



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari

DOTTORATO DI RICERCA IN:
“BIOCHIMICA, BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI”

XXI Ciclo

Genetica della calcolosi renale:
studio multidisciplinare di un isolato genetico dell’Ogliastra

Coordinatore : Prof. Bruno Masala

Tutor: Dott. Mario Pirastu

Dottoranda: Dott.ssa Silvia Tore

Anno Accademico 2007-2008

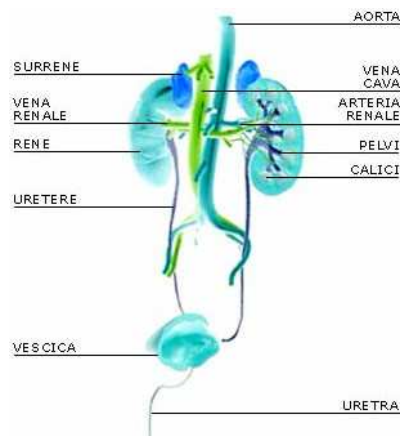
INDICE

INTRODUZIONE	1
1.1. La calcolosi renale: definizione e manifestazione clinica	1
1.2. Fisiopatologia	2
1.3. Epidemiologia	4
1.4. Fattori di rischio	7
1.5. Predisposizione genetica.	9
1.6 Isolati genetici	14
SCOPO DELLA RICERCA	16
MATERIALI E METODI	17
3.1 Analisi epidemiologica	17
3.2. Selezione dei campioni	18
3.3. Scelta delle configurazioni familiari	19
3.4. Genotipizzazione dei campioni	21
3.4.1. Genotipizzazione per 900 microsatelliti	21
3.4.2 Genotipizzazione mediante tecnologia Gene Chip Mapping	24
3.5. Analisi statistica	25
3.5.1 Analisi di linkage non parametrica	25
3.5.2. Studio di associazione caso-controllo	27
RISULTATI	31
4.1. Genome Wide Search	32
4.2. Ricerca di possibili geni funzionalmente associabili alla calcolosi.	36
4.3. Genome Wide Associations	38
DISCUSSIONE	44
APPENDICE	53
BIBLIOGRAFIA	57

INTRODUZIONE

1.1. La calcolosi renale: definizione e manifestazione clinica

La calcolosi dell'apparato urinario è una condizione patologica determinata dalla formazione di aggregati cristallini (calcoli) all'interno dei reni o di altre parti delle vie urinarie, come i calici renali, la pelvi renale, l'uretere e la vescica. I cristalli, aggregandosi, crescono di dimensioni formando i calcoli che possono essere di grandezza molto variabile. Queste formazioni sono in grado di danneggiare la mucosa e possono costituire un ostacolo al normale deflusso dell'urina lungo le vie escrettrici.



Quasi sempre i calcoli si formano nei reni, da dove possono migrare attraverso le vie urinarie, percorrerle tutte ed essere eliminati con le urine durante la minzione.

Durante questa migrazione, si possono bloccare nei punti più ristretti delle vie urinarie e creare così ostruzione e se non rimossi

dilatazione a monte delle stesse, fino al rigonfiamento del rene che viene definito "idronefrosi". Più il calcolo è grande e più facilmente causa dolore ed ostruzione. La formazione dei calcoli, anche se talvolta asintomatica, è responsabile di una sintomatologia tipica e di complicanze quali l'ostruzione delle vie urinarie. Il dolore può essere fortissimo, localizzato al fianco interessato ed irradiato fino all'inguine

ed ancora al testicolo nell'uomo ed alla vulva nella donna. Non di rado, durante una colica renale, il paziente manifesta bruciore urinario, nausea, vomito, sudorazione, senso di gonfiore addominale e sangue nelle urine.

Nei casi più gravi si può manifestare anuria (cessazione dell'emissione di urina), e in presenza di infezione febbre, brividi, urine torbide e maleodoranti¹.

La nefrolitiasi che interessa le vie urinarie superiori (rene ed uretere) deriva nella maggioranza dei casi da una alterazione del metabolismo minerale, e in misura minore, dalla presenza di una malformazione complicata o meno da infezione, (es. stenosi del giunto pielo-ureterale, reflusso vescico-ureterorenale). La calcolosi delle basse vie urinarie (vescica e uretra), riconosce una eziologia legata prevalentemente ad ostruzione ed infezione cronica o alla presenza di un corpo estraneo².

La calcolosi è una patologia che tende a recidivare, esponendo chi ne soffre a nuovi e ripetuti episodi nel tempo³.

1.2. Fisiopatologia

Normalmente le urine contengono sia sostanze che possono portare alla formazione di calcoli (promotori) sia sostanze che ne impediscono la crescita (inibitori). Una chiara trasmissione genetica della calcolosi è dimostrabile in pochi casi, ma appare evidente da vari studi che un soggetto con familiarità di calcolosi ha una probabilità circa 3 volte superiore alla media della popolazione generale di andare incontro ad un episodio analogo.

In ogni calcolo si distingue abitualmente una matrice di natura organica attorno alla quale si depositano sostanze cristalline di varia natura. Le più comuni sono ossalato di calcio, fosfato di calcio e acido urico. Il rimanente è costituito da struvite (fosfato triplo di ammonio e magnesio), apatite (carbonato apatite più idrossiapatite), cistina e

occasionalmente silicati, xantina, 2,8 diidrossiadenina. La soprasaturazione urinaria è alla base del meccanismo di formazione dei calcoli, fatta eccezione per i calcoli di ossalato di calcio e fosfato di calcio. Infatti nonostante le urine siano quasi sempre soprasature rispetto ai sali di calcio, i soggetti che formano calcoli sono una minoranza, e questo è imputabile alla presenza di alcune sostanze inibenti la cristallizzazione. Esiste un complesso equilibrio tra sostanze favorevoli la litogenesi (calcio, ossalati, fosfati, acido urico) ed altre inibenti (magnesio, citrato, fosfocitrato, pirofosfato, tartrato, proteina di Tamm-Horsfall, glicosaminglicani, nefrocalcina, uropontina, bikunina, calgranulina, frammento 1 protrombina urinaria)⁴.

Nella genesi del calcolo però, oltre all'interazione tra saturazione urinaria ed inibitori presenti, un ruolo importante è svolto dal rene che ne modifica e ne modula i processi fisico-chimici suddetti, così da portare alla formazione del calcolo. Gli inibitori agiscono adsorbendosi alla superficie dei cristalli, alterandone il reticolo e impedendo la apposizione di nuovi ioni. In tal modo si previene la nucleazione e la crescita del calcolo dovuta alla soprasaturazione delle urine, che tenderebbe a riportare i sali disciolti in fase solida.

La valutazione degli inibitori è di difficile interpretazione clinica per l'impossibilità del loro dosaggio urinario. Il citrato ed il magnesio sono due inibitori per i quali possiamo misurare la concentrazione urinaria ed il loro effetto sullo stato di saturazione, ma non la loro capacità inibitoria. Il citrato è sintetizzato dal fegato e dal rene e nelle urine può legarsi al calcio e prevenire la formazione di cristalli con ossalati o fosfati. L'ipocitraturia può essere ereditata o secondaria a patologie renali o intestinali, oppure ad una alimentazione scorretta; in questi pazienti l'assunzione di citrato può limitare il rischio litogeno. Il magnesio compete con il calcio nel legame con gli ossalati formando un sale più solubile dell'ossalato di

calcio. Un'importante concausa nella formazione dei calcoli renali, è rappresentata da uno stato di disidratazione che comporta una maggiore concentrazione nelle urine.

Il trattamento base nella cura e prevenzione della calcolosi è l'assunzione giornaliera di 2-3 litri di acqua oligominerale o in genere contenente pochi elementi non idrosolubili. Il passaggio di acqua, specialmente con una certa portata, ha un effetto diuretico, vanificato se l'acqua contiene elementi insolubili che tendono ad aggregarsi. A sostegno dei classici rimedi terapeutici di sintesi, oggi vengono spesso proposti fitocomplessi ad azione disgregante (*Ceterach officinarum*), antiossidanti (lupeolo di *Crateva nurvala*). Interessante appare l'uso di *Phyllanthus niruri* (*Chancapiedra*) che determina il rilascio di glicosamminoglicani con impedimento dell'aggregazione dei cristalli di ossalato di calcio.⁵

1.3. Epidemiologia

Variazioni geografiche

La calcolosi urinaria è un problema globale con un'incidenza maggiore nella società occidentale. L'epidemiologia della calcolosi urinaria è strettamente dipendente dai fattori geografici; le differenze sono da mettere in relazione con razza, dieta e fattori climatici. Nelle nazioni socio-economicamente più avanzate la prevalenza della calcolosi urinaria varia fra il 4% e il 20%⁶. La nefrolitiasi in particolare oscilla tra il 4 e il 10 % della popolazione adulta, con una frequenza di recidiva che arriva fino all'80%. Nella popolazione europea l'incidenza della patologia è del 5-9%; similmente in Italia la prevalenza è stimata tra il 6 e 9%, con un'incidenza di circa 100.000 nuovi casi/anno⁷.

La calcolosi vescicale è relativamente frequente in alcune aree di Turchia, Africa, Medio Oriente, India e Sud Est Asiatico^{8,9}, sebbene

l'incidenza sia in progressiva diminuzione, in relazione al miglioramento delle condizioni socio-economiche di tali popolazioni¹⁰. Viceversa la calcolosi reno-ureterale è particolarmente frequente nelle nazioni orientali⁷.

Negli americani la prevalenza della calcolosi ha subito un incremento dal 3,8% negli anni 1976-1980 al 5.2% negli anni 1988-1994¹¹. Nel Nord America e in Europa il 40% dei calcoli è composto da calcoli misti di ossalato e fosfato di calcio, il 30% da ossalato di calcio e il 12% da fosfato di calcio; meno frequenti i calcoli di acido urico (6%) e di cistina (2%)¹². I calcoli di urato d'ammonio sono particolarmente frequenti nelle regioni con diffusa malnutrizione e quindi l'incidenza è legata alle condizioni socio-economiche¹³.

Genere, razza ed età anagrafica

La calcolosi urinaria è riscontrata più frequentemente nei soggetti di razza bianca, di età compresa tra i 40 e i 50 anni, probabilmente per motivi legati alle abitudini alimentari¹⁴. I calcoli di ossalato di calcio sono più frequenti nei soggetti più giovani, mentre i calcoli misti e i calcoli di acido urico tendono a manifestarsi nell'età più avanzata³.

Il rapporto di incidenza maschi/femmine si avvicina a 2/1 probabilmente per il ruolo che hanno gli ormoni sessuali femminili nella diminuzione dell'escrezione urinaria di ossalato¹⁵. Il rapporto maschi/femmine nelle casistiche italiane si attesta al 1,5/1⁷. Recenti studi condotti sulla popolazione islandese confermano questa prevalenza. È stato osservato infatti che in individui di età compresa tra i 65 anni e i 69 anni, la prevalenza si attesta nel 8.8% degli uomini contro il 5% delle donne¹⁶.

Fattori climatici

Nelle regioni più calde (o nelle stagioni più calde in regioni a clima temperato) vi è un' aumentata incidenza di calcolosi urinaria in relazione al diminuito volume urinario, secondario all' aumentata traspirazione cutanea. Il diminuito volume implica un aumento dell' osmolarità urinaria, un aumento della concentrazione di calcio e acido ossalico e una diminuzione del pH urinario¹⁷. Un recente lavoro ha messo in evidenza come l'esposizione ad alte temperature e quindi più in generale il riscaldamento globale, rappresenti un altro fattore di rischio per la calcolosi renale, a seguito di alterazioni metaboliche come ipocitratemia e basso volume urinario¹⁸.

Aumentati livelli di vitamina D in relazione alla prolungata esposizione ai raggi solari possono inoltre portare ad un aumento dell' assorbimento intestinale e quindi all' aumentata escrezione urinaria di calcio¹⁹.

Fattori legati alla dieta

Le abitudini alimentari sono fortemente legate allo stato socio-economico e allo stile di vita. Il regime alimentare tipico delle popolazioni industrializzate è caratterizzato da un alto apporto alimentare di proteine animali. Una dieta ricca di proteine animali determina maggiore acidità urinaria, maggiore escrezione urinaria di acido urico e calcio, maggiore escrezione di fosfati. Il contenuto di amminoacidi solforati (metionina, cisteina/cistina) responsabili dell' aumento della calciuria è più elevato nelle proteine animali (uova, carne e pesce) che nelle proteine vegetali (fagioli, piselli, patate). Questo spiega perché l'incidenza della calcolosi tenda a crescere con il benessere economico^{20, 21}. È stata dimostrata l' associazione tra due distinte misure di obesità: BMI (body mass index) e circonferenza della vita, ed un aumento del rischio di calcolosi urinaria²². L' assunzione di calcio e di magnesio è stata inversamente correlata con il rischio di calcolosi (riduzione dell' assorbimento intestinale

dell'ossalato assunto con la dieta e conseguente riduzione dell'escrezione urinaria dello stesso)²³.

1.4. Fattori di rischio

La calcolosi renale è un malattia multifattoriale che dipende dall'interazione di fattori ambientali e genetici. Tra le cause della calcolosi renale non vi è un unico fattore, ma molteplici fattori in grado di determinare lo sviluppo della malattia. L'eziopatogenesi della calcolosi sembra perciò complessa e sarebbe caratterizzata dalla interazione tra diversi geni predisponenti e molteplici determinanti ambientali, soprattutto alimentari^{24,25}. Il peso dei singoli fattori potrebbe inoltre cambiare in relazione alle caratteristiche ambientali e genetiche dei singoli pazienti. Queste caratteristiche patogenetiche rendono estremamente difficile la definizione dei geni e dei nutrienti coinvolti nello sviluppo della calcolosi renale, anche se è verosimile che esistano dei fattori causali principali, capaci cioè di giocare un ruolo maggiore rispetto ad altri nel determinare il rischio di malattia.

Come si evince dall'epidemiologia i fattori di rischio di tipo ambientale che più concorrono alla patologia sono: le abitudini alimentari, lo stile di vita, il clima e lo stato socio economico. Inoltre uno dei fattori favorenti è l'insufficiente introduzione di acqua: infatti un ridotto apporto di liquidi incrementa la concentrazione e la precipitazione dei sali nelle urine, aumentando così il rischio di formazione dei calcoli. Possiamo inoltre annoverare tra i fattori di rischio alcune condizioni patologiche che predispongono all'insorgenza della calcolosi renale come l'obesità, il diabete e l'ipertensione

Alcuni parametri-indice di obesità quali il peso, la circonferenza della vita e l'indice di massa corporea sono stati messi in relazione con la comparsa di calcoli renali. Dalla letteratura è ben noto come l'obesità sia associata alla resistenza all'insulina e

all'iperinsulinemia compensatoria, le quali sono responsabili di scompensi metabolici. L'insulino resistenza è associata a difetti nella produzione di ammoniaca nel rene e alla conseguente acidificazione delle urine che favorisce la formazione di calcoli renali principalmente da acido urico(UA.)²⁶.

Come l'obesità anche al diabete di tipo 2 è stato associato un incremento del rischio di calcolosi renale. È noto infatti che le urine di pazienti diabetici presentino un basso pH urinario, fattore di rischio per la formazione di cristalli di urato. Anche in questo caso la produzione di urine acide è da imputarsi all'insulino resistenza, stato caratteristico del diabete mellito tipo II (DMT2)²⁷. Nell'individuo obeso spesso il passo che conduce al DMT2 ha il suo centro nel fenomeno dell'insulino resistenza da ridotta sensibilità: il pancreas aumenta sempre più la produzione di insulina per far fronte al peggiorare del metabolismo dello zucchero, ma col tempo questo porta all'esaurimento delle cellule del pancreas che producono l'ormone insulina, e di conseguenza al diabete. L'obesità viscerale può portare all'aumento dell'insulino-resistenza seguendo diverse vie: incremento di alcuni ormoni che hanno un'azione anti-insulinica, diminuzione dell'attività del sistema nervoso simpatico, aumento degli acidi grassi disponibili nel fegato e meccanismi morfologici. Non a caso, dunque, il rientro nel peso ideale è spesso il modo migliore per far regredire le forme di DMT2 meno gravi e ritardare il ricorso agli ipoglicemizzanti orali e all'insulina²⁸.

