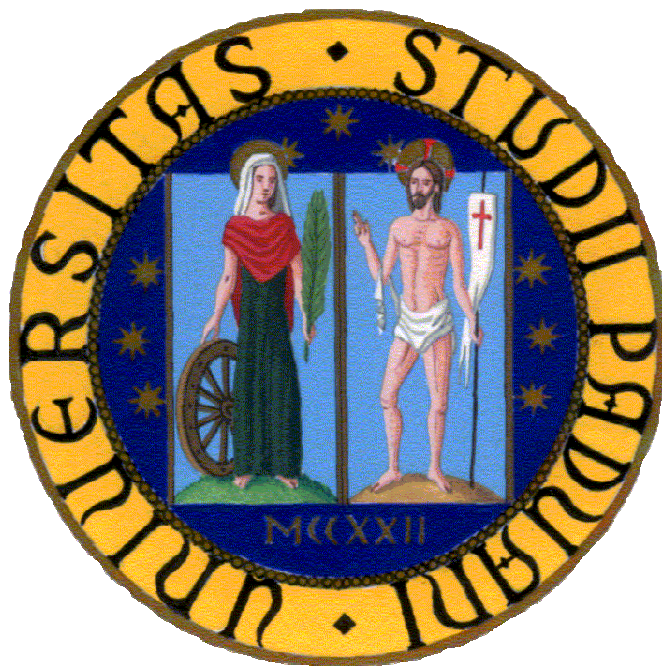


# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

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



ELABORATO DI LAUREA

**RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE CTNNA3 CANDIDATO PER LA  
CARDIOMIOPATIA ARITMOGENA DEL VENTRICOLO DESTRO**

RELATORE: Dott.sa Alessandra Rampazzo  
Dipartimento di Biologia

CORRELATORE: Dott.sa Marzia De Bortoli  
Dipartimento di Biologia

LAUREANDO: Francesco Martinati

Anno Accademico 2007/2008



## INDICE

ABSTRACT	Pag.5
INTRODUZIONE	Pag.7
-Genetica molecolare dell'ARVC	Pag.7
-I Desmosomi	Pag.8
MATERIALI E METODI	Pag.11
-Estrazione di DNA da sangue intero	Pag.11
-Amplificazione mediante PCR	Pag.11
-Sequenziamento	Pag.13
-Tools bioinformatici	Pag.13
-DHPLC	Pag.14
-Condizioni di analisi dei 18 esoni del gene CTNNA3	Pag.16
RISULTATI E DISCUSSIONE	Pag.17
-Il gene CTNNA3 come gene candidato per l'ARVC	Pag.17
-Risultati ottenuti mediante sequenziamento diretto	Pag.18
-Risultati ottenuti mediante analisi al DHPLC e conseguente sequenziamento	Pag.18
-Conclusioni	Pag.20
BIBLIOGRAFIA	Pag.23



## ABSTRACT

La cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVC) è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante a penetranza incompleta. E' caratterizzata sia da variabilità clinica che da eterogeneità genetica. Finora sono stati individuati dodici loci coinvolti, ma si sono riscontrate mutazioni in soli 8 geni, di cui 5 codificanti per proteine desmosomali. Ciò ha suggerito che la malattia sia legata ad alterazioni nella struttura dei desmosomi cardiaci, localizzati a livello dei dischi intercalari.

Nel 50% dei pazienti affetti da ARVC analizzati in questo laboratorio non sono state identificate mutazioni nei geni noti per la patologia. Nel corso del mio tirocinio, ho effettuato uno screening di mutazioni in un gene candidato in 10 di questi pazienti. Il gene CTNNA3 codifica per  $\alpha$ T-catenina, una proteina che si localizza a livello dell'area composita. Infatti, recenti studi hanno identificato nel muscolo cardiaco la presenza di una particolare giunzione definita come "area composita", contenente proteine sia desmosomali che appartenenti alle fascae adherentes. Il DNA d'interesse è stato ottenuto mediante estrazione da sangue intero e lo screening è stato condotto tramite analisi in DHPLC e sequenziamento diretto degli amplificati contenenti i 18 esoni del gene.

Nessuna delle variazioni nucleotidiche individuate può essere considerata una mutazione patogena, ma essendo il numero di pazienti analizzati esiguo, i risultati finora ottenuti non permettono di escludere l'implicazione del gene nella determinazione genetica dell'ARVC.



## INTRODUZIONE

La cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVC) è una malattia cardiaca clinicamente caratterizzata da aritmia ventricolare non-ischemica, originata dal ventricolo destro, consistente in una progressiva distrofia delle cellule muscolari del miocardio presenti nel ventricolo destro, dove si evidenziano alterazioni consistenti nella sostituzione dei cardiomiociti con tessuto adiposo o fibro-adiposo. La prevalenza stimata è di circa 1 caso ogni 5000 persone, ma questa può essere una sottostima per la presenza di casi non diagnosticati o di errata diagnosi. (Thiene et al., 2007)



Fig 1: Reperto autoptico di cuore affetto da ARVC; si nota la presenza di tessuto fibro-adiposo

La patologia tende a insorgere tra i 20 e i 40 anni, con una sintomatologia molto ampia e varia: nel 50% dei casi si assiste alla presenza di aneurismi parietali destri, singoli o multipli (Thiene et al., 1988), mentre in tutti i casi si rileva dilatazione ventricolare destra, di varia entità a seconda della fase di sviluppo della patologia. Il ventricolo sinistro risulta coinvolto in circa il 50% dei pazienti esaminati, e nel 20% dei casi si assiste alla compromissione del setto intraventricolare (Basso et al., 1996). Questa patologia è stimata come la prima causa di morte improvvisa negli atleti, e in generale se ne è riscontrata la presenza in oltre il 20% degli individui colpiti da morte improvvisa in assenza di sintomatologia previa. (Corrado et al., 1998)

### *Genetica Molecolare dell'ARVC*

La cardiomiopatia aritmogena presenta una forte eterogeneità dal punto di vista genetico. Per lo più la malattia si presenta come autosomica dominante a penetranza incompleta ed espressività variabile, per cui fattori ambientali o altri fattori epigenetici potrebbero essere implicati nell'eziologia della malattia (Awad et al., 2008). La penetranza si mostra più accentuata nei maschi (62-72%), probabilmente a causa di una più intensa attività fisica e di fattori biologici come gli estrogeni, che impedirebbero nelle femmine l'apoptosi delle cellule del miocardio (Van Tintelen et al., 2007).

Ad oggi sono stati identificati dodici loci coinvolti, ma si sono riscontrate mutazioni in soli 8 geni, 5 desmosomali e 3 non desmosomali, (tabella 1) riportati in seguito.

