

LA COMPONENTE GENETICA DELLE TENDINOPATIE E DELLE LESIONI DELL'ACHILLEO

Bisciotti Gian Nicola

Physiologist Lead c/o Qatar Orthopedic and Sport Medicine Hospital, Doha (Q).

Kinemove Rehabilitation Centers Pontremoli, Parma, La Spezia (I).

Abstract

I tendini ed i legamenti sono tra le strutture anatomiche maggiormente interessate dagli eventi traumatici nel corso dell'attività fisica e sportiva, la cui eziologia è riconducibile a numerosi fattori sia di ordine intrinseco che estrinseco. Alcuni recenti studi hanno formulato l'ipotesi di una componente genetica, perlomeno parziale, per ciò che riguarda l'eziologia dei danni a livello del tendine achilleo, dei tendini della cuffia dei rotatori e del legamento crociato anteriore.

In particolare, le varianti della sequenza del gene della tenascina C (TNC) si sono rivelate associate sia alle tendinopatie dell'achilleo che alle sue rotture, mentre una variante del gene $V\alpha 1$ (COL5A1) si è mostrata associata alle tendinopatie del tendine di Achille. Entrambi questi geni codificano per alcune importanti strutture tendinee e legamentose. In particolare, il COL5A1 codifica per un componente del collagene di tipo V che ricopre un importante ruolo nella regolazione nell'assemblaggio delle fibre di collagene e nella determinazione del loro diametro, mentre il gene della TNC codifica per quest'ultima la quale, a sua volta, regola la risposta del tessuto tendineo nei confronti delle sollecitazioni rappresentate dal carico meccanico. Oltre che ai geni TNC e COL5A1, le patologie a carico dell'achilleo possono essere associate a geni che codificano proteine che possiedono un ruolo di regolatrici nel mantenimento dell'omeostasi della membrana extra cellulare come le metallo proteinasi della matrice (MMPs). Ad oggi si conoscono solamente le varianti di due geni i quali si sono rivelati associati alle tendinopatie dell'achilleo. Invece, non sono ancora stati attualmente identificati dei geni responsabili delle lesioni della cuffia dei rotatori e del legamento crociato anteriore, anche se alcuni lavori ne suggerirebbero comunque un'eziologia genetica, seppur parziale. In futuro, l'identificazione di genotipi specifici associati ad un aumento del rischio lesionale a livello tendineo e legamentoso potrà probabilmente prevenire questo tipo di infortuni attraverso l'identificazione precoce degli individui geneticamente a rischio. Lo scopo di quest'articolo è di riassumere le attuali conoscenze riguardanti il rischio genetico di tendinopatia e rottura del tendine achilleo.

Parole chiave: tendine d'Achille, collagene, genetica, tendinopatia, TNC, COL5A1, MMP3.

Introduzione

Il tendine di Achille è una delle localizzazioni anatomiche nella quale vi è maggior riscontro lesionale nel corso di attività sportive o ricreative (Harvie e coll., 2004; Woo e coll., 2006; Rees e coll, 2006), Le lesioni a carico delle strutture tendinee rappresentano ben il 30-50% di tutti gli eventi lesivi riscontrabili nell'ambito sportivo (Jarvinen e coll., 2005); di questi una percentuale compresa tra il 6

ed 18 % è rappresentata dalle lesioni a livello del tendine Achilleo (Mazzone e McCue, 2002). Le lesioni di maggior riscontro a carico dell'achilleo rilevabili in ambito sportivo sono rappresentate dalle rotture parziali o totali e dalle tendinopatie, delle quali le prime possono essere classificate come lesioni acute e le seconde come lesioni da *overuse*. Il termine di tendinopatia è ormai universalmente preferito agli ormai desueti termini di "tendinite" e "tendinosi", in quanto con suddetta nomenclatura si sottintende una situazione anatomica che interessa le strutture tendinee e paratendinee in cui coesistono differenti quadri patologici (Almekinders, 1998; Schepsis e coll., 2002).

I rischi genetici associati alle lesioni del tendine d'Achille

L'esatta eziologia delle lesioni dell'achilleo rimane, a tutt'oggi, non perfettamente definita (Kannus e coll., 2004; Riley, 2004; Jarvinen e coll., 2005; Rees e coll., 2006), anche se ormai da tempo alcuni Autori avevano già avanzato l'ipotesi dell'esistenza di una predisposizione genetica sia per ciò che riguarda le rotture che le tendinopatie del tendine di Achille (Kannus e coll., 1997). A questo proposito, è interessante notare che altri studi più recenti ipotizzano una componente di tipo genetico anche nelle tendinopatie e nelle rotture della cuffia dei rotatori e nelle lesioni del legamento crociato anteriore (Harvie e coll., 2004; Flynn e coll., 2005). Questo ci porterebbe a formulare l'ipotesi della probabile esistenza di un ampio spettro di disordini funzionali a carico del tessuto connettivo attribuibili ad una componente genetica (September e coll., 2007). Ad un'estremità di questo ipotetico spettro troviamo i classici disturbi mendeliani¹, nei quali i fattori genetici sono i principali responsabili nell'ambito dell'insorgenza, della gravità e della prognosi della patologia. Degli esempi classici di patologie di tipo mendeliano a carico del tessuto connettivo sono l'osteogenesi imperfetta² (Prokop e coll., 1985), la sindrome di Ehlers-Danlos³ (De Paepe e coll., 1997) e la sindrome di Marfan⁴ (Judge e Dietz, 2005). All'altra estremità dello spettro, ritroviamo alcune condizioni complesse di tipo multifattoriale nelle quali l'insorgenza della patologia è determinata dalla complessa interazione della codificazione di più geni, nonché dalla loro interazione con l'ambiente esterno. Tali situazioni, invero assai complesse, sono da ricondursi ad interazioni di tipo "gene-gene" e "gene-ambiente"⁵.

¹ *Malattie mendeliane o monofattoriali, dovute alla mutazione di un singolo gene. Queste malattie si trasmettono secondo modalità relativamente semplici (mendeliane): autosomiche a carattere dominante, recessivo o codominante; legate al cromosoma X.*

² *L'osteogenesi imperfetta è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante per anomalie nella sintesi del collagene di tipo I° per mutazione dei geni COL1A1 e 2. Crea problemi a carico dello scheletro, delle articolazioni, degli occhi, delle orecchie, della cute e dei denti. I fenotipi più gravi o letali sono la conseguenza di difetti genetici, che determinano molecole anomale di collagene che non riescono a formare la tripla elica.*

³ *La sindrome di Ehlers-Danlos comprende una serie di patologie ereditarie contraddistinte da lassità dei legamenti e iperelasticità della cute. Tale sindrome colpisce prevalentemente il tessuto connettivo con la presenza di un collagene mutato.*

⁴ *La sindrome di Marfan è una patologia autosomica dominante (MIM/OMIM 154700) che colpisce il tessuto connettivo. Dal momento che tutti gli organi contengono tessuto connettivo, le manifestazioni della sindrome di Marfan interessano molti distretti corporei, ed in particolar modo il sistema scheletrico, gli occhi, il cuore e i vasi sanguigni, i polmoni e le membrane fibrose che ricoprono il cervello e la colonna vertebrale. Il termine deriva dal nome del pediatra francese Antoine Marfan.*

⁵ *Le malattie genetiche si possono classificare in tre categorie: a. malattie cromosomiche, causate dalla perdita, da un eccesso o da un'anomalia di uno o più cromosomi, da cui deriva la mancanza o la duplicazione di una parte rilevante di genoma, contenente di solito molti geni;*