Diversi studi epidemiologici hanno analizzato l'associazione tra nefrolitiasi e ipertensione, riscontrando che soggetti ipertesi mostrano una maggiore incidenza di nefrolitiasi se paragonati ai soggetti normotesi. In alcuni studi (Strazzullo et al.²⁹ e Cappuccio et al.³⁰) viene confermata la tendenza a formare calcoli per persone ipertese e allo stesso modo pazienti con storia di calcolosi renale tendono a diventare ipertesi. Contrariamente però lo studio di Madore et al.³¹ suggerisce che una conclamata storia di nefrolitiasi corrisponde

a un aumentato rischio di ipertensione, ma pazienti ipertesi non mostrano un incremento nella formazione di nuovi calcoli renali. Sebbene quindi diversi studi concordino sul fatto che la nefrolitiasi rappresenti un fattore di rischio per l'ipertensione, esistono dati che mostrano come l'ipertensione di per se non rappresenti un fattore di rischio per la nefrolitiasi.

Sono inoltre annoverati come fattori di rischio per la calcolosi le alterazioni di tipo metabolico come: ipercalciuria, iperossaluria, cistinuria, iperuricosuria, ipocitraturia.

1.5. Predisposizione genetica.

Esistono numerose evidenze in favore dell'associazione di fattori familiari con lo sviluppo della calcolosi urinaria^{32,33}. In gioco sembrano esserci la predisposizione ad un'aumentata escrezione di soluti litogeni o ad un'aumentata tendenza alla cristallizzazione dovuta al difetto degli inibitori e/o all'aumento dei promotori³⁴.

Sono già stati descritti diversi geni coinvolti in alterazioni di tipo metabolico implicati nella formazione di calcoli renali. Il fattore di rischio più frequente è l'ipercalciuria fortemente associata alla formazione dei calcoli di ossalato calcio. I fattori genetici che sottintendono all'ipercalciuria non sono del tutto chiari, ma studi epidemiologici suggeriscono che più del 20% di pazienti con ipercalciuria idiopatica presentano una storia di familiarità per la formazione dei calcoli³⁵. Inoltre studi su gemelli hanno confermato la forte ereditabilità per l'ipercalciuria³⁶, mostrando come la tendenza a formare calcoli sia maggiore nei gemelli monozigoti (32.4%) rispetto ai dizigoti (17.3%).

Analizzando attraverso analisi di linkage tre famiglie con severa ipercalciuria assorbitiva, è stato individuato il gene adenylate cyclase (sAC), di cui sono state caratterizzate le varianti³⁷.

Altri geni candidati per l'ipercalciuria assorbitiva sono TRPV5, che codifica per un recettore vanilloide che funziona come canale per il calcio attraverso il riassorbimento di questo nei tubuli convoluti distali (DCT). Il knockout , nel topo, per il Trpv5 ha mostrato una diminuzione del riassorbimento del calcio portando a una drammatica ipercalciuria. Anche polimorfismi in un gene correlato (TPRV6) sono stati trovati associati all'ipercalciuria assorbitiva. Il gene TPRV5 inoltre potrebbe essere regolato dal WNK4. In questo gene sono state trovate mutazioni che provocano pseudoipoadosteronismo di tipo II (PHAI), una patologia che presenta oltre a ipercalcemia e ipertensione anche una ipercalciuria. come risultato di una sovra regolazione del gene NCCT, cotrasportatore sodio/cloro nel tubuli convoluti distali³⁸.

Una rara sindrome legata all'X, la malattia di Dent è messa in relazione alla nefrolitiasi. È caratterizzata da una proteinuria tubulare (dovuta al difetto di riassorbimento di alcune proteine a basso peso molecolare da parte del tubulo prossimale, come la beta-2-microglobulina; i difetti di riassorbimento del tubulo prossimale possono essere molto gravi e causare la sindrome di Fanconi), ipercalciuria, nefrolitiasi da calcio, nefrocalcinosi e insufficienza renale cronica. Il difetto molecolare consiste nel mancato funzionamento di un canale del cloro, CICN5. Le mutazioni nel gene che codifica per questo canale sono state identificate anche in altre sindromi simili³⁹.

Il recettore per il calcio CaSR è espresso particolarmente nelle cellule endocrine delle paratiroidi che fungono da veri e propri "sensori" del livello ematico del calcio. L'omeostasi del calcio è finemente regolata dalla secrezione del paratormone (PTH) che viene modulata in risposta ai livelli sierici del calcio. Un aumento della calcemia inibisce la produzione del paratormone (PTH)ⁱ che attraverso

ⁱ Azioni del PTH: diminuisce l'escrezione renale del calcio, aumenta l'assorbimento intestinale di calcio, stimola la liberazione di calcio dal tessuto osseo

diverse vie determina un aumento dei livelli di calcio nel sangue, e viceversa. Mutazioni a carico del recettore per il calcio portano ad una risposta che può determinare ipocalcemia, ipercalciuria, nefrocalcinosi e formazioni di calcoli⁴⁰.

Diversi studi genetici hanno messo in relazione il recettore della vitamina D (VDR) con la nefrolitiasi da ipercalciuria, in quanto implicato nell'omeostasi del calcio. Mutazioni in Cludin-16 (CLDN16) una proteina di giunzione, sono in relazione con ipomagnesemia ipercalciuria e nefrocalcinosi. Il deficit risiede nel tratto ascendente dell'ansa di Henle dove avvengono il riassorbimento del calcio e del magnesio.

L'iperossaluria è un'anomalia metabolica riscontrata nel 10-20% di soggetti con calcoli renali. I meccanismi genetici che sottintendono l'ossaluria idiopatica devono essere ancora chiariti ma i geni che controllano il metabolismo dell'ossalato, il riassorbimento intestinale e l'escrezione renale di ossalato possono essere dei candidati chiave. Il gene SLC26A6 codifica per una proteina cloro-ossalato exchanger che aiuta la regolazione della concentrazione dell'ossalato nel siero. Il knockout modello murino per questo gene ha evidenziato presenza di iperossaluria e formazione di calcoli di ossalato di calcio.

L'iperuricemia è un'anomalia metabolica riscontrata nel 2-8% di individui con nefrolitiasi. Ci sono diverse cause cliniche alla base dell'iperuricemia che includono disordini mieloproliferativi, stati di diarrea cronica, insulino resistenza e disordini metabolici monogenici come la sindrome di Lesch-Nyhan. Difetti dell'escrezione dell'acido urico possono causare calcoli da acido urico, che di preferenza si formano in presenza di urine acide. Mutazioni e diminuzione della funzione di un trasportatore dell'urato (URAT1) sono state messe in relazione con ipouricemia e nefrolitiasi⁴¹.

Da un precedente studio condotto sulla popolazione di Talana, in soggetti che presentavano calcoli da acido urico, è stato individuato ZNF365 come gene di suscettibilità per la nefrolitiasi da acido urico. L'isoforma ZNF365D del gene, che codifica per la proteina Talanina, porta una variante (Ala62Thr) fortemente associata con la nefrolitiasi da acido urico.^{41bis}

Per quanto concerne i calcoli di cistina che sono abbastanza rari (1-2%) sono stati associati a due geni: SLC3A1 e SLC7A9 responsabili del trasporto della cistina. Alterazioni in questi geni danno origine a alti livelli di cistina nelle urine che precipita a formare calcoli. Solo il 25% di pazienti con cistinuria tuttavia presentano mutazioni in questi geni.

Geni candidati per la nefrolitiasi sono considerati i trasportatori del citrato che rappresenta un forte inibitore nella formazione dei calcoli. Tuttavia nei geni come NaCT e SLC13A5 non sono state descritte mutazioni causative. Nelle forme monogeniche di acidosi tubulare renale si ha la tendenza all'incremento del riassorbimento del citrato nei tubuli prossimali che determina ipocitratura e ipercalciuria promuovendo nefrocalcinosi e nefrolitiasi.

Sono state trovate mutazioni nel gene ANKH capace di trasportare il pirofosfato inorganico che è in grado di legarsi alla superficie di cristalli di fosfati calcio basici bloccando la crescita del cristallo. Alterazioni a carico di questo gene determinano ipopirofosfaturia associata alla formazione di calcoli renali. Studi di espressione dimostrano che il gene ANKH espresso nei tubuli collettori.

Difetti nel gene UMOD che codifica la proteina uromodulina (THP: Tamm-Horsfall) la più abbondante proteina urinaria, non sono state associate a calcoli renali nell'uomo. Tuttavia topi knockout per UMOD sono suscettibili a infezioni del tratto urinario e a formazione di cristalli di ossalato di calcio del tratto urinario. Si sono evidenziati cambiamenti nella composizione chimica oltre che nella quantità della

proteina nella THP in pazienti con calcoli di ossalato di calcio. La maturazione della proteina può essere regolata da altri fattori genetici che bisognerebbe valutare in quanto anche essi possono rappresentare geni candidati per la nefrolitiasi ^{39,42}.

1.6 Isolati genetici

Gli studi effettuati per l'identificazione dei fattori responsabili delle malattie multifattoriali, come la calcolosi renale, si sono avvalsi in passato prevalentemente di campioni molto estesi ma provenienti da popolazioni eterogenee. Negli ultimi anni, l'attenzione degli ricercatori si è spostata su popolazioni geneticamente isolate in quanto esibiscono caratteristiche genetiche peculiari ed ideali per questo tipo di studi ^{43, 44}.

L'isolamento porta alla formazione di un pool genico differente rispetto a quello della popolazione parentale e delle popolazioni circostanti. Il differenziamento del pool genico avviene principalmente a causa dell'adattamento selettivo e della deriva genetica (in assenza di migrazione), i cui effetti sono così peculiari che due popolazioni isolate, derivanti dalla stessa popolazione parentale ed aventi quindi, inizialmente, la stessa composizione genetica, possono sviluppare nel corso delle generazioni due differenti pools genici.

La Sardegna è abitata da una popolazione caratterizzata da un forte effetto fondatore e per questo ha suscitato l'interesse di molti genetisti^{45, 46}. Infatti, essa - similmente a quanto è avvenuto per le popolazioni dell'Islanda, del Quebec Francofono e della Finlandia - è discendente da un piccolo gruppo di individui insediatisi sull'isola, ed è cresciuta di numero con una limitata immigrazione dal mondo esterno. Dato il forte grado di interrelazione, gli individui condividono una gran parte della loro informazione genetica, semplificando quindi lo studio del passaggio di effetti genetici da una generazione all'altra. All'interno della Sardegna esistono inoltre popolazioni, come quella dell'Ogliastra, che sono a loro volta, per ragioni geografiche e culturali, fortemente isolate, caratterizzate da una notevole omogeneità ambientale. Negli ultimi anni ci si è indirizzati verso gli

isolati genetici poiché, in virtù di singolari condizioni storico-geografiche che si sono venute a creare, le loro caratteristiche possono essere favorevoli all'identificazione di geni associati a malattie complesse (o multifattoriali)^{47, 48}. Le malattie multifattoriali sono causate dall'interazione di fattori ambientali, comportamentali e genetici. A differenza delle malattie monogeniche, nelle quali l'alterazione di un singolo gene è chiaramente associata alla malattia, alla base delle malattie complesse vi sono diversi geni di predisposizione che, solo in presenza di altri fattori di rischio, concorrono a determinare l'insorgenza della patologia.

Come ipotizzato da Wright et al.⁴⁹, le popolazioni di origine antica, derivate da un piccolo numero di fondatori e caratterizzate da una crescita lenta e costante, sviluppano una ridotta variabilità genetica. In tali popolazioni, l'isolamento geografico, il basso tasso di immigrazione ed il limitato numero di fondatori favoriscono il fenomeno della "deriva genetica" che determina nel tempo un "linkage disequilibrium" (LD) presente in ampie regioni genomiche^{50, 51, 52}. Simili popolazioni rendono attuabile un mappaggio tramite LD con l'impiego pochi campioni ed un numero ridotto di marcatori (distribuiti a bassa densità sul genoma) e favoriscono l'identificazione di aplotipi ancestrali associati a caratteri complessi introdotti nella popolazione da un ipotetico fondatore⁵³.

Dagli studi condotti sulla struttura demografica e genetica⁵⁴ è emerso che il paese di Talana è originato da pochi fondatori, presenta un elevato tasso di endogamia (pari al 91%), ed una percentuale di matrimoni tra consanguinei pari al 38 %. Il suo isolamento geografico ha determinato una grande omogeneità sociale ed ambientale per tutti i suoi 1200 abitanti, che mantengono a tutt'oggi regole di alimentazione e di vita pressoché inalterate, alle quali fanno eccezione solo le ultime generazioni.

SCOPO DELLA RICERCA

La calcolosi renale è definita dal punto di vista genetico una tipica malattia multifattoriale . Sono stati condotti svariati studi che non hanno sinora individuato alcun “*major gene*” predisponente o un pathway metabolico chiaramente implicato nell’eziologia della malattia.

Il nostro studio è stato condotto sulla popolazione di Talana, un isolato genetico dell’Ogliastra. L’approccio utilizzato si basa su una accurata caratterizzazione fenotipica e principalmente sull’applicazione di due metodi di analisi statistica genetica: l’analisi linkage e di associazione. I marcatori genetici utilizzati sono i polimorfismi altamente informativi genotipizzati mediante le più recenti tecniche, che prevedono lo screening di centinaia di migliaia di SNPs equamente distribuiti lungo il genoma tramite l’utilizzo di chip a DNA di ultima generazione.

L’obiettivo principale consiste nell’identificare una rosa di geni candidati, che possono essere già documentati in letteratura oppure nuovi geni funzionalmente riconducibili ad un pathway metabolico correlabile alla patologia, attraverso il confronto dei risultati ottenuti con le diverse analisi statistiche. Tutti i risultati verranno interpretati considerando le peculiarità della nostra popolazione in termini di inbreeding e utilizzando software che consentono di tener conto di queste caratteristiche. L’obiettivo finale dello studio nell’isolato genetico dell’Ogliastra, di cui questo progetto fa parte, è quello di trovare le cause genetiche specifiche per la patologia in esame con lo scopo di intervenire nella prevenzione oltre che nella cura.

MATERIALI E METODI

3.1 Analisi epidemiologica

Gli individui analizzati nel nostro studio provengono tutti dal paese di Talana, che comprende 1200 abitanti. Il 70% della popolazione ha aderito volontariamente al progetto firmando il consenso informato in accordo alla dichiarazione di Helsinki.

I partecipanti allo studio sono stati sottoposti, da personale medico specializzato, ad una valutazione clinico-laboratoristica, comprendente: una routine ematochimica, un esame obiettivo, misure antropometriche, misurazione pressoria arteriosa sistolica e diastolica (PAS e PAD), anamnesi farmacologica e patologica sia personale che familiare. Inoltre è stata eseguita un'intervista strutturata per raccogliere dati socio-demografici, abitudini di vita ed esposizione a fattori di rischio comuni, come fumo ed alcool, pratica di attività fisica etc.

I dati sono stati raccolti in una cartella clinica elettronica: in tal modo abbiamo ottenuto la standardizzazione (uniformate all'ICD 9ⁱ) delle informazioni cliniche raccolte e il trasferimento automatico dei dati in un unico database relazionale. I parametri ematologici sono stati valutati utilizzando il Coulter AcT 5 autoloader hematology analyzer da Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA).

Le analisi biochimiche di routine comprendono elettroliti, enzimi, profilo lipidico e test derivati che sono stati eseguiti nel laboratorio di Perdasdefogu con l'utilizzo del VITROS dry-slide technology automated Vitros 250 Chemistry System (Orthoclinical Diagnostics,

ⁱ Il sistema di classificazione ICD9-CM, versione italiana 1997, riporta la lista ufficiale dei codici e delle descrizioni di malattie, traumatismi, interventi chirurgici e procedure diagnostiche e terapeutiche.

