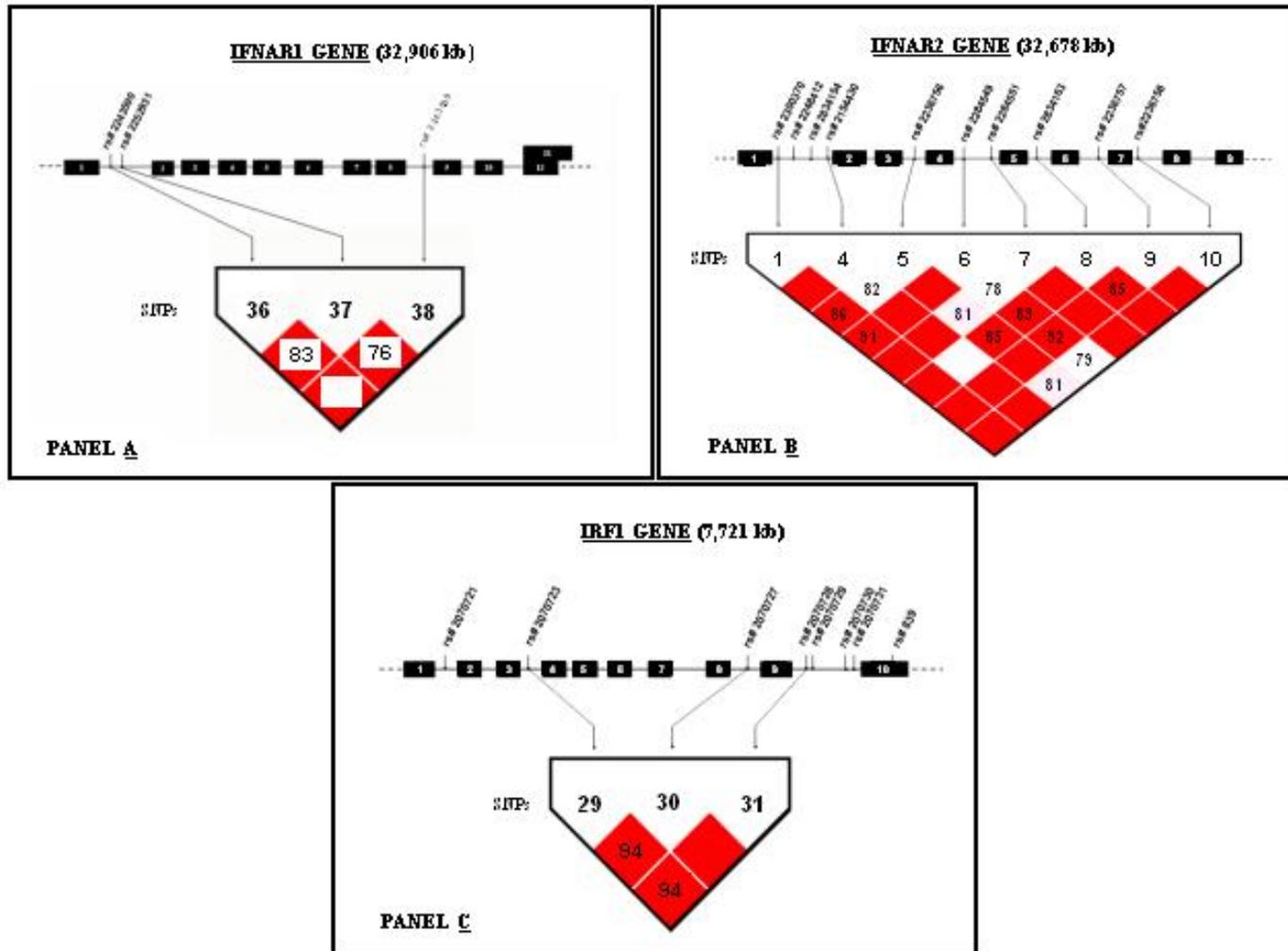
4.3 Analisi Aplotipi

L'analisi dei aplotipi per i 35 SNPs ha generato per tutte le popolazioni studiate tre blocchi di aplotipi relativi ai geni IFNAR-1, IFNAR-2 e IRF-1., ciascuno dei quali contiene SNPs in linkage disequilibrium.

