

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM. FF. NN.  
LAUREA DI PRIMO LIVELLO IN BIOTECNOLOGIE



Elaborato di Laurea

RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE JUP, CANDIDATO  
PER ARVD/C: ANALISI DELLA REGIONE CODIFICANTE  
PER LA PORZIONE N-TERMINALE

TUTOR: Dott.ssa Alessandra Rampazzo  
Dipartimento di Biologia

CO-TUTOR: Dott.ssa Gessica Smaniotto  
Dipartimento di Biologia

LAUREANDO: FRANCESCO MANNARA

Anno Accademico 2006/2007



# **INDICE**

## **ABSTRACT**

La cardiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVD/C) è una patologia geneticamente eterogenea, ad ereditarietà autosomica dominante, con penetranza incompleta.

La caratteristica patologica principale è la progressiva perdita dei cardiomiociti del ventricolo destro, che vengono sostituiti da tessuto adiposo e fibroadiposo, per effetto di alterazioni strutturali e funzionali delle proteine dei desmosomi (giunzioni responsabili della connessione cellula-cellula delle fibre muscolari cardiache). Questo porta ad un'alterata conduzione dell'impulso elettrico che può provocare aritmia, collasso cardiaco e morte improvvisa.

Durante il mio tirocinio ho effettuato lo screening della regione del gene JUP codificante per la porzione N-terminale della placoglobina in 21 pazienti affetti da ARVD classica, già sottoposti e risultati negativi all'analisi per la ricerca di mutazioni negli altri geni desmosomali noti.

Lo screening è stato effettuato mediante DHPLC e sequenziamento diretto.

È stato individuato un polimorfismo non sinonimo già noto in 2 pazienti e uno sinonimo già noto in un terzo paziente, nell'esone 3. In quest'ultimo paziente è stata poi riscontrata una variazione nell'introne 3 non nota. Sarà necessario valutare se tale variazione sia un polimorfismo mediante l'analisi di circa 200 soggetti appartenenti alla popolazione di controllo.

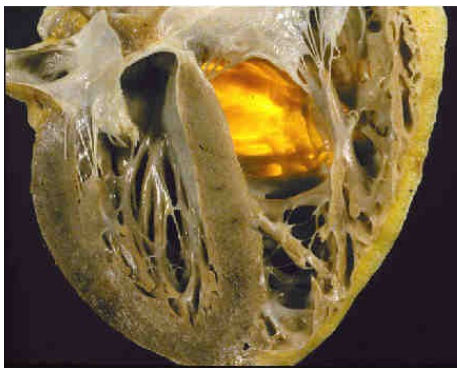
## **INTRODUZIONE**

La cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVD/C) è una malattia ereditata come un carattere autosomico dominante a penetranza incompleta. Caratteristica principale della patologia è la progressiva sostituzione dei cardiomiociti con cellule del tessuto adiposo, a livello regionale o diffuso (Thiene et al., 1988); questo fenomeno porta ad un'alterata conduzione elettrica del segnale contrattile (Marcus et al., 1982) e per questo è risultata essere la causa principale di morte improvvisa nell'atleta (Corrado et al., 1998).

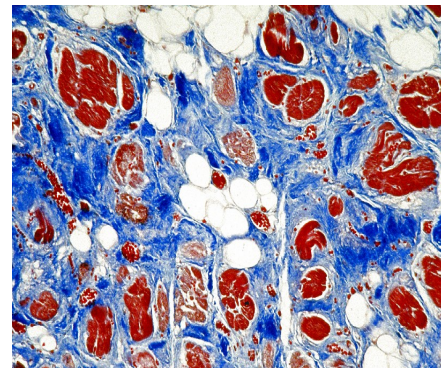
### Caratteristiche cliniche e genetiche della patologia

Da un punto di vista morfologico, il cuore affetto da ARVD è caratterizzato da un aspetto giallastro o biancastro nella parete libera del ventricolo; questa rappresenta la zona in cui il tessuto muscolare cardiaco appare sostituito da tessuto adiposo (Figura 1). In tutti i casi si nota una dilatazione del ventricolo destro la cui intensità varia a seconda del grado di sviluppo della patologia.

Il fatto che i cardiomiociti sani siano sparsi nella matrice adiposa o fibroadiposa spiega le anomalie nella trasmissione dell'impulso contrattile e del ritardo dei potenziali caratteristici della patologia (Figura 2).



**Figura 1**



**Figura 2**

**Fig. 1** = Cuore di un soggetto giovane deceduto improvvisamente a 35 anni. Si nota la transilluminabilità della parete libera del ventricolo destro in seguito ad esposizione a fonte di luce esterna (per gentile concessione del Prof. Gaetano Thiene).

**Fig. 2** = Reperto istologico del medesimo cuore in cui si notano la presenza di pochi cardiomiociti e l'infiltrazione di cellule adipose e fibrose (per gentile concessione del Prof. Gaetano Thiene).

La diagnosi della malattia è difficoltosa per la diversità con cui i segni clinici si presentano tra i diversi individui affetti, nonché dalle non indifferenti difficoltà nell'operare valutazioni funzionali e morfologiche sul ventricolo destro.