L'identificazione della componente genetica che è alla base dei disturbi mendeliani è solitamente effettuata attraverso l'analisi di linkage⁶ od il sequenziamento diretto del gene considerato. Tuttavia, occorre considerare il fatto che l'identificazione dei geni che possono predisporre un individuo (appartenente ad un'intera popolazione e non ad un semplice gruppo familiare) allo sviluppo di una determinata o di determinate condizioni patologiche presenta molte più difficoltà. Questo tipo di ricerca è infatti ulteriormente complicato sia dal fatto che esista la probabilità che siano coinvolti un certo numero di geni – ognuno dei quali dimostra una propria, seppur limitata, influenza – sia dall'interazione gene-ambiente. Un esempio in questo senso è rappresentato dalla discopatia lombare, una condizione patologica muscolo scheletrica di eziologia multifattoriale, per la quale sono stati identificati sia fattori genetici che non-genetici, senza dimenticare l'importante ruolo svolto nell'insorgenza della patologia dall'interazione reciproca tra questi ultimi (Ala-Kokko, 2002; Solovieva e coll., 2002; Noponen-Hietala e coll., 2003; Solovieva e coll., 2004). L'identificazione di numerosi fattori di rischio di tipo intrinseco ed estrinseco associati alle lesioni ed alle tendinopatie dell'achilleo (Bisciotti e coll., 2011), ci fa capire come l'eziologia di questo tipo di condizioni patologiche sia complessa, oltre a sottolineare il fatto che l'eziologia stessa è, con forte probabilità, influenzata da interazioni di tipo gene-gene e gene-ambiente. Nel corso degli ultimi due decenni, si sono susseguiti numerosi lavori incentrati sulla ricerca di una possibile interazione tra i diversi gruppi sanguigni e le lesioni tendinee e legamentose (Jozsa e coll., 1989; Kujala e coll., 1992; Kannus e coll., 1997; Maffulli e coll., 2000; Aroen e coll., 2004). I risultati di tali studi non appaiono tuttavia omogenei: alcuni Autori infatti sono concordi nell'attribuire all'appartenenza a determinati gruppi sanguigni (in particolare il gruppo 0) un'influenza sulle rotture parziali o totali e sulle recidive di rottura del tendine achilleo (Jozsa e coll., 1989; Aroen e coll., 2004), mentre altri, al contrario, non confermano tale correlazione (Mahrlein e coll., 1995; Leppilahti e coll., 1996; Maffulli e coll., 2000; Mokone, 2006). Anche il nostro gruppo di lavoro ha recentemente pubblicato (Bisciotti e coll., 2012) una ricerca in tal senso, i cui risultati confermerebbero l'influenza del gruppo sanguigno di appartenenza nell'eziologia delle tendinopatie e delle rotture totali e parziali dell'achilleo. Nello specifico, il gruppo 0 predisporrebbe il soggetto all'insorgenza di tendinopatie in grado di causare rotture parziali o totali del tendine d'Achille, a causa dell'abnorme produzione di collagene di tipo III, che si rivelerebbe molto meno adatto, rispetto al collagene di tipo I, ad assorbire carichi tensivi di elevata entità. Il gene che codifica per le proteine correlate ai gruppi sanguigni del sistema ABO (ABO gene) si trova alla fine telomerica del braccio lungo del cromosoma umano 9 (9q34) (Bennett e coll., 1995). Numerosi studi hanno confermato l'associazione tra i diversi gruppi sanguigni del sistema ABO, un marker biochimico per le varianti dell'ABO gene e le tendinopatie dell'achilleo, giustificando in tal modo la presenza di geni, nella particolare regione telomerica del cromosoma 9 poc'anzi menzionata, associabili alle lesioni del tendine di Achille (Prockop e coll., 1985; Kannus e coll., 1997; Bennet e coll., 1995).

Occorre anche ricordare che la mancanza di relazione, evidenziata da alcuni Autori, tra gruppi sanguigni e tendinopatie dell'achilleo non può fare escludere a priori l'esistenza di una variante

b. malattie mendeliane o monofattoriali, dovute alla mutazione di un singolo gene. Queste malattie si trasmettono secondo modalità relativamente semplici (mendeliane): autosomiche a carattere dominante, recessivo o codominante; legate al cromosoma X. (vedi nota 1 a piè di pagina);

c. malattie geneticamente complesse, dipendenti dall'interazione di più geni e di più fattori ambientali.

⁶ L'analisi di linkage parte dal presupposto che i marcatori (sequenze di DNA che si presentano in maniera polimorfica, cioè distinguibile tra individui diversi) vicini tra loro su di uno stesso cromosoma non segregano in maniera indipendente durante la meiosi ma tendono a essere ereditati insieme dalla progenie, in conseguenza della ridotta possibilità di cross-over (ricombinazione).

causale sia a livello del locus⁷ ABO che nelle sue immediate vicinanze, ossia nel gene o nei geni adiacenti (September e coll., 2007). Nell'ambito dell'ipotesi genetica del danno strutturale a carico dell'achilleo, i candidati "ideali" sono rappresentati dai geni che codificano per le proteine strutturali che includono alcuni tipi di collagene, proteoglicani e glicoproteine (September e coll., 2006). Questa ipotesi è ulteriormente confermata dal fatto che alcuni studi effettivamente riportano di una up- o downregulation di alcuni di questi geni nell'ambito delle patologie a carico dell'achilleo (Ireland e coll., 2001; Alfredson e coll., 2003).

Due di questi geni, e precisamente la tenascina C (TNC) ed il COL5A1 (assieme al COL27A1), sono stati localizzati nella stessa regione cromosomiale dove si trova dislocato l'ABO gene, ossia alla fine telomerica del braccio lungo del cromosoma 9 (figura n°1). In quest'ambito, occorre ricordare che alcuni studi hanno identificato dei polimorfismi⁸ all'interno dei geni TNC e COL5A1 associabili alle lesioni del tendine di Achille registrate nell'ambito di una popolazione di origine Caucasica fisicamente attiva (Mokone e coll., 2005; Mokone e coll., 2006). Tuttavia, non furono ritrovate associazioni tra i gruppi sanguigni di appartenenza e le lesioni dell'Achilleo (Mokone, 2006). Occorre comunque notare che la funzione della maggior parte di questi polimorfismi non è attualmente nota: per questo motivo, è molto comune nell'ambito della genetica ritrovare studi che correlino una patologia specifica a polimorfismi la cui funzione non è ben chiara o addirittura a polimorfismi ritenuti come non-funzionali (Feuk e coll., 2006). Entrambi i lavori precedentemente citati di Mokone e coll. (Mokone e coll., 2005; Mokone e coll., 2006) hanno seguito un metodo di studio basato sull'approccio all'associazione genetica, che rappresenta uno dei metodi d'indagine più comunemente utilizzati nell'identificazione di regioni del genoma umano che contengono geni che possono essere ritenuti come predisponenti per specifiche patologie. Oltre alla TNC ed al COL5A, le patologie a carico del tendine di Achille possono essere associate a geni che codificano proteine regolatrici nel mantenimento dell'omeostasi della ECM come le metallo proteinasi di matrice ed in particolare, come vedremo in seguito, la metallo proteinasi di matrice 3.

