

Report sull'attività scientifica condotta per il programma di Short Term Mobility

Dott. Alfredo Pauciullo

Periodo: 16 Settembre 2013 - 06 Ottobre 2013

Istituzione ospitante: Institut für Tierzucht und Haustiergenetik – Justus Liebig Universität, Gießen (Germany)

Background

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (MAP) è un batterio patogeno intracellulare noto per essere l'agente causativo della paratubercolosi nei bovini e negli altri ruminanti. Tale patologia, nota anche con il nome di Johne's disease è stata descritta per la prima volta da Johne e Frottingam (1895) come caso atipico di tubercolosi bovina. Allo stato attuale, la patogenesi della malattia non è ancora del tutto chiara sebbene l'infiammazione cronica dell'intestino con lesioni granulomatosi dell'ileo sono considerate le principali alterazioni delle mucosa intestinale causata da MAP. Gli animali infetti dalla Johne's disease mostrano una progressiva perdita di peso corporeo, diarrea cronica e riduzione delle performance produttive (per una review Purdie et al., 2011).

Molte sono le cause che impediscono una diagnosi precoce della malattia, tra queste: il lungo periodo di incubazione del patogeno (in taluni casi fino a 10 anni), le difficoltà nell'identificare chiaramente lo stadio dell'infezione, l'alta incidenza di infezioni subcliniche e i casi asintomatici.

Inoltre, la mancanza di test diagnostici rapidi, economici ed altamente sensibili rende molto difficile l'applicazione di programmi routinari di profilassi e l'eradicazione di MAP dagli allevamenti infetti (Beyerbach et al., 2001).

E' noto che le infezioni da MAP sono diffuse negli allevamenti di tutto il mondo e ciò ha un'impatto molto negativo sull'economia dell'industria casearia. Si stima che solo negli Stati Uniti d'America, le perdite economiche ammontino a circa 200 milioni di dollari in termini di ridotta produzione di latte, ridotta efficienza riproduttiva e incremento dei costi di management (Gonda et al., 2007).

E' stato dimostrato che la suscettibilità alla paratubercolosi ha una componente genetica e l'ereditabilità nella specie bovina è stimata tra 0.041 e 0.228 (Koets et al., 2000; Mortensen et al., 2004; Gonda et al., 2006; Hinger et al., 2008; Attalla et al., 2010; van Hulzen et al., 2012; Küpper et al., 2012).

Nonostante i molti studi scientifici e i differenti approcci impiegati (genotipizzazione di microsatelliti, whole genome scanning, SNP arrays, ecc...), l'identificazione della componente

genetica che contribuisce a determinare la varianza fenotipica nella suscettibilità a MAP non è ancora del tutto chiara. La conoscenza dei geni associati alla suscettibilità/resistenza alla malattia è fondamentale per la sua valutazione nell'ambito degli schemi di selezione e per la sua eradicazione.

Lo scopo del progetto di Short Term Mobility è stato quello di investigare la variabilità genetica di un pool di geni putativamente associati all'infezione da MAP, sviluppare statistiche di popolazione, valutare potenziali aplotipi e stabilire in studi "caso-controllo" le possibili associazioni responsabili di resistenza in una popolazione di bovine frisone identificate come MAP-positive e MAP-negative attraverso l'uso di test biochimici (ELISA) e colturali (analisi delle feci).

Materiali e metodi

Campionamento, estrazione del DNA e uso dei test diagnostici

Sono state oggetto di studio un totale di 324 bovine frisone provenienti da 15 differenti allevamenti locati nello stato della Thuringia (Germania). E' stato sviluppato uno studio caso-controllo in cui 162 animali positivi al test colturali sono stati scelti come casi e 162 animali provenienti dallo stesso allevamento, figlie di uno stesso toro e approssimativamente della stessa età, ma negativi al test colturale sono stati identificati come controlli. Sono stati prelevati campioni di sangue dai quali si è isolato il DNA in accordo alla procedura descritta da Montgomery e Sise (1990). La concentrazione del DNA e il rapporto $OD_{260/280}$ è stato misurato con l'uso di uno spettrofotometro di precisione (Nanodrop ND-1000).

