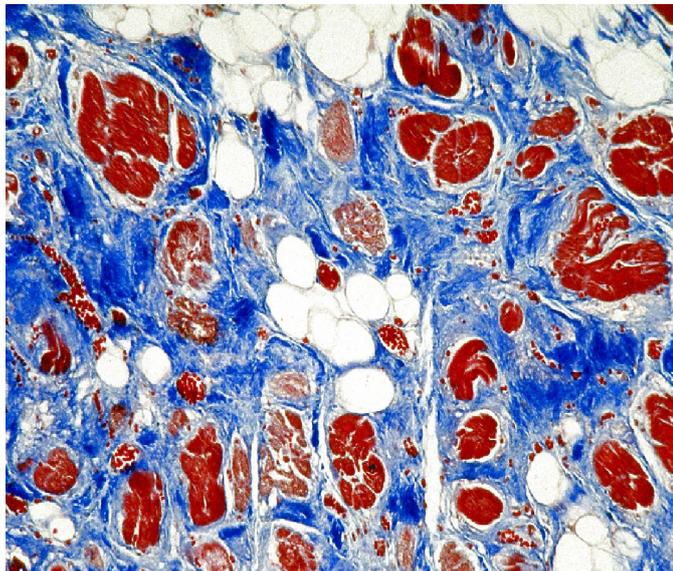


# INTRODUZIONE

## Generalità

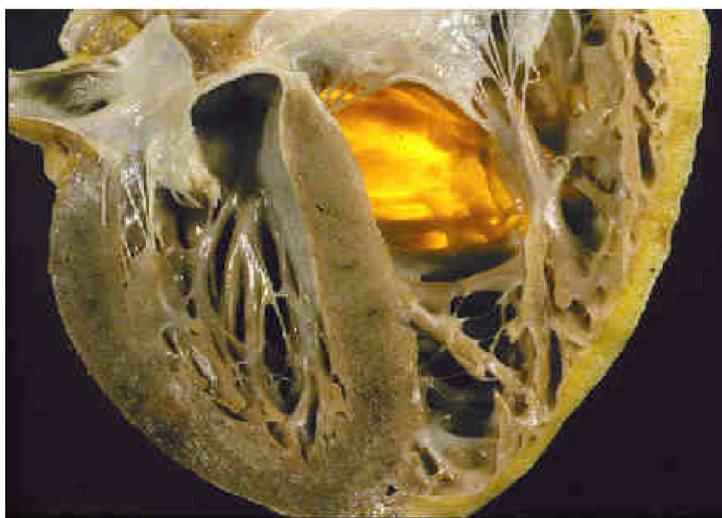
La cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVC, un tempo denominata displasia aritmogena del ventricolo destro, ARVD) è una malattia ereditaria del muscolo cardiaco caratterizzata da anomalie funzionali e strutturali del ventricolo destro. Dal punto di vista patologico, la malattia presenta progressiva perdita di cardiomiociti che formano la parete libera del miocardio, con conseguente sostituzione adiposa o fibro-adiposa (Figura 1) (Thiene *et al.*, 1988; Nava *et al.*, 1997). Questo cambiamento causa disomogeneità nel tessuto alterandone le caratteristiche di conduzione dell'impulso elettrico. Si creano in tal modo circuiti anatomici di rientro che danno origine ad aritmie ventricolari, le quali possono provocare fibrillazione ventricolare e morte improvvisa (Thiene *et al.*, 1988; Marcus *et al.*, 1995).



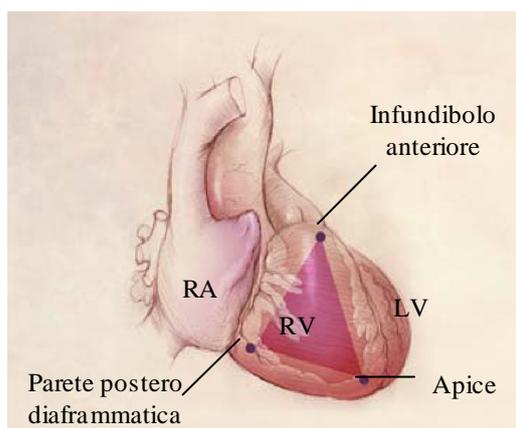
**Figura 1.** Preparato istologico ricavato dalla parete libera del ventricolo destro del cuore di un paziente affetto da ARVC e deceduto improvvisamente all'età di 39 anni per una crisi aritmica. I cardiomiociti (in colore rosso) sono stati sostituiti da tessuto adiposo (in colore bianco) e fibroso (in colore blu). Colorazione Azan-Mallory. (Per gentile concessione del Prof. Gaetano Thiene.)

A livello morfologico, il versante destro del cuore di pazienti affetti da ARVC presenta un peculiare colore giallastro indicativo dell'elevata sostituzione adiposa e dell'ispessimento fibroso, e appare talvolta transilluminabile (Figura 2). Queste alterazioni sono localizzate soprattutto in tre distretti: infundibolo polmonare,

apice e tratto di efflusso del ventricolo destro, il cosiddetto “triangolo della displasia” (Figura 3). Più recentemente si è visto che in alcuni casi è possibile anche il coinvolgimento del ventricolo sinistro (Corrado *et al.*, 1997), quale conseguenza di una progressione nel tempo della malattia da destra a sinistra.



**Figura 2.** Cuore di un paziente deceduto a causa di ARVC, in cui è evidente la caratteristica transilluminabilità della parete libera del ventricolo destro in seguito all'esposizione a fonte di luce esterna. (Per gentile concessione del Prof. Gaetano Thiene)



**Figura 3.** Triangolo della displasia. (RA: atrio destro; RV: ventricolo destro; LV: ventricolo sinistro) (Modificata da: Anderson, 2006)

Si distinguono due varianti istologiche di ARVC, a seconda del tipo di tessuto che va a sostituirsi al miocardio: la forma adiposa e quella fibro-adiposa. Entrambe sono caratterizzate da dilatazione del ventricolo destro, ma nella forma fibro-adiposa è stato riscontrato in aggiunta il coinvolgimento del ventricolo sinistro nel 50% dei casi e del setto interventricolare in misura minore; inoltre, la parete del ventricolo destro appare più sottile ( $< 3$  mm) e gli aneurismi e gli infiltrati infiammatori sono più frequenti rispetto alla variante adiposa (Basso *et al.*, 1996). La cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro è risultata la principale causa di morte improvvisa nei giovani, per lo più atleti, sotto i 35 anni di età, rappresentando tra il 12,5 e il 25% dei decessi avvenuti in Italia dal 1979 al 1996 (Corrado *et al.*, 1998). La prevalenza della patologia nella regione Veneto è stata stimata intorno a 1/1500, con punte di 7/1500 in alcune sottopopolazioni

(Rampazzo *et al.*, 1994). L'esatta prevalenza della malattia potrebbe, però, essere più alta a causa della presenza di molti casi asintomatici non diagnosticati o erroneamente classificati come cardiomiopatie dilatative.

I primi sintomi si manifestano solitamente in pazienti nella fascia d'età compresa tra la seconda e la quarta decade di vita. La diagnosi *in vivo* di questa malattia è resa complessa e difficile dalla notevole eterogeneità dei segni clinici e dei sintomi riscontrabili nei soggetti affetti, a causa della sua natura progressiva. Una serie di criteri diagnostici standardizzati è stata proposta nel 1994, quando ancora non erano disponibili sufficienti dati genetici su questa patologia, da una Task Force internazionale, costituita dai maggiori esperti di ARVC (McKenna *et al.*, 1994). Successivamente, l'individuazione di portatori di mutazioni genetiche, in assenza di sintomi clinici evidenti o con una forma lieve di malattia, ha sospinto a riconsiderare tali criteri; in particolare, è stata proposta una modificazione delle linee guida della Task Force per ricercare, tra i familiari dei probandi, i soggetti che si trovano in una fase precoce e "oculta" della malattia.

Nella storia naturale dell'ARVC si distinguono quattro fasi clinicopatologiche (Thiene *et al.*, 1990; Corrado *et al.*, 1997):

- I. Una fase occulta caratterizzata da minime anomalie strutturali del ventricolo destro (forma segmentaria), con o senza aritmie ventricolari minori. Durante questa fase gli individui affetti non presentano sintomi e la morte improvvisa per arresto cardiaco può essere, paradossalmente, la prima e unica manifestazione della malattia, soprattutto in giovani atleti durante l'attività sportiva o un intenso esercizio fisico
- II. Una seconda fase di instabilità elettrica, con palpitazioni, sincopi ed aritmie ventricolari destre con rischio di arresto cardiaco, associate ad alterazioni morfo-funzionali conclamate del ventricolo destro.
- III. Una terza fase di scompenso cardiaco, causata dalla progressione e dall'estensione della malattia a tutto il ventricolo destro, mentre è ancora relativamente conservata la funzionalità di quello sinistro.
- IV. Una quarta fase di insufficienza biventriolare in cui c'è un forte coinvolgimento del ventricolo sinistro e le aritmie ventricolari possono essere polimorfiche, in quanto si originano da diverse regioni cardiache.

Il rischio di morte improvvisa persiste comunque in tutte e quattro le fasi; quando sopraggiunge in età adulta, in assenza di un esame autoptico, potrebbe essere erroneamente attribuita ad infarto del miocardio (Corrado *et al.*, 1997).

Di recente, grazie alla migliore caratterizzazione clinica e genetica, sono stati individuati tre principali profili di espressione della malattia (Sen-Chowdhry *et al.*, 2007):

- i. *Classico*, in cui la malattia è inizialmente situata nel ventricolo destro e coinvolge solo successivamente quello sinistro.
- ii. *Dominante sinistro*, caratterizzato da manifestazioni evidenti e precoci a carico del ventricolo sinistro, con un coinvolgimento minore del destro.
- iii. *Biventricolare*, in cui entrambi i ventricoli sono affetti parallelamente e in ugual misura.

La novità più rilevante riguarda il coinvolgimento del ventricolo sinistro: in alcuni casi la sua disfunzione può precedere quella del ventricolo destro e non ricorrere soltanto nello stadio finale della malattia.

### **Genetica molecolare dell'ARVC**

La cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro è una malattia genetica trasmessa generalmente come carattere autosomico dominante a penetranza incompleta (Marcus *et al.*, 1982; Nava *et al.*, 1988; Awad *et al.*, 2008); è tuttavia presente una forma (sindrome di Naxos) ereditata come autosomico recessivo. In questa sindrome la cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro è associata a cheratosi palmoplantare e capelli lanosi. Il nome della sindrome è dovuto al fatto che è stata originariamente descritta in alcune famiglie residenti nell'omonima isola della Grecia (Protonotarios *et al.*, 1986).

Tramite studi di linkage con marcatori microsatellite polimorfi del DNA e l'analisi di geni candidati in famiglie con ricorrenza di casi ARVC, sono stati finora individuati 12 loci indipendentemente implicati nella trasmissione della patologia; per 9 di questi è già stato identificato il gene implicato (Tabella I).

<b>Locus</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Gene implicato</b>
<b>ARVD 1</b>	14q23-q24 (Rampazzo <i>et al.</i> 1994)	<b>TGFβ3</b> (Beffagna <i>et al.</i> , 2005)
<b>ARVD 2</b>	1q42-q43 (Rampazzo <i>et al.</i> , 1995)	<b>RYR2</b> (Tiso <i>et al.</i> , 2001)
<b>ARVD 3</b>	14q12-q22 (Severini <i>et al.</i> , 1996)	sconosciuto
<b>ARVD 4</b>	2q32.1-q32.3 (Rampazzo <i>et al.</i> , 1997)	Sconosciuto
<b>ARVD 5</b>	3p23 (Ahamad <i>et al.</i> , 1998)	<b>TMEM43</b> (Merner <i>et al.</i> , 2008)
<b>ARVD 6</b>	10p12-p14 (Li <i>et al.</i> , 2000)	Sconosciuto
<b>ARVD 7</b>	10q22 (Melberg <i>et al.</i> 1999)	Sconosciuto
<b>ARVD 8</b>	6p24 (Rampazzo <i>et al.</i> , 2002)	<b>DSP</b> (Rampazzo <i>et al.</i> , 2002)
<b>ARVD 9</b>	12p11.21 (Gerull <i>et al.</i> , 2004)	<b>PKP2</b> (Gerull <i>et al.</i> , 2004)
<b>ARVD10</b>	18q12.1-q12.2 (Pilichou <i>et al.</i> , 2006)	<b>DSG2</b> (Pilichou <i>et al.</i> , 2006)
<b>ARVD11</b>	18q12.1-q12.2 (Syrris <i>et al.</i> , 2006)	<b>DSC2</b> (Syrris <i>et al.</i> , 2006)
<b>ARVD12</b>	17q21 (Asimaki <i>et al.</i> , 2007)	<b>JUP</b> (Asimaki <i>et al.</i> , 2007)
<b>NAXOS</b>	17q21 (Coonar <i>et al.</i> , 1998)	<b>JUP</b> (McKoy <i>et al.</i> , 2000)

**Tabella I:** Localizzazione cromosomica dei loci ARVC finora noti e relativi geni già identificati.

Il gene implicato nella sindrome di Naxos codifica la proteina desmosomale placoglobina (JUP). La mutazione identificata originariamente negli abitanti dell'isola è una microdelezione di due paia di basi, in omozigosi. Tale delezione comporta uno slittamento del modulo di lettura che introduce a valle un codone di stop e conseguentemente determina la produzione di una proteina tronca (McKoy *et al.*, 2000). Lo stesso gene è anche implicato nella forma dominante ARVC12, provocata da un'inserzione di tre nucleotidi, che causa l'inserimento di una serina nel dominio N-terminale della placoglobina. A differenza del caso precedente la mutazione risulta patogena in eterozigosi, e, a livello fenotipico, non comporta anomalie della pelle o dei capelli (Asimaki *et al.*, 2007).

Le forme ARVD8, ARVD9, ARVD10, ARVD11 sono dovute a mutazioni nei geni che codificano, rispettivamente, desmoplachina (DSP; Rampazzo *et al.*, 2002), placofilina 2 (PKP2; Gerull *et al.*, 2004), desmogleina 2 (DSG2; Pilichou

*et al.*, 2006) e desmocollina 2 (DSC2; Syrris *et al.*, 2006), tutte componenti dei desmosomi dei cardiomiociti.

Di recente, invece, è stato scoperto il gene implicato nell'ARVD5: TMEM43, che codifica una proteina transmembrana altamente conservata nel corso dell'evoluzione. Tramite sequenziamento bidirezionale è stata identificata una mutazione *missense*, responsabile di un tipo di cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro con elevata penetranza ed espressione preferenziale nei maschi. Sebbene le funzioni di questa proteina siano ancora poco note, si pensa che essa sia coinvolta in una via adipogenica regolata da PPAR $\gamma$ , in quanto contiene un elemento di risposta per tale fattore di trascrizione. Perciò, variazioni a carico del gene TMEM43 potrebbero alterare questa via e determinare la caratteristica sostituzione fibro-adiposa del miocardio nei pazienti ARVC (Merner *et al.*, 2008). ARVD2 è una forma peculiare di ARVD ed è facile la diagnosi differenziale perché i pazienti presentano aritmie ventricolari polimorfe indotte dallo sforzo (Rampazzo *et al.*, 1995). Il gene coinvolto è RYR2, che codifica il recettore rianodinico cardiaco, un canale del calcio situato sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico dei cardiomiociti (Tiso *et al.*, 2001), dove svolge una funzione cardine nell'omeostasi intracellulare del calcio e nel meccanismo di accoppiamento eccitazione-contrazione. Mutazioni in questo gene sono state descritte anche in soggetti affetti da tachicardie polimorfe catecolaminergiche indotte da sforzo (CPVT) in assenza di evidenti anomalie strutturali del miocardio (Priori *et al.*, 2001). La rilevazione di casi ARVD e CPVT all'interno di una famiglia, entrambi riconducibili alla medesima mutazione, ha portato ad ipotizzare che le due patologie possano corrispondere a gradi diversi di espressione fenotipica della stessa malattia (d'Amati *et al.*, 2005). Le mutazioni trovate finora nel gene RYR2 comportano la sostituzione di aminoacidi, altamente conservati, in domini critici per la regolazione del calcio e, in particolar modo, provocano un'aumentata attività del canale, andando così ad incrementare la concentrazione di calcio intracellulare (George *et al.*, 2003; Bagattin *et al.*, 2004).