⁷ *In biologia ed in computazione evolutiva, il termine locus genico (o più semplicemente locus, plurale loci) designa la posizione di un gene o di un'altra sequenza significativa all'interno di un cromosoma. Un locus può essere occupato da uno qualsiasi degli alleli del gene.*

⁸ *Il termine polimorfismo (dal greco, letteralmente, "l'aver molte forme") assume significati specifici in diversi contesti. In ambito biologico il polimorfismo è il meccanismo di differenziazione di alcuni geni del DNA.*

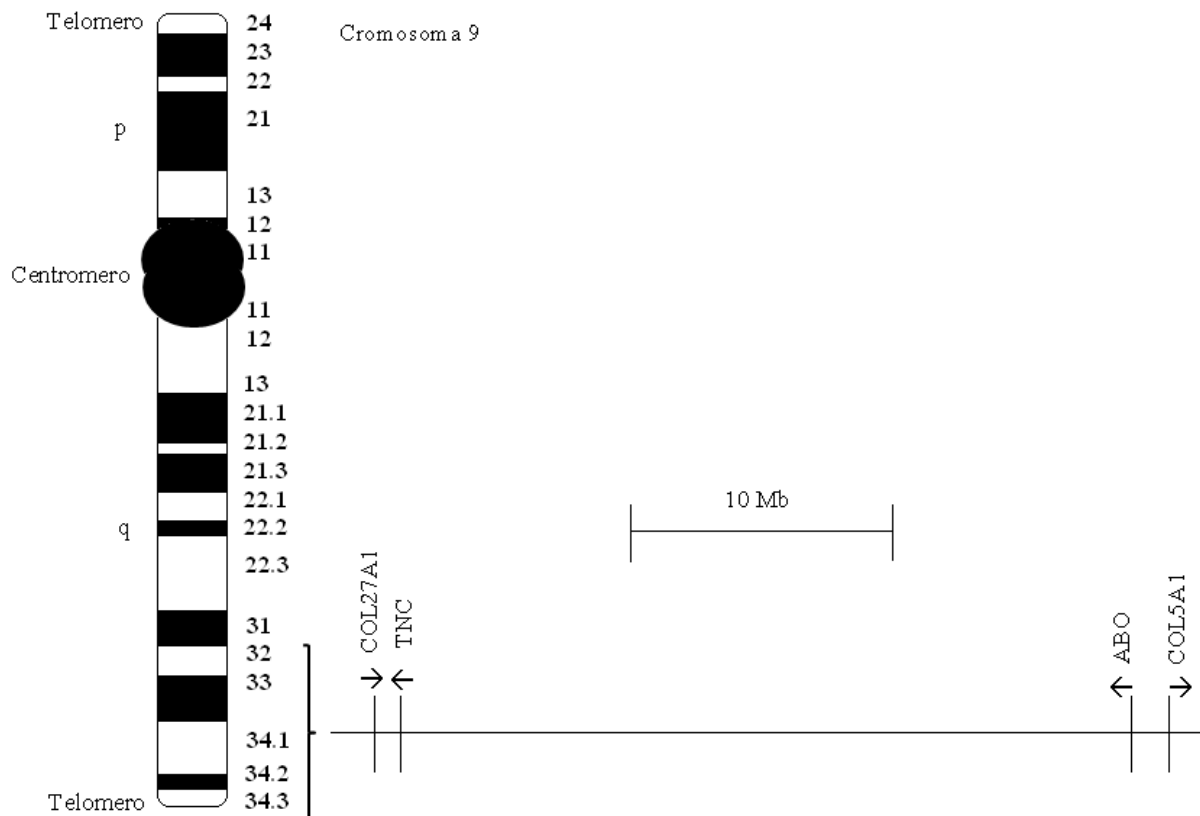


Figura 1: rappresentazione schematica del cromosoma umano 9. Il centromero è composto da DNA altamente ripetuto che non codifica per nessun gene ed è fortemente eterocromatico. La funzione di questa regione nei processi di segregazione cromosomica è prettamente strutturale, in quanto vi si assembla una struttura proteica chiamata cinetocore. Il cinetocore interagisce con i microtubuli del fuso mitotico e permette la segregazione dei cromatidi fratelli nelle due cellule figlie durante il processo di anafase I e II della meiosi, o durante l'anafase mitotica: se ciò non accadesse si avrebbero dei seri danni alle future cellule. Il telomero è la regione terminale del cromosoma, composta di DNA altamente ripetuto, che non codifica per alcun prodotto proteico. Ha un ruolo determinante nell'evitare la perdita di informazioni durante la duplicazione dei cromosomi. Il cromosoma è composto da un braccio corto (p) ed un braccio lungo (q). Le aree chiare e quelle scure riflettono il modello unico di classificazione mediante tecnica citogenetica del cromosoma 9. La nomenclatura di ogni banda è indicata sul lato destro del cromosoma. Nello schema viene rappresentato anche un segmento corrispondente alla fine telomerica del braccio lungo del cromosoma 9 (9q32–q34), che comprende i geni 155 kb COL27A1, 20 kb tenascin C (TNC), 20 kb ABO and 201 kb COL5A1. Le linee verticali rappresentano la posizione relativa di ogni gene, mentre le frecce indicano la direzione della loro trascrizione. Il gene COL27A1 codifica per il collagene di tipo XXVII, il gene TNC per la TNC, il gene ABO per l'ABO trasferasi ed il gene COL5A1 codifica per la catena pro $\alpha 1$ (V) del collagene di tipo V. Mb: megabase.

(Da September e coll., 2007, modificato)

I principi di base dell'associazione genetica

Il genoma umano dei diversi individui è altamente omologo con una differenza a carico dei nucleotidi all'interno delle sequenze del DNA pari a circa solamente lo 0.1%. Queste differenze o polimorfismi ritrovabili nell'intero genoma umano sono in grado di produrre varianti od alleli⁹ del gene stesso. In determinati casi, tali alleli sono in grado d'influenzare l'espressione del gene e/o la funzione del suo prodotto proteico. I differenti individui possono essere genotipizzati in base a questi polimorfismi, rendendo quindi possibile determinare l'associazione di specifiche varianti con altrettanti particolari tratti. I due principali tipi di polimorfismo sono rappresentati dai microsatelliti (Ms) e dai polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs)¹⁰. I Ms sono loci contenenti brevi tratti di sequenze di DNA che si ripetono in una serie di tandem. E' possibile operare una distinzione tra le diverse basi di un particolare SNP utilizzando una serie di metodi, uno dei quali è il metodo endonucleasi di restrizione (*restriction endonuclease method*). Una endonucleasi di restrizione è un enzima che è in grado di tagliare il DNA in una sequenza specifica, generando frammenti di DNA di dimensioni note. Spesso i diversi individui possono essere genotipizzati in base ad un certo numero di SNPs sino a formare un aplotipo. Un aplotipo è costituito da un numero di marcatori strettamente legati tra loro, presenti su un singolo cromosoma e che tendono ad essere ereditati insieme. L'analisi di un aplotipo è molto spesso maggiormente informativa rispetto all'analisi di un singolo polimorfismo nell'ambito dell'identificazione di malattie influenzabili da specifiche regioni genomiche. Anche altri di tipi di variazioni, incluse le cosiddette "varianti del numero di copie" (CNV) sono state associate con determinate patologie e specifici tratti fenotipici¹¹ (Feuk e coll., 2006). I CNV si riferiscono a duplicazioni o delezioni di diversi kilobase di alcuni tratti di DNA genomico e taluni studi hanno dimostrato come la variazione nel numero di copie di determinate CNV sia correlata ai cambiamenti nei livelli di espressione genica di determinati geni (Aldred e coll., 2005; Linzmeier e Ganz, 2006, Freeman e coll., 2006). Il primo studio che indagò un polimorfismo della ripetizione del dinucleotide guanina-timina (GT) all'interno del TNC (quindi un MS), associabile a patologie a carico dell'Achilleo risale al 2005 (Mokone e coll., 2005). In questo studio, di tipo "case-control"¹², gli Autori considerarono una popolazione di 114 soggetti Caucasic

⁹ In genetica si definisce allele o fattore allelico (dal greco ἀλλήλος, allelos, l'un l'altro) ogni variante di sequenza di un gene. Il genotipo di un individuo relativamente ad un gene è il corredo di alleli che egli si trova a possedere. In un organismo diploide, in cui sono presenti due copie di ogni cromosoma, il genotipo è dunque costituito da due alleli. Due cromosomi omologhi possiedono gli stessi geni, ma diverse forme alleliche. Ad esempio, ognuno dei due possiede il gene che controlla il colore del bocciolo, ma non necessariamente gli alleli determineranno lo stesso colore. Un esempio è il gene che regola il colore del bocciolo di molte specie di fiori: in questo caso un solo gene controlla il colore, ma possono esistere diversi alleli di quel gene, risultando dunque in diverse colorazioni finali. Questa capacità degli alleli di controllare un carattere fenotipico è detta allelomorfismo.

