



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN GENETICA MEDICA
XXV CICLO**

Triennio Accademico 2009-2012

***Displasie ectodermiche causate da
difetti genetici delle nectine***

Coordinatore: Prof.ssa Paola Grammatico

Dottorando: Dott. Emanuele Agolini

Relatore: Dott. Francesco Brancati

INDICE

INTRODUZIONE	4
1. L'adesione cellulare	4
Molecole di adesione	
Le giunzioni cellulari	
Struttura ed organizzazione funzionale delle caderine	
Struttura ed organizzazione funzionale delle nectine	
Struttura delle giunzioni aderenti	
Cooperazione nectina-integrina nel signaling intracellulare e nella formazione delle AJs	
2. Ruolo delle CAMs nello sviluppo	20
3. Derivati ectodermici: sviluppo e morfogenesi	23
Sviluppo dei derivati ectodermici	
Morfogenesi del follicolo pilifero	
Il ciclo del follicolo pilifero	
Ruolo dell'adesione nella morfogenesi del pelo	
4. Difetti dello sviluppo dei derivati ectodermici	29
Le displasie ectodermiche: segni clinici e classificazione	
Basi genetico-molecolari delle displasie ectodermiche	
Displasia ectodermica associata a sindattilia	
OBIETTIVI DELLO STUDIO	34
MATERIALI E METODI	35
Identificazione del gene malattia dell'EDSS	
Pazienti	
Estrazione del DNA	
Genome-wide SNP-array	
Analisi di linkage	
Analisi mutazionale del gene <i>PVRL4</i>	
Studi funzionali	
Estrazione dell' RNA da cheratinociti	

Reverse Transcriptase-PCR

Real Time-PCR

Ampliamento dello spettro mutazionale

Pazienti

Sequenziamento del gene *PVRL1*

RISULTATI

49

Identificazione del gene malattia dell'EDSS

Analisi Genome-Wide SNP array

Analisi di linkage

Analisi del gene *PVRL4*

Caratterizzazione del ruolo patogenetico della mutazione c.851G>A

Studio dell'interazione nectina-4/nectina-1

Studi funzionali ed immunoistochimici

Analisi del trascritto del gene *PVRL4* in condizioni sane e patologiche

Analisi della nectina-4 nel follicolo del capello e nell'epidermide interfollicolare

Analisi delle proteine delle giunzioni aderenti

Espressione del gene *PVRL4* nell'embrione murino

Ampliamento dello spettro mutazionale delle nectine-1 e -4 nelle displasie ectodermiche

Identificazione di nuove mutazioni nei geni *PVLR1* e *PVRL4* in una casistica di pazienti

DISCUSSIONE

64

BIBLIOGRAFIA

68

INTRODUZIONE

1. L' ADESIONE CELLULARE

Gli organismi pluricellulari sono particolarmente dipendenti dai meccanismi di adesione che coinvolgono le cellule e la matrice extracellulare (ECM) in quanto, sia durante lo sviluppo embrionale che nelle fasi adulte, programmi genetici finemente regolati specificano le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, importanti nella determinazione dell'architettura di ciascun tessuto ed organo.

Le cellule utilizzano una varietà relativamente ridotta di meccanismi di adesione per interagire tra di loro e con le molecole della matrice. Questo concetto si è reso evidente quando, confrontando le sequenze aminoacidiche, è emerso che la maggior parte delle proteine di adesione rientra in quattro famiglie principali. All'interno di queste diverse famiglie, alcuni geni progenitori sono andati incontro a duplicazione e successivamente separati durante l'evoluzione, dando origine a proteine di adesione con le numerose specificità diverse che sono necessarie per lo sviluppo embrionale, la conservazione della struttura degli organi e dei tessuti e la migrazione cellulare (1).

1.1 Molecole di adesione

Le cellule definiscono la loro capacità di creare interazioni di adesione attraverso l'espressione selettiva di recettori di membrana o molecole di adesione cellulare (CAMs), aventi una limitata attività di legame. In genere, l'espressione appropriata di recettori è parte di un programma genetico alla base del processo di

differenziamento cellulare. In alcuni casi, stimoli extracellulari controllano l'espressione dei recettori di adesione. (1)

Tutte le CAMs sono proteine integrali di membrana con una porzione citoplasmatica, spesso ancorata alle proteine del citoscheletro, un dominio transmembrana ed una componente extracellulare. I domini extracellulari legano altre cellule o le proteine della matrice, interagendo con altre molecole di adesione dello stesso tipo (interazioni omofiliche) o di tipo diverso (interazioni eterofiliche). Numerose CAMs sono state ad oggi identificate, ma dal punto di vista classificativo possono essere distinte quattro famiglie principali:

- Le **caderine** danno luogo ad interazioni omofiliche con altre caderine in presenza di ioni Ca^{2+} (la rimozione del calcio extracellulare provoca la perdita del legame). Le caderine hanno un ruolo critico nei fenomeni di migrazione cellulare e di sviluppo tessutale durante l'embriogenesi. Prendono parte alla formazione dei desmosomi e delle giunzioni aderenti.
- Le **molecole di adesione di tipo immunoglobulinico** costituiscono un ampio gruppo di proteine che interagiscono attraverso legami omofilici ed eterofilici. Sono variabilmente espresse in diversi tessuti embrionali e dell'adulto mediando l'adesione e la motilità cellulare attraverso il contatto con il citoscheletro.
- Le **integrine** sono glicoproteine eterodimeriche ed hanno notevole importanza nelle interazioni tra le cellule ed alcune componenti della matrice extracellulare, come la fibronectina, permettendo la comunicazione tra citoscheletro e matrice.

- Le **selectine** sono espresse principalmente nei leucociti e nelle cellule endoteliali. A differenza delle altre molecole di adesione interagiscono con carboidrati presenti sulla superficie cellulare mediante legami deboli.

1.1 Le giunzioni cellulari

Il contatto cellula-cellula si realizza attraverso strutture specializzate e ben organizzate definite giunzioni, la cui formazione dipende strettamente dall'intervento diretto delle CAMs (2). A tal proposito si possono distinguere:

- Le **giunzioni occludenti** o strette, particolarmente comuni nei tessuti epiteliali dove formano una *zonula occludens*, una stretta banda di molecole proteiche che circonda una cellula, formando così una barriera impermeabile che impedisce il passaggio delle sostanze da un lato all'altro dell'epitelio per diffusione tra una cellula e l'altra.
- Le **giunzioni di ancoraggio** che connettono, attraverso le membrane, le trame dei filamenti intermedi o le trame di actina di due cellule adiacenti. In base all'estensione e al tipo di trama coinvolta possiamo distinguere i desmosomi e le giunzioni aderenti. Nel primo caso le membrane sono separate da uno spazio intercellulare largo circa 30 nm colmato dalle strutture molecolari che formano il sistema di connessione tra le due cellule. Sul versante citoplasmatico le due membrane che partecipano alla formazione del desmosoma confinano con una placca densa di citoplasma che ha la stessa estensione della giunzione. Le placche citoplasmatiche sono raggiunte da numerosi filamenti di cheratina che, all'interno delle cellule costruiscono un plesso tridimensionale. Dalle placche citoplasmatiche dipartono filamenti proteici che passano attraverso la

membrana e si proiettano nello spazio intercellulare ove si connettono con analoghi filamenti del lato opposto. Tali filamenti sono costituiti da speciali proteine trans-membrana chiamate desmogleine, appartenenti alla famiglia delle caderine.

Le giunzioni aderenti sono giunzioni di ancoraggio che collegano le reti filamentose di actina pertinenti al citoscheletro di due cellule adiacenti. Sul versante citoplasmatico le membrane delle cellule connesse da tali giunzioni confinano con due aggregati di materiale citoplasmatico, simili alle placche dense dei desmosomi, al livello dei quali le fibrille di actina delle opposte cellule sono connesse a speciali proteine trans-membrana che, a loro volta si connettono tra di loro nello spazio intercellulare. Le proteine integrali che partecipano alla formazione delle giunzioni aderenti sono le caderine. Più recentemente è stato scoperto che un altro gruppo di glicoproteine, le nectine, svolge un ruolo chiave nell'organizzazione di queste giunzioni.

- Le **giunzioni comunicanti** caratterizzate da uno spazio intercellulare di dimensioni molto limitate e costituite da proteine integrali di membrana della famiglia delle connesine, le quali si uniscono a gruppi di 6 intorno ad un poro centrale formando un complesso detto connesone. I connessioni di cellule adiacenti si uniscono tra loro formando delle placche che consentono il passaggio e lo scambio di segnali elettrici e di sostanze attraverso i canali centrali che vengono a trovarsi in comunicazione.

1.2 Struttura ed organizzazione funzionale delle caderine

Le caderine fanno parte di un'ampia famiglia di molecole di adesione Ca^{2+} dipendenti espresse sia nei vertebrati che negli invertebrati. Esse svolgono un ruolo fondamentale nel riconoscimento cellulare nel corso dell'embriogenesi, durante la quale, determinati pattern di espressione caratterizzano specificatamente differenti tipi di cellule e tessuti. Le caderine sono proteine di membrana con una regione extracellulare N-terminale, una porzione transmembrana a singolo passo ed una regione intracellulare C-terminale. Tutte le caderine presentano nella regione extracellulare particolari domini, caratterizzati da una sequenza ripetuta di circa 110 aminoacidi, connessi stabilmente attraverso il legame specifico con tre ioni Ca^{2+} localizzati in corrispondenza delle porzioni comprese tra due domini adiacenti. La presenza degli ioni Ca^{2+} è necessaria per la funzione adesiva delle caderine stesse il cui nome deriva dalla contrazione dell'espressione inglese "*calcium-dependent adherent protein*". L'omologia ed il numero di questi domini, definiti EC (Extracellular Cadherin), determina la suddivisione della superfamiglia in diverse sottofamiglie (fig.1.1): le caderine classiche, connesse con il citoscheletro actinico; le caderine desmosomiali (desmocollina e desmogleina) che interagiscono con i filamenti intermedi; le protocaderine, che sono espresse principalmente nel sistema nervoso. Inoltre sono state identificate molte caderine "atipiche", contenenti uno o più domini ripetuti. Le caderine classiche presentano cinque domini EC e vengono distinte in tipo I e tipo II. Quelle di tipo I mediano una forte adesione cellula-cellula e contengono un motivo tripeptidico conservato His-Ala-Val nel dominio EC terminale (EC1). Di questo gruppo fanno parte la caderina epiteliale (E) e la neuronale (N). Al

contrario, le caderine di tipo II, come quella vasculo-endoteliale (VE), mancano di questo tripeptide. (3) Il dominio EC1 è importante per l'adesione omofilica e contiene residui conservati di triptofano che sono responsabili del *trans*-legame tra le caderine, nonostante interazioni eterofiliche tra le caderine classiche siano state descritte in letteratura (4, 5, 6). Gli altri domini EC interagiscono con altre molecole come nel caso del dominio EC4 dell'N-caderina che lega il recettore del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR) attivandone la via di segnalazione. (7).

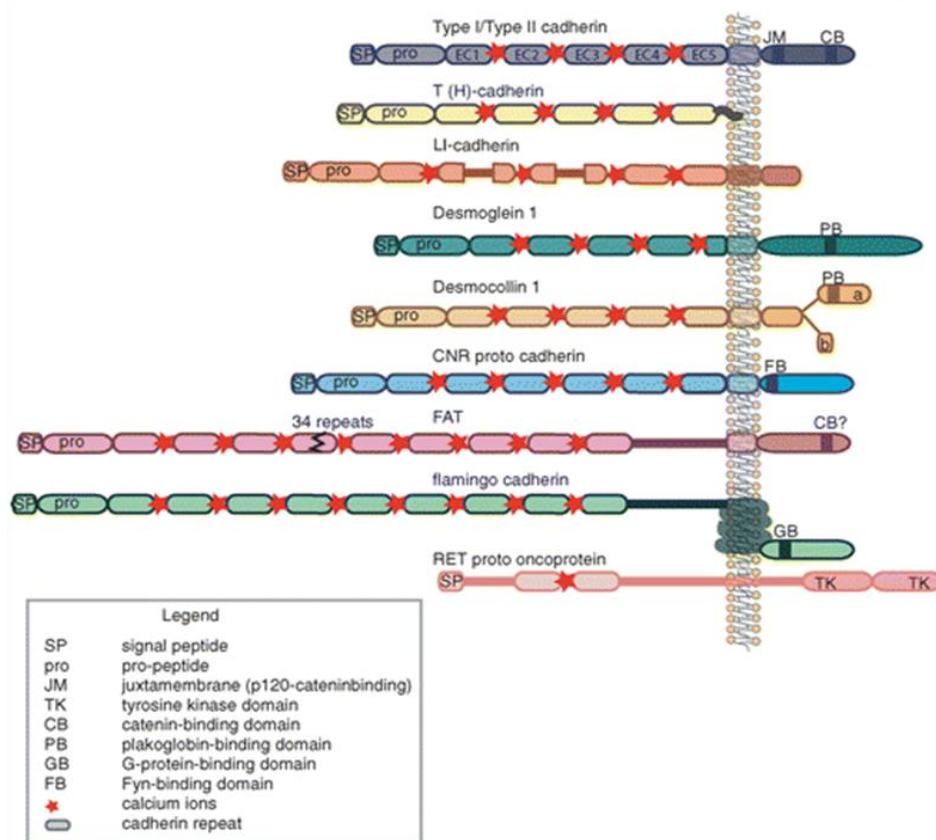


Fig.1.1 Superfamiglia delle caderine

Il dominio citoplasmatico è altamente conservato tra i differenti sottotipi e lega direttamente diverse proteine citoplasmatiche tra cui la β -catenina e p120

modulando l'interazione con il citoscheletro actinico. p120 può regolare la connessione caderina-actina legando e inibendo la proteina RhoA (8) ed indirettamente attivando Rac1 e Cdc42 attraverso Vav2 (9), mediando in questo modo la stabilità delle caderine sulla superficie cellulare (10).

1.3 Struttura ed organizzazione funzionale delle nectine

Le nectine sono molecole di adesione di tipo immunoglobulinico Ca^{2+} indipendenti e costituiscono una famiglia che comprende ad oggi 4 membri indicati con nectina-1, nectina-2, nectina-3 e nectina-4. Tutte le nectine ad presentano due o tre varianti di splicing. In particolare sono state identificate le isoforme nectina1 α , -1 β , -1 γ , -2 α , -2 δ , -3 α , -3 β e -3 γ .

Nectina-1 α e -2 α sono state inizialmente isolate come recettori del poliovirus e successivamente degli α -herpes virus in quanto mediano l'ingresso e la diffusione delle particelle virali. Solo recentemente sono state classificate come CAMs. Strutturalmente tutte le nectine, ad eccezione della forma secreta nectina-1 γ , sono caratterizzate da una regione extracellulare con tre domini immunoglobulinici, una porzione trans-membrana ed un coda citoplasmatica.

L'attività adesiva si esplica a livello della regione extracellulare, mediante la quale le nectine interagiscono in *trans* l'una con l'altra creando legami omofilici ed eterofilici. A differenza di quanto osservato per le caderine la *trans* interazione tra le nectine non richiede ioni Ca^{2+} . Due molecole di nectina adiacenti espresse sulla superficie della stessa cellula formano *cis*-dimeri, che interagiscono in *trans* con altri *cis*-dimeri su cellule opposte (11). Il primo dominio immunoglobulinico della nectina-1 è necessario per la formazione dei *trans*-dimeri, ma non per i *cis*-

dimeri, la cui formazione è resa possibile dal secondo dominio immunoglobulinico (12, 13), mentre la funzione del terzo dominio immunoglobulinico è attualmente ignota. L'analisi di mutanti tronchi delle nectine ha permesso di dimostrare che la formazione di un *cis*-dimero è essenziale per la formazione di un *trans*-dimero. Ogni membro della famiglia delle nectine forma un omo-*cis*-dimero ma non un etero-*cis*-dimero (14), nonostante le isoforme nectina-2 α e nectina-2 δ possano formare etero-*cis*-dimeri (15). Ogni membro è in grado inoltre di dare origine a etero-*trans*-dimeri. In particolare nectina-3 può interagire con nectina-1 o nectina-2, mentre nectina-4 può creare dimeri con nectina-1 (fig.1.2).

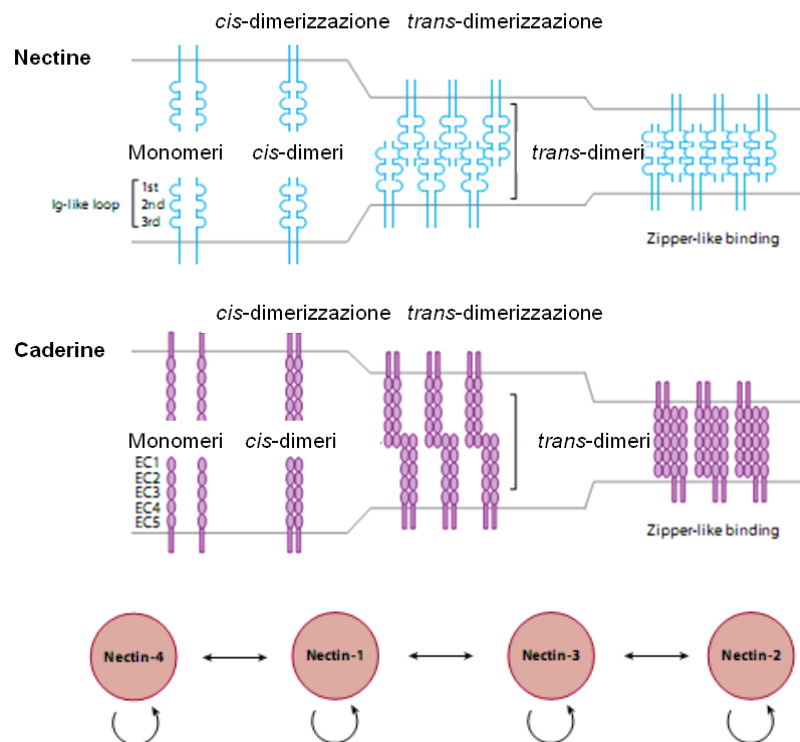


Fig 1.2 a) Modelli di *trans*-interazione delle nectine e delle caderine. La formazione dei *cis*-dimeri è necessaria per la costituzione dei *trans*-dimeri. b) Interazioni omofiliche ed eterofiliche tra le nectine

La porzione citoplasmatica di tutte le nectine, ad eccezione delle nectine-1 β , -3 γ e -4, presenta un motivo conservato di quattro residui aminoacidici (Glu/Ala-X-Tyr-Val, con X che può essere un qualsiasi aminoacido) all'estremità C-terminale. Tale sequenza lega il dominio PDZ della proteina adattatrice afadina, identificata inizialmente come una proteina legante l'F-actina e localizzata in corrispondenza delle giunzioni aderenti. Il legame con l'afadina contribuisce all'associazione delle nectine con il citoscheletro actinico ed all'innesco di determinate vie di segnalazione. Sebbene la nectina-4 manchi di questo motivo conservato, essa è in grado di legare il dominio PDZ dell'afadina alla sua estremità C-terminale (fig.1.3).