I livelli anticorpali sono stati determinati con l'uso di un test ELISA commercialmente disponibile (CATTLETYPE[®] MAP Ab, Labor Diagnostik Leipzig, Germania) seguendo le istruzioni della casa produttrice.

Selezione degli SNP, condizioni di PCR e genotipizzazione

Sei geni indicati dalla letteratura come altamente associati alla resistenza/suscettibilità a MAP sono stati investigati per la variabilità genetica. Il database dell'NCBI è stato utilizzato per individuare gli SNP da investigare (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) e da genotipizzare nella popolazione di riferimento.

La lista completa degli SNP, il gene corrispondente, la posizione e le informazioni di genotipizzazione sono riportate in tabella 1.

Frammenti di DNA di dimensione variabile tra i 402 bp e 103 bp sono stati amplificati attraverso PCR e digeriti con specifici enzimi di restrizione. Una tipica mix di reazione (25 µl) è stata così composta: 50 ng di DNA genomico, 1X PCR Buffer (Promega, Madison, WI, USA), 2.5

mM MgCl₂, 5 pmol di ciascun primer, dNTPs ciascuno a 200 µM, 1 U di *Taq* DNA Polymerase (Promega). La PCR è stata corsa applicando il seguente profilo termico: 95°C per 4 min, 35 cicli a 95°C per 30 s, 56°C per 30 s (con l'eccezione del protocollo per lo SNP [rs136770416](#) il cui annealing è stato fatto a 50°C), 72°C per 30 s, e una estensione finale a 72°C per 5 min. La specificità dei prodotti amplificati è stata confermata da elettroforesi su gel di agarosio al 2% usando bromuro di etidio come tracciante.

17µl di ciascun prodotto di PCR sono stati quindi digeriti con 10 U di endonuclease per 16h a 37°C. I prodotti di digestione sono stati analizzati attraverso elettroforesi su gel di agarosio in 1X TBE buffer nelle stesse condizioni dei prodotti di PCR.

Analisi in silico dei siti di legame per fattori di trascrizione

Gli SNPs *DLD*: [rs134692583](#); *WNT2*: [rs43390642](#) e *IL10*: g.3625A>G sono stati analizzati con il software TFSEARCH per valutare il loro coinvolgimento in potenziali siti di legame per fattori di trascrizione. Sono stati inclusi nell'analisi i fattori di trascrizione con uno score di legame ≥ 75 per ciascun allele analizzato (max. score = 100). Per ciascuno SNP analizzato, si sono valutati un totale di 30bp (15 nucleotidi fiancheggiati il 5' e il 3' dello SNP).

Analisi statistica

Le frequenze alleliche e l'equilibrio di Hardy-Weinberg (χ^2 test) sono state calcolate con il software PopGene Ver 1.31 (University of Alberta, Canada). Il software SAS system (SAS 9.1, Institute Inc., Cary, USA) è stato usato per stimare le differenze tra le frequenze alleliche dei differenti polimorfismi nei geni investigati. Le analisi sono state effettuate valutando il test del chi-quadro e il test di Fisher usando 3 differenti fenotipi: (1) coltura fecale positiva/negativa, (2) ELISA positivo/negativo, e (3) coltura fecale o ELISA positivo/negativo. Utilizzando lo stesso schema, sono stati calcolati gli odds ratios per l'allele con frequenza minore per ciascuno SNP. Per tutti i test i valori sono stati considerati significativi per $p < 0.05$.

La condizione di linkage disequilibrium (parametri D' e r^2) e le frequenze aploipiche per gli SNP analizzati sul cromosoma 4 ([rs211391398](#); [rs134692583](#) e [rs43390642](#)) sono state stimate con il software Haploview seguendo il modello proposto da Wang et al., 2002.