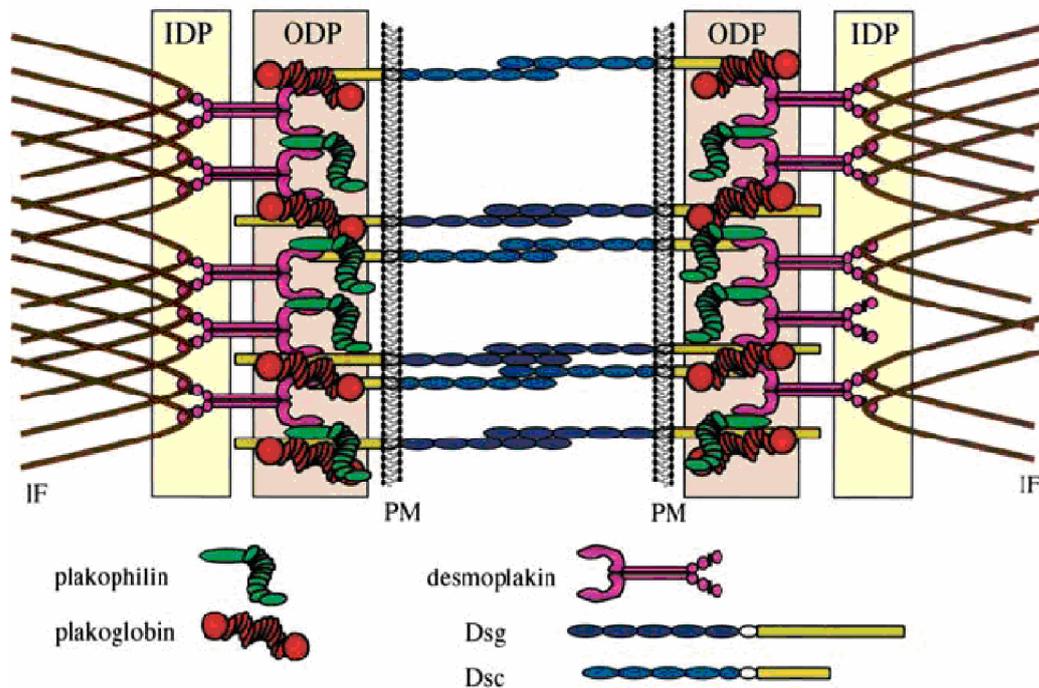
TGF- $\beta$ 3 (Fattore di crescita trasformante  $\beta$ 3) è il gene responsabile della forma classica ARVD1. Tale gene codifica una citochina solubile appartenente alla superfamiglia TGF- $\beta$  i cui membri svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nell'omeostasi cellulare (Sporn *et al.*, 1992). Tra le sue molteplici funzioni ci sono anche quelle di inibire la proliferazione di molti tipi cellulari, stimolare l'apoptosi delle cellule epiteliali e indurre una risposta fibrotica in vari tessuti, andando a promuovere l'espressione di geni implicati nella produzione di matrice extracellulare (Leask *et al.*, 2004). In questo gene sono state individuate due sostituzioni nucleotidiche nelle regioni non codificanti 5'UTR e 3'UTR. Le

mutazioni determinano una sovra-espressione della proteina, per cui si ipotizza che possano determinare *in vivo* un' aumentata sintesi di questo fattore di crescita, stimolando la formazione di tessuto fibroso nel miocardio (Beffagna *et al.*, 2005). E' stato inoltre dimostrato che i geni TGF- $\beta$  modulano l'espressione di componenti dei desmosomi in diversi tipi cellulari (Yoshida *et al.*, 1992). La conseguenza di queste variazioni patologiche potrebbe quindi risultare in un'alterata stabilità delle giunzioni intercellulari, in modo analogo alle mutazioni descritte in precedenza nei geni codificanti proteine desmosomali, portando a postulare l'esistenza di un meccanismo patogenico comune alle varie forme di ARVD.

Poiché ben cinque su otto geni, implicati nella determinazione genetica della cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro, vengono tradotti in proteine costituenti i desmosomi, si ritiene che questa malattia sia dovuta, prevalentemente, ad alterazioni strutturali e funzionali in tali giunzioni, in grado di provocare (con meccanismo ancora non chiarito) la degenerazione ed apoptosi dei cardiomiociti e la conseguente sostituzione fibro-adiposa (Ahmad *et al.*, 2003).

I desmosomi (Figura 4) sono giunzioni intercellulari adesive, multiproteiche e simmetriche a forma di disco (Kelly, 1966; North *et al.*, 1999). Sono espressi in particolar modo nei tessuti sottoposti a significativi stress meccanici in senso laterale o da stiramento come gli epitelii e il miocardio (Gallicano *et al.*, 2001). Da un punto di vista ultrastrutturale presentano un aspetto peculiare; essi, infatti, sono costituiti da due regioni principali: la regione centrale extracellulare (ECD), detta anche "desmoglea", attraversata da una linea intermedia elettrondensa, e la placca citoplasmatica, densa e simmetrica, che si sviluppa parallelamente alla membrana plasmatica. Ciascuna placca a sua volta consiste di due regioni: la placca densa esterna (ODP) e la placca interna un po' meno densa (IDP), sulla quale si inseriscono i filamenti intermedi (IF). La regione compresa tra i filamenti intermedi e il lato interno di ODP è chiamata "regione satellite" (Miller *et al.*, 1987; Garrod *et al.*, 1990).

Tali giunzioni sono formate da proteine appartenenti a tre grandi famiglie: le plachine, le proteine armadillo e le caderine (Figura 4) (Huber *et al.*, 2003; Getsios *et al.*, 2004)



**Figura 4.** Modello molecolare dei desmosomi. Sono illustrate le interazioni tra le proteine desmosomali e la loro localizzazione all'interno della placca. (ODP: placca densa esterna; IDP: placca densa interna; IF: filamenti intermedi; PM: membrana plasmatica.) (Da Huber O., 2003)

Le caderine, desmocollina (DSC, di tipo 1, 2 e 3) e desmogleina (DSG, di tipo 1, 2, 3 e 4) sono glicoproteine transmembrana, aventi il dominio C-terminale situato nella regione intracellulare della ODP, mentre il dominio N-terminale si trova nello spazio intercellulare esterno. La loro funzione è di mediare l'adesione cellula-cellula, calcio-dipendente, interagendo con le caderine delle cellule circostanti (Parker *et al.*, 1991; Garrod *et al.*, 2002).

Le proteine armadillo sono caratterizzate da un dominio centrale contenente un numero variabile di ripetizioni imperfette di 42 aminoacidi, noto come motivo *arm* (Hatzfeld 1999); comprendono plakoglobina (PKG, Franke *et al.*, 1989) e plakofilina (PKP, di tipo 1, 2, 3 e 4, Mertens *et al.*, 1996). Queste proteine, anch'esse localizzate nella ODP, mediano il contatto tra plachine e caderine, svolgendo un ruolo di notevole importanza nella regolazione dell'assemblaggio e dell'adesione desmosomale.

La famiglia delle plachine include la plectina, l'envoplachina, la periplachina e la desmoplachina (Leung *et al.*, 2002). Quest'ultima, in particolare, ha la funzione di accoppiare i siti di adesione intercellulare alla rete di filamenti intermedi (North *et al.*, 1999), in quanto la sua estremità N-terminale si colloca all'interno della placca densa esterna (ODP), mentre l'estremità C-terminale si affaccia sul

versante citoplasmatico della IDP (Bornslaeger *et al.*, 1996). La proteina, dunque, attraversa completamente la placca, trovandosi in tal modo in una posizione strategica per mettere in contatto tra loro la maggior parte delle componenti desmosomali (North *et al.*, 1999).

Nel cuore, i desmosomi sono diffusi nei dischi intercalari, giunzioni cellulari specializzate a livello dei siti di contatto tra i cardiomiociti, e rivestono un ruolo chiave per lo sviluppo cardiaco (Bierkamp *et al.*, 1996; Gallicano *et al.*, 2001). Delle proteine citate, vengono espresse qui solo determinate isoforme: tra le caderine si trovano DSC2 e DSG2 (Schafer *et al.*, 1994; Nuber *et al.*, 1995); tra le proteine armadillo ci sono PG, PKP2 e PKP4 (Cowin *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 2002), e, per finire, tra le plachine c'è DSP, che lega i filamenti intermedi, costituiti da desmina (Angst *et al.*, 1990).

Diversi modelli sono stati proposti per spiegare le interazioni tra le suddette proteine desmosomali. Nello specifico, il modello lineare, oggi accettato, prevede l'associazione delle desmogleine e desmocolline con la placoglobina e le placofiline. Le proteine armadillo, a loro volta, interagiscono con le desmoplachine, le quali legano i filamenti intermedi alla membrana plasmatica (Green e Gaudry, 2000). Inoltre, sembra che la desmoplachina leghi direttamente le caderine, senza dover necessariamente interagire con le proteine armadillo (Smith *et al.*, 1998).

### **Desmoplachina**

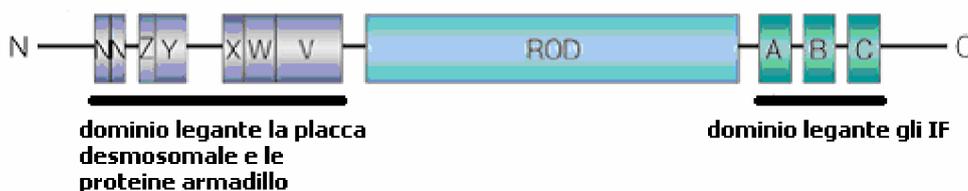
La desmoplachina, come già accennato precedentemente, appartiene alla superfamiglia delle plachine ed è la proteina più abbondantemente espressa nei desmosomi (Alcalai *et al.*, 2003). Si presenta come un omodimero a forma di manubrio. Esiste in due isoforme: la DSPI, il cui prodotto proteico di 2871 aminoacidi raggiunge un peso molecolare pari a 322 kDa, e la DSPII, costituita da 2271 aminoacidi, di 259 kDa, generate dallo splicing alternativo (Virata *et al.*, 1992) di un singolo gene, che si estende per 45 kb e contiene 24 esoni, localizzato sul cromosoma 6p24.3. Entrambe sono caratterizzate da una struttura tripartita, con un dominio globulare a ciascuna estremità e una regione centrale ad  $\alpha$ -elica, chiamata dominio *rod*, responsabile dell'avvolgimento parallelo uno sull'altro di due monomeri che vanno, così, a formare la tipica struttura a manubrio dell'omodimero (Choi *et al.*, 2002). L'isoforma II, a differenza della I, mostra un dominio *rod* estremamente ridotto, ma comunque funzionale, e viene espressa

unicamente nell'epitelio stratificato, non in cuore (Cowin *et al.*, 1985; Virata *et al.*, 1992).

Il dominio amino-terminale è necessario per la localizzazione della desmoplachina nella placca desmosomale (Stappenbeck *et al.*, 1993; Bornslaeger *et al.*, 1996), in quanto, con i suoi sottodomini NN, Z, Y, X, W e V, serve a prendere contatto con placoglobina e placofilina (Figura 5) (Trojanovsky *et al.* 1994).

La regione carbossi-terminale lega i filamenti intermedi e comprende tre domini PRD (domini ripetuti delle plachine), chiamati A, B e C, ciascuno dei quali esprime 4,5 copie di un motivo di 38 aminoacidi (Green *et al.*, 1990). I domini B e C sono strutture globulari che condividono il 29% di identità di sequenza, ognuno dei quali mostra un solco rappresentante il potenziale sito di legame ai filamenti intermedi (Choi *et al.*, 2002).

### Desmoplakin

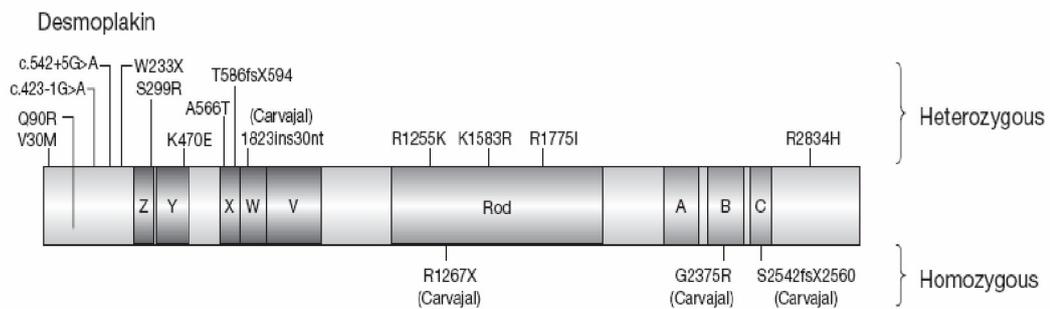


**Figura 5.** Rappresentazione schematica del gene DSP (modificata da Green e Gaudry, 2000).

Sempre all'estremità C-terminale si trova un dominio ricco in glicina-serina-arginina (GSR). Si ritiene che il passaggio dallo stato fosforilato a quello non fosforilato della serina, appartenente a tale dominio, possa regolare la capacità della desmoplachina di interagire con i filamenti intermedi, connettendo il desmosoma al citoscheletro (Stappenbeck *et al.*, 1994).

Finora sono stati trovati diversi tipi di mutazioni a carico del gene della desmoplachina (Figura 6). Queste determinano sia una forma dominante di ARVC che una forma recessiva, associata o meno a difetti di pelle e capelli; in alcuni casi mutazioni di DSP possono determinare difetti a livello dell'epidermide senza tuttavia coinvolgere il miocardio (Norgett *et al.*, 2006). La mutazione responsabile dell'ARVD8, identificata nell'esone 7 (C1176G; AGC>AGG), porta alla sostituzione di una serina con un'arginina (S299R) e sopprime un sito putativo di fosforilazione fortemente conservato nelle proteine della stessa famiglia (Rampazzo *et al.*, 2002). Una mutazione in omozigosi del gene DSP (7901delG) causa la sindrome di Carvajal, una malattia ereditata come un carattere

autosomico recessivo, caratterizzata dalla presenza di cardiomiopatia dilatativa biventricolare, cheratosi palmoplantare e capelli lanosi. In questo caso l'alterazione produce un codone di stop prematuro, posto 18 residui aminoacidici a valle della delezione, determinando la formazione di una proteina con un dominio C-terminale tronco (Carvajal *et al.*, 1998; Norgett *et al.*, 2000).



**Figura 6.** Rappresentazione schematica del gene che codifica la proteina desmoplachina in cui è mostrata la distribuzione delle mutazioni individuate finora: è possibile notare che la maggior parte di esse si trova nel dominio N-terminale. (Da Awad *et al.*, 2008.)

Studi di correlazione genotipo-fenotipo hanno evidenziato che variazioni patologiche nel dominio N-terminale della desmoplachina determinano un fenotipo “classico” di cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (Bauce *et al.*, 2005), mentre difetti che alterano la porzione C-terminale della proteina, in particolar modo nella regione di legame alla desmina, determinano un’alta frequenza di morte improvvisa, come prima manifestazione della malattia, e un coinvolgimento precoce e predominante del ventricolo sinistro (Sen-Chowdhry *et al.*, 2007). Uno studio recente ha inoltre dimostrato che la soppressione dell’espressione della desmoplachina comporta la localizzazione nucleare della placoglobina, nota anche come  $\gamma$ -catenina, una proteina armadillo con un ruolo molto importante nell’assemblaggio dei desmosomi e nella regolazione dell’espressione genica, presente sia nella membrana plasmatica sia, in quantità minore, nel nucleo. Lo squilibrio che ne risulta colpirebbe la via di segnalazione canonica Wnt/ $\beta$ -catenina (Garcia-Gras *et al.*, 2006). Questa via, quando attiva, aumenta la miogenesi, inibisce i fattori di trascrizione adipogenici, mantiene i pre-adipociti in uno stato indifferenziato e protegge molte cellule dall’apoptosi (Ross *et al.*, 2000). Il ruolo di inibitore giocato dalla placoglobina sulla via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina, in seguito alla sua traslocazione nel nucleo, potrebbe dunque essere alla base della sostituzione fibro-adiposa del miocardio, caratteristica dell’ ARVC (Garcia-Gras *et al.*, 2006).

La creazione di topi knockout per il gene codificante la desmoplachina ha sottolineato la sua funzione durante l'embriogenesi; infatti, la delezione in omozigosi di tale gene ( $DSP^{-/-}$ ) determina un'elevata letalità embrionale, come conseguenza di gravi anomalie cardiache (Gallicano *et al.*, 1998). Invece, topi eterozigoti per la delezione ( $DSP^{+/-}$ ) hanno mostrato un eccesso di adipociti e fibrosi nel miocardio, associato a disfunzioni cardiache, con anomalie strutturali molto evidenti in entrambi i ventricoli, aumento della morte cellulare programmata dei miociti, aritmie ventricolari, accumulo di placoglobina nel nucleo e riduzione dei livelli di espressione di geni bersaglio della via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina, confermando complessivamente i risultati ottenuti dagli studi *in vitro* (Garcia-Gras *et al.*, 2006).

D'altra parte la creazione di topi transgenici che sovraesprimono, a livello cardiaco, una forma mutata di desmoplachina umana nella porzione N- e C-terminale è stata d'aiuto per la caratterizzazione degli effetti *in vivo* di due mutazioni trovate in pazienti ARVC (Yang *et al.*, 2006). La mutazione N-terminale porta ad elevata letalità embrionale, a causa delle evidenti anomalie strutturali del cuore. La sovraespressione della variazione nucleotidica nella regione C-terminale determina invece difetti cardiaci nei topi adulti, che mostrano un'elevata apoptosi dei cardiomiociti, fibrosi cardiaca, accumulo di goccioline lipidiche all'interno delle cellule e disfunzioni a carico di entrambi i ventricoli. È stata riscontrata inoltre l'interruzione delle interazioni della desmoplachina con i filamenti di desmina e anomalie nei dischi intercalari, accompagnata da aumentata espressione e redistribuzione della placoglobina, placofilina 2 e  $\beta$ -catenina.

Allo stato attuale delle conoscenze l'individuazione delle mutazioni del gene DSP che risultano patogene è di fondamentale importanza per comprendere meglio le relazioni funzionali delle diverse parti della proteina e per tentare di stabilire correlazioni genotipo-fenotipo. Queste potrebbero consentire ai cardiologi di formulare una prognosi in base alla conoscenza della mutazione patogena riscontrata nel paziente.

