# UNIVERSITA' degli STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"

## FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

### DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

*2008 – XX ciclo*


# *ANALISI GENETICA E MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DI PATOLOGIE RARE DELL'EPIDERMIDE*


**Andrea Codispoti**

Docente Guida ***prof. G. Melino***

Coordinatore ***prof. A. Finazzi-Agrò***

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE E SCIENZE BIOCHIMICHE
VIA MONTPELLIER,1 00133 ROMA

# INDICE

**INDICE** ..... **I**

**RINGRAZIAMENTI** ..... **IV**

**RIASSUNTO** ..... **V**

**ABSTRACT** ..... **VII**

**PAROLE CHIAVE** ..... **IX**

## 1. INTRODUZIONE

- **1.1 L'epidermide** ..... 1
- 1.2 Struttura dell'epidermide ..... 3
- 1.3 Aspetti biochimici del differenziamento epidermico ..... 4
- 1.4 Le proteine dell'involucro corneo ..... 7
- 1.4.1 Le proteine ricche in cisteina ..... 10
- 1.4.2 Il citoscheletro di cheratine ..... 16
- 1.4.3 I lipidi sintetizzati nei cheratinociti e la componente lipidica dell'involucro corneo ..... 20
- 1.5 Assemblaggio dell'involucro corneo ..... 21
- 1.5.1 Iniziazione ..... 21
- 1.5.2 Formazione dell'involucro lipidico ..... 21
- 1.5.3 Consolidamento ..... 23
- 1.6 Ruolo delle proteasi e dei loro inibitori nell'epidermide ..... 25
- 1.7 Le Transglutaminasi ..... 27
- 1.7.1 Meccanismo catalitico ..... 31
- 1.7.2 Struttura, organizzazione gnomica ed evoluzione delle TGasi 34
- 1.8. Transglutaminasi epidermiche ..... 39
- 1.8.1 La TGasi 1 o TGasi cheratinocitica ..... 39
- 1.8.2 La TGasi 3 o TGasi epidermica ..... 41
- 1.8.3 La TGasi 5 o TGasi X ..... 43
- 1.8.4 TGasi 2 o TGasi tissutale ..... 49
- 1.8.5 Altri membri della famiglia delle TGasi ..... 50
- 1.9 Malattie genetiche in relazione con l'involucro corneo ..... 54
- 1.9.1 Malattie genetiche relative alle TGasi ..... 55
- 1.9.2 Ittiosi Lamellare ..... 55
- 1.9.3 Istopatologia dell'Ittiosi Lamellare ..... 56
- 1.9.4 Caratteristiche cliniche dell'ittiosi lamellare ..... 56

- **2.1 Giunzioni Comunicanti: struttura e funzioni.....58**
- 2.2 Organizzazione strutturale delle connessine e delle giunzioni comunicanti.....59
- 2.3 Selettività delle giunzioni comunicanti..... 63
- 2.4 Gap Junction: Comunicazione nella pelle .....65
- 2.4.1 Malattie genetiche associate a mutazioni della connessina26..68
- 2.4.2 La sindrome KID (keratitis ichthyosis deafness .....69
- 3.1 FALDH (Fatty Aldehyde Dehydrogenase).....71
- 3.2 Sindrome di SJOGREN-LARSSON (SLS).....75

**SCOPO DELLA TESI** .....79

- 

## 4. RISULTATI

- **4.1 Analisi Molecolare del gene TGM1 .....81**
- 4.1.1. Analisi molecolare del gene TGM1 in pazienti affetti da ittiosi lamellare .....81
- 4.1.2 Analisi prenatale.....85
- 4.2 Descrizione di una nuova e di una ricorrente mutazione nel gene ALDH3A2 in pazienti Italiani con la Sindrome di Sjogren-Larsson 87
- 4.2.1 Descrizione pazienti .....87
- 4.2.2 Analisi molecolare .....90
- **4.3 Caratterizzazione di una nuova e di una ricorrente mutazione in pazienti Italiani affetti da KID sindrome.....92**
- 4.3.1 Descrizione pazienti.....92
- 4.3.2 Analisi molecolare .....96
- 4.3.3 Analisi funzionale delle connessie wt e mutate .....99
- 4.3.4 Regolazione del flusso del calcio.....104

**DISCUSSIONE**.....**109**

**MATERIALI E METODI**

- 5.1.1 Estrazione del DNA e del RNA nei lavori presentati
- .....115
- 5.2 Amplificazione del gene TGM1.....115
- 5.3 Studio dei pazienti affetti da Sjogren-Larsson .....117
- 5.3.1 Microscopia elettronica.....117
- 5.3.2 Coltura dei fibroblasti .....117
- 5.4 Analisi del gene ALDH3A2 .....117

- 5.5 Attività enzimatica della FALDH .....118
- 5.6 Amplificazione del gene GJB2 nei pazienti affetti dalla sindrome KID .....119
- 5.7 Clonaggio delle Connessine WT e Mutanti.....119
- 5.8 Microscopia Confocale .....119
- 5.9 Trasfezioni e western blot .....120
- 5.10 Saggio per valutare i livelli di apoptosi .....120
- 5.11 Saggio ANNESSINA V.....120
- 5.12 Saggio per valutare i livelli di necrosi mediante fluoresceina di-acetato (FDA) .....121
- 5.13 Saggio per valutare i livelli di calcio mediante FLUO-3-AM 121
- 5.15 Calcium Imaging.....121

**BIBLIOGRAFIA** .....122

**CURRICULUM VITAE**.....149

**PUBBLICAZIONI**

# RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento è sicuramente rivolto al prof. Gerry Melino per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro di tesi presso il suo laboratorio. Desidero inoltre ringraziare il dott. Alessandro Terrinoni, mio supervisore in questo progetto di ricerca e la dott. Eleonora Candi per le interessanti discussioni scientifiche ed i sempre utili consigli. Un ringraziamento è inoltre rivolto anche alla dott. Francesca Bernassola ed al prof. Vincenzo De Laurenzi per i loro suggerimenti.
Vorrei inoltre ringraziare tutti quelli che mi hanno supportato e sopportato in questi lunghi anni di militanza all'interno del laboratorio, duranti i quali sono riuscito ad imparare anche diverse tecniche di lavoro non propriamente scientifiche ( ogni riferimento al GRANDE trasloco del 2005 è puramente casuale). Un grazie particolare va naturalmente a Loredana, con la quale ho condiviso a stretto contatto questi anni e affrontato ogni genere di discussione, da quelle lavorative, durante le quali ero molto spesso "l'ascoltatore" a quelle più prettamente ludiche, durante le quali combattevo per non essere solo "l'ascoltatore"…! Un grazie anche ad Anna Maria per la sua grandissima disponibilità, la sua amicizia e la sua capacità di distruggermi i timpani, naturalmente insieme alla sua collega citata in precedenza. Naturalmente non può mancare una citazione particolare per Marco dal quale ho imparato tanto nonostante il suo atteggiamento terroristico. Come dimenticare Martina, che ogni volta che parla con me inizia la frase con un NO ma solo perché sotto sotto mi vuole bene, e Flavia, l'unica ragazza del laboratorio con la quale posso avere una discussione decisamente al … maschile! Un grazie anche ad Alessandro R. e Valentina per i loro insegnamenti. Non posso non ringraziare inoltre Angelo ed Alessandro G. per le partite a calcetto ma soprattutto per il terzo tempo sempre molto *delicato*. Grazie inoltre a Cesare, che ormai naviga in altri lidi, Maura per averlo sostituito egregiamente, Lucilla per i suoi consigli, Valeria e Ivano ai quali spero di aver insegnato anche solo una piccola cosa per la quale mi ricorderanno anche in futuro, Pia per il piacevole viaggio verso Villa Vigoni e tutti i ragazzi che sono passati e ancora sono in lab che non ho citato. Il ringraziamento finale, ma non per questo meno importante, è rivolto alla mia famiglia per il sostegno e la fiducia che mi hanno sempre dimostrato.

# RIASSUNTO

Le genodermatosi o "disordini della cheratinizzazione", sono così definite perche' hanno come base dei difetti genetici, che hanno come conseguenze caratteristiche cliniche ed istopatologiche molto variabili e spesso sovrapponibili. Per questi motivi e a causa della loro rarità, la loro classificazione è molto complessa. In alcune patologie dermatologiche il meccanismo molecolare alla base della malattia può essere identificato nell'alterazione di un singolo gene, mentre in altri casi sono coinvolti numerosi fattori. In generale, si tratta di malattie deturpanti ma raramente letali che si presentano con gradi di severità variabile. I cambiamenti morfologici dei cheratinociti, durante il loro differenziamento, sono determinati da modificazioni biochimiche che riflettono un programma d'attivazione ed inibizione sequenziale a carico di vari prodotti genici specifici per il differenziamento. Qualsiasi difetto nei suoi componenti strutturali, sia proteici che lipidici, o negli enzimi responsabili della loro sintesi, del loro processamento e assemblaggio, possono distruggere la barriera epidermica o alterarne il processo di *turnover* dando luogo ad una varietà di stati morbosi. Lo studio dei diversi fattori che intervengono nello sviluppo epidermico è necessario ai fini di una maggiore comprensione delle cause dell'insorgere delle genodermatosi. In questa tesi sono state affrontate tre diverse patologie epidermiche, associate a tre diversi geni, che possiedono però alcune caratteristiche fenotipiche comuni.

Sono stati analizzati 60 pazienti italiani diagnosticati per l'ittiosi lamellare, un disturbo congenito della cheratinizzazione che si trasmette in maniera autosomica dominante, al fine di avere un quadro più ampio sulle mutazioni ricorrenti nella nostra popolazione. Abbiamo utilizzato un approccio specifico per l'analisi molecolare del gene TGM1, che codifica per la transglutaminasi 1 (TGasi1), noto per essere uno dei geni responsabili dell'insorgere della patologia. La metodica messa a punto in questo lavoro può essere considerata un approccio alla diagnosi prenatale specifica per l'ittiosi lamellare TGasi1 dipendente.

È stato inoltre affrontato lo studio di una diversa forma di ittiosi, la sindrome di Sjogren-Larsson (SLS) causata da mutazioni del gene ALDH3A2 che codifica per l'enzima FALDH, fondamentale per il metabolismo degli acidi grassi. L'obiettivo di questo studio è stato il chiarimento delle dinamiche molecolari responsabili dell'insorgere di questa patologia nella popolazione italiana al fine di utilizzare le nostre conoscenze

per una diagnosi più completa ed efficace. In questo lavoro presentiamo due casi distinti di cui uno causato dalla presenza di una mutazione fino ad oggi non ancora descritta in letteratura.

La terza patologia oggetto di questo lavoro di tesi, presenta un fenotipo ittiosico ed altre caratteristiche fenotipiche legate al differenziamento epidermico. La KID sindrome (Keratitis-Ichtyosis-Deafness) è causata da mutazioni del gene GJB2 che codifica per la connessina 26, una proteina necessaria per l'assemblaggio delle giunzioni comunicanti (*gap junction*). Nei due pazienti analizzati in questo studio sono state riscontrate due diverse mutazioni, di cui una mai descritta in letteratura, e sono state caratterizzate le due proteine mutanti al fine di evidenziare eventuali differenze funzionali, responsabili dei meccanismi che provocano l'insorgere di questa patologia. Utilizzando diversi approcci, uno citofluorimetrico, l'altro elettrofisiologico, abbiamo potuto inoltre evidenziare il coinvolgimento delle due proteine mutanti nella regolazione del flusso di calcio intracellulare e nel loro coinvolgimento nell'induzione di morte cellulare attraverso meccanismi di necrosi.

# ABSTRACT

The disorders of keratinisation are also defined “genodermatosis” because of their genetic basis, and they are characterized by very different, and often overlapping, clinical and histopathological features that affect skin. For these reasons and because of their rarity, their classification is very complex. For some of these diseases, the molecular mechanism can be identified as mutations of a single gene, but for others it involves several factors. Generally these disfiguring diseases are rarely fatal, and have different degrees of severity. The morphological changes of keratinocytes occurred during their differentiation are determined by biochemical changes as result of programmed activation and inhibition of several specific differentiation proteins. Any skin defects in its structural components (fat proteins or enzymes responsible for their synthesis), in its processing or assembly, can destroy the skin barrier or alter turnover process, resulting in a variety of pathological conditions. The study of factors involved in developing skin is indispensable for a deeper understanding of genodermatosis onset. The object of this work consists of three different skin diseases, associated with three different genes but with some common phenotypic characteristics.

We analyzed 60 Italians patients affected by lamellar ichthyosis, a congenital autosomal dominant disorder of keratinization, in order to analyze and summarize common mutation in our country. We used a specific approach for the molecular analysis of *TGM1* gene, which encodes the transglutaminase 1 (TGasi1), known as one of the responsible genes for disease onset. The method which we developed in this work can be considered an approach for prenatal diagnosis of specific TGasi1-dependent lamellar ichthyosis.

We also analyzed Sjogren-Larsson syndrome (SLS), another form of ichthyosis caused by ALDH3A2 mutations, which codes for the FALDH enzyme, a crucial protein for the fatty acids metabolism. This study aims to clarify the molecular mechanism responsible for the onset of this disease in Italy, in order to use our knowledge for a more complete and effective diagnosis. In this work we show two separate cases, one caused by a new mutation not yet described in literature.

The third pathology analyzed in this work has an ichthyotic phenotype and other phenotypic characteristics associated with epidermal differentiation. This disease, named KID syndrome (Keratitis-Ichtyosis-

Deafness), is caused by mutations in the GJB2 gene, coding for the connexin 26. This protein is necessary for gap junction assembly. In this study were found two different mutations in two patients, one of these never described in literature. We analyzed the mutant proteins arising from these two mutations in order to highlight possible differences in the functional mechanisms causing the onset of the disease. Using cytofluorometric and electrophysiological approaches, we could also clarify the involvement of the mutant proteins in intracellular calcium flow regulation and their involvement in the induction of cell death through necrosis.

**PAROLE CHIAVE:** Differenziamento epidermico, TGM1, Transglutaminasi 1, Ittiosi Lamellare, GJB2, Connessina 26, Sindrome KID, ALDH3A2, FALDH, Sindrome di Sjogren-Lrsson.

# INTRODUZIONE

## 1.1 L'epidermide

L'epidermide, la parte più esterna, pluristratificata della cute, (Figura 1) si è evoluta per fornire agli organismi una barriera fisica, essenziale per la sopravvivenza degli organismi stessi durante il loro adattamento alla vita terrestre. Questa barriera contro l'ambiente esterno esclude le sostanze e gli organismi esterni ed impedisce la perdita dei liquidi vitali, garantendo proprietà specifiche (resistenza meccanica, elasticità, impermeabilizzazione) nei diversi distretti cutanei.
L'epidermide è un epitelio costituito da diversi strati di cellule, i cheratinociti, in successivi stadi di differenziamento terminale epiteliale, processo conosciuto anche come cheratinizzazione. I cheratinociti migrano dallo strato interno proliferante, lo strato basale, verso lo strato lo strato più differenziato nella parte esterna dell'organismo, lo strato corneo (Reichert et al., 1993). Questo rappresenta il punto terminale del differenziamento ed è costituito da cellule appiattite morte, i corneociti. La membrana plasmatica di queste è costituita da un complessa struttura nota come involucro corneo formato da filamenti di cheratina inclusi all'interno di un amalgama di proteine insolubili e di lipidi. Tali proteine sono unite covalentemente da legami crociati catalizzati da enzimi specializzati, chiamati transglutaminasi (Michel et al., 1988; Kalinin et al., 2002). La componente lipidica dell'involucro corneo si trova nella parte esterna dei corneociti. L'epidermide è continuamente rigenerata, attraverso il differenziamento dei cheratinociti, creando un equilibrio omeostatico tra la rigenerazione di nuovi cheratinociti dalle cellule staminali epidermiche, il loro differenziamento e la loro perdita (desquamazione). Il processo di cheratinizzazione è altamente organizzato, sia nello spazio che nel tempo. A livello cellulare, il processo di cheratinizzazione inizia con la sintesi e l'assemblamento sotto la membrana plasmatica di un involucro corneo di tipo immaturo. Questo involucro subisce in seguito un processo di irrobustimento per attacco di proteine specifiche attraverso legami covalenti. Alla fine di tale processo di maturazione si ottiene la struttura lipidico/proteica in grado di espletare le principali funzioni fisiologiche della pelle.
Lo scopo di questo capitolo è descrivere i meccanismi che sono coinvolti nel processo del differenziamento terminale dei cheratinociti, tale processo è un meccanismo unico di morte cellulare programmata, nettamente distinto dall' apoptosi.