L'afadina presenta domini multipli ed è in grado di legare numerose proteine: il dominio RA interagisce con Rap1, una piccola G protein (16); il dominio DIL lega la proteina ADIP (17); il dominio PDZ è in grado di legare le nectine, una sottoclasse del recettore Eph (18), SPA-1 (19), Bcr (20) e c-Src (21); il primo ed il secondo dominio PR interagiscono con ZO-1 mentre il terzo dominio PR lega la ponsina (22). La regione C-terminale, contenente il dominio di legame per l'F-actina, interagisce con LMO7 (23). Inoltre esso lega direttamente l'enzima deubiquitinante Fam (24), la profilina (25) e l' α -catenina (26). Afadina è inoltre fosforilata da c-Src sulla tirosina 1237 e lega la regione SH2 della protein tirosin fosfatasi SHP-2 attraverso questo residuo fosforilato (27).

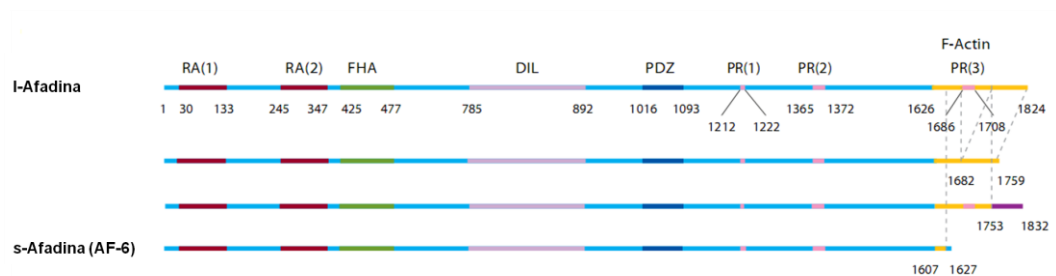
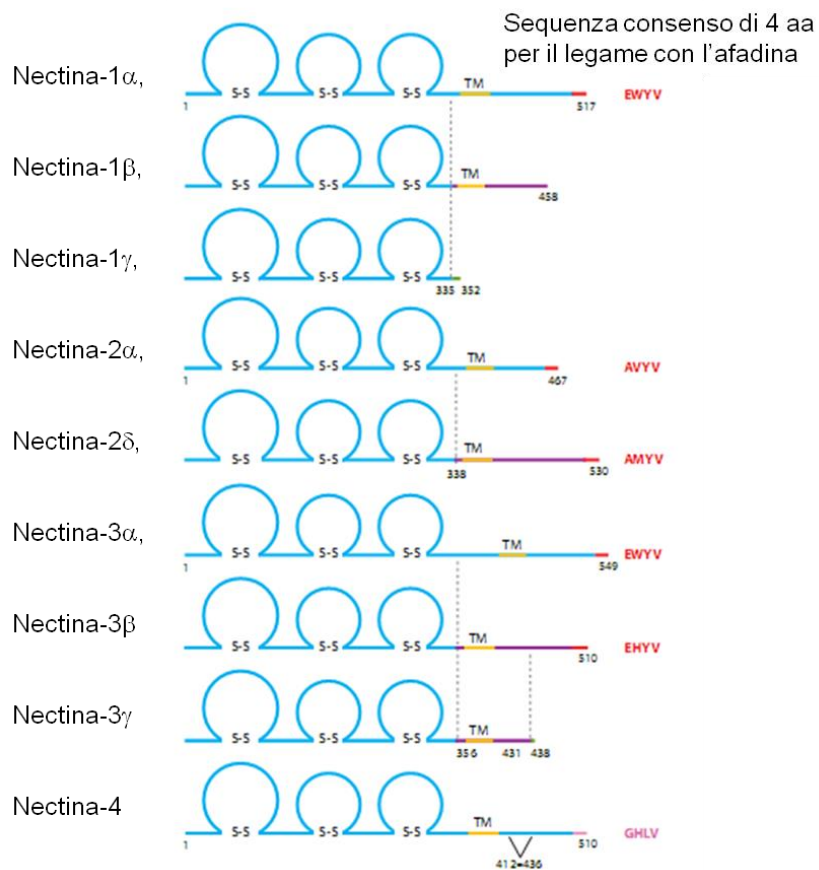


Fig. 1.3 Struttura molecolare delle nectine e dell'afadina

1.4 Struttura delle giunzioni aderenti

La formazione delle giunzioni aderenti avviene tra cellule fisicamente opposte, quali le cellule epiteliali, le cellule endoteliali ed i fibroblasti. Le molecole di

adesione che più frequentemente possono essere identificate al livello di tali giunzioni sono l'E-caderina, la VE-caderina e l'N-caderina, presenti rispettivamente nell'epitelio, nell'endotelio e nei fibroblasti (28). Queste molecole sono in grado di interagire con molte proteine attraverso la loro porzione citoplasmatica (fig.1.4). In particolare legano la β -catenina attraverso l'estremità C-terminale e la p120 mediante la regione posta in prossimità della membrana (8,28). La β -catenina interagisce direttamente con l' α -catenina, che lega a sua volta l' α -actinina e la vinculina. L' α -catenina, l' α -actinina e la vinculina sono proteine leganti l'F-actina ed attraverso di esse le molecole di caderina prendono rapporto con il citoscheletro. Tale associazione è fondamentale per la clusterizzazione delle caderine nei siti di adesione cellulare e per il potenziamento della forza adesiva. Queste molecole, ad eccezione dell' α -actinina e della vinculina sono distribuite lungo la membrana ed in corrispondenza delle AJs epiteliali. A differenza di quanto osservato per i complessi caderina-catenina, le nectine e l'afadina sono strettamente localizzate al livello delle AJs.

Studi di biologia cellulare effettuati su cellule epiteliali e fibroblasti e studi su modelli murini knock-out hanno rivelato che le nectine e l'afadina promuovono la formazione delle giunzioni aderenti ancor prima dell'intervento dell'E- o N-caderina. Soltanto in una fase successiva alla strutturazione dei complessi nectina-afadina in corrispondenza dei siti di adesione vengono reclutate le caderine. Esperimenti condotti su cellule MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) hanno permesso di dimostrare che inibitori delle nectine bloccano la formazione delle giunzioni aderenti su base caderinica. Tali inibitori sono in grado di neutralizzare

ed impedire l'omo- ed etero-*trans* dimerizzazione di nectina-1 con nectina-1 e nectina-1 con nectina-3.

L'associazione tra le molecole di caderina e di nectina è fisicamente mediata dall'afadina, dall' α -catenina e dalle altre proteine di legame (26, 28). Afadina ed α -catenina interagiscono direttamente ed indirettamente attraverso la ponsina, le proteine ADIP e LMO7 e la vinculina. La ponsina lega la vinculina che a sua volta è in grado di legare l' α -catenina (29, 22). Sia ADIP che LMO7 prendono contatto con l' α -actinina che interagisce direttamente con l' α -catenina (17). Tutte queste molecole colocalizzano con l'afadina e l' α -catenina in corrispondenza delle AJs mentre la ponsina, la vinculina e l' α -actinina si trovano anche a livello delle adesioni focali (22).

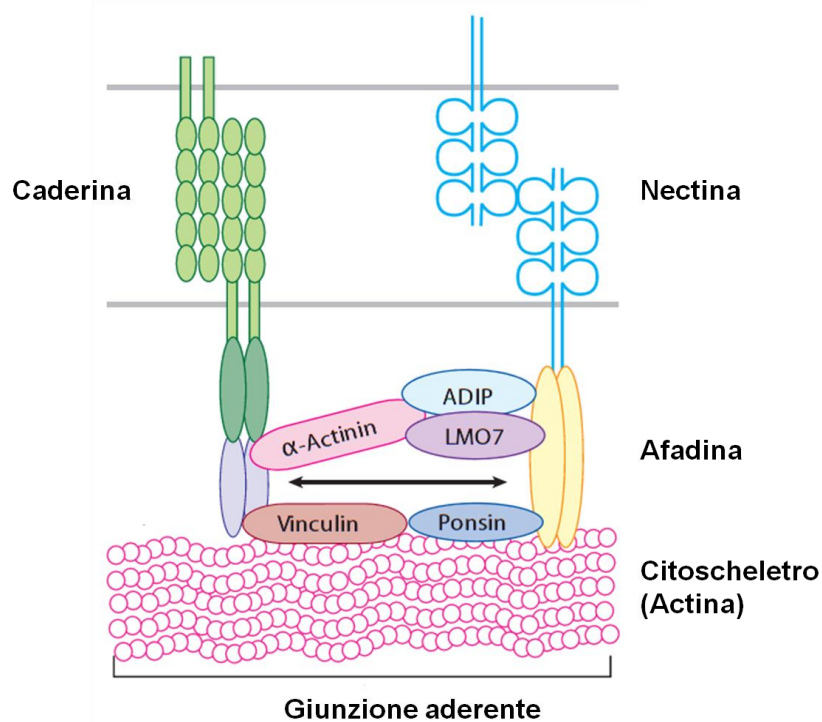


Fig. 1.4 Struttura e composizione delle giunzioni aderenti

1.5 Cooperazione nectina-integrina nel *signaling* intracellulare e nella formazione delle AJs

L'integrina regola positivamente o negativamente la formazione e la stabilità delle giunzioni cellulari attraverso protein-tirosin-chinasi ad essa associate, quali FAK e s-Src (29).

Nectina-1 e nectina-3, ma non nectina-2 e nectina-4, interagiscono fisicamente con l'integrina $\alpha_v\beta_3$ nei siti di adesione cellulare attraverso le rispettive porzioni extracellulari (30). L'integrina $\alpha_v\beta_3$ ha almeno due forme: a bassa affinità ed ad alta affinità.

Le nectine sono in grado di associarsi ad entrambe queste forme nel corso della formazione delle AJs ed in particolare durante gli step iniziali interagiscono con la forma ad alta affinità dell'integrina $\alpha_v\beta_3$ mentre nelle fasi più avanzate il legame avviene prevalentemente con la forma a bassa affinità.

La *trans*-interazione di due molecole di nectina, in associazione al legame con l'integrina $\alpha_v\beta_3$ ad alta affinità, induce inizialmente l'attivazione di c-Src (31). Ciò richiede l'attivazione della protein-chinasi C (PKC) e di FAK, indotta dal legame dell'integrina $\alpha_v\beta_3$ con le proteine della ECM (32, 30). C-Src a sua volta induce l'attivazione di Rap1, una piccola G-protein, attraverso la proteina adattatrice Crk ed il fattore di scambio GDP/GTP per Rap1 (C3G) e contemporaneamente fosforila il fattore di scambio GDP/GTP per Cdc42 (FRG) e per Rac (Vav2) (33). Rap1 è in grado di attivare completamente FRG, che a sua volta attiva Cdc42 (fig.1.5).

Quest'ultima proteina potenzia l'attività di Vav2 che a sua volta induce l'attivazione di Rac.

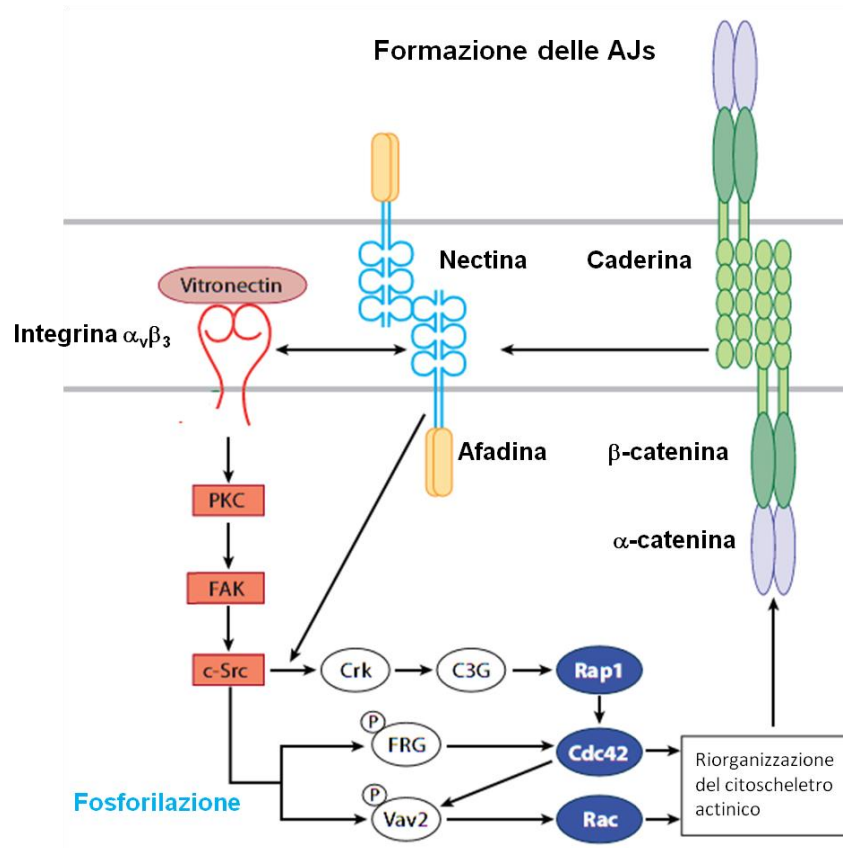


Fig.1.5 Vie di segnalazione attivate dalla costituzione delle giunzioni aderenti caderino/nectino-dipendenti.

L'innescò di Cdc42 e Rac risulta fondamentale nella formazione rispettivamente di filopodi e lamellipodi, ossia di protrusioni tipiche di cellule in movimento, che contribuiscono alla formazione delle giunzioni cellulari; i filopodi incrementano i siti di contatto tra cellule fisicamente opposte mentre i lamellipodi fungono da cerniera a livello degli spazi localizzati tra questi siti (34) (fig.1.6). Cdc42 e Rac

inducono inoltre la riorganizzazione del citoscheletro e reclutano il complesso caderina-catenina nei siti di adesione cellulare attraverso una serie di proteine leganti l'F-actina, come IQGAP1 e l'annessina II (21, 35).

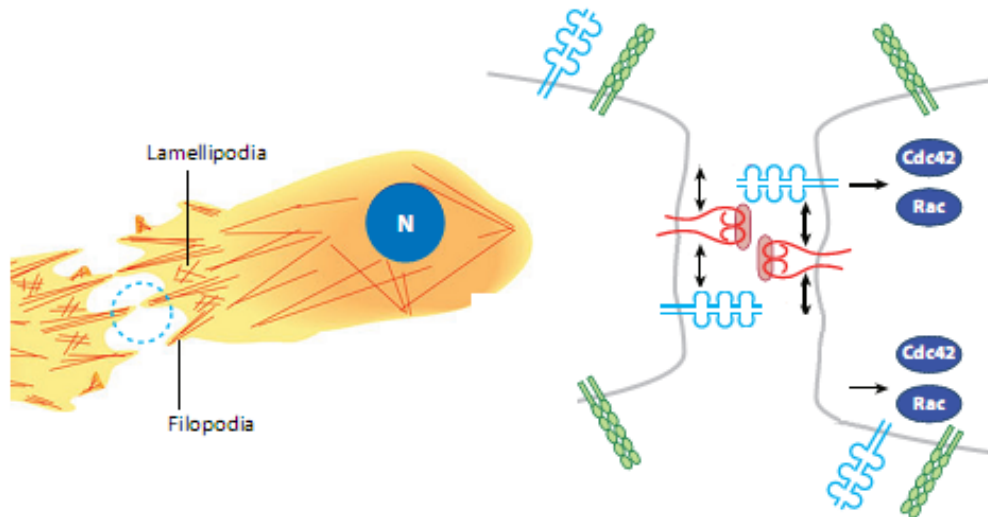


Fig.1.6 Formazione dei lamellipodia e dei filopodia dipendenti dall'attivazione di Rac e Cdc42.

Il complesso E-caderina-catenina reclutato nei siti di adesione presenta ridotta attività adesiva come dimostrato in cellule MDCK in coltura (36) in quanto l'E-caderina localizzata sulla superficie cellulare tende ad essere internalizzata per endocitosi (37). Tuttavia, quando l'afadina interagisce con Rap1 in seguito alla formazione dei *trans*-dimeri delle nectine, l'endocitosi dell' E-caderina viene inibita, permettendo la *trans*-interazione delle molecole di caderina e quindi la clusterizzazione in corrispondenza dei siti di adesione. Tale fenomeno induce l'attivazione di Rac e la conseguente formazione dei lamellipodi. L'inibizione dell'endocitosi dell'E-caderina è mediata da IQGAP1 e dall'actina del

citoscheletro (37). Prese insieme queste scoperte suggeriscono che almeno quattro step sequenziali della riorganizzazione dinamica del citoscheletro actinico sono coinvolti nella formazione delle AJs: (a) la diretta associazione delle proteine leganti l'F-actina con le nectine, (b) l'attivazione di Cdc42 e Rac mediata dalle nectine, (c) la diretta o indiretta associazione delle proteine leganti l'F-actina con le caderine (d) l'attivazione di Rac indotta dalla caderine. La *trans*-interazione delle regioni extracellulari delle molecole di nectina e caderina sono essenziali per l'adesione ma non sufficienti per la formazione delle AJs, in quanto l'associazione di queste CAMs con il citoscheletro actinico è necessaria al potenziamento dell'attività adesiva (fig.1.7).

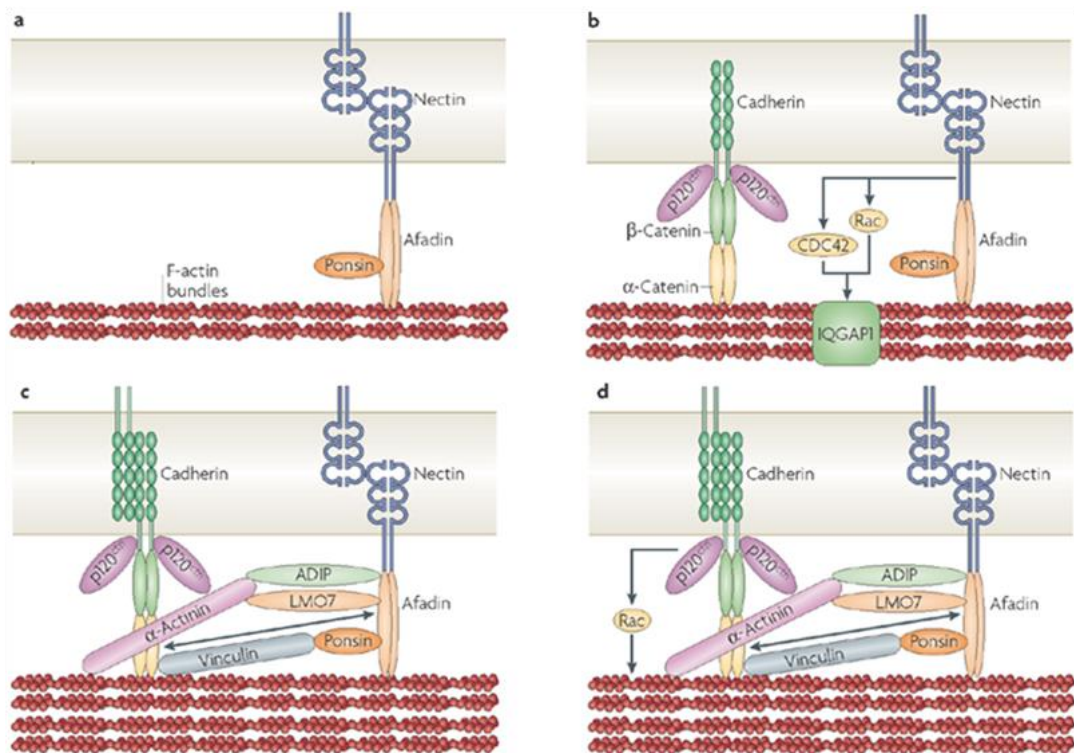


Fig.1.7 Fasi sequenziali della formazione delle giunzioni aderenti.