## **SCOPO DELLA RICERCA**

Il gene DSP è molto importante tra quelli che determinano ARVC. Nel laboratorio in cui ho svolto la tesi di laurea è in corso uno studio volto ad accertare il contributo percentuale delle mutazioni dei diversi geni alla manifestazione della malattia. Lo screening di mutazioni nei diversi geni ha finora riguardato 110 casi indice non imparentati tra loro e appartenenti alla popolazione italiana. Il lavoro della presente tesi si inquadra in questa ricerca e riguarda l'analisi di mutazioni nel gene DSP in 50 soggetti affetti da cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro.



# MATERIALI E METODI

## Reperimento dei casi ed estrazione del DNA da sangue intero

Ai fini della ricerca è stato analizzato il DNA di 50 soggetti affetti da ARVC, in base alla diagnosi effettuata nel Dipartimento di Cardiologia dell'Università di Padova dal Prof. Nava e dalla Dott.ssa Bauce. Ai pazienti presi in esame è stato prelevato con il loro consenso un campione di 10 ml di sangue, fornito in provette contenenti 70 µl di Potassio-EDTA (Acido EtilenDiammino Tetracetico) 0,38 M, per evitarne la coagulazione, e mantenuto a -20°C, fino al momento dell'estrazione.

Per estrarre il DNA è stato usato il metodo del *salting out* (Miller *et al.*, 1988) modificato dal Dott. Rosa (Laboratorio di Genetica Umana dell'Università di Padova).

### Reagenti:

- Soluzione N-N [NaCl 0,9%; Nonidet (NP40) 0,1%]
- Soluzione TEN (TrisHCl 10 mM, pH 8; EDTA 2 mM; NaCl 400 mM)
- TE (TrisHCl 10 mM, pH 8; EDTA 1mM)
- SDS 10%
- NaCl saturo
- Cloroformio
- Isopropanolo
- Etanolo 70%

### Procedimento:

Per prima cosa, il sangue da cui si deve estrarre il DNA, conservato a -20°C, viene fatto scongelare e quindi viene trasferito in una Falcon da 50 ml a cui si aggiunge la soluzione N-N in quantità tale da avere un volume finale di 40 ml. Questa soluzione è costituita da un detergente (Nonidet) ipotonico che ha lo scopo di disgregare le membrane dei linfociti già in parte lisate dal processo di congelamento e scongelamento. Dopo aver sigillato le Falcon con parafilm, i campioni vengono centrifugati a 6000 rpm per 35 minuti a 4°C. In seguito viene eliminato il surnatante e si risospende il pellet così ottenuto in altri 40 ml di

soluzione N-N. Si ripete la centrifuga alle stesse condizioni e al pellet che si ottiene, questa volta, vengono aggiunti 4 ml di soluzione TEN autoclavata. Il TEN rappresenta un tampone di lisi sterile per la disgregazione delle membrane nucleari dei linfociti e per la denaturazione delle proteine. Tale soluzione, inoltre, contiene EDTA che agendo da chelante di ioni bivalenti, in particolare  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , li sottrae all'utilizzo, come cofattori, da parte delle DNasi, salvaguardando l'integrità del DNA. Dopo aver vortexato i campioni, fino al raggiungimento di una soluzione omogenea, vengono aggiunti 600  $\mu\text{l}$  di SDS 10%, un detergente anionico che favorisce la solubilizzazione delle proteine denaturate e quindi il loro distacco dal DNA. A questo punto, si incuba il tutto a  $80^{\circ}\text{C}$  per 3 ore, per favorire la completa denaturazione delle proteine. Terminata questa fase, a ciascun campione si aggiunge 1 ml di NaCl saturo, un sale che fa precipitare le proteine, e si centrifuga a 6000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante viene in seguito trasferito in una Falcon da 15 ml e, dopo aver aggiunto un isovolume di cloroformio, solvente organico che sequestra le proteine idrofobiche ed i lipidi, si agita manualmente fintanto che la soluzione diventa omogenea, e si centrifuga nuovamente alle stesse condizioni. Tale operazione consente di ottenere due fasi ben distinte: una superiore, in cui si trovano gli acidi nucleici in soluzione, e una inferiore, contenente il cloroformio, separate tra loro da un'interfaccia biancastra, costituita dalle proteine e dalle membrane inizialmente presenti nei campioni. Si procede al trasferimento della fase superiore, facendo attenzione a non trasferire anche l'interfaccia proteica, in una nuova Falcon da 15 ml, in cui si precipitano gli acidi nucleici aggiungendo un isovolume di isopropanolo e agitando delicatamente per inversione, fino alla formazione del flocculo che contiene il DNA condensato. Successivamente, i campioni vengono centrifugati a 6000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente, per rimuovere del tutto i contaminanti e concentrare il DNA che, raccogliendosi sul fondo della provetta, può essere risospeso in un volume minore rispetto a quello in cui inizialmente si trovava disciolto. Il pellet, contenente il DNA, viene lavato aggiungendo 2 ml di etanolo 70% e centrifugando a 6000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Si effettua quindi un secondo lavaggio utilizzando questa volta 1 ml di etanolo 70% e, dopo aver rimosso il surnatante, si lascia asciugare il DNA addensato sotto cappa biologica. Quando diventa completamente asciutto lo si risospende in 300-500  $\mu\text{l}$  di TE.

## Determinazione della concentrazione di DNA tramite spettrofotometro

Lo spettrofotometro è uno strumento che consente di valutare l'assorbanza di un certo campione e, di conseguenza, la sua concentrazione grazie alla legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon c l$$

con:

A= assorbanza;

$\epsilon$ = coefficiente di assorbimento molare;

c= concentrazione;

l= cammino ottico.

Nel nostro caso l'analisi è svolta a 260 nm e la concentrazione del DNA è letta direttamente dallo strumento, senza cioè doverla ricavare dalla formula sopra riportata.

I campioni si preparano per la lettura spettrofotometrica diluendo il DNA, precedentemente estratto, in proporzione 1:50 con H<sub>2</sub>O bidistillata sterile, ossia inserendo in una cuvetta di vetro 10  $\mu$ l di DNA e 490  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O. La calibratura dello strumento è fatta con 500  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O bidistillata sterile, che funge da blank, andando a settare come zero la concentrazione così ottenuta. Successivamente si prosegue con l'analisi dei campioni. Durante la misurazione viene anche annotato il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e l'assorbanza a 280 nm per conoscere l'indice di purezza: generalmente si considera un buon valore quello compreso tra 1,8 e 2,0; infatti, se l'indice è inferiore a 1,8 vuol dire che oltre al DNA nel campione sono presenti impurità, come proteine e fenoli, mentre se è superiore a 2,0 significa che è molto probabile la presenza di quantità elevate di cloroformio, il quale assorbe alla medesima lunghezza d'onda dell'acido desossiribonucleico. Una volta nota la concentrazione del DNA, il campione viene diluito in H<sub>2</sub>O bidistillata sterile sulla base dell'equazione

$$C_{\text{iniziale}} \times V_{\text{iniziale}} = C_{\text{finale}} \times V_{\text{finale}}$$

Nel nostro caso, per la ricerca di mutazioni,  $C_{\text{finale}}$  è posto pari a 50 ng/ $\mu$ l e  $V_{\text{finale}}$  pari a 100  $\mu$ l.

## **Amplificazione tramite PCR (Reazione a Catena della Polimerasi) delle sequenze esoniche del gene DSP.**

Per l'analisi al DHPLC (cromatografia denaturante in fase liquida ad alto rendimento) e per il sequenziamento degli esoni del gene DSP, il DNA estratto da ciascun campione e successivamente diluito è stato amplificato tramite PCR. Questa tecnica consente di ottenere un grandissimo numero di copie della sequenza di interesse attraverso una reazione enzimatica *in vitro* che adopera coppie di oligonucleotidi (*primers*) specificamente progettate per funzionare da innesco alla sintesi del DNA da parte della polimerasi termostabile. Nel mio caso, le coppie di *primers* erano già disponibili in laboratorio. La sequenza del gene è stata suddivisa in 24 frammenti, ciascuno comprendente un esone e due tratti di sequenza intronica, rispettivamente a monte e a valle della regione codificante; gli esoni 23 e 24, essendo molto lunghi (con un contenuto in paia di basi superiore a 2000 e 3000 rispettivamente) sono stati ripartiti in più porzioni (23A-23B-23C-23D-23Ebg-23Eend-23F-23G; 24A-24B-24C-24D-24E-24F-24G-24H-24I-24L) con parziale sovrapposizione delle loro estremità. Per ogni esone analizzato, oltre al DNA dei pazienti è stato amplificato anche quello di un soggetto sano come controllo positivo (cp), in modo tale da poter verificare se un'eventuale mancata amplificazione fosse attribuibile a qualche caratteristica del DNA dei pazienti in esame e, nel contempo, per avere un riferimento durante la successiva analisi al DHPLC. Inoltre, è stato incluso un controllo negativo (privo di DNA), per poter rilevare possibili contaminazioni dei reagenti con tracce di acido nucleico, che avrebbero alterato l'analisi.

Gli amplificati sono stati ottenuti utilizzando AmpliTaq Gold®, un enzima modificato chimicamente per attivarsi alle alte temperature, in una fase *hot start* di 12 minuti. Questo riduce la formazione di prodotti aspecifici, impedendo un appaiamento non corretto dei *primers*.

Ciascuna reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume finale di 25 µl, per i campioni da sottoporre a sequenziamento diretto o all'analisi in DHPLC ad una o due temperature diverse; il volume è stato raddoppiato nel caso in cui l'indagine dovesse essere condotta a tre temperature differenti. I reagenti e le relative quantità richieste per la preparazione della miscela di reazione sono riportate nella tabella II.

<b>Reagenti</b>	<b>Quantità</b>
DNA (50 ng/μl)	1 μl
<i>Primer forward</i> (10 pmol/μl)	1 μl
<i>Primer reverse</i> (10 pmol/μl)	1 μl
<i>Buffer</i> 10X	2,5 μl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 μl
dNTPs (1 mM)	5 μl
AmpliTaq Gold <sup>®</sup> (Applied Biosystem) (5 U/μl)	0,16μl
H <sub>2</sub> O bidistillata sterile	12,84 μl
<b>Volume finale</b>	<b>25 μl</b>

**Tabella II.** Protocollo di amplificazione con AmpliTaq Gold<sup>®</sup>.

Per l'amplificazione della maggior parte degli esoni è stato usato un protocollo di tipo standard (Tabella III):

<b>STEP</b>	<b>T°</b>	<b>TEMPO</b>
HOT START	95°C	12 min
Denaturazione	95°C	30 sec
<i>Annealing</i>	T <sub>ann</sub> °C*	30 sec
Estensione	72°C	45 sec
Estensione finale	72°C	5 min
Blocco reazione	4°C	5 min

} 35 cicli

**Tabella III.** Condizioni di amplificazione standard con AmpliTaq Gold<sup>®</sup>. (\*La temperatura di annealing è specifica per ogni coppia di *primers*.)

Per aumentare la specificità della reazione di PCR, alcuni frammenti esonici (22, 23G, 24G), hanno richiesto, invece, il protocollo *Touch Down* (TD), che prevede un certo numero di cicli iniziali di amplificazione ad una temperatura di appaiamento (*annealing*) più alta rispetto a quella propria dei *primers*; la temperatura viene abbassata di un grado ad ogni ciclo fino al valore previsto per i *primers* in uso, che rimane costante nei cicli successivi. Mantenendo inizialmente molto alta la stringenza dell'ibridazione, viene favorita la replicazione della sequenza di interesse, riducendo al minimo la formazione di eventuali prodotti

aspecifici. Le condizioni di amplificazione TD utilizzate sono schematizzate come segue (Tabella IV):

STEP	T°	TEMPO	
HOT START	95°C	12 min	
Denaturazione	95°C	30 sec	} 10 cicli
<i>Annealing 1</i>	72°C -1°C ogni ciclo	30 sec	
Estensione	72°C	45 sec	
Denaturazione	95°C	30 sec	} 25 cicli
<i>Annealing 2</i>	60°C	30 sec	
Estensione	72°C	45 sec	
Estensione finale	72°C	10 min	
Blocco reazione	4°C	10 min	

**Tabella IV.** Condizioni di amplificazione TD-PCR con AmpliTaq Gold®.

L'efficienza di ciascuna reazione di amplificazione è stata valutata mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% (p/v), che ha permesso una stima approssimativa della quantità di amplificato attraverso il confronto con un marcatore di peso molecolare a concentrazione nota.

Nella tabella V vengono riassunte le condizioni per lo studio del gene DSP: la lunghezza degli esoni, le sequenze dei *primers*, la loro temperatura di *annealing*, le dimensioni degli ampliconi, e il metodo di analisi scelto per la ricerca di mutazioni. Qualora sia previsto l'utilizzo del DHPLC sono indicate anche le relative temperature; i numeri tra parentesi indicano l'aumento, in minuti, del tempo di ritenzione in colonna del frammento analizzato (*time shift*), introdotto per ottenere un picco di eluizione più definito.

AMPLI #	Bp EXON	PRIMER (5'>3')	Bp AMPLI	T°C ann.	dHPLC T°C +time.shift BIOL.
DSP1	449	DSP-1F: ggtagcgcgagcgcgacctc	422	55	65.9 66.5+0.5
		DSP-1R: aaaacctttccaccttcggg			
DSP2n	103	DSP-2nF: gattccgggtaagggtctc	365	62	60.5+1.5 62.6+2
		DSP-2R: tctgttctgaaaaagcgtgtct			
DSP3	149	DSP-3F: tggttcataaatctccgtctgt	433	62	57.2 59.2+2
		DSP-3R: gggaacatttgtgtgcctt			
DSP4	175	DSP-4F: ttaagtctgggtaagaaaa	471	55	58.6+0.5 61.3+1.5
		DSP-4R: ggaggaaaatcctgcaaacag			
DSP5	129	DSP-5F: gcattagccatttgggaacc	443	62	56.4+1 59.7+2.5 61.8+3
		DSP-5R: ttccccatttaagaagtgggatt			
DSP6	51	DSP-6F: gggatctgaggccagtattctga	262	62	58.2
		DSP-6R: atcgatgaacaggtgcctcc			
DSP7n	162	DSP-7nF: acctgcagagaacaccagtca	309	62	61.1 62.1+1
		DSP-7R: agaccaatcattccccgaga			
DSP8	105	DSP-8F: aacagegtgattctttggca	382	55	SEQ ( F ) str. poliA a +32nt
		DSP-8R: ccaaccctgggttagggta			
DSP9	96	DSP-9F: agctttcatgcaggtcacc	312	62	53.7 56.8+1.5 58.7+2.5
		DSP-9R: gcactcaaaatcaatgaagagg			
DSP10	126	DSP-10F: atagttcccgtgccacat	414	65	57.6+0.5 60.4+2
		DSP-10R: aaatgcttgcttggctctgg			
DSP11	153	DSP-11F: tgccgacgaatttgtgattt	442	60	55.7 56.4
		DSP-11R: ttgtccatagctgctgatttc			
DSP12	155	DSP-12F: tcagcttcatttgaggggaaa	394	62	59.3+1 61.8+2
		DSP-12R: ggcaaggcatcgtgtgtcta			
DSP13	127	DSP-13F: ggttttggcagtggtgtga	359	62	60.3
		DSP-13R: aggagggctgagctgacttg			
DSP14	202	DSP-14F: cccatctagtgggtggcatt	372	62	58.9+0.5 59.9+1
		DSP-14R: ccagtttatgcaaactccctt			
DSP15	227	DSP-15F: ttctcgtgactaaatttca	505	62	56.6+1 58.0+1.5
		DSP-15R: aatcctgcagaagcctgtt			
DSP16	167	DSP-16F: ccatggaagttgactgatgtg	480	62	55.9+1
		DSP-16R: atgcgaggctagcggaaatta			
DSP17	139	DSP-17F: tctgctttgacgttctccc	370	62	57.6-0.5 58.6
		DSP-17R: aacctgtgtggcactgaaa			
DSP18	194	DSP-18F: tttataaactttgccccca	437	62	SEQ ( R ) str. poliT a -10nt
		DSP-18R: ggcaagtcacataaaagagcat			
DSP19	163	DSP-19F: tcaagtgaatttctgggtga	382	58	57.0+1.5
		DSP-19R: aagccttcacaaaatgggtt			
DSP20	84	DSP-20F: tgctcatctcctaagctgtaac	323	62	53.6 55.3+1
		DSP-20R: cgctttacaacaaatcagca			
DSP21	108	DSP-21F: tagacgtgcagcccaatgat	312	65	57.0 58.8+1
		DSP-21R: aagacaggcaggagacaggg			
DSP22	99	DSP-22F: taggggaaacagcctggaga	489	TD 72>62	SEQ ( R ) str. poliT a -50nt
		DSP-22R: cagcgtattggagcatgaa			
DSP23	2295				
DSP23a		DSP-23aF: gaatgcacattgtctggga	455	62	56.9 58.5+1
		DSP-23aR: cacattgccttgccttctgc			
DSP23b		DSP-23bF: taccaggcagagtgttcca	477	62	58.0
		DSP-23bR: ctcttgatggtgtctctcg			