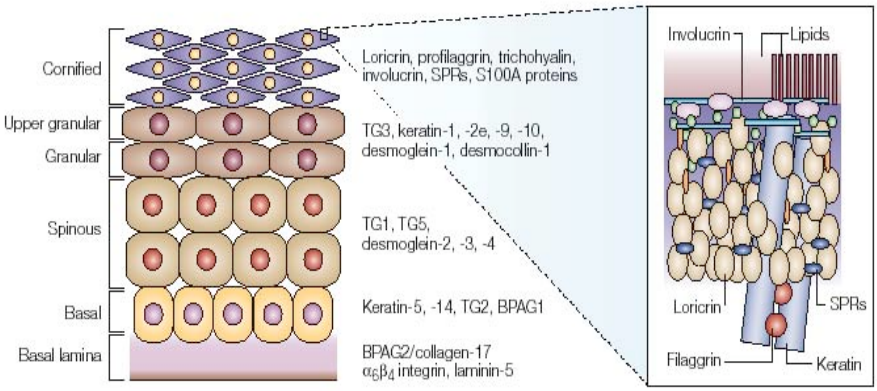



**Figura 1.** *Struttura istologica dell'epidermide.* Si notano i quattro strati che caratterizzano l'epidermide, ed i cambiamenti morfologici cui vanno incontro le cellule durante il differenziamento epidermico. Durante la sua maturazione, il cheratinocita subisce l'attivazione o l'inibizione di geni specifici di ogni strato differenziativo. L'involucro corneo è formato da una fitta rete di proteine strettamente addossate fra di loro e tenete insieme per mezzo della formazione di legami isopeptidici crociati. Da notare la predominanza delle proteine loricrina e SPRs

## 1.2 Struttura dell'epidermide

L'epidermide è un epitelio pavimentoso pluristratificato cheratinizzato desquamante, saldamente ancorato al derma attraverso la giunzione dermoepidermica o membrana basale. Ad un aspetto grossolanamente piatto della superficie esterna si contrappone una superficie interna caratterizzata dalla presenza di creste epidermiche interdigidate con le papille dermiche. In questo modo risulta estremamente aumentata la superficie di scambio tra derma ed epidermide e di conseguenza gli scambi metabolico-nutritivi. Il tessuto epidermico è costituito fondamentalmente da cellule epiteliali di origine ectodermica, i cheratinociti, disposte in strati sovrapposti, in cui si trovano sparse cellule di diversa origine embrionale (melanociti, cellule di Langerhans, cellule di Merkel) migrate nell'epidermide durante le prime fasi dello sviluppo e in periodi successivi alla nascita. L'epidermide è costituita da quattro strati cellulari (Figura 1), che rappresentano i quattro principali stadi differenziativi del cheratinocita: lo *strato basale*, posto sopra la membrana basale, lo *strato spinoso*, lo *strato granuloso* e, in superficie, lo *strato corneo*. In alcune regioni del corpo, dove la cute si presenta particolarmente ispessita, ad esempio a livello del palmo della mano e della pianta del piede, si può osservare un ulteriore strato tra quello granuloso e quello corneo, detto *strato lucido*. Lo strato basale rappresenta il compartimento proliferativo del tessuto ed è costituito da un monostrato di cheratinociti cuboidali fissati alla membrana basale attraverso emidesmosomi e giunzioni aderenti. I cheratinociti basali, caratterizzati da un'intensa attività mitotica, presentano un grosso nucleo ovale che occupa la maggior parte della cellula e un citoplasma in cui sono dispersi tonofilamenti, melanosomi e numerosi ribosomi liberi, caratteristici di una intensa attività metabolica. Tra i cheratinociti dello strato basale si distinguono le *cellule staminali*, di solito localizzate all'apice delle creste interpapillari, che mantengono una elevata capacità proliferativa lungo tutta la vita adulta, e le *cellule amplificatrici in modo transiente* che dopo un certo numero di divisioni (in genere da 1 a 5) vanno incontro a differenziamento epidermico terminale (Jones et al., 1993). Lo strato spinoso è costituito da diversi strati cellulari che possono variare da 5 a 10 a seconda delle regioni corporee e rappresenta il settore maturativo dell'epidermide (Saurat et al., 1990). I cheratinociti appaiono di forma poliedrica e connessi fra di loro da numerose interdigitazioni desmosomiali della membrana plasmatica che conferiscono alle cellule il loro tipico aspetto spinoso. Lo strato granuloso costituisce il settore differenziativo pre-terminale, caratterizzato

morfologicamente dalla presenza di grossi granuli irregolari detti di cheratoialina, dai corpi lamellari e granuli di Odland e da alterazioni involutive a carico dei nuclei. Questo strato, di spessore variabile, segna la transizione tra la porzione più interna dell'epidermide, costituita da cellule vive, metabolicamente attive, e quella più esterna, costituita da cellule morte. Nella porzione superiore di questo strato inizia la formazione *dell'involucro corneo cellulare*, che rappresenta il marcatore tipico del cheratinocita maturo. Lo strato corneo rappresenta il compartimento differenziativo terminale dell'epidermide (Plewig e Marples, 1970) ed è costituito da 15-20 strati di cheratinociti terminalmente differenziati (corneociti o squame cornee). I corneociti si presentano come cellule morte anucleate, strettamente cementate le une alle altre da una matrice extracellulare lipidica, con scarsi residui di organelli citoplasmatici, ed un involucro cellulare notevolmente ispessito. Gli spazi intercorneocitari, che costituiscono il 10% dello strato corneo (Saurat et al., 1990), sono riempiti da lipidi esocitati dai cheratinociti. Il processo di cheratinizzazione descritto si svolge in maniera continua con una durata media di circa un mese (in condizioni non patologiche), e assicura il ricambio dei cheratinociti persi con la desquamazione (Fuchs E., 1990). I cambiamenti morfologici descritti sono determinati da modificazioni biochimiche che riflettono un programma di attivazione e inibizione sequenziale e/o sincronizzata di prodotti genici specifici (Fig.1).

### 1.3 Aspetti biochimici del differenziamento epidermico

I prodotti specifici del differenziamento del cheratinocita costituiscono i componenti strutturali responsabili della proprietà meccaniche e chimiche dell'epidermide. Essi includono il citoscheletro di *filamenti intermedi di cheratina*, i *granuli cheratoialini* contenenti, in forma di precursore, la *filaggrina*, i *granuli di Odland* contenenti una miscela complessa di lipidi e le proteine dell'*involucro corneificato* (loricrina, involucrina ed altre), che sono tutti sintetizzati negli strati contenenti cellule vive e subiscono cambiamenti biochimici e nella loro organizzazione durante il processo di cheratinizzazione. Pure importanti, ai fini dell'integrità strutturale dell'epidermide, sono le componenti della membrana basale (laminine, fibronectina, collagene, etc.) che ancorano il derma all'epidermide e le proteine dei complessi di giunzione cellula-cellula e cellula-membrana (caderine, integrine, etc.). La particolare organizzazione istologica dell'epidermide deriva dall'attuazione del programma di differenziamento dei cheratinociti: il meccanismo che porta una cellula basale a progredire nei

vari strati dell'epidermide e a trasformarsi in lamella cornea prende il nome di *cheratinizzazione*, o *citomorfosi cornea*. L'epidermide mantiene l'omeostasi tramite una costante proliferazione di un singolo strato cellulare basale. All'interno di questo strato, si possono identificare due tipi di cellule. Da una parte, le *cellule staminali* sono in grado di generare ad ogni divisione una cellula figlia che mantiene le caratteristiche parentali, mantenendo quindi lo stato indifferenziato. D'altra parte, grazie alla capacità delle cellule staminali di rispondere a stimoli differenziativi, ad ogni ciclo viene generata anche una cellula figlia che è destinata a differenziarsi, chiamata *cellula amplificatrice transiente*. Questa cellula si divide molto rapidamente per un determinato numero di cicli, quindi si stacca dalla membrana basale e comincia il programma di differenziamento terminale (Figura 2). La cheratinizzazione è caratterizzata da cambiamenti progressivi della forma, dell'orientamento e della composizione biochimica del cheratinocita: la cellula aumenta di dimensione durante le prime fasi del differenziamento, si schiaccia progressivamente modificando, nello stesso tempo, il quadro di sintesi delle sue proteine; infine, quando raggiunge gli strati esterni della pelle, il cheratinocita ha perso la maggior parte dei suoi organelli, nucleo incluso, mentre vengono assemblate altre strutture, quali i corpi lamellari e l'involucro corneo. L'*involucro corneo* è una struttura stabile formata da diverse proteine tenute insieme da legami crociati di tipo covalente catalizzati da enzimi $Ca^{+2}$-dipendenti, le *transglutaminasi* (TGasi). Il prodotto finale del differenziamento del cheratinocita consiste quindi di un involucro corneo contenente macrofibrille di cheratina. Ceramidi e acidi grassi, contenuti nei corpi lamellari, vengono riversati all'esterno e risultano legati covalentemente all'involucro corneo. Il cheratinocita si è così trasformato in una lamella cornea che verrà persa dalla superficie della pelle per desquamazione. In media, l'intero processo dura 30 giorni. Le modifiche che si verificano nel cheratinocita durante il processo di maturazione terminale sono quindi dovute a variazioni dell'attività di enzimi specifici, quali le transglutaminasi, le protein-chinasi, le fosfatasi e le sulfidril-ossidasi, ed all'espressione di proteine strutturali (K1 e K10), di proteine della matrice interfilamentosa (filaggrina) e di proteine dell'involucro corneo (involucrina, loricrina, SPRs ed altre).

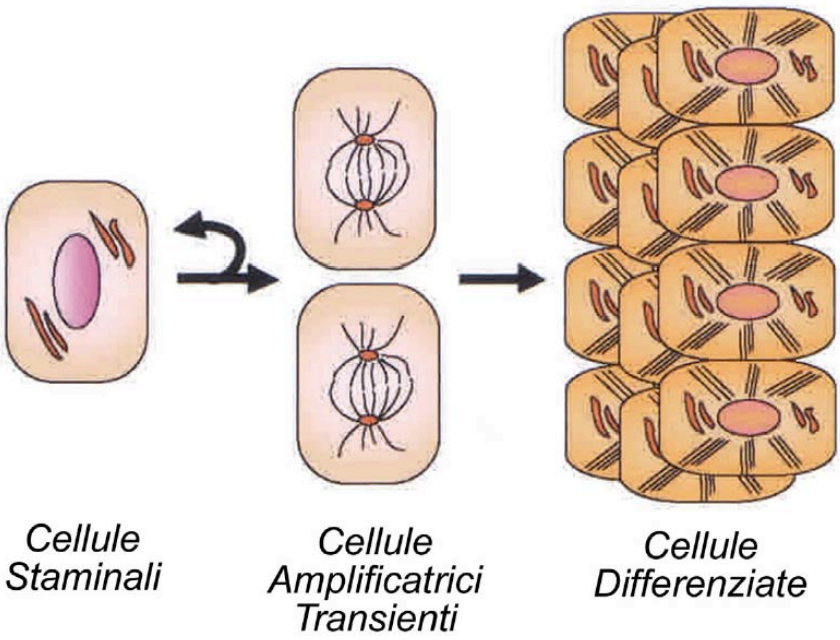



**Figura 2**. *Ciclo rigenerativo delle cellule staminali*. Le cellule staminali si rigenerano e producono anche le cellule amplificatrici transienti, che a loro volta creano una progenie che, durante il differenziamento, si muove verso l'alto, fino a trasformarsi nel corneocita.

## 1.4 Le proteine dell'involucro corneo

Il differenziamento terminale degli epiteli pluristratificati squamosi, tra cui l'epidermide, termina con la formazione di una struttura lipo-proteica altamente resistente ed insolubile, che riveste i cheratinociti differenziati,nota come involucro corneo (*Cornified Envelope*, CE). La sua costituzione inizia nello strato granuloso ed assume gradualmente una funzione protettiva a sostituzione della membrana plasmatica (Farbman, 1966). Per i morfologisti, l'involucro corneo è una banda elettrondensa, detta *banda marginale*, posta sotto la membrana plasmatica del cheratinocita, che compare prima nelle cellule superficiali granulari degli epiteli squamosi stratificati che differenziano in maniera terminale (Brody, 1969; Hashimoto, 1969; Ishida-Yamamoto e Iizuka, 1995) e quindi aumenta gradualmente di spessore e densità. Gli involucri cornei maturi coprono e incorporano le placche desmosomiali e utilizzano le proteine che le costituiscono per la loro stessa costruzione (Steinert e Marekov, 1995; Robinson et al., 1997; Steinert e Marekov, 1997), formando uno strato morfologicamente uniforme di circa 15 nm di spessore nelle cellule morte che hanno completato il differenziamento (Jarnik et al., 1998). I biochimici usano il termine involucro corneo per indicare la frazione più insolubile estratta dagli epiteli squamosi stratificati, riferendosi alla massa che rimane dopo l'esaustiva rimozione delle cheratine, dei lipidi e di altri componenti solubilizzati da detergenti, agenti riducenti (come il β -mercaptoetanolo); (Sun e Green, 1976) e agenti caotropici concentrati, come urea e guanina-HCl (Steinert e Marekov, 1995; Matolsy e Matolsy, 1966). L'estrema insolubilità dell'involucro corneo *in vivo* è il risultato della polimerizzazione macromolecolare di diverse proteine cheratinocitiche, tramite formazioni di legami disulfidici e isopeptidici. Comunque, i ponti disulfidici formati dalle sulfidril-ossidasi (Yamada et al., 1987) sono persi durante le procedure di isolamento dei CE necessarie per rimuovere la grande massa di cheratine (Hohl et al., 1991). Quindi, l'involucro corneo analizzato *in vitro* è costituito in pratica da un polimero proteico macromolecolare altamente insolubile, tenuto insieme da legami isopeptidici (Hohl et al., 1990; Polakowska e Goldsmith, 1991; Reichert et al., 1993; Simon, 1994; Eckert et al., 1997), e potrebbe essere differente in qualche modo nella struttura e nella composizione dalla struttura presente *in vivo*. Nonostante questo, i frammenti di CE isolati da molti tipi di epiteli appaiono come uno strato dello spessore unirforme di 15 mm (Jarnik et al., 1998). L'involucro corneo è costituito per il 90% da proteine e per il 10% da lipidi (Swartzendruber et

al., 1989). Alcuni di questi lipidi sono legati covalentemente alle proteine dell'involucro corneo, e formano lamelle lipidiche intercellulari che contribuiscono ad esplicare la funzione di barriera protettiva dell'epidermide. Il loro ruolo nella composizione dell'involucro corneo verrà approfondito successivamente. Gli amminoacidi più abbondanti nell'involucrocorneo sono: la glicina (23-33%), la serina (14-21%) e la cisteina (2-4%). La composizione varia leggermente in base al tipo di estrazione chimica e all'area del corpo da cui la cute è stata prelevata. Alla luce di queste considerazioni, un modello strutturale dell'involucro corneo (Figura 3) prevede un insieme di proteine legate covalentemente da legami isopeptidici (inter-proteina) e da ponti disolfuro. I legami isopeptidici o legami crociati che si formano tra un residuo di glutamina e uno di lisina, localizzati su due diverse catene proteiche, sono detti anche legami ε-(γ-glutamil)lisina, la cui formazione è catalizzata dalle transglutaminasi. Inoltre, i legami tra bis(γ-glutamil)poliammine e i residui di lisina contribuiscono a stabilizzare l'involucro corneo (Piacentini et al., 1988; Martinet et al., 1990). L'instaurarsi di ponti disolfuro dipende probabilemente anche dall'azione di sulfidril-ossidasi. Un enzima di 66 kDa che catalizza *in vitro* la formazione di legami disolfuro è stato isolato dall'epidermide di topo (Yamada et al., 1987). E' quindi possibile ipotizzare che esistano anche *in vivo* delle sulfidril-ossidasi coinvolte nella formazione di tali legami.

*Involucrina*

Il gene dell'involucrina è localizzato in un cluster genico, insieme ai geni di numerose altre proteine del CE, che formano il complesso di differenziamento epidermico (EDC, tabella 2), posto sul cromosoma 1q21 (Voltz et al., 1993; Minschke et al., 1996)
L'involucrina è una proteina che normalmente partecipa all'assemblaggio dell'involucro corneo (Rice et al., 1977), anche se può essere espressa in altri tipi cellulari di origine non epiteliale. I residui aminoacidici più abbondanti nella proteina umana sono glicina e aspartato. Analogamente ad altre proteine precursori dell'involucro corneo, l'involucrina è costituita da sequenze aminoacidiche ripetute, che hanno subito riarrangiamenti notevoli durante l'evoluzione (Eckert & Green, 1986). La struttura secondaria dell'involucrina è costituita principalmente da α-elica (Yaffe et al., 1992). L'involucrina viene utilizzata come subtrato dalla TG1, che preferenzialmente utilizza i residui aminoacidici Gln495 e 496 (Simon et al.,

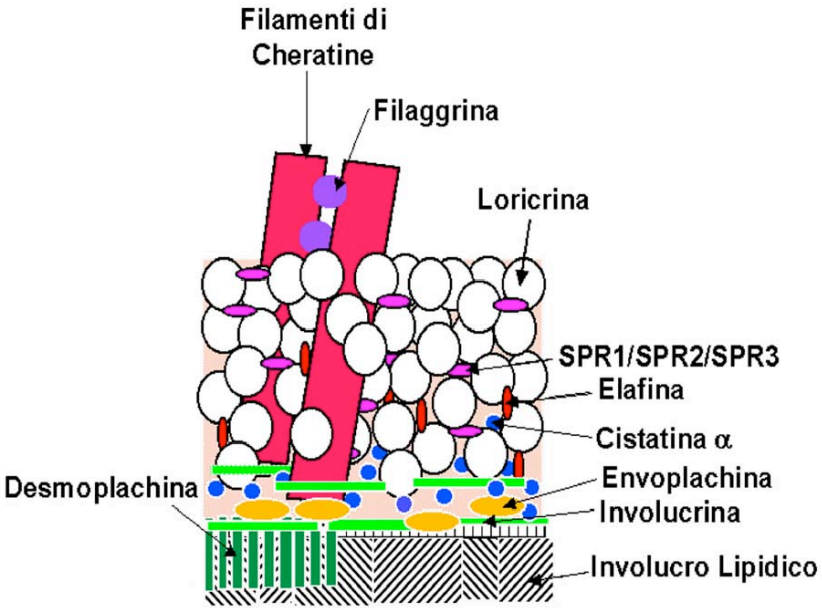



**Figura 3.** *Modello strutturale dell'involucro corneo.* L'involucro corneo è formato da proteine che sono legate covalentemente mediante l'attività delle transglutaminasi. La loricrina e le SPRs sono le proteine intracellulari più abbondanti, mentre l'involucro lipidico conferisce delle specifiche caratteristiche fisiche alla struttura.