In circa il 50% degli individui sintomatici si riscontra una mutazione in uno dei cinque componenti del desmosoma cardiaco (Awad et al.2008). Mutazioni nei geni desmosomali potrebbero favorire il danneggiamento del tessuto del miocardio in condizioni di stress meccanico, portando disgregazione e degenerazione dei cardiomiociti, e conseguente sostituzione con tessuto fibro-adiposo (Van Tintelen et al. 2007).

Locus	Regione Cromosomica	Gene	OMIM	Reference
ARVD1	14q24.3	TGFβ3	107970	Rampazzo et al., 1994 Beffagna et al., 2005
ARVD2	1q42-q43	RYR2	600996	Rampazzo et al., 1995 Tiso et al., 2001
ARVD3	1q12-q22	sconosciuto	602086	Severini et al., 1996
ARVD4	2q32.1-q32.2	sconosciuto	602087	Rampazzo et al., 1997
ARVD5	3p23	TMEM43	604400	Ahmad et al., 1998 Merner et al., 2008
ARVD6	10p12-p14	sconosciuto	604401	Li et al., 2000
ARVD7	10q22.3	sconosciuto	601419	Melleberg et al., 1999
ARVD8	6p24	Desmoplachina	607450	Rampazzo et al., 2002
ARVD9	12p11.2	Placofilina 2	609040	Gerrull et al., 2004
ARVD10	18q12.1-q12.2	Desmogleina 2	610193	Pilichou et al., 2006 Awad et al., 2006
ARVD11	18q12.1	Desmocollina 2	610476	Syrris et al., 2006 Beffagna et al., 2007
ARVD12	17q21	Placoglobina	611528	Asimaki et al. 2007

Tabella 1: loci, regione cromosomica e geni coinvolti nelle forme di ARVC note

#### *Geni desmosomali*

##### *Placoglobina (JUP)*

Il gene codificante per la placoglobina (JUP), è coinvolto nella “sindrome di Naxos” (MIM#601214), malattia caratterizzata da cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro, cheratoderma palmo plantare non epidermiolitico e capelli lanosi, (McKoy et al., 2000); nei pazienti affetti è stata individuata una delezione di 2bp che provoca slittamento del codice di lettura e formazione di una proteina tronca. Nel 2007 è stata identificata una mutazione in eterozigosi, comportante un’inserzione di una serina nel dominio N-terminale della Placoglobina in un paziente affetto da ARVC (Asimaki et al. 2007); il gene in questione quindi è coinvolto anche in una forma dominante di ARVC, l’ARVD12.

##### *Desmoplachina (DSP)*

Sono state individuate nel gene codificante per la Desmoplachina mutazioni associate ad ARVC, (Rampazzo et al., 2002).

Anche questo gene è coinvolto in una sindrome Naxos-simile, la “sindrome di Carvajal” (MIM#606676); in questo caso la mutazione riscontrata consisteva in una delezione in omozigosi, di una singola base, che porta alla formazione di una proteina tronca alla porzione C-terminale. (Carvajal-Huerta 1998).

##### *Placofilina-2 (PKP2)*

Le mutazioni sul gene codificante per la Placofilina-2 (PKP2) sono frequenti nei pazienti ARVC, e causano la forma nota come ARVD9. Ad oggi 50 mutazioni sono state identificate, alcune missenso, o, nella maggior parte dei casi, non-sense e frameshift (Van Tintelen et al., 2007; Awad et al., 2008).



### *Desmogleina-2 (DSG2)*

Mutazioni nel gene codificante per la Desmogleina-2 causano la forma ARVD9, che presenta la sintomatologia classica dell'ARVC (Pilichou et al., 2006)

### *Desmocollina-2 (DSC2)*

La desmocollina-2 è una proteina appartenente alla famiglia delle caderine desmosomiali. Nel 2006 Syrris et al. hanno per primi verificato il coinvolgimento di questo gene nella forma ARVD11. Beffagna et al. nel 2007 hanno identificato due mutazioni in eterozigosi. Queste mappano nella regione N-terminale della proteina, importante per l'adesione tra le Caderine desmosomiali. Inoltre è stato dimostrato che queste due mutazioni missenso causano un'errata localizzazione citoplasmatica della DSC2.

### *Geni non-desmosomiali*

#### *RYR-2*

Questo gene, codificante per un canale del calcio presente a livello del reticolo sarcoplasmatico dei cardiomiociti è fondamentale nell'omeostasi del calcio intracellulare e per la contrazione delle fibrocellule muscolari. Tiso et al. (2001) hanno identificato questo gene come gene-malattia responsabile di una forma di ARVD dominante (ARVD2). Le mutazioni missenso riscontrate alterano la capacità di chiusura del recettore, determinando una fuoriuscita persistente di ioni  $Ca^{2+}$  dal reticolo sarcoplasmatico, con conseguente insorgenza di aritmie.

#### *TGFB-3*

Beffagna et al. hanno identificato nel 2005 due mutazioni nelle regioni 5' e 3'-UTR nel gene TGFB-3, che codifica una citochina solubile importante nella regolazione dello sviluppo, nell'omeostasi tissutale e nella regolazione della trascrizione delle proteine desmosomiali.

#### *TMEM43*

Il gene TMEM43 è l'ultimo gene-malattia identificato come responsabile di una forma di ARVC. Merner et al. nel 2008 hanno identificato una mutazione in un dominio trans-membrana altamente conservato, che porta alla forma ARVD5. Questa forma risulta letale, a penetranza completa e influenzata dal sesso, con un'aspettativa di vita media, tra i probandi analizzati nello studio, di 41 anni per gli uomini e 71 per le donne (Merner et al., 2008).

## ***I Desmosomi***

I desmosomi sono un tipo di giunzione cellula-cellula, necessari per mantenere l'integrità meccanica dei tessuti. Essi risultano molto abbondanti in particolare nei tessuti dove lo sforzo meccanico è elevato, come epidermide, epiteli, o tessuto cardiaco. Questo tipo di giunzioni sono formate da proteine appartenenti a tre superfamiglie, le Caderine, le proteine Armadillo e le Plachine (Al-Amoudi e Frangakis, 2008).

Dato che la maggior parte dei geni identificati come responsabili per l'ARVC codificano per proteine desmosomiali, si presume che le basi molecolari della

patologia siano per lo più imputabili ad alterazioni strutturali e funzionali nel complesso desmosomale.