Johnson & Johnson Gateway SM, US). Sono stati analizzati i seguenti parametri: Emocromo, Creatina, Azoto, Calcio, Cloro, Sodio, Potassio, Fosforo, Acido Urico, Magnesio, Fosfatasi Alcalina, Albumina, Glicemia, Colesterolemia totale, Colesterolo HDL, Colesterolo LDL, Trigliceridi, Transaminasi seriche, Colinesterasi, Bilirubina totale, Bilirubina diretta, Bilirubina indiretta.

Per il calcolo del Body Mass Index (BMI) in kg/m² abbiamo utilizzato la formula peso diviso altezza al quadrato.

Grazie alla realizzazione di un “tunnel bioinformatico” tra l’Istituto di Genetica della Popolazioni di Alghero e la società Shardna, avente sede presso il Parco Tecnologico della Sardegna (Pula), abbiamo la possibilità di un accesso protetto al Database nel quale confluiscono i dati (genealogici, anagrafici, clinici-epidemiologici, genetici, comportamentali e ambientali) relativi alle informazioni di circa dodicimila persone residenti in dieci diversi paesi della regione centro-orientale della Sardegna (Ogliastra). Inoltre, sono a disposizione del ricercatore utente del framework, una serie di applicazioni che permettono di correlare i dati di genotipizzazione ai dati genealogici e medici, consentendo così un trasferimento veloce ed automatizzato della fase di analisi.

3.2. Selezione dei campioni

In base alle schede anamnestiche sono state selezionate le persone da sottoporre a visita specialistica mediante ecografia renale al fine di classificare la severità della calcolosi renale.

Sono stati individuate 85 persone che presentavano la forma più severa della patologia. Sono state da noi classificate come “C1” quegli individui che presentavano un indice di maggiore severità per la presenza di calcoli al momento ecografico o evidenza di una recente

espulsione e forte indice di recidiva per pregressa esperienza di calcolosi renale.

39 individui sono stati classificati come C2 per la presenza di calcoli al momento ecografico ma mancata pregressa esperienza di calcolosi renale.

37 individui sono stati classificati come SP (solo spot) per presenza di sola renella che è un insieme di agglomerati di sostanze saline prodotte dal rene determinando microcalcoli.

32 individui classificati come SC (solo coliche) per la riferita presenza di coliche renali.

Infine sono stati individuati 94 soggetti non affetti utilizzati come controlli, sui quali sono state effettuate tutte le indagini strumentali per escludere eventuali soggetti asintomatici.

Per questo studio sono stati presi in considerazione come affetti i soli individui che presentavano la forma più severa della patologia ossia i C1.

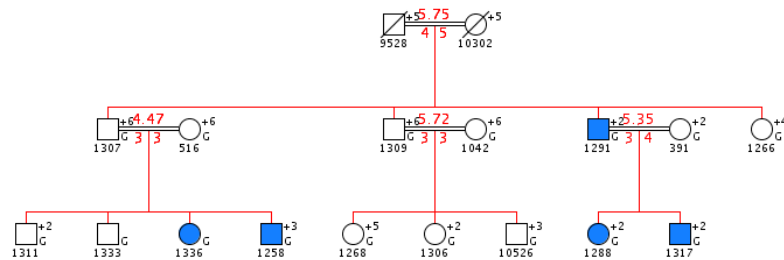
Dallo studio inoltre sono stati esclusi i soggetti che presentavano gotta e nefropatie di varia origine.

3.3. Scelta delle configurazioni familiari

Degli 85 soggetti calcolotici "C1" da noi selezionati, 78 si possono unire in un singolo pedigree di 8 generazioni composto da 605 persone. Per l'analisi di linkage, abbiamo generato famiglie più piccole. La divisione della genealogia di Talana in sub-pedigree adatti per l'analisi statistica non è immediata, in quanto spesso non è chiaro in che modo un individuo debba appartenere ad una sottofamiglia piuttosto che ad un'altra a seconda che si segua la linea paterna o materna.

Per ottimizzare l'analisi ai fini del calcolo IBD sharing, la selezione dei sub-pedigree deve essere fatta in modo da includere il numero massimo di individui affetti e genotipizzati. Per la creazione automatica di sub-pedigree è stato utilizzato il programma GREFFA⁵⁵, integrato nel Database della società Shardna. Questo software tramite la selezione di un range di relazioni di parentela desiderate fra gli affetti, cerca direttamente i gruppi più ampi di individui che soddisfano tale condizione. Queste misure di legame fra gli individui possono essere ad esempio la distanza in step meioticiⁱ la misura del grado di kinshipⁱⁱ (probabilità di IBD attesa) o pairwise (o di coppia) GREFFA crea delle strutture familiari che massimizzano il numero di individui affetti, rendendo il campione molto informativo per l'analisi di linkage che calcola il grado di condivisione allelica tra gli individui affetti. Nella figura 1 è rappresentato un esempio di famiglia visualizzato con pedNavigator 2, integrato nel Database.

Figura 1.
Esempio di albero genealogico



ⁱ Il numero di passi generazionali che occorre percorrere a partire da un individuo per arrivare ad un altro individuo passando per gli antenati in comune.

ⁱⁱ Espresso come coefficiente di kinship, quantifica il grado di parentela tra due individui

Abbiamo ottenuto 11 famiglie nelle quali sono distribuiti 49 affetti. Come parametri per la costruzione delle famiglie abbiamo utilizzato un range da 1 a 5 generazioni con non più di 6 step meiotici tra gli affetti. Le caratteristiche delle famiglie sono riassunte nella tabella 1.

Tabella 1

<i>Famiglie</i>	<i>Soggetti (fondatori; non fondatori) (maschi;femmine)</i>	<i>soggetti (media)</i>	<i>generazioni (media)</i>	<i>Affetti (media)</i>
11	183 (63;120) (86;97)	7-21 (16.6)	3-5 (4)	49 (4.5)

3.4. Genotipizzazione dei campioni

Il DNA dei soggetti in esame è stato estratto mediante Kit “Puregene DNA purification system” prodotto dalla Gentra Systems (Minneapolis, Minnesota 55441 USA) seguendo le istruzioni riportate dal produttore.

3.4.1. Genotipizzazione per 900 microsatelliti

Reazione di PCR (polymerase Chain Reaction).

Il procedimento comunemente conosciuto come Reazione di Polimerizzazione a Catena¹ (PCR) permette agevolmente di eseguire l’amplificazione selettiva di uno specifico segmento di DNA genomico compreso tra due regioni di nota sequenza nucleotidica. I primers che amplificano le zone contenenti i marcatori molecolari

¹ dall'inglese *Polymerase Chain Reaction*, (PCR);

sono stati disegnati in modo tale che un solo protocollo di PCR fosse applicabile all'intero set di primers.

Il protocollo utilizzato è il seguente:

DNA genomico in quantità di 30 ng;

Mix di primers reazione-specifica in quantità di 0,4 µl (5µM per ciascun primer);

Buffer 10 X contenente: 500 mM KCL, 15 mM MgCl₂ e 100 mM Tris-HCl a pH 9;

0,3 Unità di Taq DNA Polimerasi (Amersham Life Science, Cleveland, USA)

Desossinucleotide trifosfato (da una mix di dATP, dCTP, dGTP, dTTP 2,5 mM) in quantità di 1,5 µl;

H₂O sterile sino ad un volume finale di 15 µl;

La reazione di PCR è stata condotta con il seguente programma di amplificazione:

denaturazione iniziale di 5min alla temperatura di 95°C;

30 cicli comprendenti:

30 sec. a 94°C (denaturazione);

30 sec. a 55°C (ibridazione);

30 sec. a 72°C (estensione);

estensione finale di 10 min a 72°C.

Per le reazioni di PCR sono stati utilizzati i Thermal Cyclers Perkin Elmer 9700 (Perkin Elmer, Foster City, California, USA).

Analisi dei prodotti di PCR.

Per il controllo delle amplificazioni è stato impiegato un minigel di agarosio al 2% in tampone TBE 0,5 X (TRIS base 0,89 M, acido borico 0.89 M, Na₂EDTA 20 mM), su cui viene caricata un'aliquota pari a 5µl della reazione con 5µl di colorante (0,25% blu di bromofenolo, 0,25% xilene cianolo, 40% (w/v) saccarosio in acqua). Il minigel di agarosio viene poi sottoposto a elettroforesi in camera orizzontale a 80 Watt costanti in TBE 0,5 X per circa 20

minuti. I patterns di amplificazione vengono infine visualizzati con bromuro di etidio su un transilluminatore a raggi ultravioletti.

Elettroforesi su sequenziatore automatico.

Gli amplificati ottenuti tramite PCR sono stati eseguiti utilizzando l'oligomero sense marcato all'estremità 3'. I fluorocromi utilizzati per la marcatura degli oligonucleotidi sono 6-FAM, HEX e NED, mentre quello utilizzato per il marcatore interno è il LIZ (500 LIZTM, Applied Biosystems, Warrington, UK). La scelta dei fluorocromi tiene conto dello spettro di assorbimento, che deve essere tale da consentirne l'eccitazione nel visibile da parte di un raggio LASER presente nello strumento (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation). I massimi di emissione dei fluorocromi impiegati devono essere spettralmente ben risolti gli uni dagli altri e le intensità della fluorescenza che si registrano devono essere tali da conferire alla tecnica una elevata sensibilità.

I prodotti PCR sono stati sottoposti a corsa elettroforetica sul sequenziatore automatico Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer. È stata preparata una miscela di prodotti di PCR differenti per grandezza e marcatura, appartenenti allo stesso pannello, che consente con una singola corsa elettroforetica l'analisi di un elevato numero di marcatori per ciascun campione.

In una apposita piastra MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate sono stati dispensati 1 µl di ogni miscela di PCR così ottenuta e 10µl di una Mix contenente:

0.1µl di marcatore standard (500 LIZ TM, Applied Biosystems, Warrington, UK)
9µl di formamide.

La piastra è stata poi sottoposta a denaturazione per 2 minuti a 95°C e collocata nello strumento. La corsa elettroforetica è stata gestita tramite l'utilizzo del programma 3730 Data collection software v2.0. Successivamente i dati raccolti dal computer sono stati analizzati in

base ai parametri relativi alla durata della corsa, ai parametri elettrici e al marcatore interno per mezzo di GeneMapper® Software v3.0. Questo programma ha permesso l'assegnazione degli alleli e la gestione dei dati informatici in un formato leggibile dai programmi utilizzati successivamente per le analisi statistiche.

3.4.2 Genotipizzazione mediante tecnologia Gene Chip Mapping

Per la genotipizzazione è stata utilizzata la tecnologia Affymetrix GeneChip® Mapping (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA), che mette a disposizione diversi GeneChip. Noi abbiamo utilizzato GeneChip® Mapping 500K Array Set e GeneChip® Mapping 50K Array Set. Questi due Set differiscono sia per il numero di SNPs (circa 500 000 per il Chip da 500K e circa 50 000 per il secondo Chip) che per la differente distribuzione nel genoma. Nel set 50K gli SNPs sono distribuiti per lo più nelle regioni intorno ai geni noti, mentre nel set da 500K gli SNPs sono distribuiti uniformemente.

La genotipizzazione GeneChip® Mapping 500K Array Set è stata condotta presso i laboratori SharDNA s.p.a secondo i protocolli standard forniti dall’Affymetrix®, mentre la genotipizzazione per il GeneChip® Mapping 50K Array Set è stata condotta presso il servizio di genotyping fornito da Affymetrix®.

I campioni da genotipizzare sono stati accuratamente quantificati con lo spettrofotometro (NanoDrop® Thermo Scientific), quindi opportunamente diluiti con il tampone TE +EDTA ridotto (10mM Tris HCl, 0.1mM EDTA, pH 8.0) e normalizzati alla concentrazione di 50 ng/µl.

Per tutte le reazioni sono stati utilizzati i termociclatori GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems Industries).

I file utilizzati per l’analisi dei dati, sono stati generati con il software GCOS (GeneChip Operating Software, Affymetrix®) e quindi analizzati con GTYPE 4.1 (Affymetrix®) . Tutti dati sono stati

analizzati utilizzando sia l'algoritmo DM (Dynamic Model), che l'algoritmo BRLMM (Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis). Tutti i campioni genotipizzati, hanno rispettato gli standard di qualità Affymetrix®, il controllo di qualità supera il 93%.

Per i nostri campioni sono stati utilizzati 78 controlli e 48 casi genotipizzati utilizzando GeneChip 50K, mentre 94 controlli e 78 casi sono stati genotipizzati con GeneChip 500K.

3.5. Analisi statistica

3.5.1 Analisi di linkage non parametrica

L'analisi di linkage rappresenta una metodologia statistica classica dell'analisi genetica, che mira a stabilire una correlazione tra la trasmissione del gene-malattia in famiglie di pazienti affetti e quella di marcatori polimorfici di cui sia nota la localizzazione sul genoma.

L'analisi di linkage viene comunemente utilizzata per un primo screening del genoma, con la strategia del Genome Wide Search, nella ricerca di regioni subcromosomiche da sottoporre, in seguito, a ulteriore analisi tramite studi di associazione o LD mapping.

La tradizionale analisi di linkage, cosiddetta "parametrica", si è rivelata adatta allo studio di malattie semplici a trasmissione mendeliana, richiedendo la specificazione di un preciso modello genetico, che include parametri quali il modello di trasmissione, la frequenza dell'allele-malattia, e la penetranza di ciascun genotipo. Tale strategia risulta piuttosto inappropriata di fronte alla maggioranza delle malattie complesse (ipertensione, diabete, cancro, etc.) data la difficoltà di specificare il modello genetico sopra citato .

Per evitare errori che possano derivare dall'impiego di modelli inesatti è preferibile l'utilizzo di metodi statistici non parametrici, ossia che

non richiedono la specificazione del modello di trasmissione della malattia.

L'approccio di questa strategia consiste nella stima della condivisione allelica tra coppie di parenti affetti allo scopo di determinare se soggetti malati per una patologia e imparentati ereditino copie di alleli "identici per discendenza"(IBD)ⁱ più di frequente di quanto ci si aspetterebbe per puro effetto del caso.

Per quanto riguarda il nostro lavoro i dati genetici ottenuti sono stati sottoposti ai test per valutare la consistenza Mendeliana delle relazioni di parentela intra-familiari e per la correzione degli errori di genotipizzazione con l'utilizzo del software Pedcheck⁵⁶. Per l'analisi di linkage, assume notevole importanza la stima delle frequenze alleliche dei marcatori utilizzati

Le frequenze alleliche impiegate nella nostra analisi sono da considerarsi "esatte" in quanto determinate sull'intera popolazione di Talana; questo ha un considerevole impatto nell'analisi in quanto evita di incorrere in errori indotti da un campionamento non casuale degli individui sui quali viene eseguita la stima .

Il calcolo delle frequenze alleliche dei marcatori micro satelliti, è stato condotto con il programma PedManager V 0.9⁵⁷ .

L'analisi di linkage è stata effettuata con l'impiego del programma Merlin⁵⁸ che utilizza una particolare variante dell'algoritmo Landeer/Green. Questo algoritmo calcola con precisione i valori di IBD poiché considera la probabilità di tutte le configurazioni di markers possibili risultando quindi preciso e non stimato come in altri algoritmi. Inoltre consente di condurre un GWS in un tempo limitato di calcolo utilizzando delle famiglie non troppo estese.

Per l'analisi NPL (*non parametric linkage*) abbiamo utilizzato come marcatori molecolari 16 000 SNPs distanziati 150 Mb. Uno dei problemi legato all'analisi di Linkage con gli SNPs è la possibilità di

ⁱ IBD: alleli in una o più persone, che sono identici perché ereditati da uno stesso antenato comune a differenza che nell'identità di fatto (IBS).

considerare come indipendenti dei makers che in realtà non lo sono a causa del LD che possono portare ad una sovrastima del IBD. Abbiamo dunque condotto il GWS usando i markers non indipendenti come un unico marker multiallelico. Per definire i markers in LD abbiamo usato un valore di r^2 pari a 0.05.⁵⁹. Come valore di LD soglia per definire i marker in LD abbiamo utilizzato un valore di $r^2 \geq 0.4$.

3.5.2. Studio di associazione caso-controllo

L'analisi di linkage fornisce indicazioni sull'esistenza di geni di suscettibilità per un dato fenotipo all'interno di regioni genomiche relativamente ampie.