1988). L'involucrina si presenta legata covalentemente a diverse proteine precursori dell'involucro corneo ed è una delle prime proteine utilizzate dalle transglutaminasi durante l'assemblaggio dell'involucro corneo e crea un'impalcatura alla quale poi si uniscono altre proteine per formare l'involucro corneo maturo. Inoltre, essendo, come detto, una delle prime proteine ad essere utilizzata dalle trasglutaminasi, si trova in prossimità della membrana plasmatica cellulare. Poiché la membrana basale viene eliminata durante il differenziamento epidermico, l'involucrina potrebbe essere la proteina alla quale i lipidi che si trovano nello spazio extra-cellulare, soprattutto le cerammidi, si legano covalentemente per formare la superficie esterna lipidica dell'involucro corneo (Nemes et al., 1999).

### 1.4.1. Le proteine ricche in cisteina

Il gruppo di proteine ricche in cisteina comprende diverse proteine caratterizzate dall'inconsueta abbondanza di residui di cisteina, e comprende almeno quattro membri. La *loricrina*, sintetizzata a livello dello strato granuloso, è il componente fondamentale dell'involucro cellulare (Hohl et al., 1991). La loricrina umana ha un peso molecolare teorico di 26 kDa, è caratterizzata da un elevato numero di residui di cisteina ed è insolubile in tutti gli stadi del differenziamento epidermico. L'insolubilità della loricrina dipende in parte dalla presenza di legami disolfuro e in parte dalla rapidità con cui viene assemblata nell'involucro corneo dalle transglutaminasi epidermiche (Mehrel et al., 1990). La loricrina presenta un alto contenuto di glicina (46.8%), di serina (22.8%) e di cisteina (6%). Questi amminoacidi sono anche i più abbondanti negli involucri cornei (Hohl et al., 1991), e tale somiglianza dimostra che la loricrina è il componente principale dell'involucro cellulare. Strutturalmente la loricrina può essere suddivisa in domini distinti: domini ricchi in glicina e serina separati da domini ricchi in glutamina e legati ai domini amino- e carbossi-terminali ricchi in lisina e ricchi in lisina e glutamina (Mehrel et al., 1990; Hohl et al., 1991). I residui aminoacidici di serina, glicina e cisteina sono configurati in peptidi tandem quasi ripetuti (glicinaserina-cisteina). Queste sequenze assumono una conformazione ad anello resa possibile dalla presenza di residui aromatici (fenilalanina e tirosina) ed alifatici (valina e isoleucina) tra i peptidi tandem quasi ripetuti; gli anelli aromatici tendono ad associarsi in maniera ordinata escludendo le sequenze ricche in glicina che sono così costrette a ripiegarsi (Hohl et al., 1991; Steinert et al., 1991). La stessa struttura di peptidi in

Tabella 2 | **Precursori proteici dell'involucro corneo**

| **Nome** | **Locus Genico** | **Grandezza** | **Abbondanza relativa nei CE dell'epidermide** | **Siti di cross-linking definiti *in vivo*?** |
|---|---|---|---|---|
| Involucrina | 1q21 (EDC) | 65 | 2-5% | Sì |
| Loricrina | 1q21 (EDC) | 26 | 80% | Sì |
| SPRs | 1q21 (EDC) | 6-26 | 3-5% | Sì |
| Cistatina α | 3cen-q21 | 12 | 2-5% | Sì |
| Proelafina | 20q12-q13 | 10 | <1% | Sì |
| (Pro)filaggrina | 1q21 (EDC) | >400 | <1% | Sì |
| Cheratine di tipo II | 12q13 | 56-60 | <1% | Sì |
| Desmoplachina | 6p21-ter | 330/250 | <1% | Sì |
| Envoplachina | 17q25 | 210 | <1% | Sì |
| Periplachina | 16p13.3 | 195 | <1% | Sì |
| Proteine S100 | 1q21 (EDC) | 12 | <1% | No |
| Annessina I | 9q12-q21.2 | 36 | <1% | No |

EDC, epidermal differentation complex; CE, involucro corneo. Nemes e Steinert, 1999.

tandem quasi ripetuti è presente nei domini terminali delle cheratine K1 e K10. Anche nelle cheratine queste sequenze potrebbero adottare una configurazione ad anello (Zhou et al., 1988). E' quindi possibile che le sequenze ricche in glicina e serina della loricrina e i domini terminali delle cheratine possano interagire nel corneocita e generare punti di contatto tra il citoscheletro e l'involucro corneo (Hohl et al., 1991). La loricrina viene assemblata in un involucro corneo preesistente ed ha il ruolo di "rinforzare" tale involucro e di rendere l'epidermide flessibile attraverso l'interazione con la rete di filamenti di cheratina. I domini ricchi in glutamina e in lisina-glutamina della loricrina costituiscono il substrato per le transglutaminasi. La proteina fornisce sia il residuo donatore che quello accettore di gruppi acilici. La TGasi 1 agisce sulla loricrina formando principalmente legami crociati intramolecola, generando in questo modo una molecola di loricrina più compatta, mentre la TGasi 3 forma soprattutto legami intermolecola, costituendo così dimeri o oligomeri della proteina. L'*elafina* (elastase specific inhibitor, conosciuta anche come SKALP, skin derived anti-leukopetidase) è un componente minore degli involucri cornei dell'epidermide umana adulta, è espressa in maniera transiente nell'epidermide fetale e neonatale, ma è altamente espressa nella pelle lesionata o psoriatica e nei cheratinociti in coltura (Molhuizen et al., 1993; Schalkwijk et al., 1993; Alkemade et al., 1994; Nonomura et al., 1994; Pfundt et al., 1996). La suprabasina è un gene recetentemente identificato nei cheratinociti umani e murini in differenziamento (Park et al., 2002). Il cDNA che codifica per la suprabasina è stato identificato per la prima volta nell'epidermide di topo, fra lo strato proliferativo basale e le popolazioni sovrabasali in differenziamento. E' stato ipotizzato che la elafina funzioni come proteina-ponte fra le molecole di loricrina (Steinert e Marekov, 1995). Gli altri due membri della famiglia di proteine ricche in cisteina sono stati scarsamente studiati, e sono una proteina isolata dai granuli di cheratoialina con peso molecolare di 19.5 kDa (9.2% di residui di cisteina) (Matoltsy e Matoltsy, 1970) ed una proteina denominata *CREP* (*cystine-rich envelope protein*) sintetizzata a livello dello strato spinoso con peso molecolare di 16 kDa (4.3% di residui di cisteina) (Takahashi e Tezuka, 1987).

*SPR*

Le SPR (*small prolin-rich proteins - piccole proteine ricche in prolina-*) sono una famiglia di proteine (6-18 KDa) con sequenza aminoacidica simile, ricca in Prolina. Si suddividono in tre sottogruppi: SPR1 (2 proteine), SPR2

(10 proteine) e SPR3 (1 proteina). Le SPR hanno la stessa organizzazione strutturale: hanno un dominio di testa (N-terminale) e di coda (C-terminale) in cui sono abbondanti i residui di Gln e Lys, e un dominio centrale costituito da unità variabili (2-10) di sequenze peptidiche ripetute costituite da 8 residui (SPR1, SPR3) o da 9 residui (SPR2), queste sequenze ripetute sono ricche in Prolina. In soluzione le SPR non hanno una struttura organizzata, la minima struttura presente è dovuta alle sequenze ripetute ricche in Prolina (Tarcsa et al., 1998; Candi et al., 1999; Steinert et al., 1999). In vitro le SPR sono substrato delle transglutaminasi e i residui di Glutammina e Lisina utilizzati dalle transglutaminasi sono quelli che si trovano nei domini N- e C-terminali. Il contributo delle SPR all'assemblaggio e alla funzione dell'involucro corneo potrebbe essere simile a quello descritto per la loricrina. Infatti, la disorganizzazione strutturale delle SPR potrebbe contribuire a conferire elasticità all'involucro corneo mentre i legami catalizzati dalle transglutaminasi contribuiscono a determinare la resistenza meccanica. Il contenuto relativo di loricrina e SPRs nell'epidermide può essere diverso nelle diverse aree del corpo dell'organismo e può dipende dallo spessore dell'epidermide. Infatti, il rapporto SPR:loricrina può variare da <1:100 nell'epidermide sottile del tronco a 1:10 nell'epidermide del labbro, del palmo della mano e della pianta dei piedi, a >1:3 in quella dello stomaco anteriore dei roditori (Steinert et al., 1998). Questa variazione è alla base delle diverse proprietà di elasticità e resistenza meccanica dei diversi organi. Inoltre, nell'epidermide umana l'espressione delle SPR2 aumenta durante l'invecchiamento e dopo esposizione ai raggi ultravioletti. Da un punto di vista strutturale, il dominio centrale delle SPR è costituito da ripiegamenti beta (Steinert et al., 1999).

*Profilaggrina*

La profilagrina umana è una proteina di circa 500KDa, strutturalmente complessa. E' inizialmente fosforilata ed accumulata nei granuli di cheratoialina. Durante il processo di cheratinizzazione dell'epitelio la profilaggrina viene defosforilata, processata proteoliticamente e come filaggrina monomerica viene utilizzata dalle transglutaminasi per essere parte dell'involucro corneo (Figura 4) (Resing et al., 1985; Resing et al., 1993). L'organizzazione strutturale della filaggrina consiste in una serie di sequenze tandem ripetute di circa 35KDa, separate da peptidi di 7-10 aminoacidi detti peptidi di collegamento o "linker" (Gan et al., 1990). I domini ripetuti di filaggrina sono carichi positivamente essendo ricchi di

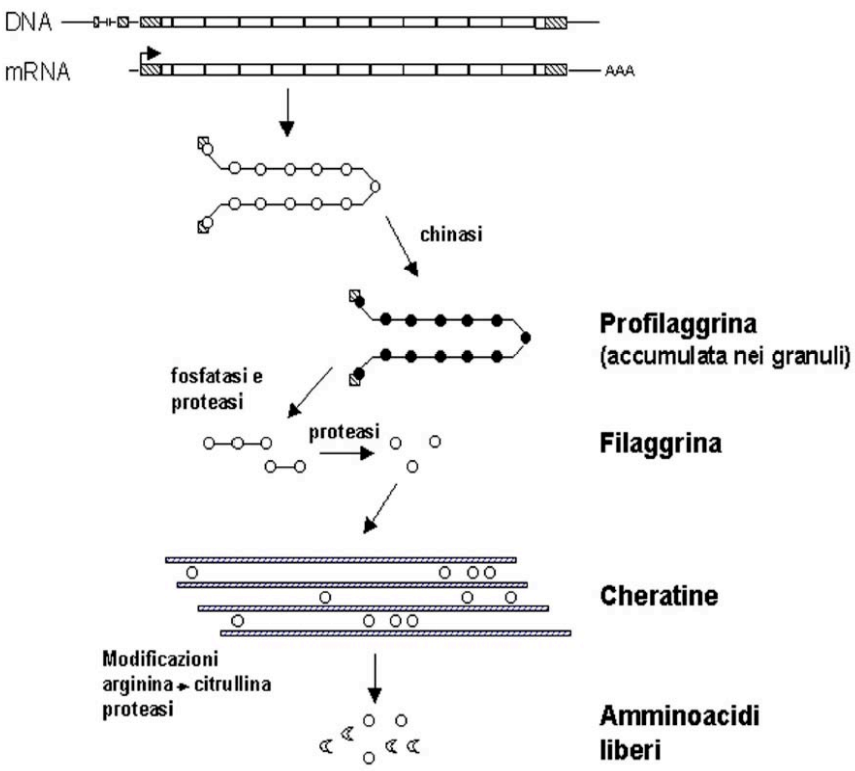



**Figura 4.** *Sintesi della profilaggrina e modificazioni post-traduzionali.* Nello schema è mostrato il processo di sintesi della profilaggrina e della filaggrina, la sua interazione con i filamenti di cheratina e la degradazione a singoli amminoacidi. Queste modificazioni avvengono nei vari strati dell'epidermide.

Arginina e Istidina, ed è stato ipotizzato che queste regioni cariche positivamente possano interagire con i residui carichi negativamente dei filamenti di cheratina (Mack et al., 1993). Inoltre i primi 80 residui aminoacidici della filaggrina contengono due "EF-hand" domini leganti il calcio tipici delle proteasi e di altre proteine leganti il calcio (Markova et al., 1993). La struttura secondaria è conservata ed è formata da porzioni ripetute di tetrapeptidi che assumono una configurazione di ripiegamento beta (Mack et al., 1993). Come ci si aspetterebbe da una proteina che funziona da "collante" per i filamenti intermedi di cheratina, la filaggrina non è una proteina strutturalmente organizzata. In vitro la filaggrina ha la proprietà unica di aggregare i filamenti intermedi di cheratina a formare delle fascicole di filamenti molto salde tra loro, in cui le molecole di cheratina sono associate in modo estremamente ordinato (Steinert et al., 1981). L'effetto dell'azione della filaggrina determinerebbe il collasso del citoscheletro del cheratinocita con conseguente modifica della morfologia della cellula che da ellissoide assume una forma piatta con i fasci di filamenti di cheratina paralleli alla superficie esterna dell'epidermide. Nell'involucro corneo, la filaggrina viene degradata interamente a livello di singoli aminoacidi, questo determinerebbe un accumulo di aminoacidi idrofobici nella cellula (fino a 100mM) essenziale per la ritenzione idrica che contribuisce alla flessibilità dell'involucro corneo.
In sostanza, tre sono le funzioni più importanti della filaggrina: (1) allinea i filamenti intermedi di cheratina, (2) controlla il cambiamento morfologico delle cellule, (3) mantiene idratata l'epidermide.

*Tricoialina (THH)*

La tricoialina, è la proteina principale dei granuli di tricoialina, presenti nello strato granuloso dell'epidermide e di altri tessuti specializzati quali il palato duro e le rilevanze filiformi della lingua. Nonostante la presenza di numerosissimi residui carichi elettricamente, la THH ha una scarsissima solubilità in acqua ed è formata da di una serie di sequenze peptidiche ripetute di 23-25 aminoacidi ricche in Glutammina e Lisina che funzionano come substrato per le TG. La THH forma una singola catena in $\alpha$-elica, e contiene un domino di legame del calcio (mano EF) all'amino terminale Miscкhie et al., 1996; O'Keele et al., 1993).
La THH ha tre funzioni: (1) è una proteina della matrice interfilamentosa substrato delle transglutaminasi, (2) svolge un ruolo di rinforzo dell'involucro corneo; in questo caso viene legata a numerose proteine

incluse involucrina e SPR. (3) Infine coordina i legami tra i filamenti intermedi e l'involucro corneo. Quindi la THH è essenziale per la resistenza meccanica dell'involucro corneo e per il coordinamento della rete dei filamenti intermedi.