Una caratteristica importante dell'ARVD è la sua elevata eterogeneità genetica. Sono stati finora mappati 12 loci, riportati in Tabella 1:

Locus	Cromosoma	Gene coinvolto
ARVD1	14q23-q24	TGF-β3

	(Rampazzo et al., 1994)	(Beffagna et al., 2005)
ARVD2	14q42-q43 (Rampazzo et al., 1995)	RYR 2 (Tiso et al., 2001)
ARVD3	14q12-q22 (Severini et al., 1996)	
ARVD4	2q32.1-q32.3 (Rampazzo et al., 1997)	
ARVD5	3p23 (Ahmad et al., 1998)	
ARVD6	10p12-p14 (Li D. et al., 2000)	
ARVD7	10q22 (Melberg et al., 1999)	
ARVD8	6p24 (Rampazzo et al., 2002)	DSP (Rampazzo et al., 2002)
ARVD9	12p11 (Gerull et al., 2004)	PKP2 (Gerull et al., 2004)
ARVD10	18q12.1-q12.2 (Pilichou et al., 2006)	DSG2 (Pilichou et al., 2006)
ARVD 11	18q12.1 (Syrris et al., 2006)	DSC2 (Syrris et al., 2006)
Naxos	17q21 (Coonar et al., 1998)	JUP (McKoy et al., 2000)

**Tab. 1 = Posizione dei loci e geni coinvolti relativi**

Dei 7 geni identificati, 5 codificano per proteine del desmosoma (DSP, PKP2, DSG2, DSC2 e JUP) mentre gli altri due, RYR 2 e TGF-  $\beta$ 3 sono invece coinvolti in meccanismi differenti.

RYR 2 codifica per un canale del calcio presente sul reticolo sarcoplasmatico del miocardio, implicato nel meccanismo di contrazione; mutazioni a livello di questo gene causano un accumulo di ioni  $Ca^{2+}$  a livello citoplasmatico (Lehnart et al., 2004).

TGF-  $\beta$ 3, invece, è un gene codificante per una citochina solubile appartenente alla famiglia dei *Transforming Growth Factor*; si tratta di un fattore di crescita implicato nello sviluppo e nel mantenimento dell'omeostasi tissutale (Sporn et al., 1992).

Oggetto di questo studio è il gene JUP, codificante per la proteina desmosomale placoglobina. È stato dimostrato che una mutazione in omozigosi in questo gene causa una patologia detta sindrome di Naxos, descritta per la prima volta nel 1986 (Protonotarios et al., 1986).

L'unica mutazione causativa di sindrome di Naxos finora riscontrata risulta essere una delezione di 2 pb nel gene JUP (McKoy et al., 2000). Tale delezione porta ad uno slittamento del frame di lettura e alla produzione di una proteina tronca.

Lo studio si propone di ricercare mutazioni nella regione del gene JUP codificante per la porzione N-terminale della placoglobina in 21 pazienti diagnosticati affetti da ARVD classica dal Prof. Nava del Dipartimento di Cardiologia del Policlinico Universitario di Padova, nei quali non è stata riscontrata nessuna mutazione negli altri geni finora noti.

## I desmosomi

I desmosomi sono giunzioni intercellulari responsabili dell'ancoraggio dei filamenti intermedi del citoscheletro alla membrana plasmatica.

Sono addetti al mantenimento dell'integrità dei tessuti e sono molto diffusi soprattutto in tessuti sottoposti ad elevati stress meccanici, come epitelii e tessuti muscolari.

Sono formati da 3 tipi di proteine (Huber, 2003), le *caderine*, a cui appartengono le desmogleine -DSG 1;4- e le desmocolline -DSC 1;3- (Garrod et al., 2002, Whittock et al. 2003), le *proteine armadillo*, a cui appartengono placoglobina e placofilline -PKP 1;4- e le *plachine*, cui appartengono le desmoplachine -DSP 1;2- oltre a plectina, envoplachina e periplachina (Leung et al., 2002).

Al di fuori della membrana cellulare sporgono le desmogleine e le desmocolline, ossia le caderine, proteine transmembrana in grado di legarsi nella parte interna alla placoglobina e alla placofillina (Hatsell and Cowin, 2001). La placoglobina è ripiegata in modo tale da avvicinare i propri armadillo repeats vicino alla membrana plasmatica (Cowin and Burke, 1996) riuscendo in questo modo a legare la porzione N-terminale della desmoplachina, la cui regione C-terminale, invece, lega i filamenti intermedi all'interno della cellula.

La figura 3 mostra una rappresentazione schematica della disposizione delle proteine desmosomali.

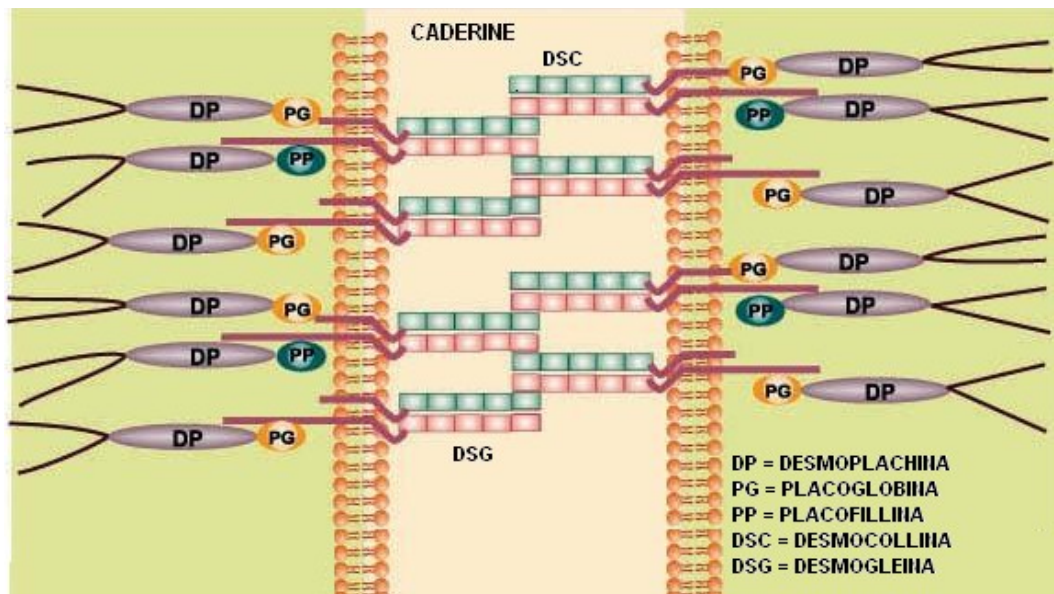


Fig. 3 = Rappresentazione schematica di un desmosoma

## MATERIALI E METODI

## Amplificazione del DNA

La PCR è una comune tecnica di laboratorio che permette di amplificare in vitro una specifica sequenza nucleotidica in milioni di copie entro poche ore. Si effettuano dai 35 ai 40 cicli di reazione, in cui ogni ciclo è composta da 3 diversi step: una fase di denaturazione del DNA doppio filamento, una fase di annealing, ossia appaiamento dei primers e una fase finale di elongazione da parte della polimerasi che catalizza la reazione.