¹⁰ Un polimorfismo a singolo nucleotide è un polimorfismo, cioè una variazione, del materiale genico a carico di un unico nucleotide, tale per cui l'allele polimorfico risulta presente nella popolazione in una proporzione superiore all'1%. Al di sotto di tale soglia si è soliti parlare di mutazione.

¹¹ Con il termine fenotipo si intende l'insieme di tutte le caratteristiche osservabili di un organismo, quindi la sua morfologia, il suo sviluppo, le sue proprietà biochimiche e fisiologiche ed anche il suo comportamento. Questo termine viene utilizzato in opposizione al termine genotipo. In realtà il fenotipo è la manifestazione del genotipo ed è il risultato dell'interazione tra espressione genica e fattori ambientali.

¹² Un case-control è uno studio analitico che mette a confronto gli individui portatori, ad esempio, di una specifica patologia ("casi") con un gruppo di individui che non presentano la suddetta patologia ("controlli").

fisicamente attivi, dei quali 72 si rivelarono positivi per una diagnosi di tendinopatia cronica dell'achilleo e 42 subirono invece una rottura spontanea dello stesso tendine; la popolazione di controllo era costituita da 127 soggetti di origine Caucasica fisicamente attivi ed asintomatici per patologie a carico dell'achilleo. Nello studio fu determinato, per ogni soggetto considerato, il numero di ripetizioni del dinucleotide GT all'interno di ogni TNC. I risultati indicarono una differenza statisticamente significativa ($p < 0.001$) tra la frequenza degli alleli di questo polimorfismo (ogni allele presenta un diverso numero di ripetizioni di GT) tra il gruppo dei soggetti affetti da patologia dell'achilleo ed il gruppo di controllo costituito da soggetti sani. Nello specifico, gli alleli contenenti da 12 a 14 ripetizioni di GT erano sovra-rappresentati nel gruppo dei soggetti che presentavano tendinopatia o rottura dell'achilleo, mentre la frequenza degli alleli contenenti da 13 a 17 ripetizioni di GT era sotto-rappresentata. Inoltre, gli Autori formularono l'ipotesi che i soggetti che erano omozigoti¹³ od eterozigoti¹⁴ per gli alleli sotto-rappresentati (i.e. per 13 e 17 ripetizioni di GT), potessero presentare un minor rischio di sviluppo di patologia a carico del tendine di Achille. Un'ulteriore interessante osservazione era rappresentata dal fatto che non vi fosse differenza nella frequenza delle ripetizioni del polimorfismo di GT dinucleotide tra il gruppo dei soggetti che presentavano tendinopatia e quello a cui appartenevano gli individui che invece avevano subito una rottura del tendine stesso. Sempre Mokone e coll. (Mokone e coll., 2006) in un successivo studio, ancora basato su di un "case-control" di associazione genetica, hanno preso in considerazione due SNPs all'interno del gene COL5A1. Nel caso di studi sul SNPs, gli alleli vengono discriminati in funzione della particolare base nella specifica posizione del singolo nucleotide. In questo secondo studio, gli Autori genotipizzarono per il COL5A1 BstUI RFLP ed il COL5A1 DpnII RFLPs 111 soggetti di origine Caucasica fisicamente attivi dei quali 72 presentavano una tendinopatia cronica dell'achilleo e 39 avevano subito una rottura spontanea di quest'ultimo. Il gruppo di controllo era costituito da 129 soggetti fisicamente attivi ed asintomatici, sempre di origine Caucasica. I risultati dello studio evidenziarono come solamente il BstUI RFLP fosse associato con la tendinopatia cronica dell'achilleo, ma non alla sua rottura. Questo risultato in effetti non sarebbe in linea con quanto ritrovato dagli stessi Autori nel loro precedente studio sul TNC, dove non furono riscontrate differenze tra i due tipi di patologie nei confronti della frequenza delle ripetizioni del polimorfismo di GT dinucleotide: questa apparente contraddizione però potrebbe essere spiegata dal fatto che a causa dei modelli di eredità (*linkage disequilibrium*)¹⁵ è abbastanza comune che solo un sottoinsieme, e non tutti i polimorfismi all'interno di un *locus*¹⁶, possa essere associato ad un determinato tratto (September e coll., 2007).

¹³ L'omozigosi, in contrapposizione all'eterozigosi, è la condizione in cui ognuno dei due o più alleli dello stesso gene, presenti in ciascun cromosoma omologo, codifica in maniera identica.

¹⁴ In genetica, si definisce eterozigosi, in contrapposizione all'omozigosi, la condizione genetica di una cellula o di un organismo costituita dalla presenza di una coppia di alleli diversi per un dato gene; gli alleli occupano gli stessi loci sui cromosomi omologhi corrispondenti.

¹⁵ Il cosiddetto *linkage disequilibrium* è un importante strumento per individuare regioni cromosomiche di limitata ampiezza in cui si collocano i geni per una data malattia (mappaggio ad alta risoluzione) e si avvale dell'analisi molecolare di varianti alleliche (per lo più di SNPs o STRs) che costituiscono aplotipi in pazienti tra loro apparentemente non imparentati. Infatti, è prevedibile che pazienti che hanno ereditato lo stesso segmento cromosomico, definito dal medesimo aplotipo, abbiano ereditato anche la stessa mutazione in esso contenuto. Risale agli anni '80, il primo gene mappato con questo approccio: quello della fibrosi cistica in 7q31.2.

¹⁶ Il locus genico rappresenta la posizione di un determinato gene sul cromosoma. Ciascun cromosoma si divide in due bracci: braccio p e braccio q, e su ciascun braccio sono identificate specifiche posizioni.... ad esempio se il locus gene "colori occhi" si trova in posizione "chr1 p 12-18" significa che il gene per il colore degli occhi si trova nello spazio compreso tra la posizione 12 e la 18 sul braccio p del cromosoma 1.

Il gene COL5A1

Il gene COL5A1 codifica per la catena pro- $\alpha 1$ (V) che si ritrova in molte delle isoforme del collagene di tipo V. Questo gene è stato mappato nello stesso *locus* del gene ABO nel cromosoma 9q34 ed è stato identificato quale ideale candidato per la predisposizione alle patologie dell'achilleo (Caridi e coll., 1992). Anche le catene pro $\alpha 2$ (V) e pro $\alpha 3$ (V) sono state ritrovate in alcuni dei collagene di tipo V, ma né uno né l'altro dei geni che codificano per queste ultime sono stati mappati nel cromosoma 9, e per questo motivo questi ultimi non sono ascrivibili tra i geni responsabili dell'insorgenza di tendinopatie dell'achilleo (Myllyharju e Kivirikko, 2001). Al contrario, molte mutazioni all'interno dei geni COL5A1 e COL5A2 sono responsabili di severi disordini connettivali come ad esempio la sindrome di Ehlers-Danlos (Myllyharju e Kivirikko, 2001; Riley, 2004). Il gene COL5A1 contiene all'interno della sua 3'-untranslated region (UTR) una restrizione del frammento di lunghezza dei polimorfismi (RFLPs) *Bst*U1 e *Dpn*II (Greenspan e Pasquinelli, 1994). L'influenza di questi polimorfismi sull'espressione del gene COL5A1 può determinare l'insorgenza di patologie dell'achilleo (Mokone e coll., 2006). Come già detto, il gene del COL5A1 è stato mappato nello stesso *locus* del gene ABO nel cromosoma 9q34 (Caridi e coll., 1992) che, come noto, determina la struttura delle glicoproteine antigene ma che potrebbe anche, secondo alcuni studi (Jozsa e coll., 1989; Bennett e coll., 1995), entrare in gioco nella determinazione della composizione tissutale del tendine. Per alcuni Autori, quindi, è più probabile che il gene che si presenta come il miglior candidato nell'insorgenza delle patologie achillee sia il COL5A1, vista la sua attività di codifica delle proteine che compongono la struttura del tendine stesso, piuttosto che il gene ABO (Makone e coll., 2006). La più importante isoforma del collagene di tipo V è un eterotrimerico formato da 2 catene pro- $\alpha 1$ (V), codificate dal COL5A1, ed una catena di pro- $\alpha 2$ (V). Una certa quantità di collagene di tipo V si trova all'interno delle strutture tendinee dove, insieme al collagene di tipo I che rappresenta il collagene maggiormente rappresentato a livello tendineo, forma delle fibre eterotopiche¹⁷ (Silver e coll., 2003). Numerosi studi riportano come il tessuto tendineo degenerato mostri un incremento nella produzione di collagene di tipo III e V, che perturba la normale architettura tendinea rendendo il tendine stesso meno resistente nei confronti dello stress meccanico (Waterston, 1997; Waterston et al., 1997; Gonclaves-Neto e coll., 2002).