### 1.4.2. Il citoscheletro di cheratine

Attraverso tecniche di immunofluorescenza e di microscopia elettronica, è possibile evidenziare, all'interno della maggior parte delle cellule eucariotiche, un intricato reticolo di filamenti proteici che, in quanto responsabile della forma e dell'organizzazione interna del citoplasma, viene indicato come *citoscheletro*. Questa formazione intracellulare svolge non solo ruoli prettamente strutturali, ma è dotata di una struttura dinamica e flessibile, in grado di modificarsi in risposta alle diverse condizioni ed esigenze della cellula. Oltre a fornire un'organizzazione spaziale agli organelli e a contribuire al traffico vescicolare, il citoscheletro gioca un ruolo fondamentale anche nella mitosi e, insieme con la matrice extracellulare e le giunzioni di membrana, nel movimento della cellula, nella regolazione del ciclo vitale e nel mantenimento del suo stato di differenziamento. L'impalcatura citoscheletrica è costituita da un'intricata rete di polimeri proteici; questi possono essere distinti al microscopio elettronico in base al loro diametro in tre classi: i *microtubuli*, i *filamenti intermedi* e i *microfilamenti* con un diametro, rispettivamente, di 25, 10 e 7 nm. I microtubuli sono polimeri di tubulina, un dimero composto da una subunità di alfa- e una di beta-tubulina. I microfilamenti derivano dall'aggregazione di monomeri di actina globulare. I filamenti intermedi (*Intermediate Filaments*, IF) costituiscono un insieme numeroso ed eterogeneo di proteine fibrose accomunate da motivi strutturali e di sequenza. Studi recenti hanno evidenziato come, in realtà, questi tre tipi di filamenti proteici di per sé non siano in grado di dar luogo a un'impalcatura stabile e funzionale; in effetti, la complessa architettura del citoscheletro sembrerebbe dipendere da numerose proteine accessorie che collegano i filamenti tra loro e ad altre strutture della cellula (Tanaka et al., 1991; Stappenbeck et al., 1993). Nell'uomo sono stati identificati più di 50 differenti geni codificanti per le proteine degli IF, che sono espressi differenzialmente in quasi tutte le cellule del corpo. Gli IF generalmente costituiscono l'1% circa delle proteine totali, sebbene in alcune cellule, come i cheratinociti e i neuroni, possano ammontare fino all'85% delle proteine

delle cellule completamente differenziate. Cellule differenti esprimono set differenti di IF, cosicché ciascun tipo cellulare presenta il proprio citoscheletro di IF fatto su misura per assolvere alle sue specifiche necessità strutturali (Fuchs e Weber, 1994). In base al grado di omologia dei domini centrali delle loro proteine componenti, gli IF sono stati suddivisi in cinque tipi principali: IF di tipo I o cheratine acide (4.5<pI<5.5); IF di tipo II o cheratine basiche (6.5<pI<8); proteine IF di tipo III vimentina-simili; proteine IF di tipo IV o proteine dei neurofilamenti e proteine IF di tipo V o lamìne. Gli IF espressi specificatamente nei tessuti epiteliali sono i filamenti intermedi di cheratina (Keratin Intermediate Filaments, KIF). i quali sono eterodimeri obbligati di catene proteiche cheratiniche (Steinert et al., 1988; Albers and Fuchs, 1992). Le cheratine sono costituite da una regione centrale di 310 amminoacidi ad α -elica, altamente conservata in sequenza e lunghezza, che presenta breve interruzioni, detti linkers non elica. I domini carbossi- e ammino-terminali non hanno una struttura ad α -elica e differiscono nella dimensione e sequenza fra le diverse cheratine. Il dominio centrale è responsabile dell'assemblamento dei filamenti stessi e dell'interazione con le proteine associate ai filamenti. Le cheratine hanno un peso molecolare compreso tra 40 e 67 KDa; in base al punto isoelettrico vengono distinte in cheratine di tipo I (o acide) e di tipo II (basiche). Gli eterodimeri che costituiscono l'unità fondamentale dei KIF, detta protofilamento, sono formati da una cheratina di tipo I ed una di tipo II. Negli epiteli umani sono state identificati 19 tipi diversi di cheratine, contraddistinte da un numero progressivo da 1 a 19 secondo il catalogo di Moll (Moll et al., 1982); fino ad oggi nell'epidermide ne sono state riscontrate 8. Durante il suo processo di maturazione il cheratinocita sintetizza coppie diverse di cheratine, le cheratine K5 e K14 (58 e 50 kDa rispettivamente) nello strato basale e le coppie K1/K10, K1/K11 e K2/K10, K2/K11 (pesi molecolari compresi tra 56.5 e 67 kDa) negli strati soprabasali (Figura 5). Inoltre, alcuni geni come quelli codificanti per le cheratine K6 e K16 sono attivati nelle regioni iperproliferative dell'epidermide (pianta del piede e palmo della mano) (Saurat et al., 1990). La quantità di cheratine aumenta procedendo attraverso i diversi strati dell'epidermide dall'interno verso l'esterno; nello strato basale le cheratine costituiscono il 30% delle proteine totali e, dopo essersi associate ai granuli di cheratoialina nello strato granuloso, arrivano a costituire l'85% in quello corneo (Saurat et al., 1990).
I KIF formano una tipica struttura a raggiera anastomizzata (Fig.4) che, dalla regione paranucleare della cellula, si estende fino alla membrana plasmatica, dove entra in relazione con giunzione specializzate, desmosomi ed

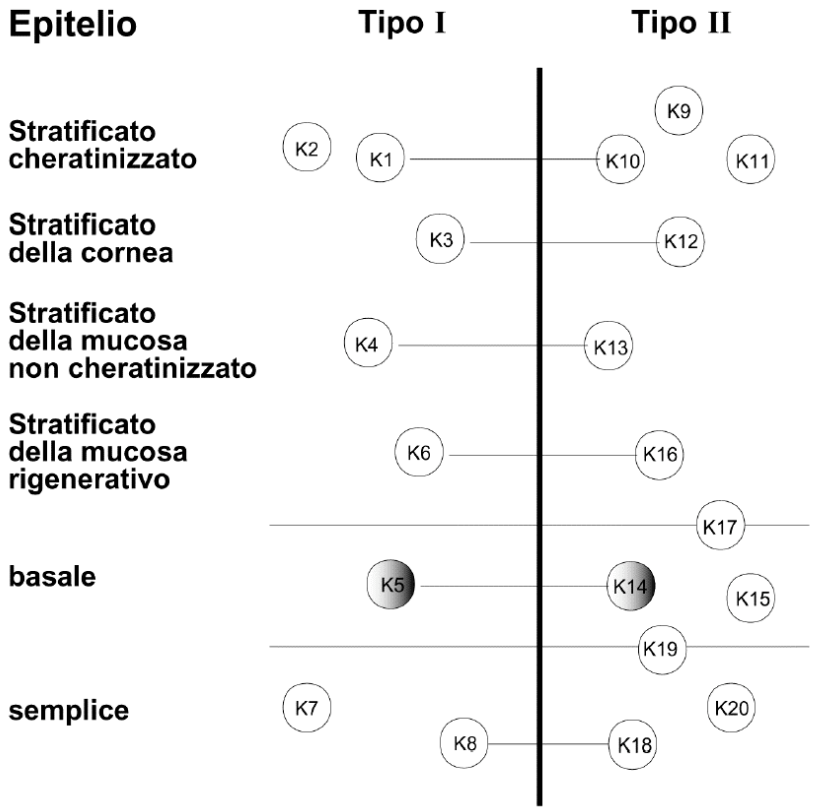



**Figura 5.** *Appaiamento specifico delle cheratine.* Rappresentazione schematica dell'appaiamento delle cheratine di tipo I e II nei diversi epiteli umani. Le K5 e le K14, specifiche dello strato basale dell'epidermide umana, sono indicate dal cerchio ombreggiato.

emidesmosomi, e quindi si connette con le reti citoscheletriche delle cellule adiacenti. Le proprietà meccaniche della pelle vengono assicurate da questa complessa ed elaborata rete citoscheletrica estesa attraverso i desmosomi a tutte le cellule del tessuto (Jones and Green, 1991). A dispetto di quanto si pensasse un tempo, i KIF, come altri tipi di IF, presentano strutture altamente dinamiche. Esperimenti di microiniezione di RNA epidermici (Franke et al., 1984) o di peptidi estranei (Vikstrom et al., 1989), e l'espressione transitoria di cheratine troncate con conseguente disassemblaggio della rete di filamenti intermedi (Albers and Fuchs, 1987), mettono in luce un continuo scambio di subunità fra filamento cheratinico e citoplasma. Questi dati, insieme ad altri più recenti, mostrano che nelle cellule viventi le proteine IF sono continuamente scambiate lungo l'intera lunghezza del filamento, sia in risposta a manipolazioni sperimentali che a stadi del ciclo cellulare, della mitosi e del differenziamento (Jones et al., 1982; Goldman and Steinert, 1990). Questo comportamento dinamico è un processo ciclico che implica l'attività di specifiche chinasi e fosfatasi che promuovono, rispettivamente, il disassemblaggio e il riassemblaggio degli IF (Stewart, 1990). Nel caso dei cheratinociti, cellule particolarmente soggette a stress meccanici, il citoscheletro deve assicurare un'impalcatura intracellulare abbastanza robusta ma anche molto flessibile. La struttura degli IF è particolarmente adatta a questa funzione meccanica: dal momento che le subunità fibrose costituenti gli IF si associano fianco a fianco in file sovrapposte, le loro fibre possono sopportare forze di stiramento molto maggiori dei microtubuli o dei filamenti di actina. Nell'epidermide, così come in tutti i tessuti epiteliali, sono le cellule, anziché la matrice extracellulare, peraltro scarsa, a sopportare la maggior parte delle sollecitazioni meccaniche, mediante la robusta intelaiatura citoscheletrica. Allo scopo di trasmettere gli stress meccanici tra cellule adiacenti, i KIF, e gli altri componenti del citoscheletro, sono legati a proteine che attraversano la membrana plasmatica, dove si formano giunzioni specializzate tra le superfici di cellule adiacenti o tra le cellule e la sottostante membrana basale (Green and Jones, 1996). Le giunzioni di ancoraggio, desmosomi, emidesmosomi e giunzioni aderenti, sono particolarmente adatte a questa funzione di collegamento e, pertanto, sono molto rappresentate nei tessuti epiteliali. Desmosomi ed emidesmosomi, mediando la connessione degli elementi del citoscheletro di una cellula con quelli di un'altra, o con la matrice extracellulare, consentono ai cheratinociti dei diversi strati dell'epidermide di funzionare come una solida unità strutturale, in grado di

reggere anche notevoli tensioni (Stappenbeck et al., 1994; Kowalczyk et al., 1994).

*Proteine Associate ai Filamenti Intermedi*

I filamenti intermedi citoplasmatici si associano sia alla membrana nucleare che a quella plasmatica. L'involucro nucleare si comporta da centro di nucleazione per l'assemblaggio dei filamenti intermedi. Le modalità di associazione dei filamenti intermedi alla membrana cellulare variano a seconda del tipo cellulare. Le cellule degli epiteli stratificati presentano sulla membrana due tipi di placche specializzate per l'interazione con i filamenti cheratinici: i desmosomi, che consentono alle cellule di aderire le une alle altre e gli emidesmosomi, che ancorano la cellula alla membrana basale. Una componente importante di queste strutture, in grado di mediare il legame tra i KIF e la placca desmosomiale, sono la desmoplachina e la pectina, localizzate a livello citoscheletrico, ma anche nei desmosomi e negli emidesmosomi.

### 1.4.3 I lipidi sintetizzati nei cheratinociti e la componente lipidica dell'involucro corneo

La componente più esterna dell'involucro corneo è costituita dai lipidi. I lipidi sintetizzati dall'epidermide svolgono la funzione di barriera e limitano la perdita di liquidi. La maggior parte dei lipidi è costituita dai ceramidi, colesterolo, acidi grassi, ed esteri del colesterolo che formano lamelle tra i corneociti dello strato corneo dell'epidermide. Questi lipidi sono sintetizzati dai cheratinociti, vengono accumulati in granuli detti granuli lamellari o corpi di Odland, che nella parte superione dello strato granuloso si fondono con la membrana plasmatica e riversano il loro contenuto nello spazio extracellulare (Bouwstra et al., 2003; Madison et al., 2003). Dopo l'estrusione dei lipidi nell'ambiente extracellulare, avvengono numerose modifiche ad opera di un gruppo di idrolasi acide che si trovano anch'esse nello spazio extracellulare (Freinkel et al., 1985; Grayson et al., 1985; Meno n et al., 1992). Tra gli enzimi coinvolti nella trasformazione dei lipidi extracellulari, troviamo: la beta-glucocerebroside, la sfingomielinasi acida e la fosfolipasi A2 (Holleran et al., 1994; Jensen et al., 1999; Schumuth et al., 2000). Sono stati descritti diversi modelli animali che mostrano che la funzione di barriera dell'epidermide è compromessa se alcune vie

metaboliche di sintesi o degradazione dei lipidici vengono alterate (Attar et al., 1997; Stone et al., 2000). Studi eseguiti al microscopio elettronico hanno dimostrato che i lipidi sono organizzati in membrane impilate le une sulle altre che riempiono lo spazio extracellulare (Elias et al., 1975), mentre esperimenti di biofisica hanno evidenziato che nelle lamelle extracellulari i lipidi possono presentarsi in fase di gel o in fase liquida (Forslind et al., 1994). Un aspetto importante e non completamente risolto riguarda il meccanismo molecolare attraverso il quale i lipidi delle lamelle interagiscono con le proteine dell'involucro corneo. Gli idrossiceramidi a catena lunga sono presenti sulla superficie extracellulare dell'involucro corneo, alcuni di questi potrebbero essere legati covalentemente attraverso legami estere alla superficie esterna dell'involucro corneo (Goldstein et al., 2003). A conferma di tale ipotesi, la TGasi 1 può catalizzare la reazione di esterificazione di una idrossiceramide a catena lunga con alcuni residui aminoacidici dell'involucrina (Nemes et al., 1999; Kalinin et al., 2002) . Tuttavia è possibile che altre proteine possano essere legate in modo covalente con i lipidi, infatti il topo knockout per l'involucrina non ha alcuna anomalia nei lipidi dell'involucro corneo (Djian et al., 2000).

## 1.5 Assemblaggio dell'involucro corneo

Si ritiene che l'assemblaggio del CE proceda essenzialmente attraverso 3 stadi principali a cominciare dagli ultimi livelli dello strato spinoso: iniziazione, formazione dell'involucro lipidico e consolidamento (Figura 6).

### 1.5.1. Iniziazione

Come conseguenza dell'aumento della concentrazione del $Ca^{2+}$ intracellulare nelle cellulre soprabasali vengono espresse tre proteine strutturali: invoplachina, periplachina e involucrina. Invoplachina e periplachina formano eterotetrameri stabili ed è stato dimostrato *in vitro* che sono in grado di interagire con l'involucrina per associarsi in maniera $Ca^{2+}$-dipendente alla membrana plasmatica. Contemporaneamente, viene espressa e attivata la TGasi1. Questo enzima, localizzato nella membrana grazie ad ancore lipidiche, risponde agli aumentati livelli di $Ca^{2+}$ unendo le plachine e l'involucrina attraverso legami crociati N-ε-(γ-glutammil)lisina. Lo stesso enzima media anche l'unione di altre proteine associate alla membrana e ai

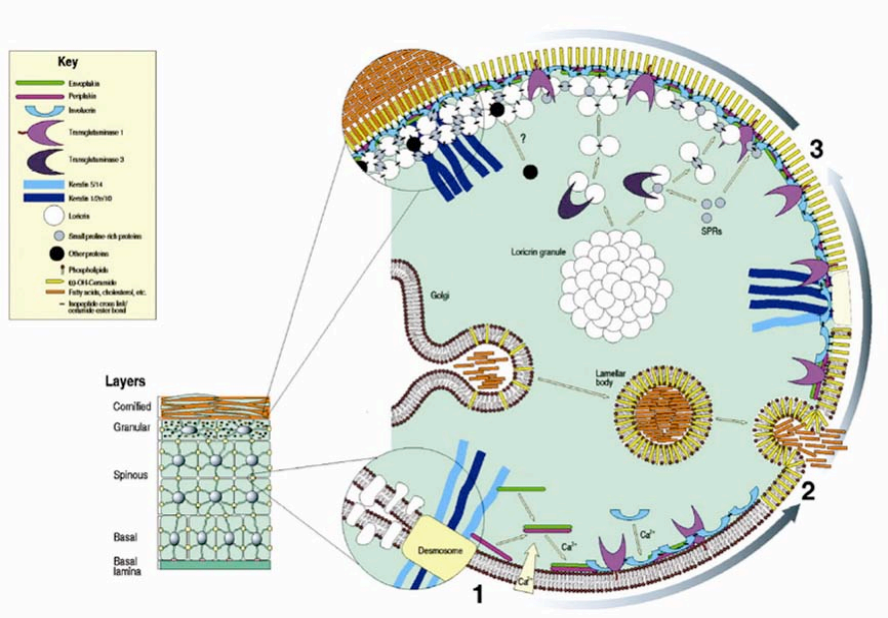



**Figura 6.** *Modello di formazione dell'involucro corneo nell'epidermide*

desmosomi, modificando in tal modo drasticamente le proprietà dinamiche delle giunzioni cellulari e del citoscheletro (Figura 7). Gradualmente, l'aggregazione involucrina-invoplachinaperiplachina forma uno strato supermolecolare depositato appena sotto la superficie interna della membrana plasmatica. La formazione di questa impalcatura proteica, o *scaffold,* è comune all'assemblaggio del CE di altri epiteli squamosi pluristratificati. Comunque, l'assemblaggio nelle cellule epidermiche differisce nei 2 seguenti passaggi.

### 1.5.2 Formazione dell'involucro lipidico

Nello strato granuloso, i cheratinociti producono ed accumulano i corpi lamellari. Come detto in precedenza, in queste vescicole secretorie vengono accumulate ω -idrossicerammidi con catene aciliche particolarmente lunghe (> C30). La secrezione dei corpi lamellari si attua all'interfaccia tra lo strato granuloso e quello corneo. Questo processo arricchisce la membrana plasmatica di ω-idrossicerammidi le cui catene aciliche sono lunghe abbastanza da attraversare il doppio strato lipidico in modo da esporre il loro gruppo ω -OH nel citosol. Esperimenti *in vitro* (Marekov e Steinert, 1998) hanno evidenziato che la TGasi 1 ancorata alla membrana plasmatica può esterificare covalentemente queste cerammidi con residui di Gln delle proteine dello scaffold (Fig. 7). Sembrerebbe che questi lipidi ad uno stadio successivo sostituiscano il normale doppio strato fosfolipidico e intervengano nell'organizzazione spaziale e strutturale degli altri lipidi extracellulari.

