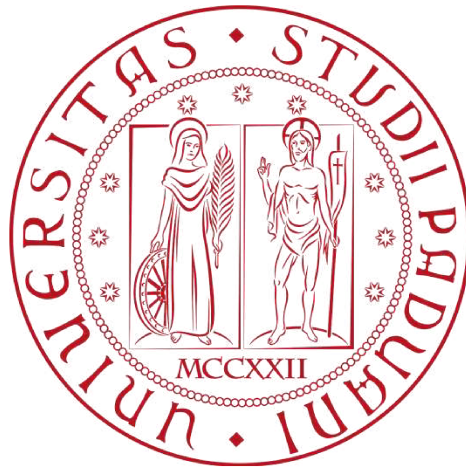


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



Elaborato di laurea:

Un nuovo gene associato alla Cardiomiopatia Aritmogena: la
Galectina-3 come modulatore e possibile biomarcatore delle
fasi precoci della malattia

*A new gene associated with Arrhythmogenic Cardiomyopathy:
Galectin-3 as a modulator and potential biomarker of the early stages
of the disease*

Tutor: Prof.ssa Tiso Natascia
Co-tutor: Dr. Risato Giovanni

Laureanda: Nunziata Sara
Matricola: 1230232

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Cardiomiopatia aritmogena	5
1.1.1 Caratteristiche istopatologiche	5
1.1.2 Cause genetiche	5
1.1.3 Patogenesi	6
1.2 Dischi intercalari	7
1.2.1 Desmosoma	7
1.3 Zebrafish come animale modello per le malattie cardiache	9
2. MATERIALI E METODI	10
2.1 Real time PCR	10
2.2 Immunoistochimica	11
2.3 Trattamento farmacologico in zebrafish	12
3. RISULTATI	13
3.1 Profilo di espressione genica prima dello sviluppo del fenotipo AC	13
3.2 Alterazioni in seguito a trattamento farmacologico	14
3.3 Varianti genetiche rare di <i>LGALS3</i>	15
4. DISCUSSIONE	16
4.1 GAL3 e adesione intercellulare	17
4.2 GAL3 e via di segnale Wnt	17
4.3 Varianti genetiche rare di <i>LGALS3</i>	17
4.4 Infiammazione, riparazione delle ferite ed insufficienza cardiaca	18
5. CONCLUSIONI	18
BIBLIOGRAFIA	19
APPENDICE	19

ABSTRACT

La cardiomiopatia aritmogena (AC) è una malattia cardiaca ereditaria caratterizzata dalla progressiva atrofia del tessuto miocardico con conseguente sostituzione fibro-adiposa, causante l'insorgenza di aritmie ventricolari e sincopi; tale patologia può portare a morte cardiaca improvvisa in giovani ed atleti. Sebbene la AC sia una malattia principalmente dovuta a mutazioni desmosomiali, l'analisi dell'espressione genica in modelli murini transgenici per la AC e in pazienti deceduti per morte improvvisa ha rivelato una ridotta espressione cardiaca del gene codificante la galectina-3 (LGALS3; GAL3) nelle fasi iniziali della AC, con la successiva identificazione di 4 varianti missenso rare, di cui una confermata causare una totale perdita di funzione in zebrafish (c.485G>A). L'inibizione farmacologica di Lgals3 in zebrafish ha determinato una riduzione dell'espressione della via Wnt/ β -catenina e TGF β ed un aumento della via Hippo/YAP-TAZ, recentemente associate alla AC, provocando inoltre una delocalizzazione della desmoplachina, con conseguenti alterazioni desmosomiali. In pazienti umani è stato osservato un aumento dei livelli di GAL3 circolante e una correlata attivazione di cellule infiammatorie e pro-fibrotiche in tessuti miocardici danneggiati. Comprendere il ruolo e la funzione della galectina-3 nella eziopatogenesi della AC potrebbe quindi consentire l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici per regolare i processi infiammatori e la progressione della malattia.

1. INTRODUZIONE

1.1 Cardiomiopatia aritmogena

1.1.1 Caratteristiche istopatologiche

La cardiomiopatia aritmogena (AC) è una rara patologia cardiaca ereditaria caratterizzata dalla progressiva atrofia del tessuto miocardico con conseguente sostituzione fibro-adiposa che può portare all'insorgenza di aritmie ventricolari, compromissione della funzione sistolica ventricolare e sincopi. Spesso i pazienti affetti da AC non presentano sintomi nelle prime fasi di sviluppo della malattia, ma le manifestazioni si presentano tra la seconda e la quarta decade di vita, in un'età compresa tra 13 e 40 anni. Il rischio di morte cardiaca improvvisa può aumentare di circa cinque volte, soprattutto se vengono svolti sforzi prolungati ed intensi. (Corrado et al., 2000). La fase conclamata della AC è caratterizzata dalla presenza di disfunzioni cardiache, aritmie potenzialmente letali, morte cardiaca improvvisa e anomalie morfologiche, come le dilatazioni ventricolari. Queste ultime sono facilmente distinguibili tramite analisi istologica, la quale permette di individuare cardiomiociti isolati ed intervallati da tessuto fibroso e adiposo (Marcus et al., 2010). Le alterazioni morfologiche e strutturali del cuore possono portare alla formazione di un'enorme dilatazione delle camere ventricolari allo stadio terminale della patologia. Successive analisi hanno inoltre messo in evidenza un possibile legame tra la progressiva degradazione e morte dei cardiomiociti con l'instaurarsi di un processo infiammatorio. In particolare, si pensa che l'iniziale necrosi delle cellule miocardiche sia il fattore scatenante della risposta infiammatoria e del processo apoptotico, il quale porta a degradazione del tessuto miocardico ed a sostituzione fibro-adiposa. La AC è collocata nell'elenco delle patologie cardiovascolari rare in quanto la sua prevalenza è di 1 caso ogni 5000 persone nella popolazione generale e di 1 caso ogni 2000 persone in alcuni paesi europei come l'Italia e la Germania. L'assenza di un valore preciso, ma la presenza di una gamma, è legata all'erronea categorizzazione dei soggetti affetti, ma asintomatici, riconosciuti come sani perché non soddisfacenti dei criteri diagnostici stabiliti. Analisi *post mortem* hanno permesso di classificare la AC come una delle principali cause di morte improvvisa nei giovani e negli atleti. La maggior parte degli studi ha riportato una maggiore incidenza e gravità tra gli uomini rispetto alle donne (rapporto 3:1); ciò potrebbe essere dovuto all'influenza degli ormoni sessuali sull'espressione della malattia o alle differenze legate al sesso nella quantità e nell'intensità dell'esercizio (Corrado et al., 2017).

1.1.2 Cause genetiche

L'AC è una malattia genetica ereditaria autosomica dominante geneticamente eterogenea principalmente causata da mutazioni a livello di proteine desmosomali (in circa il 30-50% dei pazienti), le quali conducono ad alterazioni strutturali destabilizzanti, e di conseguenza funzionali, dei desmosomi. Più raramente, la AC si manifesta con cheratoderma palmoplantare e capelli lanosi e presenta una trasmissione di tipo autosomico recessivo (sindromi Naxos e Carvajal). Una serie di analisi genetiche hanno permesso di identificare una lista di geni associati alla patologia. I principali geni causativi della AC sono sette: *JUP* (placoglobina), *DSP* (desmoplachina), *PKP2* (placofilina-2), *DSG2* (desmogleina-2), *DSC2* (desmocollina-2), *TGFβ3* (fattore di crescita trasformante beta-3) e *TMEM43* (proteina transmembrana 43) (Marcus et al., 2010). Ulteriori analisi hanno

dimostrato che la manifestazione della malattia può avvenire in seguito a mutazioni a livello di geni non desmosomiali, come *CTNNA3*. Tale gene codifica l' α -catenina, una proteina citoplasmatica che ha il ruolo di connettere direttamente le proteine desmosomiche all'area composita tramite la PKP2. Altri geni non desmosomiali possono contribuire alla manifestazione della AC, i quali codificano ad esempio: componenti della membrana nucleare; desmina (DES), un componente del filamento intermedio che collega le membrane nucleari al sarcolemma e ai dischi Z; fosfolambano, una proteina che impedisce all'ATPasi di trasportare ioni calcio all'interno del reticolo sarcoendoplasmatico, determinando sregolazione delle contrazioni cardiache; $Na_v1.5$, subunità che forma i pori del canale del sodio cardiaco voltaggio-dipendente.

1.1.3 Patogenesi

Tuttora non è del tutto chiaro come le mutazioni a livello dei geni desmosomiali possano condurre alla patogenesi della AC. La spiegazione più semplice si basa sul fatto che tali modifiche morfologiche e funzionali provochino la destabilizzazione delle giunzioni intercellulari tra i cardiomiociti, provocandone il distacco, la rottura e la successiva morte e sostituzione con il tessuto fibroadiposo. Tale distacco viene enfatizzato con l'esercizio fisico, il quale determina aumento dello stress a cui è sottoposto il tessuto cardiaco; per questo motivo gli atleti risultano essere maggiormente predisposti. Bisogna inoltre sottolineare che i desmosomi, oltre ad essere coinvolti dal punto di vista strutturale nella stabilizzazione dei complessi di adesione cellula-cellula, sono importanti mediatori coinvolti nelle vie di trasduzione di segnali intra ed extracellulari. Per esempio, la destabilizzazione e la rottura del complesso desmosomiale causa il rilascio di JUP (o γ -catenina) nel citoplasma della cellula cardiaca danneggiata, determinando così una sua redistribuzione. Se rilasciata in forma libera, essa è in grado di trasferirsi all'interno del nucleo, competendo con la β -catenina per l'attivazione della via di segnale Wnt/ β -catenina (a causa dell'88% di similarità tra le due proteine).

Un ulteriore punto interrogativo è collegato all'origine degli adipociti in regioni in cui normalmente non sono presenti, come il cuore. Si pensa che tali cellule provengano da cellule progenitrici cardiache indifferenziate, chiamate FAP (*fibroadypocyte progenitor cells*), le quali hanno la capacità di differenziarsi in fibroblasti o adipociti a seconda del contesto e della tipologia di lesione al muscolo. In particolar modo, si assiste alla generazione di cellule adipose in seguito alla soppressione della via di segnale canonica Wnt/ β -catenina, dovuta alla competizione tra JUP e β -catenina. Tale disattivazione causa l'incremento della trascrizione di fattori adipogenici come Wnt5b non canonico e BMP7 (*Bone Morphogenetic Protein 7*) e la riduzione dell'inibitore dell'adipogenesi CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*).

Come anticipato, l'alterazione della via di segnale Wnt/ β -catenina può avvenire a causa della destabilizzazione dei desmosomi e del rilascio di JUP nel citoplasma. Esistono tuttavia altre possibili cause, come la sregolazione dell'attività dell'enzima glicogeno sintasi chinasi 3β (GSK3 β) e della via di segnale Hippo/YAP-TAZ. La GSK3 β è un regolatore negativo della via Wnt e presenta un ruolo centrale nella patogenesi della AC perché mutazioni desmosomiali provocano la riduzione di tale enzima a livello citoplasmatico. La via di segnalazione Hippo, invece, svolge un ruolo nella regolazione della crescita

tissutale e della dimensione degli organi, andando a regolare proliferazione, differenziazione e apoptosi cellulare. Un effettore di questa via di segnale è la proteina YAP (*Yes-associated protein*), la quale si lega alla β -catenina e alla γ -catenina, causando la soppressione della via Wnt canonica e la successiva attivazione dei processi pro-fibrotici e adipocitici. Un altro collegamento tra via Hippo/YAP-TAZ e AC è dato da una proteina denominata neurofibromina-2 (NF2), nota anche come Merlin, la quale regola le adesioni cellula-cellula e cellula-matrice a livello dei dischi intercalari ed agisce a monte della via Hippo. È stato ipotizzato che questa proteina possa essere un ulteriore collegamento tra mutazioni desmosomali e adipogenesi; infatti, le alterazioni a livello dei dischi intercalari provocano l'alterazione della via di segnalazione Hippo e il successivo aumento dello sviluppo del tessuto fibro-adiposo a livello cardiaco.

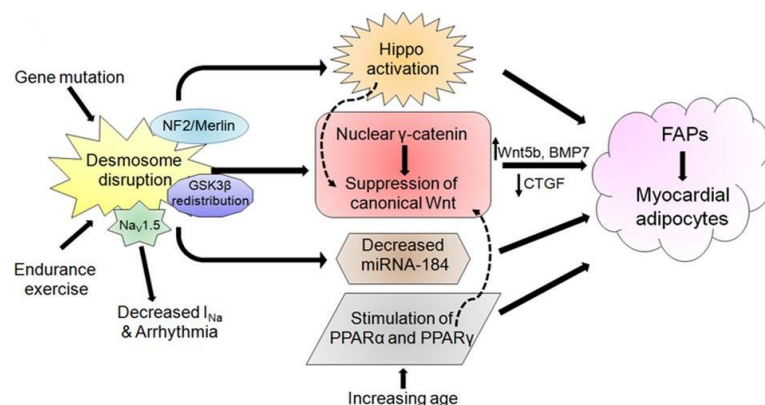


Figura 1: Fattori coinvolti nella patogenesi della AC. Da Corrado et al., 2017.

1.2 Dischi intercalari

I dischi intercalari sono strutture che collegano cardiomiociti adiacenti, sia dal punto di vista meccanico/strutturale che funzionale; essi permettono una stabile coesione tra le cellule e una rapida conduzione dell'impulso elettrico. All'interno di tali complessi è possibile riconoscere tre diverse tipologie di giunzioni cellulari: il desmosoma, la giunzione aderente e la giunzione gap. Ciascuna di esse possiede uno specifico ruolo: i desmosomi sono coinvolti nell'ancoraggio della membrana cellulare alla rete di filamenti intermedi; le giunzioni aderenti forniscono un supporto strutturale al tessuto, tramite connessione con i filamenti actinici; le giunzioni gap, infine, collegano metabolicamente ed elettricamente le cellule, consentendo ai potenziali d'azione cardiaci di diffondersi velocemente attraverso il tessuto. Tutti questi complessi funzionano come una singola unità, la cosiddetta area composta (Zhao et al., 2019).