Il gene TNC

Il gene TNC codifica per la tenascina C che è una glicoproteina che si ritrova abbondantemente in alcuni tessuti, come appunto i tendini, che sono sottoposti ad alti stress tensili o compressivi (Jarvinen e coll., 2000). L'espressione del gene TNC è regolata attraverso un meccanismo di tipo "dose-dipendente" da parte del carico meccanico estrinsecato a livello tendineo (Jarvinen e coll., 1999; Jarvinen e coll., 2003). La tenascina C è una proteina capace di legarsi a diversi recettori cellulari come le integrine e ad altri componenti della matrice extracellulare (ECM) ed è quindi implicata nei meccanismi di regolazione dell'interazione cellula-matrice (Jones e Jones, 2000).

¹⁷ *Eterotopia: presenza di un tessuto o di un organo in posizione anomala.*

Nel tendine adulto normale, la tenascina C è dislocata principalmente nelle zone anatomiche responsabili della trasmissione di alti livelli di tensioni meccaniche, come la giunzione miotendinea e quella osteotendinea (Chiquet e Fambrough, 1984); inoltre, la tenascina C si ritrova anche attorno alle cellule ed alle fibre di collagene (Jarvinen e coll., 2003). Recentemente Matsuda e coll. (2005a) hanno identificato un SNP (Single-Nucleotide Polymorphism) dislocato sull'esone¹⁸ 17 del gene TNC che causa una sostituzione aminoacidica nella posizione 1677 di una leucina con un'isoleucina. Questa sostituzione aminoacidica, che potrebbe essere responsabile di un cambiamento della stabilità strutturale del dominio della fibronectina III¹⁹ contenuta nella tenascina C, è stata recentemente associata con l'insorgenza dell'asma in una popolazione giapponese adulta (Matsuda e coll., 2005b). Ragion per cui, l'associazione funzionale di questo SNP con le patologie a carico dell'achilleo merita ulteriori approfondimenti, preferibilmente basati su studi di tipo prospettico²⁰.

Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato come l'espressione di tenascina C sia sotto-regolata nelle tendinopatie dell'achilleo, comprovando in tal modo il fatto che quest'ultima sia implicata nell'eziologia di tale patologia (Jarvinen e coll., 1999). Il gene TNC è strettamente legato al gene COL5A1 ed al gene ABO sulla punta del braccio lungo del cromosoma 9. Per tutta questa serie di motivi, appare pertanto ragionevole considerare il gene TNC come un fattore potenzialmente responsabile dell'insorgenza di patologie dell'achilleo (Mokone e coll., 2006)

Il gene MMP3

Oltre che ai geni TNC e COL5A1, le patologie a carico dell'Achilleo possono essere associate a geni che codificano proteine che possiedono un ruolo di regolatrici nel mantenimento dell'omeostasi della ECM. In questa classe sono incluse le metalloproteinasi della matrice (MMPs). Le MMPs costituiscono una famiglia di enzimi del gruppo delle proteasi²¹, che catalizzano un ampio spettro di substrati ECM e non-ECM (Somerville e coll., 2003). In particolare la MMP3 è in grado di degradare numerosi substrati tra i quali i collagene di tipo II, IV, V, IX e X, la laminina, la fibronectina, i proteoglicani, la decorina e gli aggregati (Somerville e coll., 2003; Birkedal-Hansen e coll., 1993). L'espressione del gene della MMP3 può essere sostanzialmente alterata dai promotori di polimorfismo 5A/6A (Ye e coll., 1996) e queste variazioni possono associarsi a vari stati patologici (Beyzade e coll., 2003; Ye e coll., 2007). E' interessante a questo proposito notare come si siano potuti osservare dei livelli ridotti di MMP3 e MMP3 mRNA in tendini achillei affetti da tendinopatia rispetto a tessuti di controllo (Ireland e coll., 2001; Alfredson e coll., 2003).

¹⁸ *Gli esoni costituiscono, insieme agli introni, la porzione di un gene (eucariotico o di archeobatteri) che viene trascritta dalle RNA polimerasi durante la trascrizione. Spesso, erroneamente, viene affermato che gli esoni costituiscono la parte codificante del genoma; questo è vero solo in parte: se è infatti vero che tutta la sequenza che codifica una proteina deve risiedere su uno o più esoni, non è invece sempre vero che un esone sia codificante.*

¹⁹ *La fibronectina è una glicoproteina dimerica prodotta da molte cellule e tessuti, presente nel tessuto connettivo lasso e in quello denso. Da essa derivano una serie di famiglie di molecole omologhe la cui particolare composizione aminoacidica permette loro di legare sia proteine delle membrane plasmatiche delle cellule connettivali (per esempio, le integrine) sia componenti della matrice extracellulare, come fibre collagene, eparina, eparinsolfato.*

²⁰ *Uno studio prospettico è uno studio che esamina i risultati nel tempo, ad esempio verificando dopo 1-2 anni qual è la situazione clinica di una certa popolazione di partenza.*

²¹ *Con il termine proteasi (o proteinasi, peptidasi, enzima proteolitico) si indica un enzima che sia in grado di catalizzare la rottura del legame peptidico tra il gruppo amminico e il gruppo carbossilico delle proteine.*

L'interazione gene-gene tra MMP3 e COL5A1

Raileigh e coll. (2009) hanno dimostrato come il MMP3 rs679620 insieme al COL5A1 SNP, formino la miglior coppia di genotipi per la determinazione delle patologie dell'achilleo. Il MMP3 rs679260 combinato con il COL5A1 rs12722 CC dimostra una significativa interazione nell'insorgenza delle tendinopatie dell'achilleo. Tuttavia, i dati di Raileigh e coll. (2009) non convalidano nessuna significativa associazione tra le varianti dell'MMP3, singolarmente od in associazione con le varianti del COL5A1, e le rotture del tendine d'Achille, suggerendo in tal modo come possa esistere una diversa predisposizione genica per le rotture e le tendinopatie, come d'altronde già suggerito da Mokone e coll. (2006). In effetti, tutti i tre polimorfismi del MMP3 (ossia: rs679620, rs591058 e rs650018) sembrerebbero collegati alle patologie dell'achilleo (Raileigh e coll., 2009). Già alcuni precedenti studi avevano evidenziato una ridotta espressione del MMP3 RNA sia nella degenerazione (Ireland e coll., 2001) che nella rottura dell'achilleo (Jones e coll., 2006), tuttavia il meccanismo di quest'interazione non era stato del tutto chiarito. Una plausibile spiegazione sarebbe rappresentata dal fatto che una ridotta espressione del MMP3 RNA, senza che si verifichi una contestuale diminuzione dei tessuti inibitori della metallo proteinasi (TIMPS), potrebbe causare un aumento dei proteoglicani (Riley e coll., 2002), il cui incremento è ben documentato nell'ambito del tessuto tendineo degenerato (Chard e coll., 1994).