### 1.5.3 Consolidamento

Nelle fasi finali del suo processo di formazione, il CE viene rafforzato mediante l'incorporazione del suo principale costituente proteico, la loricrina (Fig.7). La loricrina è una proteina scarsamente solubile e, a questo stadio di differenziamento del cheratinocita, si trova nel citosol a formare granuli insolubili. Si ritiene che lo spostamento della loricrina verso la periferia della cellula possa avvenire tramite una sua parziale solubilizzazione. Esperimento condotti *in vitro* suggeriscono che la TGasi 3 citosolica possa mediare questa solubilizzazione legando covalentemente catene di loricrina con molecole altamente solubili come le SPR. Gli oligomeri così formati sono traslocati in

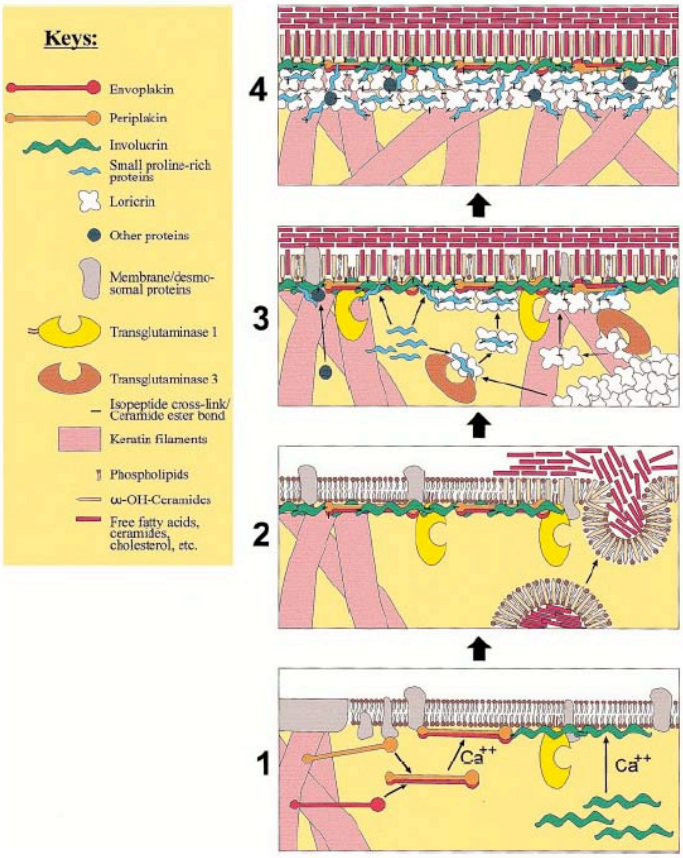



**Figura 7.** *Modello dell'assemblamento dell'involucro corneo.* Il primo passaggio è l'iniziazione, che ha luogo nello strato spinoso, e che coinvolge la sintesi di proteine strutturali dell'involucro corneo e l'estrusione di specifici lipidi nello spazio intercellulare. La seconda fase è quella di consolidamento, che avviene nello strato granuloso e comporta il legame covalente tra lipidi e proteine dell'involucro corneo, e il legame covalente tra loricrina e SPRs determinato dall'attività della TG3 e della TG1. Infine, nella fase di desquamazione, che avviene nello strato corneo, l'attività della TG1 permette il legame tra loricrina e altre proteine dell'involucro con l'estrusione di ceramidi, acidi grassi e colesterolo.

periferia dove si ritiene che la TGasi 1 li associ con lo scaffold proteico preesistente. Sempre durante la fase di consolidamento del CE vengono aggiunte all'impalcatura proteica le altre componenti del CE: la cistatina α l'elafina e tutte le altre proteine dello stato differenziativo terminale del cheratinocita. Sembra, in particolare, che i KIF, ora costituiti interamente dalle cheratine K1, K2 e K10, siano legati covalentemente al CE tramite le desmoplachine in corrispondenza delle preesistenti giunzioni aderenti e desmosomiali. Alla fine di questa lunga serie di eventi, il corneocita maturo si trasforma nella lamella cornea in cui grandi fasci di KIF sono covalentemente saldati al CE; questa struttura resistente ma flessibile circondata da una matrice lipidica altamente organizzata è alla base delle proprietà meccaniche e di impermeabilità necessarie per la sopravvivenza dei mammiferi nell'ambiente terrestre.

## 1.6 Ruolo delle proteasi e dei loro inibitori nell' epidermide

Le proteasi sono state a lungo considerate responsabili della degradazione intralisosomiale delle proteine, è noto invece che la regolazione dell'attività degli enzimi proteolitici è essenziale anche nell'omeostasi delle cellule e dei tessuti. Studi effettuati negli ultimi anni hanno dimostrato che le *catepsine*, proteasi a cisteina lisosomiali, sono coinvolte in una moltitudine di processi fisiologici, come attivazione di proenzimi, attivazione di enzimi, presentazione di antigeni, maturazione di ormoni, modellamento tissutale, e riassorbimento della matrice ossea (Dickinson, 2002). Studi recenti hanno rivelato che la catepsina agisce come mediatore della morte cellulare programmata, ed hanno dimostrato l'esistenza di una via apoptotica nei lisosomi catepsina-dipendente (Foghsgaard et al., 2001; Stoka et al., 2001; Turk et al., 2002). La sua implicazione in molteplici processi vitali e patologie la rendono interessante come bersaglio nella realizzazione di farmaci. La regolazione dell'attività delle proteasi a cisteina è regolata da diversi fattori, tra cui i più importanti sono gli inibitori di proteasi. L'importanza della regolazione proteolitica negli epiteli è stata ben dimostrata dalla scoperta dell'inibitore della proteasi a serina SPINK5, come gene difettivo nella sindrome di Netherton (Chavanas et al., 2000), mutazioni della catepsina C nella sindrome di Papillon-Lefevre (Toomes et al.,1999), e mancanza di Catepsina L nei topi *furless* (Roth et al., 2000). Possiamo quindi ipotizzare che nel caso delle transglutaminasi, enzimi sottoposti ad attivazioni proteolitiche, le proteasi devono avere un ruolo

importante nella regolazione della loro attività per controllare specificatamente la formazione dell'involucro corneo e la struttura epidermica.

## 1.7 Le transglutaminasi

Le *transglutaminasi* (TGasi; EC 2.3.2.13) rappresentano una famiglia di enzimi funzionalmente e strutturalmente correlati che catalizzano la reazione di trasferimento acilico $Ca^{2+}$-dipendente tra il gruppo γ-carbossiamidico di residui di glutammina e il gruppo amminico di varie ammine primarie. Il risultato della reazione è una modificazione post-traduzionale, ed in molti casi si ha l'oligomerizzazione delle proteine substrato in seguito alla sintesi di legami ε-(γ-glutamil)lisina. Il termine transglutaminasi fu introdotto per la prima volta da Clarke et al. (1957), per descrivere l'attività transamidante osservata nel fegato del porcellino d'India. Studi successivi (Pisano et al., 1968) sulla stabilizzazione dei monomeri di fibrina durante la formazione del coagulo dimostrarono che la transamidazione era effettuata da enzimi che legavano le proteine attraverso la formazione di un legame isopeptidico ε-( γ -glutamil)lisina. In comune con altre funzioni trovate nelle cellule di mammifero, le TGasi richiedono il legame con il $Ca^{2+}$ per la loro attività, ma a concentrazioni normalmente sovrafisiologiche (Burgoyne et al., 2001). Inoltre la loro attivazione da $Ca^{2+}$ è modulata da ulteriori processi regolatori, e quindi sono virtualmente inattive in condizioni normali, mentre sono attivate solo all'uscita dal normale meccanismo fisiologico. Una volta attivate, le TGasi possono catalizzare una serie di reazioni differenti, che vanno anche al di fuori della generica transamidazione, e che risultano in una modificazione post-traduzionale covalente (Figura 8). Fra queste reazioni, interessante è stata la scoperta della funzione di *transesterificazione* della TGasi 1, associata con il differenziamento terminale dei cheratinociti (Nemes et al., 1999). Importante è anche il significato biologico della *deamminazione* e dell'*incorporazione di ammine*. La deamminazione comporta la sostituzione di un residuo neutro di glutammina con uno carico negativamente di glutammato, con un cambiamento dell'equilibrio che governa la solubilità, la conformazione, la stabilità, l'associazione oligomerica e l'interazione con un ligando della proteina target. Ciò è stato dimostrato per la gliadina A, che viene deamminata dalla TGasi 2, preferenzialmente nella sequenza Gln-X-Pro. In questo caso, la proteina deamminata attiva i linfociti T nella malattia autoimmunitaria detta morbo celiaco (Shan et al., 2002). Lo stesso ragionamento potrebbe essere applicato per la poliamminazione, che porta la sostituzione della catena laterale neutra della glutammina con una caricata positivamente dalle poliammine. Quando

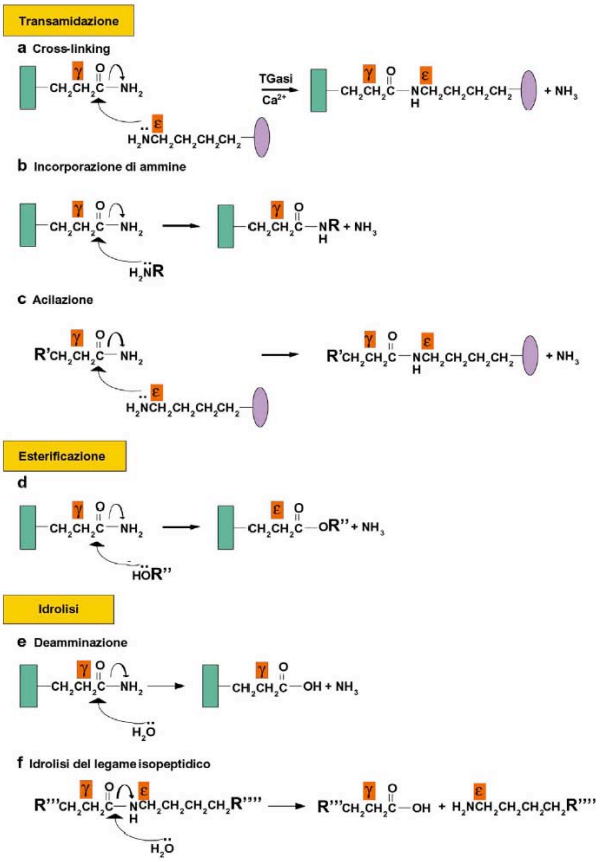



**Figura 8.** *Reazioni post-traduzionali catalizzate dalle transglutaminasi.* La transamidazione può causare (a) il legame crociato fra proteine mediante la formazione di un legame isopeptidico ε (γ- glutamil) lisina fra una lisina deprotonata di una proteina (ellisse viola) ed una glutammica di un'altra proteina (rettangolo verde); (b) l'incorporazione di un'ammina ($H_2NR$) in un residuo di glutammica della proteina accettrice; (c) l'acilazione della catena laterale di lisina di una proteina donatrice. Le reazioni b e c competono con il legame crociato mostrato in a. Le altre reazioni catalizzate dalle TGasi sono (d) l'esterificazione, (e) la deamminazione e (f) l'idrolisi del legame isopeptidico. Sono mostrati i movimenti degli elettroni (frecce curve) nelle reazioni nucleofile in assenza di enzima. R rappresenta la catena laterale di un'ammina primaria; R', un peptide contenente una glutammica; R'', una cerammide; R''' e R'''', le catene laterali in isopeptidi ramificati.

la reazione di trasferimento acilico riguarda un gruppo γ-carbossiammidico di glutammina ed un gruppo ε-amminico di lisina, il risultato è la formazione di un *legame isopeptidico* ε-*(γ-glutamil)lisina* (Lorand & Conrad, 1984). In questo modo, le TGasi catalizzano la formazione di legami crociati (*cross-linking*) fra proteine sia intramolecolari che intermolecolari, promuovendo la formazione di macromolecole ad alto peso molecolare, stabili e altamente insolubili. La polimerizzazione dei precursori proteici conferisce infatti un'elevata resistenza alla rottura meccanica e all'attacco di agenti chimici ai polipeptidi coinvolti nel legame ed i polimeri possono essere distrutti soltanto mediante degradazione proteolitica delle catene proteiche. Proteasi in grado di idrolizzare i legami crociati formati dalle TGasi sono state descritte solamente nella saliva della sanguisuga (Zavalova et al., 1996). Nell'uomo sono stati finora caratterizzati nove membri della famiglia delle transglutaminasi, TGasi 1-7, fXIIIA e banda 4.2, ognuno dei quali è coinvolto in differenti processi biologici, quali la stabilizzazione degli aggregati di fibrina, la coagulazione del liquido spermatico, l'endocitosi, l'apoptosi, la formazione dell'involucro corneo e il consolidamento delle strutture della matrice extracellulare. Dei membri della famiglia delle TGasi, elencati nella Tabella 3, almeno quattro sono espressi e sintetizzati nell'epidermide umana: la TGasi1 o TGasi cheratinocitica, un enzima associato alla membrana con un peso molecolare di 106 kDa (Thacher et Rice, 1985; Kim et al., 1991); la TGasi2 o TGasi tissutale, enzima solubile ed ubiquitario di 77 kDa (Lichti et al., 1985); la TGasi3 o TGasi epidermica, un pro-enzima solubile di 80 kDa (Ogawa e Goldsmith, 1976; Park et al., 1988) e la TGasi 5, o TGasi X, un enzima ubiquitario di recente caratterizzazione (Aeschlimann et al., 1998, Candi et al., 2001). Le altre TGasi comprendono: il fattore XIIIa (fXIIIa) della coagulazione, presente nel sangue come zimogeno ed attivato proteoliticamente dalla trombina, responsabile della retrazione del coagulo (Ichinose et al., 1988); la TGasi 4, o TGasi prostatica, responsabile della coagulazione del seme (Grant et al., 1994); la banda 4.2, un'enzima inattivo localizzato nella membrana degli eritrociti, dove svolge funzioni strutturali (Korsgren e Cohen, 1986; Korsgren e Cohen, 1988). Infine, due nuovi geni *TGM6* e *TGM7* sono stati recentemente identificati nel genoma umano (Grenard et al., 2001) e i loro rispettivi prodotti genici, TGasi 6 e TGasi 7, attendono ancora una completa caratterizzazione.

Tabella 3 | **Transglutaminasi umane regolate dal calcio e omologhi catalitically inattivi**

| Proteina | Sinonimo | Residui (Mr, Kda) | Espressione tissutale* | Localizzazione | Funzione | Gene | Locus Genetico | Malattie Collegate |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| fXIII‡ subunit A (fXIIIA) | Fattore stabilizzante la fibrina, Fattore Laki-Lorand, Pro-fibrinoligasi, Plasma pro-TG | 732(83) | Piastrine, astrociti, cellule Dentritiche dermali, Condrociti, placenta, Plasma, fluido sinoviale | Citosolica, extracellulare | Coagulazione del sangue, crescita delle ossa | F13A1 | 6p24-25 | Mancanza di fXIII |
| TG1§‖ | $TG_K$, TG cheratinocitica, particulate TG | 814(90) | Cheratinociti, cervello | Membrana, citosolica | Formazione dell'involucro corneo cellulare | TGM1 | 14q11.2 | Ittiosi lamellare |
| TG2§ | $TG_C$, TG tissutale, TG endoteliale, TG eritrocitica, Gh, Gha | 686(80) | Ubiquitaria | Citosolica, nucleare, membrana, superficie cellulare, extracellulare | Varie | TGM2 | 20q11-12 | Sconosciute |
| TG3§‖ | $TG_E$, TG epidermica, TG del callo, TG del follicolo pilifero | 692(77) | Epiteli squamosi, cervello | Citosolica | Formazione dell'involucro corneo cellulare | TGM3 | 20q11-12 | Sconosciute |
| TG4§ | $TG_P$, TG prostatica, vesicolasi, proteina dorsale prostatica 1(DP1), proteina principale secretoria prostatica regolata da androgeni | 683(77) | Prostata | Sconosciuta | Coagulazione dello sperma nei roditori | TGM4 | 3q21-22 | Sconosciute |
| TG5§ | $TG_X$ | 719(81) | Ubiquitaria eccetto per il CNS e il sistema linfatico | Sconosciuta | Formazione dell'involucro corneo cellulare | TGM5 | 15q15.2 | Sconosciute |
| TG6§ | $TG_Y$ | Sconosciuto | Sconosciuta | Sconosciuta | Sconosciuta | TGM6 | 20q11 | Sconosciute |
| TG7§ | $TG_Z$ | 710(?) | Ubiquitaria | Sconosciuta | Sconosciuta | TGM7 | 15q15.2 | Sconosciute |
| Banda 4.2¶ | B4.2, proteina eritrocitica di membrana della banda 4.2 che lega l'ATP | 690(72) | Globuli rossi, midollo osseo, fegato fetale, milza | Membrana | Componente dello scheletro di membrana | EPB42 | 15q15.2 | Sferocitosi ereditaria |

*Sono indicati solo tessuti ad alto livello di espressione. ‡Attivato dalla trombina- la trombina più il $Ca^{2+}$ - la specie attivata è della fXIIIa o $A_2$*- è la subunità A che possiede la potenzialità catalitica sia nel fXIII delle piastrine ( un omodomero $A_2$) che nel fXIII plasmatici ( un etrodimero $A_2B_2$). §Sebbene sia convenzionale usare le lettere per descrivere i membri di una famiglia di proteine, come $TG_{XYZ}$, qui viene usata la designazione numerica perché le lettere usate per i membri di questa famiglia caratterizzati inizialmente non sono state assegnate in ordine alfabetico, ma riferite alla loro espressione tissutale o cellulare predominante. ‖Proteoliticamente attivato. ¶Manca di attività transglutaminasica. TG, transglutaminasi.