Lo studio di associazione, è invece, l'approccio più ampiamente applicato nell'identificazione di fattori di rischio genetico in una fase più fine dello studio.

Questo metodo parte dalla selezione di geni candidati, precedentemente identificati sulla base della localizzazione cromosomica e delle proprietà funzionali, e ricerca le varianti alleliche che si manifestano in associazione al fenotipo.

L'analisi epidemiologica delle varianti geniche nella popolazione può condurre alla identificazione di alleli che si manifestano con incrementata frequenza in soggetti affetti, e suggerire un possibile ruolo eziologico delle mutazioni nel gene in esame. Questo approccio necessita che la popolazione studiata non presenti stratificazione e richiede che la variante genica analizzata coincida o sia in *linkage disequilibrium* con la mutazione patogenetica.

Nello studio di associazione classico di popolazione le frequenze alleliche di un determinato locus vengono confrontate in un campione di casi e di controlli indipendenti. La significatività statistica di tale confronto viene misurata con un semplice test di associazione come il χ^2 . Gli studi caso-controllo sono studi osservazionali nei quali il punto di partenza è rappresentato dall'identificazione di *casi* con la malattia sotto osservazione, e di *controlli* senza il fenotipo di interesse.

La selezione dei casi e dei controlli deve essere condotta con il massimo rigore metodologico sia per quanto riguarda la diagnosi sia per la valutazione delle relazioni parentali dei soggetti in esame, che devono essere assenti o quantomeno ridotte. Questo diminuirà la probabilità di incorrere in falsi positivi, ovvero episodi in cui la maggiore frequenza di un allele in una classe non sia dovuta alle comuni caratteristiche fenotipiche ma all'elevata consanguineità.

Per il nostro studio che ha comportato l'utilizzo di campioni con una alta percentuale di consanguinità abbiamo utilizzato il software CC-QLS⁶⁰. Questo programma stima, per ciascun locus, le frequenze alleliche esistenti nei casi e nei controlli ed esegue due differenti test statistici, un test Quasi-Likelihood Score e un test Chi², per valutare la presenza o meno di differenze significative nelle due distribuzioni. Entrambi i test tengono conto delle relazioni interindividuali presenti tra i casi e i controlli. Tali relazioni, espresse in termini di coefficienti di kinship, devono essere fornite al programma per mezzo di un file di input e serviranno per poter correggere il calcolo sul livello di consanguinità presente nel campione. Il calcolo della kinship è stato eseguito con l'applicazione GREFFA.

A partire dalla matrice di kinship o step meiotici che descrive le relazioni parentali di individui appartenenti ad una determinata genealogia il programma individua i sotto-gruppi costituiti da soggetti "distanti" una determinata quantità di kinship.

In questo modo gli individui possono essere raggruppati in base a specifici criteri di omogeneità genetica attesa.

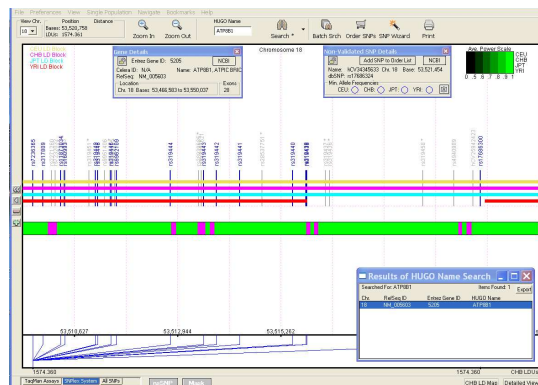
Per ogni markers viene riportato un valore di p_value che rappresenta la misura dell'associazione esistente tra marcatore e fenotipo. In generale un risultato è significativo quando il p_value risulta inferiore al valore soglia di 0.05. Quando tuttavia, come in questo studio, si lavora con un'associazione che coinvolge l'intero Genoma allora

la soglia di significatività si abbassa per un valore stimato in base alla regola di Bon Ferroni¹.

Abbiamo dunque condotto un Genome Wide Assosiation (GWA), avvalendoci sia della genotipizzazione con il set dei 50K sia del set con i 500K. Abbiamo eliminato dall'analisi i markers monomorfici e fissato il Minimum Allele Frequency (MFA) per un valore pari a 0.05. Questo ci permette di eliminare dall'analisi tutti quegli SNPs che hanno nel nostro campione, una frequenza dell'allele più raro uguale o inferiore allo 0.05%. Per gli SNPs con MAF 0.05, infatti il valore di p_value potrebbe non essere esatto perche la stima della frequenza allelica è fatto in un basso numero di campioni.

Per l' analisi dei risultati di associazione e di linkage ottenuti con gli SNPs ci siamo avvalsi del software SNPbrowser 3.5⁶¹ che fornisce un database che comprende le informazioni di 5 milioni di SNPs derivanti dai data set dell' HapMap Project e Applied Biosystem (Fig.2).

Figura 2
Schermata del software SNPbrowser



SNPbrowser rappresenta un facile e intuitivo strumento di visualizzazione, della posizione degli SNPs in relazione ai geni.

¹ Regola di Bon Ferroni: il valore di p_value sarà pari alla soglia di significatività 0.05/numero di test statistici effettuati per l'analisi (ossia numero di SNPs)

Inoltre consente di accedere direttamente mediante un link alla informazioni presenti su NCBI.

Abbiamo applicato questo procedimento per ottenere dettagliate informazioni sui geni localizzati all'interno delle regioni genomiche che nel nostro studio sono risultate associate alla calcolosi renale. Questo lavoro ci ha permesso di fare una cernita dei geni di interesse sui quali focalizzare l'attenzione per un ulteriore studio che verifichi la loro implicazione o meno nei meccanismi patogenetici alla base della calcolosi.

RISULTATI

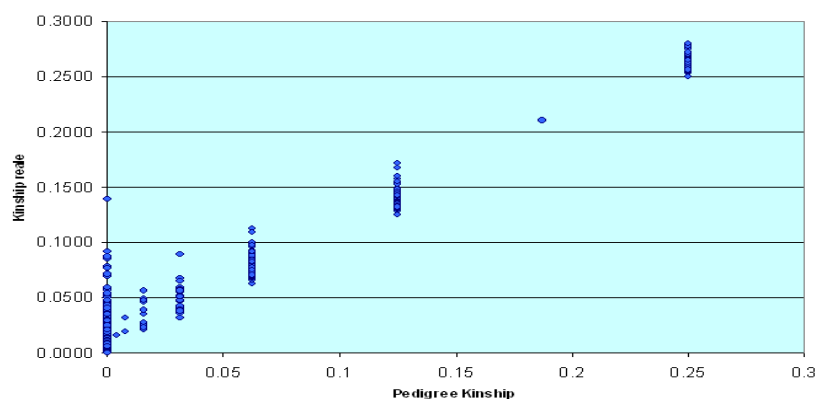
Sull'intera popolazione di Talana è stata condotta un'indagine epidemiologica che ha permesso di identificare soggetti affetti da calcolosi renale e di valutare la prevalenza ed incidenza della patologia nel paese che si attesta per il 14%. Un numero pari a circa 800 individui, che rappresenta il 70 % della popolazione, ha aderito al progetto firmando un consenso informato. Tutti i partecipanti sono stati sottoposti ad una valutazione clinico laboratoristica comprendente una routine ematochimica e un esame obiettivo che ha permesso di stilare l'anamnesi del paziente. Quest'indagine preliminare ha consentito di individuare i probabili affetti che sono stati contattati in un secondo tempo per sottoporsi a visita specialistica. I pazienti sono stati sottoposti ad ecografia renale ed è stata effettuata una più accurata anamnesi personale e familiare comprendente anche abitudini di vita ed esposizione a fattori di rischio comuni, eventuali esami specialistici come ecografie e radiografie renali che attestassero una condizione di calcolosi renale.

Sono stati selezionati 78 individui che presentavano la forma più severa della patologia classificati come C1 e 94 soggetti come controlli (come indicato nei materiali e metodi).

4.1. Genome Wide Search

Sono state selezionate opportunamente dalla genealogia di Talana, le famiglie da sottoporre ad analisi di linkage tramite IBD-sharing utilizzando il programma GREFFA. È stato creato un set di famiglie che unisse tra loro i soggetti affetti più vicini, al fine di poter disporre di famiglie non troppo estese e condurre il genome-wide search in un tempo limitato di calcolo. I 78 soggetti C1 possono essere inclusi in un unico pedigree esteso per otto generazioni che comprende 605 individui.

Per l'analisi sono stati utilizzati 49 affetti inclusi in 11 famiglie che sono state sottoposte ad analisi di linkage non parametrica sull'intero genoma, utilizzando il programma Merlin. Nella costruzione delle famiglie abbiamo raffrontato i valori di kinship dei singoli individui calcolati sull'intera popolazione con quelli che ciascun individuo assume all'interno delle famiglie. I valori di kinship possono essere potenzialmente molto diversi quando si assume che un individuo considerato indipendente nella costruzione della famiglia ha in realtà relazioni di parentela che non sono evidenziabili nella costruzione del pedigree esame. Nelle nostre famiglie l'analisi dell'intera genealogia del paese ci ha permesso di determinare che i valori di kinship reali e quelli calcolati sulla base dei pedigree (pedigree kinship) non si discostano significativamente, il che è indice di una adatta struttura familiare allo studio di linkage (Fig. 3).



Come marcatori molecolari sono stati utilizzati 16000 SNPs distanziati tra loro circa 150Kb. La scarsa informatività degli SNPs, meno polimorfici dei microsatelliti e con una eterozigotità media del 30% rispetto al 70% dei microsatelliti, è controbilanciata dal maggior numero di marcatori e dalla spaziatura più uniforme.

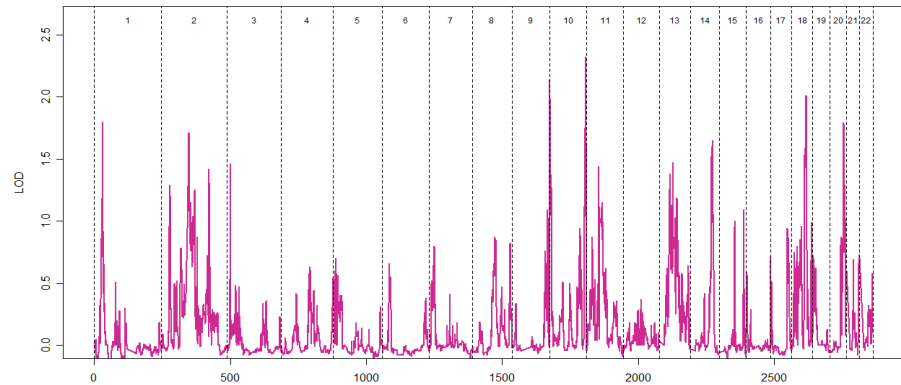


Figura 4. Risultati GWS per il set dei 16 000 SNPs

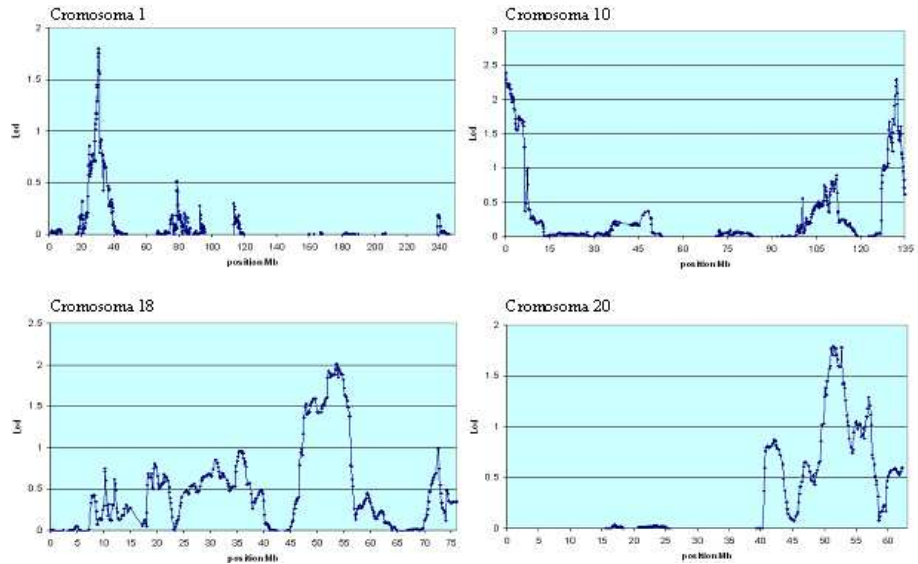
Come si osserva nel grafico (Fig.4) abbiamo diversi loci che superano il limite di significatività comunemente accettato pari ad un LOD Score di 1.3 -1.5. Nella tabella 2 vengono riportati i 5 loci il cui picco massimo supera il LOD di 1.78, l'ampiezza della regione di linkage per questi loci è stabilita a partire dagli SNPs con un valore di $LOD \geq 1.3$.

Tabella 2

Cromosoma	Regione	Intervallo(Mb)	Picco	LOD	p_value
1	rs1997865 - rs10737353	29.52 - 31.02	rs6425864 rs117312	1.8 1.8	0.002 0.002
10	rs11253562 - rs10795000	0.15 - 3.10	rs11253562	2.14	0.0009
10	rs4751481 - rs2379232	129.40 - 133.78	rs2480270 rs7093688	2.32 2.32	0.0005 0.0005
18	rs11660053 - rs521663	47.40 - 55.97	rs319424	2.01	0.0012
20	rs6021571 - rs2870389	50.01 - 53.14	rs200595 rs6014106	1.79 1.78	0.002 0.002

I 5 loci indicativi di linkage sono localizzati sui cromosomi 1, 10, 18 e 20. Nella figura 5 è rappresentata l'analisi di linkage per i quattro cromosomi.

Figura 5.



Nel cromosoma 1 abbiamo un locus positivo che copre una regione di circa 1,5 Mb con il picco massimo di 1.8 in corrispondenza di due marcatori rs6425864 posizionato a 30.41Mb e rs117312 posizionato a 30.57 Mb.

Il cromosoma 10 mostra due loci posizionati ai telomeri. Il primo locus copre una regione di circa 3Mb con il picco massimo a livello del primo SNPs del cromosoma. Questo picco potrebbe non essere attendibile in quanto ai telomeri si attesta una maggiore frequenza di ricombinazione rispetto al resto del cromosoma. Il secondo locus si trova in un intervallo di circa 4 Mb con il picco di Linkage a 131.97Mb per lo SNPs rs2480270 e 132.109 Mb per lo rs7093688.

Nel cromosoma 18 viene raggiunto e superato il limite di significatività in una regione piuttosto ampia di circa 8Mb. All'interno di questa regione (circa 4 Mb) sono compresi SNPs per valori di LOD superiori a 1.8 con il picco di linkage a 53.55Mb con LOD di 2.

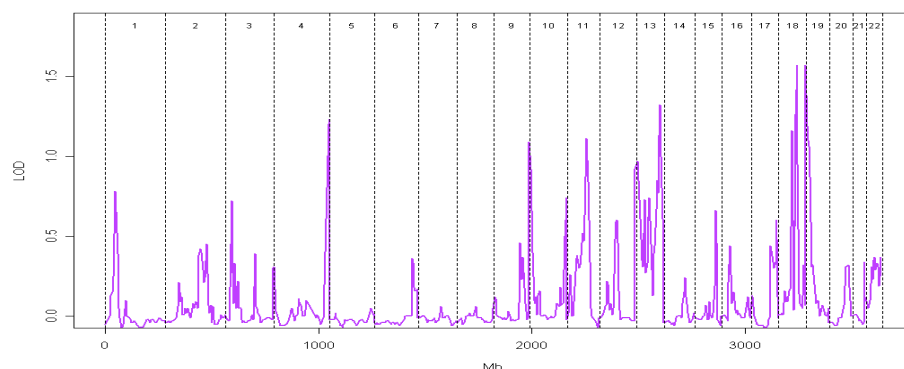
Infine nel cromosoma 20 il locus si estende per circa 3Mb con un picco massimo a 51.36 Mb con LOD di 1,79.