Il DNA analizzato era stato precedentemente estratto dal sangue di 21 pazienti a cui è stata diagnosticata una forma classica di ARVD e viene opportunamente diluito ad una concentrazione finale di 50 ng/μl.

Viene prelevato 1 μl di DNA a concentrazione 50 ng/μl per ogni paziente/controllo e inserito nel rispettivo pozzetto. In seguito si prepara separatamente una mix di reazione in comune la quale viene poi aliquotata nei diversi pozzetti. Nella preparazione della mix, la polimerasi è l'ultimo elemento da aggiungere e viene conservata in ghiaccio per evitarne una prematura attivazione.

Gli elementi che costituiscono la mix di reazione sono riportati in Tabella 2:

DNA [50 ng/ μl]	1 μl
Buffer 5X	5 μl
dNTPs	5 μl
Primer F	1 μl
Primer R	1 μl
GoTaq	0,125 μl
H <sub>2</sub> O	11,875 μl

**Tab. 2 = Protocollo di amplificazione**

In ogni reazione di PCR si fa attenzione ad includere un opportuno numero di controlli sani, ossia DNA di individui non affetti, e un controllo negativo in modo da poter escludere una contaminazione della reazione.

Il volume finale è di 25 μl ma, negli esoni 2, 3 e 4, essendoci 3 temperature di analisi in DHPLC, si è reso necessario operare in un volume di 50 μl, raddoppiando le quantità.

La regione N-terminale del gene comprende i primi 5 esoni e per ognuno di essi è stata utilizzata un'amplificazione standard, utilizzando l'enzima Promega GoTaq.

Le condizioni di amplificazione utilizzare sono riportate nella Tabella 3:



Ciclo	Temperatura	Tempo
Attivazione GoTaq	95°	2'.00''
Denaturazione	95°	0'.30''
Annealing	62°	0'.30''
Estensione	72°	0'.30''
Completamento	72°	5'.00''
Blocco della reazione	4°	10'.00''

}  
35 cicli  
}

**Tab. 3 = Condizioni di amplificazione di una PCR standard**

Nella Tabella 4 sono riportati i primers utilizzati per amplificare i 5 esoni del gene JUP e le relative temperature di analisi in DHPLC:

<i>Eson e</i>	<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<i>T°</i>
1	GGACAGTCAGGCGAGATAGC	GCCTTGCTCAGATCTCTGGT	/
2	GCCAGGTGACTTCCTGCT	GTGGGCCCTAGTTAGCAT	61,3° 62,5°+0,5 63°
3	CTGCTCCCCAGTGTCTGC	CTCCCCTGAGGACATCTGC	63,4° 64,3°+0,5 64,8°
4	GACTCTCCCGTGTGTGATGA	TTATGGAAGCTCAGGGAAGG	63,6°+0,5 64,1° 65°
5	ATATTTCCAGAGGGGCGTCA	CCAAGGCTGTGCAGGATAGA	63,7°

**Tab. 4= Sequenze dei primers utilizzati in PCR e temperature di melting adottate in DHPLC relativamente ad ogni esone.**

### Elettroforesi orizzontale su gel d'agarosio

Scopo dell'elettroforesi su gel d'agarosio è testare l'effettiva amplificazione dell'esone durante la PCR. Valutando poi l'intensità delle bande ottenute è anche possibile stabilire la quantità di campione da prelevare durante l'analisi in DHPLC.

L'amplificato viene caricato in gel d'agarosio al 2% in un tampone TAE 1X. Si pesa un'opportuna quantità di polvere d'agarosio (2% del totale) e la si inserisce in una beuta, portando poi a volume con TAE 1X. La beuta viene riscaldata nel forno a microonde fino a che la polvere non è completamente sciolta e non si è ottenuta una soluzione limpida. Questa, dopo l'aggiunta dell'intercalante etidio bromuro (in rapporto 1/20000), viene quindi versata nell'apposita vaschetta preparata precedentemente e lasciata solidificare. Una volta che il gel è pronto viene immerso nel tampone, vengono estratti i pettini per lasciare vuoti i pozzetti e si procede al caricamento.

Vengono caricati 3 µl di campione addizionati a 3 µl di Orange, composto da glicerolo 30% v/v, Orange G 0,25% p/v e EDTA 10mM. Il glicerolo può portare

il DNA sul fondo del pozzetto mentre l'Orange permette di vedere il fronte di migrazione durante la corsa.

Viene applicato un voltaggio opportuno e dopo la corsa il gel viene esposto a luce UV mediante un transilluminatore, in modo da evidenziare l'etidio bromuro che si è intercalato alle basi.

### Ricerca di mutazioni con DHPLC

La tecnica DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) permette di individuare all'interno di una sequenza nucleotidica diversi tipi di mutazioni come piccole inserzioni e delezioni, tandem repeat, SNPs, note o sconosciute.