### 1.7.1 Meccanismo catalitico

A tutt'oggi non è stata ancora eseguita un'analisi dettagliata del meccanismo catalitico di questa classe di enzimi. La maggior parte degli studi enzimatici si è concentrata sul fattore XIIIa (Hettasch et al., 1997;Micanovic et al.,1994) e sulla TGasi 2 (Folk e Finlayson, 1977). Da questi studi è emerso che la reazione a due substrati catalizzata da questi enzimi segue il meccanismo a doppio spostamento (ping pong) con uno schema modificato, che comprende l'azione dell'acqua (Figura 9); Folk e Finlayson, 1977). Il primo substrato a legarsi all'enzima è quello contenente il residuo di Gln (conosciuto come substrato "*donatore*" o "Q") . Dopo la formazione del complesso binario enzima-substrato, si ha la fase di acilazione in cui la cisteina del sito attivo si lega, tramite un legamo tioestere, al gruppo ã-carbonilico della Gln substrato, formando un intermedio acil–tiolestere legato all'enzima, chiamato *intermedio acil-enzima* (Folk, 1969). Dopo il rilascio di ammoniaca (primo prodotto), l'enzima si associa al secondo substrato, un residuo di Lys di una proteina (noto come substrato "*accettore*" o "K" nel caso della reazione di transamidazione) o una poliammina. La deacilazione si verifica attraverso amminolisi dell'intermedio acil-tioestere, portando alla rigenerazione dell'enzima libero. L'accettore di acile durante questo processo è tipicamene l'ε-ammino gruppo di un residuo di lisina o il gruppo amminico primario di poliammine fisiologiche (come la spermidina e la putrescina). In assenza di un'ammina primaria, l'acqua è in grado di rigenerare l'enzima libero, sebbene con una cinetica molto più lenta. Inoltre, *in vitro*, le transglutaminasi hanno anche mostrato di aver attività su certi esteri ad alta energia, catalizzando la loro idrolisi o amminolisi (Folk et al., 1969). Si pensa che il passaggio limitante di queste reazioni sia la formazione del complesso intermedio acil-enzima. Le diverse forme isoenzimatiche condividono un comune meccanismo d'azione. L'attività catalitica è molto probabilmente mediata da una triade amminoacidica Cys-His-Asp che ricorda da vicino quella delle proteasi a cisteina papaina-simili (Cys25-His159-Asn175; Drenth et al.,1968) ed è conservata in tutte le TGasi cataliticamente attive. Questa triade è stata recentemente identificata attraverso analisi cristallografica ai raggi X nel fattore XIIIa (Cys314, His373 e Asp396; Yee et al., 1996). Il probabile meccanismo catalitico delle TGasi è illustrato schematicamente nella figura 10. Si ritiene che a pH neutro il residuo di His sia prevalentemente protonato nella forma ad ione imidazolio, probabilmente stabilizzato dalla carica negativa del residuo di

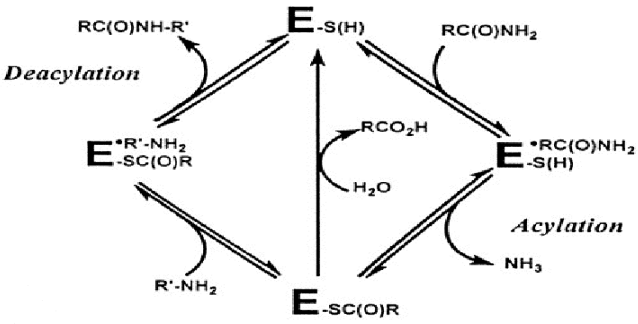



**Figura 9.** *Schema del meccanismo di catalisi delle transglutaminasi.* Lo schema è quello di un modello a doppio spostamento ordinato, mdoficato per l'eventuale intervento dell'acqua.

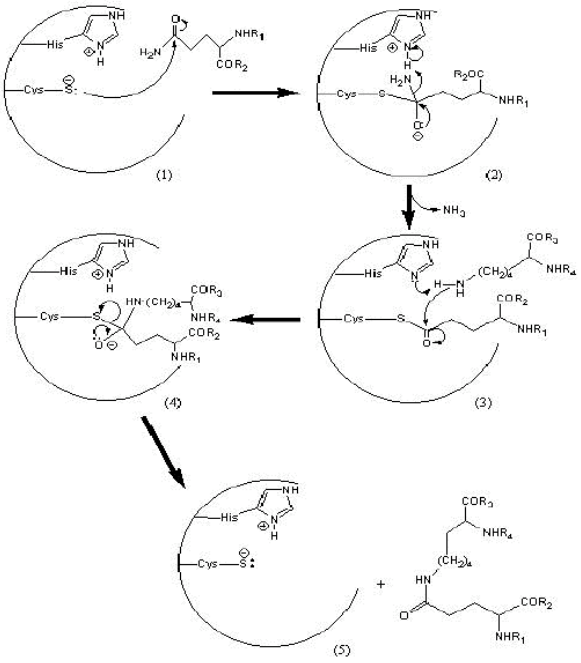



**Figura 10.** *Ipotetico meccanismo catalitico delle transglutaminasi* (dettagli nel testo).

Asp. Questo particolare intorno chimico, già descritto nel caso della papaina (Polgár, 1974; Polgár, 1979) renderebbe il residuo di Cys più acido del normale, favorendo la sua forma ad anione tiolato che è notevolmente più reattiva come nucleofilo del gruppo sulfidrilico. Il meccanismo catalitico comporterebbe pertanto la presenza di una coppia ionica imidazolio-tiolato (Fig.10, (1)). Secondo questo modello, la Cys del sito attivo, nella forma ad anione tiolato, attacca il carbonio del gruppo γ -carbonilico della Gln del primo substrato formando un intermedio tetraedrico in cui il substrato è unito covalentemente all'enzima (Fig.10, (1)). Successivamente, nello stadio lento della reazione, l'intermedio tetraedrico si scinde e lo ione imidazolio della His, che in questa fase agisce da catalizzatore acido generale, dona un H+ all'azoto amminico dell'intermedio determinandone il rilascio sotto forma di ammoniaca (Fig.10, (2)) Sembra che questa reazione, energeticamente sfavorita, sia parzialmente sostenuta dal rilascio di ammoniaca e dalla sua susseguente protonazione in ambiente neutro (Aeschlimann and Paulsson, 1994). La fase di acilazione produce così un intermedio tioacil-enzima (Fig.10 (2, 3)). A questo punto della reazione, l'His si comporta da catalizzatore basico generale favorendo l'attacco nucleofilo dell'azoto amminico della Lys del secondo substrato con la formazione di un secondo intermedio tetraedrico che rapidamente riarrangia (deacilazione) liberando il secondo prodotto e rigenerando così l'enzima (Fig.10, (4,5)). Per quanto riguarda la specificità di reazione, si può dire che questa sia abbastanza ristretta per quanto concerne il riconoscimento del primo substrato e meno per quello del secondo. Infatti, sebbene le TGasi utilizzino un residuo di glutamina legato ad un peptide come donatore acilico, la suscettibilità di questi residui all'attacco enzimatico dipende dalla sequenza aminoacidica dei residui che circondano la glutamina stessa (distribuzione della carica). Tipicamente, le transglutaminasi riconoscono la sequenza generica Gln-Gln*-Val, dove Gln* rappresenta il residuo donatore del gruppo acilico. Comunque, sembra che tale specificità sia distinta per ciascun isoenzima. In contrasto con la loro elevata selettività per il donatore acilico, le TGasi mostrano un'ampia tolleranza per il substrato accettore che, come già ricordato, può essere un residuo di lisina o una qualunque delle poliammine fisiologiche. Come detto prima, le TGasi richiedono $Ca^{2+}$ per smascherare la cisteina del sito attivo ed essere così attive. Quindi il legame del calcio provoca una evidente riorganizzazione della struttura delle proteine. La recente risoluzione cristallografica della TGasi 3 attivata ha dimostrato che il legame del calcio provoca un sostanziale cambiamento conformazionale che coinvolge l'apertura di un canale nella proteina esponendo i residui chiave

che controllano l'accesso del substrato al sito di legame. Tramite l'incremento del calcio intracellulare, probabilmente la cellula può attivare le TGasi in assenza di sintesi proteica. Il $Ca^{2+}$ è usato probabilmente come secondo messagero anche quando l'attivazione delle TGasi è mediata da diversi agonisti, come lo sperma (nella fertilizzazione delle uova di riccio di mare, Cariello et al., 1984), il fattore di crescita epidermico (EGF, nelle cellule epidermoidi di carcinoma umano A431, Dadabay e Pike, 1987) e la trombina (che agisce sulle piastrine umane, Lorand et al., 1987). Il calcio potrebbe essere rilasciato nel citoplasma dai depositi intracellulari o potrebbe essere portato dentro la cellula dall'esterno. Data la concentrazione relativamente alta di calcio richiesta per attivare le TGasi, si può supporre che tale attivazione si ha soprattutto in situazioni estreme, quando la capacità d'immagazzinamento interno del calcio diviene sovraccaricata, o quando le pompe che espellono il calcio non riescono a bilanciare l'influsso del catione. Una caratteristica interessante delle TGasi è la loro bassa velocità di reazione. Quando si misura l'attività specifica, usando un substrato artificiale come la caseina metilata o un substrato specifico come la loricrina, la più alta velocità di reazione misurata con gli enzimi attivati delle TGasi 1 e 3 è di circa 1000 pmole di putrescina incorporata/ora/pmole di enzima, che corrisponde ad un ciclo di reazione ogni 3-4 secondi (Kim et al., 1994; Candi et al., 1998). Anche la TGasi 2 è ugualmente lenta (Kim et al., 1994). Comunque, le caratteristiche strutturali che determinano la specificità di substrato e questo modesto tasso di reazione rimangono ancora sconosciuti. Inoltre, le strutture finora risolte delle TGasi hanno rivelato la presenza di tre legami peptidici atipici in *cis*, localizzati nel dominio catalitico in motivi che fiancheggiano i residui della triade catalitica. Normalmente, questi legami sono energeticamente sfavorevoli, e si pensa che siano presenti in queste proteine perché in qualche modo sono necessari per alcuni aspetti del meccanismo di reazione oppure per conferire stabilità particolari (Weiss et al., 1998a; Weiss et al., 1998b).

### 1.7.2. Struttura, organizzazione genomica ed evoluzione delle TGasi

La famiglia delle transglutaminasi appartiene alla superfamiglia delle proteasi a cisteina, che include anche le proteasi papaina e calpaina, enzimi deubiquitinanti e N-acetil transferasi (Murzin et al., 1995). Tutti questi enzimi hanno in comune una triade catalitica Cys-His-Asp o Cys-His-Asn. Come detto, nel genoma umano sono stati identificati nove differenti geni

delle TGasi, di cui otto codificano per potenziali enzimi capaci di formare legami crociati regolati dal calcio (anche se non è stata ancora dimostrata l'attività catalitica delle TGasi 6 e 7), ed uno codifica per un omologo cataliticamente inattivo, la banda 4.2 degli eritrociti. Sono stati identificati ortologhi delle diverse TGasi umane in vari organismi, dai mammiferi agli invertebrati. Le transglutaminasi sono codificate da una famiglia di geni strettamente correlati, con un alto grado di similitudine (Grenard et al., 2001). Inoltre, tutti i geni isolati fino ad ora sembrano essere organizzati in maniera simile (Figura 11). I geni per il fXIIIA (F13A1) e la TGasi 1 (TGM1) consistono di 15 esoni e 14 introni, mentre quelli per le TGasi 2-7 (TGM2-7) e la banda 4.2 (EPB42) sono formati da 13 esoni e 12 introni. Nei geni F13A1 e TGM1, l'equivalente esone 9 è stato diviso da un introne addizionale per dare gli esoni 10 e 11. In questi geni, l'esone 1 non è tradotto, e il pro-peptide ammino-terminale è codificato dall'esone 2. Varianti di splicing alternativo sono state identificate in diverse TGasi, come la TGasi 1, TGasi 2, TGasi 5 e nella banda 4.2 (Shevchenko et al., 2000; Kim et al., 1992; Citron et al., 2001; Bouhassira et al., 1992; Aeschlimann et al., 1998; Candi et al., 2001). Al contrario della somiglianza nell'organizzazione genica, le sequenze fiancheggianti in 5' i geni delle TGasi e i meccanismi della regolazione trascrizionale non sono omologhi, come ci si aspetta dalla diversa regolazione della loro espressione tissutale e durante lo sviluppo. Infatti, sebbene la regolazione dei geni delle TGasi non sia stata ben caratterizzata, sono evidenti le differenze nella struttura dei promotori e degli elementi enhancer (Grenard et al., 2001). Così, nonostante la loro struttura genica conservata, la grandezza della sequenza genomica è molto variabile, andando, dai 160 Kbp del gene per il fXIIIA ai soli 14 Kbp del gene codificante per la TGasi 1. Analisi filogenetiche indicano che inizialmente la duplicazione genica di un progenitore comune abbia dato origine a due differenti ramificazioni: una linea che comprende la TG1, il fXIIIA, la TG4 e le TGasi degli invertebrati; ed una seconda comprendente la banda 4.2, la TG2, la TG3, la TG5, la TG6 e la TG7. In seguito alla duplicazione, i diversi geni hanno subito un processo di divergenza e di dispersione nel genoma, come suggerisce la loro diversa localizzazione cromosomica (Figura 12). L'alta conservazione della sequenza e, quindi, un alto grado di conservazione della struttura secondaria, indica che tutte le TGasi potrebbero conservare una struttura a quattro domini, simile a quella già determinata per il fXIIIA, per la TGasi 2 umana e per la TGasi 3 umana (Yee et al., 1994; Liu et al., 2002; Ahvazi et al., 2002; Kim et al., 2001), con piccole variazioni dovute alle funzioni specializzate di ogni isoenzima.

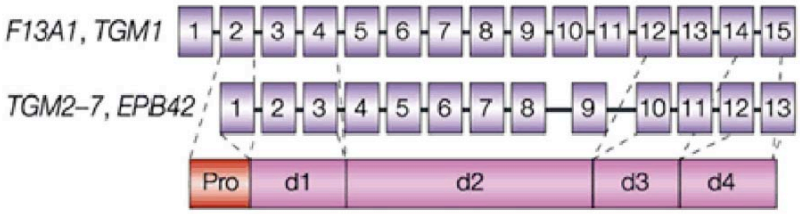



**Figura 11.** *Schema dell'organizzazione genomica e domini proteici delle transglutaminasi.* I geni per il fXIIIA e la TGasi 1 consistono di 15 esoni (numerati) mentre quelli per le TGasi 2-7 e la banda 4.2 consistono di 13 esoni. Le linee tratteggiate indicano gli esoni che codificano per i quattro domini (indicati d1-d4) delle proteine mature. Pro, propeptide del fXIIIA e della TGasi 1.

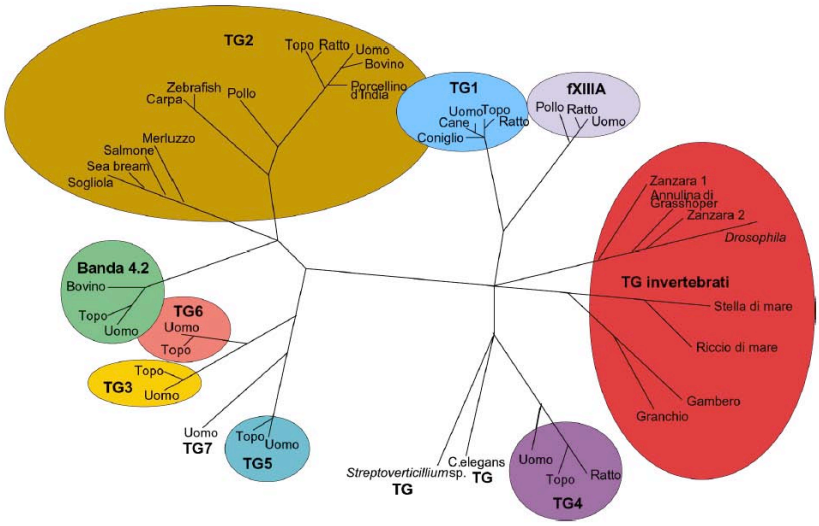



**Figura 12.** *Albero filogenetico della famiglia delle transglutaminasi.* L'albero è stato generato con Phylip sulle sequenze amminoacidiche allineate con CLUSTALW. I gruppi colorati indicano probabili ortologhi. La lunghezza dei rami è proporzionale al numero di sostituzioni accumulate.Si può notare la presenza di molti politomi (due o più rami che iniziano alla stessa posizione), che non possono essere risolti con le sequenze attualmente disponibili. Modificato da Lorand e Graham.

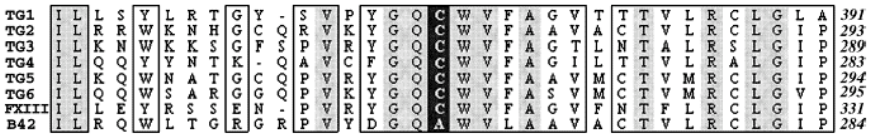



**Figura 13.** *Allineamento della sequenza amminoacidica delle TGasi umane a livello del sito attivo.* Le linee indicano gli intervalli inseriti per ottimizzare l'allineamento delle sequenze. Le regioni nei rettangoli rappresentano gli amminoacidi conservati in almeno quattro prodotti genici. Le colonne grigie indicano la presenza di aminoacidi conservati in tutti i membri della famiglia delle transglutaminasi.