Contemporaneamente sulle stesse famiglie adoperate per l'analisi di linkage con gli SNPs, abbiamo effettuato un'ulteriore analisi utilizzando come marcatori molecolari i microsatelliti. Da questo ulteriore studio è stata eliminata una famiglia per la quale non avevamo a disposizione il genotipo degli affetti, di conseguenza il Genome Wide Search è stato condotto su 44 affetti (Fig. 6).

L'analisi coi microsatelliti conferma il locus nel cromosoma 18, con valori di LOD sopra la soglia di significatività (LOD 1.5). Abbiamo verificato la posizione dei microsatelliti D18S858 (LOD 1.26) e D18S64 (LOD 1.57) che cadono nella stessa regione di linkage trovata con gli SNPs (regione 153048092-55577235)

I loci presenti nei cromosomi 1, 10 presentano dei valori di LOD inferiori rispetto all'analisi precedente (LOD 0.8 e 1 rispettivamente) sebbene nelle stesse regioni cromosomiche. Da questa analisi abbiamo ottenuto altri 2 loci nei cromosomi 13 e 19 (LOD 1,3 e 1,5 rispettivamente), non evidenziati dall'analisi con gli SNPs.

Figura 6. Risultati GWS per il set dei 900 microsatelliti



4.2. Ricerca di possibili geni funzionalmente associabili alla calcolosi.

Nelle regioni individuate tramite linkage è stata condotta una ricerca in banca dati (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) al fine individuare tra i geni presenti al loro interno un qualche possibile candidato per la calcolosi renale in base alla funzione riportata. L'esito della ricerca ha fornito un lista di geni presenti nelle regioni. Tale elenco comprende sia geni a funzione nota che geni la cui funzione è predetta tramite metodi computazionali che utilizzano algoritmi complessi.

Nel locus 1p35.5-1p34 abbiamo 5 geni; nella regione 10p14-p15.2 sono presenti 23 geni; 18 geni sono invece presenti nella regione 10q26.2-10q26.3; nella regione 18q21.2- 18q21.32 sono individuabili 54 geni; infine nel locus 20q13.2- 20q13.2 sono presenti 20 geni.

Sul locus del cromosoma 18, che consideriamo il più suggestivo e indicativo di linkage in quanto si mantiene stabile nelle due analisi, abbiamo individuato due geni la cui funzione è correlabile alla calcolosi renale: ATP8B1 e NEDD4L

Entrambi questi geni cadono nel picco massimo di linkage. (Fig. 7)

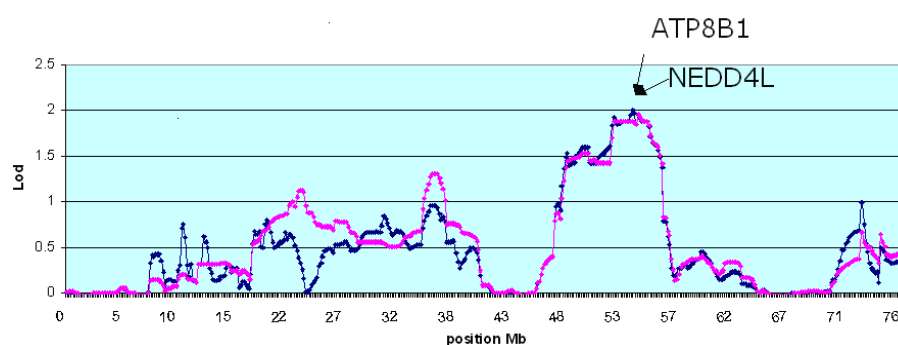


Figura 7. Analisi di linkage sul cromosoma 18 set 16K. In fucsia è mostrata un'ulteriore analisi con l'opzione per la correzione sui genotipi effettuata dal software Merlin.

Il gene ATP8B1 si trova in posizione 53,464,656- 53,550,037 bp ed è composto da 28 esoni. Codifica una P-type ATPase, espressa a livello dei colangiociti, della cistifellea, del pancreas, piccolo intestino e fegato; sembra svolgere un ruolo nella regolazione del circolo entero-epatico degli acidi biliari, incluso il loro assorbimento intestinale⁶². Il gene ATP8B1 anche noto come FIC1 è responsabile del primo sottotipo di coloestasi intraepatica progressiva familiare (PFIC) ed è coinvolto anche nella colestasi intraepatica ricorrente benigna (BRIC)^{63, 64}.

NEDD4L è un gene che si espande circa 350 Kb (posizione 53,862,778-54,216,369pb), composto da 32 esoni codifica una proteina di 854 amminoacidi. NEDDL anche conosciuto come NEDD4-2, interagisce con la proteina ENaC (*Epithelial Sodium Channel*), deputata al riassorbimento renale del sodio.⁶⁵ NEDD4L interagisce con il canale per il sodio in un pathway che conduce alla ubiquitinazione e degradazione dello stesso che in definitiva porta ad una diminuzione del numero dei canali per il sodio sulla superficie cellulare.⁶⁶

4.3. Genome Wide Associations

Una prima analisi di associazione caso-controllo è stata condotta su un campione di 48 affetti e 78 controlli genotipizzati per il set da 50 000 SNPs con l'utilizzo del Software CC-QLS. Una volta filtrati gli SNPs per un $MAF \leq 0.05$ sono rimasti nella analisi 35 687 SNPs. In base alla regola più stringente di Bonferroni ($0.05/35687$) il valore di significatività è fissato a $1.4E-6$.

I risultati di associazione sono riportati nella figura 8.

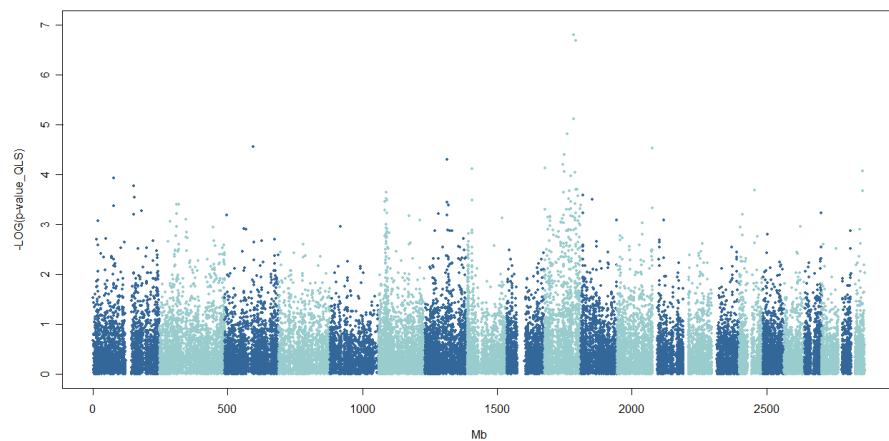


Figura 8. GWA condotta con il set 50K

Questo tipo di analisi ha permesso di identificare nel cromosoma 10 2 degli SNPs che hanno mostrato la maggiore associazione con la calcolosi. Il marker più indicativo di associazione è rs2900713 con p_value pari a $1.6E-07$ (posizione 108,303,229bp). Ad 1,5Kb abbiamo un altro SNPs rs2181019 con un valore di p pari a $7.7E-06$ (posizione 108,301,686). Lo SNP rs2900713 si trova a 20Kb dall'estremità 3' del gene Sorcs1.

Mediante il software Haploview, abbiamo calcolato utilizzando il set 500K, il *Linkage Disequilibrium* (LD) per questa regione sia in 843 individui della popolazione di Talana che nei 48

casi e nei 68 controlli (Tavole I, II, III). I risultati mostrano che nella regione in cui mappa il gene *SorCS1* non c'è un esteso LD.

Questo gene si estende per 590kb e contiene 29 esoni. La proteina codificata da questo gene, appartiene ad una famiglia di cinque proteine che contengono il dominio VPS10 (*Vacuolar Protein Sorting 10*). Le proteine che possiedono questi domini in genere sono coinvolte nel trasporto di lipoproteine e nello smistamento “sorting” di proteine endosomiali e possono agire come recettori per alcuni neuropeptidi.⁶⁷ La famiglia SorCS si distingue per la presenza di domini con residui ricchi di leucina tra il dominio VPS10 e il corto dominio transmembrana. Sorcs1 è fortemente espresso nel cervello nel cuore e nel rene.⁶⁸

Abbiamo poi condotto una seconda analisi di associazione utilizzando i 500 000 SNPs su un campione di 78 affetti e 94 controlli utilizzando sempre il software CC-QLS. Una volta filtrati gli SNPs per un $MAF \leq 0.05$ sono rimasti nella analisi 414 596 SNPs per cui abbiamo considerato come fortemente significativi gli SNPs con p_value inferiore a 1.2×10^{-7} (Bonferroni $0.05/414\ 596$) I risultati di associazione sono riportati nella figura 9.

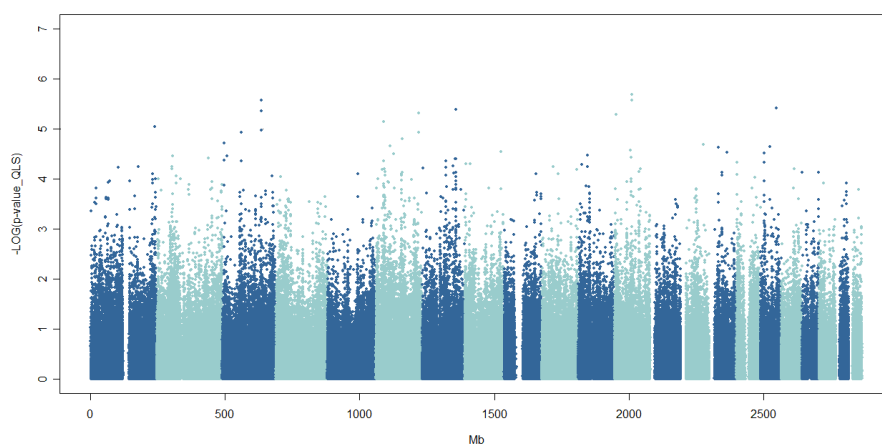


Figura 9. GWA condotta con il set dei 500K

Quest' analisi non ha evidenziato nessuna spiccata associazione in un particolare cromosoma tale da catturare la nostra attenzione. Per quasi tutto il genoma abbiamo p_value massimi che si attestano per E-6 (cromosomi: 1,3,6,7,12,17) e E-5, fatta eccezione per cromosomi 13, 20, 21, 22 che mostrano valori di p massimi di E-4. Una distribuzione dunque troppo omogenea per poter focalizzare l'attenzione su un qualche regione cromosomica sulla base di questa analisi.

Visti i risultati di linkage e di associazione ci siamo soffermati in particolare sul cromosoma 10 per la forte associazione riscontrata con l'analisi dei 50K e sul cromosoma 18 per la buona conferma ottenuta utilizzando nell'analisi di linkage i due diversi set di marcatori. Per di più, entrambi questi cromosomi presentano dei geni che per la loro funzione potrebbero essere dei buoni candidati. Per avere una visione completa dei risultati dalle diverse analisi abbiamo eseguito una valutazione comparativa dei risultati di linkage e di associazione dei due cromosomi.

Figura 10

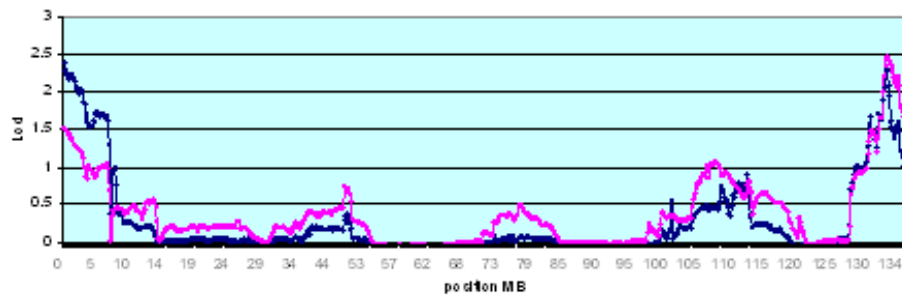
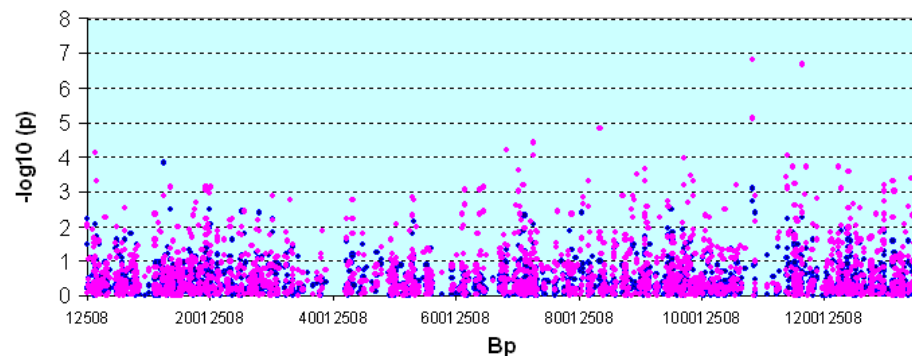


Figura 11



Nelle figure 10 e 11 sono mostrati rispettivamente i risultati dell'analisi di linkage condotta con i 16K e i risultati dell'analisi di associazione effettuata per i 50K sul cromosoma 10.

Comparando questi due grafici emerge come la regione che mostra la maggiore associazione nel quale è presente il gene SorCS indichi un linkage massimo con LOD di 1 corrispondente a un p_value di 0,02. Sebbene al di sotto della soglia di significatività da noi stabilita, che si uniforma a convenzioni più stringenti, questo rappresenta un locus suggestivo in quanto come suggerito in precedenti lavori ⁶⁹ il limite di significatività per il linkage viene comunque stabilito per valori di p inferiori a 0,05.

Per quanto riguarda il cromosoma 18 sono stati comparati i risultati di linkage con quelli di associazione per i 50K e i 500K. Dalla comparazione con l'analisi dei 500k (Fig. 13) è emerso che lo SNP rs323122, p_value pari a 6.39E-05, si trova nella regione di linkage in posizione 47460145bp. (Fig. 12)

Figura 12

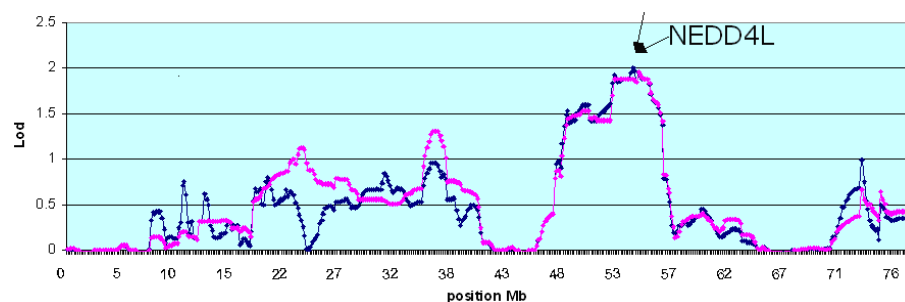
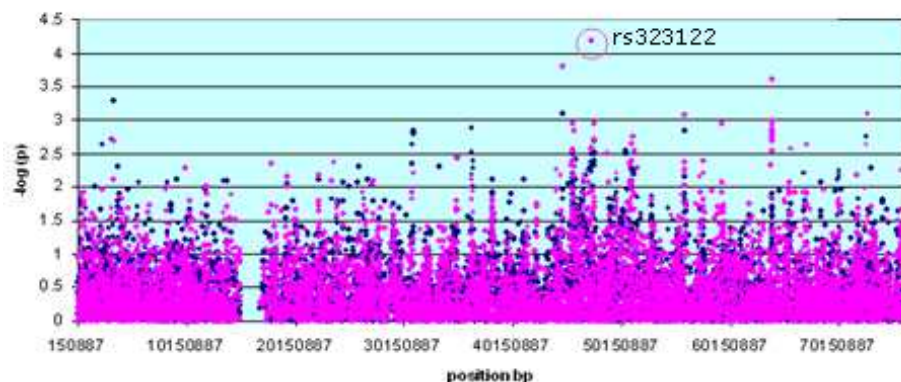
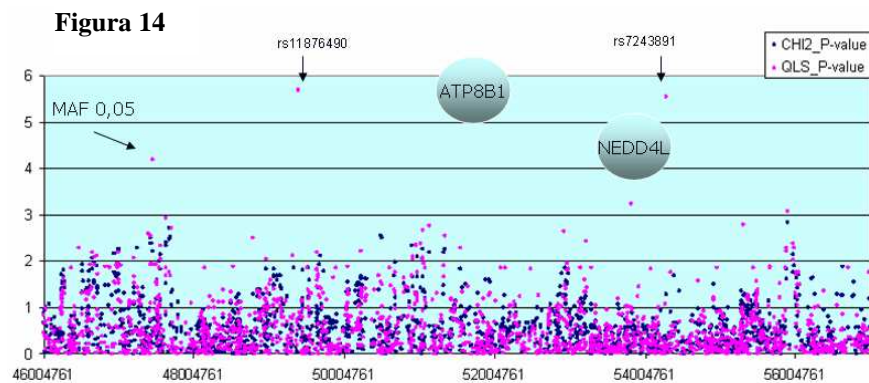