Risultati

La variabilità genetica è stata investigata per un gruppo di sei geni (*LAMB1*, *DLD*, *WNT2*, *PRDM1*, *SOCS5* e *PTGER4*) indicati come putativi candidati per la resistenza/suscettibilità all'infezione da MAP. 8 SNP localizzati nei suddetti geni sono stati scelti dal database dell'NCBI

per la genotipizzazione degli animali infetti e non infetti. L'analisi in silico ha indicato che questi SNP sono responsabili di cambiamenti aminoacidici (tabella 1) o hanno un potenziale effetto sulla regolazione trascrizionale perché ricadenti in putativi siti genici per fattori di trascrizione (tabella 2).

Un test preliminare di genotipizzazione è stato effettuato su 28 animali (14 MAP+ e 14 MAP-) per validare la variabilità di ciascuno SNP. 4 degli 8 SNP ([rs43388824](#); [rs136770416](#); [rs134378401](#); [rs41944920](#)) sono risultati monomorfi nei nostri campioni test, sebbene riportati come polimorfici nella razza frisona. Pertanto, l'intera popolazione di frisone tedesche (162 casi e 162 controlli) è stata genotipizzata per i rimanenti 4 siti polimorfici.

L'analisi dei dati di RNA-Seq da un recente progetto ha indicato l'interleuchina-10 come significativamente up-regulated durante la prime fasi di infezioni da MAP (dati non mostrati), quindi il gene *IL10* è stato ulteriormente incluso nell'analisi per lo SNP discovery e il genotyping. A tal proposito, i 5 esoni e le rispettive regioni introniche del gene *IL10* sono state sequenziate per i campioni informativi (28 frisone test). Il confronto delle sequenze ha evidenziato 2 nuovi SNP (g.1309C>T all'introne 2 e g.3625A>G all'introne 4; la numerazione è relativa alla sequenza di riferimento con numero EMBL acc. no. [AC_000173](#)) mai riportati nel database dell' NCBI. Il secondo sito polimorfico è posizionato a soli 14 bp a monte dell'esone 5 e potrebbe potenzialmente influenzare un sito di legame per il fattore di trascrizione GATA, pertanto questo SNP è stato scelto per la genotipizzazione della popolazione investigata attraverso un metodo PCR-RFLP.

Il pattern di restrizione per ciascuno dei protocolli di digestione sviluppati è riportato in figure 1. Brevemente, la transizione C>T per lo SNP [rs211391398](#) nel gene *LAMB1* crea un sito di taglio per l'endonucleasi *DraI*, quindi l'amplicone PCR di 402 bp è ristretto in due frammenti di 238 bp e 164 bp per i campioni TT, mentre risulta non ristretto per il genotipo CC. L'eterozigote mostra 3 frammenti (402bp, 238 bp e 164bp).

Pattern simile per la trasversione A>T ([rs134692583](#)) nel gene *DLD*. Il genotipo AA è caratterizzato da 2 frammenti di 103 bp e 65 bp (endonucleasi *SphI*), mentre il genotipo TT mostra una banda indigerita di 168 bp. Il pattern di restrizione dei campioni eterozigoti è composto da 3 frammenti di 168 bp, 103 bp e 65 bp.

La trasversione G>T per lo SNP [rs43390642](#) al locus *WNT2* mostra il seguente pattern di restrizione dopo digestione con *HaeIII*: TT (167 bp), GT (167 bp, 95 bp e 72 bp), GG (95 bp e 72 bp).

Il pattern di restrizione per la traversione A>C (SNP [rs136669229](#)) nel gene *PRDM1* è caratterizzato da 2 frammenti di 103 bp e 39 bp per il genotipo AA, mentre la banda di 103 bp è

ulteriormente ristretta in due frammenti di 75 bp e 28 bp in presenza di citosina. Il pattern di restrizione dei campioni eterozigoti risulta di 4 frammenti (103 bp, 75 bp, 39 bp and 28 bp).