Le proteine che costituiscono il desmosoma cardiaco sono:

- Le caderine desmosomiali Desmocollina-2 (DSC2) e Desmogleina-2 (DSG2), che si presentano come glicoproteine, mediante l'adesione calcio-dipendente intercellulare, attraverso legami soprattutto omofilici ed in parte eterofilici con altre caderine poste sulla membrana plasmatica di cellule adiacenti. Inoltre, nella porzione intracellulare, legano due proteine armadillo, la Placofilina-2 (PKP2) e la Placoglobina.
- Le proteine Armadillo Placofilina-2 e Placoglobina, importanti per la regolazione dell'assemblaggio e dell'adesione desmosomale. Esse mediano il contatto tra le Caderine e le Plachine, nel caso del desmosoma cardiaco rappresentate dalla Desmoplachina (DSP)
- La Desmoplachina (DSP), che forma un legame diretto con Placoglobina e Placofilina tramite il dominio N-terminale, mentre tramite il dominio C-terminale ancora l'intera struttura del desmosoma ai filamenti intermedi del citoscheletro, costituiti, nel cuore, da desmina. (Huber et al., 2003)

Nel miocardio le cellule sono connesse da vari tipi di giunzioni, che si trovano in zone definite come dischi intercalari (ID), i quali appaiono come un sistema complesso, formato da vari tipi di giunzioni, in particolare desmosomi e fascia adherentes, oltre alla presenza di gap junctions, in grado di permettere la propagazione del potenziale d'azione. L'ID è necessario per l'ancoraggio delle cellule del miocardio, così come per la contrazione.

Recenti studi effettuati da Franke et al. dal 2005 al 2008 hanno identificato come una parte delle giunzioni aderenti presenti a livello dei dischi intercalari nel cuore contengano proteine facenti parte sia dei desmosomi che delle fasce adherentes, rappresentando una speciale struttura definita come "area composita", dove i complessi molecolari sono fusi sottoforma di mosaici, unita sia ai filamenti intermedi che all'actina del citoscheletro. Le proteine desmosomiali sono comunque i maggiori componenti di queste strutture, soprattutto PKP2 e DSP, ma è uniforme la presenza di proteine proprie del complesso caderin-cateninico, come  $\alpha$ - e  $\beta$ -catenina, proteina p120 e ARVCF, vinculina e metavinculina,  $\alpha$ -actinina e afadina, così come l' $\alpha$ T-catenina, (Franke et al., 2005; Goossens et al., 2007).

In quanto nel 50% dei pazienti affetti da ARVC, analizzati in questo laboratorio, non sono finora state identificate mutazioni su nessuno dei geni su cui è stato effettuato lo screening, si è effettuata un'analisi, in 10 soggetti affetti da ARVC, di un gene candidato, l' $\alpha$ T-catenina.

## **MATERIALI E METODI**

In seguito all'estrazione del DNA a partire da un campione di sangue intero, prelevato con il consenso informato dei pazienti, si è proceduto ad amplificazione dei 18 esoni dell' $\alpha$ T-catenina per 10 probandi, e successiva corsa in gel d'agarosio per un'analisi qualitativa. Per gli esoni 2, 8, 10, 14 e 18 si è proceduto con il sequenziamento diretto, mentre per tutti gli altri esoni si è ricorsi ad analisi tramite DHPLC e successivo sequenziamento nel caso si siano riscontrate variazioni nel profilo cromatografico.

### ***Estrazione di DNA da sangue intero***

Per l'estrazione del DNA su cui si effettueranno i successivi screening si procede con l'estrazione da sangue intero, secondo il metodo del "salting out" messo a punto da Miller et al. nel 1988 e ottimizzato dal Dott. M. Rosa, Laboratorio di Genetica Umana Molecolare, metodo che si basa sul principio chimico-fisico per cui ad elevate concentrazioni di sali si determina un abbassamento della solubilità delle macromolecole.

Una volta completata l'estrazione si procede ad un'analisi quantitativa del DNA, con una lettura spettrofotometrica della sua concentrazione a 260 nm e di eventuali contaminazioni da proteine con il rapporto 260 nm /280 nm. Se esso è compreso tra 1.6 e 1.8 può considerarsi sufficientemente puro. E' possibile anche una valutazione qualitativa, mediante corsa in gel d'agarosio all'1%, che permette di osservare la qualità del DNA, che deve mostrarsi come un insieme di bande ad alto peso molecolare, senza eventuali smears o bande a più basso peso molecolare, proprie di un DNA degradato.

### ***Amplificazione mediante PCR***

Per ognuno dei 10 probandi, più un controllo positivo (contenente il DNA di un soggetto sano, utilizzabile come riferimento per l'analisi mediante DHPLC) e un controllo negativo, i 18 esoni del gene CTNNA3 sono stati amplificati mediante reazione di PCR, tecnica che consente di amplificare, rapidamente e selettivamente, in vitro, sequenze specifiche di DNA genomico o cDNA. Si sono utilizzati primer intronici, permettendo in questo modo l'analisi dei siti accettori e donatori di splicing, dove eventuali mutazioni potrebbero essere patogene.

Il protocollo seguito per le amplificazioni è stato identico per tutti gli esoni, come descritto in seguito.

### ***PROTOCOLLO***

Si è utilizzata sempre la GoTaq<sup>®</sup> Polymerase (Promega)

Il protocollo è stato messo a punto per consentire la corsa in DHPLC, utilizzando il buffer adeguato (Colorless GoTaq buffer, Promega).

La miscela di reazione per un singolo campione è costituita da:

Reagente	Quantità
H <sub>2</sub> O	11,8 µl
Buffer 5X	5,0 µl
dNTPs [1mM]	5,0 µl
Primer F [10pmoli]	1,0 µl
Primer R [10pmoli]	1,0 µl
GoTaq Polymerase [5 u/µl]	0,2 µl
DNA [50 µg/µl]	1,0 µl

Tabella 2: componenti della miscela di reazione per ogni campione

Nella tabella 3 si riportano i tempi e le temperature utilizzate nel protocollo per le PCR standard, mentre nella tabella 4 sono presenti tempi e temperature utilizzate per le Touchdown PCR.

<i>Ciclo</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>
Hot start	95° C	2'00"
Denaturazione	95° C	30"
Annealing	T <sub>an</sub>	30"
Estensione	72° C	30"
Estensione finale	72 °C	8'00"
Blocco della reazione	8 °C	8'00"

} 35 cicli

Tabella 3: condizioni di amplificazione utilizzate per PCR standard

<i>Ciclo</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>
Hot start	95° C	2'00"
Denaturazione	95° C	30"
Annealing 1	T <sub>an1</sub> (-1° C per ciclo)	30"
Estensione	72° C	30"
Denaturazione	95° C	30"
Annealing 2	T <sub>an2</sub>	30"
Estensione	72° C	30"
Estensione finale	72 °C	8'00"
Blocco della reazione	8 °C	8'00"

} 10 cicli  
} 25 cicli

Tabella 4: condizioni di amplificazione utilizzate per TD PCR

Le temperature di annealing utilizzate per i vari esoni sono riportate, insieme alle temperature di melting utilizzate al DHPLC, nella tabella 5.