Figura 13

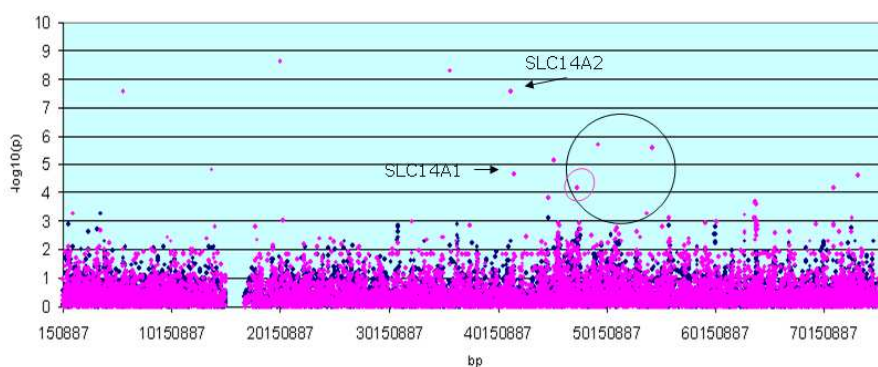


Valutando che con il linkage vengono considerati anche gli alleli rari e che dall'analisi di associazione abbiamo eliminato gli SNPs con $MAF \leq 0.05$, abbiamo ripetuto l'analisi di associazione senza questo filtro. I risultati per questi SNPs potrebbero non essere esatti per la bassa frequenza dell'allele nei casi o nei controlli o in entrambi. Per validarli sarebbe necessario aumentare il numero di campioni. È stato osservato che due SNPs eliminati dal filtro si trovano dentro la regione di linkage a monte e a valle dei geni ATP8B1 e NEDD4L. Lo SNP rs11876490 si trova a 4 474 607bp (circa 4Mb) dal 3' del gene ATP8B1 e ha un p_value di 2.06E-06. Lo SNP rs7243891 è posizionato a circa 68Kb con un p_value di 2,78E-6 dal gene 3'NEDD4L (Fig. 14)



Inoltre sempre nel cromosoma 18, segnaliamo fuori dalla regione di linkage (cerchiata in nero nella figura 15), l'interessante associazione per due geni SLC14A1 SLC14A2 che per la loro funzione potrebbero essere degli ottimi candidati in quanto trattasi di trasportatori dell'urea e quindi direttamente implicati nella concentrazione dell'urine⁷⁰.

Figura 15



DISCUSSIONE

L'obiettivo di questo studio è la ricerca di regioni cromosomiche e geni che potessero avere un ruolo nella calcolosi renale. Per lo studio di questa malattia multifattoriale sono stati utilizzati due approcci attualmente disponibili quando si vuole studiare tutto il genoma: analisi di linkage e analisi di associazione. Questi due tipi di analisi per quanto fortemente diversi hanno lo stesso scopo e prevedono entrambi l'utilizzo di marcatori molecolari disposti su tutto il genoma.

In uno studio di questo tipo ci aspettiamo di trovare diverse varianti associate alla patologia in quanto ci troviamo di fronte ad una malattia multifattoriale le cui componenti, genetica e ambientale, sono a loro volta complesse. Spesso la componente genetica non si limita ad un'unica variante in un solo gene ma è data dalla combinazione di più varianti in geni diversi che coinvolgono pathways differenti che concorrono all'insorgenza della malattia. La teoria secondo la quale le malattie di più larga diffusione sono dovute a poche varianti comuni si è rivelata esatta solo in alcuni casi⁷¹. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che le malattie complesse possano essere causate da diverse mutazioni che avvengono su geni diversi di uno stesso pathway; è possibile quindi che in una popolazione venga "selezionata" una particolare variante trasmessa nelle generazioni successive che in definitiva indica solo un tassello dell'intero pathway coinvolto nella patologia. Questo potrebbe spiegare il perché utilizzando popolazioni differenti si ottengono differenti varianti associate.

Questo studio è stato condotto nella popolazione di Talana che presenta caratteristiche peculiari (pochi fondatori originari, elevato tasso di inbreeding, isolamento geografico, etc.), indicate come ideali da vari autori^{43, 44, 49} nello studio di tratti complessi alla cui insorgenza

partecipano sia fattori genetici (dovuti all'alterazione di un gene o di un gruppo di geni deputati al controllo di una determinata funzione o fenotipo) che fattori ambientali (inclusi quelli relativi allo stile di vita e all'alimentazione).

I valori elevati di Linkage Disequilibrium determinati nel lavoro condotto da Angius et al. nel 2001⁵⁴ sono prova dell'elevato grado di isolamento e omogeneità strutturale che contraddistinguono il paese mentre la caratterizzazione delle linee materne e paterne ne evidenzia l'origine da un ridotto numero di fondatori (undici capostipiti femminili e otto maschili).

La popolazione di Talana permette, quindi, di analizzare individui con diminuita eterogeneità genetica in un contesto culturale ed ambientale omogeneo. Possiamo, per questa ragione, presupporre che in tale paese esista un numero di geni responsabili dell'insorgenza della patologia sicuramente ridotto rispetto ad altre popolazioni più aperte e che influisca in maniera determinante sul manifestarsi della calcolosi.

Infatti in un precedente lavoro

Sulla base di questi presupposti è stata condotta a Talana un'indagine epidemiologica che ha definito prevalenza e distribuzione della calcolosi renale nel paese. L'indagine epidemiologica ci ha consentito di selezionare le persone da sottoporre a visita specialistica mediante ecografia renale al fine di classificare la severità della calcolosi renale. In un precedente studio condotto nella popolazione di Talana, un sottogruppo di campioni selezionati in base alla composizione del calcolo da acido urico (UAN) ha portato all'individuazione di un gene nella regione 10q21.2 di suscettibilità per la calcolosi renale da acido urico, ZNF365D che porta una variante (Ala62Thr) fortemente associata con la nefrolitiasi da acido urico.^{41°} Diversamente in questo studio la selezione dei campioni non ha tenuto conto della composizione del calcolo ipotizzando un meccanismo comune alla base della formazione dei diversi tipi di calcoli.

Abbiamo selezionato due pool di soggetti da sottoporre ad analisi genetica: quelli che presentavano la forma più severa della patologia (casi) e i controlli.

Utilizzando i casi a disposizione abbiamo costruito le famiglie da sottoporre ad analisi di linkage non parametrica utilizzando due diversi set di marcatori: il set dei 16000 SNPs e il set dei 900 microsatelliti. L'utilizzo di differenti marcatori, aiuta a compiere una cernita di quei loci che rimanendo costanti nelle diverse analisi ne rafforzano la veridicità.

I risultati di linkage hanno mostrato 5 loci in comune tra le due analisi e tra questi il locus nel cromosoma 18 è risultato il più robusto con valori di LOD di 1.5 per l'analisi con i 900 microsatelliti e un LOD di 2 per l'analisi con i 16000 SNPs. Nella regione di linkage abbiamo individuato due geni *ATP8B1* e *NEDD4L* che giudichiamo "interessanti" per il loro possibile ruolo nella calcolosi renale.

Il gene *ATP8B1* si espande per 77Kb nella regione 18q21.31 ed è composto da 28 esoni. Codifica per una proteina appartenente alla famiglia delle *P-type ATPase subfamily IV*. I membri di questa subfamiglia sono stati associati al trasporto di proteine e apoptosi, oltre che al trasferimento di aminofosfolipidi da uno strato lipidico all'altro della membrana plasmatica, garantendo il mantenimento dell'asimmetria di membrana. L' *ATP8B1* è stato trovato espresso in linea di massima nei tessuti epiteliali (compresi rene e vescica), con alti livelli di espressione nel piccolo intestino pancreas e fegato⁶⁴. L'espressione nell'ortologo del topo è stata osservata in particolare negli epatociti e dotti biliari, cistifellea, colangiociti, ileociti e cellule pancreatiche⁷²

Il gene *ATP8B1* è responsabile del primo sottotipo di colestasi intraepatica progressiva familiare (PFIC) ed è coinvolto anche nella colestasi intraepatica ricorrente benigna (BRIC)⁶². Sembra svolgere

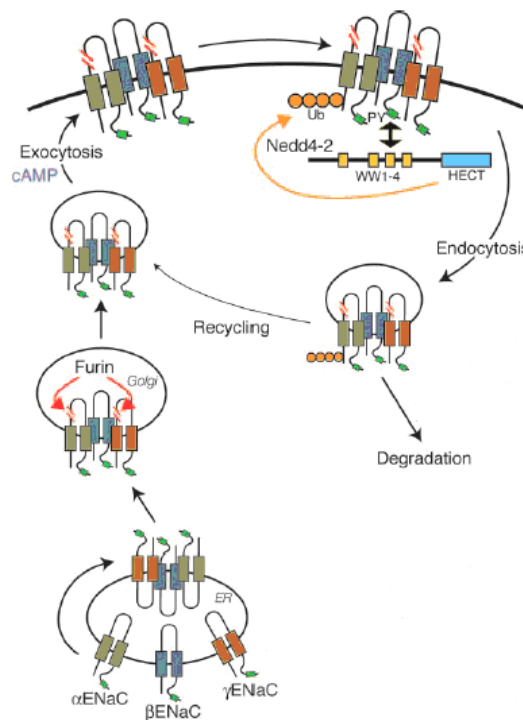
un ruolo fondamentale nella regolazione del circolo entero-epatico degli acidi biliari, incluso il loro assorbimento intestinale.

Non è stato stabilito ancora il meccanismo attraverso il quale le variazioni a carico del gene determinino la colestasi. È stato ipotizzato che ATP8B1 sia una traslocasi di aminofosfolipidi, che trasloca la fosfatidilserina dalla posizione extra citoplasmatica a quella citoplasmatica del bilayer lipidico delle cellule canalicolari⁷³. Se questa ipotesi fosse corretta una alterazione dell'assetto di membrana potrebbe interferire con la normale funzione dei trasportatori al suo interno⁷⁴.

Un'altra ipotesi è che la proteina rappresenti un diretto trasportatore degli acidi biliari⁷⁵ che potrebbe determinare una anomalia del riassorbimento intestinale degli stessi⁶⁴.

Gli effetti fisiopatologici della colestasi sono dovuti al reflusso dei costituenti della bile (principalmente la bilirubina, i sali biliari e i lipidi) nella circolazione sistemica e alla loro mancata eliminazione, data l'impossibilità a raggiungere l'intestino. Il deflusso della bile può essere alterato a qualsiasi livello nel sistema biliare. La colestasi è espressione di un difetto della secrezione biliare e i meccanismi sono complessi. Tra i fattori che contribuiscono alla colestasi vi è la presenza di acidi biliari scarsamente solubili; un'alterata attività della Na⁺, K⁺-ATPasi, necessaria per il corretto deflusso della bile lungo i canalicoli; un'alterata composizione e fluidità dei lipidi di membrana; un aumento del riassorbimento tubulare dei costituenti della bile. La stessa stasi del fluido biliare può determinare calcolosi biliare, così come molto spesso è la presenza del calcolo causativa del mancato deflusso della bile. Alla luce di questo, possiamo ipotizzare che l'ATPasi possa essere implicata nella calcolosi renale con un meccanismo fisiologico molto simile nei tubuli renali a quello presente nei canalicoli biliari ancora, per altro, non compreso.

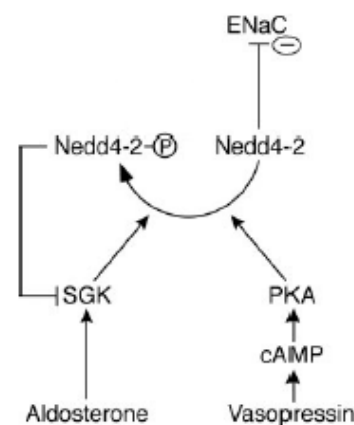
Il gene *NEDD4L* si estende per circa 350 Kb nella regione 18q21, composto da 32 esoni codifica una proteina di 854 amminoacidi. *NEDD4L* anche conosciuto come *NEDD4-2*, interagisce con la proteina ENaC (*Epithelial Sodium Channel*), deputata al riassorbimento renale del sodio. Ha quindi un ruolo cruciale nel bilancio idro-salino di tutto il corpo, e di conseguenza nel controllo del volume del sangue e della pressione sanguigna ⁶⁶. Oltre che nell'epitelio renale, la proteina ENaC è espressa nell'epitelio alveolare, nel colon distale, nei dotti salivari e nelle ghiandole sudoripare ⁷⁶.



L'interazione di dei NEDD4L tramite i domini WW della proteina con i domini PY di ENaC conduce alla ubiquitinazione del canale e successiva degradazione dello stesso, che in definitiva porta ad una diminuzione del numero dei canali per il sodio sulla superficie cellulare ⁷⁷.

Il pathway che conduce al riassorbimento del sodio, attraverso l'incremento del numero dei canali ENaC sulla membrana apicale delle cellule, è finemente regolato in base alle condizioni fisiologiche. Questa via è modulata da diversi ormoni in particolare dall'aldosterone, dall'ormone antidiuretico (ADH o vasopressina) e dall'insulina.

L'aldosterone determina un maggior riassorbimento di sodio stimolando la trascrizione dei geni che codificano per le sub unità dell' ENaC, mediante i recettori citoplasmatici per i mineral corticoidi e successiva migrazione del complesso nel nucleo. Inoltre l'aldosterone, stimola la trascrizione del gene *SGK* che codifica per una *serine/threonine protein kinase*, la quale fosforilando NEDD4L inibisce l'endocitosi del canale⁷⁸.



Anche l'ormone antidiuretico, il cui effetto principale è quello di riassorbire l'H₂O dai dotti collettori e determinare quindi la concentrazione urinaria, attiva un pathway che porta all'attivazione della kinasi PKA che inibisce tramite fosforilazione NEDD4L⁷⁷.

L'insulina invece stimola e regola l'attività di SGK attraverso una via di trasduzione del segnale che coinvolge: i recettori di membrana e i loro substrati, l'enzima fosfatidil-inositolo 3 kinasi (P13) e le chinasi dipendenti da fosfoinositidi (PDK1 e PDK2). L'SGK è anche attivata da *Protein kinasi A* (PKA) c-AMP dipendente attraverso la fosforilazione della treonina 369⁷⁹. Questa complessa regolazione ad opera di insulina, vasopressina e aldosterone che agisce su un insieme di geni tra i quali NEDD4L spiega complessivamente l'effetto sodio ritentivo.

Diversi lavori mettono in relazione l'ENaC e le proteine che ne costituiscono la via metabolica con l'ipertensione essenziale e in seguito al maggior riassorbimento del sodio, all' ipertensione sensibile al sale. Dati di letteratura riportano una aumentata ritenzione di sodio in relazione alla insulino- resistenza in soggetti obesi.

Il lavoro di *Dahlberg et al.* dimostra chiaramente che polimorfismi del gene *NEDD4L* determinano un incrementano del riassorbimento del sodio e riduzione dei livelli di renina plasmatica, che conducono ad un aumento della pressione diastolica e sistolica⁸⁰.

È dunque chiaro il ruolo di *NEDD4L* nella *down regulation* di ENaC che conduce a un maggior riassorbimento salino.