4.3.1 Popolazione di controllo

Nella popolazione di controllo l'analisi degli aplotipi ha generato tre blocchi di aplotipi come riportato in fig. 1. Il primo blocco di aplotipi è di 19,47 kb e contiene tre SNPs nel gene IFNAR-1, di cui due nell'introne 1 e uno nell'introne 8; il secondo blocco di 21 kb è relativo al gene IFNAR-2, e contiene otto SNPs intronici; il terzo blocco di 3.2 kb contiene tre SNPs del gene IRF-1 rispettivamente nell'introne 3,8 e 9 (Fig.9, pannello A,B,C).

Fig. 9. Blocco di aplotipi ottenuto nella popolazione di controllo con il software Haploview



4.3.2 Popolazione di controllo vs pazienti affetti da Sclerosi Multipla

L'applicazione del test di associazione casi/controllo non ha rivelato un'associazione statisticamente significativa per i geni IFNAR-1 ed IFNAR-2 tra i controlli ed i pazienti affetti da sclerosi multipla, mentre è stato generato un blocco di aptotipi discriminante nel gene IRF-1 (Fig. 10). Quest'ultimo copre una regione di 6.7 Kb, più ampia di quella del blocco di controllo (3.2 Kb, fig.9), ed include un totale di sette SNPs; rispetto al blocco di controllo contiene altri quattro ulteriori SNPs intronici ed uno nella regione 3' UTR, mentre non contiene lo SNP rs# 2070727.

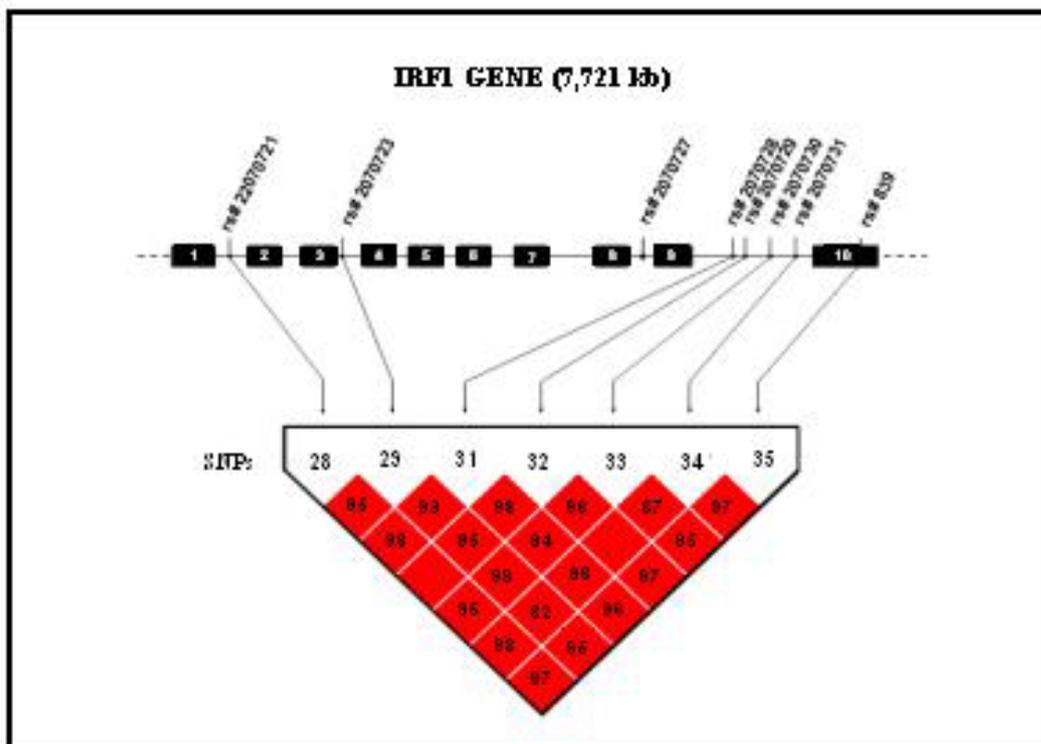


Fig. 10. Associazione nel blocco di aptotipi di IRF-1 ottenuto nei controlli vs pazienti MS

Nelle tab. 3 e 4 sono indicati rispettivamente la struttura e le relative frequenze dei quattro aplotipi identificati nel blocco del gene IRF1, sia per i pazienti MS, che nella popolazione di controllo. In particolare l'aplotipo CCATTGA risulta essere , significativamente più frequente nella popolazione affetta (31.1 %), rispetto a quella ai controlli (17.8%), applicando un test di permutazione di 100.000 (p=0.030).