AMPLI #	Bp EXON	PRIMER (5'>3')	Bp AMPLI	T°C ann	dHPLC T°C +time.shift BIOL.
DSP23c		DSP23cF: aggcacccggaagagagaat	471	62	56.0
		DSP23cR: gcctcctcctgaaactcagc			57.0+0.5 60.7+3
DSP23d		DSP23dF: actgaagcaggtcatgcagc	461	62	56.7
		DSP23dR: ccagctgctgtttcctctga			59.0
DSP23e Bg		DSP23eF: tcaccgagaaaacaggagc	326	62	57.4
		DSP23eBgR: tctcgcgttttcatctcca			59.6+1
DSP23e End		DSP23eEndF: ttgatgatgctgcaaaaacc	271	62	57.0
		DSP23eR: aaccgcgtgatacctggctc			59.6+1
DSP23f		DSP23fF: gcaaacagtagtcgcagcggga	503	62	60.6
		DSP23fR: tgctcattcctcaagtgcgctt			61.6+1
DSP23g		DSP23gF: cggaacctgaggctggagta	407	TD 72>62	54.8
		DSP23gR: aaagaacagcagggcacaca			56.2+1 59.8+3.5
DSP24	3237				
DSP24a		DSP24aF: caagctcacagtgtatccaggg	488	62	SEQ ( R )
		DSP24aR: tgcttgagctctttcgtatctca			str. poliT a -95nt
DSP24b		DSP24bF: ggaagactcaatattcccgcga	471	62	57.8
		DSP24bR: aagcagatgctccagcgata			59.3+0.5 59.8+1
DSP24c		DSP24cF: gaaggtgacagcaatgcagc	476	62	57.8
		DSP24cR: ctgaagcaatctgggcttcc			58.7
DSP24d		DSP24dF: ttgatgatccatttccaggca	490	62	58.0
		DSP24dR: cagcttgaacctggaggaa			59.1+1 59.7+1
DSP24e		DSP24eF: cctccaaggaatcagacaacc	472	65	58.3
		DSP24eR: cgaataccgtggccctttt			59.3+1
DSP24f		DSP24fF: cagaacgagctgtcaactggg	502	62	SEQ ( R )
		DSP24fR: tgctcacacagttcttgaagg			(picco non informativo)
DSP24g		DSP24gF: cctcaggaagcgtagagtgg	493	TD 72>62	57.2
		DSP24gR: gtcaaagatggctgcaatgg			58.5+0.5 59.3+1
DSP24h		DSP24hF: ttagcagctcccacatgaa	500	62	58.8
		DSP24hR:			61.2+1.5 62.0+2
DSP24i		DSP24iF: cataggcttcgagggtgtga	467	65	SEQ ( F )
		DSP24iR: gtggcgtcaaagcttctct			(picco non informativo)
DSP24l		DSP24lF: ggatgccataaatcgcctcca	479	65	55.3
		DSP24lR: gacgcactgcatccaagtgtga			56.8+1

**Tabella V.** Condizioni per l'analisi dei frammenti esonici del gene DSP.

### Elettroforesi orizzontale su gel di agarosio

L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica semplice e rapida , che viene impiegata sia per effettuare un controllo della presenza e della qualità (integrità e purezza) del DNA estratto sia per verificare la buona riuscita delle reazioni di amplificazione mediante PCR.

Le dimensioni dei frammenti di DNA genomico (100-150 Kb) richiedono l'utilizzo di gel di agarosio al 1% p/v. Per testare, invece, gli amplificati di singoli esoni è necessario impiegare percentuali maggiori (2% p/v) ottenendo come risultato campioni più compatti all'interno del gel e di conseguenza bande elettroforetiche più definite.

#### Reagenti:

- Tampone di corsa TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM, pH 8)
- Agarosio (Invitrogen)
- Bromuro di etidio (10 ng/μl)
- Marcatore di peso molecolare 100 bp (Invitrogen)
- *Loading Buffer* 5X (Orange G 0,25% p/v; glicerolo 30% v/v; EDTA 10 mM, pH 8)

#### Procedimento:

Si pesa un'opportuna quantità di agarosio in polvere e la si versa all'interno di una beuta, contenente un adatto volume di *buffer* TAE 1X, in base alle dimensioni della vaschetta elettroforetica che si deve utilizzare. Tale miscela viene scaldata in un forno a microonde fino all'ottenimento di una soluzione limpida, segno che l'agarosio si è completamente sciolto. Successivamente si lascia raffreddare per qualche minuto e poi, sotto cappa chimica, si aggiunge etidio bromuro ad una concentrazione finale di 1 μg/ml. L'etidio bromuro è una molecola planare che si intercala tra le basi del DNA e, se viene irradiata da luce ultravioletta, emette fluorescenza a 590 nm nella regione rosso-arancio dello spettro visibile evidenziando così posizione ed intensità delle bande elettroforetiche. La soluzione di agarosio viene in seguito versata nell'apposita vaschetta dotata di pettini per la formazione dei pozzetti di caricamento e, una volta polimerizzato, il gel viene posto nella camera da elettroforesi, precedentemente riempita con tampone TAE 1X. In ciascun pozzetto, ad eccezione di quello riservato al marcatore di peso molecolare, si caricano 3 μl di amplificato insieme a 3 μl di *loading buffer* che rende visibile il fronte della corsa grazie alla presenza, al suo interno, del colorante *Orange G*. Il voltaggio applicato, per consentire la migrazione dei campioni, è pari a circa 6 mV per cm di lunghezza del gel. Il DNA, carico negativamente per la presenza dei gruppi fosfato, sottoposto ad un campo elettrico, si sposta verso l'anodo. La corsa elettroforetica normalmente viene interrotta dopo che il fronte ha raggiunto approssimativamente i 2/3 della corsia.

A questo punto, è possibile visualizzare le bande di DNA esponendo il gel a luce ultravioletta in un transilluminatore.

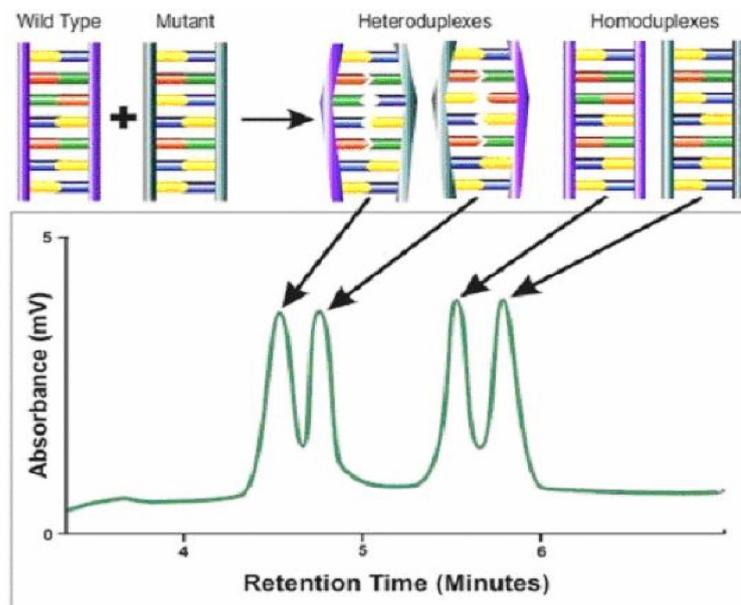
### **Ricerca di mutazioni mediante DHPLC (cromatografia denaturante in fase liquida ad alto rendimento)**

La maggior parte dei frammenti esonici del gene DSP è stata analizzata tramite DHPLC. Gli amplificati dei pazienti il cui profilo di eluizione ha rivelato la presenza di anomalie rispetto a quello del controllo sano, usato come riferimento, e gli esoni difficilmente analizzabili con questa tecnica sono stati sottoposti a sequenziamento.

La cromatografia DHPLC è una tecnica semi-automatizzata e relativamente veloce, che consente di rilevare la presenza di variazioni nucleotidiche tra le due forme alleliche di un frammento di DNA (Oefner e Underhill, 1995). Questo tipo di analisi può essere applicata ad amplificati di dimensioni comprese tra 100 e 700 bp e il principio di separazione delle molecole è quello della cromatografia liquida ad accoppiamento ionico in fase inversa. La fase stazionaria è costituita da una colonna riempita con sfere del polimero polistirene-divinilbenzene (PS-DVB), derivatizzate con catene alchiliche C<sub>18</sub> che, essendo idrofobiche ed elettrostaticamente neutre, non interagiscono con gli acidi nucleici. L'accoppiamento ionico è ottenuto con l'ausilio del controione trietilammonioacetato (TEAA), una molecola "ponte" di natura anfipatica: la carica positiva del TEAA lega i gruppi fosfato del DNA, carichi negativamente, mentre la parte idrofobica interagisce con le catene C<sub>18</sub> permettendo, in tal modo, l'adesione del DNA alla fase stazionaria. La fase mobile, costituita da una miscela di TEAA, acqua ed acetonitrile in bassissima concentrazione, consente inizialmente la ritenzione in colonna delle molecole di DNA; aumentando progressivamente la quantità di acetonitrile in soluzione, si crea un gradiente lineare di eluizione che comporta il distacco dei frammenti di DNA dalla matrice, in quanto l'acetonitrile compete con il TEAA nel legame all'acido nucleico. Il principio alla base dell'analisi DHPLC, che consente di rilevare la presenza di una variazione nucleotidica nel DNA, è la differente velocità di eluizione delle molecole *eteroduplex* rispetto alle *omoduplex*. La corsa dei campioni viene condotta ad una temperatura critica, definita temperatura di "quasi denaturazione", alla quale il DNA è sotto forma di doppia elica per il 75% della sua sequenza; a tale temperatura gli *eteroduplex* risultano maggiormente denaturati rispetto agli *omoduplex*, a causa della presenza dell'errato appaiamento (*mismatch*) delle basi

non complementari. La maggiore denaturazione determina un'interazione meno stabile con la fase stazionaria e di conseguenza un'eluizione più precoce (Xiao e Oefner, 2001). La temperatura di "quasi denaturazione" è strettamente correlata alla composizione nucleotidica del frammento in esame, pertanto alcuni esoni richiedono l'analisi a diverse temperature. Durante la corsa l'eluato passa in continuo in uno spettrofotometro, corredato di microcella a flusso, che consente di misurare l'assorbanza delle molecole di DNA a 260 nm; il valore viene registrato da un computer e riportato sotto forma grafica di cromatogramma. In presenza di una variazione nucleotidica in eterozigosi, si dovrebbero osservare, teoricamente, più picchi di eluizione (Figura 7).

I profili di eluizione dei vari campioni in esame sono confrontati con quello di riferimento, relativo ad un soggetto sano; gli amplificati che mostrano un profilo divergente vengono sottoposti a sequenziamento, per definire il tipo di cambiamento nucleotidico presente. Le sequenze caratterizzate da un elevato numero di ripetizioni mononucleotidiche o da domini con temperature di analisi molto diverse danno origine a cromatogrammi non significativi e di difficile interpretazione; in questi casi si ricorre al sequenziamento diretto dei frammenti.



**Figura 7.** In alto, rappresentazione schematica della formazione delle molecole di DNA *eteroduplex* e *omoduplex*, in seguito a denaturazione termica e successiva rinaturazione di un campione con una variazione nucleotidica in eterozigosi. In basso, relativo profilo di eluizione derivante dall'analisi DHPLC, in cui si osservano i picchi corrispondenti alle quattro diverse molecole presenti (immagine disponibile al sito <http://www.transgenomic.com>).

## **Preparazione dei campioni per l'analisi al DHPLC**

La ricerca di mutazioni mediante DHPLC è preceduta dalla denaturazione termica degli amplificati a 95°C per 5 minuti, così da permettere la separazione di ciascun frammento di DNA nei due filamenti che lo compongono; successivamente, mantenendo i campioni a temperatura ambiente per circa 60 minuti, si ottiene la rinaturazione spontanea delle molecole di DNA. In tal modo, se nel paziente è presente un cambiamento nucleotidico in eterozigosi, il riappaiamento casuale delle singole eliche di DNA porta alla formazione di una miscela di frammenti *omoduplex*, costituiti da due filamenti perfettamente complementari, ed *eteroduplex*, caratterizzati dalla presenza di un errato appaiamento tra le basi, in corrispondenza della variazione. La differente visualizzazione cromatografica di questi due tipi di molecole permette di individuare la presenza di mutazioni o polimorfismi nei campioni in esame. Una volta completata la fase di rinaturazione, i prodotti di PCR sono pronti per l'analisi tramite DHPLC. Il volume di iniezione viene stabilito in base alla concentrazione approssimativa di DNA stimata attraverso l'elettroforesi in gel di agarosio, in modo da ottimizzare l'intensità dei picchi di eluzione.

## **Preparazione del DNA per il sequenziamento diretto: purificazione dei campioni**

Prima di essere sequenziati, gli amplificati devono venire purificati per rimuovere i dNTPs e i *primers* in eccesso non utilizzati durante la reazione di PCR, in quanto la loro presenza potrebbe interferire con il sequenziamento. La purificazione prevede l'utilizzo di un *kit* (PCR Product Pre-sequencing Kit, Amersham Pharmacia Biotech) che comprende gli enzimi SAP (*Shrimo Alcaline Phospatase*) ed EXO (*Exonuclease I*). SAP è una fosfatasi alcalina che idrolizza i dNTPs a nucleosidi e fosfato inorganico; EXO è un'esonucleasi che rimuove i *primers* ed ogni eventuale DNA a singolo filamento. Per ogni campione, sono stati purificati 5 µl di DNA aggiungendo 0,5 µl di SAP e 0,5 µl di EXO; le condizioni della reazione di purificazione sono riportate nella tabella VI.

<i>Step</i>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Attivazione degli enzimi	37°C	15 min
Inattivazione degli enzimi	80°C	15 min
Blocco della reazione	4°C	10 min

**Tabella VI.** Condizioni per la reazione di purificazione.

La tecnica del sequenziamento richiede una quantità di DNA purificato pari a 3 ng per 100 bp di lunghezza dell'amplificato e 1 µl di *primer* (*forward* o *reverse*), inoltre la miscela deve essere completamente disidratata.

Il sequenziamento è stato effettuato presso il centro BMR-Genomics di Padova, utilizzando il sequenziatore automatico a 96 capillari ABI PRISM 3730XL DNA Sequencer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state analizzate con i programmi Chromas e SeqMan II.

## **STRUMENTI BIOINFORMATICI UTILIZZATI**

### **Chromas**

<http://www.technelysium.com.au>

Chromas è un programma che viene utilizzato per visualizzare le sequenze ottenute dal sequenziamento automatico del DNA. Permette di analizzare una sola sequenza alla volta, rilevando gli eventuali doppi picchi presenti.

### **dbSNP (*Single Nucleotide Polymorphism Database*)**

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

Il dbSNP è una banca dati gestita e distribuita dall’N.C.B.I. che identifica e cataloga gli SNPs (polimorfismi di singoli nucleotidi) presenti nei genomi di vari organismi.

### **ENTREZ**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ENTREZ>

Sistema di ricerca prodotto dall’N.C.B.I. che permette di recuperare dati riguardanti sequenze nucleotidiche e proteiche, mappe, strutture ed informazioni tassonomiche. ENTREZ fornisce inoltre un importantissimo strumento, PUBMED, banca dati che consente di accedere a tutte le citazioni bibliografiche contenute in MEDLINE.

### **Genbank**

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

Genbank è una banca dati, fornita dall’N.C.B.I., in cui sono presenti tutte le sequenze nucleotidiche pubblicamente disponibili. Insieme a DDBJ (*DNA DataBank of Japan*) ed EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), fa parte dell’*International Nucleotide Sequence Database Collection*, una collaborazione tra diverse banche dati che condividono quotidianamente i dati riguardanti le sequenze nucleotidiche.

### **Navigator™ Software**

Il Navigator™ Software è il programma, in dotazione con lo strumento, che consente di gestire il sistema *Transgenomic Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System* (Transgenomic Wave System), utilizzato per l’analisi DHPLC.

I parametri vengono impostati tramite diverse finestre; ad esempio, la finestra “DNA” permette di inserire la sequenza dell’amplificato da analizzare e, attraverso una variante dell’algoritmo di Fixman-Freire, il *software* calcola la

probabilità che, al variare della temperatura, ogni nucleotide si trovi in una struttura a doppia o singola elica (Fixman e Freire, 1977). I risultati ottenuti sono visualizzati in forma grafica su quattro riquadri distinti. La prima curva mostra la percentuale di doppia elica al variare della temperatura; la seconda indica la percentuale di doppia elica rispetto alla posizione di ciascuna base nell'amplificato, ad una data temperatura; il terzo e il quarto grafico descrivono il rapporto tra temperatura di melting e posizione delle basi nella sequenza. In genere, è il secondo grafico ad essere determinante nella scelta della temperatura ottimale per la ricerca di mutazioni nel frammento di DNA. Il Navigator™ Software consiglia automaticamente la temperatura di analisi detta anche temperatura di "quasi denaturazione", in quanto la sequenza di interesse ha una percentuale di doppia elica del 75-80%; tale temperatura è considerata sufficiente per la parziale denaturazione dell'eteroduplex, ma non in grado di denaturare l'omoduplex; in alternativa, è possibile selezionare altri valori (fino a cinque contemporaneamente) e visualizzare sullo stesso riquadro le curve corrispondenti, in modo da scegliere la temperatura più soddisfacente. Questi valori, unitamente al gradiente di eluizione prescelto, sono memorizzati attraverso l'opzione "Method".