2. RUOLO DELLE CAMs NELLO SVILUPPO

L'adesione cellulare costituisce un fenomeno particolarmente importante nello sviluppo e nella morfogenesi dell'embrione. Pattern di espressione finemente regolati coinvolgono le CAMs a differenti stadi dell'embriogenesi a partire dalle fasi più precoci come quelle che caratterizzano l'impianto dell'embrione e la progressione a morula, passando attraverso lo sviluppo dei foglietti embrionali, fino ad arrivare ai veri e propri processi di istogenesi ed organogenesi. La E-caderina ad esempio è espressa molto precocemente durante lo sviluppo embrionale, allo stadio di morula, dove è responsabile della reazione di compattazione, mediante la quale i blastomeri dello strato esterno formano tra loro delle giunzioni occludenti, che permettono di "sigillare" la struttura. I blastomeri più interni esibiscono al contrario giunzioni comunicanti attraverso cui è possibile il passaggio di molecole necessarie alla divisione cellulare (38).

L'importanza delle molecole di adesione nel normale sviluppo è dimostrata dalla letalità embrionale precoce che si osserva in modelli murini portatori di mutazioni nulle in geni differenti dell'adesione cellulare. Ad esempio, embrioni di topo che mancano dell'E-caderina e dell' α -catenina muoiono allo stadio di blastocisti a causa dell'impossibilità di dare origine al trofoectoderma (39). Anche gli stadi più avanzati dello sviluppo richiedono le caderine come dimostrato dall'impiego di anticorpi che inibiscono la formazione delle interazioni omofile. Ad esempio, anticorpi anti N-caderina iniettati in un embrione di pollo provocano difetti nella definizione della simmetria corporea. Il blocco condizionale della β -catenina nell'epidermide induce difetti nella determinazione del destino cellulare mentre l'eliminazione condizionale di α -catenina nell'epitelio cutaneo provoca la perdita

della morfogenesi del follicolo pilifero, la parziale scomparsa della polarità cellulare, una marcata iperproliferazione e l'invaginazione epiteliale (40)

L'espressione delle caderine è finemente regolata nel corso dello sviluppo. I passaggi dall'espressione di una caderina a quella di un'altra si correlano con una varietà di eventi morfogenetici che coinvolgono l'aggregazione o la disaggregazione cellulare. Ad esempio le cellule della cresta neurale presuntiva esprimono la E-caderina quando fanno parte dell'ectoderma ma perdono ogni traccia di caderina quando si trasformano nella forma migratoria. Tuttavia esse riacquistano l'espressione delle caderine quando si aggregano per formare i gangli periferici. Di contro i somiti, le cui cellule sono connesse strettamente tra di loro a formare delle sfere epiteliali, esprimono ad alti livelli la N-caderina, ma quando parte di essi sono convertiti in cellule migratorie e differenziano in sclerotomi, non esprimono più tale molecola. In questi fenomeni vi è una chiara correlazione tra espressione di caderina e comportamento adesivo delle cellule. La necessità di fluttuazioni programmate nei livelli delle proteine di adesione durante la morfogenesi è dimostrata dagli effetti deleteri che un'espressione forzata provoca sullo sviluppo. L'iperespressione di E-caderina nell'embrione precoce di *Xenopus laevis* impedisce la traslocazione di β -catenina nel nucleo, inibendo l'induzione del mesoderma dorsale e la formazione dell'asse. Ulteriori studi sull'embriogenesi dello *Xenopus* hanno dimostrato che l'inibizione della down-regolazione di C-caderina, attraverso anticorpi attivanti, in espianti animali impedisce l'allungamento tessutale, apparentemente bloccando l'estensione convergente delle cellule (40).

Un ulteriore importante funzione delle caderine si osserva nei processi morfogenetici che coinvolgono la segregazione dei foglietti cellulari. Nel corso dello sviluppo del tubo neurale ad esempio, l'ectoderma esprime inizialmente l'E-caderina. Nella porzione che si differenzia in tubo neurale gradualmente l'espressione dell'E-caderina viene down-regolata mentre quella dell'N-caderina viene ad essere up-regolata. Inoltre, le cellule della cresta neurale che si separano dall'ectoderma inibiscono l'espressione di qualsiasi caderina. In questo modo tre differenti gruppi di cellule che originano da un solo strato cellulare mostrano pattern distinti di espressione di caderina nel momento in cui si separano l'uno dall'altro. Simili cambiamenti nel pattern di espressione associati con la segregazione di un foglietto cellulare avvengono in altri eventi morfogenetici, come la gastrulazione, la formazione della vescicola lenticolare e la differenziazione epidermica.

Anche le nectine, al pari delle caderine svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo. Durante gli stadi precoci dell'embriogenesi del topo, nectina-1, -2, -3 e l'afadina sono equamente distribuite a livello delle AJs dell'epitelio colonnare omotipico, così come nel neuroepitelio e nei somiti epiteliali. Tali molecole sono espresse ad alti livelli durante il rimodellamento epiteliale nell'embrione murino (41). Studi in vivo hanno chiaramente dimostrato l'importanza delle nectine nel mantenimento di vari meccanismi di adesione e di molteplici funzioni cellulari, incluso il differenziamento. Tutte le linee di topi nulli per le nectine mostrano fenotipi alterati in siti specifici, come le giunzioni cellule del Sertoli-spermatidi e le giunzioni apice-apice tra gli strati cellulari pigmentati e non pigmentati dell'epitelio ciliare. Tuttavia questi topi sono vitali e manifestano fenotipi

moderati. Ciò può dipendere dalla ridondanza funzionale delle nectine. Al contrario topi knock-out per *afadina* mostrano letalità embrionale proprio a causa della mancanza di tale ridondanza (42). L'assenza di *afadina* provoca la disorganizzazione dell'ectoderma, difetti di migrazione del mesoderma e la perdita dei somiti e di altre strutture di origine ectodermica e mesodermica durante e dopo la gastrulazione. Inoltre negli embrioni *afadina*^{-/-}, a livello dell'ectoderma, si osserva un'alterazione delle giunzioni cellula-cellula e la perdita della polarità cellulare (42). Questi difetti derivano principalmente dalla mancanza di tutte quelle funzioni che l'*afadina* mostra di avere nella formazione delle giunzioni, nella migrazione cellulare e nei processi differenziativi.

3. DERIVATI ECTODERMICI: SVILUPPO E MORFOGENESI

3.1 Sviluppo dei derivati ectodermici

I capelli, i denti, le unghie e una serie di ghiandole come quelle mammarie, salivari, lacrimali e sudoripare sono strutture che derivano dall'ectoderma embrionale. Questi organi differiscono l'uno dall'altro per dimensioni e forma. Nonostante l'organogenesi ectodermica abbia inizio nelle fasi dello sviluppo embrionale, la morfogenesi di tali strutture mostra continuità anche nelle fasi postnatali. La comparsa dei denti è un fenomeno che si verifica dopo la nascita così come la seconda dentizione ha luogo nelle prime due decadi di vita. Tali organi di derivazione ectodermica presentano inoltre un'abilità, seppur limitata, di rigenerazione. Le ghiandole mammarie si sviluppano e differenziano durante la pubertà e nel corso di ogni gravidanza. Una crescita ciclica la si può inoltre

osservare a livello del capello e del pelo, dove un nuovo follicolo si sviluppa da un follicolo precedente. Alcuni organi di derivazione ectodermica come le unghie crescono continuamente durante la vita adulta. Nonostante la diversità di forma e funzione, i derivati ectodermici condividono molte caratteristiche comuni nello sviluppo. Essi originano da due strati adiacenti dell'epitelio (ectoderma) e del mesenchima (mesoderma). Il primo segno visibile di sviluppo è rappresentato da un ispessimento dello strato epiteliale a formare il cosiddetto placode. Le cellule mesenchimali sottostanti condensano a formare una papilla che gemma all'interno o all'esterno del mesenchima. Le fasi morfogenetiche successive prevedono la crescita continua degli elementi epiteliali e mesenchimali associati al ripiegamento dell'epitelio, e ciò risulterà nella forma e nella dimensione finali dell'organo. Lo sviluppo dei derivati ectodermici è stato particolarmente studiato attraverso l'impiego di sistemi modello. Studi di ricombinazione hanno evidenziato che l'organogenesi dipende strettamente da interazioni reciproche e sequenziali tra l'epitelio ed il mesenchima. Tali meccanismi di comunicazione richiedono l'intervento di specifiche molecole di segnalazione che appartengono alla famiglia del fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), di hedgehog (Hh), del fattore di crescita trasformante β (TGF β), di Wnt e del fattore di necrosi tumorale (TNF). Questi fattori sono coinvolti ripetutamente nel corso dei differenti stadi dell'organogenesi ectodermica (40).

3.2 Morfogenesi del follicolo pilifero

Il follicolo pilifero (Hair follicle - HF) costituisce quella struttura della pelle a livello della quale viene ad essere prodotto il pelo. I follicoli variano per dimensione e forma a seconda della loro localizzazione, ma indistintamente

presentano la stessa struttura di base e lo stesso processo di sviluppo. La formazione degli HF ha inizio durante l'embriogenesi e procede attraverso nove distinte fasi morfologiche (43). Il primo segnale determinante per lo sviluppo del follicolo ha origine nel derma e porta all'attivazione dei cheratinociti dello strato basale (fase 0), che modificano la loro forma, si organizzano in una struttura morfologicamente distinta chiamata placode ed inducono i fibroblasti sottostanti a condensarsi (stage 1). L'interscambio di segnali tra il mesenchima condensato ed il placode epiteliale guida la proliferazione in entrambe le strutture, determinando la crescita dell' *hair germ* e l'aggregazione a cappuccio dei fibroblasti nella sua estremità prossimale (fase 2). Le cellule epiteliali proliferanti formano il *peg* pilifero, una struttura colonnare allungata costituita da strati multipli di cheratinociti indifferenziati disposti in modo concentrico attorno all'asse follicolare mentre il cappuccio di fibroblasti si trasforma nella cosiddetta papilla dermica (Dermal Papilla - DP) (fase 3). La porzione terminale del *peg* genera un'invaginazione che inizia ad avvolgere la DP. I cheratinociti proliferanti in prossimità della DP, iniziano a differenziare nella guaina reticolare interna (*inner root sheath* - IRS), formando una struttura conica al di sopra della DP (fase 4). Nella fase successiva l'HF raggiunge la zona sottocutanea mentre la DP viene quasi completamente inglobata nel bulbo pilifero (fase 5). Nel bulbo si localizzano le cellule della matrice a partire dalle quali inizia a svilupparsi il fusto del pelo (Hair Shaft - HS) che cresce sotto forma di elemento tubulare rigido all'interno dell'IRS cheratinizzato, esteso già al di sopra della zona mediana dell'HF. Nella porzione distale dell'HF, si sviluppano i primi sebociti a partire dalle cellule epiteliali ed il *bulge*, sede delle cellule staminali follicolari (44), a

partire dallo strato più esterno dell' HF, che diventerà la guaina reticolare esterna (Outer Root Sheath – ORS). Le ulteriori fasi dello sviluppo (fasi 6-7) includono: la formazione del canale del capello detto *infundibulum*, l'organizzazione dei sebociti nella ghiandola sebacea, l'allungamento dell'IRS e dell'HS, l'internalizzazione completa della DP nel bulbo. La morfogenesi si conclude quando l'HF, con i suoi strati completamente differenziati, raggiunge il muscolo sottocutaneo, prende rapporto con il muscolo erettore del pelo, attaccato a livello del *bulge* e l'HS emerge dall'epidermide (fase 8). Un follicolo maturo è formato quindi da una serie distinta di strati cellulari concentrici. Lo strato più esterno, l'ORS, trova continuità con la membrana basale dell'epidermide e circonda l'intero HF. Esso consiste di un epitelio a singolo strato a livello del bulbo e di un epitelio pluristratificato lungo tutto l'HF. Nonostante le cellule dell'ORS mostrino una differenziazione orizzontale, esse non vanno incontro a cheratinizzazione, ad eccezione di quelle più superficiali (45). Tutti gli altri strati differenziano dalla matrice germinativa, localizzata nella parte inferiore del bulbo attorno alla DP. Lo strato “*companion*”, il cui ruolo non è ancora stato chiarito, è costituito da un singolo strato di cellule che separa l'ORS dall'IRS. La funzione dell'IRS è quella di dare forma e supporto all'HS. Esso è formato da tre differenti strati che differiscono per organizzazione cellulare: lo strato di Henle, lo strato di Huxley e la cuticola. L'HS è il prodotto della differenziazione dei tricociti, cellule proliferanti che costituiscono la matrice del capello e che derivano dalla matrice germinativa. Le cellule della matrice danno origine alla corteccia ed al midollo. La corteccia costituisce la massa del fusto e diventa totalmente cheratinizzata nella fase terminale del processo di differenziazione.

3.3 Il ciclo del follicolo pilifero

Quando il potenziale proliferativo delle cellule del bulbo si esaurisce, l'HF entra in un perpetuo ciclo di crescita (fig. 1.8) e regressione che coinvolge soltanto lo strato più inferiore dell'HF. Esso inizia dalla fase di catagen, la fase involutiva, durante la quale la struttura dell'HF al di sotto del *bulge*, va incontro ad una degenerazione apoptotica controllata, a partire dal bulbo andando verso l'alto. L'HS si stacca dalla matrice proliferativa e costituisce il *club hair*, che coincide con la regressione dell'IRS. Successivamente il *club hair*, circondato dall'ORS si muove verso il bulge. Un filamento epiteliale, che si estende dall'ORS retratto, spinge la DP fino alla base del segmento permanente dell'HF, dove resta in prossimità del bulge. Durante la fase terminale del catagen, le cellule staminali del bulge formano l'*hair germ* secondario nella parte inferiore dell'HF. Terminato il catagen, l'HF entra nel telogen, la fase di riposo, durante la quale rimane relativamente in uno stato di dormienza. Il passaggio da telogen ad anagen, la fase di crescita, avviene grazie all'interscambio di segnali tra la DP ed il *bulge* (45). Le cellule progenitrici dell'*hair germ* secondario vengono attivate ed iniziano a proliferare incominciando ad avvolgere la DP (anagen I). Attraverso fasi successive (anagen II-VI) ha luogo la morfogenesi completa dell'HF e la sua ricostituzione nella porzione inferiore. La durata dell'anagen determina la lunghezza del pelo ed è dipendente dalla proliferazione e dalla differenziazione continua delle cellule della matrice alla base del follicolo.

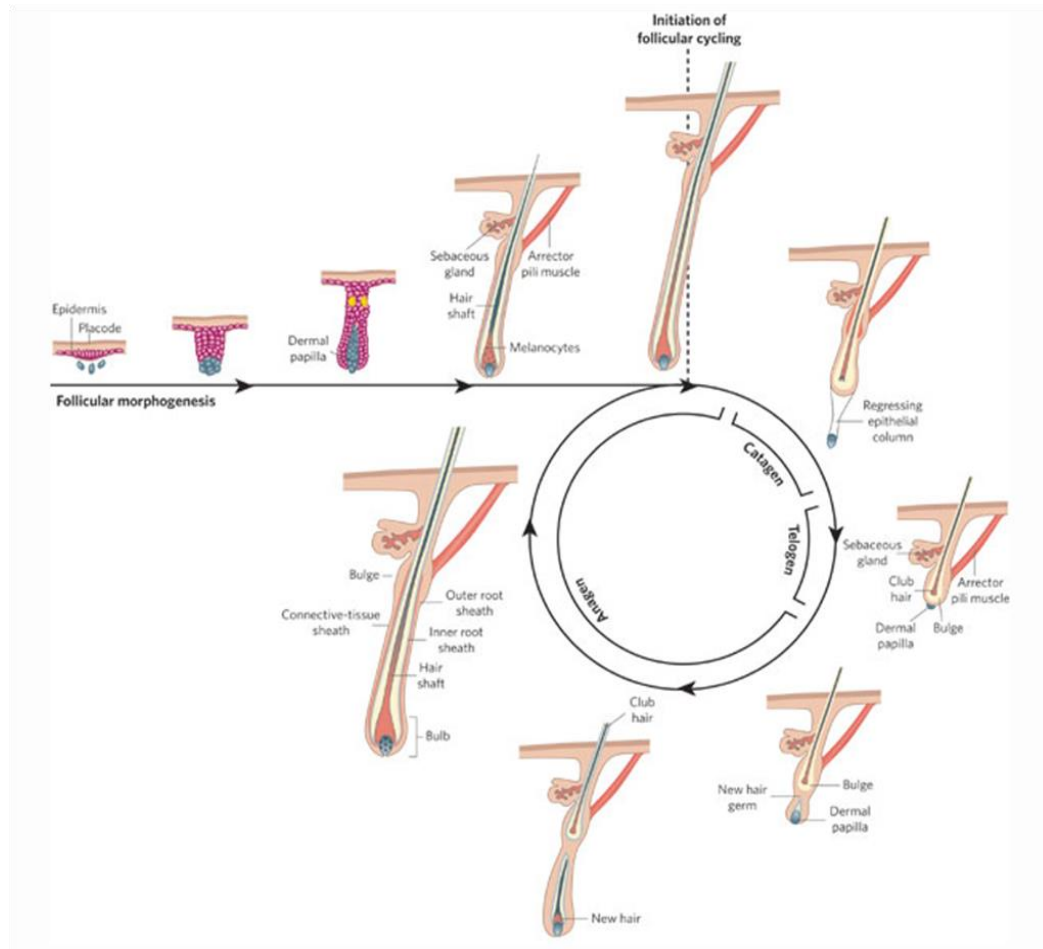


Fig. 1.8 Fasi del ciclo del follicolo pilifero

3.4 Ruolo dell'adesione nella morfogenesi del pelo

La morfogenesi dell'HF costituisce un esempio interessante di come cambiamenti del pattern di espressione delle CAMs possano influenzare lo sviluppo di un organo. Esperimenti classici di trapianto tessutale hanno dimostrato che tre differenti fattori di interscambio epitelio-mesenchima giocano un ruolo chiave nello sviluppo follicolare. Il primo messaggio origina dal mesenchima ed induce le cellule ectodermiche sovrastanti a clusterizzare formando il placode. Il placode a

sua volta trasmette un secondo segnale alle cellule mesenchimali sottostanti affinché condensino formando la DP. La papilla trasmette segnali alle cellule germinali della matrice affinché proliferino e differenzino. Dalle fasi iniziali dello sviluppo del follicolo nell'ectoderma passando per le fasi differenziate, i patterns di espressione delle molecole di adesione intercellulare cambiano in maniera concomitante all'organizzazione delle cellule. La ricezione del primo messaggio di segnalazione originatosi dal mesenchima si accompagna ad una riduzione dei livelli di E-caderina e all'induzione della P-caderina nell'ectoderma embrionale. Con la crescita delle cellule germinali nel mesenchima sottostante, la P-caderina mantiene la sua espressione mentre l'epitelio torna ad esprimere E-caderina. Nel momento in cui le cellule della matrice iniziano a differenziare, si assiste alla riduzione dell'espressione della P-caderina ed all'incremento dell'E-caderina nei sistemi di adesione. L'espressione differenziale di E- e P-caderina durante la morfogenesi pone un elemento di riflessione su come questi cambiamenti possano avere una funzione nello stabilire la polarità cellulare (40).