Tab 3. Associazione allelica nel blocodi aplotipi di IRF-1 ottenuta in pazienti MS vs controls con il software Haploview

IRF-1 Haplotypes	rs# 2070721	rs# 2070723	rs# 2070728	rs# 2070729	rs# 2070730	rs# 2070731	rs# 839
	A/C	C/T	A/G	G/T	C/T	A/G	A/G
1	A	T	G	G	C	A	G
2	C	C	A	T	T	G	A
3	C	T	G	T	C	A	G
4	C	C	A	T	T	A	A

Tab 4 Frequenze dei quattro aplotipi identificati nel blocco del gene IRF1

IRF-1 Haplotypes	Total Frequencies	Relative Frequencies		P- value	Permutation P- value
		MS patients	Controls		
		1	56,9		
2	28,0	31,1	17,8	,0068*	,0303*
3	7,6	8,1	5,8	,4243	,9708
4	1,2	0,9	1,8	,4453	,9845

* Valore statisticamente significativo

4.3.3 Popolazione di controllo vs pazienti affetti da Epatite C

L'analisi degli aplotipi non ha mostrato associazioni significative nei blocchi dei geni IFNAR-1 e IFNAR-2 tra la popolazione di controllo ed i pazienti affetti da Epatite C, mentre è stata trovata associazione significativa nel blocco del gene IRF-1 (fig.11). Quest'ultimo copre una regione di 7.7 Kb, più ampia rispetto al blocco di controllo (3.2 Kb), ed include, rispetto a questo un ulteriore SNP intronico, ed uno nella regione 3' UTR.

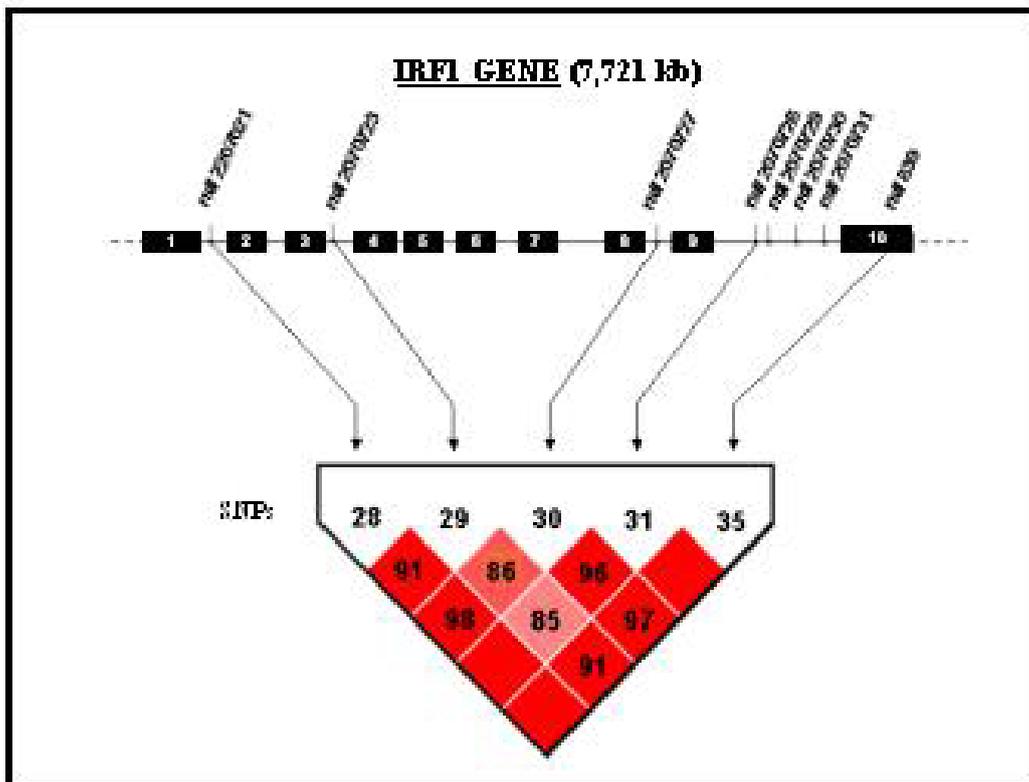


Fig. 11. Associazione nel blocco di aplotipi in IRF1 ottenuto nei controlli vs pazienti HCV

Le tab. 5 e 6 mostrano rispettivamente la struttura e la relativa frequenza nei pazienti e nei controlli, dei cinque aplotipi identificati nel blocco del

gene IRF-1. In particolare, tra questi, l'aplotipo CCGAA è più frequente nella popolazione affetta da Epatite C (15.5%), rispetto ai controlli (0.2%, $p=0.001$).