1.2.1 Desmosoma

I desmosomi sono giunzioni intercellulari che forniscono una forte adesione tra le cellule e mediano l'ancoraggio dei filamenti intermedi alla membrana plasmatica, integrando le cellule all'interno dei tessuti e fornendo resistenza alle sollecitazioni meccaniche. Le DSG e DSC sono proteine transmembrana che mediano le adesioni cellula-cellula e fanno parte della superfamiglia delle caderine. Tramite il loro dominio citoplasmatico interagiscono con la JUP e la PKP (appartenenti alla famiglia delle proteine Armadillo); quest'ultime si legano a loro volta alla DSP (appartenente alla famiglia delle plachine), la quale ancora i filamenti intermedi formando il complesso desmosoma-filamenti. Più nel dettaglio, studi di

microscopia elettronica hanno permesso di suddividere il desmosoma in tre diverse zone: placca densa interna (IDP), placca densa esterna (ODP) e desmoglea (presente nella porzione extracellulare). La ODP è costituita dalle code citoplasmatiche delle caderine desmosomali, le quali si legano in maniera Ca^{2+} -dipendente a JUP, PKP e DSP. Dalla Figura 2 è possibile vedere come la JUP si leghi direttamente alle code citoplasmatiche di DSG e DSC, e come la desmoplachina interagisca con la placofilina e la placoglobina. A livello della IDP, invece, il legame con la rete citoscheletrica è mediato dalla DSP, la quale interagisce direttamente con i filamenti intermedi di cheratina.

DSG e DSC appartengono alla superfamiglia delle caderine, glicoproteine transmembrana che mediano l'adesione cellula-cellula in maniera calcio-dipendente. Lo ione calcio, con la sua carica positiva, permette al dominio extracellulare di assumere una conformazione tale da permettere l'interazione con le caderine presenti sulle cellule adiacenti. La tipologia di legame che generalmente si instaura è di tipo omofilico, ovvero tra caderine dello stesso sottotipo. La JUP è una proteina citoplasmatica cruciale per l'assemblaggio dei desmosomi ma, oltre alle funzioni di adesione cellulare, possiede anche un ruolo nella trasduzione del segnale; in particolare, è stato riscontrato che tale proteina, insieme alla β -catenina, sia un regolatore della famiglia dei fattori di trascrizione delle cellule T (TCF) e un modulatore della segnalazione del fattore di crescita Wnt. Per questa ragione, mutazioni in geni desmosomiali possono interferire con questa via di segnale, coinvolta nello sviluppo cardiaco, nel differenziamento dei miociti e nella normale architettura del miocardio. Normalmente la β -catenina forma un complesso nel nucleo con i fattori di trascrizione TCF-LEF (*T-cell factor-lymphocyte-enhancing factor*) e sopprime l'espressione dei geni adipogenici e fibrogenici in modo da impedire il differenziamento dei precursori mesodermici in adipociti e fibrociti. La compromissione dell'assemblaggio dei desmosomi dovuta a mutazioni in geni desmosomiali causa la traslocazione della placoglobina dal sarcolemma al nucleo, dove compete con la β -catenina, impedisce la formazione del complesso tra la β -catenina e TCF-LEF e porta all'espressione di geni adipogenici e fibrogenici. Le PKP, invece, mantengono l'integrità e mediano le interazioni laterali tra i vari complessi desmosomiali. È stata dimostrata la presenza di PKP anche in siti diversi dai desmosomi, come nel nucleo, anche se tuttora non è chiaro quale sia la loro funzione nella regolazione genica. Infine, diversi studi evidenziano il ruolo cruciale della DSP nella determinazione della corretta struttura e funzione del desmosoma. Il 10-15% delle mutazioni desmosomiali individuate nei pazienti affetti da cardiomiopatia aritmogena sono situate nel gene DSP.

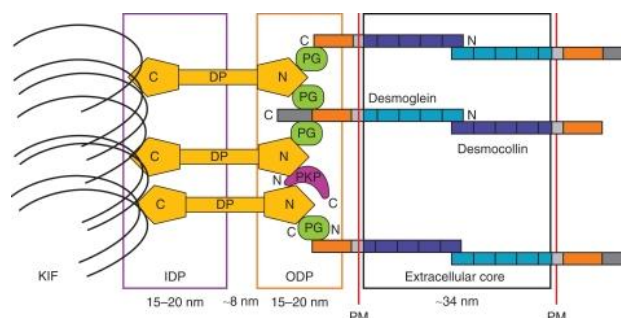


Figura 2: organizzazione delle proteine desmosomiali. DP = desmoplachina; PG = placoglobina; PKP = placofilina; KIF = filamenti intermedi di cheratina. Da Delva et al., 2009.

1.3 Zebrafish come animale modello per le malattie cardiache

Lo zebrafish (*Danio rerio*) è un teleosteo originario dell'India che vive in torrenti e fiumi d'acqua dolce in regioni tropicali. Presenta un corpo fusiforme di lunghezza media di 4-5 cm con delle caratteristiche strisce laterali. Nel corso degli anni, lo zebrafish è diventato un eccezionale organismo modello, utilizzato anche per lo studio delle malattie cardiache. L'allevamento in laboratorio è relativamente semplice ed economico. Le analisi genetiche e statistiche sono facilitate dall'elevata fertilità; infatti, ad ogni evento riproduttivo si ottengono circa 100-200 uova. Inoltre, la fecondazione e lo sviluppo delle uova avvengono all'esterno della madre, facilitando l'osservazione e la manipolazione, senza la necessità di utilizzare approcci invasivi. Gli embrioni sono trasparenti e questo consente di osservare in tempo reale l'organogenesi, le prime fasi di sviluppo dell'organismo e i possibili vari fenotipi cardiaci, come le aritmie e la presenza di alterazioni morfologiche nella regione cardiaca. Lo zebrafish, essendo un vertebrato, è geneticamente più vicino all'uomo rispetto ad altri modelli invertebrati, quali *Drosophila* o *C. elegans*. Inoltre, circa l'82% dei geni umani presenta almeno un gene ortologo in zebrafish. La similarità genetica con l'uomo ha portato all'uso di tecniche di mutagenesi per modellizzare diverse patologie umane, come il trattamento ENU e la tecnologia CRISPR/Cas9. È inoltre possibile generare linee transgeniche fluorescenti, tessuto-specifiche o sensori di vie di segnale. organismo. Con questi approcci è possibile effettuare screening farmacologici mirati, alla ricerca di nuove molecole potenzialmente utili per lo studio o la cura di specifiche patologie.

Come anticipato, lo zebrafish si è dimostrato un animale modello adeguato allo studio di malattie cardiache, nonostante le differenze anatomiche con il cuore umano. Il cuore di zebrafish è formato da due camere, ossia un atrio e un ventricolo, diversamente dai mammiferi, caratterizzati da un cuore a quattro camere (2 atri e 2 ventricoli). Il sangue venoso entra nell'atrio attraverso il seno venoso, passa al ventricolo tramite il canale atrioventricolare ed esce dal cuore attraverso il bulbo arterioso per raggiungere l'aorta ventrale. Il fatto di essere in grado di sopravvivere anche in presenza di un sistema circolatorio non completamente funzionale nelle prime fasi dello sviluppo, rende lo zebrafish fondamentale per lo studio delle malformazioni cardiache; tali studi sarebbero letali in altri animali modello, come il topo. In effetti, lo zebrafish può sopravvivere in quanto la semplice diffusione di nutrienti ed ossigeno sono sufficienti per soddisfare il suo fabbisogno embrionale o larvale. Inoltre, il fatto che ci sia una somiglianza nella frequenza cardiaca, nella durata del potenziale d'azione e nella morfologia rispetto al cuore umano, rende lo zebrafish ulteriormente adatto per lo studio di patologie cardiache.

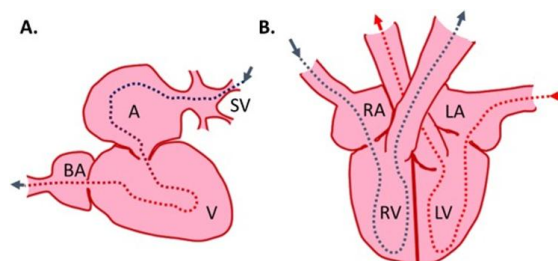


Figura 3: A: rappresentazione del cuore di zebrafish, con atrio (A) e ventricolo (V). B: rappresentazione del cuore umano, con quattro camere: atrio destro (RA), ventricolo destro (RV), atrio sinistro (LA) e ventricolo sinistro (LV). Da Benslimane et al., 2020.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Real time PCR

La *real time* PCR, definita anche *quantitative* PCR (qPCR), è una tecnica che permette di monitorare in tempo reale l'espressione del gene di interesse, tramite l'uso di sonde specifiche coniugate a fluorofori o di agenti fluorescenti intercalanti al doppio filamento di DNA (generalmente viene utilizzato il SYBR green). La quantità di amplicone può essere assoluta o relativa ad un gene di controllo, e viene definita monitorando il cambiamento diretto o indiretto della fluorescenza. Vi è differenza tra la PCR tradizionale e la *real time*. La prima non può essere definita quantitativa in quanto non è in grado di determinare con esattezza la quantità degli stampi prima della reazione di amplificazione. Questo accade perché l'analisi dei campioni avviene solo alla fine del processo, ovvero nella fase di *plateau* (in cui la velocità di sintesi delle nuove molecole ha raggiunto l'equilibrio). Nella qPCR, invece, è possibile monitorare l'amplificazione alla fine di ogni ciclo; in questo modo si ha la certezza di avere una proporzionalità diretta con la quantità di campione aggiunto all'inizio del processo, in quanto si ha la possibilità di analizzare il campione durante la crescita esponenziale (superata questa fase si perde la proporzionalità). La quantificazione viene determinata mettendo in relazione il numero di cicli di amplificazione necessari affinché diventi rilevabile il prodotto di PCR (detto *threshold cycle*, C_t , o *quantification cycle*, C_q) con la quantità di stampo all'inizio della reazione. Esistono essenzialmente due metodi di *real time* PCR. Il più semplice si basa sull'utilizzo di intercalanti che, una volta inseriti all'interno del doppio filamento di DNA, emanano fluorescenza. Il segnale è direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione, quindi il segnale aumenterà ciclo dopo ciclo secondo un andamento sigmoidale. Questo metodo è efficace, semplice e relativamente economico, tuttavia non ci permette di discriminare gli aspecifici. Tale problema però può essere evitato attraverso l'utilizzo di un terzo *reporter* fluorescente che si andrà ad ibridare con l'amplicone di interesse. Un esempio è il metodo TaqMan, in cui la sonda presenta un fluorocromo ad alta energia (*reporter*) all'estremità 5' e un fluorocromo a bassa energia (*quencher*) all'estremità 3', il quale ha la funzione di annullare l'emissione della fluorescenza tramite il processo di *fluorescence resonant energy transfer* (FRET). L'attività esonucleasica 5'→3' della DNA polimerasi determinerà l'allontanamento dei due fluorofori; di conseguenza il *reporter* sarà in grado, dopo essere stato eccitato da un laser, di emettere fluorescenza. Come detto precedentemente, esistono essenzialmente due modi per determinare la quantità di template: assoluto o relativo. La quantificazione assoluta viene effettuata attraverso l'utilizzo di una curva standard di calibrazione in cui vengono messi in relazione il numero di cicli di amplificazione e l'intensità della fluorescenza emessa. La quantificazione relativa, invece, si basa sulla normalizzazione della quantità del gene in esame con la quantità di un gene di controllo, il cui livello di espressione è il medesimo in ogni campione che si sta analizzando.

In questo studio è stata applicata la metodica basata sull'utilizzo di intercalanti fluorescenti; nello specifico, nella miscela è stato utilizzato il SYBR Green. I primer utilizzati sono stati progettati dal software Primer-Blast, mentre la loro specificità di sequenza è stata determinata mediante analisi della curva di fusione ed elettroforesi su gel di agarosio degli ampliconi. I saggi sono stati condotti in

triplicato utilizzando come geni di controllo *HPRT* (codificante ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi) e *GAPDH* (codificante gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi); il controllo qualità è stato valutato introducendo in ciascuna corsa un campione senza stampo e/o senza trascrittasi inversa.

2.2 Immunoistochimica

L'immunoistochimica è una metodica che permette di identificare la distribuzione intra ed extracellulare delle proteine in esame in un tessuto di interesse e, in maniera indiretta, di definire la loro abbondanza. La tecnica si basa sull'utilizzo di anticorpi coniugati a sistemi di rivelazione enzimatici (perossidasi, fosfatasi alcalina, β galattosidasi) o fluorescenti (fluorocromi), i quali possono essere osservati mediante la formazione di un precipitato colorato o mediante microscopia in fluorescenza. La rilevazione può essere diretta o indiretta, a seconda di quale tipologia di anticorpo permetta la rilevazione dell'antigene in esame; nel primo caso la molecola di rilevazione è coniugata all'anticorpo primario, nel secondo caso è coniugata all'anticorpo secondario (Figura 4). Il grande vantaggio della colorazione indiretta è l'amplificazione del segnale dovuto ai molteplici anticorpi secondari anti-FC specifici per la porzione costante della catena pesante del singolo anticorpo primario legato alla proteina di interesse. Per far sì che questo avvenga è necessario che la molecola da ricercare venga riconosciuta da anticorpi prodotti da un animale immunizzato contro tale molecola, mentre nella colorazione indiretta è necessario che gli anticorpi secondari vengano prodotti in organismi di diversa specie. Per prima cosa il campione deve essere fissato in formaldeide o paraformaldeide, in maniera tale da preservare la morfologia delle cellule e dei tessuti; in questo modo si impedisce la diffusione delle molecole e si è in grado di mantenere l'antigene di interesse nella posizione originaria. A questo punto è necessario permeabilizzare il campione utilizzando detergenti come digitonina o triton X, a seconda della localizzazione subcellulare dell'antigene. È possibile riunire il processo di fissazione e permeabilizzazione in un unico passaggio utilizzando solventi organici come metanolo e acetone; in questo caso viene mantenuta l'architettura interna della cellula, ma a volte la morfologia delle cellule cambia. Infine, il campione viene sottoposto all'azione degli anticorpi tramite incubazione (un passaggio nel caso del metodo diretto, due nel caso del metodo indiretto – alla fine di ciascun processo il campione viene lavato con un tampone in maniera tale da eliminare l'eccesso di anticorpi).

In questo studio i campioni di tessuto precedentemente inclusi in paraffina sono stati deparaffinati, tagliati in sezioni sottili (3-4 mm) e pretrattati per il recupero dell'antigene. Per fare questo le sezioni sono state poste in tampone citrato 0.01 M a pH 6.0 e scaldate in microonde per 10 minuti. Successivamente, sono state sottoposte a lavaggio con tampone fosfato 0.1 M a pH 7.2 ed incubazione in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) per 20 minuti. Lo scopo dell'esperimento è quello di visualizzare la distribuzione e determinare l'abbondanza di galectina-3 e CD98 in aree del campione costituite da miocardio che non presenta anomalie strutturali; per questo motivo sono stati utilizzati come anticorpi anti-GAL3 (1:25), anti-CD98 (1:5000), anti-CD68 (1:200) ed anticorpi primari diluiti. La colorazione dei nuclei è stata effettuata mediante ematossilina di Harris.