Per gli esoni 3, 5, 9, 11, 12 e 13 si è proceduto all'utilizzo di un diverso programma, denominato Touchdown PCR. Questo prevede dopo la temperatura iniziale di hot start per l'attivazione della polimerasi, una prima fase di

amplificazione costituita di 10 cicli di denaturazione-annealing-estensione condotta a temperatura elevata (qui 72 o 70°C), per assicurare un appaiamento specifico dei primer alla sequenza complementare. Ad ogni ciclo la temperatura di annealing è abbassata di 1°C, facilitando l'annealing, con l'obiettivo di incrementare le copie amplificate. In seguito vi è una seconda fase di 25 cicli, ad una temperatura di annealing appropriata (qui 62 o 60 °C).

L'avvenuta amplificazione mediante PCR è stata controllata tramite elettroforesi in gel d'agarosio al 2% con aggiunta di etidio bromuro per rendere visibile il DNA, effettuando la corsa insieme ad un marcatore di peso molecolare con risoluzione di 100bp.

### ***Sequenziamento***

Il sequenziamento è stato effettuato con un sequenziatore automatico ABI PRISM 3730XL a 96 capillari (Applied Biosystems), presso il BMR-Genomics. La successiva analisi degli elettroferogrammi è stata effettuata via software tramite SeqManII (DNASTAR).

Gli amplificati prima del sequenziamento sono trattati con un kit apposito ("PCR Product Pre-Sequencing Kit", Amersham Pharmacia Biotech), per purificarli da eventuali residui di dNTPs e primers. Il kit è composto da una fosfatasi alcalina (SAP) e un esonucleasi (EXO I), in grado di degradare rispettivamente i dNTPs e i primers rimasti. Il protocollo prevede l'utilizzo di una miscela di reazione contenente 50% di SAP e 50% di EXO I. Ogni 5[ $\mu$ l] di DNA da purificare richiede l'utilizzo di 1 $\mu$ l di mix, contenente 0.5 $\mu$ l di SAP e 0.5  $\mu$ l di EXO I. A questo punto, si effettua un ciclo di attivazione (37° C per 15 minuti) e inattivazione (80° C per 15 minuti) dei due enzimi. Al termine viene aggiunto 1  $\mu$ l del primer impiegato per il sequenziamento ed il tutto viene disidratato a 70°C per circa 20 minuti.

### ***Tools bioinformatici e database***

*Seqman II* - è un'applicazione che permette l'analisi degli elettroferogrammi derivanti dal sequenziamento. Permette la creazione di un contiguo tra le sequenze ottenute ed un allineamento con le sequenze consenso dell'amplificato e dell'esone.

*UCSC Human Genome Browser* - è un database sviluppato dalla UCSC Genome Bioinformatics, che consente la visualizzazione di informazione su intere regioni genomiche, mostrando informazioni su geni noti e predetti con suddivisione introni/esoni, UTR, isole CpG, siti di restrizione, ORF, isoforme e sul mRNA.

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

*dbSNP* - è una banca dati di SNPs, in cui si possono effettuare ricerche per SNPs noti, ottenendo per questi informazioni sulle loro eterozigosità e frequenza allelica.

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

*Pubmed* - è un database contenente articoli pubblicati su qualsiasi giornale di divulgazione ad interesse medico, veterinario o biologico. Offre gratuitamente l'abstract, oltre ai link per avere accesso agli articoli interi (gratuiti o a pagamento).

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

## DHPLC

La DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) è un sistema cromatografico liquido ad accoppiamento ionico in fase inversa, che può essere utilizzata per lo screening di mutazioni a livello di DNA, permettendo di analizzare frammenti con lunghezze tra 100 e 700 bp. La colonna è formata da una matrice non porosa idrofobica costituita dal copolimero polistirene-divinilbenzene, alle cui sfere sono associati in maniera covalente molecole di octadecilsilano (C<sub>18</sub>) (fase stazionaria). L'adesione del DNA alla matrice è mediata dalla presenza di TEAA (trimetilammonioacetato), un controione (che funziona da ponte), molecola anfipatica, la cui testa positiva va ad interagire con i gruppi fosfato, negativi, presenti sul DNA, mentre la coda idrofobica è in grado di interagire con l'octadecilsilano.

La fase mobile, polare, è costituita di una miscela di H<sub>2</sub>O, TEAA ed, in bassissima concentrazione, acetonitrile, in grado di competere per la carica positiva del controione.

Una siringa automatizzata presente nel sistema va a iniettare nella colonna la quantità stabilita di DNA, variabile a seconda dell'efficienza dell'amplificazione

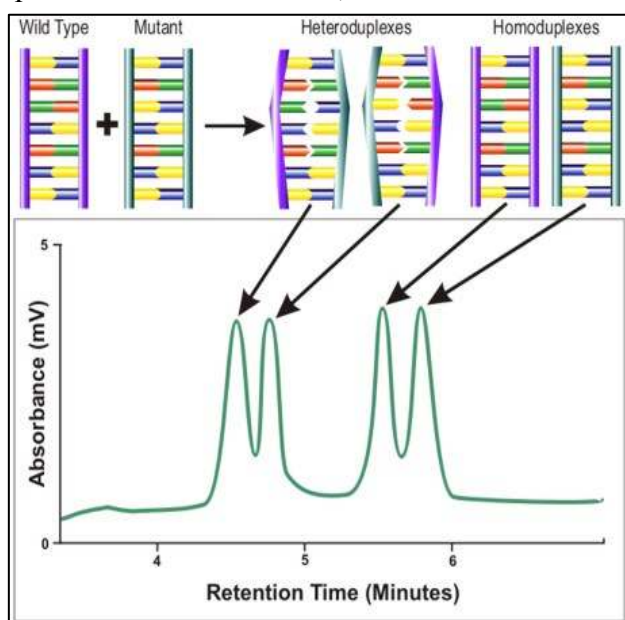


Fig 2: formazione di molecole omoduplex ed eteroduplex a partire da un frammento di DNA contenente una variazione nucleotidica in eterozigosi (in alto) e il corrispondente profilo cromatografico dopo analisi DHPLC del campione

mediante PCR. Il DNA inizialmente, si lega, tramite la propria carica negativa dovuta ai gruppi fosfato, con la fase stazionaria, grazie all'interazione con la regione carica positivamente del TEAA. Si effettua quindi un'eluizione tramite un aumento della concentrazione dell'acetonitrile, in gradiente, nella fase mobile. L'acetonitrile, essendo più affine al DNA rispetto al controione, ne favorirà il distacco dalla matrice.