Pattern simile per la trasversione g.3625A>G individuata nel gene *IL10*. Il genotipo AA è caratterizzato da 2 frammenti di 282 bp e 71 bp. La banda di 282 è ulteriormente digerita in due frammenti di 220 bp e 62 bp per il genotipo GG. I campioni eterozigoti mostrano 4 frammenti di 282 bp, 220 bp, 71 bp e 62 bp. Le ultime due bande hanno una differenza di sole 9 bp e non è stato possibile discriminarle su un gel di agarosio. Pertanto, questi frammenti appaiono come un'unica banda sia per il genotipo AG che per il GG (Figura 1, linee 22 e 23).

La distribuzione dei genotipi e le frequenze alleliche sono riportate in tabella 3. Per tutti gli SNP analizzati, i valori di χ^2 indicati non danno evidenza di allontanamento della popolazione da una condizione di equilibrio per la legge di Hardy-Weinberg. La distribuzione dei genotipi a seconda del test fenotipico (coltura fecale ed ELISA) sono riportati in tabella 4. Sono state osservate differenze significative nelle frequenze dello SNP [rs43390642](#) (regione promoter di *WNT2*) per gli animali infetti comparati con quelli controllo (tabella 4). Lo SNP [rs43390642](#) è significativamente associato alla suscettibilità alla paratubercolosi usando sia test colturali ($p=0.035$) che ELISA ($p=0.049$). Un'associazione significativa ($p=0.013$) è stata trovata anche quando sono state applicate condizioni fenotipiche più restrittive (coltura fecale o ELISA positivo/negativo). Il test esatto di Fisher ha confermato l'associazione (tabella 4). Nel gruppo di animali positivi a MAP, la frequenza dell'allele raro T del polimorfismo [rs43390642](#) è stata di 0.04 (coltura fecale/ELISA), mentre nel gruppo controllo è stata di 0.08. I valori di OR ($p=0.043$, OR 0.50 [0.25-0.97]) suggeriscono un effetto protettivo dell'allele minore nell'infezione a MAP. Di contro, nessuna associazione è stata osservata per gli altri siti polimorfici investigati, ad eccezione dello SNP [rs134692583](#) nel gene *DLD*, i cui odd ratios hanno mostrato un effetto significativo ($p=0.046$, OR 0.58 [0.34-0.99]) per l'allele minore T quando i risultati dei test diagnostici fecale ed ELISA sono stati combinati assieme. I valori di D' di 0.968 e r^2 di 0.561 hanno suggerito una condizione di forte linkage disequilibrium tra 2 SNPs (*DLD* [rs134692583](#) e *WNT2* [rs43390642](#)), che formano un unico blocco aplo-tipico per un frammento cromosomico di circa 750 kb. L'analisi ha inoltre permesso di individuare 3 aplotipi: AG, TT e TG le cui frequenze sono state di 0.894, 0.057 e 0.047 rispettivamente. Il test del χ^2 valutato sugli aplotipi ha mostrato un'associazione significativa ($p=0.047$) per l'aplotipo TT nella resistenza all'infezione da MAP.

Conclusioni

Molti studi di GWA sono stati fatti per individuare le regioni cromosomiche altamente associate alla John's disease e molti geni sono stati indicati come possibili candidati funzionali.

Questo progetto si è proposto di valutare possibili associazioni per la resistenza/suscettibilità alle infezioni da MAP in una popolazione di vacche frisone attraverso l'investigazione di 7 geni: *LAMB1*, *DLD*, *WNT2*, *PRDM1*, *SOCS5*, *PTGER4* e *IL10*. Sono stati scelti, validati e genotipizzati SNP appartenenti a ciascuno dei geni investigati così come sono stati messi a punto protocolli rapidi per la discriminazione allelica per ciascuno SNP.