Troviamo che questo gene possa essere fortemente implicato anche nella calcolosi renale, in quanto il riassorbimento dal fluido tubulare del sodio sul versante apicale della membrana delle cellule dei tubuli distali e dotti collettori, è accompagnato da un concomitante riassorbimento di H₂O aldosterone/ADH-dipendente. Questo è uno dei meccanismi chiave nella concentrazione e acidificazione delle urine, che di per se è un importantissimo fattore di rischio per la calcolosi renale.

I risultati ottenuti con l'analisi di linkage vengono supportati dall' analisi di associazione effettuata su tutto il genoma, in cui segnalimo in particolare 3 SNPs che cadono nella regione di interesse individuata con l'analisi di linkage per il cromosoma 18. Lo SNP rs11876490 si trova a circa 4Mb dal 3' del gene *ATP8B1* e ha un p_value di 2.06E-06. Lo SNP rs7243891 è posizionato a circa 68KB con un p_value di 2,78E-6 dal gene 3'*NEDD4L*. In questa analisi il software CC-QLS riporta l'attenzione sul fatto che per questi due SNPs il valore di p potrebbe non essere esatto per la bassa frequenza dell'allele nei casi o nei controlli. Mentre nel terzo SNP (rs323122) con p_value pari a 6.39E-05 la una frequenza dei due alleli è ben rappresentata.

I risultati di associazione inoltre, hanno indicato sempre sul cromosoma 18, nei geni *SLC14A1* e *SLC14A2* altri due possibili candidati per la calcolosi in quanto trasportatori dell'urea e quindi implicati direttamente nel meccanismo di concentrazione dell'urina⁸¹,⁸². Lo SNP rs577020 con p_value di 2,21E-5 cade dentro il gene

SLC14A1. Mentre lo SNP rs7228226 con p_value di 2,73E-8 si trova a 120kb dal gene *SLC14A2*. Tuttavia il numero di soggetti presi in esame non consente di validare dal punto di vista statistico l'associazione osservata. Per confermare questo dato, che dal punto di vista della implicazione nella calcolosi renale è molto suggestivo, sarà necessario ampliare il nostro campionamento.

Dall'analisi di associazione su tutto il genoma abbiamo trovato come marker più associato lo SNP rs2900713 con un valore di p pari a 1.6×10^{-07} e ad appena 1,5Kb un altro SNP rs2181019 con p_value pari a 7.7E-06 che mappano a 20Kb dall' estremità 3' del gene *SorCSI* nella regione 10q25. Questi due SNPs per la loro vicinanza sono in LD tra loro. Calcolato il *linkage disequilibrium* della regione, sia sui nostri campioni che su 800 individui della popolazione di Talana, non abbiamo osservato un forte LD della zona. Questo ci spiega perché gli SNPs che mappano dentro il gene, presenti nel nostro set di marcatori, non mostrino valori di p significativi, ma ciò non esclude che il nostro SNP possa essere in LD con una variante all'interno del gene.

Il gene *SorCS1* si estende per 590kb e contiene 29 esoni. Codifica per una proteina transmembrana costituita da un dominio ricco di leucine, un singolo dominio transmembrana, e un corto dominio citoplasmatico VPS10 N-terminale. La proteina, appartenente alla famiglia dei recettori VPS10, si trova nella superficie cellulare così come nell'apparato del Golgi, ed è stato ipotizzato che sia coinvolta, attraverso il dominio VPS10, nel legame con le proteine all'interno delle vescicole secretorie per il trasporto verso la membrana plasmatica. *SORCS1* è stata localizzata principalmente nel sistema nervoso centrale, ma è molto espressa anche nel rene, nel fegato, nelle cellule beta pancreatiche e nel cuore^{67, 68}.

Nel topo, il gene localizzato sul cromosoma 19, è stato associato al diabete mellito di tipo 2 (locus *T2dm2*)⁸³. Polimorfismi in

SorCS1 mostrano che questo gene è legato a variazioni dei livelli di insulina nel sangue.

In particolare studi condotti su topi obesi hanno individuato polimorfismi che predispongono ad una minore capacità di compensare l'insulino-resistenza dovuta all'obesità. Nei topi con lieve iperglicemia a digiuno si osserva una riduzione del 30 % della produzione di insulina e livelli di espressione del gene 10 volte più alti. Anche nell'uomo recenti studi indicano *SorCSI* come gene candidato per il diabete di tipo 2 e individuano alcune varianti associate ad un'alterata secrezione di insulina nel sangue, per una incapacità delle cellule β nel mantenere la morfologia delle isole pancreatiche⁸⁴.

L'obesità e il diabete di tipo 2 due sono dei fattori di rischio per la calcolosi renale. Studi mostrano che soggetti affetti da diabete di tipo 2 due formano urine più acide come conseguenza dell'insulino-resistenza, con un maggior rischio per la calcolosi renale da acido urico. Alla luce di queste premesse, l'associazione tra il fenotipo calcolotico e lo SNP rs2900713 nella regione dove si trova il gene *SorCSI*, suggerisce che *SorCSI* possa avere un ruolo fisiologico nella calcolosi renale, considerando inoltre la sua alta espressione nel rene.

In conclusione questo studio individua in *ATP8B1*, *NEDD4L* e *SorCSI*, tre nuovi geni di suscettibilità alla calcolosi renale, confermando che la componente genetica di questa patologia multifattoriale non si limita ad un'unica variante in un solo gene ma è data dalla combinazione di più varianti in geni diversi, che coinvolgono pathways differenti ma che concorrono all'insorgenza della malattia. In particolare, possiamo ipotizzare che *NEDD4L* e *SorCSI*, attraverso differenti vie metaboliche, concorrano al rischio di calcolosi renale avendo nell'insulino-resistenza il loro denominatore comune.

Tavola II- Particolare della tavola I

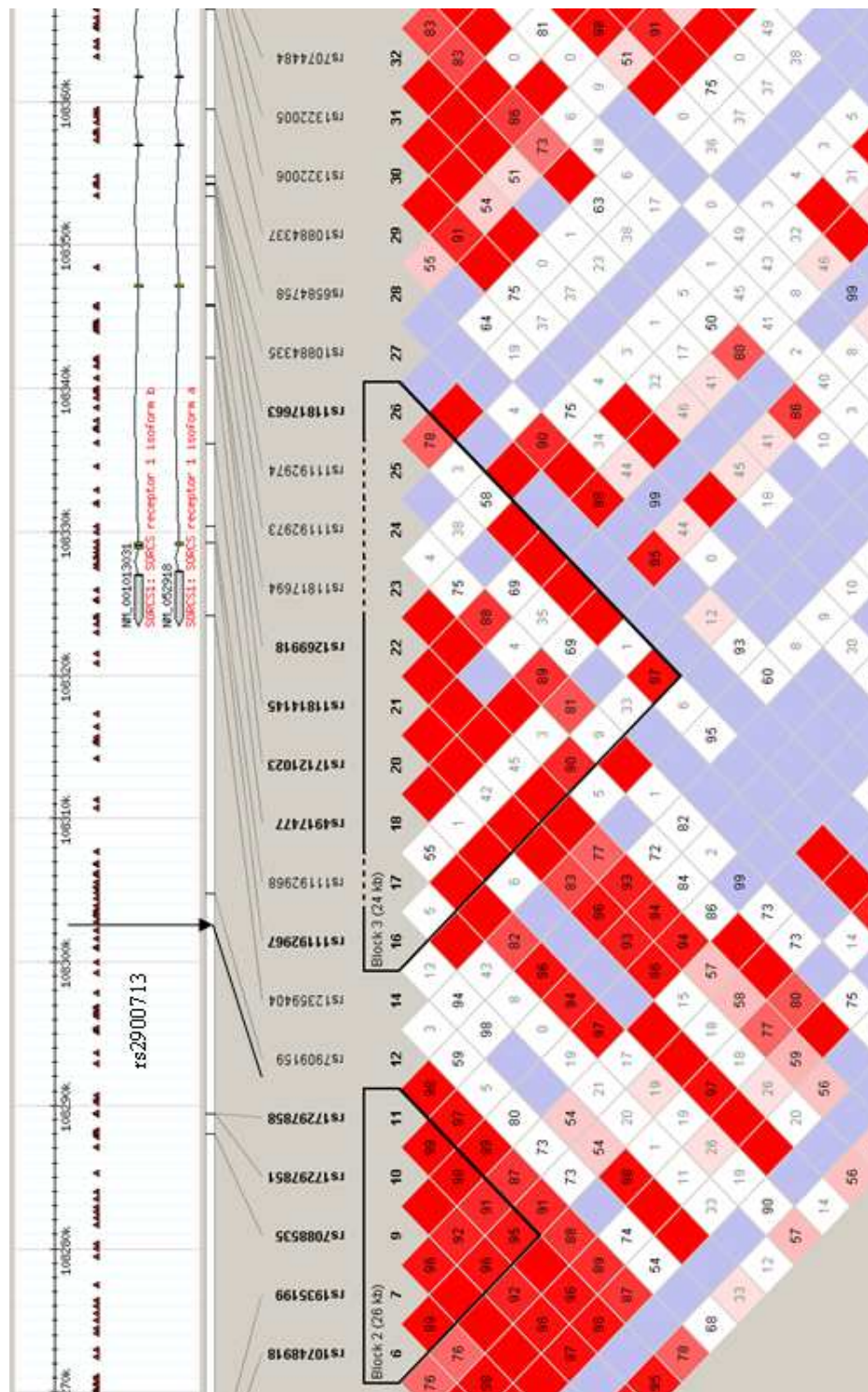
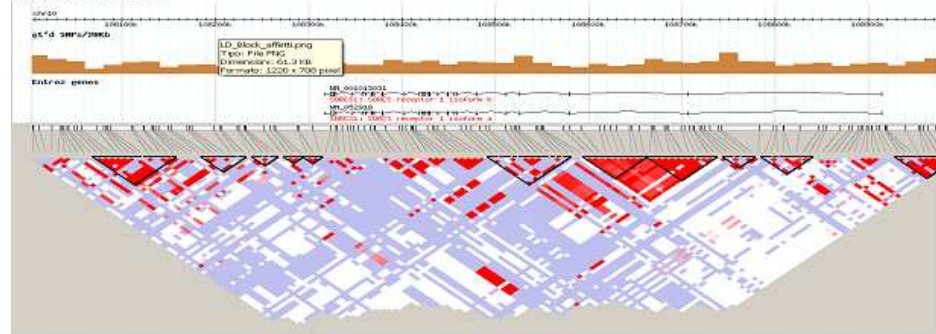
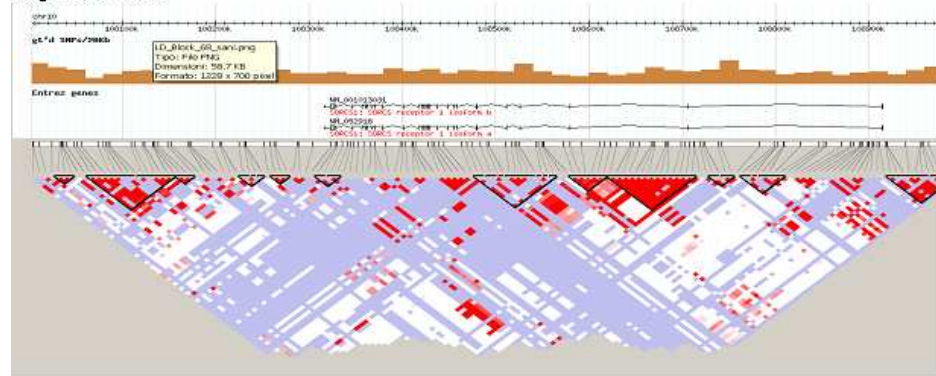


Tavola III

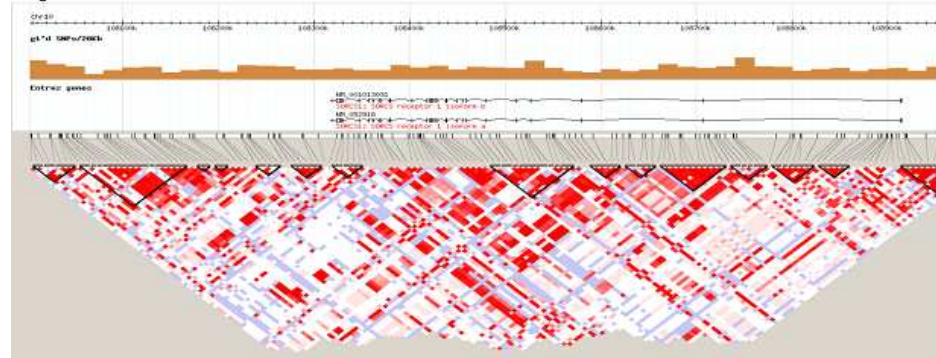
48 Casi
Regione SorCS1



68 Controlli
Regione SorCS1



843 soggetti Talana
RegioneSORCS1



Desidero rivolgere un ringraziamento particolare a Stefania Casula e alla dott.ssa Paola Forabosco per il prezioso contributo in questo lavoro.

Vorrei inoltre ringraziare la dott.ssa Laura Frogheri, la dott.ssa Luciana Guiso, la dott.ssa Paola Pistidda, la dottoressa M.Pina Concas e il dott. Angius e tutti i colleghi per il loro importante sostegno scientifico. Infine ringrazio il Dott. Pirastu, per avermi dato la possibilità di lavorare nel campo della genetica molecolare.

BIBLIOGRAFIA

¹ Ugo Dettori. *Trattato di patologia medica*.

² *Linee Guida per la calcolosi delle vie urinarie* Associazione Urologi Italiani, 2007.

³ Ramello A, Vitale C, Marangella M. *Epidemiology of nephrolithiasis*. J Nephrol 2000; 13(S3): S45-S50.

⁴ Maina E., Forte F., Paracuollo D. Terribile M., Taranto C., Sacco G., Marchetti M., Risitano A. *Diagnosi di Laboratorio nello screening metabolico dei pazienti nefrolitiasici: la nostra esperienza* .

⁵ Paolo Campagna. *Farmaci vegetali*. Minerva Medica, maggio 2008.

⁶ Hesse A, Brandle E, Wilbert D, et al: *Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1979 vs. 2000*. Eur Urol 44:709-13, 2003.

⁷ Amato M, Lusini ML, Nelli F. *Epidemiology of nephrolithiasis today*. Urol Int 72 (suppl 1): 1-5, 2004.

⁸ Oliech JS, Kayima JK, Otieno LS: *Urinary tract stone disease in Nairobi*. East Afr Med J 75:30-4, 1998.

⁹ Rashid HV, Fatima N, Ahmed S, Shamim AM, Alem MK: *Clinical characteristics of renal stone disease in Bangladesh*. In Rao PN, Kavanagh JP, Tiselius H-G. *Urolithiasis: consensus and controversies*, p. 411-13, Manchester 1995

-
- ¹⁰ Tanthanuch M, Apiwatgaroon A, Pripatnanont C: *Urinary tract calculi in southern Thailand*. J Med Assoc Thai 88:80-5, 2005
- ¹¹ Stamatelou KK, Francis ME, Jones CA, Nyberg LM, Curhan GC: *Time trends in reported prevalence of kidney stones in the united states: 1976–1994*. Kidney Int 63: 1817-1823, 2003.
- ¹² Scott R a: *Epidemiology of stone disease*. Br J Urol 57: 491-497,1985
- ¹³ Al-Hunayan A, Abdul-Halim H, Kehinde EO, et al: *Mode of presentation and first line of management of non-recurrent urolithiasis in Kuwait*. Int J Urol 11:963-8, 2004
- ¹⁴ Maloney ME, Springhart WP, Ekeruo WO, et al: *Ethnic background has minimal impact on the etiology of nephrolithiasis*. J Urol 173:2001-4, 2005
- ¹⁵ Fan J, Chandhoke PS, Grampas SA. *Role of sex hormones in experimental calcium oxalate nephrolithiasis*. J Am Soc Nephrol 10 (suppl 14): S376-80, 1999
- ¹⁶ Indridason OS, Birgisson S, Edvardsson VO, Sigvaldason H, Sigfusson N, Palsson R: *Epidemiology of kidney stones in Iceland: a population-based study*. Scand J Urol Nephrol; 40: 215–220 2006
- ¹⁷ Parry ES: *Sunlight and hypercalciuria*. Lancet 1:10631065,1975

¹⁸ Luiz Atan, Cassio Andreoni, Valdemar Ortiz, Edina Koga Silva, Ricardo Pitta, Fernanda Atan, Miguel Srougi *High kidney stone risk in men working in steel industry at hot temperatures*. *Urology* 2005 May; 65 (5):858-61.