Il funzionamento del DHPLC si basa sulla diversa affinità, e quindi velocità di eluizione, tra omoduplex ed eteroduplex. Questi vengono ottenuti tramite un'iniziale denaturazione dei frammenti di DNA prodotti

dalla PCR (95°C per 5 minuti), e successiva rinaturazione a temperatura ambiente. Se la variazione è presente in eterozigosi la PCR avrà generato due popolazioni di frammenti: una contenente una variazione (SNP o mutazione), ed un'altra avente sequenza wild-type. Il riannealing casuale porterà quindi alla formazione di popolazioni di omoduplex (riappaiamento tra frammenti correlati) ed eteroduplex (appaiamento tra frammenti non correlati in precedenza). Condizione essenziale per la corsa DHPLC è il mantenimento di una temperatura costante di "quasi-denaturazione", in grado di mantenere circa il 75% di DNA nella condizione di dsDNA e il 25% a ssDNA; temperatura che dovrà essere ottimizzata per ogni target diverso, tenendo conto della diversa composizione in basi dei vari frammenti, della loro diversa lunghezza e della presenza di domini di melting. Se è presente la variazione, mantenendo i frammenti alla temperatura di quasi-denaturazione, gli eteroduplex non daranno appaiamento perfetto, formando una "bolla di denaturazione" a livello dell'appaiamento scorretto. Questo influenza la velocità di eluizione nella colonna cromatografica di omoduplex ed eteroduplex, causata dall'alterato coefficiente di ripartizione proprio di questi ultimi, che, essendo più denaturati, avranno un minore livello d'interazione con la fase stazionaria, e saranno quindi eluiti a concentrazioni minori di acetonitrile.

Gli omoduplex, diversamente, dato il maggiore livello d'interazione con la fase stazionaria, necessitano per il rilascio di tempi e concentrazioni di acetonitrile maggiori. Durante il periodo di eluizione l'eluato attraversa una microcella a flusso presente in uno spettrofotometro correlato allo strumento, il quale, misurando l'assorbanza a 260 nm stabilisce la quantità di DNA in uscita in ogni istante. Una successiva analisi computerizzata riporterà i valori ottenuti in un cromatogramma, che confrontato con quello di un controllo positivo ci mostrerà l'eventuale presenza di una qualsiasi variazione, necessariamente presente in eterozigosi. Generalmente si osserva un picco di eluizione precoce per le molecole eteroduplex, seguito dal picco degli omoduplex.

Il pattern cromatografico che si ottiene dal controllo positivo si presenta come un solo picco, netto e stretto. Eventuali anomalie nella forma o presenza di un maggior numero dei picchi sono indicativi di variazioni in eterozigosi. Per quei campioni presentanti un profilo di eluizione diverso rispetto a quello di un controllo, si è proceduto con il sequenziamento, per identificare la variazione presente.

E' molto importante valutare come detto in precedenza, la temperatura di quasi-denaturazione che è strettamente correlata alla composizione in basi dei frammenti in esame, un'analisi accurata può implicare la necessità (per alcune sequenze) di letture a diverse temperature, nel caso di presenza di diversi domini di melting. Proprio per le caratteristiche del DHPLC in presenza di sequenze con un numero elevato di regioni con ripetizioni mononucleotidiche, o nel caso di presenza di domini di melting che richiedano temperature troppo diverse, l'analisi diventa passibile di errore, ed è necessario procedere sin dall'inizio tramite sequenziamento.

Altro limite del DHPLC è l'incapacità di individuare le variazioni presenti in omozigosi, fatto di importanza minore nel caso di patologie, come l'ARVC, che si presentano come autosomiche dominanti. Per individuare tuttavia eventuali mutazioni in omozigosi sarà necessario aggiungere al prodotto di PCR in analisi una quantità analoga di DNA wild-type, consentendo in questo modo la formazione di eteroduplex.

### **Condizioni di analisi dei 18 esoni del gene CTNNA3**

In seguito sono riportate in tabella le temperature di quasi-denaturazione (comprehensive di eventuale time shift utilizzato) impiegate nell'analisi DHPLC dei 18 esoni del gene CTNNA3. Dove risultano assenti le temperature di analisi, cioè per gli esoni 1, 2, 8, 10, 12, 14 e 18 si è proceduto al sequenziamento diretto per tutti i pazienti su cui si è effettuato lo screening. Sono inoltre riportate in tabella, oltre alle dimensioni in paia di basi degli amplificati, le temperature di annealing che sono state adoperate per l'amplificazione mediante PCR degli esoni. E' indicato, oltre a ciò, quando è stata impiegata una TD PCR.

Esoni	T <sub>an</sub> PCR	Lunghezza Amplificato	Temperature di analisi DHPLC		
			T °C (time shift)	T °C (time shift)	T °C (time shift)
1	62°	395			
2	60°	407			
3	TD72°-62°	491	56.5	58.2	
4	60°	583	56.4 (1)	57.8 (1)	58.4 (1)
5	TD72°-62°	406	56.5	59.9	
6	62°	700	55.2	58.7 (1)	
7	62°	326	56.2	58.7 (0.5)	60.8 (1)
8	62°	156			
9	TD72°-62°	267	54.3	56.3 (2)	
10	62°	454			
11	TD 70°-60°	578	55 (3)	57 (3)	
12	TD72°-62°	350	56.7 (1)	61 (3)	
13	62°	586	53.5	55.3 (1)	
14	62°	395			
15	60°	326	55.7	57.5 (1)	
16	TD70°-60°	295	57.6 (1)		
17	62°	313	55.8 (1)	58.5 (2)	
18	62°	550			

Tabella 5: temperature di annealing, dimensioni degli amplificati e temperature di analisi al DHPLC per i vari esoni.



## RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo tirocinio si è proceduto con l'analisi per la ricerca di mutazioni, in dieci pazienti affetti da ARVC, in un nuovo gene candidato, codificante per l' $\alpha$ T-catenina (CTNNA3). Si è proceduto tramite sequenziamento diretto e mediante DHPLC. Gli esoni 1, 2, 8, 10, 14, 18 sono stati sottoposti a sequenziamento diretto, a causa dell'alto numero di polimorfismi presente in letteratura per questi esoni o perché erano presenti sequenze particolari. Per tutti gli altri esoni si è effettuata inizialmente un'analisi mediante DHPLC, seguita da eventuale sequenziamento per quei campioni che presentavano profili cromatografici diversi rispetto al controllo positivo.