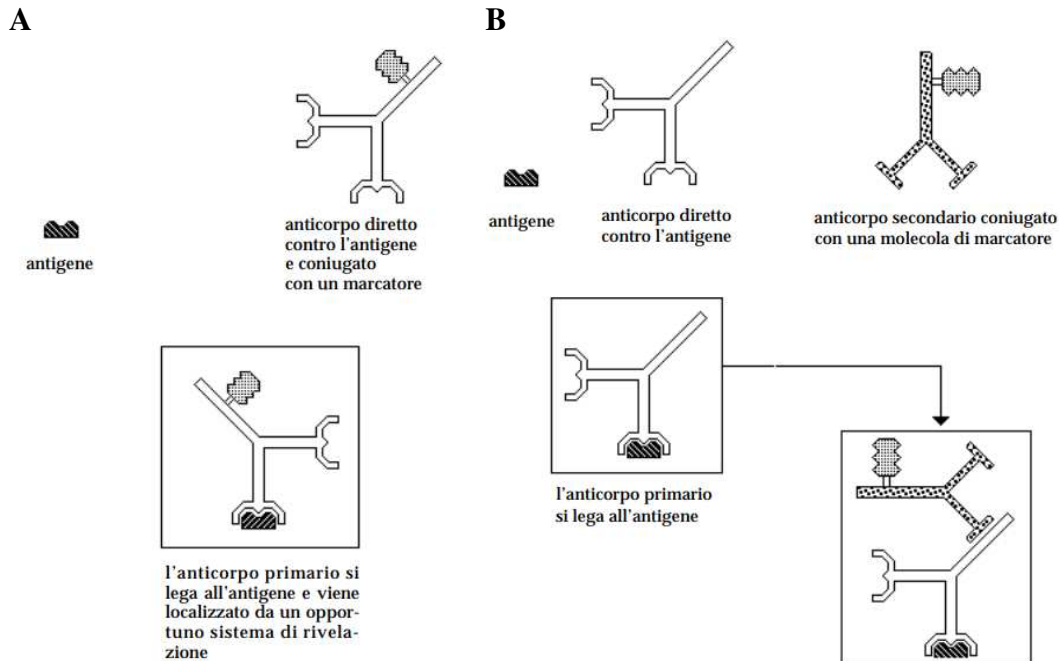


Figura 4: A: Metodo di rivelazione diretto. B: Metodo di rivelazione indiretto. Figura da Muzi P., Bologna R., *Tecniche di immunoistochimica. Un manuale operativo essenziale*. Genova, Medical Systems S.p.A., 1999.

2.3 Trattamento farmacologico in zebrafish

Gli zebrafish sono stati allevati presso la Zebrafish Facility dell'Università di Padova, in condizioni standard e secondo le leggi nazionali e le normative UE sul benessere degli animali (autorizzazione numero 407/2015-PR). Per l'analisi *in vivo* della via di segnale Wnt è stata utilizzata la linea transgenica $Tg(Tg(7xTCF-Xla.Sia:GFP)^{ia44}$, reporter di Wnt. Per l'analisi delle vie di segnale TGF β e Hippo/YAP-TAZ sono state utilizzate le linee transgeniche $Tg(12xSBE:EGFP)^{ial6}$ e $Tg(Hsa.CTGF:EGFP)^{ia48}$, rispettivamente.

Diversi studi hanno ipotizzato una correlazione tra attività di GAL3 e regolazione della via di segnale Wnt, e quindi una possibile influenza da parte di tale proteina sulla progressione della malattia. Per vedere quali fossero gli effetti della sotto-regolazione di *Igals3* sulla patogenesi della AC è stato utilizzato TD139 (PUBChem 73774610), un composto inibitore che bersaglia il sito di legame del glicano di GAL3, presente a livello del dominio di riconoscimento del carboidrato (CRD, *carbohydrate-recognition domain*). Gli embrioni trattati e di controllo sono stati allevati in acqua con 0.003% PTU (1-fenil-2-tiourea) in maniera tale da prevenire la pigmentazione. L'analisi del fenotipo è stata effettuata a 1, 2 e 3 giorni dopo la fecondazione (dpf); nello specifico, sono state analizzate le vie di segnale Wnt, TGF β e Hippo/YAP-TAZ tramite analisi quantitativa della fluorescenza emessa da GFP, la distribuzione della desmoplachina tramite immunofluorescenza e l'integrità e la localizzazione dei desmosomi tramite analisi al TEM (microscopio elettronico a trasmissione).

3. RISULTATI

3.1 Profilo di espressione genica prima dello sviluppo del fenotipo AC

Al fine di studiare il profilo di espressione genica nella fase iniziale della AC, quindi in assenza di anomalie a livello della struttura del miocardio o di un chiaro fenotipo patologico, sono stati analizzati 4 topi transgenici che sovra-esprimevano la mutazione N271S della desmogleina-2 (TgNS). Come campioni di controllo sono stati utilizzati 2 topi *wildtype* (WT) e 3 topi che sovra-esprimevano la variante *wildtype* della desmogleina-2 (TgWT). Tutti gli organismi in esame al momento dell'analisi avevano la medesima età, ovvero <2 settimane o >3 settimane.

L'analisi RNAseq ha identificato 29 geni differentemente espressi (DEGs) nei topi transgenici TgNS: 10 sovra-espressi e 19 sotto-espressi. Tali geni sono principalmente coinvolti nei processi di risposta allo stimolo e nei processi cellulari e metabolici. In particolar modo, l'espressione del gene codificante la galectina-3 (*Lgals3*) è risultata significativamente diminuita rispetto ai campioni WT e TgWT. Tali risultati e precedenti studi, che dimostravano una correlazione tra GAL3, DSG-2 e regolazione della via Wnt, hanno permesso di ipotizzare un eventuale ruolo di GAL3 nella patogenesi della malattia. Per convalidare i risultati sopra riportati sono state effettuate le analisi di *real time* PCR e Western Blot di un campione di tessuto ventricolare proveniente da un organismo TgNS. È stata osservata una drastica riduzione di espressione del gene *Lgals3* negli organismi con età inferiore a 2 settimane rispetto a WT e TgWT (di circa 4 volte); tale risultato però non è stato riscontrato in organismi di età superiore a 3 settimane, di fatto l'analisi quantitativa non ha mostrato alcuna differenza rispetto ai controlli.

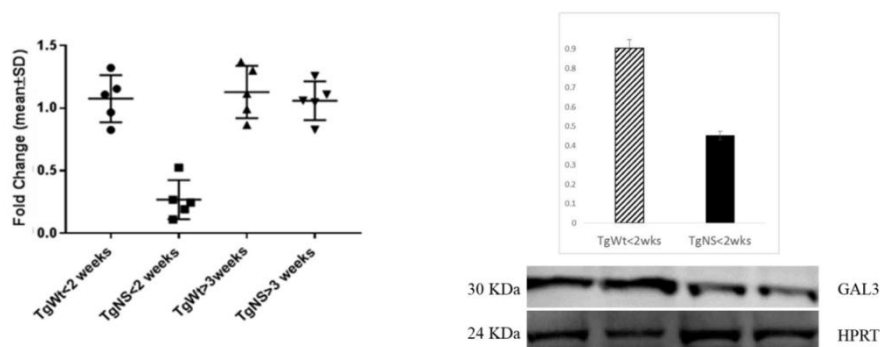


Figura 5: Risultati dell'analisi qPCR e Western Blot. Si nota una differente espressione di GAL3 a seconda dell'età (<2 o >3 settimane) e della tipologia di campione analizzato (TgWT o TgNS). HPRT è un gene *housekeeping* utilizzato per standardizzare la quantificazione di GAL3.

Ulteriori studi di espressione sono stati effettuati a livello umano, analizzando tramite immunostochimica la distribuzione di GAL3 nel tessuto cardiaco proveniente da pazienti AC nelle prime o ultime fasi della malattia, deceduti per morte cardiaca improvvisa; pazienti deceduti per trauma sono stati utilizzati come campione di controllo. È stata riscontrata una minore espressione di GAL3 a livello dei dischi intercalari nei pazienti allo stadio iniziale rispetto al campione di controllo, mentre non è stata osservata alcuna differenza significativa nei pazienti allo stadio avanzato.

L'analisi istologica ha inoltre permesso di caratterizzare i principali protagonisti della risposta infiammatoria. La fase infiammatoria acuta e gli stadi più avanzati sono caratterizzati dalla presenza di cellule CD68⁺ e CD98⁺. Al contrario, la fase

iniziale (in cui GAL3 è assente) è caratterizzata dalla sola presenza di cellule CD98⁺, come accade nei campioni di controllo. CD98 è una glicoproteina altamente espressa nei macrofagi quando attivata dal legame con GAL3.

Per determinare il potenziale ruolo di *LGALS3* come biomarcatore sono stati effettuati esami ematologici in 40 pazienti AC che presentavano varianti desmosomiche patogene o potenzialmente patogene. I livelli di *LGALS3* sono risultati significativamente aumentati rispetto ai controlli, suggerendo un potenziale ruolo di GAL3 nei processi di guarigione.

3.2 Alterazioni in seguito a trattamento farmacologico

Studi precedenti hanno dimostrato che GAL3 è coinvolta nella regolazione dell'attività dell'enzima GSK3 β , portando alla soppressione del segnale Wnt ed a una progressione della malattia (Song et al., 2009). Per comprendere meglio gli effetti della sotto-regolazione dell'espressione di *Lgals3* sulla progressione della malattia, sono stati effettuati dei trattamenti farmacologici in linee reporter Wnt-transgeniche di zebrafish. In particolare, è stato utilizzato il composto TD139, un inibitore selettivo di GAL3 che lega il dominio di riconoscimento del carboidrato (CRD) a livello dei residui di arginina (Arg48 e Arg73).

Tramite analisi al microscopio a fluorescenza è stato possibile osservare *in vivo* una netta diminuzione della fluorescenza di GFP corrispondente all'espressione della via di segnale Wnt in embrioni di 2 e 3 dpf (*days post fertilization*) in seguito al trattamento farmacologico. Il medesimo risultato viene ottenuto trattando gli embrioni con Xav, un noto inibitore della via Wnt, usato come controllo positivo per confermare che la riduzione di espressione di GAL3 porta alla soppressione di questa via di segnale.

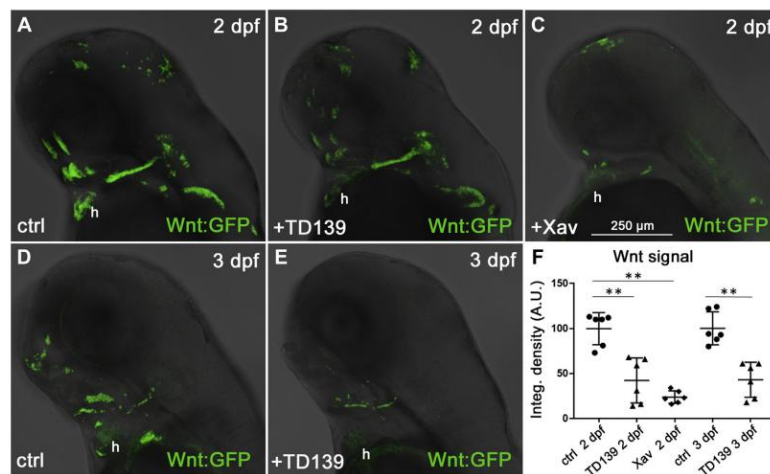


Figura 6: A-E: variazione della fluorescenza nei campioni trattati farmacologicamente; F: analisi quantitativa della fluorescenza correlata alla via di segnale Wnt.

Ulteriori analisi basate sull'utilizzo di TD139 sono state effettuate in linee transgeniche di zebrafish, reporter di TGF β e Hippo/YAP-TAZ. In seguito a inibizione dell'attività di GAL3 utilizzando il composto TD139, è stato possibile osservare una riduzione di espressione della via di segnale TGF β e un innalzamento della via di segnale Hippo/YAP-TAZ. Tali risultati suggeriscono una possibile interconnessione tra le varie vie di segnale.

Valutando la distribuzione di desmoplachina tramite immunofluorescenza e analizzando l'ultrastruttura dei desmosomi in seguito a trattamento con TD139, è stato possibile ipotizzare che l'inibizione di GAL3 determini variazioni strutturali a livello del desmosoma. La somministrazione del farmaco in embrioni 2 dpf di zebrafish ha provocato una distribuzione non omogenea di desmoplachina a livello delle membrane plasmatiche delle cellule epidermiche (indicata dalle frecce bianche nella Figura 7). La riduzione di espressione di tale proteina è stata confermata dall'analisi quantitativa della fluorescenza.

Sono state effettuate analisi sulla struttura e sulla distribuzione dei desmosomi a livello delle cellule epidermiche tramite indagini ultrastrutturali. I risultati hanno evidenziato la disconnessione di tali strutture dal citoscheletro, la loro distribuzione non uniforme e il fenotipo "pallido" delle placche cellulari interne ed esterne. Inoltre, le immagini hanno messo in evidenza la presenza di cellule in necrosi. In conclusione, tali risultati hanno permesso di ipotizzare un ruolo funzionale di GAL3 nel mediare la corretta organizzazione delle strutture desmosomali e la precisa localizzazione delle proteine di cui fanno parte.

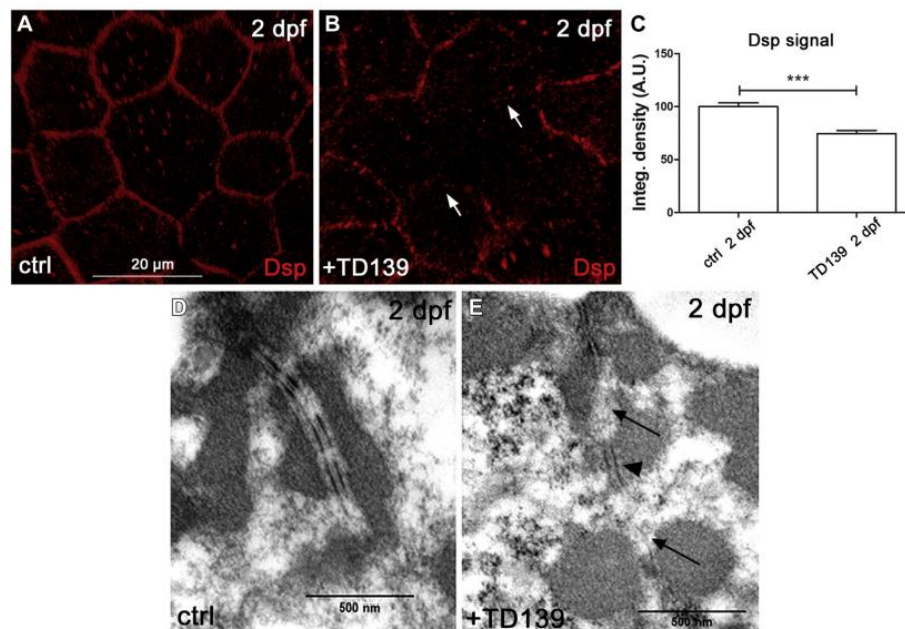


Figura 7: A-B: riduzione della distribuzione di desmoplachina (segnale rosso) in campioni di zebrafish di 2 dpf trattati con TD139; C: analisi quantitativa della fluorescenza della desmoplachina in campioni di controllo e campioni trattati con TD139. D-E: immagine al TEM dell'ultrastruttura desmosomale a livello delle giunzioni cellulari epidermiche in embrioni di zebrafish di 2 dpf.