La finestra "Injection" rende possibile la creazione di un progetto di analisi, inserendo i dati relativi a ciascun campione: nome, numero del pozzetto in cui viene caricato all'interno di una piastra da 96, volume di PCR che si desidera iniettare in colonna e metodo pre-memorizzato con il quale si intende effettuare l'analisi.

La finestra "Analysis" consente di visualizzare i profili di eluizione relativi ai diversi amplificati, anche singolarmente tramite l'opzione "Select result". Se si sceglie l'opzione "Mutation Calling", invece, si ottiene un primo e immediato sistema di analisi dei risultati: quelli selezionati vengono normalizzati, comparati e clusterizzati dal software che mostra un grafico tridimensionale in cui ogni campione è rappresentato da un punto e punti vicini simboleggiano dei risultati equiparabili.

### **N.C.B.I. (*National Center for Biotechnology information*)**

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

Divisione del *National Library of Medicine* (NLM), situato presso il *National Institute of Health* (NIH), USA. Fondato nel 1988 per decisione governativa con lo scopo di fornire un supporto alla ricerca nella biologia molecolare, gestisce database pubblici e sviluppa *software* per l'analisi dei dati genomici.

### **OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*)**

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

Database mondiale delle malattie ereditarie della *National Library of Medicine* (NLM). Nato come MIM alla *J.Hopkins University*, è stato successivamente sviluppato ed introdotto in rete dalla N.C.B.I.

### **SeqMan II**

(<http://www.dnastar.com>)

Programma per analizzare le sequenze ottenute dal sequenziamento automatico del DNA: importandole nel giusto formato, è possibile costruire un contiguo che consente di confrontare in modo rapido i frammenti amplificati da individui diversi e identificare eventuali differenze rispetto alla sequenza consenso.

### **UCSC *Human Genome Browser***

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

Si tratta di un database sviluppato dalla UCSC *Genome Bioinformatics* che permette la visualizzazione di porzioni genomiche, mettendo in evidenza la presenza di CpG, di geni noti e predetti con relativa suddivisione in esoni ed introni, UTR ed 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.

## RISULTATI

### RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE DESMOPLACHINA (DSP)

La ricerca di mutazioni nel gene DSP, effettuata mediante DHPLC e sequenziamento diretto, ha riguardato 50 soggetti affetti da ARVC non imparentati tra loro.

La sequenza del gene, costituito da 24 esoni, è stata suddivisa in frammenti, ciascuno comprendente un esone e due porzioni rispettivamente a monte e a valle della regione codificante, per poter identificare anche eventuali variazioni introniche con possibile effetto sullo splicing del trascritto primario.

#### Risultati dell'analisi DHPLC

Tutti i segmenti degli esoni del gene DSP tranne 6 (# 8, 18, 22, 24A, 24F e 24I) sono stati analizzati mediante DHPLC. I campioni che hanno mostrato un profilo di eluizione non sovrapponibile a quello di riferimento sono stati successivamente sequenziati, per identificare la variazione nucleotidica responsabile del profilo anomalo. I risultati della ricerca sono schematizzati nella tabella VII.

AMPLIFICATO	TEMPERATURA (T°)	TIPOLOGIA PICCO	#PAZIENTE
1	65.9	DOPPIO	4,5,9,10,34,43,48
		ALLARGATO	12,17,33,50
		ANOMALO	23,31,35
	66.5+0.5	DOPPIO	4,9,10,23,35,36,39,43,48,50
ANOMALO		5,26,31,34	
2n	60.5+1.5	ANOMALO	1
	62.6+2	ANOMALO	1,31
3	57.2	DOPPIO	4,7,8,14,17,18,20,22,23,24,25,26,28,29
	59.2	TRIPLO	4,7,8
6	58.2	ANOMALO	14
7n	62.1+1	ANOMALO	1,2,4,6,8,10
9	53.7	ANOMALO	2,41
	56.8+1.5	DOPPIO	41
		ANOMALO	34,42
	58.7+2.5	ANOMALO	18,22,23,41
10	57.6+0.5	TRIPLO	3,4,7
		ANOMALO	3,4,7
	60.4+2	ANOMALO	3,4,7,25,26

<b>AMPLIFICATO</b>	<b>TEMPERATURA (T°)</b>	<b>TIPOLOGIA PICCO</b>	<b>#PAZIENTE</b>
11	55.7	ANOMALO	11,12,31
	56.4	ALLARGATO	2,6,7
		ANOMALO	5,31
12	61.8+2	ANOMALO	1,2
13	60.3	ANOMALO	18
15	56.6+1	DOPPIO	8,9,10,11,12,13,14,15, 19,24,25,27,28,31,32
		ANOMALO	18,20,21,22
	58.0+1.5	DOPPIO	3,4,7,8,10,12,14,15, 24,25,
		ANOMALO	11,13,16,17,19,21,27,28, 29,30,31,32
16	55.9+1	ANOMALO	5
17	57.6-0.5	ANOMALO	2,11,14,24,25,31,32
		BASSO	18
		DOPPIO	27
		TRIPLO	7
	58.6	DOPPIO	2,5
		ANOMALO	25
		LARGO	11,14,21,22,24,27
TRIPLO	6,7		
19	57.0+1.5	ANOMALO	11,13,17,21,22,23,28,29, 30,31,32
		BASSO	1
		DOPPIO	3,7
20	53.6	TRIPLO	1,12,13,15,16,17,20,23
		DOPPIO	3,4,5
		ANOMALO	26
	55.3+1	TRIPLO	1
		ANOMALO	2,3,4,5,9,10,12,13, 15,16,17,20, 23,26,28
21	57.0	DOPPIO	2,6,7
		ANOMALO	11,14,18,19,24,25, 29
	58.8+1	DOPPIO	7
		ANOMALO	2,6,8,11,14,18,19,24, 25,29
23A	56.9	DOPPIO	2,12,32
		ANOMALO	13,20,22,23,31
	58.5+1	ANOMALO	12,13,20,21, 22,23,31,32
		DOPPIO	2
		TRIPLO	1
23B	58.0	ANOMALO	19,23
		LARGO	16,21,22
23C	56.0	ANOMALO	30
	57.0+0.5	ANOMALO	30,33,49
	60.7+3	ANOMALO	30
23D	56.7	LARGO	30
		TRIPLO	30
	59.0	LARGO	18
		ANOMALO	27

AMPLIFICATO	TEMPERATURA (T°)	TIPOLOGIA PICCO	#PAZIENTE
23eBg	57.4	ANOMALO	12,14,28,29
	59.6+1	ANOMALO	1,2,5,6,9,10,14,32
23eEnd	59.6+1	DOPPIO	5
		TRIPLO	1,2
23F	60.6	TRIPLO	1
	61.6+1	ANOMALO	18,26,27,32
		ANOMALO	1,18,26,27,30,32
23G	54.8	ANOMALO	12,13,18,22
	56.2+1	ANOMALO	18,20,21,24,25
	59.8+3.5	ANOMALO	11,17,20,23,32
24B	57.8	ANOMALO	20,21,24,27,32
	59.8+1	ANOMALO	24,25,27
24C	58.7	ANOMALO	8,9,16,23,25,32
24G	59.3+1	ANOMALO	5
24H	61.2+1.5	ANOMALO	3
		DOPPIO	2
	62.0+2	TRIPLO	2
24L	55.3	DOPPIO	1,3,4
	56.8+1	DOPPIO	8,9
		TRIPLO	1,3,4

**Tabella VII.** Risultati ottenuti dall'analisi DHPLC degli amplificati (1-7, 9-17, 19-21, 23A-23G, 24B-24E, 24G, 24H, 24L) del gene DSP nella serie di 50 pazienti ARVC a diverse temperature di analisi. Sono riportati soltanto i casi in cui il profilo di eluizione presentava variazioni rispetto al normale.

## Risultati del sequenziamento diretto

I frammenti esonici dei pazienti il cui amplificato presentava un profilo alterato rispetto al controllo sono stati sequenziati. I risultati per la ricerca di variazioni nucleotidiche sulla sequenza del gene DSP sono riportati nella Tabella VIII. La numerazione dei nucleotidi inizia dalla prima base del codone ATG e si riferisce al cDNA dell'isoforma DSPI (NM\_001455); gli aminoacidi sono stati numerati in base alla sequenza peptidica dell'isoforma DSPI (NP\_004406).

ESONE	#PAZIENTE	SOSTITUZIONE NUCLEOTIDICA	SOSTITUZIONE AMINOACIDICA	db SNP rs# Cluster ID
1	5,10,12,26	1-1 ins A	-	*
	4,9,10	TAT>TAC(126) [In eterozigosi]	Tyr42Tyr	rs36087964
2n	31	273+10 C>T [In eterozigosi]	-	(9 su 97 Ctrl dHPLC)
3	4,7,8,14,17,18,20, 22,23,24,25,26, 28,29	274-31 T>C [In eterozigosi]	-	rs10484326
6	14	GCT>GCG (741) [In omozigosi]	Ala247Ala	rs2806234
7	10	ATC>TTC(913) [In eterozigosi]	Ile305Phe	rs17604693
9	41	AAT>ATT (1124) [In eterozigosi]	Asn375Ile	<b>NUOVA</b> <b>(107 Ctrl</b> <b>dHPLC)</b>
10	3,4,7	1141-44 C>T [In eterozigosi]	-	rs2076296
15	8,9,11,12,13,14, 15,19,24,25,27,28, 31,32	1904-49T>A [In eterozigosi]	-	rs2076303
	3,4,7,11,13,18,20, 22,23,26,27,28,29 30,31,32	GGA>GGG (2091) [In eterozigosi]	Gly697Gly	rs2076304
	8,10,12,14,15,16, 17,19,21,24,25	GGA>GGG (2091) [In omozigosi]		
19	11,13,17,21,22,23, 28,29,31	AGG>AGA (2631) [In eterozigosi]	Arg877Arg	rs1016835
	30,32	AGG>AGA (2631) [In omozigosi]		
20	1,3,4,5,12,13,15,16 17,20,23,28,	2794-113 G>A [In eterozigosi]	-	rs2260359
	9,10	2794-113 G>A [In omozigosi]		
	1,3,4,13,15,16,17, 20,23,28	TGC>TGT (2862) [In eterozigosi]	Cys954Cys	rs2064217
	26	TGC>TGT (2862) [In omozigosi]		
21	2,6,7,11,14,18,19, 24,25,29	2985+70 G>A [In eterozigosi]	-	rs6942260

23A	12,32	3085-72 G>A [In eterozigosi]	-	rs6905839
23C/23D	30	CAG>CAA (3963) [In eterozigosi]	Gln1321Gln	(5 su 132 Ctrl dHPLC)
23eEnd	2,5	TAT>TGT (4535) [In eterozigosi]	Tyr1512Cys	rs2076299
	1	CGC>TGC (4609) [In eterozigosi]	Arg1573Cys	rs28763967
23F	18,26,27,32	AGG>AGA(4773) [In eterozigosi]	Arg1591Arg	rs28763968
24F	15,17	ACC>ACT (7122) [In eterozigosi]	Thr2374Thr	rs2076300
24H/I	2	CGC>CGA (8175) [In eterozigosi]	Arg2725Arg	rs11558731
24L	1,3,4	GGG>GGC (8472) [In eterozigosi]	Gly2824Gly	rs2744380
	8,9	GGG>GGC (8472) [In omozigosi]		
	1,3,4	8616+197C>T [In eterozigosi]	-	rs12250

**Tabella VIII.** Risultati del sequenziamento diretto dei frammenti del gene DSP che presentano un profilo alterato al DHPLC. In rosso è evidenziata una variazione non riportata in letteratura, ma identificata precedentemente nel laboratorio dove ho svolto la tesi di laurea e verificata al DHPLC su un campione di 107 controlli sani. Nel caso della variazione 1-1 ins A, si tratta di uno SNP già precedentemente identificato nel laboratorio e confermato mediante analisi di 100 controlli sani.

I sei frammenti 8, 18, 22, 24A, 24F e 24I sono stati sequenziati direttamente perchè la presenza di ripetizioni mononucleotidiche non li rendeva adatti all'analisi mediante DHPLC. I risultati sono elencati nella Tabella IX.

ESONE	#PAZIENTE	SOSTITUZIONE NUCLEOTIDICA	SOSTITUZIONE AMINOACIDICA	db SNP rs# Cluster ID
24F	12,13,15,16,17,18,20,21,23,24,25,28,31,35,36,37,42,43,44,45,46,47	ACC>ACT (7122) [In eterozigosi]	Thr2374Thr	rs2076300
	33,34,38,39,48,50	ACC>ACT (7122) [In omozigosi]		
24I	3,4,7,11,13,14,15,16,17,19,20,21,23,28,29,31,35,36,41	GGG>GGC (8472) [In eterozigosi]	Gly2824Gly	rs2744380
	2,5,6,8,9,10,12,18,24,25,26,27,30,32,33,34,37,38,39,40,42,43,44,45,46,47,48,49,50	GGG>GGC (8472) [In omozigosi]		
	18,25,27,32,37,40,41,45	CGC>CGA (8175) [In eterozigosi]	Arg2725Arg	rs11558731

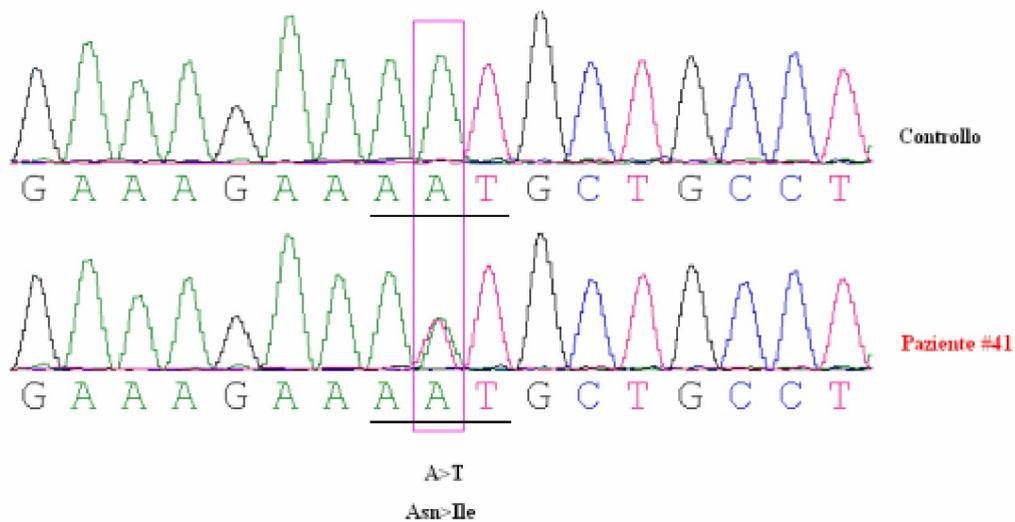
**Tabella IX.** Risultati del sequenziamento diretto degli ampliconi 8, 18, 22, 24A, 24F, 24I in cinquanta pazienti ARVC.

L'analisi delle sequenze del gene DSP, nel gruppo di soggetti in esame, ha permesso di individuare una mutazione esonica *missense* e 22 polimorfismi, tra i quali 13 esonici e 9 intronici. In particolare, 10 dei polimorfismi esonici sono sostituzioni sinonime e 3 comportano invece una sostituzione aminoacidica. La maggior parte delle variazioni trovate è presente nel database degli SNPs, tranne 3 (1-1insA; c.273+10C>T; c.3963G>A) che tuttavia erano state identificate precedentemente nel laboratorio in cui ho svolto la tesi.