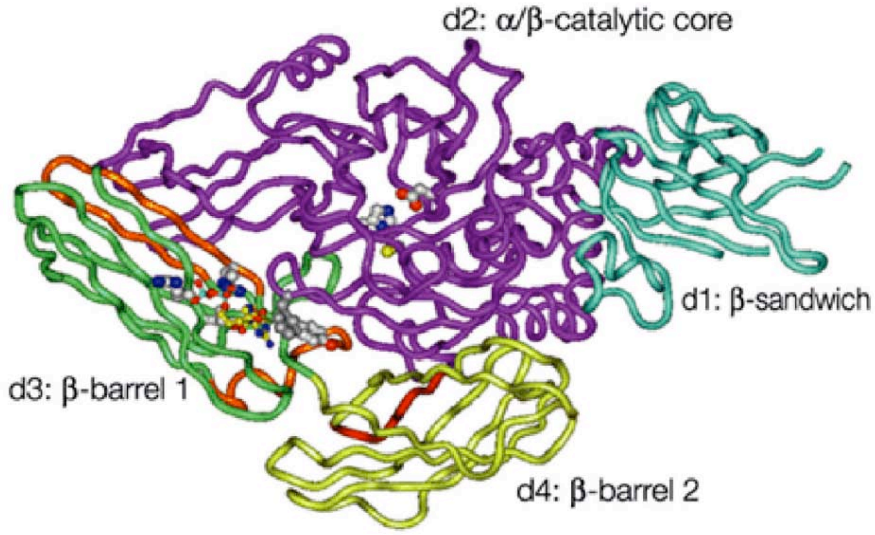



**Figura 14.** *Struttura terziaria delle transglutaminasi.* I domini d1-d4 sono indicati sulla struttura cristallina tridimensionale della TGasi 2. Sono indicati i domini funzionali, che includono i siti di legame con il recettore adrenergico $\alpha_{1b}$ (arancione) e il dominio di riconoscimento per la fosfolipasi cδ1 (rosso).

**Tabella 4 | Omologia fra i membri della famiglia delle transglutaminasi**

| | Band4.2 | fXIIIA | TGasi 7 | TGasi 5 | TGasi 4 | TGasi 3 | TGasi 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **TGasi 1** | 37% | 51% | 56% | 45% | 47% | 47% | 42% |
| **TGasi 2** | 51% | 47% | 56% | 56% | 48% | 54% | --- |
| **TGasi 3** | 47% | 47% | 58% | 60% | 56% | --- | --- |
| **TGasi 4** | 46% | 49% | 49% | 49% | --- | --- | --- |
| **TGasi 5** | 49% | 48% | 61% | --- | --- | --- | --- |
| **TGasi 7** | 50% | 47% | --- | --- | --- | --- | --- |
| **fXIIIA** | 41% | --- | --- | --- | --- | -- | --- |

L'omologia è stata calcolata considerando le identità e le similitudini degli amminoacidi dell'intera sequenza proteica

Tabella 5 | **Omologia fra i diversi domini dei membri della famiglia delle transglutaminasi**

| | β-sandwich | Catalitico | β-barrels 1 | β-barrels 2 |
|---|---|---|---|---|
| TG5 vs TG1 | 40% (24) | 66% (51) | 39% (19) | 56% (30) |
| TG5 vs TG2 | 56% (35) | 69% (56) | 44% (20) | 52% (35) |
| TG5 vs TG3 | 52% (30) | 70% (56) | 58% (33) | 61% (38) |
| TG5 vs TG4 | 39% (24) | 66% (48) | 33% (14) | 44% (20) |
| TG5 vs TG7 | 58% (48) | 74% (62) | 46% (31) | 52% (35) |
| TG5 vs banda4.2 | 52% (34) | 59% (42) | 39% (16) | 48% (22) |
| TG5 vs fXIIIA | 36% (20) | 65% (47) | 37% (19) | 47% (25) |
| TG2 vs TG1 | 42% (24) | 62% (48) | 35% (17) | 49% (25) |
| TG2 vs TG3 | 52% (35) | 61% (47) | 50% (26) | 50% (24) |
| TG2 vs TG4 | 39% (23) | 63% (45) | 28% (12) | 50% (22) |
| TG2 vs TG7 | 56% (43) | 69% (53) | 41% (21) | 48% (28) |
| TG2 vs fXIIIA | 38% (22) | 64% (50) | 32% (20) | 38% (24) |
| TG2 vs banda4.2 | 53% (19) | 56% (40) | 40% (17) | 47% (25) |
| TG3 vs TG1 | 47% (25) | 64% (49) | 40% (15) | 51% (30) |
| TG3 vs TG4 | 46% (28) | 61% (48) | 37% (15) | 44% (20) |
| TG3 vs TG7 | 54% (35) | 65% (52) | 53% (22) | 52% (29) |
| TG3 vs fXIIIA | 37% (22) | 61% (47) | 42% (17) | 39% (19) |
| TG3 vs banda4.2 | 53% (35) | 50% (34) | 45% (20) | 42% (22) |
| TG1 vs TG4 | 48% (30) | 69% (50) | 44% (15) | 50% (26) |
| TG1 vs TG7 | 41% (28) | 62% (50) | 35% (17) | 49% (27) |
| TG1 vs fXIIIA | 50% (31) | 70% (54) | 56% (32) | 49% (33) |
| TG1 vs band4.2 | 38% (23) | 53% (35) | 41% (18) | 35% (16) |
| TG4 vs fXIIIA | 41% (21) | 64% (20) | 41% (14) | 41% (22) |
| TG4 vs band4.2 | 42% (23) | 56% (38) | 34% (15) | 41% (18) |
| TG4 vs TG7 | 36% (24) | 65% (48) | 33% (15) | 49% (32) |
| TG7 vs fXIIIA | 40% (20) | 61% (42) | 38% (15) | 39% (22) |
| TG7 vs band4.2 | 57% (39) | 55% (38) | 40% (17) | 50% (25) |
| fXIIIA vs band4.2 | 36% (19) | 54% (34) | 38% (17) | 32% (13) |

(.)percentuale di identità

Questa struttura comprende il dominio "β-sandwich" nella porzione amino-terminale, il dominio catalitico centrale contenente il sito attivo e la triade catalitica (Figura 13) e i domini "β-barrels1" e "β-barrels2" nella porzione carbossi-terminale (Figura 14). Un'analisi comparativa delle sequenze proteiche delle diverse transglutaminasi, nella regione comprendente l'intero prodotto genico, rivela un'alta omologia, spesso la metà degli amminoacidi sono conservati o comunque sostituiti in maniera conservativa (v.tabella 4). La stessa analisi comparativa ripetuta confrontando i diversi domini strutturali che compongono le transglutaminasi rivela che l'omologia di sequenza è particolarmente pronunciata nel dominio catalitico, contenente il sito attivo e la triade catalitica (v. tabella 5). Le regioni finacheggianti questo dominio, comprendenti i siti di legame per il substrato e i siti regolatori, presentano sostanziali differenze, ancora più pronunciate nei membri appartenenti a diverse linee filogenetiche. Sono proprio queste regioni addizionali a spiegare le proprietà uniche di ciascun membro della famiglia.

## 1.8 Transglutaminasi epidermiche

Tra i membri della famiglia delle transglutaminasi, gli enzimi TGasi 1, 3 e 5 sono coinvolti nella formazione dell'involucro corneo.

### 1.8.1 La TGasi 1 o TGasi cheratinocitica

La TGasi 1 è un enzima associato alla superficie interna della membrana dei cheratinociti (Goldsmith and Martin, 1975). È una proteina di 814 aminoacidi, con un peso molecolare teorico di 90 kDa (Kim et al., 1991). Viene espressa in tutta l'epidermide, soprattutto negli alti strati spinoso e granuloso (Schroeder et al., 1992), ma anche nello strato basale e nei follicoli piliferi (Kim et al., 1995), ed ha un ruolo fondamentale nella formazione dell'involucro corneo nei cheratinociti. L'espressione del gene per la TGasi1 può essere indotta dal $Ca^{2+}$ (Floyd & Jetten, 1989; Polakowska et al., 1991; Yada et al., 1993), dal TPA (12-Otetradecanoyl-phorbol-13-acetate; Liew & Yamanishi, 1992; Dlugosz & Yuspa, 1994; Yamanishi et al., 1992), dal ganglioside GQ1b (Yada et al., 1993) e dall'interferone γ (Saunders et al., 1994) in cheratinociti in coltura. La regione 5' a monte di TGM1 ha attività di promotore e contiene siti di risposta per il TPA, sia *in vitro* (Yamada et al., 1994) che *in vivo* (Yamada et al., 1997). La TGasi 1

viene sintetizzata come enzima citosolico e successivamente viene acetilata con gli acidi grassi palmitato e miristato e ancorata alla membrana plasmatica (Chakravarty e Rice, 1989; Steinert et al., 1996b). L'acetilazione interessa un gruppo di cinque residui di cisteina in prossimità della porzione ammino-terminale dell'enzima, che si presenta altamente conservato (90%) nella sequenza amminoacidica della TGasi 1 umana e di ratto, mentre i restanti residui della porzione ammino-terminale hanno una omologia del 75% (Philips et al., 1990). Le cisteine sono fondamentali per l'acetilazione dell'enzima, e quindi per il suo ancoraggio alla membrana. Le modificazioni post-traduzionali della proteina determinano un aumento del 15% del peso molecolare (106 kDa), osservato tramite elettroforesi su gel denaturante, rispetto al peso molecolare teorico. Nei cheratinociti umani sono presenti anche delle forme solubili (citosoliche) dell'enzima, oltre alla forma di membrana di 106 kDa (Kim et al., 1995). In particolare, nelle cellule proliferanti dell'epidermide (strato basale) è presente la proteina completa (106 kDa) ancorata alla membrana plasmatica, mentre nei cheratinociti differenziati è stata identificata anche una forma solubile di 67 kDa, spesso complessata ad una forma di 33 kDa. Nei cheratinociti soprabasali in coltura, l'attività specifica della forma di 67 kDa è due volte più alta dell'attività del complesso solubile 67/33 kDa, che è dieci volte più attivo della TGasi1 ancorata alla membrana (Kim et al., 1995). Tuttavia, nei cheratinociti differenziati, esistono altre forme di TGasi1 ancorate alla membrana plasmatica, oltre a quella da 106 kDa. Quest'ultima, nei cheratinociti differenziati, può essere proteoliticamente tagliata in punti specifici a dare frammenti da 10, 33 e 67 kDa. Questi ultimi due frammenti costituiscono le forme citosoliche 67 e 67/33, probabilmente in seguito al loro ricambio dalla membrana plasmatica. Il frammento di 10 kDa rappresenta la regione ammino-terminale che subisce l'addizione dei gruppi acilici palmitato e miristato, e consente a tutto il complesso 10/67/33 di essere ancorato alla membrana (Steinert et al., 1996). Il frammento di 10 kDa corrisponde alla sequenza di circa 90 residui amminoacidici che precede il dominio a "β-sandwich" della TGasi 1. Quando l'enzima viene proteoliticamente attivato per generare il complesso 10/67/33 kDa, i siti di taglio sono localizzati in prossimità della giunzione tra il peptide transmembrana e il dominio ammino-terminale, e della giunzione tra il dominio catalitico ed il dominio "β-barrel" 1. In seguito all'attivazione proteolitica, che sembra essere mediata dalla catepsina D nei cheratinociti (Egberts F., 2004), la maggior parte TGasi 1 rimane associata con il frammento di 10 kDa per formare il complesso 10/67/33 kDa, unito da interazioni secondarie. Il complesso

10/67/33 kDa è altamente attivo, avendo un'attività specifica 100 volte maggiore della forma da 106 kDa e 20 volte più attivo delle forme citosoliche. E' quindi responsabile della maggior parte dell'attività transglutaminasica di tipo 1 dei cheratinociti differenziati (Steinert et al., 1996). Esistono quindi due condizioni necessarie perchè la TGasi 1 abbia la massima attività specifica: 1) la forma intera deve essere proteoliticamente attivata a formare la forma di membrana 10/67/33 kDa, 2) deve essere presente il frammento da 10 kDa, che quindi ha la duplice funzione di legare il complesso attivato alla membrana plasmatica e di regolare lo stato catalitico dell'enzima (Steinert et al., 1996, Candi et al., 1998). La TGasi 1 è quindi un enzima molto complesso, potendo esistere nei cheratinociti in forme multiple, sia solubili che ancorate alla membrana, processate da enzimi proteolitici in siti conservati. Sebbene la funzione specifica delle diverse forme enzimatiche non sia conosciuta, è stato ipotizzato che abbiano affinità diverse per i substrati (Kim et al., 1995) oppure che possano servire per accumulare l'enzima in uno stato inattivo (Steinert et al., 1996). Recentemente (Nemes et al., 1999) è stata trovata una nuova funzione della TGasi 1 legata alla membrana: quella di catalizzare la formazione di un legame estereo fra l'involucrina e una ω-idrossicerammide. Questo legame è importante perché crea un collegamento fra la struttura lipidica e quella proteica dell'involucro corneo. Il meccanismo di reazione è il seguente: dapprima si ha la formazione dell'intermedio labile acil-enzima tra la glutammina dell'involucrina e la cisteina presente nel sito attivo dell'enzima. Questo intermedio viene poi attaccato dal gruppo nucleofilo debole ω - idrossilico dell'idrossicerammide (che si trova in posizione adiacente all'intermedio acil-enzima) formando un legame estereo con fuoriuscita della TGasi1. Questo legame avviene selettivamente sull'ossidrile ω poiché gli altri ossidrili dell'idrossicerammide sono glicosilati al momento in cui avviene tale reazione.

### 1.8.2. La TGasi 3 o TGasi epidermica

La TGasi 3 è un pro-enzima solubile che viene attivato mediante taglio proteolitico e il cui peso molecolare, dedotto sulla base della sequenza nucleotidica, è di 77 kDa. È codificata da un gene di 42.8 Kbp, costituito da 13 esoni e localizzato sul cromosoma 20 (Wang et al., 1994; Kim et al., 1994). È stata identificata per la prima volta nei follicoli piliferi umani (Chung e Folk, 1972). La sua espressione è confinata e specifica nella guaina

e nella cuticola (Thibaut et al., 2005). L'analisi mediante anticorpi monoclonali o policlonali specifici per la TGasi 3 ha dimostrato che la proteina è espressa negli strati superiori dell'epidermide, e mostra una distribuzione citoplasmatica diffusa, coerentemente con l'ipotesi che prevede per la TGasi 3 un ruolo nelle prime fasi di formazione dell'involucro corneo (Candi et al., 2002; Hitomi et al., 2003; Kalinin et al., 2002; Tarcsa et al., 1998). Recentemente è stato notato che la TGasi 3 viene normalmente espressa negli epiteli normali dell'esofago, ma la sua espressione è diminuita nei corrispondenti carcinomi (Chen et al., 2000). Poiché anche alcuni substrati della TGasi 3, come SPR3, S100A9 e S100A12, hanno un'espressione diminuita in questi tumori, è stato ipotizzato che la minore espressione di queste proteine e della TGasi 3 nei tumori dell'esofago provochi una formazione non corretta del complesso di differenziamento, causando quindi un disturbo della proliferazione cellulare e alterazioni maligne. E' stato dimostrato che il promotore prossimale della TGasi3 contiene le informazioni sufficienti per avere un'alta espressione della proteina degli epiteli squamosi stratificati. Infatti, il promotore della TGasi3 contiene due siti di legame per Sp1 e ets, che interagiscono in maniera cooperativa per attivare la trascrizione del gene TGM3. Tuttavia, sembra che sia necessaria la presenza di altri fattori epidermici, la cui natura non è ancora nota, che potrebbero interagire con le sequenze promotrici distali del gene. La TGasi 3 è coinvolta negli eventi terminali del differenziamento dell'epidermide e dei suoi derivati; la sua attività enzimatica è stata infatti identificata unicamente nella porzione più esterna dello strato granuloso e nello strato corneo. La forma attivata della TGasi 3 è responsabile per più del 75% dell'attività TGasica totale dell'epidermide e del follicolo pilifero, anche se esperimenti di frazionamento cromatografico hanno dimostrato che la quantità di TGasi 3 nell'epidermide è inferiore a quella della TGasi 1 e della TGasi 2 (Kim et al., 1990). Sebbene non se ne capisca bene il significato biologico, l'mRNA della TGasi3 è espresso in numerosi tessuti al di fuori dell'epidermide, come il cervello, il testicolo, l'intestino, la milza e il rene (Hitomi et al., 1999; Kim et al., 1999; Hitomi et al., 2001). La forma pro-enzimatica presenta una bassa attività, ma in seguito al taglio proteolitico l'enzima (50 kDa) diviene altamente attivo (Kim et al., 1990). Non si conosce la natura della proteasi responsabile dell'attivazione della TGasi3, ma si presuppone che *in vivo* venga in qualche modo attivata durante il differenziamento epidermico. Recentemente è stata identificata la catepsina L come prima protesi in grado di tagliare *in vitro* la TGasi 3 (Cheng et al., 2006) Il sito di attivazione proteolitica è localizzato a circa due

terzi della lunghezza della molecola, all'interno della regione più idrofila e flessibile della proteina (Kim et al., 1993). Queste osservazioni indicano che il pro-enzima potrebbe adottare una conformazione allungata in cui i due domini globulari, uno più grande ammino-terminale ed uno più piccolo carbossi-terminale, sono separati da una cerniera flessibile che corrisponde al sito di attivazione. La cerniera è probabilmente localizzata in prossimità della superficie della molecola ed è quindi accessibile alla proteasi responsabile della sua attivazione. La recente risoluzione della struttura cristallografica della TGasi 3 ha permesso di comprendere le modalità con cui la TGasi 3 viene attivata in seguito al taglio proteolitico e quali sono i cambiamenti conformazionali causati dal legame del calcio (Figura 15); Kim et al., 2001; Ahvazi et al., 2002; Ahvazi e Steinert, 2003). Come la TGasi 2, anche la TGasi 3 attivata è inibita in maniera allosterica dal GTP e dal suo analogo non idrolizzabile, il GTPγS (Hitomi et al., 1999). Al contrario della TGasi 2, però, questa inibizione non è revertita dal Ca2+, e l'ATP e l'ATPγS non hanno alcun effetto sulla attività transglutaminasica, per cui si pensa che il meccanismo di interazione con il GTP sia diverso per la TGasi 2 e la TGasi 3 (Hitomi et al., 2000). Inoltre, finora non è stato ancora verificato se, dopo aver legato il GTP, la TGasi3 sia in grado anche di idrolizzarlo. Non è ancora ben chiaro il significato biologico di questa inibizione, che potrebbe essere una funzione accessoria del diretto progenitore delle TGasi2 e 3 (v. Fig.12).