Tab. 5 Associazione allelica nel blocco di aplotipi di IRF-1 ottenuta in pazienti HCV vs controlli con il software Haploview

IRF-1 Haplotypes	rs# 2070721	rs# 2070723	rs# 2070727	rs# 2070728	rs# 839
	A/C	C/T	G/T	A/G	A/G
1	A	T	G	G	G
2	C	C	T	A	A
3	C	C	G	A	A
4	C	T	G	G	G
5	A	C	T	A	A

Tab. 6 Frequenze dei quattro aplotipi identificati nel blocco del gene IRF1

IRF-1 Haplotypes	Total Frequencies	Relative Frequencies		P- value	Permutation P- value
		HCV patients	Controls		
1	56,9	49,7	65,4	,0128*	,1730
2	21,5	22,2	20,8	,7926	1,000
3	8,5	15,5	0,2	,0744	,0011*
4	10,0	12,3	7,4	,2021	,9085
5	2,2	0,3	4,4	,0290*	,2957

*Valore statisticamente significativo

Cap 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente studio indica un possibile ruolo dei geni STAT-1 ed IRF-1 nella suscettibilità sia alla sclerosi multipla che all'Epatite C.

Un'iniziale analisi genetica dei 35 SNPs localizzati nei geni IFNAR-1, IFNAR-2, STAT-1, STAT-2 e IRF-1, è stata effettuata su 182 pazienti affetti da sclerosi multipla e 118 individui di una popolazione di controllo. L'analisi casi-controllo ha mostrato una significativa associazione con la MS per due SNPs nel gene STAT-1 e di uno SNP intronico nel gene IRF-1. Per quanto riguarda il ruolo del complesso del recettore dell'IFN nella suscettibilità alla malattia, è stata dimostrata in un precedente studio (53), un'associazione tra il polimorfismo 18417 di IFNAR1 e 11876 di IFNAR2 e la malattia; ma questi risultati non sono in accordo con un precedente lavoro in cui è stato effettuato uno studio di associazione familiare (62).

Anche il presente studio sembra confermare questa ultima ipotesi, anche se sono stati investigati differenti polimorfismi nei geni IFNAR-1 e IFNAR-2. Attualmente vi sono poche informazioni riguardo gli altri componenti della trasduzione del segnale attivata dall'IFN di tipo I (come STAT-1, STAT-2 e IRF-1), ed in particolare non è stata riportata nessuna associazione genetica tra la suscettibilità alla sclerosi multipla ed IRF-1 (50).

In questo studio, invece, è stato identificato nel gene IRF-1 un aplotipo di sei SNPs intronici ed uno nella regione 3' UTR, che risulta essere più frequente nei pazienti affetti rispetto ai controlli, suggerendo che questo aplotipo potrebbe conferire suscettibilità alla malattia.

Come è noto, la sclerosi multipla è considerata una patologia autoimmune del sistema nervoso centrale, mediata dalle cellule Th-1 helper, nella quale cellule CD4+ specifiche per i componenti basi della mielina, provocano demielinazione del sistema nervoso, con conseguenze devastanti (63).

L'attivazione delle cellule CD+ autoreattive ed il loro differenziamento nel fenotipo Th1, che rappresenta un evento cruciale nello sviluppo della sclerosi multipla, è determinata principalmente da citochine, come gli IFNs, che svolgono i loro effetti antiproliferativi e antivirali attraverso l'induzione prima del fattore trascrizionale STAT-1 e dopo della proteina regolatoria IRF-1. Perciò queste due proteine mostrano un ruolo importante nello sviluppo della sclerosi multipla; infatti precedenti studi hanno mostrato che cellule che non esprimono STAT-1, perdono l'espressione di alcuni membri delle caspasi ed aumentano la suscettibilità di una malattia autoimmune dovuto ad un difetto nella selezione negativa di cellule T autoreattive in topi transgenici. Questi risultati hanno dimostrato un ruolo essenziale di STAT-1 nel mantenimento della autotolleranza immunologica. Inoltre bassi livelli di

IRF-1 in cellule MNC provenienti da pazienti affetti da sclerosi multipla e non trattati, potrebbero essere la causa di instabilità dell'attivazione del background immunitario (64).