4.DIFETTI DELLO SVILUPPO DEI DERIVATI ECTODERMICI

4.1 Le displasie ectodermiche: segni clinici e classificazione

Le displasie ectodermiche (DE) costituiscono un gruppo complesso ed altamente eterogeneo di malattie ereditarie, comprendente circa 200 differenti condizioni patologiche che hanno in comune anomalie dello sviluppo di due o più tessuti e strutture di origine ectodermica, in particolare denti, peli e capelli, unghie e ghiandole sudoripare. La frequenza delle DE nella popolazione generale è di circa

7:10.000 nati mentre la modalità di trasmissione genetica può essere autosomica dominante, autosomica recessiva o legata all'X.

Molte displasie ectodermiche possono presentarsi in forma sindromica in quanto mostrano ulteriori manifestazioni associate: malformazioni di organi o arti, alterazioni oculari neurosensoriali, ritardo mentale. La maggior parte delle forme sindromiche si identifica sulla base di alcuni segni tipici. L'epidermide può essere sottile e secca, caratterizzata da eczemi ed ipercheratosi. Frequentemente si osservano ipotricosi e segni di alopecia totale o parziale a causa del ridotto numero o dell'assenza dei follicoli piliferi. Le unghie possono avere carattere distrofico o ipertrofico con difetti di cheratinizzazione. I denti possono essere pochi (oligodontia) con forma rudimentale conica o assenti del tutto (anodontia). Le ghiandole sudoripare possono essere ipoplastiche o plastiche mentre quelle salivari, della mucosa nasale e mammarie si possono presentare in forma ipotrofica o essere completamente assenti. (46)

Una prima classificazione clinica delle displasie ectodermiche è stata proposta da Pinheiro e Freire-Maia, sulla base dei derivati ectodermici coinvolti. Secondo questa classificazione possono essere distinti due gruppi principali di DE. Al primo gruppo appartengono le DE che mostrano difetti in almeno due delle classiche strutture ectodermiche (capelli, unghie, denti e ghiandole sudoripare), con o senza malformazioni associate. Il secondo comprende tutte quelle forme che presentano difetti in una sola delle strutture sopra menzionate in aggiunta ad ulteriori anomalie. Nella classificazione di Freire-Maia e Pinheiro, le strutture ectodermiche coinvolte, vengono indicate secondo una precisa numerazione: 1-

capelli, 2-denti, 3-unghie, 4-ghiandole sudoripare. La combinazione di tali numeri consente in questo modo la definizione di 11 differenti sottogruppi. (47)

La recente caratterizzazione di alcuni geni implicati ha permesso di avanzare delle correlazioni tra la supposta funzione di tali geni ed il fenotipo, e di proporre in questo modo una classificazione clinico-molecolare. A tal proposito Priolo e Laganà hanno elaborato due gruppi: il 1° comprende le DE dipendenti da difetti nella regolazione dello sviluppo e nell'interazione epitelio-mesenchima; il 2° gruppo include le forme determinate da alterazioni nell'adesione cellulare e nei meccanismi di comunicazione intercellulare. (48)

4.2 Basi genetico-molecolari delle displasie ectodermiche

Negli ultimi anni numerosi studi hanno permesso l'identificazione di alcuni geni responsabili di varie forme di DE e consentito la comprensione dei pathways molecolari nei quali tali geni risultano coinvolti. Sulla base di questi studi è stato dimostrato che tutti i geni implicati nell'insorgenza delle DE agiscono secondo due distinti meccanismi patogenetici e che le caratteristiche cliniche osservate nei soggetti affetti sono fortemente correlate al tipo di meccanismo coinvolto. Il primo modello patogenetico è associato ad un difetto nell'interazione epitelio-mesenchima. Tutti i geni implicati in questo fenomeno biologico regolano l'espressione di proteine coinvolte nel *signaling* tra l'ectoderma ed il mesenchima e, in alcuni casi, controllano il differenziamento e la sopravvivenza cellulare attraverso la regolazione del processo apoptotico. Tale interazione viene ad essere regolata attraverso due pattern distinti. Il primo coinvolge la via di segnalazione Ectodisplasina/Edar/Edaradd (49) ed il pathway di regolazione di NEMO (50), entrambi convergenti sull'attività della molecola *nuclear factor kappa beta* (NF-

kB). Il secondo implica l'intervento di alcuni fattori regolatori della trascrizione e/o espressione genica, come p63, DLX3, MSX1, EVC ed EVC2.

Il secondo meccanismo patogenetico dipende da difetti funzionali di importanti proteine strutturali. In particolare sono state identificate alterazioni in geni codificanti per molecole coinvolte nell'adesione e nella comunicazione cellulare come le connesine e la placofilina, cruciali nel mantenimento dell'omeostasi tissutale, nel controllo della crescita, nello sviluppo e nella risposta sincronizzata delle cellule agli stimoli ambientali.

Questa classificazione permette di chiarire alcuni dei meccanismi responsabili delle differenti anomalie dei derivati ectodermici osservabili nelle varie forme di DE. Durante lo sviluppo degli annessi cutanei, l'epitelio ed il mesenchima sono induttori e target l'uno dell'altro ed interagiscono attraverso specifici segnali morfogenetici. L'alterazione di questi processi comporta un'ipoplasia dei derivati ectodermici, il cui sviluppo e differenziamento viene ad essere alterato a causa dell'assenza di specifici segnali induttivi tra ectoderma e mesenchima. Nel caso delle DE determinate da difetti in proteine strutturali, i derivati ectodermici risultano sviluppati e differenziati normalmente, ma diventano displastici a causa di un'alterata interazione cellula-cellula e di una disorganizzazione importante del citoscheletro.

4.3 Displasia ectodermica associata a sindattilia

Tra le displasie ectodermiche sindromiche si possono considerare forme che si associano a difetti dello sviluppo degli arti. Le anomalie possono essere più o meno importanti, dall'artrogriposi presente nella sindrome di Cote-Adamopoulos-Pantelakis (OMIM 601701) passando per l'ectrodattilia, come nel caso della

sindrome ectrodattilia - displasia ectodermica - labio/palatoschisi (OMIM #604292), fino a manifestazioni più lievi come la sindattilia cutanea presente nella sindrome di Zlotogora-Ogur (OMIM #225060). Quest'ultima forma è caratterizzata dall'associazione tra malformazioni di gravità variabile quali labio/palatoschisi, displasia ectodermica con anomalie dei denti, capelli corti, secchi e radi, sopracciglia e ciglia rade e sindattilia parziale delle dita delle mani e/o dei piedi. Questa sindrome, autosomica recessiva, è determinata da mutazioni del gene *PVLR1* localizzato sul cromosoma 11q23 e codificante per la molecola di adesione nectina-1.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Le displasie ectodermiche costituiscono un ampio gruppo di patologie rare le cui basi molecolari risultano nella maggior parte dei casi sconosciute. Clinicamente circa 200 forme sindromiche e non sindromiche sono state descritte in letteratura ed il loro numero è in costante aumento. Ad oggi tuttavia soltanto circa trenta geni-malattia sono stati associati ad alcune forme di DE. Un recente dibattito ha messo in luce la necessità di sviluppare un sistema di classificazione funzionale per queste patologie che integri le conoscenze cliniche e molecolari. Pertanto, l'identificazione di nuove molecole causative, rappresenta un elemento importante nell'ambito di tali malattie, poiché consente non soltanto un miglioramento della diagnosi, della prognosi e della gestione del paziente ma permette anche di stabilire un sistema classificativo più appropriato.

In considerazione di tali premesse, questo progetto di ricerca ha visto il raggiungimento di alcuni importanti obiettivi:

- La caratterizzazione di una forma di displasia ectodermica sindromica associata a sindattilia e causata da mutazioni in una nuova nectina.
- La ridefinizione delle displasie ectodermiche nectino-dipendenti sia dal punto di vista clinico, mediante l'analisi del fenotipo, sia dal punto di vista biologico, attraverso la definizione delle basi genetico-molecolari di tali patologie.

MATERIALI E METODI

Parte dello studio è stato condotto in collaborazione con altri centri di ricerca. In particolare le analisi immunocitochimiche sono state condotte presso l'Istituto Dermatologico dell'Immacolata di Roma, l'analisi FACS è stata eseguita presso il centro INSERM di Marsiglia ed infine gli studi sul topo in collaborazione con l'Istituto Max Planck di Berlino. Ringrazio pertanto tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione di questo lavoro di ricerca.

Identificazione del gene malattia dell'EDSS

3.1 Pazienti

Sono state inizialmente studiate due famiglie non correlate caratterizzate dalla presenza di alcuni membri con anomalie dei capelli e dei denti associate a sindattilia cutanea parziale delle dita delle mani e/o dei piedi. Sulla base di queste caratteristiche, a tale fenotipo è stato assegnato il nome di sindrome da displasia ectodermica-sindattilia (*Ectodermal Dysplasia-Syndactyly Syndrome*, EDSS).

La prima famiglia (famiglia A) è stata originariamente descritta da Boudghene-Stambouli e Merad-Boudia e si compone di 4 fratelli affetti nati da genitori algerini sani, primi cugini. Nella seconda famiglia di origine italiana (famiglia B), due fratelli, nati da genitori sani non consanguinei, mostrano caratteristiche cliniche sovrapponibili a quelle osservate nella famiglia algerina.

Tutti i soggetti affetti presentano sindattilia cutanea parziale che coinvolge variabilmente le dita 2-3 e 4-5 delle mani e 2-3 e 4-5 dei piedi. Nei pazienti più giovani, i capelli risultano sparsi e tendenti alla rottura già in età precoce. Ciglia,

sopracciglia e peli del corpo presentano le stesse identiche anomalie. Nella seconda decade di vita è stata osservata una perdita progressiva di capelli responsabile di un'alopecia parziale, diventata in seguito completa, come osservato nel paziente più anziano della famiglia A (40 anni). L'analisi morfologica del capello ha dimostrato anomalie strutturali quali *pili torti* con fusti piliferi che mostrano, ad intervalli irregolari, torsioni di 180° lungo l'asse longitudinale associate ad aree di rottura.

I denti si presentano piccoli, distanziati e di forma conica. Tutti i pazienti non mostrano anomalie della sudorazione. Le caratteristiche fenotipiche sono riportate nella tabella 1.

	Famiglia A				Famiglia B	
Paziente	IV:1	IV:2	IV:7	IV:8	II:1	II:3
Sesso	F	M	F	F	M	F
Consanguineità	+				-	
Origine	Algerina				Italiana	
Caratteristiche cliniche						
<i>Anomalie dei capelli:</i>						
Capelli sparsi	+	+	+	+	+	+
Pili torti	+	+	+	+	+	+
<i>Anomalie dei denti</i>						
Denti piccoli	+	+	+	+	+	+
Denti distanziati	+	+	+	+	+	+
<i>Difetti delle unghie</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Sindattilia cutanea</i>						
Mani (sinistra/destra)	2-3-4/2-3-4	-	-	2-3/2-3	2-3-4/2-3-4	2-3-4/2-3-4
Piedi (sinistra/destra)	2-3/2-3	2-3/2-3	2-3/2-3	2-3 4-5/2-3 4-5	2-3/2-3	2-3 4-5/2-3 4-5
<i>Sviluppo cognitivo</i>	normale	normale	normale	normale	normale	normale

Tab. 3.1 Caratteristiche fenotipiche dei pazienti con EDSS

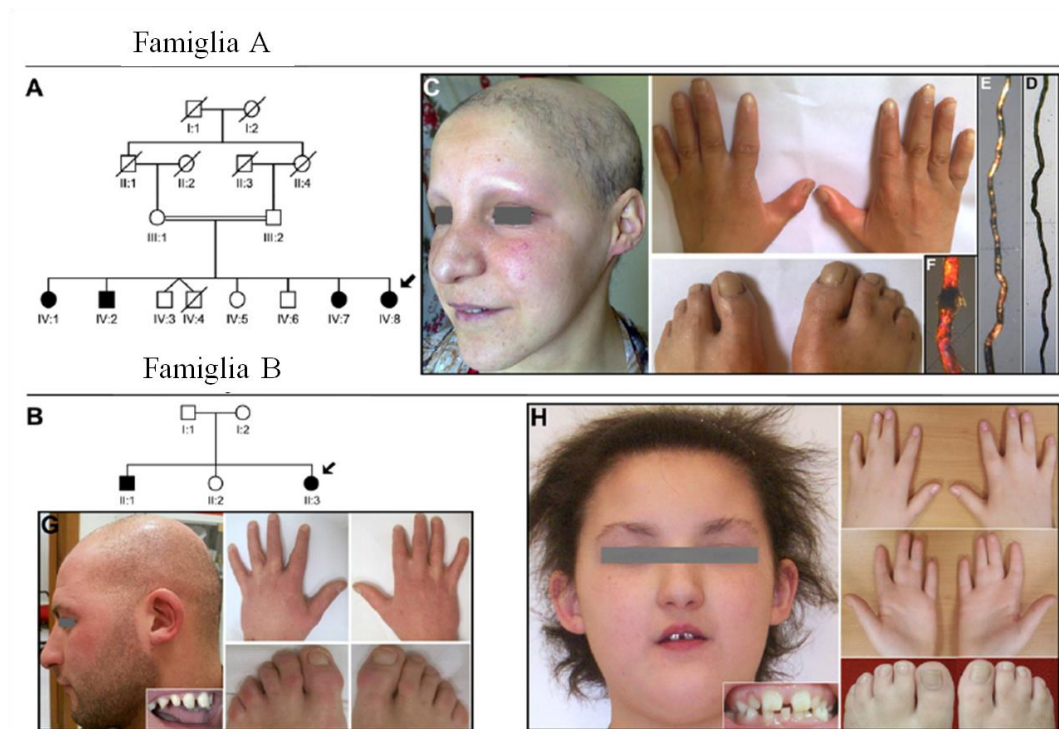


Fig. 3.1 Struttura dei pedigrees e fenotipo clinico dei pazienti EDSS della famiglia A e della famiglia B

Estrazione del DNA

Tutti i campioni di DNA sono stati estratti da leucociti di sangue periferico mediante estrattore automatico Maxwell (Promega).

Il consenso informato è stato sottoscritto da ogni soggetto incluso nello studio, o da entrambi i genitori, se il probando era minorenne al momento del prelievo. Sono stati prelevati circa 8 ml di sangue venoso in EDTA da ciascun paziente e dai familiari sani disponibili.

1. Genome-wide SNP-array

Il DNA genomico è stato quantificato mediante NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) e 500 ng sono stati digeriti, separatamente, con due enzimi di restrizione. 250 ng sono stati digeriti con 10 unità di NspI (New England Biolabs, Ipswich, MA) e 250 ng con 10 unità di StyI (New England Biolabs) per 2 h a 37 °C e 20' a 65 °C nel termociclo (GeneAmp PCR System 9700; Perkin Elmer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA) nel buffer di reazione NE 10X, con aggiunta di 0,2 µl di BSA (100X, 10 mg/ml; New England Biolabs).

Dopo la digestione, ai frammenti di restrizione di ciascuna aliquota sono stati aggiunti 0,75 µl di uno specifico adattatore per NspI e per StyI (50 µM; Affymetrix), che si lega in corrispondenza delle basi sporgenti nel sito di taglio, 2,5 µl di buffer 10X e 400 unità di T4 DNA ligasi (New England Biolabs) e i campioni sono stati inseriti nel termociclature (3 h a 16 °C, 20' a 70 °C) (GeneAmp PCR System 9700).

Per ogni campione sono state preparate 4 reazioni di amplificazione mediante PCR per il DNA digerito con NspI e 3 per il DNA digerito con StyI con l'aggiunta di 39,5 µl di H₂O, 10 µl di buffer 10X, 20 µl di GC-Melt 5M (Clontech Laboratories, Inc. Mountain View, CA), 14 µl di dNTPs (2,5 mM; Thermo Fisher Scientific), 4,5 µl del primer (100µM) complementare alla sequenza dell'adattatore (PCR 002; Affymetrix) e 2 µl di Titanium Taq Dna polimerasi (50X; Clontech). Le condizioni della reazione (un ciclo a 94°C per 3', 30 cicli comprendenti 30" a 94°C, 30" a 60°C e 15" a 68°C, un ultimo ciclo a 68°C per 7') erano tali da permettere preferenzialmente l'amplificazione di frammenti di 200-

1100 bp. La dimensione dei frammenti dopo PCR è stata valutata tramite corsa elettroforetica su un gel d'agarosio 2%.

Le aliquote di DNA sono state quindi unite, purificate con biglie magnetiche (Beckman Coulter Genomics, Agencourt AMPure, Brea, CA) e quantificate al NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Circa 200 µg di prodotto di PCR è stato frammentato nel termociclatore (35' a 37 °C, 15' a 95°C), mediante aggiunta di 5 µl di buffer 10X e 2,50 unità di enzima di frammentazione (Affymetrix) in un volume totale di 55 µl. La corretta lunghezza dei frammenti, inferiore alle 180 bp, è stata verificata mediante una corsa elettroforetica su un gel d'agarosio 4%. I campioni frammentati sono stati marcati per 4 ore e 15 minuti nel termociclatore (4 h a 37°C, 15' a 95°C), utilizzando 14 µl di TDT buffer 5X (Affymetrix), 2 µl di miscela di marcatura contenente deossinucleotidi biotinilati (30mM), e 3,5 µl di enzima transferasi deossinucleotil-terminale (30unità/µl) (TdT) , che catalizza l'incorporazione dei deossinucleotidi marcati in posizione 3' terminale dei frammenti di DNA (Affymetrix). Ai prodotti marcati sono stati aggiunti 200 µl di una miscela di ibridazione, contenente 12 µl MES 12X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 13 µl di soluzione di Denhardt 50X (Sigma-Aldrich), 3 µl EDTA 0.5M (Ambion, Foster City, CA), 3 µl di DNA di sperma d'aringa (10 mg/ml; Promega Corporation, Madison, WI), 2 µl di un DNA di controllo (Oligo Control reagent 0100; Affymetrix), 3 µl di Cot-1 umano 1mg/ml (Invitrogen Ltd., Paisley, UK), 1 µl di Tween-20 al 3%, 13 µl di DMSO 100% (Sigma-Aldrich) e 150 µl di TMACL 5M (Sigma-Aldrich), per ciascun campione, ed inseriti nel termociclatore per 10 minuti a 95°C. I campioni sono stati ibridizzati sui chip SNP-array 6.0 (Affymetrix).