Questo studio conferma che la suscettibilità della regione (50639460-51397892) del cromosoma 4 alla Johne's disease. Il gene *Wingless-type MMTV integration site family member 2* (*WNT2*) è significativamente associato all'infezione da MAP. L'allele T al locus [rs43390642](#) ha mostrato un potenziale ruolo protettivo contro la paratubercolosi perché responsabile dell'alterazione di un sito di legame per un recettore glucocorticoide, suggerendo che tale fattore di trascrizione può modulare l'espressione di *WNT2*.

Il forte linkage disequilibrium con lo SNP *DLD* [rs134692583](#) e il potenziale effetto protettivo dell'allele T anche a questo locus potrebbe suggerire un meccanismo di azione combinato di questi geni vicini nella resistenza all'infezione da MAP. Tuttavia, saggi funzionali sono necessari per verificare se questi 2 SNP realmente modulano il legame a fattori di trascrizione, regolano l'espressione dei loro geni target e quindi influenzano la suscettibilità all'infezione da MAP.

I risultati di questo progetto contribuiscono alla individuazione della variabilità genetica coinvolta nella suscettibilità alla Johne's disease e chiarifica il ruolo svolto dai loci investigati nell'infezione da MAP. L'identificazione di loci associati alla tolleranza alla Johne's disease è il primo step per sviluppare programmi di selezione assistita da marcatori allo scopo di rendere le popolazioni bovine più resistenti all'infezione da MAP, ridurre la trasmissione tra animali dello stesso allevamento, migliorare lo stato di salute delle mandrie allo scopo di incrementare la produttività delle aziende zootecniche e dell'industria collegata.

Bibliografia

Attalla S.A., Seykora A.J., Cole J.B., Heins B.J. 2010. Genetic parameters of milk ELISA scores. *Journal of Dairy Science* 93: 1729-1735.

Beyersbach, M., Gerlach G.F., Kreienbrock L. 2001. Modelling of prevalence development in a paratuberculosis control program in a dairy herd. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 108: 363-370.

Gonda M.G., Chang Y.M., Shook G.E., Collins M.T., Kirkpatrick B.W. 2006. Genetic variation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in US Holsteins. *Journal of Dairy Science* 89: 1804-1812.

Gonda M.G., Chang Y.M., Shook G.E., Collins M.T., Kirkpatrick B.W. 2007. Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. *Preventive Veterinary Medicine* 80: 103-119.

Hinger M., Brandt H., Erhardt G. 2008. Heritability estimates for antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in German Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* 91: 3237-3244.

Johne H.A. and Frottingam L. 1895. An atypical case of tuberculosis in cattle. *Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und vergleichende Pathologie* 21: 438-454.

Koets A.P., Adugna G., Janss L.L., van Weering H.J., Kalis C.H., Wentink G.H., Rutten V.P., Schukken Y.H. 2000. Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 83: 2702–2708.

Küpper J., Brandt H., Donat K., Erhardt G. 2012. Heritability estimates for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* status of German Holstein cows tested by fecal culture. *Journal of Dairy Science* 95: 2734-2739.

Montgomery G.W., Sise J.A. 1990. Extraction of DNA from sheep white blood cells. *The New Zealand Journal of Agricultural Research* 33: 437-441.

Mortensen, H., Nielsen S.S., Berg P. 2004. Genetic variation and heritability of the antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Danish Holsteins cows. *Journal of Dairy Science* 87: 2108-2113.

Purdie A.C., Plain K.M., Begg D.J., de Silva K., Whittington R.J. 2011. Candidate gene and genome-wide association studies of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep: a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 34: 197–208.

van Hulzen K.J.E., Nielen M., Koets A.P., de Jong G., van Arendonk J.A.M., Heuven H.C.M. 2011. Effect of herd prevalence on heritability estimates of antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Journal of Dairy Science* 94: 992-997.

Wang N., Akey J.M., Zhang K., Chakraborty R., Jin L. 2002. Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation. *The American Journal of Human Genetics* 71: 1227-1234.