Gli SNPs identificati in questo studio nel gene IRF-1 ed associati alla sclerosi multipla hanno una localizzazione intronica, e quindi è improbabile un loro effetto funzionale sulla molecola; comunque il gene IRF-1 è localizzato (5q31.1) in un cluster di geni di citochine, comprendenti IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 e GM-CSF, e quindi essi potrebbero funzionare da marcatori in linkage con i polimorfismi presenti nei membri del cluster implicati nella risposta immunitaria.

In questo studio è stata effettuata la stessa analisi su 103 pazienti affetti da HCV per investigare il ruolo degli SNPs precedentemente descritti, nella suscettibilità all'Epatite C, ed abbiamo trovato che entrambi i geni STAT-1 e IRF-1 sono associati alla patologia; in questi geni abbiamo individuato per alcuni SNPs, dei genotipi che conferiscono un rischio malattia e inoltre, per il solo gene IRF-1 abbiamo identificato un aplotipo che permette di discriminare i pazienti dai controlli.

Il virus HCV ha un genoma ad RNA, ed è causa di epatite acuta e cronica nell'uomo. L'infezione viene diagnosticata dalla presenza di anticorpi anti-HCV e di RNA HCV nel siero (65). La maggior parte dei pazienti non sono in grado di eliminare il virus e sviluppano epatite Cronica con il rischio di progressione a cirrosi o carcinoma epatico,

mentre invece una piccola proporzione di pazienti mostra risoluzione della infezione in maniera soggettiva (66); la risposta immunitaria individuale contro il virus HCV nella fase acuta è responsabile di queste differenti risposte.

Entrambi i meccanismi che portano alla persistenza virale o all'eliminazione spontanea del virus, non sono ben conosciuti (65). Un possibile determinante del risultato di una infezione può essere la forza della risposta innata antivirale, mediata dall'Interferone. In particolare, l'IFN di tipo I (67), gioca un ruolo centrale nella eliminazione del virus, non solo nell'applicazione terapeutica, ma anche nella risposta innata cellulare.

L'IFN di tipo α agisce legandosi al suo recettore cellulare, e attraverso la formazione del complesso ISGF-3, attiva la trascrizione di geni attivati dall'IFN di tipo I (ISG), inclusi quelli ad attività antivirale, come Mxa, e molti altri, tra cui IRF-1, fattore trascrizionale implicato nel mediare la cascata di segnali che può essere attivata anche dall'IFN di tipo II.

L'mRNA di IRF-1, può essere però indotto anche da molte citochine, come TNF- α , IL-1, IL-6 e da fattori trascrizionali, come NF κ B. E' noto che IRF-1 regola positivamente l'espressione degli ISG, e dunque ha un ruolo importante nella regolazione della infiammazione epatica e nell'eliminazione del virus durante il trattamento con IFN nelle epatiti virali di tipo cronico

(67). Queste osservazioni confermano l'importanza di investigare la correlazione tra i polimorfismi SNPs nel gene IRF-1 e la suscettibilità alla malattia: infatti questi ultimi possono essere responsabili della differenze individuali nella risposta al virus. È stata trovata, in un precedente studio (65), un'associazione positiva tra il polimorfismo -300, localizzato nel promotore del gene, e la risposta al virus. Al contrario, in questo studio sono stati identificati dei polimorfismi associati ad un 'aumentata suscettibilità alla malattia; essi hanno una localizzazione intronica, e probabilmente potrebbero essere in linkage con altri SNPs presenti sullo stesso gene, determinandone variazioni strutturali, tali da indurre alterazioni dell'espressione del gene.

Per poter stabilire una infezione persistente nell'ospite, il virus HCV deve evadere i meccanismi di difesa cellulari antivirali indotti dall'IFN. La stessa strategia di difesa potrebbe contribuire alla resistenza al trattamento con IFN osservata nella maggior parte dei pazienti affetti da epatite C cronica (68).

I meccanismi che sono alla base di tale resistenza non sono ben conosciuti: le proteine virali potrebbero interferire con il segnale di trasduzione intracellulare indotto dall'IFN, inibendo così l'induzione di proteine antivirali (69).