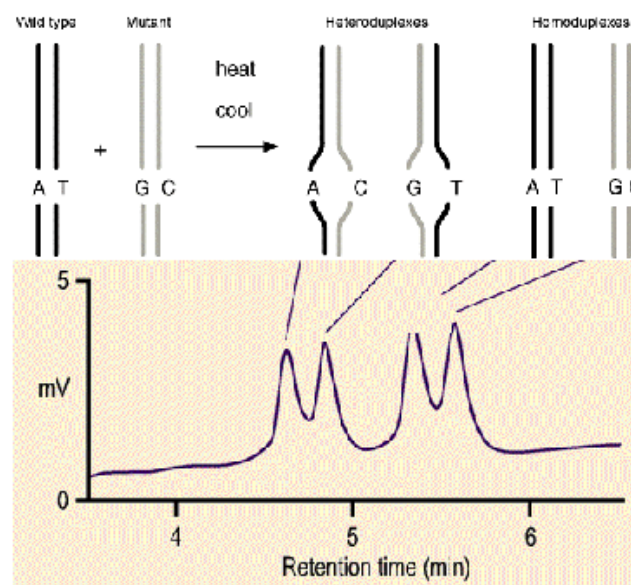
La tecnica si basa sulla differente velocità di eluizione degli eteroduplex rispetto agli omoduplex all'interno della colonna cromatografica.

Il protocollo base prevede una denaturazione a 95° per 5 minuti dei campioni che, in seguito, vengono lasciati spontaneamente rinaturare a temperatura ambiente. In caso di mutazioni in eterozigosi, sarà possibile che si riformi l'accoppiamento originale tra i 2 filamenti oppure che questi si scambino. Un *omoduplex* sarà formato dal ri-appaiamento dei due filamenti che erano accoppiati in origine mentre l'*eteroduplex* si avrà quando un filamento appartenente all'allele wild-type si appai al filamento dell'allele mutato.

Nel caso del gene JUP, per poter identificare mutazioni in omozigosi, è necessario mescolare il DNA del paziente da analizzare con quello di un soggetto di controllo.

La caratteristica degli eteroduplex è la presenza di una "bolla" data dal mismatch nel sito mutato. Questa bolla aumenta la percentuale totale di denaturazione influenzando sul tempo di ritenzione dello stesso eteroduplex.

Gli eteroduplex, infatti, si comportano diversamente dagli omoduplex in quanto sono meno trattenuti e vengono eluiti prima (Figura 4).



**Fig. 4= Esempio di denaturazione e rinaturazione spontanea di 2 filamenti, uno wt e uno mutante, e corrispondente grafico DHPLC.**

I tempi di eluizione dipendono dalla sequenza che costituisce il filamento.

Il DHPLC è una cromatografia ad accoppiamento ionico in fase inversa. L'accoppiamento ionico è dato dal trimetilammonioacetato (TEAA) presente in soluzione, una molecola che ha due funzionalità: da un lato si lega alla colonna, ossia alla fase stazionaria, e dall'altro al DNA che attraversa la colonna stessa. Il TEAA, detto controione, è in grado di legare le proprie cariche positive al DNA e la propria parte idrofobica alla colonna essendo una molecola anfipatica, fungendo quindi da molecola "ponte".

La siringa pesca nel pozzetto la quantità indicata di DNA e lo inietta all'interno della colonna. In una prima fase viene iniettata una soluzione, detta soluzione A, composta da H<sub>2</sub>O, TEAA e tracce di acetonitrile, mentre in seguito viene iniettata la soluzione B, composta da H<sub>2</sub>O, TEAA e acetonitrile in quantità sempre maggiori. La soluzione A serve a far aderire il DNA alla colonna per mezzo del TEAA mentre la soluzione B serve per l'eluizione. Il flusso crescente di acetonitrile (ACN) causa un calo di concentrazione del controione e, quindi, un distacco del DNA dalla colonna. La concentrazione critica di ACN a cui si ha il distacco dalla colonna è sequenza-dipendente e varierà tra omoduplex ed eteroduplex, in quanto questi ultimi saranno in grado di formare meno legami rispetto ai primi.

L'analisi viene fatta a temperature di "quasi denaturazione" o di melting. Questa temperatura di analisi può essere calcolata attraverso l'algoritmo di Stanford, il quale fornisce una temperatura in base al tipo di amplicone fornito (per amplicone si intende la sequenza che viene amplificata). In realtà, questo algoritmo è abbastanza impreciso ed è necessario risalire sperimentalmente alle temperature di melting mediante apposite messe a punto specifiche per ogni esone.

La messa a punto (effettuata su controlli sani) porta ad una temperatura di "quasi denaturazione" in cui la sequenza è al 25% in singola elica (e quindi denaturata) e al 75% in doppia elica. In realtà, è raro trovare una sola temperatura che vada bene per tutta la sequenza, dato che possono co-esistere più domini di melting, e spesso si è costretti ad utilizzare 2 o 3 temperature.

Non è possibile effettuare analisi al DHPLC negli esoni che presentano ripetizioni mononucleotidiche o domini di melting con temperature troppo differenti. In questi casi, si procede ad un sequenziamento diretto dell'esone.

### Sequenziamento diretto

Il sequenziamento diretto è una tecnica che permette di ottenere la sequenza nucleotidica di un filamento di DNA. Tale tecnica è stata adottata dopo aver individuato anomalie al DHPLC.

Prima di essere sequenziati, i campioni devono essere purificati da primers e dNTPs residui della reazione di PCR. Questi, infatti possono interferire con il processo di sequenziamento e vengono eliminati grazie all'uso di 2 enzimi ("PCR Product Pre-Sequencing KIT", Amersham Pharmacia Biotech):

- *EXO I*, un'esonucleasi in grado di rimuovere tutti i filamenti singoli di DNA, compresi i primers;
- *SAP*, una fosfatasi alcalina che rimuove i dNTPs in eccesso.

Si aliquota 0,5 µl di ciascun enzima per ogni 5 µl di DNA e si procede alla purificazione. Gli enzimi agiscono alla temperatura ottimale di 37° e i campioni

vengono dunque posti nel termociclatore e tenuti a 37° per 15' per attivare gli enzimi, a 80° per 15' per inattivarli e a 80° per 4' per completare la reazione. Il sequenziamento è stato effettuato al BMR Genomics presso l'Università di Padova, tramite il sequenziatore automatico ABI PRISM 3730XL DNA Sequencer della Applied Biosystem a 96 capillari.