### *Il gene CTNNA3 come gene candidato per l'ARVC*

In questo tirocinio si è scelto di effettuare uno screening di mutazioni nelle regioni esoniche e nelle regioni introniche fiancheggianti il gene  $\alpha$ T-catenina (CTNNA3). L' $\alpha$ T-catenina è una proteina appartenente alla famiglia delle  $\alpha$ -catenine, un particolare tipo di catenine, famiglia di proteine in grado di legare il dominio citoplasmatico di un ampio numero di caderine, producendo un complesso che lega i filamenti di actina del citoscheletro, molto importante nelle giunzioni cellula-cellula. (Herrenknecht et al., 1991).

Il gene fu identificato e caratterizzato per la prima volta da Janssens et al. nel 2002, tramite clonaggio del cDNA di topo, ed in seguito tramite FISH e sequenziamento diretto. (Janssens et al. 2002). L'espressione di questo gene è molto abbondante a livello dei cardiomiociti e delle cellule mioidi peritubulari del testicolo.

Il gene mappa nella regione 10q21 e all'interno dell'introne 7 presenta nello strand antiparallelo un'ulteriore sequenza codificante corrispondente al gene LRRTM3.

Il gene CTNNA3 presenta forte identità con i geni codificanti per le altre proteine appartenenti alla famiglia delle  $\alpha$ -catenine, come CTNNA1, CTNNA2 e in maniera minore con CTNNAL1 ( $\alpha$ -catulina). Inoltre è molto conservato rispetto all'ortologo in topo.

Il gene è molto lungo (1.776 kb), presenta 18 esoni di cui solo 17 sono codificanti ed introni molto estesi (spesso oltre le 100 kb).

Questo gene è stato selezionato come gene candidato considerando la funzione e l'espressione tissutale della proteina codificata da CTNNA3. Nel cuore l' $\alpha$ T-Catenina si trova, assieme alle proteine desmosomali, in una giunzione strutturale mista (area composita), che combina elementi dei desmosomi e delle giunzioni aderenti, la quale lega sia l'actina del citoscheletro che i filamenti intermedi. L' $\alpha$ T-catenina interagisce specificamente con il dominio N-terminale della PKP2, svolgendo un ruolo di rinforzo della giunzione dell'area composita, funzione che non può essere svolta dall' $\alpha$ E-catenina.

Essendo l'ARVC una malattia associata, nella maggior parte dei casi, a mutazioni presenti nei geni che codificano per le proteine costituenti il desmosoma cardiaco, le caratteristiche dell' $\alpha$ T-catenina, in particolar modo la specifica espressione

tissutale, la localizzazione e la funzione della proteina hanno fatto ipotizzare che mutazioni in questo gene possano essere coinvolte nella determinazione genetica dell'ARVC.

### ***Risultati ottenuti mediante sequenziamento diretto***

Gli esoni 1, 2, 4, 8, 10, 14, 18 sono stati sottoposti a sequenziamento diretto. In nessun caso sono state trovate variazioni nucleotidiche, né in eterozigosi né in omozigosi.

### ***Risultati ottenuti mediante analisi al DHPLC e conseguente sequenziamento***

Per tutti gli altri esoni si è proceduto inizialmente ad un'analisi tramite corse al DHPLC, servendosi delle temperature di quasi-denaturazione riportate nella tabella 5. Si sono utilizzate corse di 8 minuti, in modalità "mutation detection". Per quei campioni in cui il profilo cromatografico risultava diverso dal profilo del controllo positivo si è proceduto a sequenziamento.

Come previsto, data l'alta densità di polimorfismi noti, molti profili cromatografici ottenuti differivano rispetto al controllo positivo.

Sono riportati, nella tabella 6, i risultati ottenuti dal sequenziamento degli amplificati che presentavano un cromatogramma al DHPLC anomalo.

Esone	Paziente	Picco DHPLC	Variazione nucleotidica	Regione	dbSNP ID
3	2,3,4 (in eterozigosi) 7 (in omozigosi)	la porzione a monte del picco principale è anomala T:58.2	c.292+13A>G	intronica	rs3750863
4	7	picco doppio T:56.5	c.325-19A>T	intronica	rs1909654
5	7	picco triplo T:56.4+1 picco triplo T:57.8+1	c.469-161T>C	intronica	rs7906790
12	4,6	picco doppio T:56.7	c.1532-32C>T	intronica	rs12761828
17	1,3,6,8,10	picco triplo T:55.8+1	c.2266-10T>G	intronica	rs2105702

Tabella 6: risultati del sequenziamento nel caso di cromatogrammi anomali

### c.292+13G>A

Questa variazione nucleotidica (A>G) mappa nell'introne 3, 13 paia di basi a valle dell'esone 3. Si tratta di un polimorfismo noto in letteratura (rs3750863); l'allele di riferimento è A, e nella popolazione europea la variante G si trova con una frequenza del 29.2%.

Il polimorfismo è stato identificato nei pazienti 2, 3, 4 in eterozigosi, mentre nel paziente 7 la variazione è presente in omozigosi. Il profilo cromatografico al DHPLC presentava alla T: 58.2 un'anomalia nella porzione a monte del picco principale.

### c.325-19A>T

Questa variazione nucleotidica (A>T) mappa nell'introne 3, 19 paia di basi a monte dell'esone 4. Si tratta di un polimorfismo noto in letteratura (rs1909654); l'allele di riferimento è A, e nella popolazione europea la variante T si trova con una frequenza del 2.1%.

Il polimorfismo è stato identificato, in eterozigosi, nel paziente 7. Il profilo cromatografico al DHPLC per questo campione si presentava con un doppio picco a T:56.5. In figura 3 si può osservare in rosso il profilo cromatografico del paziente, che presenta un picco doppio rispetto al controllo positivo (in nero).