Studi genetici e biochimici in vivo hanno suggerito che STAT-1 ha un ruolo fondamentale per le funzioni dell'IFN; inoltre è stato osservato che

cellule non esprimenti STAT-1 non possiedono attività antivirale mediata dall'IFN: STAT-1 sembra quindi svolgere un ruolo indispensabile nella immunità innata antivirale (70).

Nel presente studio sono stati investigati polimorfismi nel gene STAT-1 (rs# 2066802 a localizzazione esonica e rs# 1547550 a localizzazione intronica); di questi l'SNP rs# 2066802 in particolare, codifica per un codone sinonimo (L/L) e potrebbe avere un effetto negativo sull'espressione di STAT-1. Infatti sono state descritte mutazioni sinonime in geni in grado di indurre variazioni funzionali suggerendo un nuovo meccanismo genetico (71). La mutazione sinonima, più che silente, altererebbe il folding dell'mRNA, portando ad un decremento nella stabilità del messaggero, con effetti negativi sulla sua traduzione, e dunque sulla proteina. Studi funzionali sono necessari a sostegno di questa ipotesi.

I nostri risultati, dunque, indicano che polimorfismi nei geni STAT1 e IRF1 potrebbero rappresentare marcatori di suscettibilità alla sclerosi multipla ed all'Epatite C, o come indici indiretti o come marcatori di varianti funzionali, suggerendo un ruolo dei geni nell'eziologia di entrambe le patologie. Ulteriori studi di conferma di tale associazione potranno aiutare a chiarire il loro ruolo nella suscettibilità ad entrambe le patologie.

Cap. 6 BIBLIOGRAFIA

1. Shaker A., Ross Hawkins J. DNA variation and the future of human genetics. *Nat.Biotechnol.* 1998; 16(1): 33-39.
2. Landegren U., Nilsson M., Kwok P. Y. Reading Bits of Genetic Information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genom. Res.* 1998; 8 : 769-776.
3. Brookes A.J. The essence of SNPs. *Gene* 1999; 8, 234(2):177-86.
4. Wang D.G., Fan J.B., Siao C.J., Berno A., Young P., Sapolsky R., Ghandour G., Perkins N., Winchester E., Spencer J., Kruglyak L., Stein et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998; 15, 280: 1077-1082.
5. Bhasi K, Zhang L., Brazeau D. et al. Information-theoretic identification of predictive SNPs and supervised visualization of genome-wide association studies. *NAR* 2006; 34, 14:e101.
6. Alarcòn-Riquelme M.E. The genetic of systemic lupus erythematosus: understanding how SNPs confer disease susceptibility. *Springer Semin Immun* DOI 10.1007/s00281-006-0033-4 Review.

7. Spannbrucker N., Eichelbaum M., Steinke B. et al. A human genetic defect in the metabolism of sparteine *Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med.* 1978; 84:1125-1127.
8. Mahgoub A., Idle J.R., Dring L.G., Lancaster R., Smith R. L. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 1977; 17: 584-586.
9. Lewis D.F.V: 57 varieties: the human cytochromes. *Pharmacogenomics* 2004,5:305-318.
10. Graham S.E., Peterson J.A. How similar are P450s and what can their differences teach us? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 199,369:24-
11. Koo S.H., Lee E.J.D. Pharmacogenetics approach to therapeutics. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2006;33, 525,532.
12. Song-Feng YU and al. Genetic factors for individual administration of immunosuppressants in organ transplantation. *Hepatobiliar Pancreat Dis Int.* 2006;5(3): 337-344.
13. Koistinen P., Ruuska S., Saily M. et al. An association between manganese superoxide dismutase polymorphism and outcome of chemotherapy in acute myeloid leukaemia. *Hematologica* 2006 Jun;91(6):829,832.

14. Gonzalez F.J. et al. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 1998; 331: 442-446.
15. Takaoka A., Yanai H. Interferon signalling network in innate defence *Cellular Microbiology* 2006;8 (6):907- 922. Review.
16. Stetson D.B., Medzhitov R. Type I Interferons in Host Defense. *Immunity* 2006; 25:373-381. Review.
17. Stark G.R., Kerr I.M., Williams, B.R., et al. How cell respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem* 1998; 67:227-264.
18. Gil J., Esteban M. The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FGADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of FAS and TNF-alpha receptors. *Oncogene* 2000; 19: 3665-3674.
19. Sangfelt O., Erickson S., Castro J., Heiden T., Einhorn T., and Grander D. Induction of apoptosis and inhibition of cell growth are independent responses to interferon-alpha in hematopoietic cell lines. *Cell Growth Differ.* 1997; 8:343-352.
20. Dai I., Krantz S.B. Interferon gamma induces upregulation and activation of caspase 1, 3 and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. *Blood* 1997; 93:3309-3316.