3.3 Varianti genetiche rare di *LGALS3*

Allo scopo di valutare il contributo delle varianti genetiche di *LGALS3* sulla patogenesi di AC, è stato effettuato il sequenziamento genico di una coorte di 150 pazienti. L'analisi ha identificato la presenza di 4 varianti missenso (c.29 C>T, c.137C>G, c.137C>G, c.485G>A), ovvero quattro tipologie diverse di mutazione nel filamento di DNA che portano ad alterazioni della tripletta e dell'amminoacido da essa codificato. Tra queste, solo la variante c.485G>A (caratterizzata dalla sostituzione di G con A) determina la perdita di funzione di GAL3. La sostituzione dell'amminoacido provoca una notevole riorganizzazione spaziale del sito di legame CRD. Tale sito non è più in grado di formare legami

idrogeno con il ligando, determinando così la perdita di funzione della proteina. Per valutare l'impatto *in vivo* della variante missenso c.485G>A, sono state fatte delle iniezioni di RNA messaggeri umani relativi a *LGALS3* *wildtype* e mutato in embrioni di zebrafish di 1 dpf. L'mRNA *wildtype* ha provocato ritardo della crescita, dismorfismi e incremento della mortalità, mentre l'mRNA contenente la mutazione non ha portato ad alcuna variazione sullo sviluppo dell'embrione. In entrambi i casi la segnalazione Wnt non ha subito variazioni. Questi dati confermano che c.485G>A provochi la completa perdita della funzione di GAL3 e che la sovra-espressione della proteina *wildtype* abbia effetti negativi sull'embrione, causando problemi nello sviluppo.

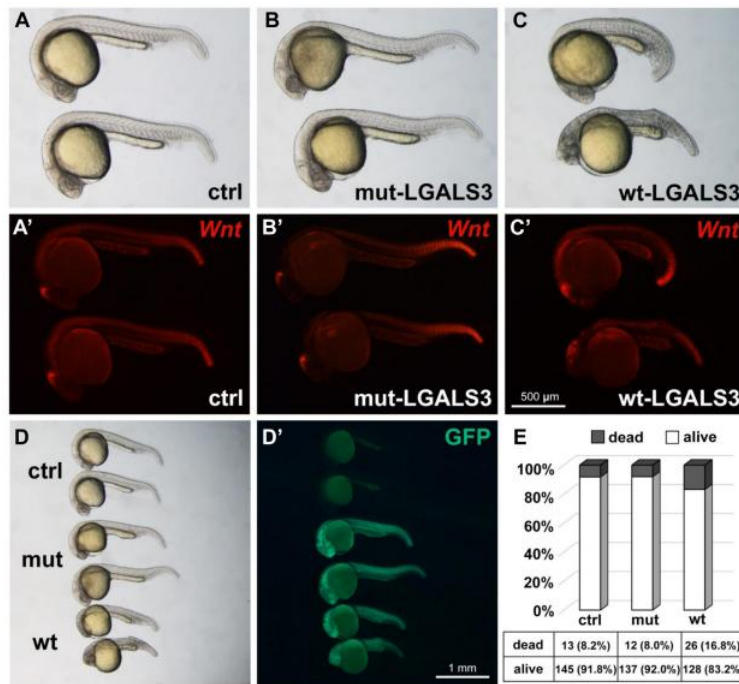


Figura 8: A-C: l'iniezione di *LGALS3* di tipo selvatico induce ritardo dello sviluppo e dismorfismi negli embrioni di zebrafish (C), rispetto all'iniezione di *LGALS3* mutato (B) o al controllo non iniettato (A). A'-C': la via di segnale Wnt non viene modificata. D-D': l'espressione di *LGALS3* viene monitorata dalla fluorescenza emanata da GFP. E: il grafico rappresenta la frazione di organismi deceduti per ciascuna tipologia di campione; è possibile notare una mortalità doppia nel caso dei campioni iniettati da *LGALS3* selvatico.

4. DISCUSSIONE

Lgals3 è un gene coinvolto in diversi processi cellulari, tra cui la regolazione del traffico cellulare delle glicoproteine, la segnalazione intracellulare e l'adesione cellulare. A livello cardiaco è stato dimostrato essere coinvolto nella formazione e stabilizzazione delle giunzioni intercellulari. Esso codifica GAL3, una proteina appartenente alla famiglia delle galectine, caratterizzata da un dominio CRD C-terminale, un sito di legame che presenta un motivo di sequenza conservato che conferisce affinità per i glicani contenenti β -galattoside. Questa proteina presenta due funzioni: si lega al dominio extracellulare della desmogleina-2 mediante il CRD, migliorando l'adesione intercellulare, e regola l'attività di GSK3 β , portando alla soppressione di Wnt.

4.1 GAL3 e adesione intercellulare

Diversi studi hanno dimostrato che le galectine possono agire sia da agonisti che da antagonisti sul processo di formazione e stabilizzazione delle giunzioni intercellulari, a seconda del loro livello di espressione, della loro posizione, della tipologia di recettori coinvolti, dal loro profilo di glicosilazione, e infine della forza di legame dell'interazione stessa (Hughes et al., 2001). È stato possibile notare questa doppia funzione regolatoria nell'esperimento che ha coinvolto l'utilizzo di topi transgenici e l'analisi del profilo di espressione genica, in cui i livelli di GAL3 variavano a seconda che la malattia fosse nella sua fase iniziale o avanzata. I risultati ottenuti in seguito a trattamento farmacologico degli embrioni di Zebrafish hanno anche suggerito un ruolo di GAL3 nella determinazione e stabilizzazione della struttura e funzionalità dei desmosomi. Infatti, nel momento in cui veniva a mancare l'espressione di GAL3 si assisteva alla generazione di desmosomi anomali e distribuiti in maniera irregolare, alla lesione e alla morte dei cardiomiociti, a causa della riduzione delle adesioni cellula-cellula.

4.2 GAL3 e via di segnale Wnt

È stato dimostrato che *LGALS3* sia un gene regolatore di GSK3 β , una serin-treonin chinasi costitutivamente attiva che agisce come regolatore negativo nel controllo della via di segnale Wnt, dell'omeostasi del glucosio e della regolazione dei fattori di trascrizione e dei microtubuli. Essendo una chinasi, agisce fosforilando i propri substrati. Nel caso della via di segnale Wnt, GSK3 β viene reclutata in un complesso multiproteico dove iper-fosforila la β -catenina a livello N-terminale, contrassegnandola per l'ubiquitinazione e la successiva degradazione tramite proteasoma (Dajani et al., 2003). In particolare, è stato dimostrato che una minore espressione di GAL3 porta ad una maggiore espressione di GSK3 β nella forma attiva e quindi ad un successivo aumento del processo di fosforilazione a livello della β -catenina (Song et al., 2009). I medesimi risultati sono stati ottenuti negli esperimenti con le linee transgeniche di zebrafish, in cui il trattamento farmacologico portava ad una riduzione di GAL3 e ad una successiva soppressione della via di segnale Wnt. I risultati mostrano come una mutazione a livello di un gene desmosomiale determini la soppressione della via Wnt/ β -catenina e la sotto-regolazione di *Lgals3* nelle prime fasi della malattia. Il processo infiammatorio così innescato provoca l'aumento di GAL3 a livello sistemico a causa di un processo a feedback mediato dall'attivazione alternativa dei macrofagi CD98⁺ nel tentativo di controbilanciare la destabilizzazione del complesso desmosomiale.

4.3 Varianti genetiche rare di *LGALS3*

Il sequenziamento dell'esoma ha dimostrato la presenza di quattro varianti missenso rare altamente conservate a livello del gene *LGALS3* le quali potevano determinare variazioni della struttura proteica di GAL3, fino a determinare la completa perdita di funzione (come accade con la mutazione c.485G>A). I dati raccolti suggeriscono una possibile associazione tra i bassi livelli di espressione del gene e la perdita di funzione della proteina dovuta alla presenza delle mutazioni a livello del dominio CRD. I dati raccolti non hanno mostrato alcuna differenza di effetto sulla patogenesi in seguito alla sovraespressione di c.485G>A rispetto ai controlli *wildtype* in zebrafish. Tutt'altro effetto si ottiene sovraesprimendo la variante non mutata di *LGALS3*: gli embrioni di zebrafish iniettati con tale mRNA mostravano ritardo della crescita, dismorfismi ed incremento

della mortalità. Tali risultati suggeriscono che la perdita di funzione di GAL3 dovuta alla presenza di mutazioni missenso vada ad influenzare l'espressione della via di segnale Wnt e successivamente vada a gravare sulle adesioni cellulari, rendendo i soggetti portatori della variante genica più suscettibili all'AC.

4.4 Infiammazione, riparazione delle ferite ed insufficienza cardiaca

Studi precedenti hanno dimostrato un collegamento tra GAL3, macrofagi e fibrosi (Corrado et al., 2017). I processi infiammatori innescati in seguito a danno del tessuto miocardico portano ad aumento dei livelli di espressione di GAL3; tale processo determina successivamente l'attivazione alternativa dei macrofagi, il rimodellamento cardiaco e l'attivazione dei geni pro-fibrotici, i quali stimolano la produzione di matrice e la riparazione delle ferite tramite la produzione di cicatrici. In conclusione, l'aumento di GAL3 è stato associato a fibrosi ed insufficienza cardiaca, anche se a causa della sua doppia funzione (positiva e negativa) sull'assemblaggio e la stabilizzazione delle giunzioni intercellulari, la riduzione o l'aumento di GAL3 possono portare ad effetti deleteri opposti. In particolare, in questo studio è stato dimostrato che il suo aumento provoca un incremento dei tassi di mortalità, mentre la sua riduzione un assemblaggio aberrante dei desmosomi.

Le analisi del sangue dei 40 pazienti con AC hanno confermato il fatto che i monociti e i macrofagi reclutino GAL3 nei processi di guarigione e nei processi fibrogenici in quanto l'espressione di *LGALS3* risultava nettamente aumentata rispetto ai controlli. Le analisi istochimiche hanno inoltre confermato il reclutamento delle cellule CD98⁺ nella fase acuta della malattia. Tali risultati supportano l'ipotesi che i macrofagi rilascino grandi quantitativi di GAL3 nella regione cardiaca lesa per stabilizzare il complesso desmosomiale, suggerendo un potenziale ruolo di tale proteina nel processo di guarigione.

Le analisi ematiche sono state fatte con lo scopo di determinare il potenziale ruolo di *LGALS3* come biomarcatore, ma recentemente è stata sostenuta l'idea che i livelli sierici di *LGALS3* potrebbero non essere specifici solo di questa malattia, ma che potrebbero riflettere le condizioni di guarigione e fibrotiche generali. Infatti, la variazione dei livelli di GAL3 (inizialmente assente e poi presente in grosse quantità) è un processo che caratterizza altre condizioni, come ad esempio le lesioni a livello epidermico.

5. CONCLUSIONI

In conclusione, possiamo dire che gli studi condotti hanno dimostrato che GAL3 ha un ruolo ben definito nella patogenesi di AC, in quanto la riduzione dei suoi livelli di espressione causano la formazione di giunzioni cellulari aberranti, la soppressione della via Wnt/ β -catenina e l'attivazione dei processi pro-fibrotici. Tra i vari scopi, lo studio ha cercato di analizzare in modo approfondito il ruolo di GAL3 per comprendere se tale proteina potrebbe essere utilizzata come biomarcatore della AC, ma il fatto che non abbia un'espressione costante e stabile (i livelli di espressione variano a seconda della fase della malattia) e il fatto che non sia specifico esclusivamente per AC, rendono GAL3 non totalmente idoneo a tale scopo. In futuro si potrebbero condurre degli esperimenti volti a chiarire ulteriormente il ruolo di GAL3 nella fase iniziale della patologia e per identificare degli inibitori specifici delle galectine in maniera tale da utilizzarli durante le cure mediche dei pazienti AC-positivi, al fine di regolare i processi infiammatori e la progressione della malattia.

BIBLIOGRAFIA

- Benslimane FM, Zakaria ZZ, Shurbaji S, Abdelrasool MKA, Al-Badr MAHI, Al Absi ESK, Yalcin HC. Cardiac function and blood flow hemodynamics assessment of zebrafish (*Danio rerio*) using high-speed video microscopy. *Micron*. 2020 Sep;136:102876. doi: 10.1016/j.micron.2020.102876. Epub 2020 May 19. PMID: 32512409.
- Corrado D, Basso C, Judge DP. Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circ Res*. 2017 Sep 15;121(7):784-802. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309345. PMID: 28912183.
- Dajani R, Fraser E, Roe SM, Yeo M, Good VM, Thompson V, Dale TC, Pearl LH. Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex. *EMBO J*. 2003 Feb 3;22(3):494-501. doi: 10.1093/emboj/cdg068. PMID: 12554650; PMCID: PMC140752.
- Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Aug;1(2):a002543. doi: 10.1101/cshperspect.a002543. PMID: 20066089; PMCID: PMC2742091.
- Gauvrit S, Bossaer J, Lee J, Collins MM. Modeling Human Cardiac Arrhythmias: Insights from Zebrafish. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2022 Jan 5;9(1):13. doi: 10.3390/jcdd9010013. PMID: 35050223; PMCID: PMC8779270.
- Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001; 83:667–676.
- Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, Basso C, Bauce B, Bluemke DA, Calkins H, Corrado D, Cox MG, Daubert JP, Fontaine G, Gear K, Hauer R, Nava A, Picard MH, Protonotarios N, Saffitz JE, Sanborn DM, Steinberg JS, Tandri H, Thiene G, Towbin JA, Tsatsopoulou A, Wichter T, Zareba W. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria. *Circulation*. 2010 Apr 6;121(13):1533-41. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.840827. Epub 2010 Feb 19. PMID: 20172911; PMCID: PMC2860804.
- Muzi P., Bologna R., *Tecnica di immunoistochimica. Un manuale operativo essenziale*. Genova, Medical Systems S.p.A., 1999.
- Song S, Mazurek N, Liu C, et al. Galectin-3 mediates nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signaling in human colon cancer cells by regulation of glycogen synthase kinase-3beta activity. *Cancer Res* 2009;69:1343–1349.
- Zhao G, Qiu Y, Zhang HM, Yang D. Intercalated discs: cellular adhesion and signaling in heart health and diseases. *Heart Fail Rev*. 2019 Jan;24(1):115-132. doi: 10.1007/s10741-018-9743-7. PMID: 30288656.