I chip, disposti negli appositi supporti, sono stati collocati all'interno di un forno a 50°C in rotazione a 60 rpm per 16-18 ore. Nella macchina di lavaggio Fluidic Station 450 (Affymetrix), i campioni ibridizzati sono stati marcati con fluorocromi in maniera indiretta mediante l'utilizzo consecutivo di tre soluzioni differenti, contenenti rispettivamente: streptavidina marcata in fluorescenza (Molecular Probes, Invitrogen), anticorpo biotinilato specifico per la streptavidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA) ed infine una soluzione di stabilizzazione 1X (100mM MES, 1M [Na⁺], 0,01 % Tween 20). I chip sono stati successivamente sottoposti a lavaggi per eliminare l'eccesso di campione non ibridato, utilizzando due soluzioni di lavaggio A (6X SSPE, 0,01% Tween 20) e B (0,6X SSPE, 0,01% Tween 20).

L'immagine del chip è stata acquisita mediante lo Scanner GeneChip 3000 7G (Affymetrix) e i dati sono stati elaborati con il software Genotyping Console (versione 3.0.2; Affymetrix). Il software fornisce informazioni riguardo la percentuale di SNPs ibridizzati (Contrast Quality Control, CQC) e fornisce una stima sul rumore di fondo (Median Absolute Pairwise Difference, MAPD), parametri presi in considerazione per valutare la qualità dell'esperimento (CQC > 0,4; MAPD < 0,35), confronta i risultati dell'ibridazione con un set di 270 campioni appartenenti all'HapMap Project (International HapMap Consortium, 2005).

3.3 Analisi di linkage

La famiglia A è stata genotipizzata mediante una batteria di 6 marcatori microsatelliti D1S498, D1S2635, D1S484, D1S2878, D1S196, D1S452 (ABI Prism Linkage Mapping Set) nella regione di omozigosi identificata mediante SNP array. La reazione di PCR è stata effettuata su un volume finale di 15µl contenenti 60ng di DNA genomico, 100pmol di ciascun primer, 4µl di dNTPs 1.25mM, 1.5µl di buffer di reazione (150mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8.0), 1.5µl di MgCl₂ e 1.25 unità di Ampli Taq Gold Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizzando il seguente ciclo d'amplificazione: 12 min di denaturazione iniziale a 94°C seguita da 10 cicli comprendenti ciascuno una denaturazione a 94°C per 15 sec, un annealing a 55°C per 15 sec e una estensione a 72°C per 30 sec, seguiti da 20 cicli comprendenti ciascuno una denaturazione a 89°C per 15 sec, un annealing a 55°C per 15 sec e una estensione a 72°C per 30 sec, seguiti da una estensione finale di 10 min a 72°C e da uno step finale di 1 min a 4°C. Gli amplificati ottenuti sono stati separati mediante un sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 o 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA) e la segregazione degli alleli è stata determinata con il programma GeneMapper Analysis Software versione 3.7 (Applied Biosystem, Foster City, CA).

3.4 Analisi mutazionale del gene *PVRL4*

La sequenza codificante e le regioni fiancheggianti gli esoni compresi i siti di giunzione esone/introne del gene *PVRL4* sono stati analizzati per la ricerca di mutazioni mediante sequenziamento diretto.

I primers per l'amplificazione del gene *PVRL4*, riportati nella tabella 3.2, sono stati disegnati mediante software 'Primer 3' (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>).

Nome primer	Lunghezza (bp)	Sequenza (5' to 3')	Annealing
<i>PVRL4</i> genomico (umano)			
PVRL4-EX1F PVRL4-EX1R	207	CAGTTCCTTATTCAAGTCTGC GTTGGGCTCAGAAGCAAGTG	60
PVRL4-EX2F PVRL4-EX2R	501	ATTATGACTGTGCTCCCCCA TCTCTGCAGTCCCCATCTCT	60
PVRL4-EX3F PVRL4-EX3R	409	CCTGACAGGGATTGTGTAGAC ACCTGTGGCATCTCACCAATC	60
PVRL4-EX4F PVRL4-EX4R	247	ACCACATGATCAAAGGCATC TGGTATATCCTGGCCCTGAG	60
PVRL4-EX5F PVRL4-EX5R	339	AGAGCTGTCTGGACACGTTG CAGCCCCCTCTGAATAAACA	60
PVRL4-EX6F PVRL4-EX6R	447	TGTTTATTCAAGGGGGCTG TCAGCCCTAGAAACACCTG	60
PVRL4-EX7F PVRL4-EX7R	310	GCAGCCACACACTCACACTT AGAGAGCTGTGCTCCTGGTC	60
PVRL4-EX8F PVRL4-EX8R	321	TCCAGGAGAGAATGGACCTG AGCCAGGGCTAAGGAAAGAG	60
PVRL4-EX9F PVRL4-EX9R	446	CCTATGCTTCTGAGGCAACC AATGGGGGTGTTTAAGGAGG	60
<i>PVRL4</i> cDNA (umano)			
PVRL4-cDNAex3F PVRL4-cDNAex6R	391	TGGTGTCCCATCCTGGCCTGCT CCCACCAACCACCGAGGC	60
<i>PVRL4</i> mRNA per q-PCR (umano)			
PVRL4-express-F PVRL4-express-R	51	CTTCAAGCACTCCGCTCTG GGCACCAAGTGGA ACTCTGAG	60
GAPDH-express-F GAPDH-express-R	51	TCAATGGAAATCCCATCACCA TGATTTTGGAGGGATCTCGCT	60
<i>Pvr14</i> in situ probe (topo)			
Pvr14_ISH-f Pvr14_ISH-r	96	AATTAGGGGATCACAGTTGG AGTGACTCTGGAGTTCCAC	60
<i>Pvr14</i> mRNA qPCR (topo)			
Pvr14_e3f Pvr14_e4r	104	ATGCAGAGTCAGCACCTTCC AGTGGTGGACCAAGGATTCAG	60
Gapdh-f Gapdh-r	90	GGGAAGCCCATCACCATCTT CGGCCTACCCCATTTG	60

Tab. 3.2 Oligonucleotidi utilizzati per l'analisi del gene *PVRL4*

L'amplificazione dei singoli esoni è stata effettuata mediante termociclatore Applied Biosystem 9700 thermocycler (Applied Biosystems). La PCR è stata eseguita mediante Taq Go kit (Promega) in un volume finale di 25µl contenenti 100ng di DNA genomico, 5 µl di Colorless GoTaq Reaction Buffer 5X (pH8.5; 7.5mM MgCl₂), 4 µl dNTPs 1.25 mM, 0,2 µl primer (100pmol/µl) e 0,125µl GoTaq DNA Polymerase 2.5 U. E' stato impostato il seguente ciclo di PCR: 3 minuti di denaturazione iniziale a 94°C, 30 secondi a 94°C, 30 secondi alla T di annealing specifica, 30 secondi a 72°C (per 35 cicli) ed infine un' estensione finale di 7 minuti a 72°C.

Il prodotto di PCR è stato purificato per eliminare i nucleotidi non incorporati nella reazione, i sali, i primers, e i dimeri di primers per evitare eventuali interferenze nella successiva reazione di sequenza. Per la purificazione del prodotto di PCR sono state utilizzate le colonnine "Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices" (MILLIPORE) che utilizzano un filtro a membrana ad esclusione molecolare. La reazione di PCR è stata portata ad un volume massimo di 500 µl con acqua bidistillata. L'intero volume è stato trasferito sul filtro fornito dal Kit commerciale e centrifugato per 15 minuti a 4000 rpm. Il prodotto di PCR purificato è stato eluito dal filtro con circa 20 µl di acqua bidistillata centrifugando 4 minuti a 4000 rpm. Il prodotto di PCR così purificato è stato controllato e quantizzato con una corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1,8%.

La reazione di sequenza è stata eseguita con il kit commerciale BigDye Terminator (Applied Biosistem) e Dye Primer Cycle Sequencing (Perkin Elmer, Foster City, CA) che fornisce i substrati per effettuare una reazione di sequenza con il metodo Sanger. Sono state preparate due reazioni separate, una per ciascun

primer (forward e reverse). Per ogni reazione sono stati utilizzati 100 ng dell'amplificato di PCR purificato, 15 pmol/ μ l di primer, 1 μ l di mix di sequenza BigDye e 1 μ l di buffer di sequenza. La reazione è stata eseguita con un termociclatore Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA) in tre fasi successive: una denaturazione a 96°C per 10", un annealing a temperatura specifica per 5", una estensione a 60°C per 4 minuti. Le tre fasi sono state ripetute 30 volte e si sono concluse con una fase finale di 5' a 4°C.

La reazione di sequenza è stata purificata per eliminare i primers e i nucleotidi liberi fluorescenti non incorporati nella reazione che altrimenti interferirebbero con la lettura al sequenziatore automatico. La purificazione è stata eseguita mediante singole colonnine "DyeEx 2.0 Spin Kit" (QIAGEN), che utilizzano il principio della cromatografia per gel-filtrazione separando le molecole in base al peso molecolare. La purificazione avviene mediante una centrifugazione (3 minuti a 4000 rpm), nella quale il gel trattiene i componenti della reazione di sequenza lasciando eluire soltanto i frammenti di DNA generati dalla reazione.

Le sequenze sono state corse mediante elettroforesi capillare su un sequenziatore automatico 3130XL (Applied Biosystems) ed analizzate mediante il software Mutation Surveyor (Softgenetics) utilizzando la sequenza di riferimento deposita nel database NCBI (*PVRL4* GenBank accession no. NG_028109.1).

Studi funzionali

3.5 Estrazione dell' RNA da cheratinociti

L'RNA totale è stato estratto da cheratinociti in coltura secondo la metodica di Chomczynsky and Sacchi (1987), mediante l'uso del reagente Trizol (Invitrogen, Italia) contenente una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato. I campioni sono stati omogeneizzati in Trizol (1 ml per 100 mg di tessuto) e, dopo l'aggiunta di cloroformio (0.2 ml per 1 ml di Trizol), centrifugati a 12000xg per 15 minuti a 4°C. La miscela, dopo centrifugazione, si è separata in 3 fasi: una fase rossa contenente il fenolo e il cloroformio, un'interfase, e una fase acquosa superiore, contenente l'RNA, che è stata prelevata e trasferita in nuovi tubi. La precipitazione dell'RNA è stata effettuata mediante aggiunta di isopropanolo (0.5 ml per 1 ml di Trizol) e centrifugazione per 10 minuti a 12000xg a 4°C. Il pellet di RNA così ottenuto è stato lavato con etanolo al 75% (1 ml per 1 ml di Trizol) e centrifugato a 7500xg per 5 minuti a 4°C. Il pellet di RNA è stato quindi risospeso in acqua RNase free (Invitrogen, Italia) e sottoposto a lettura spettrofotometrica a 260, 280 e 320 nm.

3.6 Reverse Transcriptase-PCR

In seguito a digestione con DNase I, l'RNA (1 µg) è stato incubato per 5 minuti a 65°C con 100 ng di random primers e dNTPs 0.5 mM. E' stata quindi aggiunta una miscela contenente l'enzima SUPERSRIPT III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen, Italia) in un tampone contenente Tris-HCl (50 mM, pH 8.5), KCl 75 mM, MgCl₂ 3mM, DTT 10 mM, e 20 U di RNase OUT. I campioni

sono stati incubati a 25°C per 5 minuti, 50°C per 45 minuti e infine la reazione è stata inattivata mediante riscaldamento a 70°C per 15 minuti.

3.7 Real Time-PCR

Per valutare l'espressione di *PVRL4* e' stata eseguita un'analisi di real time PCR impiegando la chimica del Sybr Green (Applied Biosystem), con verifica della specificità dei prodotti amplificati mediante curva di dissociazione. Il gene housekeeping utilizzato e' la *GAPDH*. Sono stati quindi disegnati mediante software Primer Express (Applied biosystem) due coppie di primers, specifiche rispettivamente per l'mRNA di *PVRL4* e *GAPDH*

Per ogni coppia di primer è stata valutata la relativa curva di efficienza effettuando 4 diluizioni seriali in rapporto 1:2 un campione di cDNA di controllo. In generale, per eseguire le reazioni di PCR Real time è stata impiegata una mix contenente Sybr Green, primer alla concentrazione di 20 µM e acqua per arrivare ad un volume finale di 25 µl. I campioni sono stati analizzati in triplicato impostando il seguente ciclo di amplificazione: 50°C per 2 minuti, seguiti da 40 cicli a 95°C per 10 minuti, 95 per 15 secondi e 60°C per 1 minuto. I valori medi di cT di ogni campione, sono stati calcolati per ogni gene analizzato; i valori di cT medi relativi al gene *PVRL4* sono stati poi normalizzati contro i corrispondenti valori medi di *GAPDH*, secondo la tecnica del Delta cT (cT gene house-keeping – cT gene di interesse).

Ampliamento dello spettro mutazionale

3.8 Pazienti

Sono stati reclutati 4 pazienti caratterizzati da displasia ectodermica associata a sindattilia cutanea, provenienti da 3 famiglie di diversa origine geografica. Le caratteristiche di ciascun paziente sono descritte nella tabella 3.4 e riportate nella figura 3.2

	Famiglia 1		Famiglia 2	Famiglia 3
Sesso	F	M	F	M
Consanguineità	+		-	+
Origine	Libanese		Danese	Turca
Caratteristiche cliniche				
<i>Anomalie dei capelli:</i>				
Capelli sparsi	+	+	+	+
Pili torti	+	+	+	+
<i>Anomalie dei denti</i>				
Denti piccoli	+	+	+	+
Denti distanziati	+	+	+	+
<i>Difetti delle unghie</i>				
<i>Ipercheratosi palmo-plantare</i>	+	+	-	+
<i>Sindattilia cutanea</i>				
Mani (sinistra/destra)	2-3-4/2-3-4	2-3/2-3	2-3/2-3	2-3-4/2-3-4
Piedi (sinistra/destra)	2-3/2-3	2-3/2-3	2-3 4-5/2-3 4-5	-
<i>Labio-palato schisi</i>	-	-	-	-
<i>Sviluppo cognitivo</i>	normale	normale	normale	ritardato

Tab. 3.3 Caratteristiche fenotipiche dei pazienti con displasia ectodermica associata a sindattilia, reclutati in questo studio

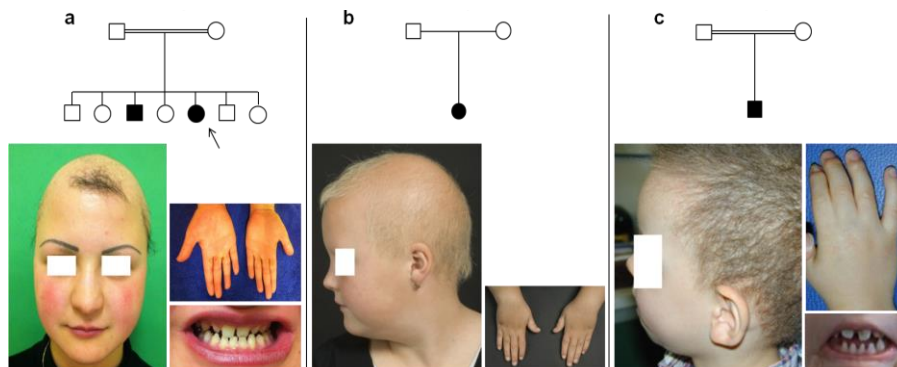


Fig. 3.2 Struttura dei pedigrees e fenotipo clinico dei pazienti con displasia ectodermica associata a sindattilia

3.9 Sequenziamento del gene *PVRL1*

Ogni paziente e' stato analizzato per la ricerca di mutazioni nel gene *PVRL4* come da protocollo precedentemente descritto. Il paziente della famiglia 3, risultato negativo all'analisi di *PVRL4*, e' stato studiato per la ricerca di mutazioni nel gene *PVRL1*. Analogamente a quanto e' stato fatto per il gene *PVRL4*, abbiamo disegnato, mediante il software primer 3, le sequenze oligonucleotidiche per l'amplificazione genomica delle 3 isoforme del gene *PVRL1*. I primers sono riportati nella tabella. Di seguito all'amplificazione mediante PCR con Taq Go kit, l'intera regione codificante e le giunzioni introne/esone sono state sequenziate con il kit Big dye terminator 3.1. L'elettroforesi capillare e' stata condotta su sequenziatore ABI 3130 e l'analisi di sequenza e' stata effettuata mediante il software Mutation Surveyor utilizzando la sequenza di riferimento depositata nel database NCBI (*PVRL1* GenBank accession no. NG_013083.1).

Nome primer	Lunghezza (bp)	Sequenza (5' to 3')	Annealing
<i>PVRL4</i> genomico (umano)			
PVRL4-EX1F PVRL4-EX1R	404	GCA TGACTCGTGCAACTTGCG AATCCAGTCGTGCCCGCCAT	67
PVRL4-EX2F PVRL4-EX2R	528	AGACAAGGCCAGAGCAAGGG GGATGTCTGGGGTCA TTGAGGCA	67
PVRL4-EX3F PVRL4-EX3R	493	GGTGCA TCTGGACAAGTCAACAG GGA GGAGATA GGGGAGACAGGAG	67
PVRL4-EX4F PVRL4-EX4R	245	CTTCCTGGCTGAAGTCCCTTGT TGGTCCAGTCAGCTGTCTTCCAA	67
PVRL4-EX5F PVRL4-EX5R	304	CAAGTGGGTGACCCAGGAACAG ATTGCTCAAAGGTGAGGGATGCAG	67
PVRL4-EX6F PVRL4-EX6R	284	TTGGGTCACTTGAGTTTCTCTCTC TTAGGTGCTTTAAGTCTGGGGC	67
PVRL4-EX6aF PVRL4-EX6aR	798	GAAC TGGAGCTGCTCAAACCT AGCTGGGCAAGTCTCTGTTC A	67
PVRL4-EX6bF PVRL4-EX6bR	196	AGGGAGACTGGAGAGAAAGCG AGGGTCACAGCTGTCTGACAT	67
PVRL4-EX7F PVRL4-EX7R	184	ATGGGGAGAGCCCCATGTGT TTCTCCCTCCCCGAGTCCAG	67
PVRL4-EX8F PVRL4-EX8R	253	TGGAGCAGGGGCA TGGAAAAGG TGGTTCCCTCTAAGGCAGCTGG	67

Tab. 3.4 Oligonucleotidi utilizzati per l'analisi del gene *PVRL1*

RISULTATI

Identificazione del gene malattia dell'EDSS

4.1 Analisi Genome-Wide SNP array

Allo scopo di identificare il difetto genetico responsabile dell'EDSS abbiamo utilizzato l'approccio della mappatura per omozigosi in 4 soggetti affetti ed in 3 membri sani della famiglia A, mediante piattaforma Affymetrix Genome-Wide 6.0 SNP Array. L'analisi ha permesso l'identificazione di una minima regione di omozigosi, condivisa dai pazienti, estesa per circa 4.18 Mb sul cromosoma 1q23.3 tra lo SNP rs11265404 in posizione 158,686,947 bp e lo SNP rs16833478 in posizione 162,874,726 bp, in base alle informazioni del National Center for Biotechnology Information (NCBI) build 36.3 (fig. 4.1).