Tabella 1 - SNP di riferimento scelti per lo studio di associazione alla suscettibilità a MAP. Sono riportate: localizzazione cromosomica, geni, alleli, cambi aminoacidici, posizione degli SNP sul gene (5' flanking region/esone/introne) e in relazione a BTA UMD 3.1. Sono inoltre riportate le sequenze dei primer, la dimensione degli ampliconi, le endonucleasi impiegate per il genotyping. Gli asterischi indicano i siti polimorfici.

Gene	BTA	SNP	Allele	Cambio Aa	Gene Pos./ UMD3.1	Primer	bp	Genotyping
LAMB 1	4	rs43388824	A>G	-	Esone 8 49318278	5'-GGGAAGTAAACTTTACATAAG-3' 5'-GCACGTACTTACCATTC-3'	345	<i>BsmAI</i>
LAMB 1	4	rs211391398	C>T*	Ser>Asn	Esone 11 49312998	5'-TTGGTTAAAGATAAAATGAAGC-3' 5'-TTTTGTGAAATTTGGAGGG-3'	402	<i>DraI</i>
DLD	4	rs134692583	A>T*	-	5' flank. reg. 50639460	5'-TTACGCTCTTTACGACAGT-3' 5'-TTCTGCCAAGGATTTTCAC-3'	168	<i>SphI</i>
WNT2	4	rs43390642	G>T*	-	5' flank. reg. 51397892	5'-GGGTGGATGAAATGATGGCAA-3' 5'-TCTACCCCGAGCGCTTG-3'	167	<i>HaeIII</i>
PRDM1	9	rs136669229	A>C*	Phe>Val	Esone 2 44375813	5'-CAGAGTCATATCCGCGTC-3' 5'-CGGGACAATGGGGATTAA-3'	103	<i>NlaIV</i>
PRDM1	9	rs136770416	A>C	Val>Gly	Esone 5 44359367	5'-TTGATGAGATTCACCGCCT-3' 5'-CTGAAGGACAAGGCCTG-3'	140	<i>DraIII</i>
SOCS5	11	rs134378401	A>C	Tyr>Asp	Esone 2 29050621	5'-AGAGCGACTTCCTACAGT-3' 5'-AGTTCACTGGATACGGATAAAA-3'	129	<i>RsaI</i>
PTGER4	20	rs41944920	C>G	Leu>Val	Esone 3 33764044	5'-TGATAAGTTCAGCGTTTCAC-3' 5'-AGCCATAGAGAAGATCAAAT-3'	277	<i>HinfI</i>
IL10	16	present work	A>G*	-	Introne 4	5'-CATGACCTTCCCAGCAG-3' 5'-AATAAATATATGTGGGAGCTGAG-3'	353	<i>Alw26I</i>

Tabella 2. Analisi dei siti di fattori di trascrizione nei dintorni degli SNP [rs134692583](#); [rs43390642](#) e IL g.3625A>G condotta tramite il software TFSEARCH.

[rs134692583](#) (8 bp a monte di DLD) 5'-AGGCCGCGCTCGTG[C/A/T]TGCGCAGGGCGGGGA-3'

Fattore di trascrizione	Sequenza consenso*	Posizione relative allo SNP (5'>3')	DNA strand	Binding allele score	
				T	A
USF	<u>NCACGTGN</u>	-5 a +2	3'>5'	78.4	78.4
c-Myc	<u>NANCACGTGNNW</u>	-7 a +4	3'>5'	76.8	-
C/EBPb	<u>NKNTTGCNYAAYNN</u>	-3 a +10	5'>3'	76.0	-
Arnt	<u>NDDNNCACGTGNNNNN</u>	-8 a +5	3'>5'	75.9	-
N-Myc	<u>NNCCACGTGNNN</u>	-10 a +1	5'>3'	76.0	77.0
GATA-1	<u>SNNGATNNNN</u>	-5 a +4	5'>3'	75.5	-

[rs43390642](#) (164 bp a monte di WNT2) 5'-AAACACCTCCGTGTG[G/T]CCTCGAGCACCCGCG-3'