APPENDICE

Cason M, Celeggin R, Marinas MB, Beffagna G, Della Barbera M, Rizzo S, Remme CA, Bezzina CR, Tiso N, Bauce B, Thiene G, Basso C, Pilichou K. Novel pathogenic role for galectin-3 in early disease stages of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Heart Rhythm*. 2021 Aug;18(8):1394-1403. doi: 10.1016/j.hrthm.2021.04.006. Epub 2021 Apr 19. PMID: 33857645.

Novel pathogenic role for galectin-3 in early disease stages of arrhythmogenic cardiomyopathy



Marco Cason, MSc, PhD,^{*1} Rudy Celegghin, MSc, PhD,^{*1}
Maria Bueno Marinas, MSc, PhD,^{*} Giorgia Beffagna, MSc, PhD,^{*}
Mila Della Barbera, MSc, PhD,^{*} Stefania Rizzo, MD, PhD,^{*}
Carol Ann Remme, MD, PhD, FHRS,[†] Connie R. Bezzina, MSc, PhD, FHRS,[†]
Nataschia Tiso, MSc, PhD,[‡] Barbara Bauce, MD, PhD,^{*} Gaetano Thiene, MD, FHRS,^{*}
Cristina Basso, MD, PhD, FHRS,^{*} Kalliopi Pilichou, MSc, PhD^{*}

From the ^{*}Cardiovascular Pathology and Cardiology Units, Department of Cardiac-Thoracic-Vascular Sciences and Public Health, University of Padua, Padua, Italy, [†]Department of Experimental Cardiology, Amsterdam UMC, location AMC, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands, and [‡]Department of Biology, University of Padua, Padua, Italy.

BACKGROUND Arrhythmogenic cardiomyopathy (AC) is a myocardial disease due to desmosomal mutations whose pathogenesis is incompletely understood.

OBJECTIVE The purpose of this study was to identify molecular pathways underlying early AC by gene expression profiling in both humans and animal models.

METHODS RNA sequencing for differentially expressed genes (DEGs) was performed on the myocardium of transgenic mice overexpressing the *Desmoglein2-N271S* mutation before phenotype onset. Zebrafish signaling reporters were used for *in vivo* validation. Whole exome sequencing was undertaken in 10 genotype-negative AC patients and subsequent direct sequencing in 140 AC index cases.

RESULTS Among 29 DEGs identified at early disease stages, *Lgals3/GAL3* (lectin, galactoside-binding, soluble, 3) showed reduced cardiac expression in transgenic mice and in 3 AC patients who suffered sudden cardiac death without overt structural remodeling. Four rare

missense variants of *LGALS3* were identified in 5 human AC probands. Pharmacologic inhibition of *Lgals3* in zebrafish reduced Wnt and transforming growth factor- β signaling, increased Hippo/YAP-TAZ signaling, and induced alterations in desmoplakin membrane localization, desmosome integrity and stability. Increased *LGALS3* plasma expression in genotype-positive AC patients and CD98 activation supported the galectin-3 (GAL3) release by circulating macrophages pointing toward the stabilization of desmosomal assembly at the injured regions.

CONCLUSION GAL3 plays a crucial role in early AC onset through regulation of Wnt/ β -catenin signaling and intercellular adhesion.

KEYWORDS Arrhythmogenic cardiomyopathy; Gene expression; Inflammation; LGALS3; Transgenic models; Wnt signaling

(Heart Rhythm 2021;18:1394–1403) © 2021 Heart Rhythm Society. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

Arrhythmogenic cardiomyopathy (AC) is an inherited heart muscle disorder that causes life-threatening arrhythmias and cardiac sudden death, particularly in the young and in athletes.^{1–4} The inheritance pattern of the disease is mostly autosomal dominant with low penetrance.^{5–7} Despite recent advances in AC research, the molecular and cellular

mechanisms leading from an aberrant desmosomal protein to myocardial tissue replacement remain incompletely understood.

Animal-based studies previously demonstrated Wnt/ β -catenin inhibition leading to translocation of junction plakoglobin (JUP) protein from intercalated discs to the nucleus, where it acts as a β -catenin competitor.⁸ Wnt/ β -catenin

Funding sources: This work was supported by Regional Registry for Cardio-cerebro-vascular Pathology, Veneto Region, Venice, Italy; Ministry of Health Grants RF-2013-02356762 and RF-2014-00000394, Rome, Italy; Veneto Region Target Research, Venice 933/2015; PRIN Ministry of Education, University and Research 20173ZWACS, Rome, Italy; University Research Grants CPDA144300 and BIRD192170, Padua, Italy; and The Netherlands CardioVascular Research Initiative CVON Projects PREDICT2/CVON2018-30 and e-Detect/CVON2015-12. Disclosures: All authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose. ¹The first 2 authors contributed equally to this work. **Address reprint requests and correspondence:** Dr Cristina Basso, Cardiovascular Pathology Unit, Department of Cardiac-Thoracic-Vascular Sciences and Public Health, University of Padova-Azienda Ospedaliera di Padova, Via A. Gabelli, 61-35121 Padova, Italy. E-mail address: cristina.basso@unipd.it.

signaling suppression was also confirmed by the subsequent identification of a glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) inhibitor, which rescued the AC phenotype in zebrafish models, and by the discovery of aberrant Hippo/YAP signaling pathway activation leading to β -catenin cytoplasmic sequestration and JUP nucleus translocation.^{9–12} However, abnormal JUP nuclear translocation and decreased β -catenin activity are not sufficient to reproduce *in vitro* the AC phenotype.¹³

A systematic study in a transgenic AC mouse model was adopted to identify differentially expressed genes (DEGs) during the early disease stage.¹⁴ We found the galectin-3 (*LGALS3/GAL3*) gene as a regulator of Wnt/ β -catenin signaling pathway in early stages and validated its effects in zebrafish reporter lines. Mechanical and signaling functions of this molecule likely link cell-to-cell stabilization to myocardial injury, inflammation, and fibrogenesis, thereby constituting a potential biomarker of AC. Accordingly, pharmacologic inhibition of *Lgals3* in zebrafish reporter lines reduced Wnt signaling and induced alterations in desmoplakin (DSP) membrane localization. Thus, our findings demonstrate a potential role for GAL3 in early AC stages.

Materials and methods

Tissue samples collection

Myocardial samples of 4 transgenic mice without cardiac structural changes overexpressing the desmoglein-2 (*dsg2*) N271S mutation (TgNS<2wks) were collected. Age-matched, wild-type (WT) FVB/N strain littermates and overexpressing WT *dsg2* (TgWt) mice were used as controls to exclude interference of transgene expression.¹⁴

Paraffin-embedded heart tissue from genotype-positive AC patients was used for experimental validation, including patients who died in the concealed, acute, and overt phases of the disease. Control samples were derived from patients who died of trauma.

Human, zebrafish, and mouse samples were collected according to government and institutional guidelines. The protocols were approved by the University Hospital ethical committee (University of Padua) and the Animal Experimentation Commission of the Academic Medical Center (University of Amsterdam), respectively. All animal experiments conformed to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and adhered with the ARRIVE Guidelines for the care and use of laboratory animals. Human tissue studies were in compliance with the Declaration of Helsinki as revised in 2013.

Gene expression and ontology analysis

Transcriptome assembly and annotation, quantitative polymerase chain reaction, and western blot validation methods are described in the [Supplemental Materials and Methods](#).

Transcript abundance estimation was performed using Cufflinks Version 2.2.1 (open source software). For differential expression analysis at the gene level, DESeq2

(Bioconductor Version 1.6.3; open source software) with false discovery rate cutoff of 0.05 and log₂ fold-change (FC) cutoff of Log₂FC₁ \geq 2, Log₂FC₂ \leq -2 was used.

Gene ontology (GO) and molecular pathway analysis were carried out with the “Panther classification system” to analyze the main function of DEGs and to identify enriched biological themes within a gene dataset. Predicted protein-protein interaction networks based on DEGs were produced using STRING: Protein-Protein Interaction Networks (<http://string-db.org/>). Network statistics were obtained using the NetworkAnalyst tool (<http://www.networkanalyst.ca/>).

Zebrafish lines, chemical treatment, and whole-mount RNA *in situ* hybridization

Zebrafish (*Danio rerio*) embryos and adults were raised, staged, and maintained at the Zebrafish Facility of the University of Padua, under standard conditions and according to national laws and EU regulations on animal welfare. *In vivo* analyses of Wnt, transforming growth factor- β (TGF β), and Hippo/YAP-TAZ signaling and DSP protein detection are described in the [Supplemental Materials and Methods](#).

Genetic testing

Whole exome sequencing was performed in 10 selected AC patients negative for disease-related gene variants using the SureSelect Clinical Research Exome V2 kit (Agilent, Santa Clara, CA). Sanger sequencing of exon and exon-intron boundaries of *LGALS3* (lectin, galactoside-binding, soluble, 3; NM_002306.3) was performed on 140 index cases.

Results

Gene expression profile in TgNS mice before AC phenotype development

RNA-Seq analysis identified 10 overexpressed and 19 under-expressed genes in TgNS<2wks tissue compared to the age-matched control groups (2 Wt<2wks and 3 TgWt<2wks mice) ([Table 1](#)).

These 29 DEGs are mainly involved in cellular (27.3%, GO: 0009987, $P = .0434$) and metabolic (24.2%, GO: 0008152, $P = .000444$) processes, and response to stimulus (9.1%, GO: 0050896, $P = 9.68E-8$). This gene set was not of sufficient size to obtain significant functional enrichment by pathway analysis; therefore, DEGs were manually characterized based on literature search. The gene *Lgals3*, which was found to be significantly decreased in TgNS compared to Wt and TgWt hearts (Log₂FC = -4.01, $P = 1.38E-04$), is engaged in different biological events, tissues and plays a relevant role in cardiovascular diseases among other clinical conditions.¹⁵

GAL3 quantification in TgNS mice and AC human specimens

We hypothesized an early GAL3 role in disease pathogenesis, as previous studies showed that GAL3 directly binds to DSG2 and enhances intercellular adhesion,¹⁶ and that

Table 1 Transcriptional profile of TgNS<2wks compared to the age-matched control group (Wt and TgWt <2wks)

No.	Gene name	Log2FC	P value
1	<i>C2</i>	-5.27	7.44E-05
2	<i>Fbxl16</i>	-4.02	4.32E-05
3	<i>Lgals3</i>	-4.01	1.38E-04
4	<i>Sp</i>	-3.54	3.62E-05
5	<i>Syp</i>	-3.05	9.26E-06
6	<i>Cbr2</i>	2.97	6.09E-06
7	<i>4930481A15Rik</i>	2.95	6.12E-04
8	<i>Lrrn1</i>	2.78	2.04E-04
9	<i>Unc79</i>	-2.71	3.76E-04
10	<i>Slc22a3</i>	2.71	4.46E-05
11	<i>Cd163</i>	2.69	1.15E-05
12	<i>Capn6</i>	-2.67	6.40E-06
13	<i>Doc2b</i>	-2.63	4.40E-05
14	<i>Hif3a</i>	2.52	4.69E-05
15	<i>Mapk4</i>	-2.51	2.72E-06
16	<i>Tdrd9</i>	-2.49	8.04E-05
17	<i>Cybrd1</i>	-2.44	6.26E-05
18	<i>Kcnv2</i>	2.44	1.84E-05
19	<i>Mgl2</i>	2.38	3.65E-04
20	<i>Ms4a7</i>	-2.32	1.77E-04
21	<i>Tgfa</i>	-2.27	2.07E-05
22	<i>Lrat</i>	2.25	4.79E-04
23	<i>Erc2</i>	-2.24	1.19E-04
24	<i>Ptprv</i>	-2.22	1.02E-05
25	<i>Crispld1</i>	-2.16	6.67E-06
26	<i>Lrg1</i>	2.15	4.33E-05
27	<i>Tbx15</i>	-2.13	2.67E-04
28	<i>Scg3</i>	-2.12	5.08E-04
29	<i>Pex5l</i>	-2.02	2.11E-04

FC = fold=change; Wt = wild-type.

Lgals3 regulates GSK3 β activity leading to Wnt signaling suppression.¹⁷ Validating the RNA-Seq results, quantitative polymerase chain reaction analysis of ventricular tissue demonstrated an approximately 4-fold reduction in *Lgals3* mRNA expression in TgNS<2wks compared to Wt and TgWt of the same age. In contrast, no differences were observed in mice aged >3 weeks (Figure 1A). Western blot analysis confirmed that the observed decrease in *Lgals3* mRNA levels was accompanied by a significant reduction in GAL3 protein expression in ventricular tissue of TgNS<2 wks mice.

To extend these findings to human AC, we investigated GAL3 expression in paraffin-embedded heart tissue from control patients and genotype-positive patients with early and late disease stages. Immunohistochemical staining demonstrated GAL3 labeling in the intercalated discs of cardiomyocytes (Figure 1B).

Compared to control tissue, GAL3 expression was reduced in tissue from 3 young DSP and JUP carriers (7, 14, and 15 years, respectively) who suffered sudden death at early disease stages (ie, in the absence of fibrofatty replacement). In contrast, no significant changes of GAL3 expression were detected in patients with advanced AC stages (Figure 1B).

CD98 is a glycoprotein highly expressed in macrophages when alternatively activated by GAL3 binding. In the

absence of GAL3 (early disease stages), no CD98+ cells were observed, whereas during acute inflammatory response and in more advanced disease stages CD98+ macrophages were found (Figure 1B).