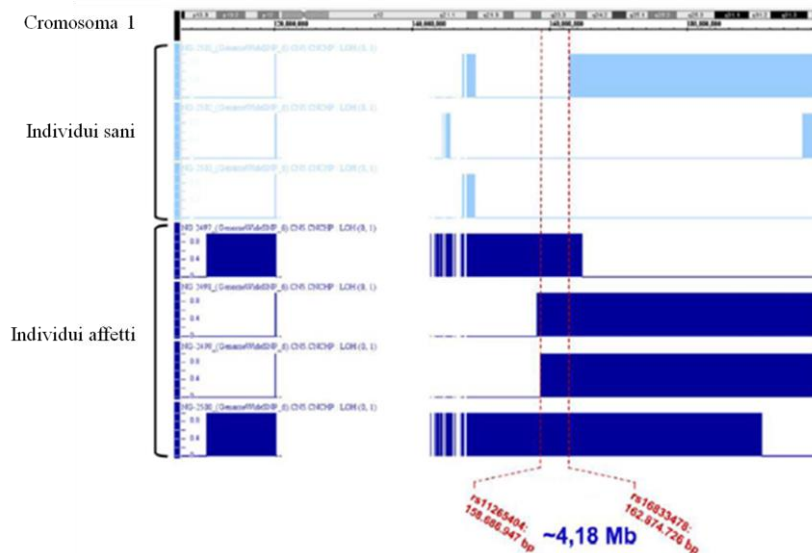


Fig. 4.1 Risultato dell'analisi genome-wide SNP array sulla famiglia A. La minima regione di omozigosi condivisa dai soggetti affetti è compresa tra le due linee rosse tratteggiate

4.2 Analisi di linkage

L'analisi di sei marcatori microsatelliti compresi nell'intervallo, identificato mediante Genome-Wide, ha confermato la cosegregazione della malattia con il locus 1q23.3 con un valore massimo di LOD score di 3.08 per il marcatore D1S484 (fig. 4.2).

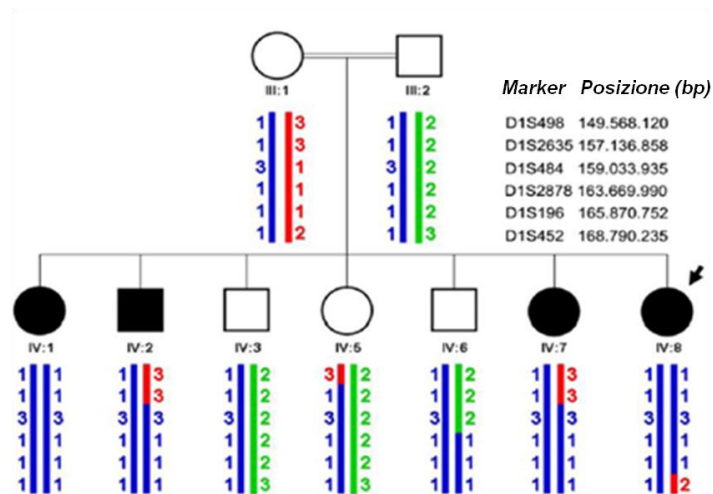


Fig. 4.2 Genotipizzazione dei marcatori microsatelliti nella regione 1q23.3

4.3 Analisi del gene *PVRL4*

All'interno dell'intervallo identificato sono contenuti circa 60 geni tra cui *PVRL4* (*poliovirus receptor-related 4*) che è stato considerato immediatamente il miglior candidato in quanto il paralogo *PVRL1* era già noto essere associato alla sindrome displasia ectodermica – labio/palatoschisi o sindrome di Zlotogora-Ogur (CLPED1, MIM 225069) il cui fenotipo risulta parzialmente sovrapponibile a quello dell'EDSS per la presenza di displasia ectodermica associata a sindattilia cutanea. *PVRL4* e *PVRL1* codificano rispettivamente per la nectina-4 e la nectina-

1. L'analisi di sequenza dei 9 esoni (fig. 4.5A) e delle giunzioni introne-esone del gene *PVRL4* ha permesso di identificare, nel paziente della famiglia A IV:8, la mutazione in omozigosi c.851G>A responsabile del cambio aminoacidico p.Arg284Gln, nell'esone 4. La mutazione è stata confermata in omozigosi negli individui affetti mentre nei genitori e nei membri sani è risultata essere in eterozigosi. La mutazione non è stata trovata in 250 campioni di DNA di controllo (inclusi 70 campioni algerini) ne era presente come SNP nei database pubblici.

Al fine di confermare il coinvolgimento di *PVRL4* nell'EDSS, abbiamo testato la famiglia B alla ricerca di mutazioni, identificando due distinti difetti in entrambi gli individui affetti della famiglia. I due pazienti erano eterozigoti composti per il cambio, di origine materna, c.554C>T (p.Thr185Met) presente nell'esone 3, e per la delezione frameshift, trasmessa per via paterna, c.906delT localizzata nell'esone 5 e responsabile della formazione di una proteina tronca (p.Pro304HisfsX2). Entrambe le mutazioni erano assenti in 180 campioni di DNA di controllo (fig. 4.4).

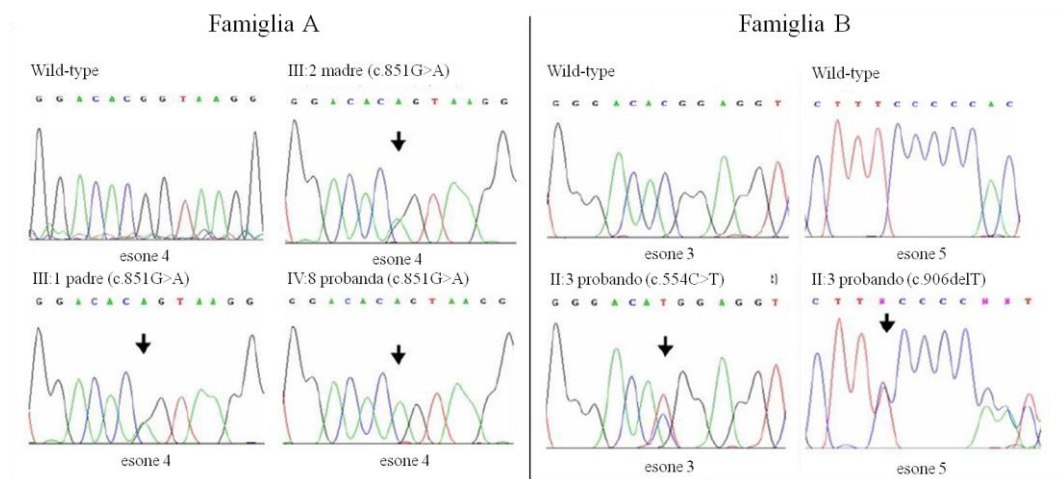


Fig. 4.4 Elettroferogrammi relativi all'analisi di sequenza del gene *PVRL4* nella famiglia A e nella famiglia B

Il residuo mutato treonina 185 è localizzato in corrispondenza del secondo dominio immunoglobulinico (fig. 4.5B) della nectina-4 ed è altamente conservato tra le specie (fig. 4.5C). Il modelling molecolare (fig. 4.5D) della struttura di questo dominio ha suggerito che la treonina 185 contribuisce alla formazione di un loop tra due filamenti beta e prende contatto con la valina 187 e la leucina 221. La sostituzione della treonina con un residuo di dimensioni maggiori quale è la metionina, riteniamo possa modificare questi contatti, alterando la struttura e le interazioni con altre molecole di nectina-4 indispensabili per la formazione degli omo-*cis*-dimeri.

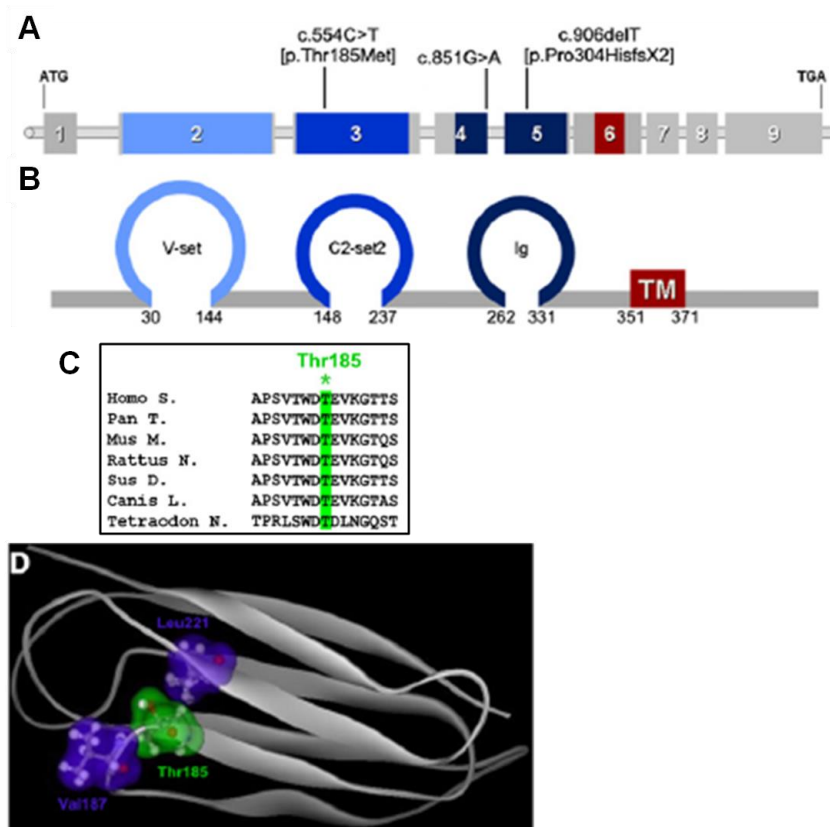


Fig. 4.5 A) Struttura del gene *PVRL4*; B) struttura della proteina nectina-4 con i 3 domini immunoglobulinici ed il dominio trans membrana; C) allineamento del residuo Thr185 tra le specie; D) modelling del residuo Thr185

4.4 Caratterizzazione del ruolo patogenetico della mutazione c.851G>A

Al fine di dimostrare il ruolo patogenetico della mutazione c.851G>A identificata nella famiglia A, abbiamo preso in considerazione l'ipotesi che, essendo la sostituzione localizzata in corrispondenza dell'ultima base dell'esone 4, essa potesse alterare lo splicing. Esempi di mutazioni esoniche responsabili di uno splicing difettivo sono riportati in letteratura. Inoltre il cambio Arg284Gln è stato predetto come benigno dai softwares di analisi SIFT e PolyPhen. Al contrario i softwares NetGene2, SplicePort e HSF hanno riportato una riduzione significativa dello score per l'esone 4, supportando la tesi di un possibile ruolo della sostituzione sullo splicing dell'mRNA. Al fine di testare tale ipotesi, abbiamo analizzato l'mRNA di *PVRL4* estratto da una biopsia cutanea del paziente IV:8 della famiglia A e da quella di un soggetto sano. L'amplificazione del cDNA di *PVRL4* (RT-PCR) mediante i primers fiancheggiati l'esone 4 ed il successivo caricamento su gel d'agarosio hanno permesso di evidenziare prodotti di splicing anomali rispetto a quanto osservato nel controllo negativo. Il sequenziamento diretto del più abbondante dei trascritti aggiuntivi, estratto direttamente dal gel d'agarosio, ha confermato lo skipping dell'esone 4 con formazione di un codone di stop prematuro (p.Phe244CysfsX22). La proteina risultante da tale trascritto manca del dominio transmembrana e della sequenza legante l'afadina, causando molto verosimilmente la perdita di funzione della nectina-4 (fig. 4.6).

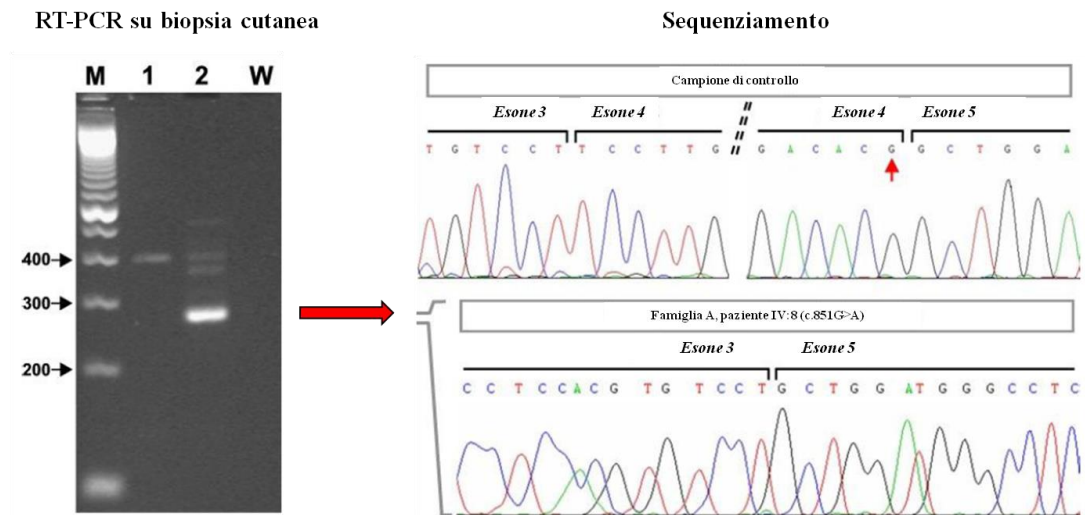


Fig. 4.6 RT-PCR eseguita su biopsia cutanea. Nella fila M è stato caricato il marcatore 100bp, nella fila 1 un controllo wild-type, nella fila 2 il paziente IV:8 della famiglia A e nella fila W il bianco. Il sequenziamento della banda più intensa della fila 2 ha evidenziato lo skipping dell'esone 4.

4.5 Studio dell'interazione nectina-4/nectina-1

Sulla base delle precedenti evidenze scientifiche dimostranti che la nectina-4 forma etero-*trans*-dimeri con nectina-1, abbiamo studiato, in collaborazione con l'Istituto INSERM di Marsiglia, l'attività di legame tra le due proteine mediante Fluorescence-activated cell sorting (FACS), utilizzando cellule di controllo e cellule del paziente II:1 (famiglia B). L'analisi ha dimostrato non soltanto un'alterazione del legame tra le due nectine nei cheratinociti del paziente ma anche un decremento dell'espressione di nectina-4 sulla superficie cellulare (Fig. 4.7).

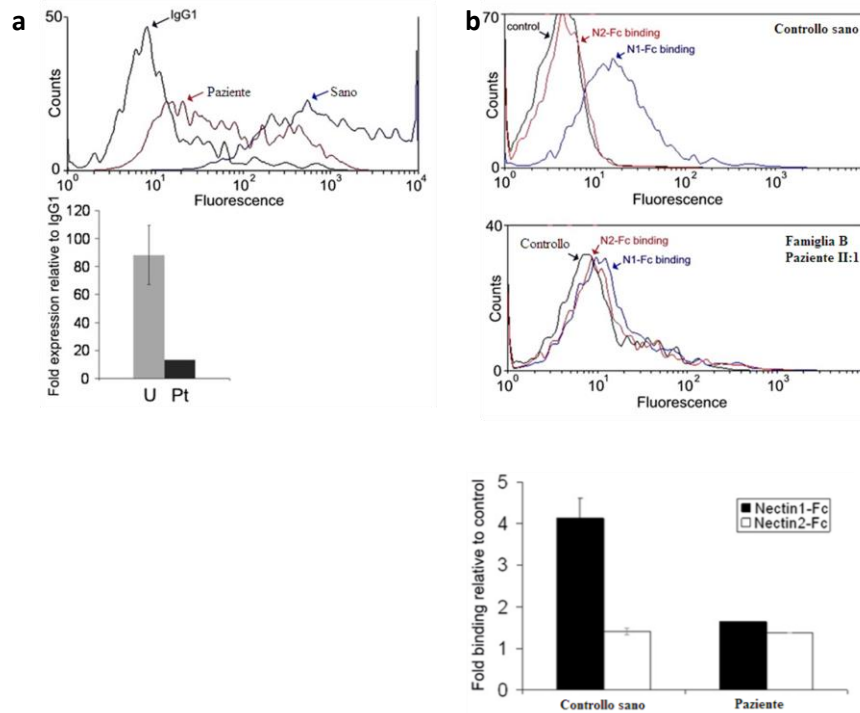


Fig. 4.7 a) L'analisi FACS sui cheratinociti dissociati evidenzia un decremento dell'espressione di superficie di nectina-4 nel paziente II:1 della famiglia B (rosso) rispetto al controllo (blu). Il relativo istogramma documenta la forte riduzione dell'espressione di nectina-4 nel paziente (pt, grigio scuro) rispetto ai valori medi di tre controlli non affetti (U, grigio chiaro).

b) *Trans*-interazione nectina-4/nectina-1 determinata mediante FACS utilizzando la proteina ricombinante solubile nectina-1-Fc.

Studi funzionali ed immunoistochimici

4.6 Analisi del trascritto del gene *PVRL4* in condizioni sane e patologiche

Al fine di comprendere la potenziale funzione di nectina-4 nei tessuti umani abbiamo analizzato l'espressione del trascritto di *PVRL4* in un pannello

commerciale umano di mRNA mediante real-time PCR. L'espressione è risultata essere ristretta alla placenta in misura maggiore ed in misura minore alla trachea, alla prostata, ai polmoni e allo stomaco (fig. 4.8a).

Poiché la pelle ed i capelli rappresentano i tessuti maggiormente interessati dall'EDSS, abbiamo testato l'espressione di nectina-4 mediante real-time PCR in biopsie cutanee, nei bulbi piliferi, nei fibroblasti in coltura ed in cheratinociti dell'epidermide in coltura a differenti stadi differenziativi. L'mRNA di *PVRL4* è significativamente espresso nella pelle, nei follicoli piliferi e nei cheratinociti in coltura ma non nei fibroblasti (fig. 4.8b).