## Strumenti bioinformatici

### **dbSNP**

Database gestito e fornito dall'NCBI che identifica e cataloga SNPs (polimorfismi di singoli nucleotidi) di genomi di vari organismi. Tutte le informazioni sono di pubblico dominio, importanti soprattutto nella ricerca di variazioni genetiche.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)

### **Seqman II**

Programma utilizzato per l'analisi delle sequenze ottenute dal sequenziamento diretto. Importando le sequenze nel giusto formato, è possibile costruire un contiguo e confrontare in modo rapido i frammenti amplificati a partire da DNA di individui diversi, evidenziandone così le differenze.

### **UCSC Human Genome Browser**

Database fornito dalla suite di UCSC Genome Bioinformatici. Consente la visualizzazione di porzioni genomiche, in qualsiasi scala, mettendo in evidenza la presenza di CpG, di geni noti e predetti con relativa suddivisione in esoni e introni, UTR e ORF e le varie isoforme prodotte. Inoltre vengono indicati gli SNPs, i siti di restrizione eventualmente presenti, il grado di conservazione nei vari genomi, ESTs e mRNA.

(<http://genome.ucsc.edu/>)

### **Pubmed**

Banca dati sviluppata dall'NCBI che consente la ricerca bibliografica di tutte le pubblicazioni scientifiche a livello mondiale. Mediante l'inserimento di parole chiave offre un elenco di pubblicazioni inerenti alla ricerca; è possibile visualizzare l'abstract e talvolta accesso all'intera pubblicazione.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>)

### **Swiss-Prot**

È una banca dati biologica contenente sequenze proteiche. Si tratta di un database caratterizzato da una bassa ridondanza ed un'elevata qualità di annotazione. Fornisce ottime informazioni addizionali, come modifiche post-traduzionali, funzioni svolte dalla proteina, domini funzionali, oltre a garantire un elevato livello di correlazione con altri database.

(<http://expasy.org/sprot/>)

## RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi della porzione di gene JUP codificante per la regione N-terminale della placoglobina è stata effettuata mediante DHPLC per gli esoni 2, 3, 4 e 5 mentre, per l'esone 1, si è proceduto a sequenziamento diretto.

La placoglobina è una proteina chiave nelle interazioni cellula-cellula, in quanto è un elemento fondamentale nella struttura e nell'assemblaggio di desmosomi e giunzioni aderenti (Franke et al., 1989).

Si tratta di una proteina globulare che, nella forma solubile, si presenta come dimero (Kapprell et al., 1987) di 745 aa e di 81,75 kDa (Franke et al., 1989).

La placoglobina presenta lungo la propria sequenza 12 domini ARM o *armadillo repeats* (Huber, 2003) che ne determinano le diverse funzioni (Figura 5); questi domini, infatti, facilitano l'interazione della placoglobina con altre molecole citoplasmatiche e desmosomali e conferiscono alla proteina caratteristiche funzioni di signalling (Hatzfeld, 1999, North et al., 1999). Gli *armadillo repeats* sono domini ripetuti di circa 42-45 aa tipici, appunto, delle proteine armadillo (Hatzfeld, 1999). Ogni dominio ARM consiste di 3  $\alpha$ -eliche ripiegate in maniera tale da formare una super-elica destrorsa; questa forma una zona carica positivamente che rappresenta il punto di interazione con diversi ligandi, comprese le caderine (Huber et al., 1997).



Fig. 5 = Rappresentazione schematica della proteina desmosomale placoglobina.

La funzione principale della placoglobina, assieme all'altra classe di *armadillo protein*, ossia le placofilline, è di mediare e regolare l'assemblaggio della placca desmosomale. In particolare, placofillina e placoglobina legano la porzione N-terminale della desmoplachina, la quale è situata nella parte più interna e lega i filamenti del citoscheletro (Kowalczyk et al., 1997, Bornslaeger et al., 2001).

La placoglobina, poi, è ripiegata in modo tale da legarsi alla desmogleina utilizzando i primi 4 domini ARM mentre tutti i domini ARM sono necessari per l'interazione con la desmocollina. Risulta quindi evidente che i domini ARM sono, per la placoglobina, indispensabili all'interazione con le caderine (Trojanovsky et al., 1996, Wahl et al., 1996, Witcher et al., 1996).

Dei 5 esoni analizzati, il primo non viene tradotto.

La tabella 5 riporta i dati ottenuti dallo screening al DHPLC degli esoni 2, 3, 4 e 5 relativi ai campioni in cui è stato riconosciuto un profilo differente dal controllo positivo, il quale è stato fatto correre come riferimento.

Esone	Paziente	Picco	Temperatura di analisi
3	7,9	Picco smezzato	64,8°
	10	Non sovrapponibile al CP	63,4°
		Non sovrapponibile al CP	64,3° + 0,5
		Non sovrapponibile al CP	64,8°
4	10	Doppio picco	63,6° + 0,5
		Doppio picco	64,1°
		Doppio picco	65°
	17	Non sovrapponibile al CP	64,1°
5	2,5	Non sovrapponibile al CP	63,7°
	4,6,8,11,12,16	Doppio picco	63,7°
	10	Doppio picco smezzato	63,7°

**Tab. 5 = Risultati dell'analisi al DHPLC di pazienti il cui cromatogramma differisce dal riferimento del controllo positivo.**

Sono stati sequenziati i campioni che presentavano anomalie rispetto al controllo sano e le sequenze sono state analizzate col programma Seqman II.