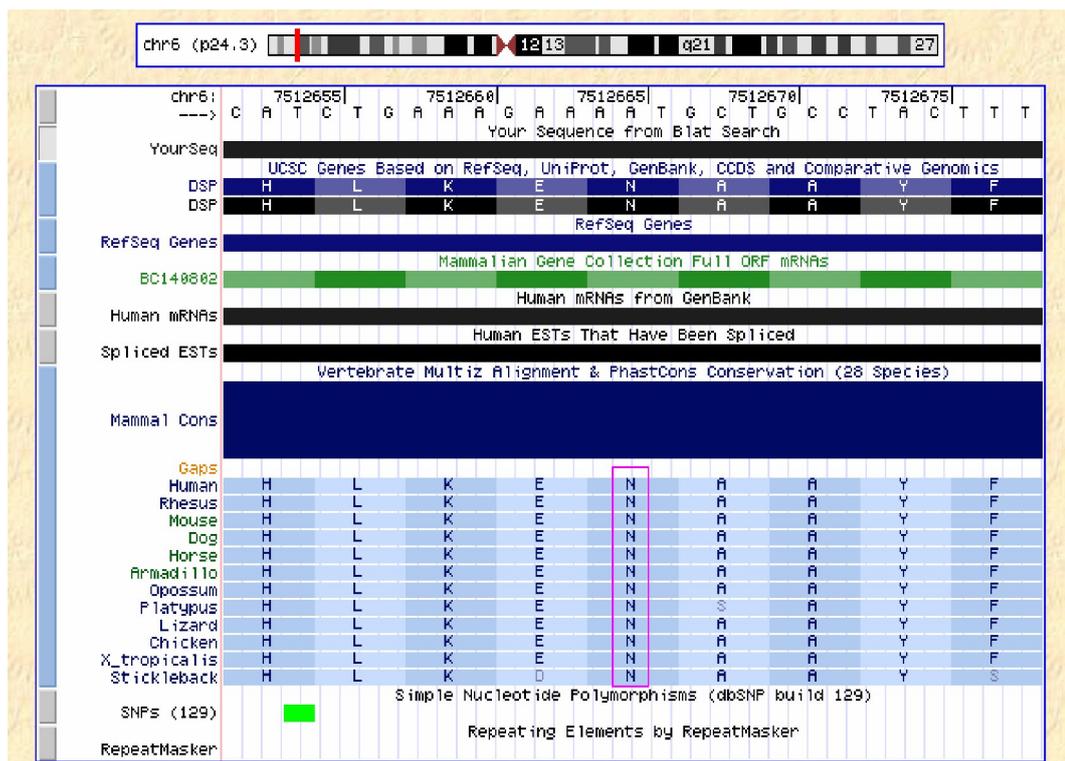
## **Variazioni esoniche**

### **N375I**

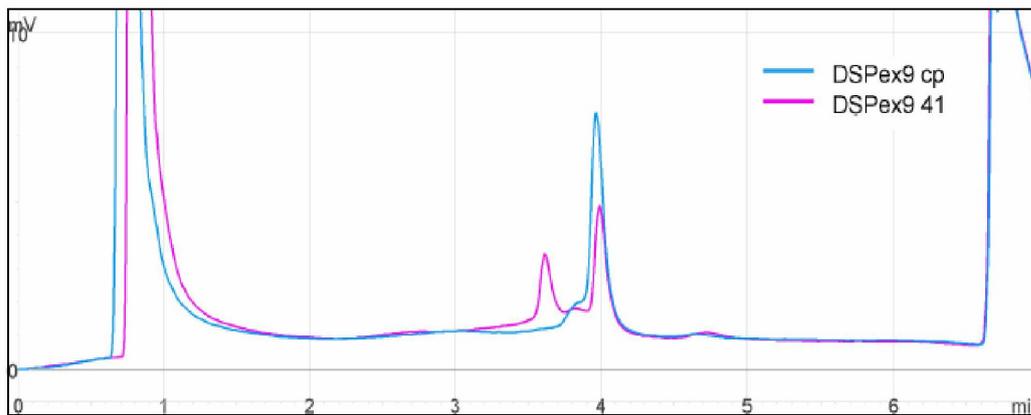
Il cambiamento nucleotidico c.1124A>T (Figura 8) all'interno dell'esone 9 nel paziente #41 causa una variazione aminoacidica *missense* (Asn>Ile) nel dominio globulare N-terminale della proteina, in particolare nella regione di interazione con la placofilina 1 e la placoglobina. Tale variazione cade in un residuo altamente conservato tra le specie (Figura 9). Non essendo riportato nel dbSNPs, né descritto in letteratura come mutazione nota, questo cambiamento nucleotidico ha richiesto l'analisi del DNA di un gruppo di soggetti sani, per tentare di stimare la sua frequenza allelica nella popolazione. L'analisi dei profili di eluzione di 107 campioni corrispondenti a controlli sani ha dato esito negativo, portando a concludere che la sostituzione nucleotidica sia verosimilmente una mutazione (Figura 10).



**Figura 8.** Confronto tra la sequenza di un controllo sano (in alto) e quella del probando #41 (in basso) in cui è stata identificata la variazione c.1124A>T, in eterozigosi, all'interno dell'esone 9.



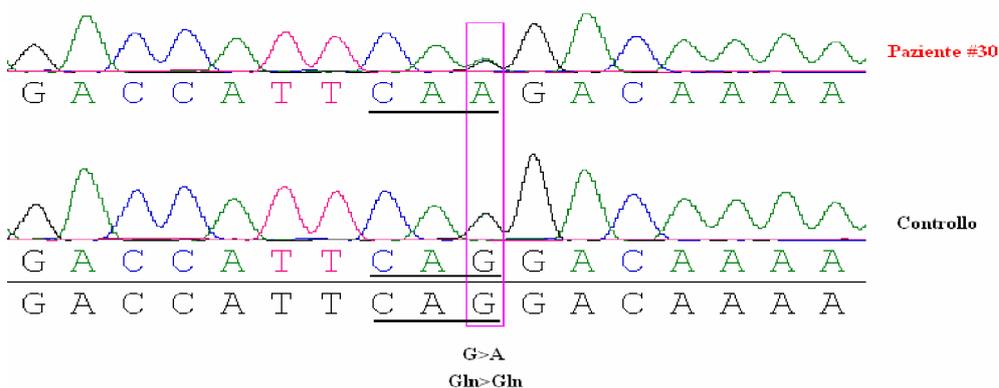
**Figura 9.** Allineamento ottenuto con *Genome Browser*, di una porzione della sequenza peptidica, tradotta a partire dall'esone 9, in diverse specie. In rosa è evidenziata la conservazione dell'aminoacido interessato dalla variazione nucleotidica c.1124A>T. Si può notare che, in generale, la sequenza peptidica è abbastanza conservata; in basso a sinistra è evidente la presenza di un polimorfismo noto (in verde).



**Figura 10.** Confronto tra il profilo di eluizione del DNA di un controllo sano, cp, (in azzurro) e quello del paziente #41 (in rosa) in cui è stata individuata la variazione c.1124A>T all'interno dell'esone 9. Temperatura di analisi: 58,7°C (+2).

### Q1321Q

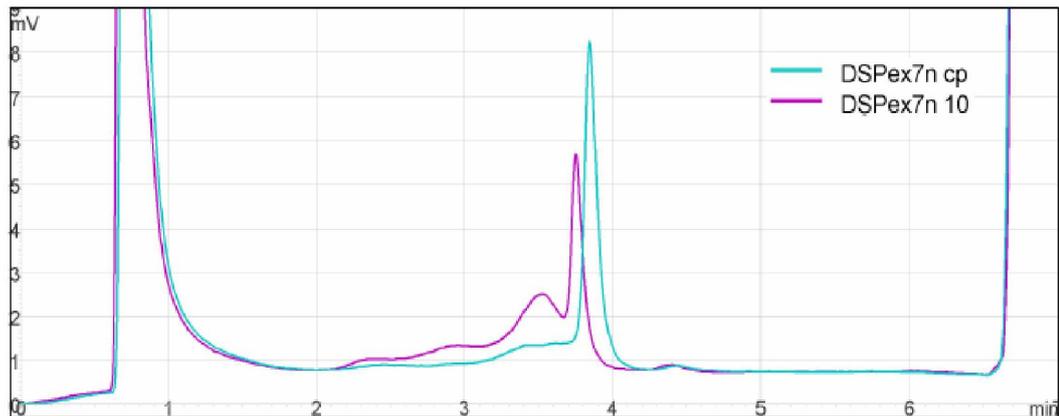
La sostituzione nucleotidica c.3963G>A (Figura 11), individuata all'interno dell'esone 23, in particolare tra i frammenti C e D, nel paziente #30, determina un cambiamento aminoacidico sinonimo (Gln>Gln). Tale variazione non è riportata tra gli SNPs noti, ma è stata rinvenuta in precedenza nel laboratorio dove ho svolto la tesi di laurea, tramite analisi con DHPLC, in 5 su 132 controlli sani, evidenziando una frequenza del 3,8% sulla popolazione di controllo, che la conferma essere un polimorfismo.



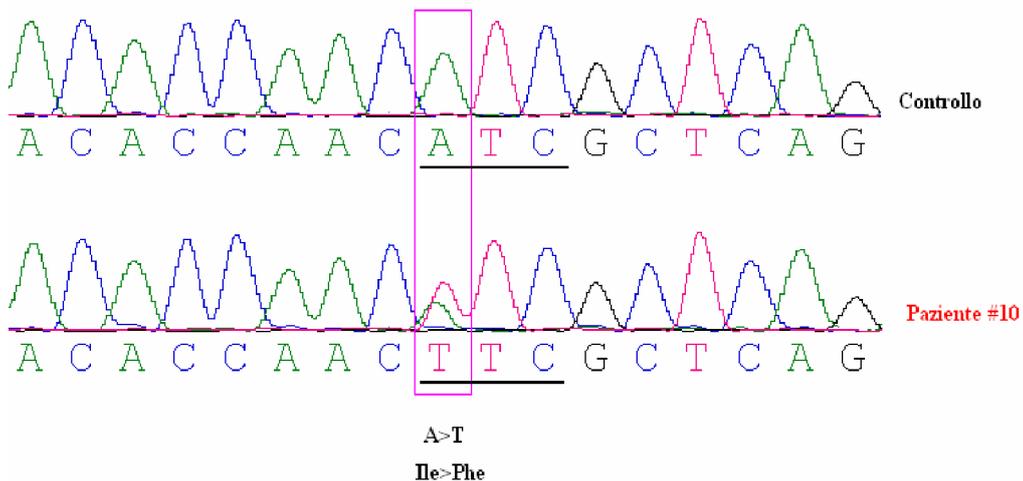
**Figura 11.** Confronto tra la sequenza di un controllo sano (in basso) e quella del probando #30 (in alto) in cui è stata identificata la variazione c.3963G>A, in eterozigosi, all'interno dell'esone 23.

### I305F

La sostituzione nucleotidica c.913A>T, presente nell'esone 7, è stata individuata in un solo probando in seguito ad analisi DHPLC (Figura 12) e successivo sequenziamento del DNA (Figura 13). Si tratta di un polimorfismo esonico già noto in letteratura (Rampazzo *et al.*, 2002) e comporta la sostituzione aminoacidica di una isoleucina con una fenilalanina.



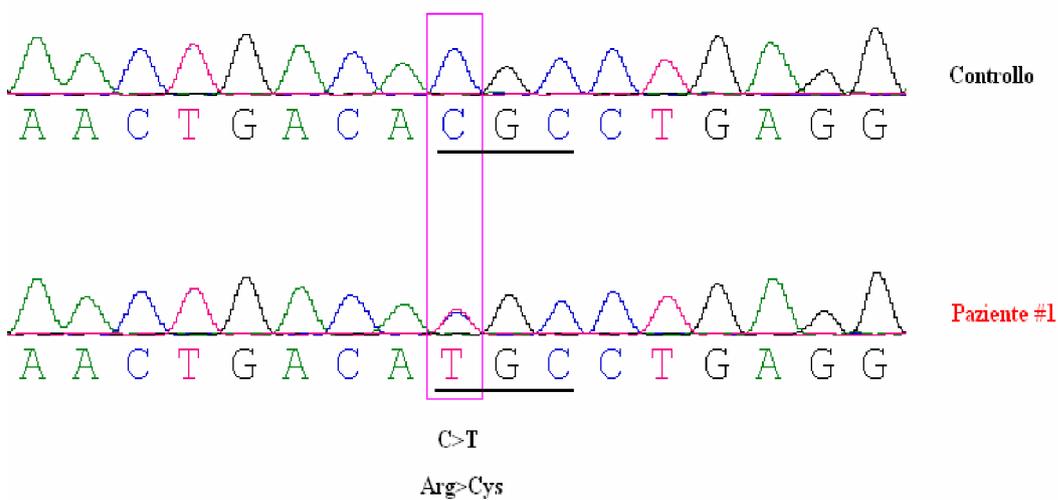
**Figura 12.** Confronto tra il profilo di eluizione del DNA di un controllo sano, cp, (in turchese) e quello del paziente #10 (in viola) in cui è stata individuata la variazione c.913A>T all'interno dell'esone 7. Temperatura di analisi: 62,1°C.



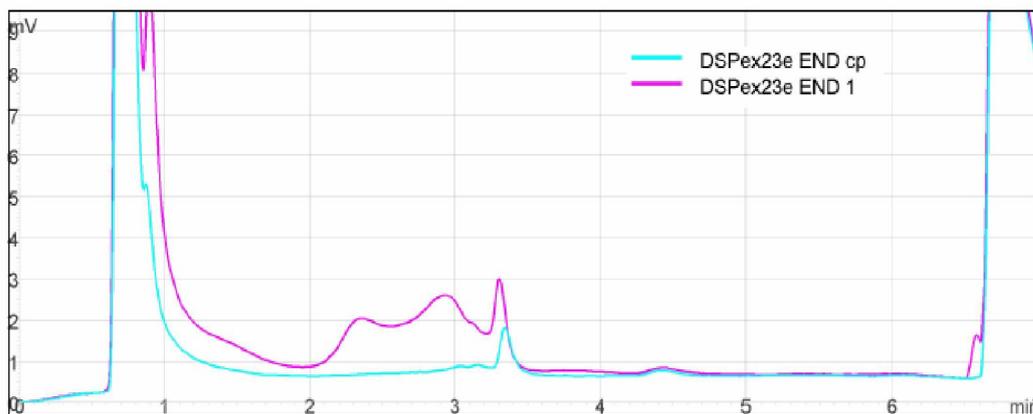
**Figura 13.** Confronto tra la sequenza di un controllo sano (in alto) e quella del probando #10 (in basso) in cui è stata individuata la sostituzione nucleotidica c.913A>T, in eterozigosi, all'interno dell'esone 7.

### R1573C

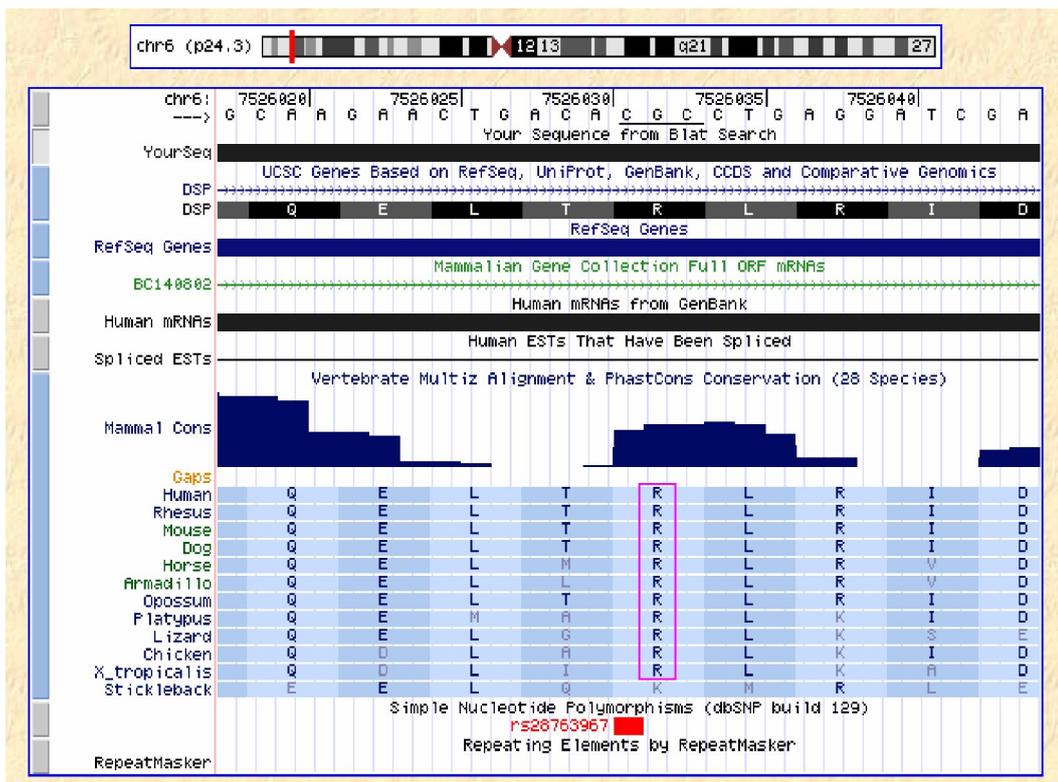
La sostituzione nucleotidica c.4609C>T (Figura 14 e 15), riscontrata solo nel paziente #1, si trova all'interno del frammento 23eEnd e comporta la sostituzione di un'arginina con una cisteina in posizione 1573 della sequenza peptidica. Tale cambiamento aminoacidico cade nel dominio *rod* della proteina desmoplachina e si tratta di un residuo abbastanza conservato tra le specie (Figura 16): è un polimorfismo noto. Il suo codice di identificazione (rs) non è presente in dbSNP, ma lo si può trovare grazie al programma *Genome Browser*.



**Figura 14.** Confronto tra la sequenza di un controllo sano (in alto) e quella del probando #1 (in basso) in cui è stata individuata la sostituzione nucleotidica c.4609C>T, in eterozigosi, all'interno del frammento 23eEnd.



**Figura 15.** Confronto tra il profilo di eluzione del DNA di un controllo sano, cp, (in turchese) e quello del paziente #1 (in rosa) in cui è stata individuata la variazione c.4609C>T all'interno del frammento 23eEnd. Temperatura di analisi: 59,6°C (+1).