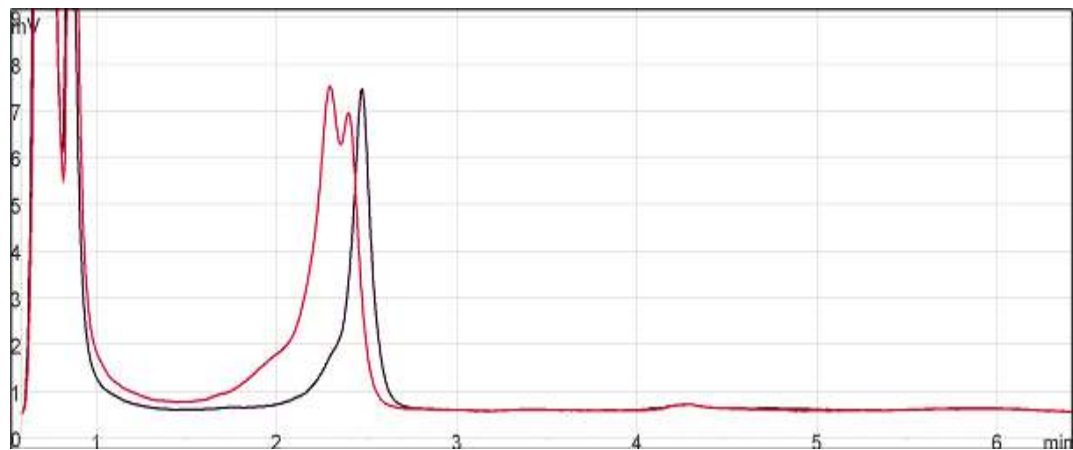


Figura 3: cromatogramma relativo alla corsa DHPLC a T:56.5 del paziente 7

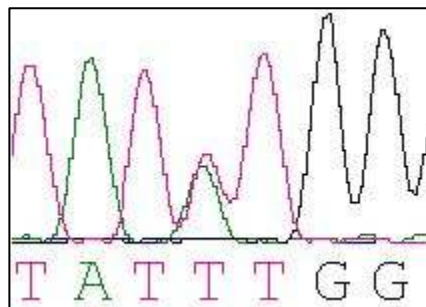


Figura 4: elettroferogramma relativo alla variazione nucleotidica c.325-19A>T nel paziente 7

In figura 4 è riportato l'elettroferogramma corrispondente alla sequenza dell'amplicone 4 dove è stata identificata, nel paziente 7, la variazione c.325-19A>T. Si evidenzia chiaramente la presenza, in eterozigosi, di una A ed una T.

### c.469-161T>C

Questa variazione nucleotidica (T>C) mappa nell'introne 4, 161 paia di basi a monte dell'esone 5. Si tratta di un polimorfismo noto in letteratura (rs7906790); l'allele di riferimento è T, e nella popolazione europea la variante C si trova con una frequenza del 4,4%.

Il polimorfismo è stato identificato, in eterozigosi, nel paziente 7. Il profilo cromatografico al DHPLC per questo campione si presentava con picchi tripli sia a T:56.4+1 che a T:57.8+1.

#### **c.1532-32C>T**

Questa variazione nucleotidica (C>T) mappa nell'introne 11, 32 paia di basi a monte dell'esone 12. Si tratta di un polimorfismo noto in letteratura (rs12761828); l'allele di riferimento è C, e nella popolazione europea la variante T si trova con una frequenza del 8,3%.

Il polimorfismo è stato identificato, in eterozigosi, nei pazienti 4 e 6. Il profilo cromatografico al DHPLC per questo campione si presentava con picco doppio a T:56.7.

#### **c.2266-10T>G**

Questa variazione nucleotidica (T>G) mappa nell'introne 16, 10 paia di basi a monte dell'esone 17. Si tratta di un polimorfismo noto in letteratura (rs2105702); l'allele di riferimento è T, e nella popolazione europea la variante G si trova con una frequenza del 29,2%.

Il polimorfismo è stato identificato, in eterozigosi, nei pazienti 1, 3, 6, 8, 10. Il profilo cromatografico al DHPLC per questo campione si presentava con picco triplo T:55.8+1, molto simile tra tutti i campioni.

In figura 5 si può osservare in rosso il profilo cromatografico del paziente 1, che presenta un picco triplo rispetto al controllo positivo (in nero).

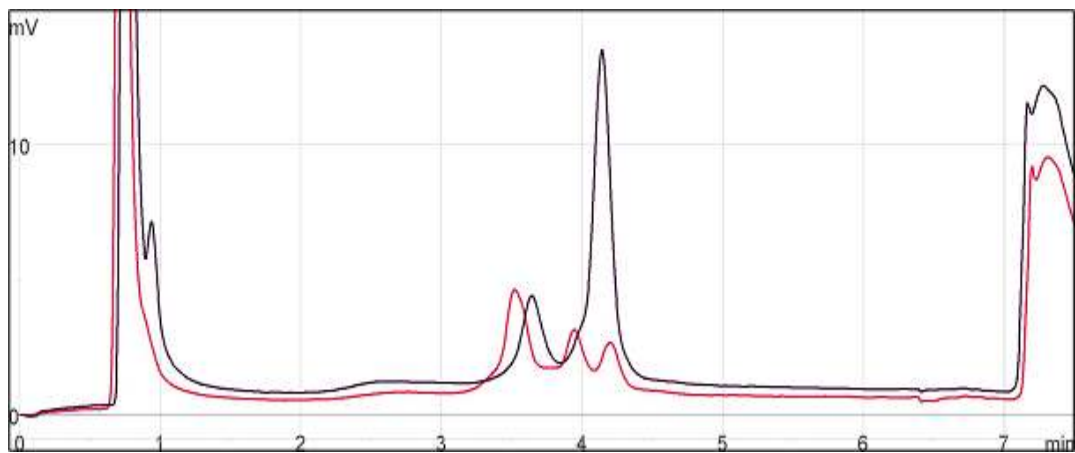


Figura 5: cromatogramma relativo alla corsa DHPLC a T:58.5+1 del paziente 1

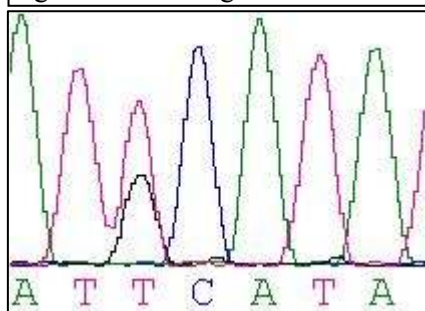


Figura 6: elettroferogramma relativo alla variazione nucleotidica c.2266-10T>G nel paziente 1

In figura 6 è presente l'elettroferogramma corrispondente alla sequenza dell'amplicone 17 dove è stata identificata, nei pazienti 1, 3, 6, 8, 10 la variazione c.2266-10T>G. Si evidenzia chiaramente la presenza, in eterozigosi, di una T ed una G.

## ***Conclusioni***

Una conoscenza sempre maggiore della genetica dell'ARVC ha permesso l'individuazione dei geni responsabili di numerose forme della patologia. E' importante per quei pazienti portatori della malattia nei quali non è ancora stata identificata la mutazione patogena poter scoprire quale sia il gene coinvolto. Ciò risulta di grande interesse, per poter identificare quali familiari, all'interno della famiglia del probando, portino la mutazione. I soggetti in questo caso potranno ricorrere ad esami cardiologici specifici, per valutare e monitorare la progressione della malattia.

In questo tirocinio si è eseguito la ricerca di mutazioni su un nuovo gene candidato, l' $\alpha$ T-catenina. In precedenza non si erano effettuati screening per questo gene in relazione all'ARVC, ma una ricerca di mutazioni per la DCM autosomica dominante non aveva dato alcun risultato (Janssens et al., 2002). Questo è l'unico studio presente in letteratura, dove si sia effettuato uno screening per la ricerca di mutazioni per valutare il coinvolgimento di questo gene in una malattia cardiaca.