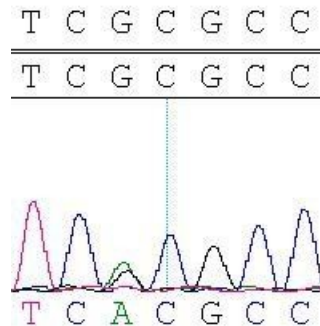
La Tabella 6 mostra i risultati di quest'analisi. Sono stati trovati 2 polimorfismi noti all'interno dell'esone 3, relativamente a 3 pazienti, e 2 variazioni non note, una nell'introne 3 nel paziente 10 e l'altra nell'introne 5 in più pazienti:

Esone	Paziente	Variazione		dbSNP	Note
3	7	543 G>A	R143H	rs41283425	Polimorfismo non sinonimo già noto
	9	543 G>A	R143H	rs41283425	Polimorfismo non sinonimo già noto
	10	523 C>T	D136D	rs17850807	Polimorfismo sinonimo già noto
4	10	469-48 C>T	(intronica)	/	Variazione non nota. Necessario effettuare test per stimarne la frequenza all'interno della popolazione
5	2(o), 4, 5(o), 6, 8, 10(o), 11, 12	1028+17 T>C	(intronica)	/	Variazione non nota. Necessario effettuare test per stimarne la frequenza all'interno della popolazione

**Tab. 6 = Risultati del sequenziamento.**

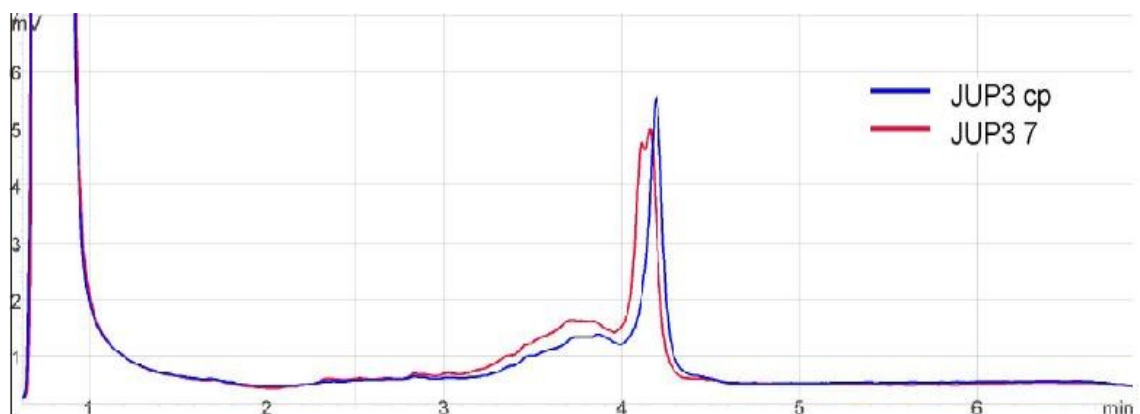
La (o) posta di fianco al numero del paziente indica la presenza della variazione in omozigosi.

Il paziente 7 e il paziente 9 presentano, per l'esone 3, lo stesso polimorfismo non sinonimo che porta al cambiamento amminoacidico da un'arginina ad un'istidina (Figura 6):



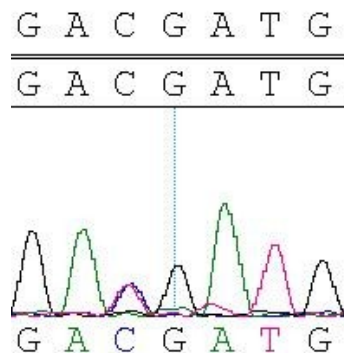
**Fig. 6= Sequenza del paziente 7 in cui è evidente la presenza del polimorfismo in eterozigosi. Per il paziente 9, la sequenza è analoga a quella qui rappresentata.**

Tale variazione è stata riscontrata in quanto il cromatogramma dei pazienti 7 e 9 al DHPLC mostrava, alla temperatura di 64,8°, un picco smezzato, come è possibile vedere nella Figura 7:



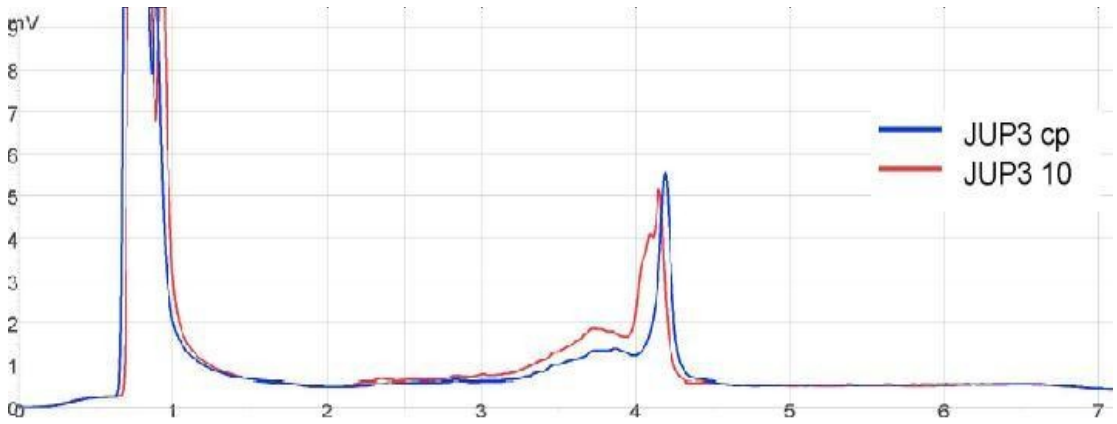
**Fig. 7 = Cromatogramma del paziente 7 alla temperatura di 64,8° per l'esone 3.**

Il paziente 10, invece, presenta due variazioni. Una, all'interno dell'esone 3, è un polimorfismo sinonimo già noto (Figura 8):



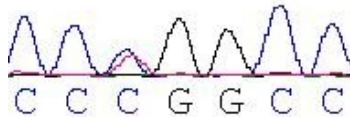
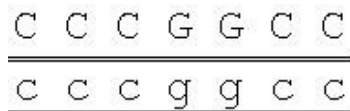
**Fig. 8 = Sequenza del paziente 10 per l'esone 3 in cui è evidente la presenza del polimorfismo in eterozigosi.**

Tale variazione comporta il picco anomalo relativo al cromatogramma al DHPLC del paziente (Figura 9). Si può notare come il picco sia più allargato rispetto al controllo sano.