Wnt signaling inhibition following GAL3 inhibition in zebrafish

Previous studies have demonstrated a link between *Lgals3* and GSK3 β activity/Wnt signaling regulation,¹⁷ with aberrant GSK3 β distribution and Wnt suppression apparently key to explaining disease progression.¹⁰ To explore the potential functional consequences of reduced *Lgals3*/GAL3 expression, we inhibited GAL3 pharmacologically in zebrafish using the compound TD139, an inhibitor targeting the glycan binding pocket of GAL3 with high binding affinity for the arginine residues (Arg48 and Arg73) of the unique carbohydrate-recognition domain (CRD) of GAL3.¹⁸ The *in vivo* impact of TD139 on Wnt signaling was investigated in a transgenic Wnt reporter zebrafish line. TD139 administration into 2- and 3 day-old embryos led to reduced Wnt signaling activity as indicated by a significant decrease in Wnt-responsive fluorescent signal in the cardiac region comparable with that obtained by administration of Xav, a known Wnt signaling antagonist (Figure 2).

Reduced Wnt signaling also has been linked to TGF β and Hippo/YAP-TAZ signaling alterations.¹¹ In this setting, transgenic reporter zebrafish lines were treated by TD139 showing inhibition of GAL3 activity, reduced TGF β , and increased Hippo/YAP-TAZ signaling, confirming the interconnection among these pathways (Figure 3).

Alterations in desmosome structure following GAL3 inhibition in zebrafish

We next evaluated the distribution of Dsp after TD139 treatment. Two-day-old TD139-treated zebrafish embryos displayed abnormal Dsp localization in epidermal cells compared to controls. In particular, in treated embryos, Dsp was not equally distributed in the whole cell membrane but showed a focally reduced or absent signal (Figure 4B, arrows).

Desmosome integrity and localization were evaluated through ultrastructural investigation (Figure 4). In the epidermis of TD139-treated embryos, desmosomes appeared disconnected from the cytoskeletal complex and not regularly distributed (Figure 4E, arrows). Moreover, internal and external desmosomes plaques displayed a "pale" phenotype (Figure 4E, arrowhead) compared to controls. Taken together, these observations indicate a functional role for Gal3 in mediating proper desmosomal structure and integrity, as well as colocalization with desmosomal proteins.

LGALS3 expression in blood samples of AC patients

To determine the potential of *LGALS3* as a biomarker, we assessed a series of 40 AC patients who fulfilled the Task Force

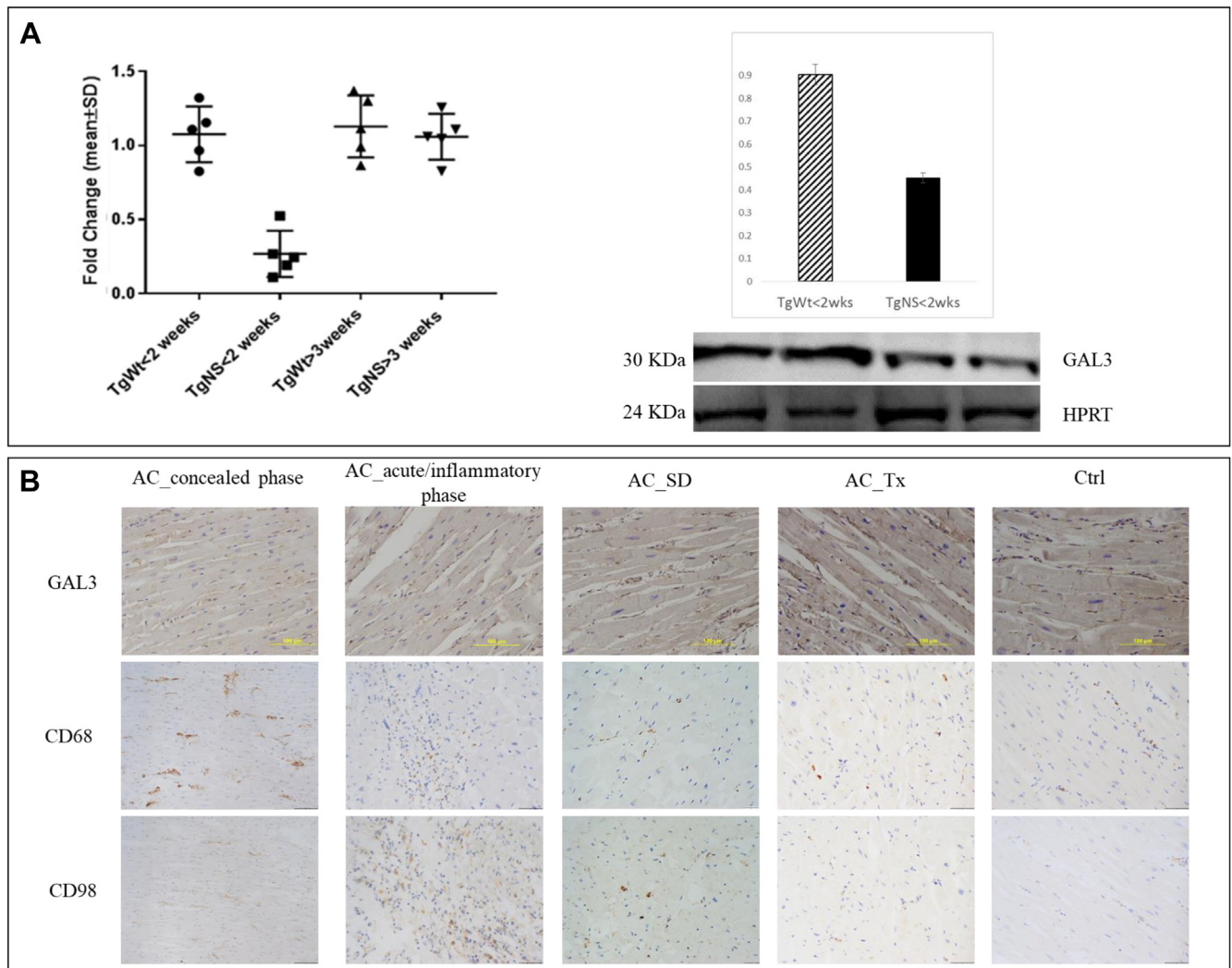


Figure 1 **A:** *Lgals3* and Gal3 reduction in TgNS<2 weeks mice by quantitative polymerase chain reaction and western blotting. **B:** Immunohistochemistry analysis performed on myocardial tissues of patients with arrhythmogenic cardiomyopathy (AC) at early-stage disease showed galectin-3 (GAL3) reduction at the intercalated discs in comparison with control samples and end-stage AC myocardium. Massive inflammatory response in acute-stage disease is characterized by CD68⁺ and CD98⁺ cells, whereas in the early-stage disease CD98⁺ cells, designating alternatively activated macrophages, are completely missing, similar to the control samples (Ctrl). SD = sudden death; Tx = transplantation.

Criteria (TFC)⁵ and carried desmosomal pathogenic/likely pathogenic variants. Significantly increased levels of *LGALS3* were found in the blood of patients compared to controls (Log₂FC = 5.02, *P* = 1.50E-03), confirming GAL3 recruitment during healing processes as reported in a previous study.¹⁹

***LGALS3* rare genetic variants in AC index cases**

To determine whether genetic variants in *LGALS3* may contribute to AC, we performed genetic sequencing in a cohort of 150 AC index cases identifying 5 *LGALS3* missense variant carriers (4%; 4 males; mean age 39 ± 11 years) (Table 2).

All 4 *LGALS3* rare missense variants were highly conserved among species (with maximum and positive PhastCons and PhyloP scores, respectively) and predicted by *in silico* tools to affect the protein structure. Of note, we

found the rare missense variant c.485G>A, which occurred in the unique CRD of GAL3 conferring the loss of its function (Figure 5).

Ad hoc assessment of the genetic burden in *LGALS3* demonstrated a large excess of rare nonsynonymous variants among our AC cohort compared to the general population (Table 3). The analysis highlighted a 5.8-fold enrichment of *LGALS3* rare variants in our AC patients (Fisher exact test, *P* = 2.10E-03).

Functional analysis of the *LGALS3* c.485G>A variant in zebrafish

To assess the *in vivo* impact of the rare missense variant c.485G>A located in the unique CRD of GAL3, we injected human WT *LGALS3* mRNA in zebrafish embryos, which caused growth delay, dysmorphology, and increased mortality compared to control-injected sibs. This suggests

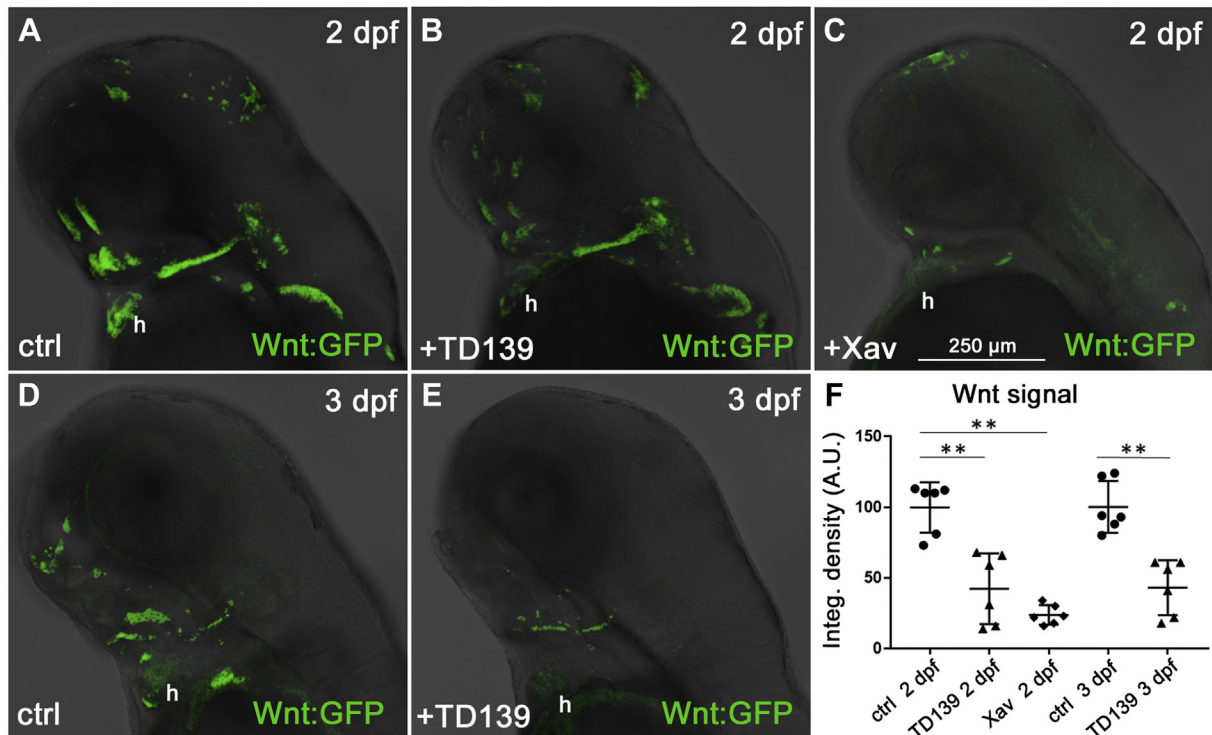


Figure 2 Inhibition of Gal3 decreases Wnt signaling *in vivo*. **A–C**: Two-day treatment of Wnt reporter zebrafish embryos with the Gal3 inhibitor TD139 induces a decrease of Wnt-responsive signal (green fluorescence; compare **B** with **A**). **C**: The Wnt inhibitor Xav was used as positive control for Wnt inhibition. **D, E**: Three-day treatment with TD139 confirms a strong Wnt signaling decrease. All images show the head region of 2 or 3 days-post-fertilization (dpf) embryos in the lateral view, anterior to the left. h = heart region. **F**: Quantitative analysis of Wnt-related fluorescence, shown as integrated (Integ.) density expressed in arbitrary units (A.U.). Statistical test: One-way analysis of variance followed by Tukey test. $**P < .001$. n = 6 measurements per condition. GFP = green fluorescence protein. ctrl = control.

interfering, dominant negative, or overexpression-induced effects on zebrafish development. In contrast, injection of the c.485G>A *LGALS3* variant had no detectable effects on embryonic growth, morphology, and mortality. Wnt

signaling seemed to remain unmodified under all conditions. These data confirm that c.485G>A in *LGALS3* results in complete loss of function of GAL3, in line with the *in silico* prediction (Figure 6).

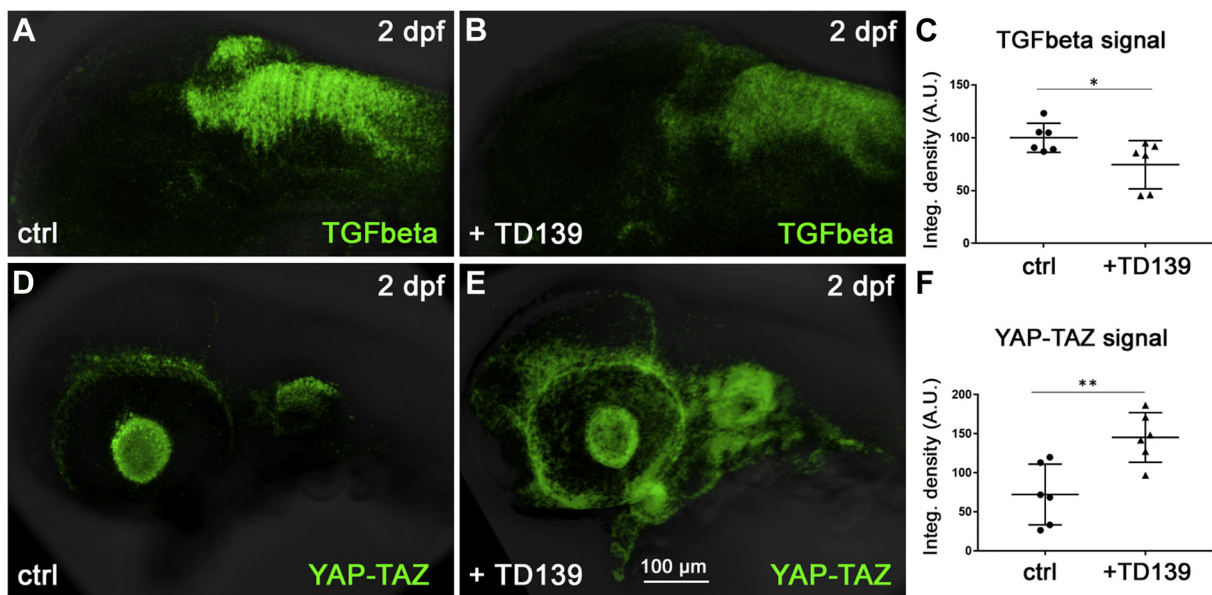


Figure 3 Gal3 inhibition reduces transforming growth factor-beta (TGFβ) signaling and increases Hippo/YAP-TAZ signaling in zebrafish embryos. **A–C**: TGFβ signaling, analyzed in a zebrafish TGFβ reporter line (green signal), appears reduced upon TD139 treatment. **D–F**: YAP-TAZ signaling, analyzed in a zebrafish YAP-TAZ reporter line (green signal), appears increased upon TD139 treatment. **A, B, D, E**: 2 days-post-fertilization (dpf) zebrafish heads in lateral view, anterior to the left. Scale bar in **E** applies to all panels. **C, F**: Integrated (Integ.) density of the signals expressed as arbitrary units (A.U.). $*P < 0.05$; $**P < .01$. n = 6 measures per condition. ctrl = control.