Tuttavia, sia una ridotta che un'eccessiva espressione di MMP3 possono essere la causa di tendinopatie dell'achilleo. Questa ipotesi è giustificata dal fatto che l'uso di fluoroquinolonici²², farmaci noti per indurre tendinopatie e rotture dell'Achilleo (Pierfitte e Royer, 1996), produce un sostanziale incremento del MMP3 RNA in cellule di tendine umano trattate con interleuchina 1- β ²³ in cultura (Corps e coll., 2002). Delle 23 MMP3 umane, ben 9 dei loro geni formano un cluster²⁴ sul braccio lungo del cromosoma 11, di cui fa parte anche il gene del MMP3. Per cui, perlomeno in linea teorica, non si potrebbe escludere che uno, o più di uno, degli altri 8 geni appartenenti a detto cluster, possano essere in qualche modo associati alla patogenesi delle tendinopatie dell'achilleo. A questo proposito, è ad esempio interessante ricordare come Ye e coll. (2007) abbiano recentemente dimostrato che 3 altri geni all'interno di questo stesso cluster, e più specificatamente i MMP7 – 12 e 13, siano associati all'artrite reumatoide. Bisogna comunque ricordare che l'associazione allelica ad un tratto o ad una patologia non ne rappresenta inequivocabilmente la causa. Per cui, nel nostro argomento specifico, nell'interpretare studi che associno un particolare gene od un'associazione genica (come nel caso dell'interazione della variante del MMP3 ed il polimorfismo del COL5A1 rs12722) alle patologie dell'achilleo, occorre ricordare che l'insorgenza di una tendinopatia è sempre un processo complesso, che probabilmente coinvolge un certo numero di interazioni di tipo gene-gene e gene-ambiente (September e coll., 2007).

Conclusioni

Le associazioni tra i polimorfismi²⁵ ritrovabili all'interno dei geni TNC, COL5A1 ed MMP3 e le patologie dell'achilleo non provano inconfutabilmente una relazione di causa-effetto di tipo

²² I chinoloni sono una famiglia di antibiotici ad ampio spettro.

²³ L' interleuchina 1 (IL-1) è una citochina secreta da vari tipi di cellule del sistema immunitario tra cui macrofagi, monociti e cellule dendritiche, ma anche da fibroblasti e cellule endoteliali. Deve il suo nome al fatto di essere stata la prima citochina a venire scoperta.

²⁴ Grappolo.

²⁵ Il polimorfismo in biologia si verifica quando due o più fenotipi diversi esistono contemporaneamente nella stessa popolazione. Per essere classificati come tali, i polimorfismi devono occupare allo stesso tempo lo stesso habitat e

esaustivo. E' infatti possibile che un altro gene, od altri geni, dislocati sul cromosoma 9 in prossimità dei geni sopramenzionati, possano codificare per la proteina responsabile della patologia. E' il caso ad esempio del gene COL27A1, che codifica per il collagene di tipo XXVII, e che è stato mappato nella stessa regione del gene TNC e del COL5A1 (Boot-Handford e coll., 2003; Pace e coll., 2003). In questo caso, un promotore di variante non-codificato potrebbe causare un decremento dell'espressione della proteina COL27A1, senza peraltro interessare la sequenza genica, e quindi in tal modo creare un potenziale fattore di rischio per l'insorgenza di tendinopatie (Jenkins e coll., 2005). Il COL27A1 viene espresso nel modello murino nella cartilagine, nell'occhio, nell'orecchio, nel polmone e nel colon. Tuttavia, la precisa funzione di questa proteina a livello tissutale non è ancora ben conosciuta, potrebbe anche infatti essere espressa a livello tendineo, anche se quest'ultima affermazione necessita di ulteriori conferme. Ovviamente, oltre a quelle già menzionate, esiste un'ulteriore vasta gamma di proteine che sono coinvolte nella strutturazione e nella funzionalità del tendine, e quindi la serie di possibili polimorfismi genici associabili alle patologie a carico del tendine di Achille si allargherebbe di conseguenza (Riley, 2005a). A questo proposito, possiamo ricordare come il collagene di tipo XII e XIV siano tipi di collagene entrambi sottoposti a sollecitazioni meccaniche e coinvolti nel processo di fibrillogenesi²⁶, al quale sono associati anche il COL5A1 ed il TNC (Young e coll., 2002). In un modello murino, ad esempio, nella tendinopatia della cuffia dei rotatori il collagene di tipo XII è *up-regulated* durante tutta la fase di riparazione tissutale (Thomopoulos e coll., 2002). Occorre sempre ricordare che i tessuti connettivi, come appunto i tendini, sono prevalentemente costituiti da ECM e che la sintesi, la degradazione ed il mantenimento dell'integrità funzionale di quest'ultima dipendono dalla presenza cellulare riscontrabile al suo interno. Il rimodellamento "cellulo-mediato" ed i processi di guarigione del tendine sono due processi tra loro indissolubilmente interconnessi e che rivestono un'importanza vitale per il mantenimento della funzionalità tendinea. Tali processi sono sostenuti da specifiche proteinasi, proteinasi-inibitori, *growth factors*, citochine e regolatori dell'apoptosi. A rigor di logica, tutte le proteinasi che si ritrovano a livello tendineo, come la famiglia delle MMP oppure quella delle ADAM-TS (una disintegrina e metalloproteinasi-trombospondina²⁷), come anche i tessuti inibitori delle MMP, possono essere considerati come geni potenzialmente candidati all'insorgenza di patologie dell'achilleo (Riley, 2004; 2005). Tuttavia, le review incentrate sullo studio degli enzimi regolatori della ECM sino ad oggi pubblicate non riportano di geni codificanti per le proteine regolatrici dell'ECM mappati alla fine telomerica del braccio lungo del cromosoma 9 (Kaushal e coll., 2000; Riley, 2005; Riley, 2005b; Mokone e coll., 2006; September e coll., 2006). Anche il fenomeno dell'apoptosi è stato chiamato in causa quale meccanismo associabile allo stress meccanico inducente l'insorgenza di tendinopatia (Giunta e coll., 2002). Questa ipotesi viene giustificata dal fatto che alcuni geni responsabili dell'apoptosi sono stati mappati nella regione

appartenere ad una popolazione panmittica (cioè soggetta ad accoppiamento casuale). Si parla di polimorfismo genetico quando una variazione genetica ha una prevalenza maggiore dell'1% nella popolazione. La variazione genetica può essere determinata da sostituzioni, delezioni o inserzioni di basi nel DNA e può riguardare regioni codificanti e regioni non codificanti.