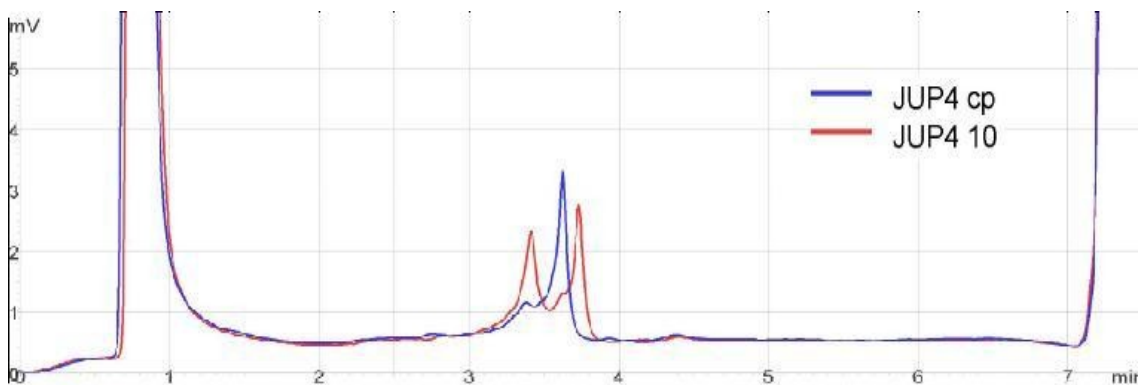
**Fig. 9 = Cromatogramma del paziente 10 relativo alla corsa al DHPLC per l'esone 3.**

Per l'esone 4, lo stesso paziente presenta una variazione a livello intronico, sempre in eterozigosi (Figura 10):



**Fig. 10= Sequenza del paziente 10 per l'esone 4 in cui si evidenzia la variazione in eterozigosi.**

Nella figura 11 è mostrato, per il paziente 4, il cromatogramma al DHPLC, caratterizzato da un doppio picco.



**Fig. 11 = Cromatogramma del paziente 10 relativo alla corsa al DHPLC per l'esone 4.**



## CONCLUSIONI

Sono stati analizzati 21 pazienti affetti da ARVD classica per il gene JUP, nei quali è stata già verificata l'assenza di mutazioni causative della patologia all'interno degli altri geni desmosomali finora noti.

Il gene JUP codifica per una proteina che costituisce il desmosoma assieme a placofilline, desmogleine, plachine e desmocolline. Per questo motivo, oltre al fatto che una mutazione in omozigosi di questo gene è stato dimostrato essere causativa della sindrome di Naxos il cui fenotipo è caratterizzato da una forma di ARVD classica ereditata in forma autosomica recessiva, associata a cheratosi palmoplantare e capelli lanosi, si è scelto di effettuare lo screening per questo gene.

Sono stati riscontrati polimorfismi già noti e 2 variazioni introniche non note, per le quali si rende necessario effettuare test su una popolazione di controlli sani. In questo modo si rende possibile stimare con quale frequenza questa variazione si distribuisce all'interno di una popolazione campione e, in base a questi dati, si può stabilire se si tratta di un polimorfismo più o meno diffuso oppure se si è di fronte ad una mutazione.

Nonostante non siano state rilevate mutazioni durante quest'analisi, non si può escludere un coinvolgimento di JUP nella patologia, in quanto è necessario tener presente che è stata analizzata solo la regione N-terminale, di cui, inoltre, solo gli esoni 2, 3, 4 e 5 sono esoni codificanti, dato che l'esone 1 non viene tradotto.

## BIBLIOGRAFIA

Ahmad F, Li D, Karibe A, Gonzalez O, Tapscott T, Hill R, Weilbaeher D, Blackie P, Furey M, Gardner M, Bachinski LL, Roberts R.

*Localization of a gene responsible for arrhythmogenic right ventricular dysplasia to chromosome 3p23.*

Circulation **1998 Dec** 22-29;98(25):2791-5

Beffagna G, Occhi G, Nava A, Vitiello L, Ditadi A, Basso C, Bauce B, Carraro G, Thiene G, Towbin JA, Danieli GA, Rampazzo A.

*Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1.*

Cardiovasc Res. **2005 Feb** 1;65(2):366-73

Bornslaeger EA, Godel LM, Corcoran CM, Park JK, Hatzfeld M, Kowalczyk AP, Green KJ.

*Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders.*

J Cell Sci. **2001 Feb**;114:727-38

Coonar AS, Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Needham EW, Houlston RS, Cliff S, Otter MI, Murday VA, Mattu RK, McKenna WJ.

*Gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with diffuse nonepidermolytic palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) maps to 17q21.*

Circulation **1998 May** 26;97(20):2049-58.

Corrado D, Basso C, Schiavon M, Thiene G.

*Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes.*

N Engl J Med. **1998 Aug** 6;339(6):364-9

Cowin P, Burke B.

*Cytoskeleton-membrane interactions.*

Curr Opin Cell Biol. **1996 Feb**;8(1):56-65.

Franke, W.W., Goldschmidt, M.D., Zimbelmann, R., Mueller, H.M., Schiller, D.L., Cowin, P.

*Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the common junctional plaque protein*

Proc Natl Acad Sci U S A. **1989 Jun**;86(11):4027-31

Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z.  
*Desmosomal cadherins.*  
Curr Opin Cell Biol. **2002 Oct**;14(5):537-45

Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Drenckhahn J, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Thierfelder L.  
*Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.*  
Nat Genet. **2004 Nov**;36(11):1162-4.