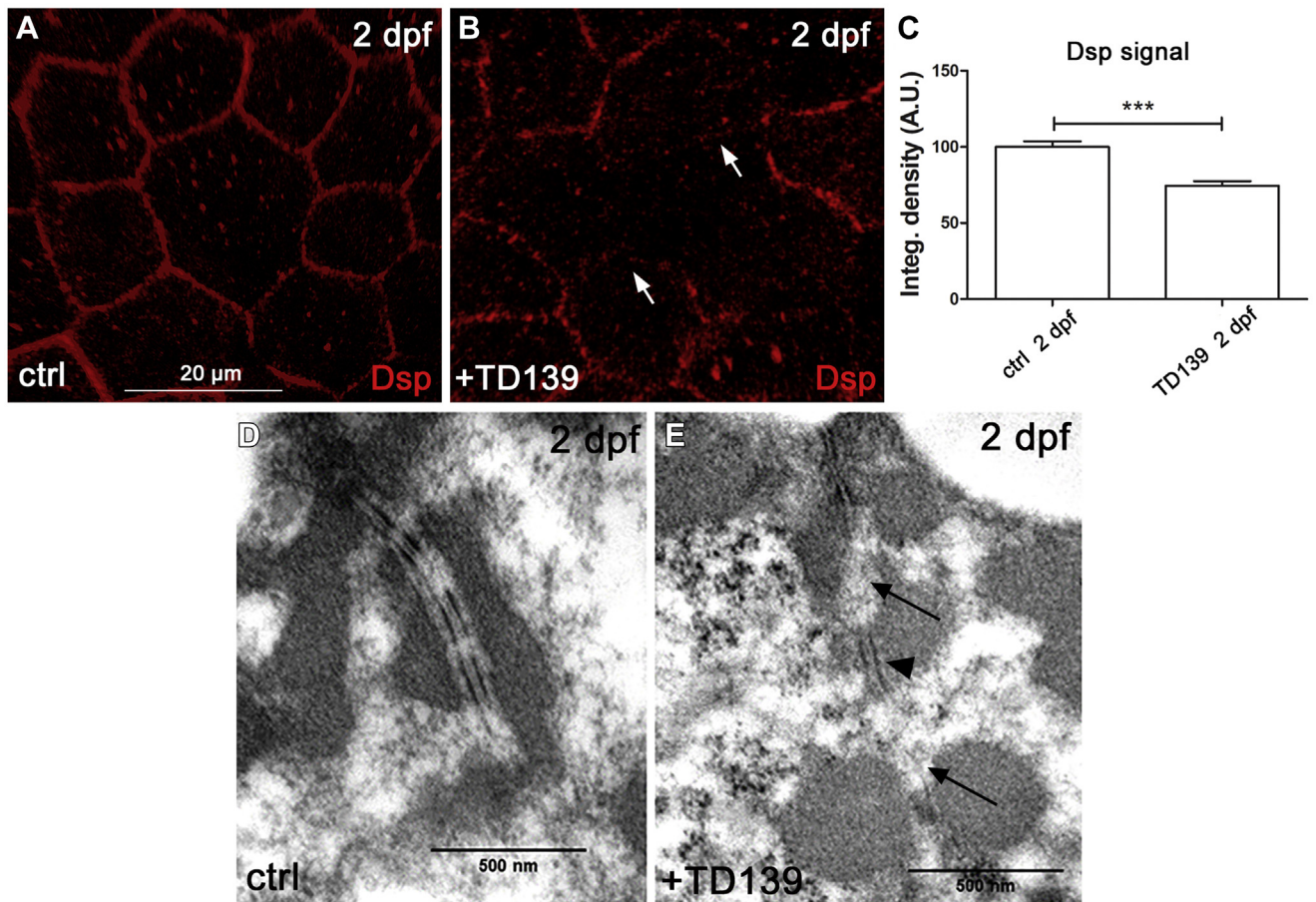


Figure 4 Inhibition of Gal3 induces cell junction impairment. **A, B:** Two-day treatment of zebrafish embryos with the Gal3 inhibitor TD139 leads to decrease and altered distribution (*white arrows*) of Desmoplakin (Dsp; *red signal*) in the plasma membrane of epidermal cells. **C:** Quantitative analysis of Dsp fluorescence, shown as integrated (Integ.) density expressed in arbitrary units (A.U.). Statistical test: Unpaired *t* test. *** $P < .001$; n = 6 measurements per condition. **D, E:** Ultrastructural images of epidermal cell junctions in 2 days-post-fertilization (dpf) zebrafish embryos. **D:** Control (ctrl) shows regular desmosome disposition with well-defined external and internal plaques, the latter connected with cytoskeletal filaments. **E:** TD139-treated epidermidis shows structural alteration of cell–cell junction. Desmosomes appear disconnected from the cytoskeletal complex and irregularly distributed along a focally widened cell membrane (*arrows*). Internal and external plaques show a pale phenotype (*arrowhead*). Focal cell necrosis is visible. Original magnification $\times 50,000$.

Discussion

Transcriptome profiling in AC mutant mice preceding structural abnormalities¹⁴ displayed decreased *Lgals3* cardiac expression encoding for GAL3, a member of the galectin family, which is thought to have a dual positive or negative regulatory function during the assembly and stabilization of intercellular junctions.²⁰ Indeed, we observed a different expression of *Lgals3*/GAL3 in the early vs the late stage of the disease. Subsequent genetic analysis of a larger AC

cohort highlighted *LGALS3* rare variants in 4% of cases, corresponding to a significant 5.8-fold increase of *LGALS3* rare variants in affected patients compared to the control population.

Intercellular adhesion and Gal3

Few studies to date have investigated disease pathways in the early stages of AC. Previous ultrastructural studies in AC patients and mechanotransduction in *in vitro* assays

Table 2 *LGALS3* rare variants identified in AC patients

No.	cDNA	Protein	dbSNP ID	gnomAD	SIFT
1	c.29 C>T	p.Ala10Val	rs202159462	0.025%	Tolerated (score: 0.06)
2	c.137C>G	p.Pro46Arg	rs200440596	0.02%	Deleterious (score: 0)
3	c.137C>G	p.Pro46Arg	rs200440596	0.02%	Deleterious (score: 0)
4	c.485G>A	p.Arg162His	rs201865041	0.002%	Deleterious (score: 0)
5	c.18+1_18+4delGTAA	—	rs745877914	0.01%	—

AC = arrhythmogenic cardiomyopathy; dbSNP = Single Nucleotide Polymorphism database; gnomAD = Genome Aggregation Database; SIFT = Sorting Intolerant from Tolerant (algorithm).

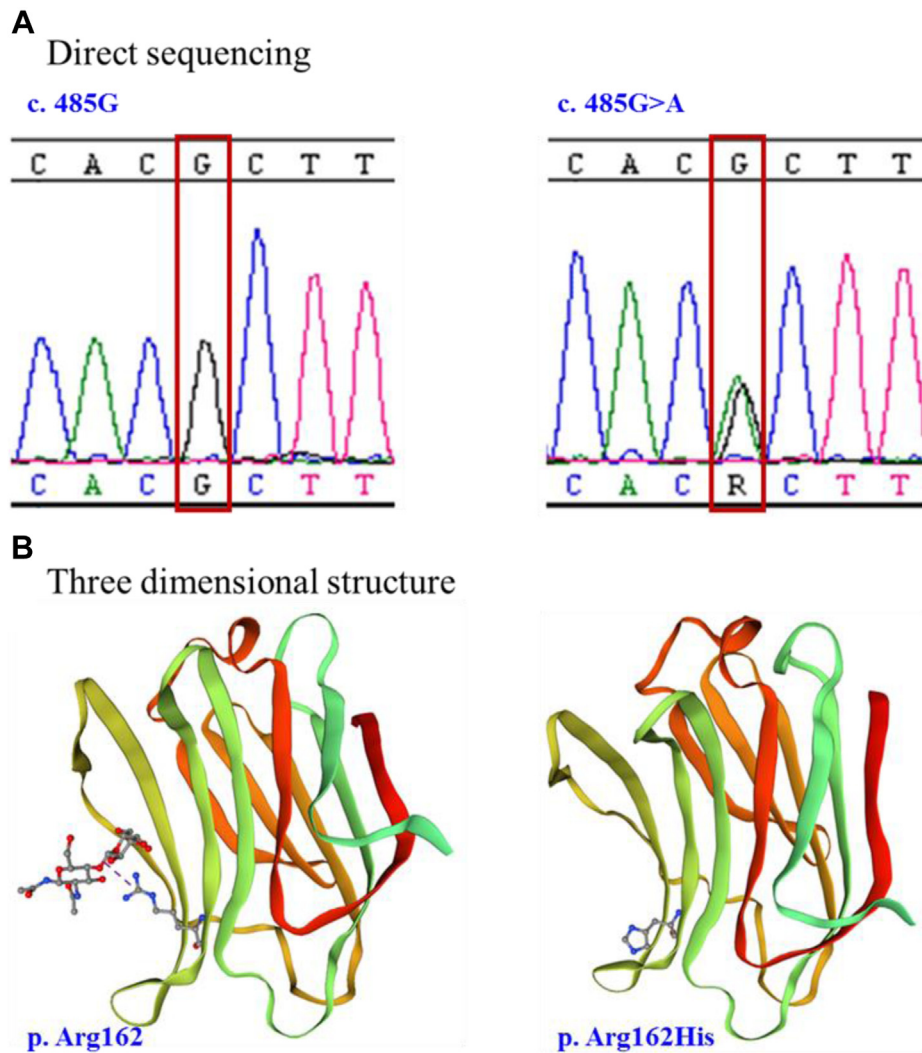


Figure 5 **A:** Electropherogram of *LGALS3* c.485G>A missense mutation identified in a heart transplant patient affected by arrhythmogenic cardiomyopathy (patient 4). **B:** Three-dimensional structure of GAL3. **Left:** Wild-type (Wt) protein presenting the H-bond with the ligand. **Right:** p. Arg162His mutant with loss of H-bond in the carbohydrate-recognition domain (CRD)–GAL3 binding domain. Comparative view of the same structures shows a remarkable spatial reorganization of the CRD–GAL3 pocket.

indicated that abnormal cell–cell mechanical coupling, exacerbated by strenuous exercise, plays an important pathogenic role.^{14,21,22} In our study, transcriptional data obtained from TgNS<2wks mice exhibited decreased expression of *Lgals3*, which is involved in a wide array of cellular activities, such as regulation of cellular trafficking of glycoproteins, signaling, and cell adhesion.¹⁵

Table 3 Distribution of *LGALS3* rare variants in AC patients vs healthy controls

Variants	AC pts	Ctrl pts	OR (95% CI)	P value
Nonsynonymous	5	305	5.812 (0.075–0.41)	2.10E-03
No variants	295	104,589		

AC = arrhythmogenic cardiomyopathy; Ctrl = control patients from gnomAD database; CI = confidence interval; OR = odds ratio.

GAL3 is composed of a 21-amino-acid-long N-terminal stretch with 2 sites for serine phosphorylation, followed by 9 non-triple-helical collagen-like Pro/Gly-rich repeats, which harbor cleavage sites for diverse proteases, and the C-terminal CRD with a conserved sequence motif that confers affinity for β -galactoside-containing glycans. GAL3, as do other galectins that mediate signal transduction events on the cell surface,²³ enhances intercellular adhesion through CRD direct binding to the extracellular domain of cadherins and specifically with DSG2, as previously demonstrated in experiments in intestinal, corneal, and conjunctival epithelia.^{16,24–26} Also, GAL3-reactive sites colocalize with the DSP and DSG proteins in primary squamous carcinomas, pointing to the potential role of GAL3 in mediating intercellular contacts. The role of galectins as agonists or antagonists of adhesion depends on the expression level and location of these lectins, the glycosylation pattern of the receptors, the binding valence

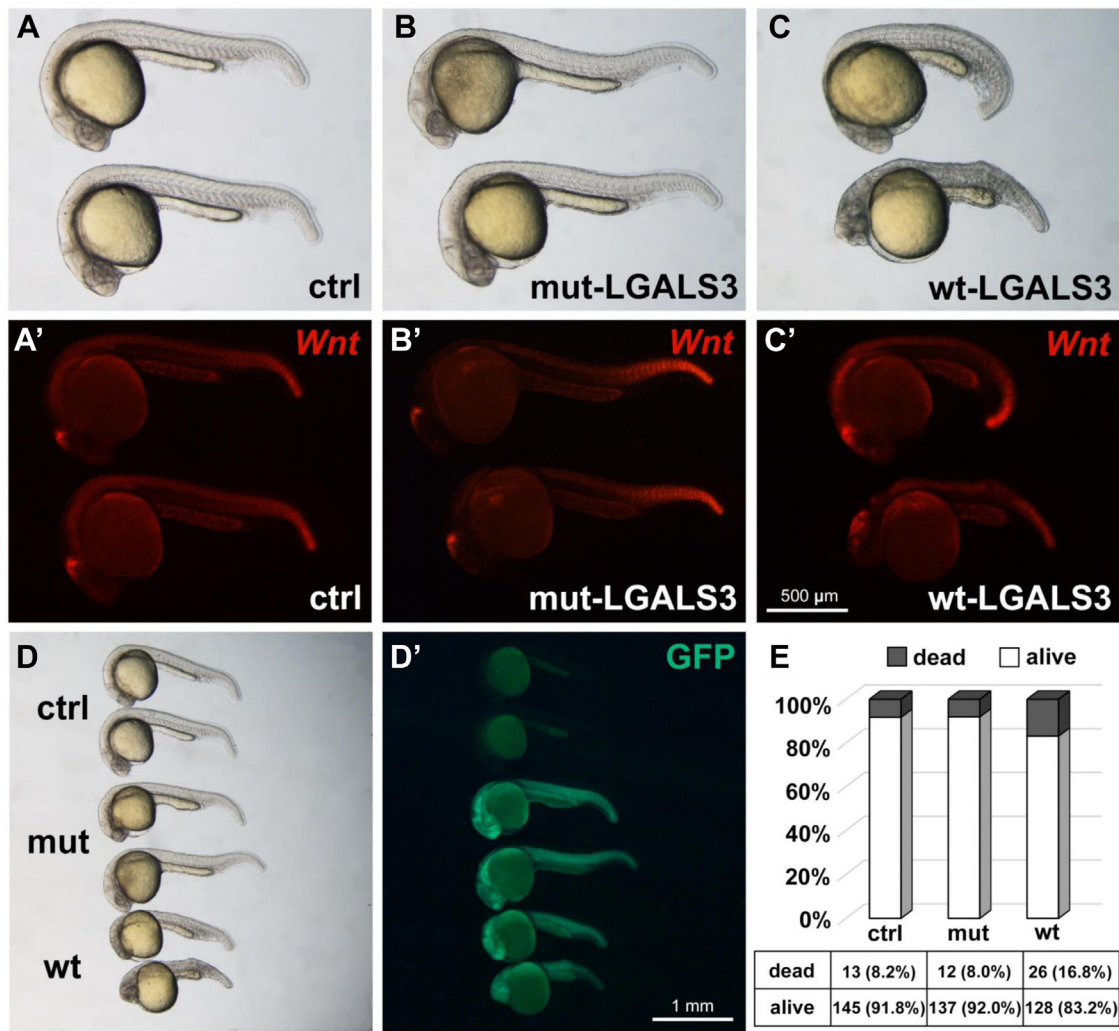


Figure 6 A–C: Injection of human wild-type *LGALS3* induces developmental delay and dysmorphology in zebrafish embryos (C) compared to mutated *LGALS3* (B) or control solution (A). A'–C': Wnt signaling (red signals) appears unmodified. D, D': Injection of human *LGALS3* mRNAs is verified by conjugated green fluorescence protein (GFP) expression. All embryos are at 1 day-post-fertilization (dpf) and in lateral view, anterior to the left. Scale bar in C' applies to A'–C'. Scale bar in D' applies to D and D'. E: Chart displaying similar viability in embryos injected with control solution or mutated *LGALS3*. Mortality is double in case of wild-type *LGALS3*. ctrl = control; mut = mutated; wt = wild-type.