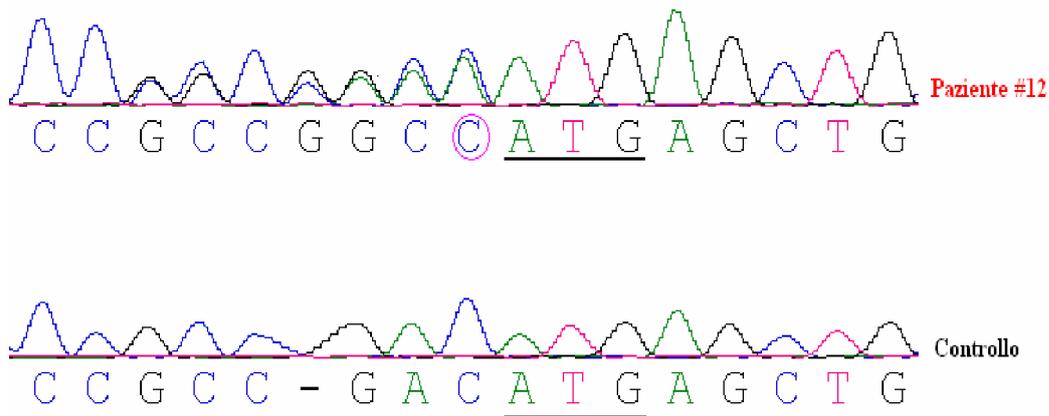


**Figura 16.** Allineamento ottenuto con *Genome Browser*, di una porzione della sequenza peptidica, tradotta a partire dall'esone 23, in diverse specie. In rosa è evidenziata la conservazione dell'aminoacido interessato dalla variazione nucleotidica c.4609C>T. Si può notare che, in generale, la sequenza peptidica è abbastanza conservata; in basso è riportato l'rs del polimorfismo (in rosso).

## Variazioni introniche

### 1-1 InsA

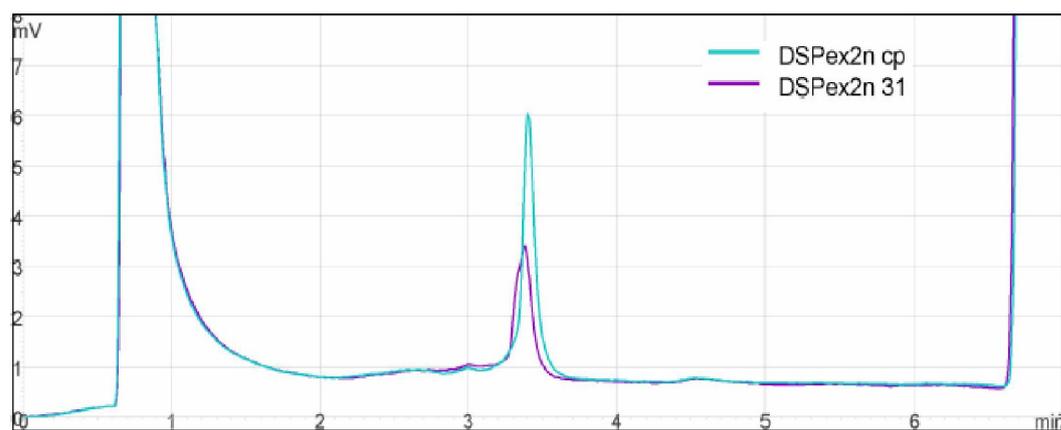
L'inserzione di una A, trovata in quattro pazienti, (Figura 17) nella regione intronica a monte dell'esone 1, in particolare, prima dell'ATG iniziale, è già nota in letteratura (Rampazzo *et al.*, 2002), ma non è stata riportata nel database degli SNPs.



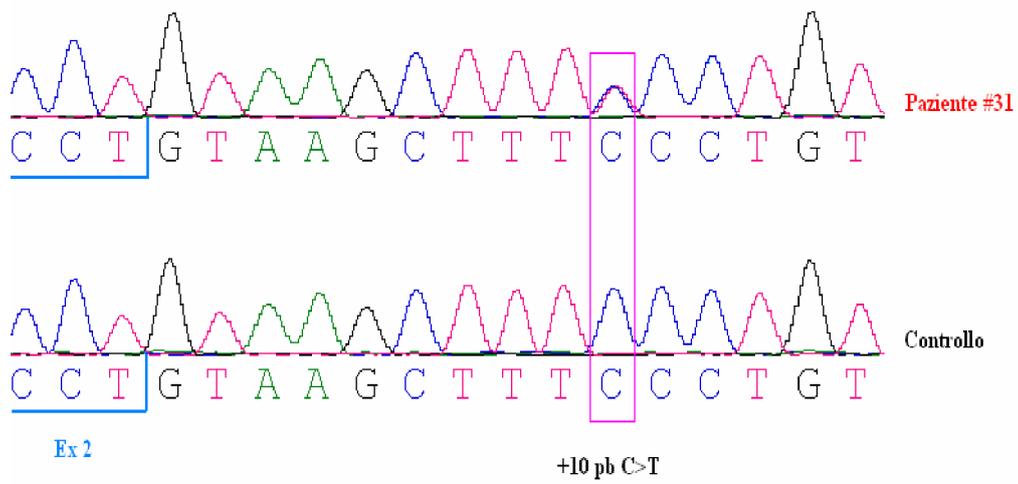
**Figura 17.** Confronto tra la sequenza di un controllo sano (in basso) e quella del probando #12 (in alto) in cui è stata identificata l'inserzione di una A, in eterozigosi, immediatamente a monte dell'esone 1.

### c.273+10C>T

Questa sostituzione nucleotidica, individuata a valle dell'esone 2 (Figura 18 e 19) nel paziente #31, non compare tra gli SNPs noti e non è descritta in letteratura, ma è stata precedentemente riscontrata nel laboratorio dove ho svolto la tesi di laurea in 9 su 97 soggetti di controllo sani, mediante analisi DHPLC, mostrando una frequenza del 9,3% sulla popolazione di controllo e confermando, quindi, la variazione come polimorfismo (poiché maggiore dell'uno per cento).



**Figura 18.** Confronto tra il profilo di eluizione ottenuto dall'analisi DHPLC del DNA di un soggetto di controllo sano, cp, (in azzurro) e quello del paziente #31 (in viola) in cui è stata individuata la variazione c.273+10C>T a valle dell'esone 2. Si può notare che il profilo di eluizione del probando si discosta lievemente dal controllo. Temperatura di analisi: 62,6°C (+2).



**Figura 19.** Confronto tra la sequenza di un controllo sano (in basso) e quella del probando #31 (in alto) in cui è stata identificata la variazione c.273+10C>T, in eterozigosi, a valle dell'esone 2.

I risultati trovati possono essere riassunti nella seguente tabella (Tabella X):

VARIAZIONI	SOSTITUZIONE NUCLEOTIDICA	SOSTITUZIONE AMINOACIDICA	dbSNP rs# Cluster ID O N. CONTROLLI
<b>MUTAZIONE ESONICA</b>	<b>c.1124A&gt;T</b>	<b>Asn375Ile</b>	<b>(NUOVA) 107 Ctrl DHPLC</b>
POLIMORFISMI ESONICI SINONIMI	c.126C>T	Tyr42Tyr	rs36087964
	c.741T>G	Ala247Ala	rs2806234
	c.2091A>G	Gly697Gly	rs2076304
	c.2631G>A	Arg877Arg	rs1016835
	c.2862C>T	Cys954Cys	rs2064217
	c.3963G>A	Gln1321Gln	(5 su 132 Ctrl dHPLC)
	c.8175C>A	Arg2725Arg	rs11558731
	c.8472G>C	Gly2824Gly	rs2744380
	c.7122C>T	Thr2374Thr	rs2076300
	c.8472G>C	Gly2824Gly	rs2744380
POLIMORFISMI ESONICI NON SINONIMI	c.913A>T	Ile305Phe	rs17604693
	c.4535A>G	Tyr1512Cys	rs2076299
	c.4609C>T	Arg1573Cys	rs28763967
POLIMORFISMI INTRONICI	1-1 INS A	-	*
	273+10C>T	-	(9 su 97 Ctrl dHPLC)
	274-31T>C	-	rs10484326
	1141-44C>T	-	rs2076296
	1904-49T>A	-	rs2076303
	2794-113G>A	-	rs2260359
	2985+70G>A	-	rs6942260
	3085-72G>A	-	rs6905839
	8616+197C>T	-	rs12250

**Tabella X.** Tabella riassuntiva di tutte le variazioni nucleotidiche trovate.

## DISCUSSIONE

Questo lavoro di tesi ha riguardato la ricerca di mutazioni nel gene desmoplachina in 50 pazienti affetti da ARVC. I risultati possono essere riassunti schematicamente dalla seguente Tab. XI.

GENI	#PAZIENTI	DSP
DSC2, DSG2, PKP2, DSP	8020	POLIMORFISMI
	7716	POLIMORFISMI
	7950	POLIMORFISMI
	7956	POLIMORFISMI
	8012	POLIMORFISMI
	8011	POLIMORFISMI
	7974	POLIMORFISMI
	7972	POLIMORFISMI
	7971	POLIMORFISMI
	7968	POLIMORFISMI
	7963	POLIMORFISMI E MUTAZIONI IN DSG2 E PKP2
	8161	POLIMORFISMI MUTAZIONI IN PKP2
	8339BIS	POLIMORFISMI
DSG2, PKP2, DSP	8428	POLIMORFISMI MUTAZIONI IN PKP2
	8102	POLIMORFISMI
	8325	POLIMORFISMI MUTAZIONI IN PKP2
	8308	POLIMORFISMI MUTAZIONI IN PKP2
	8274	POLIMORFISMI
	8226	POLIMORFISMI
	8317	POLIMORFISMI
	8303	POLIMORFISMI
	27	POLIMORFISMI
	28	POLIMORFISMI MUTAZIONI IN DSG2 E PKP2
	8209	POLIMORFISMI
	8322	POLIMORFISMI
	8432BIS	POLIMORFISMI
	8341BIS/8397	POLIMORFISMI MUTAZIONI IN PKP2
	8289	POLIMORFISMI
	7626	POLIMORFISMI
	8221	POLIMORFISMI
	8301	POLIMORFISMI
	8347/8400	POLIMORFISMI 2MUTAZIONI IN PKP2
	8361	POLIMORFISMI <b>MUTAZIONE (c.1124A&gt;T)</b> MUTAZIONI IN PKP2
8382	POLIMORFISMI	
DSG2, DSP	8282	POLIMORFISMI
DSC2, DSP	7952	POLIMORFISMI
PKP2, DSP	4835	POLIMORFISMI MUTAZIONI IN PKP2
	8101	POLIMORFISMI MUTAZIONI IN PKP2
	8338	POLIMORFISMI MUTAZIONI IN PKP2
	8353	POLIMORFISMI
	8388	POLIMORFISMI MUTAZIONI IN PKP2
	8377	POLIMORFISMI

GENI	#PAZIENTI	DSP
	8380	POLIMORFISMI MUTAZIONI IN PKP2
	8399	POLIMORFISMI
	8389	POLIMORFISMI
	8405	POLIMORFISMI
DSP	20	POLIMORFISMI
	8492	POLIMORFISMI
	8367	POLIMORFISMI
	84263	POLIMORFISMI

**Tabella XI.** Tabella in cui sono riassunte tutte le variazioni nucleotidiche trovate in 50 pazienti affetti da ARVC, analizzati per il gene DSP. Nella colonna di sinistra sono indicati anche i geni nei quali era stata precedentemente effettuata la ricerca di mutazioni (in rosso è evidenziata la mutazione identificata nel paziente #8361.)

Nella serie di soggetti indagati, che rappresentano casi isolati e non imparentati tra loro, è stata identificata una sostituzione *missense* in eterozigosi nell'esone 9 del paziente #41. L'analisi tramite DHPLC di 107 controlli sani ha dato esito negativo, suggerendo che la variazione riscontrata sia una mutazione patogena. In effetti, la sostituzione c.1124A>T comporta il cambiamento dell'aminoacido asparagina in posizione 375 con l'aminoacido isoleucina (Asn375Ile). In questo caso la variazione è di tipo non conservativo in quanto gli aminoacidi coinvolti hanno diverse proprietà chimico-fisiche: l'asparagina è caratterizzata dalla presenza di una catena laterale polare ma non carica, che le conferisce la capacità di interagire con altri aminoacidi con proprietà idrofiliche ed eventualmente anche con l'acqua attraverso legami idrogeno. Al contrario, l'isoleucina possiede una catena laterale alifatica che, di conseguenza, le permette di stabilire interazioni idrofobiche all'interno delle strutture proteiche. L'introduzione di un residuo idrofobico nella sequenza aminoacidica della desmoplachina potrebbe causare un avvolgimento (*fold*ing) proteico anomalo con eventuali implicazioni a livello funzionale. Siccome il cambiamento in questione interessa il dominio N-terminale, la mutazione potrebbe alterare la formazione del legame della desmoplachina alla placca desmosomale, mediante una connessione anomala a placoglobina e placofilina, e indebolire così la struttura desmosomale.

La relazione tra mutazioni del gene DSP e ARVC certamente ha a che fare con deficit funzionale dei desmosomi. Si può ipotizzare che in presenza di desmosomi difettosi, a parità di forza applicata, lo stiramento delle connessioni risulti superiore al normale; ciò potrebbe determinare una maggiore attivazione dei canali del calcio sensibili allo stiramento (*stretch-activated calcium channels*) e conseguentemente un aumento anomalo del calcio intracellulare. Eccessi di calcio all'interno delle cellule provocherebbero apoptosi o necrosi cellulare (Rampazzo *et al.*, 2002).

E' interessante notare che nello stesso paziente era stata precedentemente identificata in eterozigosi nell'esone 7 del gene PKP2 una mutazione *missense* (F522C) che sostituisce una fenilalanina con una cisteina. Tale variazione non era stata mai riportata in letteratura, ma non era stata trovata in 110 controlli sani. La mutazione di PKP2 in questione cade nel quarto dominio *arm* della placofilina, importante nel legame con le altre componenti desmosomali. Casi di doppia eterozigosi sono stati già riportati in letteratura anche per ARVC (Sen-Chowdhry *et al.*, 2007); spesso la presenza di due diverse mutazioni in eterozigosi (nello stesso gene o in geni diversi) sono associate a fenotipi particolarmente gravi. Quando l'eterozigosi per mutazioni patogene riguarda due geni diversi, ovviamente, a causa della segregazione indipendente, ci saranno nella famiglia individui che presentano una delle due mutazioni ed altri in numero molto inferiore, che viceversa ereditano una delle due mutazioni dal padre e l'altra dalla madre. La presenza di una singola mutazione in alcuni casi può dar luogo ad un fenotipo clinico parvisintomatico, mentre la presenza di entrambe le mutazioni può determinare un'espressione clinica più grave. Nelle famiglie in cui si riscontra l'eredità di due distinte mutazioni, la ridotta penetranza e la variabilità intrafamiliare dell'espressione clinica risulta facilmente spiegata.

Nei cinquanta pazienti presi in considerazione sono stati rinvenuti inoltre 22 polimorfismi, dei quali 13 esonici e 9 intronici. Tra i polimorfismi esonici 10 sono sostituzioni sinonime, ma 3 comportano un cambiamento aminoacidico. La maggior parte di queste variazioni era già nota, solo 3 (1-1insA; c.273+10C>T; c.3963G>A) non erano presenti in dbSNP, ma sono state confermate nel laboratorio dove ho svolto la tesi di laurea. Nel paziente #1 è stato trovato un polimorfismo esonico non sinonimo (Arg1573Cys) che sostituisce un'arginina (catena laterale basica) con una cisteina (catena laterale acida). Il residuo interessato da questo cambiamento è abbastanza conservato tra le specie ed è localizzato nel dominio centrale (*rod*) della desmoplachina, responsabile dell'avvolgimento parallelo uno sull'altro dei due monomeri che vanno a formare la tipica struttura a manubrio dell'omodimero. Nonostante si tratti di un polimorfismo, non si può escludere che tale variazione abbia qualche conseguenza funzionale. Al momento attuale non è possibile stimare la sua frequenza nella popolazione.

Il lavoro svolto nel corso della presente tesi di laurea si inquadra in una ricerca di più ampio respiro in corso nel laboratorio e volta a stimare la proporzione di mutazioni dei diversi geni tra gli affetti da ARVC. Finora erano stati analizzati in tutto 110 casi indice (pazienti affetti e non imparentati tra loro); per tutti questi

casi è stata effettuata una ricerca di mutazioni in tutti i geni che codificano le proteine desmosomali DSP, PKP2, DSG2, DSC2.

Di questi casi:

- 11 presentano mutazioni in DSP
- 16 presentano mutazioni in PKP2
- 8 presentano mutazioni in DSG2
- 3 presentano mutazioni in DSC2
- 14 presentano più di una mutazione
- 58 casi non presentano mutazioni in nessuno dei geni analizzati.

Dei 50 casi indice che sono stati oggetto dell'analisi del gene DSP riportata in questa tesi:

- 13 casi erano stati analizzati per PKP2, DSG2 e DSC2; di questi, in:
  - ✓ 11 sono stati identificati soltanto polimorfismi
  - ✓ 1, che presentava mutazioni in DSG2 e PKP2, sono stati identificati polimorfismi in DSP
  - ✓ 1, che presentava una mutazione in PKP2, sono stati identificati polimorfismi in DSP
- 21 casi erano stati analizzati per DSG2 e PKP2, di questi in:
  - ✓ 14 sono stati identificati in DSP soltanto polimorfismi
  - ✓ 5, che presentano mutazioni in PKP2, sono stati identificati polimorfismi in DSP
  - ✓ 1, che presenta mutazioni in DSG2 e PKP2, sono stati identificati polimorfismi in DSP
  - ✓ 1, che presenta una mutazione in PKP2, e' stata identificata una mutazione in DSP, oltre a polimorfismi nello stesso gene
- 1 caso analizzato per DSG2: sono stati identificati polimorfismi in DSP
- 1 caso analizzato per DSC2: sono stati identificati polimorfismi in DSP
- 10 casi sono stati analizzati per PKP2, in :
  - ✓ 5, che presentavano mutazioni in PKP2, sono stati trovati polimorfismi in DSP
  - ✓ 5 sono stati trovati polimorfismi in DSP
- 4 casi analizzati soltanto per DSP: sono stati trovati soltanto polimorfismi.