Getsios S, Huen AC, Green KJ.  
*Working out the strength and flexibility of desmosomes.*  
Nat Rev Mol Cell Biol. **2004 Apr**;5(4):271-81

Hatzfeld M.  
*The armadillo family of structural proteins.*  
Int Rev Cytol. **1999**;186:179-224

Huber A. H., Nelson W. J., Weis W. I.  
*Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of  $\beta$ -catenin.*  
Cell. **1997 Sep** 5;90(5):871-82

Huber O.  
*Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease.*  
Cell Mol Life Sci. **2003 Sep**;60(9):1872-90

Kapprell HP, Cowin P, Franke WW  
*Biochemical characterization of the soluble form of the junctional plaque protein, plakoglobin, from different cell types.*  
Eur J Biochem. **1987 Aug** 3;166(3):505-17

Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Borgwardt JE, Palka HL, Dhaliwal AS, Corcoran CM, Denning MF, Green KJ.  
*The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes.*  
J Cell Biol. **1997 Nov** 3;139:773-84

Lehnart SE, Wehrens XH, Kushnir A, Marks AR.  
*Cardiac ryanodine receptor function and regulation in heart disease.*  
Ann N Y Acad Sci. **2004 May**;1015:144-59

Leung CL, Green KJ, Liem RK.  
*Plakins: a family of versatile cytolinker proteins.*  
Trends Cell Biol. **2002 Jan**;12(1):37-45

Li D, Ahmad F, Gardner MJ, Weilbaecher D, Hill R, Karibe A, Gonzalez O, Tapscott T, Sharratt GP, Bachinski LL, Roberts R.  
*The locus of a novel gene responsible for arrhythmogenic right-ventricular dysplasia characterized by early onset and high penetrance maps to chromosome 10p12-p14.*  
Am J Hum Genet. **2000 Jan**;66(1):148-56

Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, Frank R, Laurenceau JL, Malergue C, Grosgeat Y  
*Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases.*  
Circulation **1982 Feb**;65(2):384-98

McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, McKenna WJ.  
*Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease).*  
Lancet **2000 Jun** 17;355(9221):2119-24

Melberg A, Oldfors A, Blomstrom-Lundqvist C, Stalberg E, Carlsson B, Larsson E, Lidell C, Eeg-Olofsson KE, Wikstrom G, Henriksson G, Dahl N.  
*Autosomal dominant myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy linked to chromosome 10q.*  
Ann Neurol. **1999 Nov**;46(5):684-92

North AJ, Bardsley WG, Hyam J, Bornslaeger EA, Cordingley HC, Trinnaman B, Hatzfeld M, Green KJ, Magee AI, Garrod DR.  
*Molecular map of the desmosomal plaque.*  
J Cell Sci. **1999 Dec**;112:4325-36

Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon A, Frigo G, Vettori A, Valente M, Towbin J, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A.  
*Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.*  
Circulation **2006 Mar** 7;113(9):1171-9

Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Patsourakos P, Alexopoulos D, Gezerlis P, Simitsis S, Scampardonis G.  
*Cardiac abnormalities in familial palmoplantar keratosis.*  
Br Heart J. **1986 Oct**;56(4):321-6

Rampazzo A, Nava A, Danieli GA, Buja G, Daliento L, Fasoli G, Scognamiglio R, Corrado D, Thiene G.  
*The gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy maps to chromosome 14q23-q24.*  
Hum Mol Genet. **1994 Jun**;3(6):959-62

Rampazzo A, Nava A, Erne P, Eberhard M, Vian E, Slomp P, Tiso N, Thiene G, Danieli GA.  
*A new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVD2) maps to chromosome 1q42-q43.*  
Hum Mol Genet. **1995 Nov**;4(11):2151-4

Rampazzo A, Nava A, Miorin M, Fonderico P, Pope B, Tiso N, Livolsi B, Zimbello R, Thiene G, Danieli GA  
*ARVD4, a new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, maps to chromosome 2 long arm*  
Genomics **1997 Oct** 15;45(2):259-63

Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Beffagna G, Bauce B, Rossi V, Zimbello R, Simionati B, Basso C, Thiene G, Towbin JA, Danieli GA.  
*Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.*  
Am J Hum Genet. **2002 Nov**;71(5):1200-6

Severini GM, Krajcinovic M, Pinamonti B, Sinagra G, Fioretti P, Brunazzi MC, Falaschi A, Camerini F, Giacca M, Mestroni L.  
*A new locus for arrhythmogenic right ventricular dysplasia on the long arm of chromosome 14.*  
Genomics **1996 Jan** 15;31(2):193-200

Sporn MB, Roberts AB.  
*Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges.*  
J Cell Biol. **1992 Dec**;119(5):1017-21

Syrris P, Ward D, Evans A, Asimaki A, Gandjbakhch E, Sen-Chowdhry S, McKenna WJ.

*Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2.*

Am J Hum Genet. **2006 Nov**;79(5):978-84

Thiene G, Nava A, Corrado D, Rossi L, Pennelli N. *Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people.*

N Engl J Med. **1988 Jan** 21;318(3):129-33

Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmabhatt B, Brown K, Bauce B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A.

*Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2).*

Hum Mol Genet. **2001 Feb** 1;10(3):189-94

Troyanovsky RB, Chitaev NA, Troyanovsky SM.

*Cadherin binding sites of plakoglobin: localization, specificity and role in targeting to adhering junctions.*

J Cell Sci. **1996 Dec**;109 ( Pt 13):3069-78.

Wahl JK, Sacco PA, McGranahan-Sadler TM, Sauppé LM, Wheelock MJ, Johnson KR.

*Plakoglobin domains that define its association with the desmosomal cadherins and the classical cadherins: identification of unique and shared domains.*

J Cell Sci. **1996 May**;109 ( Pt 5):1143-54

Witcher LL, Collins R, Puttagunta S, Mechanic SE, Munson M, Gumbiner B, Cowin P.

*Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin.*

J Biol Chem. **1996 May** 3;271(18):10904-9.

Whittock NV, Bower C.

*Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4.*

J Invest Dermatol. **2003 Apr**;120(4):523-30