Tutte le variazioni riscontrate in questa analisi sono risultate introniche e corrispondenti a polimorfismi già noti in letteratura oltre che frequenti nella popolazione: nessuna di queste può quindi essere considerata una mutazione patogena. Ciò nonostante il numero di pazienti analizzati è estremamente esiguo (10) e i risultati negativi ottenuti non permettono di escludere che questo gene sia implicato nella determinazione genetica dell'ARVC.

In futuro si estenderà l'analisi ad altri pazienti che non sono risultati portatori di mutazioni nei geni ARVC finora noti.



## BIBLIOGRAFIA

- Al-Amoudi A., Frangakis AS. (2008)  
Structural studies on desmosomes.  
*Biochemical Society Transactions*, **36**: 181-187
- Asimaki A., Syrris P., Wichter T., Matthias P., Saffitz JE., McKenna WJ. (2007)  
A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.  
*American Journal of Human Genetics*, **81(5)**: 964-973
- Awad M., Calkins H., Judge DP. (2008)  
Mechanism of Disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy  
*Nature Clinical Practice*, **5**: 258-267 Review
- Basso C., Thiene G., Corrado D., Angelini A., Nava A., Valente M. (1996)  
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, dystrophy or myocarditis?  
*Circulation*, **94(5)**: 983-991
- Beffagna G., Occhi G., Nava A., Vitiello L., Ditadi A., Basso C., Bauce B., Carraro G., Thiene G., Towbin JA., Danieli GA., Rampazzo A. (2005)  
Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1.  
*Cardiovascular Research*, **65(2)**: 366-373
- Beffagna G., De Bortoli M., Nava A., Salamon M., Lorenzon A., Zaccolo M., Mancuso L., Sigalotti L., Bauce B., Occhi G., Basso C., Lanfranchi G., Towbin JA., Thiene G., Danieli GA., Rampazzo A (2007)  
Missense mutations in Desmocollin-2 N-terminus, associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, affect intracellular localization of desmocollin-2 in vitro  
*BMC Medical Genetics*, **8**: 65
- Carvajal-Huerta L. (1998)  
Epidermiolytic palmoplantar keratoderma with woolly hair and dilated cardiomyopathy  
*Journal of the American Academy of Dermatology*, **39(3)**: 418-421
- Corrado D., Basso C., Schiavon M., Thiene G. (1998)  
Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes.  
*New England Journal of Medicine*, **339(6)**: 364-36
- Franke WW., Borrmann CM., Grund C., Pieperhoff S. (2006)  
The area composite of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I-Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins  
*European Journal of Cell Biology*, **85**: 69-82

Franke WW., Schumacher H., Borrmann CM., Grund C., Winter-Simanowski S., Schlechter T., Pieperhoff S., Hofmann I. (2007)

The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. III-Assembly and disintegration of intercalated disks in rat cardiomyocytes growing in culture.

*European Journal of Cell Biology*, **86**: 127-142

Goossens S., Janssens B., Bonn e S., De Rycke R., Braet F., van Hengel J., van Roy F. (2007)  
A unique and specific interaction between  $\alpha$ T-catenin and plakophilin-2 in the area composite, the mixed-type junctional structure of cardiac intercalated discs

*Journal of Cell Science*, **120**: 2126-2136

Herrenknecht K., Ozawa M., Eckerskorn C., Lottspeich F., Lenter M., Kemler R. (1991)

The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue.

*The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88(20)**: 9156-60

Huber O. (2003)

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

*Cellular and Molecular Life Sciences*, **60(9)**: 1872-90. Review

Janssens B., Mohapatra B., Vatta M., Goossens S., Vanpoucke G., Kools P., Montoye T., van Hengel J., Bowles NE., van Roy F., Towbin JA. (2003)

Assessment of CTNNA3 gene encoding human  $\alpha$ T-catenin regarding its involvement in dilated cardiomyopathy.

*Human Genetics*, **112**: 227-236

McKoy G., Protonotarios N., Crosby A., Tsatsopoulou A., Anastasakis A., Coonar A., Norman M., Baboonian C., Jeffrey S., McKenna WJ. (2000)

Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair. (Naxos Disease)

*Lancet*, **355(9221)**: 2119-2124

Merner ND., Hodgkinson KA., Haywood AF., Connors S., French VM., Drenckhahn JD., Kupprion C., Ramadanova K., Thierfelder L., McKenna W., Gallagher B., Morris-Larkin L., Bassett AS., Parfrey PS., Young TL. (2008)

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

*American Journal of Human Genetics*, **82(4)**: 809-21

Pieperhoff S., Schumacher H., Franke WW. (2008)

The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. V-The importance of plakophilin-2 demonstrated by small interference RNA-mediated knockdown in cultured rat cardiomyocytes.

*European Journal of Cell Biology*, in press

Pilichou K., Nava A., Basso C., Beffagna G., Bauc e B., Lorenzon A., Frigo G., Vettori A., Valente M., Towbin JA., Thiene G., Danieli GA., Rampazzo A. (2006)

Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy

*Circulation*, **113(9)**: 1171-1179



Rampazzo A., Nava A., Malacrida S., Beffagna G., Bauce B., Rossi V., Zimbello R., Simionati B., Basso C., Thiene G., Towbin JA., Danieli GA. (2002)  
Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.  
*American Journal of Human Genetics*, **71(5)**: 1200-1206

Syrris P., Ward D., Evans A., Asimaki A., Gandjbakhch E., Sen-Chowdhry S., McKenna WJ. (2006)  
Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2  
*American Journal of Human Genetics*, **79(5)**: 1009-1025

Thiene G., Corrado D., Basso C. (2007)  
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia.  
*Orphanet Journal of Rare Diseases*, **2**: 45 Review

Thiene G., Nava A., Corrado D., Rossi L., Pennelli N. (1988)  
Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people.  
*New England Journal of Medicine*, **318(3)**: 1009-1025

Tiso N., Stephan DA., Nava A., Bagattin A., Devaney JM., Stanchi F., Larderet G., Brahmhatt B., Brown K., Bauce B., Muriamo M., Basso C., Thiene G., Danieli GA., Rampazzo A. (2001)  
Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2)  
*Human Molecular Genetics*, **10(3)**: 189-194

Van Tintelen JP., Hofstra RM., Wiesfeld AC., Van der Berg MP., Hauer RN., Jongbloed JD. (2007)  
Molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: emerging horizon?  
*Current Opinion in Cardiology*, **22(3)**: 185-192 Review