21. Schindler C., Darnell J.E. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the Jak-STAT pathway. *Annu.Rev.Biochem.* 1995; 64: 621-651.
22. Fu X.Y., Schindler C., Improta T., Aebersold R., Darnell J.E. Jr. The proteins of ISGF3, the IFN-alpha induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1992; 89: 7840-7843.
23. Schindler C., Fu X., Improta T., Aebersold R. and J.E. Darnell Jr. Proteins of Transcription Factor ISGF-3: One Gene Encodes the 91- and 84- kDa ISGF-3 Proteins that are activated by Interferon-alpha. *Proc.Acad.Natl.Acad.Sci.USA* 1992; 89: 7836-7839.
24. Shuai K., Schindler C., Prezioso V.R. , Darnell J.E. Jr. Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* 1992; 11: 808-812.
25. Velazquez L., Fellous M., Stark G. R. , Pellegrini S. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 1992; 24: 313-322.
26. Muller M., Briscoe J., Laxton C., Guschin D., Ziemiecki A., Silvennoinen O., Harpur A.G., Barbieri G., Witthuhn B.A., Schindler C., et al. The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction. *Nature* 1993; 366: 129-135.

27. Watling D., Guschin D., Muller M., Silvennoinen O., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Rogers N.C., Schindler C., Stark G.R., Ihle J.N., et al. Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature* 1993, 366(6451):166-170.
28. Durbin J.E., Hackenmiller R., Simon M.C., Levy D.E. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 1996; 84: 443-450.
29. Meraz M.A., White J.M., Sheehan K.C., Bach E.A., Rodig S.J., Dighe A.S., Kaplan D.H., Riley J.K., Greenlund A.C., Campbell D., Carver-Moore K., DuBois R.N., Clark R., Aguet M., Schreiber R.D. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 1996; 84(3): 431-442.
30. Bromberg J.F., Horvath C.M., Wen Z., Schreiber R.D., Darnell J.E. Jr. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 ;93(15):7673-7678.
31. Kaplan D.H., Shankaran V., Dighe A.S., Stockert E., Aguet M., Old L.J., Schreiber R.D. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(13):7556-7561.

32. Takaoka A., Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cellular Microbiology* 2006,8(6):907-922.
33. Barth H., Liang T.J., Baumert F. Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology* 2006,44:527-535.
34. Liang TJ., Rehemann B, Seeff LB., Hoofnagle LH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000;132:296-305.
35. Di Bisceglie AM. Genetic factors for individual administration of immunosuppressants in organ transplantation. *Hepatology* 1997; 26:34S-38S.
36. Fried MW., Shiffman ML., Reddy KR, et al. PEG interferon α -2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *New Engl J Med* 2002;347:975-982.
37. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. PEG interferon α -2a plus ribavirin compared with interferon alpha-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-965.
38. Davis GL. Current therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2000; 118 :S104-114.
39. Castet V., Fournier C., Soulier A., Brillet R., et al. Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virol* 2002;76:8189- 8199.

40. Brassard D.L., Grace MJ., Bordens RW. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol* 2002;71 (4):565-581
41. Bin Gao, Feng Hong, and Svetlana Radaeva. Host factors and failure of interferon-alpha treatment in hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39:880-890.
42. Iwasaki A., Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology* 2004; 5(10): 987-95.
43. Lublin FD., Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of a international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996;46: 907-11.
44. Javed A., Reder A.T. Therapeutic role of beta-interferons in multiple sclerosis. *Pharmacology & Therapeutics* 2006; 11:35-56.
45. Jacobs L., O'Malley J., Freeman A., et al. Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. *Science* 1981; 214 (4524):1026-1028
46. Jacobs L., Salazar AM., Herndon R. et al. Multicentre double-blind study of effect of intrathecally administered natural human fibroblast interferon on exacerbations of multiple sclerosis. *Lancet* 1986; Dec 20-27 2 (8521-8527):1411-1413.