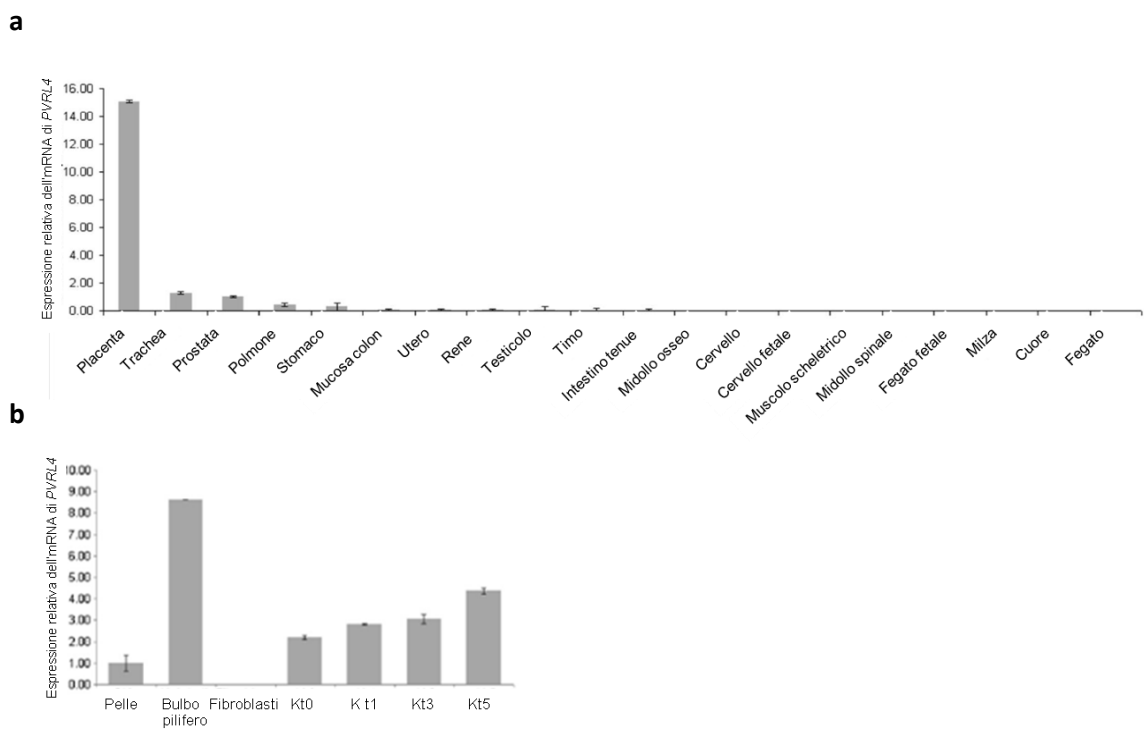


Fig. 4.8 a) Espressione del gene *PVRL4* in un pannello di tessuti umani. b) Espressione del gene *PVRL4* nella pelle in toto, nel bulbo pilifero, nei fibroblasti e nei cheratinociti in coltura a stadi differenti di sviluppo.

L'analisi dell'mRNA di *PVRL4* nei cheratinociti in coltura a stadi differenti (Fig. 4.9), ottenuti dall'epidermide del paziente II:1 (famiglia B), ha permesso di rilevare una riduzione del 50% circa dell'espressione genica rispetto ad tre controlli normali, indicando un mRNA decay, secondario alla mutazione frameshift identificata nel paziente stesso.

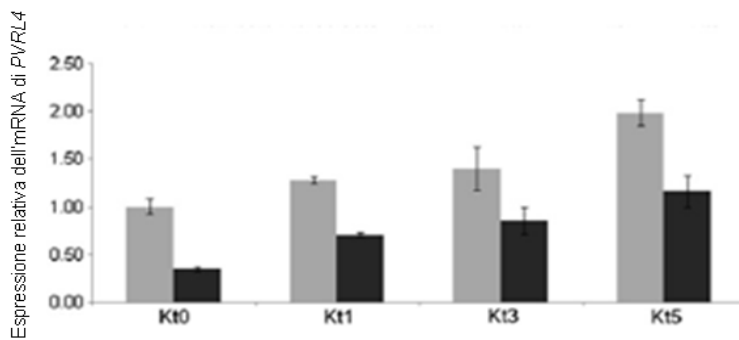


Fig. 4.9 Livelli dell' mRNA di *PVRL4* nei cheratinociti del paziente II:1 della famiglia B (grigio scuro) e di tre controlli sani (grigio chiaro)

4.7 Analisi della nectina-4 nel follicolo del capello e nell'epidermide interfollicolare

Mediante analisi immunocistochimica è stato possibile determinare la localizzazione cellulare della nectina-4 nell'epidermide interfollicolare (fig.4.10 E-F) e nel follicolo pilifero umani (fig.4.10 A-D). In particolare la proteina risulta espressa a livello dei siti di giunzione cellulari dei cheratinociti. Abbiamo osservato una colorazione positiva in tutti gli strati soprabasali nucleati dell'epidermide (dallo strato spinoso fino allo strato granulare) ed in tutte le strutture non cheratinizzate del capello con un segnale più forte all'interno della

guaina reticolare interna e della corteccia del fusto del capello. Con l'incremento della cheratinizzazione, l'espressione di nectina-4 si riduce progressivamente.

La stessa analisi immunohistochimica eseguita su sezioni di cute ottenute dal paziente II:1 (famiglia B) ha evidenziato una marcata riduzione del segnale nell'epidermide interfollicolare (fig.4.10 G-H) e soltanto un segnale residuo nel follicolo del capello (fig.4.10 I-K).

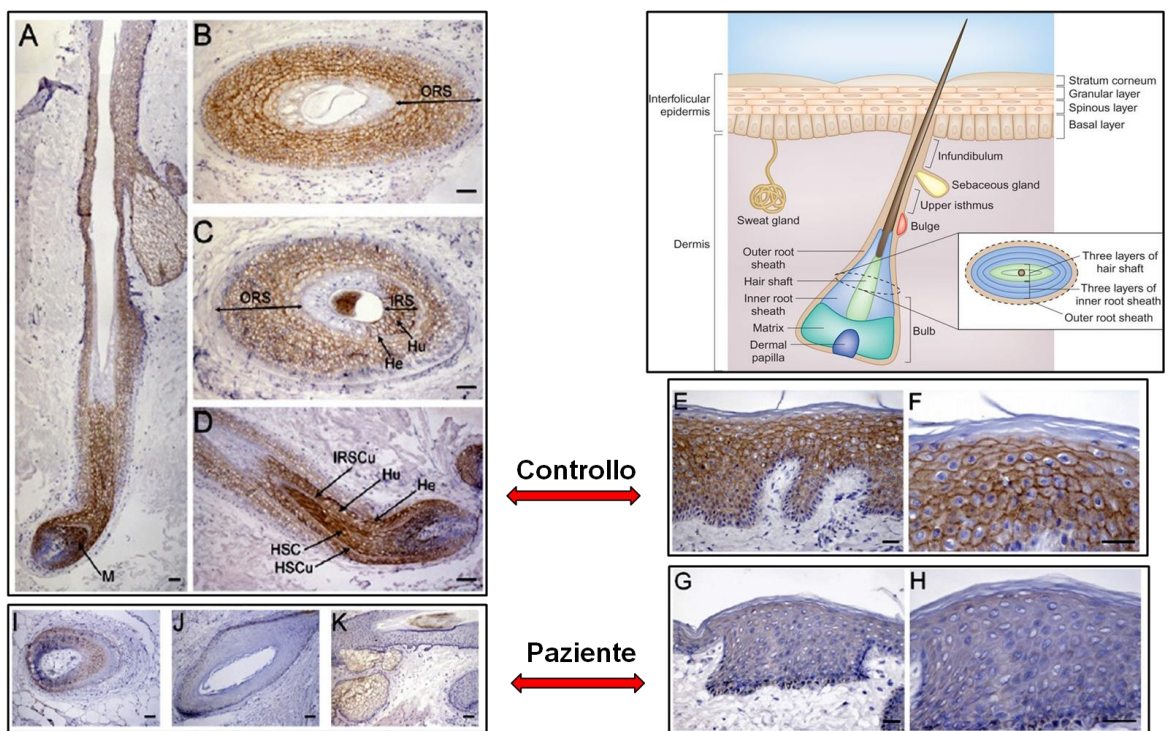


Fig. 4.10 Analisi immunohistochimica di nectina-4 nel follicolo pilifero (A-D, I-K) e nell'epidermide interfollicolare (E-H)

4.8 Analisi delle proteine delle giunzioni aderenti

Poiché le nectine promuovono la formazione delle AJs attraverso i complessi nectina-afadina e caderina-catenina, abbiamo esaminato la localizzazione degli

altri componenti delle AJs e del citoscheletro actinico in biopsie cutanee di un paziente con EDSS mediante immunistoichimica. Rispetto ad un controllo normale, la localizzazione dell'a-catenina, della b-catenina, dell'E-caderina e dell'afadina appare fortemente alterata. Inoltre l'F-actina mostra un'anomala distribuzione con perdita della localizzazione pericellulare. Tali alterazioni risultano limitate ad alcune aree del follicolo pilifero (fig.4.11a) che compongono la guaina reticolare esterna mentre non sono osservabili differenze apprezzabili nell'epidermide interfollicolare (fig.4.11b) e negli altri compartimenti del capello analizzati.

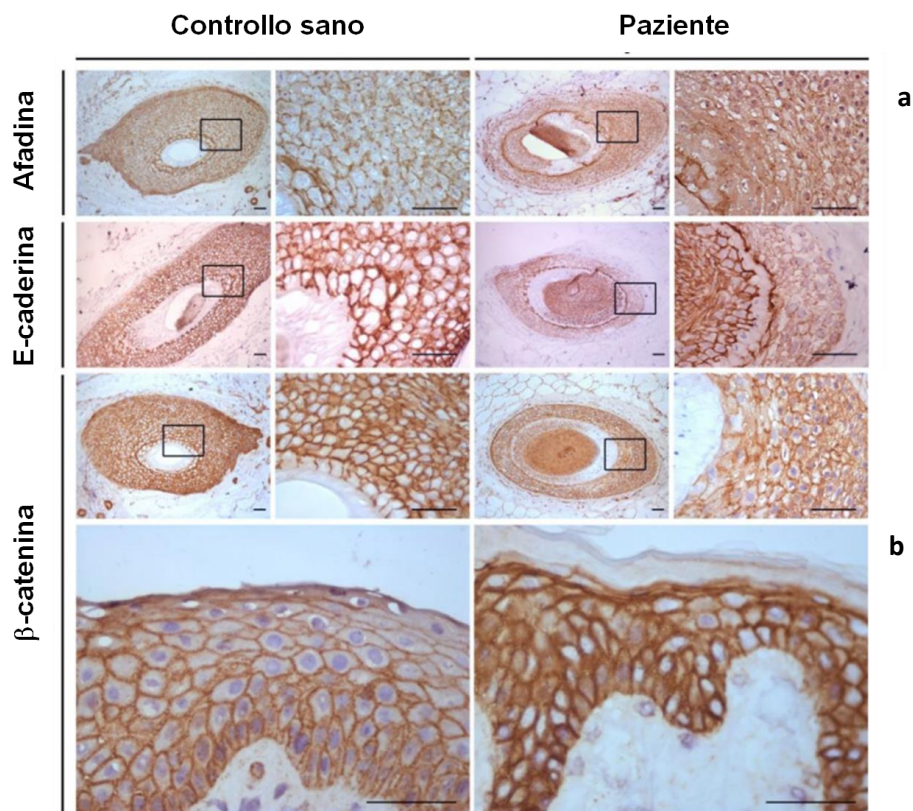


Fig. 4.11 Analisi immunistoichimica di alcune proteine delle giunzioni aderenti (Afadina, E-caderina e β-catenina) nel follicolo pilifero (a) e nell'epidermide interfollicolare (b)

4.9 Espressione del gene *Pvrl4* nell'embrione murino

La sindattilia cutanea delle dita delle mani e/o dei piedi costituisce uno dei caratteri ricorrenti dell'EDSS. Al fine di stabilire il ruolo della nectina-4 nello sviluppo embrionale murino è stata eseguita in collaborazione con l'istituto Max Plank di Berlino l'analisi di espressione dell'mRNA di *Pvrl4* in un pool di zampe di topo durante stadi differenti dello sviluppo. Nectina-4 non è espressa significativamente fino allo stadio E14.5 mentre raggiunge la massima espressione ad E16.5 e decresce negli stadi più avanzati. Per poter studiare l'espressione di *Pvrl4* nell'embrione *in toto* è stata effettuata un'analisi whole-mount in situ hybridization con un probe specifico per *Pvrl4* generato mediante PCR. L'analisi ha confermato espressione di nectina-4 nello spazio interdigitale allo stadio embrionale E15.5. Inoltre una forte espressione a livello delle radici delle vibrissae è stata osservata a partire da E13.5.

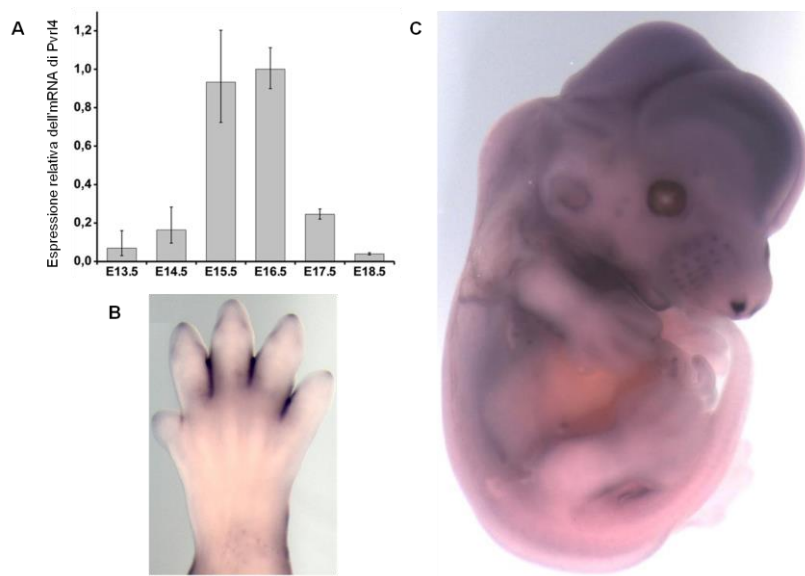


Fig. 4.12 (A) Espressione dell'mRNA di *Pvrl4* in un pool di zampe embrionali murine. Ibridazione in situ su zampa murina (B) e nell'embrione murino in toto (C) con sonda specifica per *Pvrl4*.

Ampliamento dello spettro mutazionale delle nectine-1 e -4 nelle displasie ectodermiche

4.10 Identificazione di nuove mutazioni nei geni *PVRL1* e *PVRL4* in una casistica di pazienti

L'analisi molecolare del gene *PVRL4* nel paziente della famiglia 1 è risultata negativa. Conseguentemente è stato sequenziato il gene *PVRL1*, identificando una nuova mutazione nonsense in omozigosi nell'esone 1, c.39G>A, che introduce un codone di stop in posizione Trp13. Entrambi i genitori sono risultati eterozigoti per questa mutazione.

Nei pazienti della famiglia 2 l'analisi di sequenze del gene *PVRL4* ha evidenziato una nuova mutazione nonsense nell'esone 4, c.776G>A, che sostituisce un residuo di triptofano in posizione 259 con un codone di stop. La mutazione è stata trovata in eterozigosi nei due genitori ed in omozigosi in ognuno dei due individui affetti.

Nella famiglia 3 nessuna variante è stata identificata nel gene *PVRL4* ma un inaspettato risultato è stato osservato per l'esone 2 che non poteva essere amplificato mediante PCR. Al fine di verificare la presenza di una delezione che interessa l'esone 2 abbiamo eseguito una PCR quantitativa che ha permesso di determinare un rapporto di numero di copie *PVRL4/TERT* di circa 0,5 nei genitori della paziente suggerendo una delezione in eterozigosi. Nel paziente, nessuna amplificazione dell'esone 2 è stata osservata, a conferma di una delezione biallelica. Nell'ipotesi di un effetto fondatore nella popolazione danese è stata eseguita un'analisi genome-wide SNP-array sul DNA della paziente. L'analisi ha permesso l'identificazione di una regione di omozigosità di circa 1.8 Mb sul

cromosoma 1q23.2q23.3, che include il gene *PVRL4*. Al fine di valutare l'estensione della delezione, abbiamo eseguito una long PCR, seguita dal sequenziamento della regione utilizzando differenti primers, fino all'identificazione dei punti di rottura. L'analisi di sequenza ha rilevato una delezione di 2222bp (12,537,426-12,539,467 - H. sapiens chromosome 1 genomic contig NT_004487.19) che comprende l'esone 2 e corrispondente alla mutazione p.Gly27_Leu146del risultante in frame. Nel sito della delezione una sequenza di 256 bp estranea al gene *PVRL4* risulta essere inserita. Il software BLAST per l'allineamento di sequenze ha mostrato che la stessa sequenza è presente alla distanza di 7850 bp rispetto all'estremità 5' del gene *PVRL4*. All'interno di questa sequenza è localizzato un elemento Alu di tipo *free left Alu monomer* (FLAM-C) sulla base delle informazioni estrapolate attraverso il programma RepeatMasker.

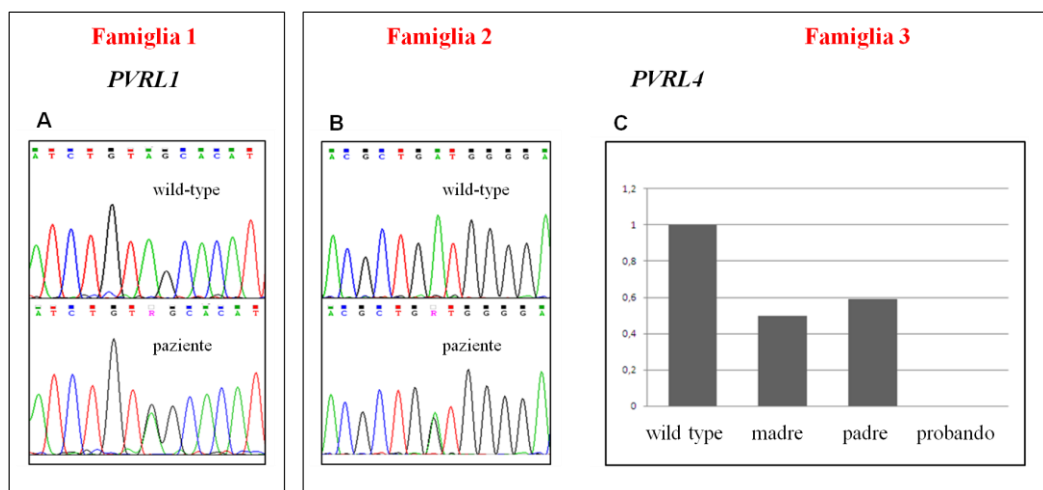


Fig. 4.13 Analisi di sequenza (A-B) e real time PCR (C) sui pazienti delle 3 famiglie con displasia ectodermica associata a sindattilia.

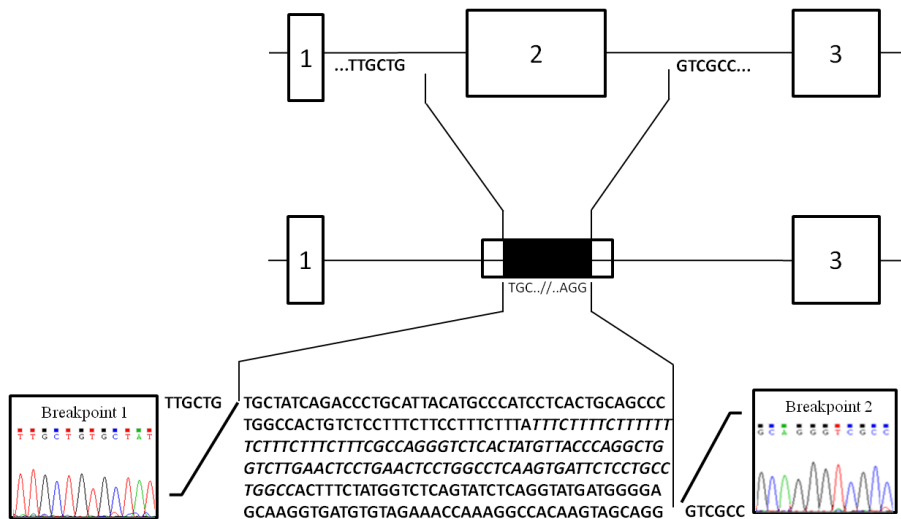


Fig. 4.14 Delezione del gene *PVRL4* identificata nel paziente della famiglia 3. L'area colorata di nero rappresenta la sequenza FLAM-c trovata come inserzione tra i due punti di rottura.