²⁶ *La fibrillogenasi è un processo complesso operato da diversi tipi cellulari nei diversi tipi di tessuto connettivo: dai fibroblasti nei vari tipi di connettivo propriamente detto, dai condroblasti nella cartilagine, dagli osteoblasti nel tessuto osseo e dagli odontoblasti e i cementoblasti nel dente. Il processo inizia nel nucleo con la trascrizione dei geni e dalla maturazione dei relativi mRNA.*

²⁷ *La trombospondina è una glicoproteina avente peso molecolare di 450 kDa, contenuta nei granuli alfa delle piastrine del sangue. Essa è coinvolta nel fenomeno dell'aggregazione piastrinica, legandosi al fibrinogeno e favorendo l'aggregazione stessa. Viene espressa sulla superficie delle piastrine attivate. Inibisce l'angiogenesi.*

telomerica del cromosoma 9q (Bennet e coll., 1995). L'eziologia delle patologie dell'achilleo resta quindi senza dubbio multifattoriale, ma è comunque innegabile l'importanza che potranno avere ulteriori futuri studi nell'ambito dell'interazione dei differenti fattori, intrinseci ed estrinseci, di rischio. Un interessante campo d'indagine potrebbe essere ad esempio l'interazione tra COL5A1 TNC e MMP3 con i fattori ambientali, quali la massa corporea o l'esposizione allo stress meccanico rappresentato dall'attività sportiva. In questo campo, ad esempio, si è già scoperta un'interessante associazione tra incremento del peso corporeo e COL9A3²⁸ nell'insorgenza delle discopatie lombari (Solovieva e coll., 2002). Ed ancora è interessante notare che le mutazioni del COL5A1 e della Tenascina X (TNX) sono state entrambe associate con la sindrome di Ehlers–Danlos e la sindrome benigna di ipermobilità²⁹ (Schalkwijk e coll., 2001; Giunta e coll., 2002). Dal momento che il TNX appartiene alla stessa famiglia della TNC, da un punto di vista biologico appare giustificato ricercare possibili interferenze del TNX sulla funzione e la struttura tendinea. In ultimo, è interessante ricordare che in bibliografia esistono case-report di soggetti affetti da sindrome di Ehlers–Danlos di tipo II, in cui è stato possibile osservare una rottura spontanea del tendine di Achille o del tendine rotuleo, che rappresenterebbe una condizione autosomica dominante per la quale sarebbe stata identificata una mutazione nel gene COL3A, che si porrebbe quindi come un ulteriore possibile gene candidato alla responsabilità della rottura del tendine achilleo (Palvolgy e coll., 1979; Matziolis e coll., 2003; Palmeri e coll., 2003).

Bibliografia

Ala-Kokko L. Genetic risk factors for lumbar disc disease. *Ann Med* 2002;34:42–7.

Aldred PM, Hollox EJ, Armour JA. Copy number polymorphism and expression level variation of the human alpha-defensin genes DEFA1 and DEFA3. *Hum Mol Genet* 2005;14:2045–52.

Alfredson H., Lorentzon M., Backman S., et al. cDna-arrays and real-time quantitative PCR techniques in the investigation of chronic Achilles tendinosis. *J Orthop Res.* 2003; 21: 970-975.

Almekinders LC. Tendinitis and other chronic tendinopathies. *J Am Acad Orthop Surg* 1998;6:157–64.

Aroen A, Helgo D, Granlund OG, et al. Contralateral tendon rupture risk is increased in individuals with a previous Achilles tendon rupture. *Scand J Med Sci Sports* 2004;14:30–3.

Bennett EP, Steffensen R, Clausen H, et al. Genomic cloning of the human histoblood group ABO locus. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206:18–25.

²⁸ *La catena collagene alfa-3(IX) è una proteina che nell'uomo è codificata dal gene COL9A3 .*

²⁹ *La sindrome benigna di ipermobilità (SBI) si riferisce a dolori alle estremità dovuti ad una eccessiva mobilità articolare, in assenza di una malattia congenita o del tessuto connettivo. Di conseguenza la SBI non è una malattia ma piuttosto una caratteristica del singolo individuo. La SBI è estremamente comune nei bambini ed è stata riscontrata nel 25-50% dei minori di 10 anni. La frequenza diminuisce con l'età ed è facile riscontrarla in più generazioni di una famiglia. La ipermobilità dà origine a dolore profondo intermittente e ricorrente, alla fine della giornata o di notte, localizzato alle ginocchia, piedi o caviglie. Nei bambini che suonano il piano od il violino può colpire invece le dita. Attività fisica od esercizi scatenano od aumentano il dolore. Raramente si riscontra una lieve tumefazione alle articolazioni. La terapia è raramente necessaria in quanto l'SBI è una sindrome benigna che recede con l'età.*

- Beyzade S., Zhang S., Wong YK., et al. Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extend of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41: 2130-2137.
- Birkedal-Hansen H., Moore WG., Bodden MK et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4: 197-250.
- Bisciotti GN, Eirale C., Lello PP. ABO Blood Groups and Achilles Tendon Injury. *Achilles tendon.* Intech Publisher (Ed). Rijeka, Croatia. 2012.
- Bisciotti GN., Eirale C. The role of exogenous and endogenous factors in the etiology of Achilles and patellar tendinopathy . *Med Sport.* (submitted), 2011.
- Boot-Handford RP, Tuckwell DS, Plumb DA, et al. A novel and highly conserved collagen (pro(alpha)1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J Biol Chem.* 2003;278:31067-77.
- Caridi G., Pwezzolo A., Bertelli R., Gimelli G., Di Donato A., Candiano G., Ghiggeri GM. Mapping the human COL5A1 gene to chromosome 9q34.3. *Hum Genet.* 1992; 90: 174-176.
- Chard MD., Harral RL., Curry VA., et al., Rotator cuff degeneration and lateral epicondylitis: a comparative histological study. *Ann Rheum Dis.* 1994; 53: 30-34.
- Chiquet M., Fambrough DM. Chick myotendinous antigen. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis. *J Cell Bio.* 1984; 98: 1926-1936.
- Corps AN., Harral RL., Curry VA., et al. Ciprofloxacin enhances the stimulation of matrix metalloproteinase 3 expression by interleukin 1beta in human tendon derived cells. A potential mechanism of fluoroquinolone-induced tendinopathy. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 3034-3040.
- De Paepe A, Nuytinck L, Hausser I, et al. Mutations in the COL5A1 gene are causal in the Ehlers-Danlos Syndromes I and II. *Am J Hum Genet.* 1997;60:547-54.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006;7:85-97.
- Flynn RK, Pedersen CL, Birmingham TB, et al. The familial predisposition toward tearing the anterior cruciate ligament: a case control study. *Am J Sports Med.* 2005;33:23-8.
- Freeman JL, Perry GH, Feuk L, et al. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res* 2006;16:949-61.
- Giunta C, Nuytinck L, Raghunath M, et al. Homozygous Gly530Ser substitution in COL5A1 causes mild classical Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Med Genet.* 2002;109:284-90.

- Gonclaves-Neto J., Witzel SS., Teodoro WR., Carvalho-Junior AE., Fernandes TD., Yoshinari HH. Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. *Joint Bone Spine*. 2002; 69: 189-194.
- Greenspan DS., Pasquinelli AE., BstUI and DpnII RFLPs at COL5A1 gene. *Hum Mol Genet*, 1994; 3: 385.
- Harvie P, Ostlere SJ, Teh J, et al. Genetic influences in the aetiology of tears of the rotator cuff. Sibling risk of a full-thickness tear. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86:696–700..
- Ireland D., Harral R., Curry V., et al. Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy. *Matrix Biol*. 2001; 20: 159-169.
- Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, et al. Mechanical loading regulates tenascin-C expression in the osteotendinous junction. *J Cell Sci* 1999;112:3157–66.
- Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, et al. Mechanical loading regulates the expression of tenascin-C in the myotendinous junction and tendon but does not induce de novo synthesis in the skeletal muscle. *J Cell Sci*. 2003;116:857–66.
- Jarvinen TA, Kannus P, Jarvinen TL, et al. Tenascin-C in the pathobiology and healing process of musculoskeletal tissue injury. *Scand J Med Sci Sports*. 2000;10:376–82.
- Jarvinen TA, Kannus P, Maffulli N, et al. Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. *Foot Ankle Clin* 2005;10:255–66.
- Jenkins E, Moss JB, Pace JM, et al. The new collagen gene COL27A1 contains SOX9-responsive enhancer elements. *Matrix Biol* 2005;24:177–84.
- Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*. 2000;218:235–59.
- Jones GC., Corps AN., Pennington CJ., et al., Expression profiling of metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase in normal and degenerate human Achilles tendon, *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 832-842.
- Józsa L., Balint JB., Kannus P., Reffy A., Barzo M. Distribution of blood groups in patients with tendon rupture. An analysis of 832 cases. *J Bone Joint Surg*. 1989; 71B: 272-274.
- Judge DP, Dietz HC. Marfan's syndrome. *Lancet* 2005;366:1965–76.
- Kannus P, Jarvinen TL, Jarvinen TA, et al. Painful Achilles tendon and its treatment. *Scand J Med Sci Sports* 2004;14:69–71.
- Kannus P, Natri A. Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. *Scand J Med Sci Sports* 1997;7:107–12.
- Kaushal GP, Shah SV. The new kids on the block: ADAMTSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family. *J Clin Invest* 2000;105:1335–7.