47. Chofflon M. Recombinant human interferon beta in relapsing-remitting multiple sclerosis: a review of the major clinical trials. *Eur J. Neurol.* 2000; 7 (5):369-380.
48. Zaffaroni M. Treatment optimization in multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2005; 26:S187-S192.
49. Fusco C., Andreone V., Coppola G., et al. HLA-DRB1* 1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 57: 1976-1979.
50. Vandebroek K, Hardt C, Louage J ,et al. Lack of association between the interferon regulatory factor-1 (IRF1) locus at 5q31.1 and multiple sclerosis in Germany, Northern Italy, Sardinia and Sweden. *Genes and Immunity* 2000;1:290-292.
51. Sriram U, Barcellos LF, Villoslada P, et al. Pharmacogenomic analysis of interferon receptor polymorphisms in multiple sclerosis. *Genes and Immunity* 2003;4:147-152.
52. Weinstock-Guttman B, Badgett D, Patrick K, et al. Genomic effects of IFN- β in Multiple Sclerosis patients. *The Journal of Immunology* 2003;171:2694-2702.
53. Leyva L, Fernández O, Fedtz M, et al. IFNAR1 and IFNAR2 polymorphisms confer susceptibility to multiple sclerosis but not to interferon-beta treatment response. *Journal of Neuroimmunology* 2005;163:165-171.

54. Wietzke-Braun P, Maouzi AB, Manhardt LB, Bickeboller H, Ramadori G, Mihm S. Interferon regulatory factor-1 promoter polymorphism and the outcome of hepatitis C virus infection. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2006;18(9):991-997.
55. Saito H, Tada D, Wakabayashi K, Nakamoto N, Takahashi M, Nakamura M, Ebinuma H, Ishii H. The detection of IRF-1 promoter polymorphisms and their possible contribution to T helper 1 response in chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22(6):693-700.
56. Stone LA, Frank JA, Albert PS, et al. Characterization of MRI response to treatment with interferon- β -1b: contrast-enhancing MRI lesion frequency as a primary outcome measure. *Neurology*;49:862. 1997.
57. Gabriel SB, Schaffner S F, Nguyen H, et al. The structure of haplotype blocks in the humane genome. *Science* 2002;296:2225-2229.
58. Jacques B. de Kok, Erwin T.G. Wiegerinck, Blinda A.J. Rapid Genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotide (MGB probes). *Human Mutations* 2002,19 :554-559.

59. Kenneth J. Livak Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 1999,14:143-149.
60. Valisi, Gramigna. PCR-Real Time e carica virale HCV: standardizzazione di una metodica quantitativa con lo standard internazionale WHO. *La Salute* 2003, 1: 4-6.
61. Taqman allelic discrimination protocol Applied Biosystems.
62. Sriram U, Barcellos LF, Villoslada P, et al. Pharmacogenomic analysis of interferon receptor polymorphisms in multiple sclerosis. *Genes and Immunity* 2003;4:147-152.
63. Takeaki Nishibori, Yoshinari Tanabe, Leon Su, Mischeal David. Impaired development of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the absence of STAT-1: increased susceptibility to autoimmune disease. *J Exp Med* 2004;199:25-34
64. Kyosawa K., Sodeyama T., Toneka E. Interrelation of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990; 12: 671-675.
65. Braun P.W., Maouzi A.B., Manhardt L.B. et al. Interferon regulatory factor-1 promoter polymorphism and the outcome of hepatitis C virus infection. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006; 18(9):991-997.

- 66.Saito T., Guijin J., Shinzawa H., et al. Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 317: 335-341.
- 67.Kanazawa N., Kurosaki M., Sakamoto N., et al. Regulation of Hepatitis C replication by interferon regulatory factor 1. *Journal of Virology* 2004; Sept: 9713-9720.
- 68.Blindenbacher A., Duong F.H.T., Hunziker L., et al. Expression of Hepatitis C virus proteins inhibits interferon α signaling in the liver of transgenic mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1465-1475.
- 69.Aceti A., Zechini B., Griggi T., et al. Undetectable phospho-STAT1 in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C who do not respond to interferon- α therapy. *Liver international* 2005;25:987-993.
- 70.Lin W., Choe W. H., Hiasa Y., et al. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signalling by degrading STAT1. *Gastroenterology* 2005;128:1034-1041.
- 71.Duan J.,Wainwright M.S., Comeron J.M. et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Human Molecular Genetics* 2003;12 (3):205-216.