Quindi sommando questi risultati a quelli ottenuti precedentemente nel laboratorio, in totale si hanno oggi informazioni derivate dallo screening di mutazioni nei geni DSP, PKP2, DSC2 e DSG2 in 123 casi, con il seguente risultato:

- § 11 casi mutati soltanto in DSP (8,9%)
- § 17 casi mutati soltanto in PKP2 (13,8%)
- § 8 casi mutati soltanto in DSG2 (6,5%)
- § 3 casi mutati soltanto in DSC2 (2,4%)
- § 15 casi mutati in più di un gene (12,2%)
- § 69 casi in cui non è stata trovata alcuna mutazione (56,1%)

Le informazioni precedentemente ottenute dalla serie dei 110 casi assegnavano a DSP circa 10% dei casi, a PKP2 circa 14%, a DSG2 circa 7% e a DSC2 circa 3%; i casi con più mutazioni rappresentavano circa il 13% del totale e i casi nei quali non era stata identificata alcuna mutazione circa il 53%.

Non sono disponibili finora studi effettuati da laboratori diversi, che consentano di comparare tali frequenze. Tuttavia il lavoro originale sull'identificazione del gene PKP2 riportava che tale gene sarebbe coinvolto nel 30% dei casi ARVC (Gerull *et al.*, 2004). Alla luce dei dati ottenuti sulla serie dei 123 casi indice finora esaminati a Padova, si può senz'altro affermare che nella nostra popolazione le mutazioni patogene di tale gene sono meno frequenti. Ciò non è verosimilmente dovuto a differenze nel tasso di mutazione, ma a differenze attribuibili ad "effetto del fondatore", dato che si tratta di mutazioni con eredità dominante che non si possono definire "letali" in senso genetico, perché non incompatibili con la riproduzione. Analisi in corso di una serie di casi indice della Polonia sembrano in effetti indicare che in quella popolazione la frequenza di mutazioni patogene in PKP2 sia quasi del 50% (Rampazzo A., dati non pubblicati, comunicazione personale).

Un dato importante sul piano pratico è che la frequenza dei casi con due o più mutazioni è non trascurabile (superiore al 10%); ciò significa che la ricerca delle mutazioni patogene non può ritenersi conclusa nel momento in cui venga identificata una mutazione e che particolare attenzione in questo senso va posta ai casi che in una famiglia manifestano una forma clinica più grave degli altri parenti affetti, in quanto i casi gravi potrebbero essere dovuti alla presenza di più mutazioni.



## BIBLIOGRAFIA

Ahamad F, Li D, Karibe A, Gonzales O, Tapscott T, Hill R, Weilbaecher D, Blackie P, Furey M, Gardner M, Bachinski LL, Roberts R  
*Localisation of a gene responsible for a arrhythmogenic right ventricular dysplasia to chromosome 3p23.*  
Circulation 1998; 98: 2791-2795

Ahamad F  
*The molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia-cardiomyopathy.*  
Clin Invest Med 2003; 26: 167-178

Alcalai R, Metzger S, Rosenheck S, Meiner V, Chajek-Shaul T  
*A recessive mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia, skin disorder, and woolly hair.*  
J Am Coll Cardiol 2003 Jul 16; 42 (2): 319-327

Anderson EL  
*Arrhythmogenic right ventricular dysplasia.*  
Am Fam Physician 2006; 73: 1391-1398

Angst BD, Nilles LA, Green KJ  
*Desmoplakin II expression is not restricted to stratified epithelia.*  
J Cell Sci 1990 Oct; 97 (Pt 2): 247-257

Asimaki A, Syrris P, Wichter T, Matthias P, Saffits JE, Mckenna WJ  
*A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.*  
Am J Hum Genet 2007; 81: 964-973

Awad MM, Calkins H, Judge DP  
*Mechanism of disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy.*  
Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2008 May; 5(5): 258-67

Bagattin A, Veronese C, Bauce B, Wuyts W, Settimo L, Nava A  
*Denaturing HPLC-based approach for detecting RYR2 mutations involved in malignant arrhythmias.*

Clin Chem 2004; 50: 1148-1155

Basso C, Thiene G, Corrado D, Angelini A, Nava A, Valente M  
*Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: displasia, dystrophy, or myocarditis?*

Circulation 1996; 94: 983-991

Bauce B, Basso C, Rampazzo A, Beffagna G, Daliento L, Frigo G, Malacrida S, Settimo L, Danieli GA, Thiene G, Nava A  
*Clinical profile of four families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by dominant desmoplakin mutations.*

Eur Heart J 2005 Aug; 26 (16): 1666-1675

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 factors-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1.*

Cardiovasc Res 2005; 65: 366-373

Bierkamp C, McLaughlin KJ, Schwarz H, Huber O, Kelmer R  
*Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin.*

Dev Biol 1996; 180: 780-785

Bornslaeger EA, Corcoran CM, Stappenbeck TS, Green KJ  
*Breaking the connection: displacement of the desmosomal plaque protein desmoplakin from cell-cell interfaces disrupts anchorage of intermediate filament bundles and alters intercellular junction assembly.*

J Cell Biol 1996; 134 (4): 985-1001

Carvajal-Huerta L  
*Epidermolitic palmoplantar keratoderma with woolly hair and dilated cardiomyopathy.*

J Am Acad Dermatolog 1998; 39: 418-421

Chen X, Bonne S, Hatzfeld M, van Roy F, Green KJ  
*Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta-catenin signaling.*  
J Biol Chem 2002; 277: 10512-10522

Choi HJ, Park-Snyder S, Pascoe LT, Green KJ, Weis WI  
*Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure.*  
Nat Struct Biol 2002 Aug; 9 (8): 612-620

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; 97: 2049-2058

Corrado D, Basso C, Thiene G, McKenna WJ, Davies MJ, Fontaliran F, Nava A, Silvestri F, Blomstrom-Lundqvist C, Wlodarska EK, Fontaine G, Camerini F  
*Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a multicenter study.*  
J Am Coll Cardiol 1997; 30: 1512-1520

Corrado D, Basso C, Schiavon M, Thiene G  
*Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes.*  
N Engl J Med 1998; 339: 364-369

Cowin P, Kapprell HP, Franke WW  
*The complement of desmosomal plaque proteins in different cell type.*  
J Cell Biol 1985; 101 (4): 1442-1454

Cowin P, Kapprell HP, Franke WW, Tamkun J, Hynes RO  
*Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions.*  
Cell 1986; 1063-1073

d'Amati G, Bagattin A, Bauce B, Rampazzo A, Autore C, Basso C, King K, Romeo MD, Gallo P, Thiene G, Danieli GA, Nava A

*Juvenile sudden death in a family with polymorphic ventricular arrhythmias caused by a novel RyR2 gene mutation: evidence of specific morphological substrates.*

Hum Patol 2005 Jul; 36(7): 761-7

Fixman M and Freire JJ

*Theory of DNA melting curves.*

Biopolymers. 1977, Dec; 16: 2693-2704

Franke WW, Goldschmidt MD, Zimbelmann R, Mueller HM, Schiller DR, Cowin P

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

Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 4027-4031

Gallicano GI, Kouklis P, Bauer C, Yin M, Vasioukhin V, Degenstein L, Fuchs E  
*Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage.*

J Cell Biol 1998; 143: 2009-2022

Gallicano GI, Bauer C, Fucus E

*Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature.*

Development 2001; 128: 929-941

Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, Willerson JT, Schneider MD, Khoury DS, Marian AJ

*Suppression of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.*

J Clin Invest 2006 Jul; 116 (7): 2012-2021

Garrod DR, Parrish EP, Matthey DL, Marston JE, Measures HR, Vilela MJ

*Desmosome*

*Morphoregulatory Molecules* (ed. G.M. Edelman, B.A. Cunningham and, J.P. Thiery), 1990; pp. 315-319. New York: John Wiley and Sons

Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z

*Desmosomal cadherins.*

Curr Opin Cell Biol 2002; 14: 537-545

George CH, Higgs GV, Lai FA

*Ryanodine receptor mutations associated with stress-induced ventricular tachycardia mediate increased calcium release in stimulated cardiomyocytes.*

Circ Res 2003 Sep 19; 93(6): 531-540

Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermot DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossman KS, Drenkhahn J, Michely B, Sasse-Klaasen 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; 36: 1162-1164. Erratum in: Nat Genet 2005; 37: 106

Getsios S, Huen AC, Green KJ

*Working out the strength and flexibility of desmosomes.*

Nat Rev Mol Cell Biol 2004; 5: 271-281

Green KJ, Parry DA, Steinert PM, Virata ML, Wagner RM, Angst BD, Nilles LA

*Structure of the human desmoplakins. Implications for function in the desmosomal plaque.*

J Biol Chem 1990 Jul 5; 265 (19): 11406-11407

Green KJ, Gaudry CA

*Are desmosomes more than tethers for intermediate filament?*

Nat Rev Mol Cell Biol 2000 Dec; 1 (3): 208-216

Hatzfeld M

*The armadillo family of structural proteins.*

Int Rev Cytol 1999; 186: 179-224

Huber O

*Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease.*

Cell Mol Life Sci 2003; 60: 1872-1890

Kelly DF

*Fine structure of desmosome, hemidesmosomes, and an epidermal globular layer in developing newt epidermis.*

J Cell Biol 1966; 28: 51-72

Leask A, Abraham DJ

*TGF-beta signaling and the fibrotic response.*

FASEB J 2004; 18: 816-827

Leung CL, Green KJ, Liem RK

*Plakins: a family of versatile cytolinker proteins.*

Trends Cell Biol 2002; 12: 37-45

Li D, Ahamad F, Gardner MJ, Weilbaecher D, Hill R, Karibe A, Gonzales O, Tapscott T, Sharrat JP, Bachinski LL, Roberts R

*The locus of a novel gene responsible for arrhythmogenic right ventricular dysplasia characterized by early onset and high penetrance to chromosome 10p12-p14.*

Am J Hum Genet 2000; 66: 148-156

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; 65: 384-398

Marcus FI, Fontaine GH

*Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: a review.*

PACE 1995; 18: 1298-1314

McKenna WJ, Thiene G, Nava A, Fontaine F, Blomstrom-Lundqvist C, Fontaine G, Camerini F.

*Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy Task Force of Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the Internationals Society and Federation of Cardiology.*

Br Heart J. 1994; 71: 215-208

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 disease (Naxos disease).*

Lancet 2000 Jun; 355: 2119-2124

Melberg A, Oldfors A, Blomstrom-Lundqvist C, Stalberg E, Carlsson B, Larsson E, Lidel C, Eeg-olofsson KE, Wikstrom G, Henriksson KG, Dhal N

*Autosomal dominant myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy linked to chromosome 10q.*

Ann Neurol 1999; 46: 684-692

Merner ND, Hodgkinson KA, Haywood A, connors S, French VM, Drenckhahn JD, Kupprion C, Ramadanova K, Thierfelder L, McKenna W, Gallagher B, Larkin-Morris L, Bassett AS, Parfrey PS, Young TL

*Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene.*

Am J Hum Genet 2008; 82: 1-13

Mertens C, Kuhn C, Franke WW

*Plakophilins 2a and 2b : constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque.*

J Cell Biol 1996; 135: 1009-1025

Miller K, Matthey D, Measures H, Hopkins C, Garrod D

*Localisation of the protein and glycoprotein components of bovine nasal epithelial desmosomes by immunoelectron microscopy.*

EMBO J 1987; 6, 885-889

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF

*A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.*

Nucleic Acid Res. 1988; 16: 1215

Nava A, Thiene G, Canciani B, Scognamiglio R, Daliento L, Buja G, Martini B, Stritoni P, Fasoli G.

*Familial occurrence of right ventricular dysplasia: a study involving nine families.*

J Am Coll Cardiol. 1988 Nov; 12 (5): 1222-1228

Nava A, Rossi L, Thiene G

*Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-dysplasia.*

Ed Elsevier, 1997

Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, Cabezas JC, Common J, Purkis PE, Whittock N, Leigh IM, Stevens HP, Kelsell DP

*Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma.*

Hum Mol Genet 2000 Jan 29; 105 (4): 431-437

Norgett EE, Luck TW, Bowers B, Munro CS, Leigh IM, Kelsell DP

*Early death from cardiomyopathy in a family with autosomal dominant striate palmoplantar keratoderma and woolly hair associated with novel insertion mutation in desmoplakin.*

J Invest Dermatol 2006 Jul; 126 (7): 1651-4 Epub 2006 Apr 20. Erratum in: J Invest Dermatol 2006 Dec; 126 (12): 2735

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.*

Journal of Cell Science 1999; 112: 4325-4336

Nuber UA, Schafer S, Schmidt A, Koch PJ, Franke WW

*The widespread human desmocollin Dsc2 and tissue-specific patterns of synthesis of various desmocollin subtypes.*

Eur J Cell Biol 1995; 66 (1): 69-74

Oefner PJ, Underhill PA

*Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC).*

Am J Hum Genet 1995; 57: A266

Parker AE, Wheeler GN, Arnemann J, Pidsley SC, Ataliotis P, Thomas CL, Rees DA, Magee AI, Buxton RS

*Desmosomal glycoproteins II e III.*

J Biol Chem 1991; 266: 10438-10445

Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Barbara B, Lorenzon A, Frigo G, Vettori A, Valente M, Towbin JA, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A

*Mutations in desmoglein-2 gene are associated to arrhythmogenic right ventricular.*

Circulation 2006; 113: 1171-1179

Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V, Danieli GA

*Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (RYR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.*

Circulation 2001; 103: 196-200

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): 321-326

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; 3: 959-962

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 1 q42-q43.*

Hum Mol Genet 1995; 4: 2151-2154

Rampazzo A, Nava A, Miorin M, Fonderico P, Pope B, Tiso N, Rivolsi B, Zimbello R, Thiene G, Danieli GA

*ARVD4, a new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, maps to chromosome 2 long arm.*

Genomics 1997; 45: 252-263

Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Beffagna G, Bauce B, Rossi V, Zimbello R, Sionati 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 Hum Genet 2002; 71: 1200-1206

Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennet CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA

*Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling.*

Science 2000 Aug 11; 289 (5481): 950-953

Schafer S, Koch PJ, Franke WW

*Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2 and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins.*

Exp Cell Res 1994; 211 (2): 391-399

Sen-Chowdhry S, Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sevdalis E, McKenna WJ

*Clinical and genetic Characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression.*

Circulation 2007; 115: 1710-1720

SeveriniGM, 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; 31: 193-200

Smith EA and Fuchs E

*Defining the interaction between intermediate filaments and desmosomes.*

J Cell Biol 1998; 141 (5): 1229-1241

Sporn MB, Roberts AB

*Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges.*

J Cell Biol 1992; 119(5): 1017-1021

Stappenbeck TS, Bornslaeger EA, Corcoran CM, Luu HH, Virata ML, Green KJ

*Functional analysis of desmoplakin domains: specification of the interaction with keratin versus vimentin intermediate filament networks.*

J Cell Biol 1993 Nov; 123 (3): 691-705

Stappenbeck TS, Lamb JA, Corcoran CM, Green KJ

*Phosphorylation of the desmoplakin COOH terminus negatively regulates its interaction with keratin intermediate filament networks.*

J Biol Chem 1994 Nov 25; 269 (47): 29351-29354

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 Genet 2006; 79: 978-984

Thiene G, Nava A, Corrado D, Rossi L, Pennelli N

*Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people.*

N Engl J Med 1988; 318: 129-133

Thiene G, Nava A, Angelini A, Daliento L, Scognamiglio R, Corrado D

*Anatomoclinical aspects of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.*

In: Baroldi G, Camerini F, Goodwin JF, eds *Advances in Cardiomyopathy*

Berlin: Springer Verlag 1990; 397-408

Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Lardert G, Brahmbhatt 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; 10: 189-194

Troyanovsky SM, Troyanovsky RB, Eshkind LG, Krutovskikh VA, Leube RE, Franke WW

*Identification of the plakoglobin-binding domain in desmoglein and its role in plaque assembly and intermediate filament anchorage.*

J Cell Biol 1994 Oct; 127 (1): 151-160

Virata MLA, Wagner RM, Parry DAD, Green KJ

*Molecular structure of human desmoplakin I e II amino terminus.*

Proc Natl Acad Sci USA 1992;89 (2): 544-548

Xiao W, Oefner PJ

*Denaturing high-performance liquid chromatography: A review*

Hum Mut 2001; 17: 439-474

Yang Z, Bowles NE, Scherer SE, Taylor MD, Kearney DL, Ge S, Nadvoretzkiy VV, DeFreitas G, Carabello B, Brandon LI, Godsel LM, Green KJ; Saffitz JE, Li H, Danieli GA, Calkins H, Marcus F, Towbin JA

*Desmosomal dysfunction due to mutations in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy.*

Circ Res 2006 Sep 15; 99 (6): 646-655

Yoshida M, Romberger DJ, Illig MG, Takizawa H, Sacco O, Spurzem JR, Sisson JH, Rennard SI, Beckmann JD

*Transforming growth factor-beta stimulates the expression of desmosomal proteins in bronchial epithelial cells.*

Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 6: 439-445