of the interaction, and the repertoire of receptors clustered by these lectins.²⁰

GAL3-inhibited zebrafish embryos displayed abnormal and irregularly distributed desmosomes with “pale” internal and external plaques, as observed in previous studies in humans.²¹ Thus, our findings underscore a role for GAL3 in modifying desmosomal ultrastructure, with reduced cell–cell adhesion as a consequence of diminished GAL3 levels possibly leading to cardiomyocyte injury and death.

Intercellular adhesion and Wnt signaling suppression

Aberrant GSK3 β distribution has been proposed to explain morphofunctional and arrhythmic features of the disease progression.^{10,27} *Lgals3* is an upstream regulator gene of GSK3 β . Recent studies demonstrated that lower expression of *Lgals3* leads to reduced levels of phospho-GSK3 β at

serine 9, thus increasing GSK3 β activity, and phospho-GSK3 β reduction leads to phosphorylation of β -catenin and its subsequent degradation, suppressing Wnt signaling.¹⁷ To prove this concept, Gal3 expression was pharmacologically inhibited in a Wnt reporter zebrafish line showing clearly suppression of the Wnt signaling and reduced expression levels of downstream targets. Taken together, our findings indicate that suppression of Wnt/ β -catenin signaling mediated by a desmosomal gene defect downregulates *Lgals3* expression at early disease stages, specifically in the intercalated disc. Through a feedback loop, this reduced GAL3 expression triggers additional desmosomal instability and inflammation, leading to a compensatory increase in systemic GAL3 mediated by alternative macrophage activation CD98⁺ during the acute inflammatory phase in an effort to counterbalance the destabilization of the desmosomal complex.

GAL3: Inflammation, wound repair and heart failure

GAL3 was previously reported as the link between macrophages and fibrosis.¹⁵ Myocardial injury generates inflammatory processes that stimulate GAL3 secretion, which leads to interleukin-4–induced alternative macrophage activation, up-regulation of profibrotic genes stimulating matrix production, enhanced wound healing through scar production, and ultimately cardiac remodeling.^{28,29} Overexpression and secretion of GAL3 are associated with several diseases and have been extensively studied in the context of fibrosis and heart failure.^{19,30,31} However, little is known, and often with contradictory findings, on the mechanism responsible for GAL3 inhibition or downregulation.³² In this context, our experiments have demonstrated that overexpression of *Lgals3* in an *in vivo* model causes increased mortality rates typical of heart failure Wnt dysregulation effects,^{30,31} whereas inhibition of GAL3 expression causes aberrant desmosome assembly.^{16,20} Overall, the effects of GAL3 at the myocardial level may depend on its dual positive or negative regulatory function during the assembly and stabilization of intercellular junctions.

In our series of 40 AC patients with definite TFC and genotype-positive for desmosomal mutations, we found expression levels of *LGALS3* significantly increased in blood, thus confirming recruitment of GAL3 through inflammatory cells (monocytes, macrophages) in healing and fibrogenic processes.^{26,28,32} We further showed the myocardial recruitment of CD98⁺ macrophages at the acute inflammatory disease phase, supporting our hypothesis that upon cardiac reduction of GAL3, circulating macrophages release GAL3 at the injured region and pointing toward the stabilization of desmosomal assembly. As a whole, our data suggest that GAL3 cardiac reduction triggers compensatory GAL3 production, which activates CD98 and alternative macrophage activation by a GAL3 feedback loop mechanism. GAL3/*LGALS3* compensatory serum and tissue levels have been also related to dilated cardiomyopathy and myocarditis and very recently its release from the heart into the circulation has been proven.^{33–36} Circulating *LGALS3* levels may not be disease-specific but probably reflect in general healing and fibrotic conditions.³⁷ The transitional absence and subsequent presence of GAL3 have also demonstrated in other conditions (eg, epidermis lesions).³⁸ In order to explore complement system activation and the role of myocardial GAL3 expression during the early stage of AC, a time–course analysis of cardiac and serum GAL3 in animal models should be undertaken in future studies.

LGALS3 rare genetic variants in AC index cases

Whole exome sequencing and direct sequencing in 150 AC index cases with definite TFC highlighted 4% of *LGALS3* rare genetic variants. Genomic comparison among species showed that *LGALS3* rare missense variants were highly conserved and predicted to significantly affect protein structure conferring the loss of GAL3 function. In this regard, our

data demonstrated a possible association between low expression levels of *LGALS3* and loss of function rare missense variants on key functional domains. Specifically, we demonstrated no effects on disease status when zebrafish embryos overexpressed c.485G>A *LGALS3* compared to their WT counterparts; instead, overexpression of the WT *LGALS3* in zebrafish leads to increased mortality rates, reduced development, and dysmorphology. These findings support further that *LGALS3* genetic variants confer the complete loss of protein function, which ultimately impacts Wnt signaling, decrease intrinsic cell adhesion reserve, and eventually increase susceptibility to AC. Nevertheless, the causal role of *LGALS3* rare variants in AC pathogenesis should be supported by cascade family screening.

Study limitations

Several molecules have been developed as GAL3 inhibitors, but TD139 currently is being examined in several clinical trials, and its specific interaction with the CRD binding site of GAL3 has been thoroughly demonstrated. Although no direct readout to measure the degree of GAL3 inhibition by TD139 was developed, our data and that of other investigators demonstrated that *Lgals3* downregulation and Wnt suppression mutually occur.^{17,37} As such, we can confidently state that TD139 suppresses Wnt signaling. The link with recently reported inflammatory biomarkers such as anti-DSG2 antibodies should be undertaken.³⁹

Conclusion

Our data support a potential pathogenic role of *LGALS3* in the myocardial injury of AC mediated by destabilization of desmosomes. Reduced *Lgals3* myocardial expression levels in prephenotypic disease stages suppress Wnt signaling pathway and activate an excess of proinflammatory processes by recruitment of circulating GAL3. Understanding the role and function of this molecule in disease pathogenesis might enable identification of high-affinity and selective galectin inhibitors to regulate inflammatory processes and disease progression.

Appendix Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2021.04.006>.

References

1. Thiene G, Nava A, Corrado D, et al. Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *N Engl J Med* 1988;318:129–133.
2. Corrado D, Basso C, Pavei A, et al. Trends in sudden cardiovascular death in young competitive athletes after implementation of a preparticipation screening program. *JAMA* 2006;296:1593–1601.
3. Basso C, Thiene G, Corrado D, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, dystrophy, or myocarditis? *Circulation* 1996;94:983–991.
4. Basso C, Corrado D, Marcus FI, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet* 2009;373:1289–1300.

5. Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, et al. Diagnosis of arrhythmic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria. *Circulation* 2010;121:1533–1541.
6. Basso C, Bauce B, Corrado D, Thiene G. Pathophysiology of arrhythmic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* 2011;9:223–233.
7. Pilichou K, Thiene G, Bauce B, et al. Arrhythmic cardiomyopathy. *Orphanet J Rare Dis* 2016;11:33.
8. Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, et al. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2006;116:2012–2021.
9. Chen SN, Gurha P, Lombardi R, et al. The hippo pathway is activated and is a causal mechanism for adipogenesis in arrhythmic cardiomyopathy. *Circ Res* 2014;114:454–468.
10. Chelko SP, Asimaki A, Andersen P, et al. Central role for GSK3beta in the pathogenesis of arrhythmic cardiomyopathy. *JCI Insight* 2016;1:e85923.
11. Giuliodori A, Boffagna G, Marchetto G, et al. Loss of cardiac Wnt/beta-catenin signalling in desmoplakin-deficient AC8 zebrafish models is rescuable by genetic and pharmacological intervention. *Cardiovasc Res* 2018;114:1082–1097.
12. Asimaki A, Kapoor S, Plovie E, et al. Identification of a new modulator of the intercalated disc in a zebrafish model of arrhythmic cardiomyopathy. *Sci Transl Med* 2014;6:240ra274.
13. Kim C, Wong J, Wen J, et al. Studying arrhythmic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature* 2013;494:105–110.
14. Pilichou K, Remme CA, Basso C, et al. Myocyte necrosis underlies progressive myocardial dystrophy in mouse *dsg2*-related arrhythmic right ventricular cardiomyopathy. *J Exp Med* 2009;206:1787–1802.
15. Sciacchitano S, Lavra L, Morgante A, et al. Galectin-3: one molecule for an alphabet of diseases, from A to Z. *Int J Mol Sci* 2018;19:379.
16. Jiang K, Rankin CR, Nava P, et al. Galectin-3 regulates desmoglein-2 and intestinal epithelial intercellular adhesion. *J Biol Chem* 2014;289:10510–10517.
17. Song S, Mazurek N, Liu C, et al. Galectin-3 mediates nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signaling in human colon cancer cells by regulation of glycogen synthase kinase-3beta activity. *Cancer Res* 2009;69:1343–1349.
18. Hsieh TJ, Lin HY, Tu Z, et al. Dual thio-digalactoside-binding modes of human galectins as the structural basis for the design of potent and selective inhibitors. *Sci Rep* 2016;6:29457.
19. Oz F, Onur I, Elitok A, et al. Galectin-3 correlates with arrhythmic right ventricular cardiomyopathy and predicts the risk of ventricular arrhythmias in patients with implantable defibrillators. *Acta Cardiol* 2017;72:453–459.
20. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001;83:667–676.
21. Basso C, Czarnowska E, Della Barbera M, et al. Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on endomyocardial biopsies. *Eur Heart J* 2006;27:1847–1854.
22. Asimaki A, Saffitz JE. Remodeling of cell-cell junctions in arrhythmic cardiomyopathy. *Cell Commun Adhes* 2014;21:13–23.
23. Saraboji K, Hakansson M, Genheden S, et al. The carbohydrate-binding site in galectin-3 is preorganized to recognize a sugarlike framework of oxygens: ultra-high-resolution structures and water dynamics. *Biochemistry* 2012;51:296–306.
24. Boscher C, Zheng YZ, Lakshminarayan R, et al. Galectin-3 protein regulates mobility of N-cadherin and GM1 ganglioside at cell-cell junctions of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 2012;287:32940–32952.
25. Argueso P, Mauris J, Uchino Y. Galectin-3 as a regulator of the epithelial junction: Implications to wound repair and cancer. *Tissue Barriers* 2015;3:e1026505.
26. Gross A, Pack LAP, Schacht GM, et al. Desmoglein 2, but not desmocollin 2, protects intestinal epithelia from injury. *Mucosal Immunol* 2018;11:1630–1639.
27. Hariharan V, Asimaki A, Michaelson JE, et al. Arrhythmic right ventricular cardiomyopathy mutations alter shear response without changes in cell-cell adhesion. *Cardiovasc Res* 2014;104:280–289.
28. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004;110:3121–3128.
29. MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodkinson PS, et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol* 2008;180:2650–2658.
30. Suthahar N, Meijers WC, Sillje HHW, et al. Galectin-3 activation and inhibition in heart failure and cardiovascular disease: an update. *Theranostics* 2018;8:593–609.
31. Carrasco-Sanchez FJ, Aramburu-Bodas O, Salamanca-Bautista P, et al. Predictive value of serum galectin-3 levels in patients with acute heart failure with preserved ejection fraction. *Int J Cardiol* 2013;169:177–182.
32. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5060–5065.
33. Zhang Y, Wang Y, Zhai M, et al. Influence of LGALS3 gene polymorphisms on susceptibility and prognosis of dilated cardiomyopathy in a Northern Han Chinese population. *Gene* 2018;642:293–298.
34. Djordjevic A, Dekleva M, Zivkovic M, et al. Left ventricular remodeling after the first myocardial infarction in association with LGALS-3 neighbouring variants rs2274273 and rs17128183 and its relative mRNA expression: a prospective study. *Mol Biol Rep* 2018;45:2227–2236.
35. Nguyen MN, Su Y, Vizi D, et al. Mechanisms responsible for increased circulating levels of galectin-3 in cardiomyopathy and heart failure. *Sci Rep* 2018;8:8213.
36. Kovacevic MM, Pejnovic N, Mitrovic S, et al. Galectin-3 deficiency enhances type 2 immune cell-mediated myocarditis in mice. *Immunol Res* 2018;66:491–502.
37. Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, et al. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res* 2005;65:3535–3537.
38. Shi ZR, Tan GZ, Cao CX, et al. Decrease of galectin-3 in keratinocytes: a potential diagnostic marker and a critical contributor to the pathogenesis of psoriasis. *J Autoimmun* 2018;89:30–40.
39. Chatterjee D, Fatah M, Akdis D, et al. An autoantibody identifies arrhythmic right ventricular cardiomyopathy and participates in its pathogenesis. *Eur Heart J* 2018;39:3932–3944.