DISCUSSIONE

Le nectine sono molecole di adesione di tipo immunoglobulinico Ca^{2+} -indipendenti che partecipano alla formazione delle giunzioni cellulari in cooperazione con le caderine o indipendentemente da esse. Quattro distinte nectine sono ad oggi state identificate e contribuiscono all'adesione cellulare attraverso la creazione di interazioni omofiliche ed eterofiliche mediate dai domini immunoglobulinici. Le nectine sono connesse al citoscheletro actinico attraverso l'afadina e regolano con altre molecole di adesione e di segnalazione, molte attività cellulari, dalla migrazione alla polarizzazione, dal differenziamento all'ingresso delle particelle virali. Fino ad oggi soltanto mutazioni della nectina-1 sono state associate a patologie umane, quali la displasia ectodermica-labio/palatoschisi (CLPED1, MIM 225069) o sindrome di Zlotogora-Ogur, caratterizzata da anomalie dei capelli e dei denti, sindattilia cutanea e labio/palatoschisi e la schisi orofacciale non sindromica di tipo 7 (OFC7).

Lo sviluppo di questo progetto di ricerca ha reso possibile l'identificazione di un nuovo gene-malattia, *PVRL4*, associato ad una forma di displasia ectodermica con sindattilia (EDSS). Tale gene codifica per la nectina-4, la seconda molecola appartenente a questo gruppo ad essere coinvolta in una sindrome ereditaria. Esistono similarità tra il pattern di espressione di nectina-4 dimostrato sperimentalmente in questo studio ed il pattern di nectina-1. In particolare, negli embrioni di topo, nectina-1 è espressa da E8.5 a E16.5 e decresce dopo E18.5, con una colorazione presente in vari tessuti ectodermici, inclusi la pelle, i denti ed i capelli. Studi dettagliati di immunoistochimica su embrioni murini e su sezioni di

cute umana hanno evidenziato un'espressione positiva di nectina-1 nell'epidermide, principalmente al livello dello strato spinoso. Di notevole interesse è il dato precedentemente dimostrato di una possibile *trans*-interazione eterofilica tra nectina-1 e nectina-4, a supporto di una comune modalità di azione di queste molecole nella regolazione dell'organogenesi dell'ectoderma e dei suoi derivati. I difetti di interazione osservati nei cheratinociti del paziente rafforzano questa ipotesi. In effetti CLPED1 ed EDSS mostrano molte caratteristiche fenotipiche sovrapponibili quali, alopecia, anomalie dei denti e sindattilia mentre la labio/palatoschisi è caratteristica soltanto della CLPED1. L'espressione spazio/temporale delle altre nectine (nectina-2 e nectina-3) è stata studiata nell'embrione di topo. Nectina-2 è espressa a livello della matrice del pelo, mentre la nectina-3 risulta quasi assente nell'epidermide e nelle vibrissae. Questi dati evidenziano che le nectine sono differenzialmente espresse durante lo sviluppo embrionale, suggerendo un ruolo nella morfogenesi di distinti tessuti epiteliali.

La combinazione di difetti della morfogenesi del pelo e anomalie degli arti è stata precedentemente riportata in disordini genetici causati da molecole di adesione difettive. Un esempio interessante è rappresentato da CDH3, gene codificante per la P-caderina, le cui mutazioni causano ipotricosi con distrofia maculare giovanile (HJMD, MIM 601553) e displasia ectodermica, ectrodattilia e distrofia maculare (EEM, MIM 225280). Le anomalie dei capelli osservate nei pazienti EDSS sono quasi identiche a quelle riportate nei pazienti con l'HJMD. Recenti evidenze suggeriscono che la P-caderina è un target trascrizionale di p63, fattore che presenta un ruolo cruciale nello sviluppo del capello e nella crescita del *limb bud*. Mutazioni in p63 causano disordini dello sviluppo umano con displasia

ectodermica, anomalie degli arti e schisi facciali. Sarebbe interessante dimostrare se tale fattore abbia o meno un ruolo nella regolazione di *PVRL4*. E' già stato tuttavia dimostrato in topi difettivi per p63 a livello dell'epitelio orale, dentale e cutaneo che l'espressione di *PVRL1* non risulta alterata rispetto a quanto osservato nei topi wild-type.

Le nectine cooperano con le caderine nella formazione delle giunzioni aderenti dopo reclutamento dei complessi caderina-catenina. I nostri dati hanno dimostrato che un difetto di nectina-4 non soltanto altera il complesso nectina-afadina ma rende difettiva la formazione del complesso caderina-catenina, cruciale per la formazione delle AJs. E' possibile infatti osservare un'alterazione della localizzazione cellulare di queste molecole in alcuni strati del follicolo pilifero. Tale scompaginamento non risulta tuttavia evidenziabile a livello dell'epidermide interfollicolare non interessata dall'EDSS.

La sindattilia cutanea dipende da un difetto del processo apoptotico nei tessuti dello spazio interdigitale. Differenti pathways sono coinvolti nella regolazione della morte cellulare in questi tessuti. A tal proposito l'inattivazione di Rac nel mesenchima interdigitale determina sindattilia cutanea. Nectina-4, che abbiamo dimostrato essere espressa a livello della porzione interdigitale, è in grado di attivare la via di Rac in seguito a *trans*-dimerizzazione. La perdita dell'attivazione di Rac nectino-dipendente potrebbe quindi spiegare la presenza della sindattilia cutanea nei pazienti con EDSS.

Un numero crescente di CAMs è implicato nella patogenesi delle sindromi da displasia ectodermica come per il gene *PKP1* codificante per la placofilina-1, le cui mutazioni causano la sindrome da displasia ectodermica e fragilità cutanea

(MIM 604536). L'identificazione di una nuova molecola di adesione associata ad una displasia ectodermica non soltanto presenta vantaggi ai fini della diagnosi, dell'inquadramento e della gestione del paziente ma ha permesso un ampliamento delle conoscenze molecolari e biologiche ad oggi estremamente ridotte nell'ambito delle displasie ectodermiche. A tal proposito è opportuno fare delle considerazioni importanti. Nella nostra casistica di pazienti con displasia ectodermica associata a sindattilia è stato possibile identificare una mutazione in *PVRL1* in assenza di labio/palato schisi. Il fatto che tale difetto non rappresentasse un carattere costante della CLPED1 era già stato dimostrato (Busto et al, 1991).

In considerazione di ciò possiamo quindi considerare l'EDSS e la CLPED1 come due “*nectinopatie*” parzialmente sovrapponibili dal punto di vista clinico con caratteri gene-specifici e variabili. Infatti, nonostante la presenza di caratteristiche distinguibili come la labio/palato schisi e lieve ritardo mentale presenti in alcuni pazienti con mutazioni in *PVRL1*, in molti casi il fenotipo può essere identico a quello osservato nei pazienti mutati in *PVRL4*. Per tale ragione, al fine di migliorare il percorso diagnostico abbiamo proposto una flow-chart diagnostico molecolare che prevede in una prima fase, in assenza di labio/palatoschisi, l'analisi del gene *PVRL4* e successivamente il sequenziamento del gene *PVRL1*. Inoltre, al fine di consentire una classificazione più appropriata e semplice delle nectinopatie, abbiamo proposto una terminologia per l'EDSS e la CLPED1 basata sul gene responsabile della malattia (Tab. 5.1)

<u>Nome attuale</u>	<u>Terminologia proposta</u>	<u>Gene mutato</u>
Zlotogora-Ogur syndrome (#225060) Margarita Island ectodermal dysplasia (#225060) Ectodermal dysplasia, type 4: ED4 (#225060) Cleft lip/palate, ectodermal dysplasia syndrome: CLPED1 (#225060)	<u>Nectin 1-ectodermal dysplasia syndrome (nectin 1-EDS)</u>	<i>PVRL1</i> (<u>Nectin 1</u>)

Ectodermal dysplasia-syndactyly syndrome: EDSS (#613573)	<u>Nectin 4-ectodermal dysplasia syndrome (nectin 4-EDS)</u>	<i>PVRL4</i> (<u>Nectin 4</u>)

Tab. 5.1 Terminologia attuale e proposta per la CLPED1 e l'EDSS

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cyrus Chothia, E. Yvonne Jones. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 1997. 66:823–62
- 2) Joachim Wegener. *Cell Junctions*. Wiley, 2011
- 3) Angst B, Marcozzi C, Magee A. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 114 (Pt 4) 2001: 629–41. PMID 11171368.
- 4) Shimoyama Y, Tsujimoto G, Kitajima M, Natori M. Identification of three human type-II classic cadherins and frequent heterophilic interactions between different subclasses of type-II classic cadherins. *Biochem J.* 2000 Jul 1;349(Pt 1):159-67.
- 5) Niessen CM, Gumbiner BM. Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J Cell Biol.* 2002 Jan 21;156(2):389-399. Epub 2002 Jan 14.
- 6) Foty RA, Steinberg MS. The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. *Dev Biol.* 2005 Feb 1;278(1):255-63.
- 7) Williams EJ, Williams G, Howell FV, Skaper SD, Walsh FS, Doherty P. Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *J Biol Chem.* 2001 Nov 23;276(47):43879-86. Epub 2001 Sep 24.
- 8) Anastasiadis PZ, Reynolds AB. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol.* 2001 Oct;13(5):604-10. Review.

- 9) Noren NK, Liu BP, Burridge K, Kreft B. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol.* 2000 Aug 7;150(3):567-80.
- 10) Peifer M, Yap AS. Traffic control: p120-catenin acts as a gatekeeper to control the fate of classical cadherins in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2003 Nov 10;163(3):437-40.
- 11) Takai Y, Ikeda W, Ogita H, Rikitake Y. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008;24:309-42. Review.
- 12) Momose Y, Honda T, Inagaki M, Shimizu K, Irie K, Nakanishi H, Takai Y. Role of the second immunoglobulin-like loop of nectin in cell-cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Apr 26;293(1):45-9.
- 13) Yasumi M, Shimizu K, Honda T, Takeuchi M, Takai Y. Role of each immunoglobulin-like loop of nectin for its cell-cell adhesion activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Feb 28;302(1):61-6.
- 14) Satoh-Horikawa K, Nakanishi H, Takahashi K, Miyahara M, Nishimura M, Tachibana K, Mizoguchi A, Takai Y. Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities. *J Biol Chem.* 2000 Apr 7;275(14):10291-9.
- 15) Lopez M, Aoubala M, Jordier F, Isnardon D, Gomez S, Dubreuil P. The human poliovirus receptor related 2 protein is a new hematopoietic/endothelial homophilic adhesion molecule. *Blood.* 1998 Dec 15;92(12):4602-11.

- 16) Linnemann T, Geyer M, Jaitner BK, Block C, Kalbitzer HR, Wittinghofer A, Herrmann C. Thermodynamic and kinetic characterization of the interaction between the Ras binding domain of AF6 and members of the Ras subfamily. *J Biol Chem.* 1999 May 7;274(19):13556-62.
- 17) Asada M, Irie K, Morimoto K, Yamada A, Ikeda W, Takeuchi M, Takai Y. ADIP, a novel Afadin- and alpha-actinin-binding protein localized at cell-cell adherens junctions. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):4103-11. Epub 2002 Nov 21.
- 18) Buchert M, Schneider S, Meskenaite V, Adams MT, Canaani E, Baechi T, Moelling K, Hovens CM. The junction-associated protein AF-6 interacts and clusters with specific Eph receptor tyrosine kinases at specialized sites of cell-cell contact in the brain. *J Cell Biol.* 1999 Jan 25;144(2):361-71.
- 19) Su L, Hattori M, Moriyama M, Murata N, Harazaki M, Kaibuchi K, Minato N. AF-6 controls integrin-mediated cell adhesion by regulating Rap1 activation through the specific recruitment of Rap1GTP and SPA-1. *J Biol Chem.* 2003 Apr 25;278(17):15232-8. Epub 2003 Feb 15.
- 20) Radziwill G, Erdmann RA, Margelisch U, Moelling K. The Bcr kinase downregulates Ras signaling by phosphorylating AF-6 and binding to its PDZ domain. *Mol Cell Biol.* 2003 Jul;23(13):4663-72.
- 21) Radziwill G, Weiss A, Heinrich J, Baumgartner M, Boisguerin P, Owada K, Moelling K. Regulation of c-Src by binding to the PDZ domain of AF-6. *EMBO J.* 2007 Jun 6;26(11):2633-44. Epub 2007 May 10.
- 22) Mandai K, Nakanishi H, Satoh A, Takahashi K, Satoh K, Nishioka H, Mizoguchi A, Takai Y. Ponsin/SH3P12: an l-afadin- and vinculin-binding

- protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junctions. *J Cell Biol.* 1999 Mar 8;144(5):1001-17.
- 23) Ooshio T, Irie K, Morimoto K, Fukuhara A, Imai T, Takai Y. Involvement of LMO7 in the association of two cell-cell adhesion molecules, nectin and E-cadherin, through afadin and alpha-actinin in epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004 Jul 23;279(30):31365-73. Epub 2004 May 12.
- 24) Taya S, Yamamoto T, Kano K, Kawano Y, Iwamatsu A, Tsuchiya T, Tanaka K, Kanai-Azuma M, Wood SA, Mattick JS, Kaibuchi K. The Ras target AF-6 is a substrate of the fam deubiquitinating enzyme. *J Cell Biol.* 1998 Aug 24;142(4):1053-62.
- 25) Boettner B, Govek EE, Cross J, Van Aelst. The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the Rap1A GTPase and associates with the actin cytoskeletal regulator profilin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 1;97(16):9064-9.
- 26) Pokutta S, Drees F, Takai Y, Nelson WJ, Weis WI. Biochemical and structural definition of the l-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):18868-74. Epub 2002 Mar 20.
- 27) Nakata S, Fujita N, Kitagawa Y, Okamoto R, Ogita H, Takai Y. Regulation of platelet-derived growth factor receptor activation by afadin through SHP-2: implications for cellular morphology. *J Biol Chem.* 2007 Dec 28;282(52):37815-25. Epub 2007 Oct 30.
- 28) Tachibana K, Nakanishi H, Mandai K, Ozaki K, Ikeda W, Yamamoto Y, Nagafuchi A, Tsukita S, Takai Y. Two cell adhesion molecules, nectin and

- cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins. *J Cell Biol.* 2000 Sep 4;150(5):1161-76.
- 29) Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Nov;2(11):793-805. Review.
- 30) Sakamoto Y, Ogita H, Hirota T, Kawakatsu T, Fukuyama T, Yasumi M, Kanzaki N, Ozaki M, Takai Y. Interaction of integrin alpha(v)beta3 with nectin. Implication in cross-talk between cell-matrix and cell-cell junctions. *J Biol Chem.* 2006 Jul 14;281(28):19631-44. Epub 2006 May 5.
- 31) Fukuhara T, Shimizu K, Kawakatsu T, Fukuyama T, Minami Y, Honda T, Hoshino T, Yamada T, Ogita H, Okada M, Takai Y. Activation of Cdc42 by trans interactions of the cell adhesion molecules nectins through c-Src and Cdc42-GEF FRG. *J Cell Biol.* 2004 Aug 2;166(3):393-405. Epub 2004 Jul 26.
- 32) Ozaki M, Ogita H, Takai Y. Involvement of integrin-induced activation of protein kinase C in the formation of adherens junctions. *Genes Cells.* 2007 May;12(5):651-62.
- 33) Ogita H, Takai Y. Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, polarization, movement, and proliferation. *IUBMB Life.* 2006 May-Jun;58(5-6):334-43. Review.
- 34) Ehrlich JS, Hansen MD, Nelson WJ. Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell.* 2002 Aug;3(2):259-70.
- 35) Yamada A, Irie K, Hirota T, Ooshio T, Fukuhara A, Takai Y. Involvement of the annexin II-S100A10 complex in the formation of E-cadherin-based

- adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 2005 Feb 18;280(7):6016-27. Epub 2004 Dec 1.
- 36) Sato T, Fujita N, Yamada A, Ooshio T, Okamoto R, Irie K, Takai Y. Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 2006 Feb 24;281(8):5288-99. Epub 2005 Dec 18.
- 37) Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. Izumi G, Sakisaka T, Baba T, Tanaka S, Morimoto K, Takai Y. *J Cell Biol.* 2004 Jul 19;166(2):237-48
- 38) Kan NG, Stemmler MP, Junghans D, Kanzler B, de Vries WN, Dominis M, Kemler R. Gene replacement reveals a specific role for E-cadherin in the formation of a functional trophoblast. *Development.* 2007 Jan;134(1):31-41. Epub 2006 Nov 30.
- 39) Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J. & Kemler, R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophoblast epithelium. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 8263–8267 (1994).
- 40) Jamora, C and Fuchs, E. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *nature cell biology* vol 4 april 2002
- 41) Okabe N, Ozaki-Kuroda K, Nakanishi H, Shimizu K, Takai Y. Expression patterns of nectins and afadin during epithelial remodeling in the mouse embryo. *Dev Dyn.* 2004 May;230(1):174-86.
- 42) Ikeda W, Nakanishi H, Miyoshi J, Mandai K, Ishizaki H, Tanaka M, Togawa A, Takahashi K, Nishioka H, Yoshida H, Mizoguchi A, Nishikawa S, Takai Y. Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell

- junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J Cell Biol.* 1999 Sep 6;146(5):1117-32.
- 43) Hardy MH. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet.* 1992 Feb;8(2):55-61. Review.
- 44) Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell.* 1990 Jun 29;61(7):1329-37.
- 45) Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev.* 2001 Jan;81(1):449-494. Review.
- 46) Itin PH, Fistarol SK. Ectodermal dysplasias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004 Nov 15;131C(1):45-51.
- 47) Pinheiro M, Freire-Maia N. Ectodermal dysplasias: a clinical classification and a causal review. *Am J Med Genet.* 1994 Nov 1;53(2):153-62. Review.
- 48) Priolo M. Ectodermal dysplasias: an overview and update of clinical and molecular-functional mechanisms. *Am J Med Genet A.* 2009 Sep;149A(9):2003-13
- 49) Koppinen P, Pispa J, Laurikkala J, Thesleff I, Mikkola ML. Signaling and subcellular localization of the TNF receptor Edar. *Exp Cell Res.* 2001 Oct 1;269(2):180-92.
- 50) Jain A, Ma CA, Liu S, Brown M, Cohen J, Strober W. Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohydrotic ectodermal dysplasia. *Nat Immunol.* 2001 Mar;2(3):223-8.
- 51) Thesleff I, Mikkola ML. Death receptor signaling giving life to ectodermal organs. *Sci STKE.* 2002 May 7;2002(131):pe22. Review.