Fattore di trascrizione	Sequenza consenso*	Posizione relative allo SNP (5'>3')	DNA strand	Binding allele score	
				G	T
AML-1a	<u>TGCGGT</u>	-4 a +1	5'>3'	83.7	-
ZID	<u>NGGCTCYATCAYC</u>	-1 a +11	5'>3'	78.9	-
GR	<u>NNNNNNCNNNTNTGTNCTNN</u>	-13 a +5	5'>3'	-	78.2
c-Ets-1	<u>NCMGGAWGYN</u>	-9 a +2	3'>5'	75.1	75.1

g.3625A>G (14 bp a monte dell'esone 5 di IL10) 5'-CACTGAACACGTCTT[A/G]TCTCCCCACACAGCT

Fattore di trascrizione	Sequenza consenso*	Posizione relative allo SNP (5'>3')	DNA strand	Binding allele score	
				A	G
GATA-X	<u>NGATAAGNMNN</u>	-4 a +6	3'>5'	93.1	-
GATA-1	<u>NNCWGATARNNNN</u>	-3 a +9	3'>5'	90.3	-
SREBP	<u>KATCACCCAC</u>	-1 a +9	5'>3'	90.1	85.9
GATA-3	<u>NNGATARNG</u>	-5 a +3	3'>5'	89.1	-

*I nucleotidi che nella sequenza genomica concordano con la sequenza consenso sono sottolineati mentre il sito polimorfico è in grassetto. Le regioni esoniche sono sottolineate in doppio. La soglia dello binding score per ciascun allele è stato settato a ≥ 75.0 . Codice nucleotidico: K = G o T; M = A o C; S = C o G; W = A o T; Y = C o T; R = A o G; D = A, G o T; N = A, G, C o T.

Tabella 3 – Dati di genotipizzazione, frequenze alleliche e equilibrio di Hardy-Weinberg ($p \leq 0.05$) per ciascuno SNP scelto come marker molecolare nello studio di associazione con la suscettibilità a MAP. Il test del chi-quadro ha un grado di libertà.

Locus	SNP	Genotipi osservati					Frequenza Allelica		
		MAP	CC	CT	TT	tot	C	T	χ^2
LAMB1	rs211391398	+	124	37	3	164	0.87	0.13	0.015
		-	107	29	2	138	0.88	0.12	0.000
		tot	231	66	5	302	0.87	0.13	0.013
DLD	rs134692583	MAP	AA	AT	TT	tot	A	T	χ^2
		+	140	24	2	166	0.92	0.08	0.678
		-	100	30	3	133	0.86	0.14	0.174
		tot	240	54	5	299	0.89	0.11	0.908
WNT2	rs43390642	MAP	GG	GT	TT	tot	G	T	χ^2
		+	166	13	1	180	0.96	0.04	1.646
		-	121	23	0	144	0.92	0.08	1.084
		tot	287	36	1	324	0.94	0.06	0.013
PRDM1	rs136669229	MAP	AA	AC	CC	tot	A	C	χ^2
		+	1	19	76	96	0.11	0.89	0.024
		-	1	23	72	96	0.13	0.87	0.319
		tot	2	42	148	192	0.12	0.88	0.267
IL10	g.3625A>G	MAP	AA	AG	GG	tot	A	G	χ^2
		+	0	17	79	96	0.09	0.91	0.892
		-	1	9	87	97	0.06	0.94	1.706
		tot	1	26	166	193	0.07	0.93	0.000

Tabella 4 – Frequenze osservate per i test fecale ed ELISA per ciascuno SNP investigato. Le differenze tra le frequenze alleliche dei differenti polimorfismi sono state stimate con il test del chi-quadro e il Fisher's exact test usando tre differenti fenotipi: (1) fecale positivo/negativo, (2) ELISA positivo/negativo, e (3) fecale o ELISA positivo/negativo. Gli odds ratios (OR) al 95% di intervallo di confidenza (CI) sono stati calcolati per gli alleli con minor frequenza (MAF) in accordo allo stesso schema. Gli asterischi indicano valori significativi ($p \leq 0.05$).