¹⁹ Sedrani SH, Al-Arabi KM, Abanmy A, Elidrissy A, Lawson DEM: *Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D in Saudi population in relation to age,sex and type of house*. Eight Workshop on vitamin D,July 5-10,Paris,1991.

²⁰ Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. *A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones*. *N Engl J Med* 1993; 328: 833–838.

²¹ Serio A, Fraioli A. *Epidemiology of nephrolithiasis*. *Nephron* 1999; 81[Suppl 1]: 26-30.

²² Taylor EN b, Stampfer MJ, Curhan GC. *Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones*. *JAMA*. 2005 Jan 26;293(4):455-62.

²³ Curhan GC h: *Epidemiologic evidence for the role of oxalate in idiopathic nephrolithiasis*. *J Endourol* 13:629, 1999.

²⁴ Goldfarb D, Fischer ME, Keich Y, Goldberg J. *A twin study of genetic and dietary influences on nephrolithiasis. A report from the Vietnam era twin (VET) registry*. *Kidney Int* 2005; 67: 1053-61.

²⁵ Griffin D G. *A review of the heritability of idiopathic nephrolithiasis*.*J Clin Pathol* 2004: 57:793-796.

-
- ²⁶ Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. *Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones*. JAMA 2005; 293: 455–62.
- ²⁷ Mary Ann Cameron, Naim M. Maalouf, Beverley Adams-Huet, Orson W. Moe, and Khashayar Sakhaee, *Urine Composition in Type 2 Diabetes: Predisposition to Uric Acid Nephrolithiasis*, J Am Soc Nephrol 17: 1422–1428, 2006.
- ²⁸ Michel Daudon, Olivier Traxer, Pierre Conort, Bernard Lacour, and Paul Jungers, *Type 2 Diabetes Increases the Risk for Uric Acid Stones*, J Am Soc Nephrol 17: 2026–2033, 2006.
- ²⁹ Strazzullo P, Barba G, Vuotto P, Farinaro E, Siani A, Nunziata V, Galletti F, Mancini M, Cappuccio FP. *Past history of nephrolithiasis and incidence of hypertension in men: a reappraisal based on the results of the Olivetti Prospective Heart Study*. Nephrol Dial Transplant 2001; 16:2232–2235.
- ³⁰ Cappuccio FP, Strazzullo P, Mancini M. *Kidney stones and hypertension: population based study of an independent clinical association*. BMJ 1990; 300:1234–1236.
- ³¹ Madore F, Stampfer MJ, Rimm EB, Curhan GC. *Nephrolithiasis and risk of hypertension*. Am J Hypertens 1998; 11:46–53.
- ³² Goodman HG, Holmes RP, Assimos DG: *Genetic factors in calcium oxalate stone disease*. J Urol 153:301, 1995.
- ³³ Marangella M, Vitale C, Bagnis C, et al: *Idiopathic calcium nephrolithiasis*. Nephron 81 Suppl 1:38-44, 1999

-
- ³⁴ Lerolle N, Lantz B, Paillard F, et al: *Risk factors for nephrolithiasis in patients with familial idiopathic hypercalciuria*. Am J Med 113:99-103, 2002
- ³⁵ Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ: *Family history and risk of kidney stones*. J Am Soc Nephrol 1997; 8: 1568–1573.
- ³⁶ Stechman MJ, Loh NY, Thakker RV: *Genetics of hypercalciuric nephrolithiasis: renal stone disease*. Ann NY Acad Sci 2007; 1116: 461–484.
- ³⁷ Obligado SH, Goldfarb DS: *The association of nephrolithiasis with hypertension and obesity: a review*. Am J Hypertens 2008; 21:257–264.
- ³⁸ Wilson, F.H., Kahle, K.T., Sabath, E., Lalioti, M., Rapson, A.K., Hoover, R.S., Hebert, S.C., Gamba, G., and Lifton, R.P.: *Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4*. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 2003; 100:680-684.
- ³⁹ Devuyst O, Pirson Y: *Genetics of hypercalciuric stone forming diseases*. Kidney Int 2007; 72: 1065–1072.
- ⁴⁰ John A. Sayer. *The Genetics of Nephrolithiasis*. Nephron E e38 xp Nephrol 2008;110:e37–e43.
- ⁴¹ Tanaka M, Itoh K, Matsushita K, Matsushita K, Wakita N, Adachi M, Nonoguchi H, Kitamura K, Hosoyamada M, Endou H, Tomita K: *Two male siblings with hereditary renal hypouricemia and exercise-induced ARF*. Am J Kidney Dis 2003; 42: 1287–1292.

^{41°} Gianfrancesco F, Esposito T, Ombra MN, Forabosco P, Maninchedda G, Fattorini M, Casula S, Vaccargiu S, Casu G, Cardia F, Deiana I, Melis P, Falchi M, Pirastu M. Gianfrancesco et al. *Identification of a novel gene and a common variant associated with uric acid nephrolithiasis in a Sardinian genetic isolate.* Am J Hum Genet. Jun 72:1479-91, 2003

⁴² Jaggi M, Nakagawa Y, Zipperle L, Hess B: *Tamm-Horsfall protein in recurrent calcium kidney stone formers with positive family history: abnormalities in urinary excretion, molecular structure and function.* Urol Res 2007; 35: 55–62.

⁴³ Zamel N, McClean PA, Sandell PR, Siminovitch KA, Slutsky AS. *Asthma on tristan da cunha: looking for the genetic link. the university of toronto genetics of asthma research group.* Am J Respir Crit Care Med. 1996 Jun;153(6 Pt 1):1902-6.

⁴⁴ Ginns EI, Ott J, Egeland JA, Allen CR, Fann CS, Pauls DL, Weissenbachoff J, Carulli JP, Falls KM, Keith TP, Paul SM. *A Genome-Wide Search for chromosomal loci linked to bipolar affective disorder in the old order amish.* Nature Genetics 1996; 12:431-5.

⁴⁵ Piazza A, Cappello N, Olivetti E, Rendine S. *A genetic history of Italy.* Ann Hum Genet 1988; 52:203-13.

⁴⁶ Cavalli-Sforza LL, Piazza A. *Human genomic diversity in Europe: a summary of recent research and prospects for the future.* Eur J Hum Genet. 1993; 1:3-18.

⁴⁷ Peltonen L, Jalanko A, Varilo T. *Molecular genetics of the Finnish disease heritage.* Hum Mol Genet 1999; 8:1913-1923.

-
- ⁴⁸ Peltonen L. *Positional cloning of disease genes: advantages of genetic isolates*. Hum Hered. 2000; 50:66-75
- ⁴⁹ Wright AF, Carothers AD, Pirastu M. *Population choice in mapping genes for complex disease*. Nature Genetics **23**:397-404, 1999
- ⁵⁰ Laan M and Paabo S. *Demographic history and linkage disequilibrium in human populations*. Nature Genet 1997; 17: 435-438
- ⁵¹ Kruglyak L. *Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes*. Nat Genet 1999; 22:139 144
- ⁵² Thompson EA, Neel JV. *Allelic disequilibrium and allele frequency distribution as a function of social and demographic history*. American Journal Human Genetics 1997; **60** :197-204
- ⁵³ Jorde LB, Rogers AR, Bamshad M, Watkins WS, Krakowiak P, Sung S, Kere J, Harpending HC. *Microsatellite diversity and the demographic history of modern humans*. Proceeding National Academy Science U S A. 1997; **94** :3100-3.
- ⁵⁴ Angius A, Melis PM, Morelli L, Petretto E, Casu G, Maestrale GB, Fraumene C, Bebbere D, Forabosco P, Pirastu M. *Archival, demographic and genetic studies define a sardinian sub-isolate as a suitable model for mapping complex traits*. Hum Genet. 2001 Aug;**109**(2):198-209.

⁵⁵ Falchi M, Forabosco P, Mocci E, Borlino CC, Picciau A, Viridis E, Persico I, Parracciani D, Angius A, Pirastu M: *A genomewide search using an original pairwise sampling approach for large genealogies identifies a new locus for total and low-density lipoprotein cholesterol in two genetically differentiated isolates of Sardinia*. *Am J Hum Genet* 75:1015–1031, 2004.

⁵⁶ <http://slack.ser.man.ac.uk/progs/pedcheck.html>

⁵⁷ Geyer. *Software for calculating gene survival and multigene descent probabilities, and for pedigree manipulation and drawing*. Technical report No. 153, Dept Statistics, University of Washington, 1988

⁵⁸ Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO and Cardon LR. *Merlin-rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees*. *Nat Genet* (2002) 30:97-101

⁵⁹ Gonçalo R. Abecasis and Janis E. Wigginton. *Handling marker-marker linkage disequilibrium: pedigree analysis with clustered markers*. *Am J Hum Genet* 77(5):754-67,2005

⁶⁰ Bourgain C, Hoffjan S, Nicolae R, Newman D, Steiner L, Walker K, Reynolds R, Ober C, McPeck MS. *Novel case-control test in a founder population identifies P-selectin as an atopy-susceptibility locus*. *Am J Hum Genet.*;73(3):612-26, 2003

⁶¹ <http://www.allsnps.com/snpbrowser>

⁶² Eppens, E. F.; van Mil, S. W. C.; de Vree, J. M. L.; Mok, K. S.; Juijn, J. A.; Oude Elferink, R. P. J.; Berger, R.; Houwen, R. H. J.; Klomp, L. W. J. *FIC1, the protein affected in two forms of hereditary cholestasis, is localized in the cholangiocyte and the canalicular membrane of the hepatocyte*. J. Hepatol. 35: 436-443, 2001.

⁶³ Klomp, L. W. J.; Vargas, J. C.; van Mil, S. W. C.; Pawlikowska, L.; Strautnieks, S. S.; van Eijk, M. J. T.; Juijn, J. A.; Pabon-Pena, C.; Smith, L. B.; DeYoung, J. A.; Byrne, J. A.; Gombert, J.; van der Brugge, G.; Berger, R.; Jankowska, I.; Pawlowska, J.; Villa, E.; Knisely, A. S.; Thompson, R. J.; Freimer, N. B.; Houwen, R. H. J.; Bull, L. N. *Characterization of mutations in ATP8B1 associated with hereditary cholestasis*. Hepatology 40: 27-38, 2004.

⁶⁴ Bull, L. N.; van Eijk, M. J. T.; Pawlikowska, L.; DeYoung, J. A.; Juijn, J. A.; Liao, M.; Klomp, L. W. J.; Lomri, N.; Berger, R.; Scharschmidt, B. F.; Knisely, A. S.; Houwen, R. H. J.; Freimer, N. B. *A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis*. Nature Genet. 18: 219-224, 1998.

⁶⁵ Garty, H. and Palmer, L. G. *Epithelial sodium channels : function, structure and regulation*. Physiol. Rev. 77, 359-396, 1997

⁶⁶ Gormley K., Dong Y. and Sagnella G. A. *Regulation of the epithelial sodium channel by accessory proteins*. Biochem. J. 371, 1-14, 2003.

⁶⁷ Hermey, G.; Riedel, I. B.; Hampe, W.; Schaller, H. C.; Hermans-Borgmeyer, I. *Identification and characterization of SorCS, a third member of a novel receptor family*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 266: 347-351, 1999

⁶⁸ Hampe, W.; Rezgaoui, M.; Hermans-Borgmeyer, I.; Schaller, H. C. *The genes for the human VPS10 domain-containing receptors are large and contain many small exons.* *Hum. Genet.* 108: 529-536, 2001.

⁶⁹ Lander E, Kruglyak L. *Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results.* *Nat.Gen.* 1995 Nov; 11: 241-247

⁷⁰ Olives, B.; Martial, S.; Mattei, M.-G.; Matassi, G.; Rousselet, G.; Ripoche, P.; Cartron, J.-P.; Bailly, P. *Molecular characterization of a new urea transporter in the human kidney.* *FEBS Lett.* 386: 156-160, 1996.

⁷¹ Pritchard JK, Cox NJ. *The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not?* *Hum Mol Genet* 11:2417–2423, 2002

⁷² Pawlikowska, L.; Groen, A.; Eppens, E. F.; Kunne, C.; Ottenhoff, R.; Looije, N.; Knisely, A. S.; Killeen, N. P.; Bull, L. N.; Oude Elferink, R. P. J.; Freimer, N. B. *A mouse genetic model for familial cholestasis caused by ATP8B1 mutations reveals perturbed bile salt homeostasis but no impairment in bile salt secretion.* *Hum. Molec. Genet.* 13: 881-892, 2004

⁷³ Ujhazy P, Ortiz D, Misra S, et al. *Familial intrahepatic cholestasis I: studies of localization and function.* *Hepatology* 34:768–75, 2001

⁷⁴ Clayton, R. J.; Iber, F. L.; Ruebner, B. H.; McKusick, V. A. *Byler disease: fatal familial intrahepatic cholestasis in an Amish kindred.* *Am. J. Dis. Child.* 117: 112-124, 1969

-
- ⁷⁵ Elferink RO, Groen AK. *Genetic defects in hepatobiliary transport*. *Biochim Biophys Acta* 1586:129–45, 2002
- ⁷⁶ Rossier, B. C., Pradervand, S., Schild, L. and Hummler, E. *Epithelial sodium channel and the control of sodium balance : interaction between genetic and environmental factors*. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 877-897, 2002.
- ⁷⁷ Peter M. Snyder. *The Epithelial Na⁺ Channel: Cell Surface Insertion and Retrieval in Na⁺ Homeostasis and Hypertension*. *Endocrine Reviews* 23:258–275.
- ⁷⁸ Peter M. Snyder. *Minireview: Regulation of Epithelial Na⁺ Channel Trafficking*. *Endocrinology* 146:5079–5085, 2005.
- ⁷⁹ Busjahn A, Aydin A, Uhlmann R, Krasko C, Bähring S, Szelestei T et al. *Serum and Glucocorticoid regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure*. *Hypertension*. 40: 256-60, 2002
- ⁸⁰ Dahlberg J, Nilsson LO, von Wowern F, Melander O. *Polymorphism in NEDD4L is associated with increased salt sensitivity, reduced levels of P-renin and increased levels of Nt-proANP*. *PLoS ONE* May 9;2(5):e432, 2007
- ⁸¹ Sands, J. M.; Gargus, J. J.; Frohlich, O.; Gunn, R. B.; Kokko, J. P. *Urinary concentrating ability in patients with Jk(a-/b-) blood type who lack carrier-mediated urea transport*. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2: 1689-1696, 1992.

⁸² Lucien, N.; Sidoux-Walter, F.; Olives, B.; Moulds, J.; Le Pennec, P.-Y.; Cartron, J.-P.; Bailly, P. *Characterization of the gene encoding the human Kidd blood group/urea transporter protein: evidence for splice site mutations in Jk-null individuals*. J. Biol. Chem. 273: 12973-12980, 1998.

⁸³ Clee, S. M.; Yandell, B. S.; Schueler, K. M.; Rabaglia, M. E.; Richards, O. C.; Raines, S. M.; Kabara, E. A.; Klass, D. M.; Mui, E. T.-K.; Stapleton, D. S.; Gray-Keller, M. P.; Young, M. B.; Stoehr, J. P.; Lan, H.; Boronenkov, I.; Raess, P. W.; Flowers, M. T.; Attie, A. D. *Positional cloning of Sorcs1, a type 2 diabetes quantitative trait locus*. Nature Genet. 38: 688-693, 2006.

⁸⁴ Goodarzi MO, Lehman DM, Taylor KD, Guo X, Cui J, Quiñones MJ, Clee SM, Yandell BS, Blangero J, Hsueh WA, Attie AD, Stern MP, Rotter JI. *SORCS1: a novel human type 2 diabetes susceptibility gene suggested by the mouse*. Diabetes 56:1922-9, 2007