- Kujala UM, Jarvinen M, Natri A, et al. ABO blood groups and musculoskeletal injuries. *Injury* 1992;23:131–3.
- Leppilahti J, Puranen J, Orava S. ABO blood group and Achilles tendon rupture. *Ann Chir Gynaecol* 1996;85:369–71.
- Linzmeier RM, Ganz T. Copy number polymorphisms are not a common feature of innate immune genes. *Genomics* 2006;88:122–6.
- Maffulli N, Ewen SW, Waterston SW, Reaper J, Barrass V. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal Achilles tendons: An in vitro model of human tendon healing. *Am J Sports Med* 2000; 28: 499–505.
- Maffulli N, Reaper JA, Waterston SW, et al. ABO blood groups and Achilles tendon rupture in the Grampian region of Scotland. *Clin J Sport Med* 2000;10:269–71.
- Mahrlein R, Schmelzeisen H, Papathanassopoulos A. Achillessehnenrupturen und blutgruppenzugehörigkeit. *Aktuelle Traumatol* 1995;25:13–15.
- Matsuda A, Hirota T, Akahoshi M, et al. Coding SNP in tenascin-C Fn-III-D domain associates with adult asthma. *Hum Mol Genet* 2005a;14:2779–86.
- Matsuda A, Hirota T, Akahoshi M, et al. Coding SNP in tenascin-C Fn-III-D domain associates with adult asthma. *Hum Mol Genet* 2005b;14:2779–86.
- Matziolis G, Drahn T, Perka C. Spontaneous patellar tendon rupture in a patient with Ehlers-Danlos syndrome). *Unfallchirurg*. 2003;106:1051–3.
- Mazzone MF, McCue T. Common conditions of the Achilles tendon. *Am Fam Physician* 2002;65:1805–10.
- Mokone GG, Gajjar M, September AV, et al. The Guanine-thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C gene is associated with Achilles tendon injuries. *Am J Sports Med* 2005;33:1016–21.
- Mokone GG, Schwellnus MP, Noakes TD, et al. The COL5A1 gene and Achilles tendon pathology. *Scand J Med Sci Sports* 2006;16:19–26.
- Mokone GG. Risk factors for Achilles tendon injuries: an emphasis on the identification of specific genetic factors. South Africa: University of Cape Town, 2006.
- Mokone GG., Schwellnus MP., Noakes TD., Collins M. The COL5A1 gene and Achilles tendon pathology. *Scand J Med Sci Sport*. 2006; 16: 19-26.
- Myllyharju J., Kivirikko KI. Collagens and collagen-related disease: *Ann Med*. 2001; 33: 7-21.

- Noponen-Hietala N, Kyllonen E, Mannikko M, et al. Sequence variations in the collagen IX and XI genes are associated with degenerative lumbar spinal stenosis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1208–14.
- Pace JM, Corrado M, Missero C, et al. Identification, characterization and expression analysis of a new fibrillar collagen gene, COL27A1. *Matrix Biol.*2003;22:3–14.
- Palmeri S, Mari F, Meloni I, et al. Neurological presentation of Ehlers-Danlos syndrome type IV in a family with parental mosaicism. *Clin Genet.* 2003;63:510–15.
- Palvolgyi R, Balint BJ, Jozsa L. The Ehlers-Danlos syndrome causing lacerations in tendons and muscles. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1979;95:173–6.
- Pierfitte C., Royer RJ. Tendon disorders with fluoroquinolones. *Terapie.* 1996; 51: 419-420.
- Prockop DJ, Chu ML, de Wet W, et al. Mutations in osteogenesis imperfecta leading to the synthesis of abnormal type I procollagens. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;460:289–97.
- Raleigh SM., Van der Merwe L., Ribbans Wj., Smith RK., Schwellnus MP., CollinsM. Variant within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction whit the COL5A1 gene. *Br J Sports Med.* 2009; 43(7): 514-520
- Rees JD, Wilson AM, Wolman RL. Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology* 2006;45:508–21.
- Riley GP. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular prospective. *Reumatology.* 2004; 43: 131-142.
- Riley GP., Curry V., DeGroot J., et al., Matrix metalloproteinase activities and their relationship whit collagen remodeling in tendon pathology. *Matrix Biol.* 2002; 21: 185-195.
- Riley GP. Chronic tendon pathology: molecular basis and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med* 2005a;7:1–25.
- Riley GP. Gene expression and matrix turnover in overused and damaged tendons. *Scand J Med Sci Sports* 2005b;15:241–51.
- Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, et al. A recessive form of the Ehlers- Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N Engl J Med.* 2001;345:1167–75.
- Schepesis AA, Jones H, Haas AL. Achilles tendon disorders in athletes. *Am J Sports Med* 2002;30:287–305.
- September AV, Mokone GG, Schwellnus MP, et al. Genetic risk factors for Achilles tendon injuries. *Int Sports Med J* 2006;7:201–15.
- September AV., Schwellnus MP., Collins M. Tendon and ligament injuries: the genetic component. *Br J Sport Med.* 2007: 41: 241-246.

Silver FH., Freeman JW., Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech.* 2003; 36: 1529-1553.

Solovieva S, Kouhia S, Leino-Arjas P, et al. Interleukin 1 polymorphisms and intervertebral disc degeneration. *Epidemiology* 2004;15:626–33.

Solovieva S, Lohiniva J, Leino-Arjas P, et al. COL9A3 gene polymorphism and obesity in intervertebral disc degeneration of the lumbar spine: evidence of gene-environment interaction. *Spine* 2002;27:2691–6.

Somerville RP., Oblander SA., Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol.* 2003; 4: 216. *Surg* 1998;6:157–64.

Tilkeridis C, Bei T, Garantziotis S, et al. Association of a COL1A1 polymorphism with lumbar disc disease in young military recruits. *J Med Genet* 2005;42:e44.

Thomopoulos S, Hattersley G, Rosen V, et al. The localized expression of extracellular matrix components in healing tendon insertion sites: an in situ hybridization study. *J Orthop Res.* 2002;20:454–63.

Waterston SW, Maffulli N, Ewen SW. (1997) Subcutaneous rupture of the Achilles tendon: basic science and some aspects of clinical practice. *Br J Sports Med.* 31(4):285–298.

Waterston SW. (1997) Histochemistry and biochemistry of Achilles tendon ruptures. University of Aberdeen; 1–58.

Woo SL, Abramowitch SD, Kilger R, et al. Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. *J Biomech* 2006;39:1–20.

Ye S., Eriksson P., Hamsten A et al. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem.* 1996; 271: 13055-13060.

Ye S., Patodi N., Walker-Bone K., et al. Variation in the matrix metalloproteinase-3, -7, -12 and 13 genes is associated with functional status in rheumatoid arthritis. In *J Immunogenet.* 2007; 34: 81-85.

Young BB, Zhang G, Koch M, et al. The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea. *J Cell Biochem.* 2002;87:208–20.