Test	LAMB1 rs211391398					χ^2	P	P Fisher	OR [95% CI] MAF
		CC	CT	TT	tot				
Fecale	+	116	29	3	148	1.055 ⁽¹⁾ 1.327 ⁽²⁾ 0.183 ⁽³⁾	0.590 ⁽¹⁾ 0.515 ⁽²⁾ 0.912 ⁽³⁾	0.642 ⁽¹⁾ 0.510 ⁽²⁾ 0.912 ⁽³⁾	0.87 [0.53-1.41] ⁽¹⁾ 1.33 [0.81-2.19] ⁽²⁾ 1.11 [0.68-1.80] ⁽³⁾
	-	115	37	2	154				
	Tot	231	66	5	302				
ELISA	+	71	25	2	98				
	-	160	41	3	204				
	Tot	231	66	5	302				
DLD rs134692583									
		AA	AT	TT	tot				
Fecale	+	126	22	2	150	2.648 ⁽¹⁾ 3.710 ⁽²⁾ 3.939 ⁽³⁾	0.266 ⁽¹⁾ 0.156 ⁽²⁾ 0.139 ⁽³⁾	0.235 ⁽¹⁾ 0.173 ⁽²⁾ 0.135 ⁽³⁾	0.64 [0.38-1.09] ⁽¹⁾ 0.57 [0.31-1.05] ⁽²⁾ 0.58 [0.34-0.99] ^{(3)*}
	-	114	32	3	149				
	Tot	240	54	5	299				
ELISA	+	85	15	0	100				
	-	155	39	5	199				
	Tot	240	54	5	299				
WNT2 rs43390642									
		GG	GT	TT	tot				
Fecale	+	149	12	1	162	4.418 ⁽¹⁾ 3.851 ⁽²⁾ 6.112 ⁽³⁾	0.035 ^{(1)*} 0.049 ^{(2)*} 0.013 ^{(3)*}	0.050 ^{(1)*} 0.050 ^{(2)*} 0.019 ^{(3)*}	0.56 [0.28-1.11] ⁽¹⁾ 0.42 [0.18-0.97] ^{(2)*} 0.50 [0.25-0.97] ^{(3)*}
	-	138	24	0	96				
	Tot	287	36	1	324				
ELISA	+	103	7	1	111				
	-	184	29	0	213				
	Tot	287	36	1	324				
PRDM1 rs136669229									
		AA	AC	CC	tot				
Fecale	+	1	19	76	96	0.489 ⁽¹⁾ 1.174 ⁽²⁾ 0.489 ⁽³⁾	0.783 ⁽¹⁾ 0.555 ⁽²⁾ 0.783 ⁽³⁾	0.799 ⁽¹⁾ 0.379 ⁽²⁾ 0.799 ⁽³⁾	0.82 [0.44-1.52] ⁽¹⁾ 1.40 [0.74-2.65] ⁽²⁾ 0.82 [0.44-1.52] ⁽³⁾
	-	1	23	72	96				
	Tot	2	42	148	192				
ELISA	+	1	16	45	62				
	-	1	26	103	130				
	Tot	2	42	148	192				
IL10 g.3625A>G									
		AA	AG	GG	tot				
Fecale	+	0	17	79	96	2.847 ⁽¹⁾ 2.643 ⁽²⁾ 2.847 ⁽³⁾	0.091 ⁽¹⁾ 0.104 ⁽²⁾ 0.091 ⁽³⁾	0.138 ⁽¹⁾ 0.117 ⁽²⁾ 0.138 ⁽³⁾	1.97 [0.85-4.54] ⁽¹⁾ 1.88 [0.84-4.20] ⁽²⁾ 1.97 [0.85-4.54] ⁽³⁾
	-	1	9	87	97				
	Tot	1	26	166	193				
ELISA	+	0	12	50	62				
	-	1	14	116	131				
	Tot	1	26	166	193				