### 1.8.3. La TGasi 5 o TGasiX

La TGasi 5, conosciuta anche come TGasi X, è uno degli ultimi membri della famiglia delle transglutaminasi ad essere stato identificato e parzialmente caratterizzato (Aeschlimann et al., 1998; Candi et al., 2001; Candi et al., 2002). L'enzima è costituito da 719 aminoacidi ed ha un peso molecolare di circa 81 KDa. Sono stati identificati, sia nella pelle umana che in cheratinociti in coltura, oltre alla forma intera dell'enzima, anche tre varianti di splicing alternativo, che non risultano essere attivi. L'espressione della TGasi 5 viene indotta, nei cheratinociti in coltura, in seguito a trattamento con agenti che inducono il differenziamento in queste cellule, come il $Ca^{2+}$ e il TPA, ma l'induzione è temporalmente diversa rispetto alle altre due transglutaminasi epidermiche, le TGasi 1 e 3 (Candi et al., 2001). Ulteriori studi hanno dimostrato che, similimente alla TGasi 2, la TGasi 5 oltre all'attività transamidasica, possiede anche la capacità di legare ed

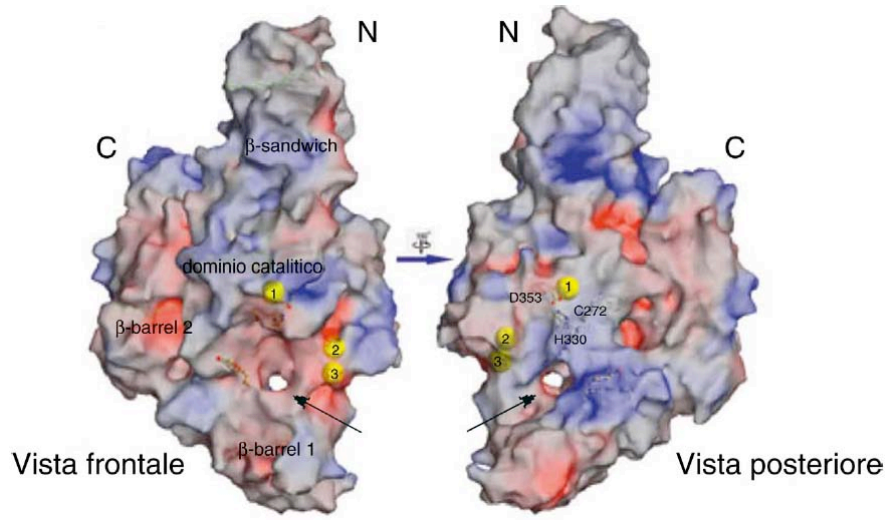



**Figura 15.** *Figura cristallografica della TGasi 3 umana attivata.* Nel modello è mostrato il potenziale elettrostatico della struttura della TGasi 3. A sinistra è mostrata la visione frontale del modello, mentre a destra quella posteriore. I colori variano dal rosso (gruppi acidi) al blu (gruppi basici). Sono indicati i quattro domini caratteristici delle transglutaminasi, la posizione della triade catalitica della TGasi 3 e dei tre ioni calcio legati all'enzima (in giallo). Le frecce indicano il canale che si viene ad aprire in seguito al legame del calcio. N, estremità amino terminale; C, estremità carbossi terminale.

idrolizzare il GTP, che agisce sulla TGasi5 come inibitore non competitivo (Candi et al., 2004). Studi biochimici hanno dimostrato che la forma intera della TGasi5 è attiva, ed utilizza con buona efficienza i substrati specifici dell'epidermide, come la loricrina, le SPRs e l'involucrina, ed i valori cinetici per questi substrati sono comparabili con quelli delle TGasi 1 e 3. Questi dati fanno pensare che effettivamente la TGasi 5 sia coinvolta nei primi stadi dell'assemblaggio dell'involucro corneo, durante il differenziamento epidermico. Ciò è stato ulteriolmente confermato dall'analisi dell'espressione della proteina nella pelle umana (Candi et al., 2002). La TGasi 5 è normalmente espressa negli strati soprabasali dell'epidermide (Figura 16), dove segue un gradiente di espressione che aumenta progressivamente andando dallo strato basale fino allo strato granuloso. Lo studio dell'espressione della TGasi 5 in diverse malattie della pelle ha rivelato che l'enzima è deregolato nella malattia del Darrier e nell'ittiosi lamellare, mentre il quadro di espressione non sembra essere particolarmente modificato nella psoriasi e nell'ittiosi volgare (Candi et al., 2002). Sebbene non si comprenda ancora se la TGasi 5 sia coinvolta direttamente in queste patogenesi, sembra chiaro che l'espressione dell'enzima riflette l'alterazione del processo di differenziamento che si manifesta in queste patologie, a conferma di un ruolo attivo della TGasi 5 nel mantenimento dell' omeostasi dell' epidermide. La TGasi 5 è inoltre espressa nel follicolo pilifero al livello dell'IRS (strato interno della radice) e dell'ORS (strato esterno della radice) colocalizzando con l'involucrina (Thibaut et al., 2005). Non è ancora stata stabilità con sicurezza la localizzazione cellulare della TGasi 5. L'enzima risulta essere insolubile in tamponi contenenti detergenti non ionici, come il triton X-100, ed una completa solubilizzazione dell'enzima è possibile solo utilizzando agenti denaturanti, come SDS e UREA (Candi et al., 2001). Quando viene trasfettata nei cheratinociti in coltura, la TGasi5 risulta essere presente nel citoplasma, sotto forma di granuli, dove è principalmente localizzata in posizione perinucleare. Esperimenti di frazionamento cellulare e microscopia confocale hanno mostrato che l'enzima co-localizza con la rete di filamenti intermedi di vimentina, a loro volta insolubili, e questa possibile interazione potrebbe essere la spiegazione dell'insolubilità della TGasi 5. L'enzima è anche in grado di utilizzare la vimentina come substrato (Candi et al., 2001), come già descritto per altre transglutaminasi (Tucholski et al., 1999; Qian et al., 1997; Zatloukal et al., 1989). Il fatto che la vimentina sia espressa solo nei cheratinociti in coltura, ma non nell'epidermide (Franke et al., 1979) suggerisce che, oltre ad avere un ruolo nel differenziamento

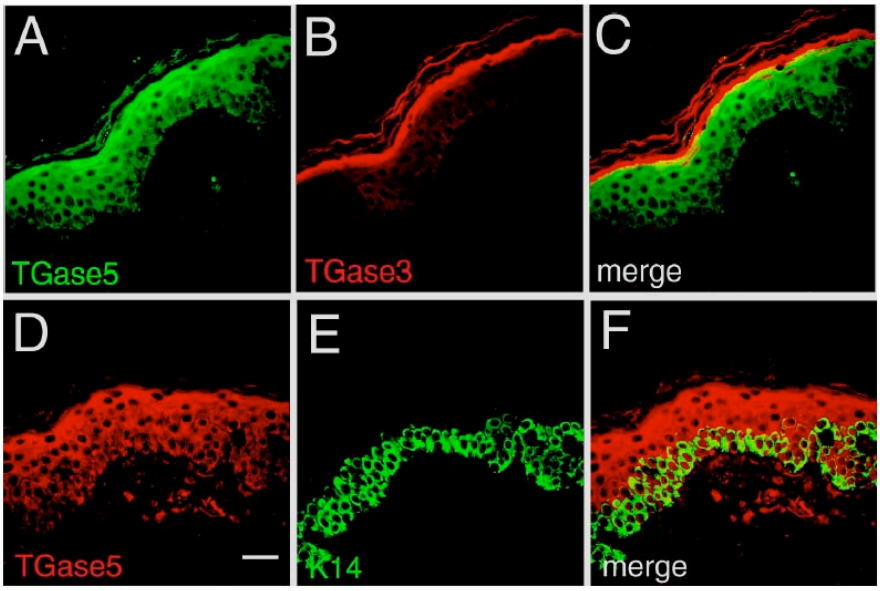



**Figura 16.** *Espressione della TGasi 5 nell'epidermide umana.* LA TGasi 5 (A e D) è espressa nell'epidermide umana, in particolare negli stati soprabasali, come dimostra la colorazione della K14 (E). L'enzima risulta avere un'espressione esclusiva rispetto alla TGasi 3 (B), che invece è riscontrabile negli strati più maturi della pelle.

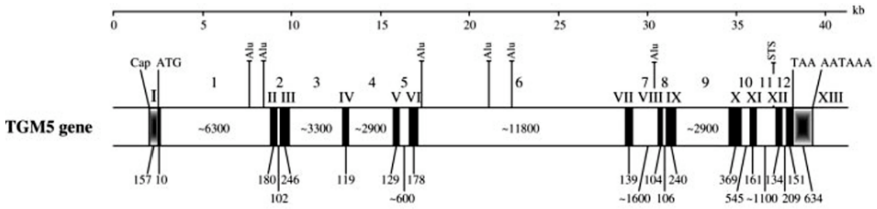



**Figura 17.** *Organizzazione genomica del gene TGM5 umano.* Il gene TGM5 umano è rappresentato con gli esoni numerati I-XIII e indicati dai rettangoli solidi, separati dagli introni 1-12. La tagli di esoni ed introni è data in bp. Le ragioni non tradotte in 5' e 3' negli esoni I e XIII, rispettivamente, sono indicati dai rettangoli ombreggiati, dove sono indicato gli elementi funzionali che definiscono il trascritto. Alu, retrotrasposone Alu derivato da 7SL; STS, sequenze tagged site.

epidermico, la TGasi 5 possa essere coinvolta in altri processi cellulari, laddove viene espressa anche la vimentina. In effetti, il cDNA della TGasi5 è stato trovato anche in altre linee cellulari, come fibroblasti e osteosarcomi (Aeschlimann et al., 1998). La TGasi 5 potrebbe avere un ruolo anche nella morte cellulare programmata. E' stato infatti osservato che l'enzima è in grado di indurre in overespressione apoptosi sia nelle cellule SK-N-Be che nelle cellule HEK-293 (Cadot et al, 2004). Recentemente, è stato isolato e caratterizzato il gene codificante per la TGasi5 umana (TGM5; Grenard et al., 2001). Il gene, della grandezza di 35 Kbp, si trova nella regione 15q15.2 del cromosoma 15, e consiste, come gli altri membri della famiglia delle transglutaminasi, di 13 esoni e 12 introni (Figura 17). Tutti i siti di splicing introne/esone sono stati confermati essere i classici siti GT/AG donatore/accettore. La grandezza degli introni varia considerevolmente, da 106 bp a più di 11 Kbp. L'analisi della regione 5' non tradotta ha rivelato che l'inizio della trascrizione si trova 157 nucleotidi a monte del codone di inizio della traduzione  La regione del promotore non presenta nessuna classica sequenza TATA-box, per cui potrebbe trattarsi di un promotore senza TATA. Sono stati trovati anche siti potenziali per il legame con AP1, SP1 e Ets, tipici dei geni cheratinocita-specifici. Siti potenziali per c-Myb, correlati con i fattori Ets sono stati trovati in una serie di promotori senza TATA box in geni coinvolti nell'ematopoiesi (Oh et al., 1999), e quindi questi siti potrebbero essere operativi nell'espressione della TGasi 5 in cellule ematopoietiche. Nella regione 3' non tradotta, è presente un classico segnale di poliadenilazione, circa 600 bp a valle del codone di terminazione. Un'ulteriore analisi delle sequenze genomiche vicine al gene della TGasi 5 ha mostrato la presenza in questo locus dei geni codificanti altre due transglutaminasi, EPB42 (la banda 4.2) e TGM7 (che codifica per la TGasi 7, non ancora caratterizzata; Grenard et al., 2001), disposti in tandem con TGM5 (Figura 18). Questi tre geni formano quindi un cluster di geni della famiglia delle transglutaminasi, simile a quello già trovato sul cromosoma 20, formato da TGM2 e TGM3, oltre che da un nuovo gene non ancora clonato, TGM6. Tutti e sei i geni dei due cluster sono stati trovati nel topo sulla parte distale del cromosoma 2 (Grenard et al., 2001). Questa scoperta suggerisce che i sei geni derivino dalla duplicazione locale di un singolo gene, e successivamente siano stati ridistribuiti in due distinti cromosomi nel genoma umano durante l'evoluzione.

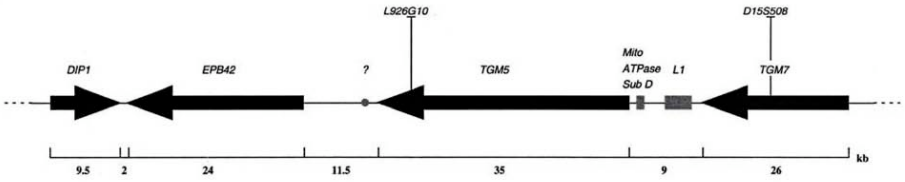



**Figura 18**. *Schema del locus contenente il gene TGM5 umano*. Nello schema è mostrata l'organizzazione dei geni che codificano per la TGasi 5 (TGM5), per la banda 4.2 (EPB42) e la TGasi 7 (TGM7). Il locus contiene altri geni, quali DIP1 (D-type cyclin-interacting protein), Mito ATPase Su D (mithocondrial ATPase subunit D seudogene), L1 ( un elemento ripetitivo), diversi marcatori genici, e un EST (?). Sono indicate le grandezze dei geni (barra inferiore), espresse in Kbp.

**Figura 19.** *Fenotipo dell'APSS.* (a) L'APSS ( Acral Peeling Skin Sindrome), malattia genetica autosomica recessiva, che coinvolge gli arti superiori ed inferiori. (b) In particolare la regione dorsale di mani e piedi. (c) E' accompagnata da eritemi estesi che si risolvono nel giro di alcuni giorni. (d) In seguito ad esposizione ad alto tasso di umidità ed elevate temperature si osserva un distacco della pelle a livello della giunzione tra lo strato granuloso e lo strato corneo.

### 1.8.4 TGasi 2 o TGasi tissutale

La TGasi2, una proteina monomerica (690 aminoacidi) il cui peso molecolare calcolato in base alla sequenza aminoacidica è di 77 kDa, è codificata da un gene localizzato sul cromosoma 20. Il sito attivo si estende dall'aminoacido 275 al 304; il residuo di cisteina del sito attivo è localizzato in posizione 277 e la molecola ha complessivamente 17 residui di cisteina, nessuno dei quali è coinvolto nella formazione di legami disolfuro. Inoltre, non contiene carboidrati, sebbene siano presenti sei potenziali siti di Nglicosilazione. Analogamente alla altre TGasi, è costituita da un dominio amino-terminale, da un dominio catalitico e da due domini "β-barrels". La TGasi 2 è una proteina citosolica, sebbene una piccola frazione (4-20%) risulta essere associata alle membrane (Chang e Chung, 1986; Korner et al., 1989), e un frammento N-terminale della proteina è legato ai pori nucleari, anche se non è ben nota la sua funzione (Singh et al., 1995). Può essere anche secreta, anche se non ne è stato spiegato il meccanismo, e va a localizzarsi sulla superficie cellulare. L'enzima presenta un'ampia distribuzione (Chung, 1972); studi di immunoistochimica, eseguiti su tessuti umani al fine di determinare la localizzazione *in situ* della proteina, hanno dimostrato che l'ampia distribuzione della TGasi 2 è determinata dalla sua espressione in cellule ubiquitarie, quali quelle endoteliali e muscolari lisce (Thomazy e Fesus, 1989). Inoltre, alcune cellule organo-specifiche come ad esempio gli eritrociti, i monociti, i mastociti, i fibroblasti, i macrofagi, i cheratinociti (Lichti et al., 1985) e le cellule istiociti -simili del polmone sintetizzano costitutivamente l'enzima (Thomazy e Fesus, 1989). La sua espressione nell'epidermide umana è localizzata esclusivamente nello strato basale (Candi et al., 2002). Quest'ultima è normalmente espressa a bassi livelli nella cellula, e l'incremento della sua espressione si ha solo dopo una prolungata esposizione a determinati stimoli, quali i retinoidi, la prostaglandina E2, l'interleuchina 6 ed il fattore di crescita tumorale βregione codificante per la TGasi2 hanno permesso di identificare gli elementi regolatori del suo promotore (Yan et al.,1996) Una volta che la TGasi 2 viene espressa, la sua attività enzimatica può essere regolata dal legame con diversi co-fattori, come il GTP, l'ATP e il $Ca^{2+}$. Il GTP e l'ATP (ed in maniera ancora più forte i loro analoghi non idrolizzabili, il GTPγS e l'ATPγS), complessati con $Mg^{2+}$, sono in grado di inibire l'attività transglutaminasica dell'enzima in maniera dose-dipendente (Achyuthan & Greenberg, 1987; Lai et al., 1996; Lai et al., 1998), legandosi in un sito posto fra il dominio catalitico ed il β-barrel 1. I residui chiave dell'interazione fra

enzima e nucleotide sono stati individuati tramite studi di cristallografia e mutagenesi *in vitro* (Liu et al., 2002; Iismaa et al., 2000). Oltre che legare il GTP, la TGasi 2 è anche in grado di idrolizzarlo (Lee et al., 1989). Il meccanismo dell'inibizione da parte del GTP è probabilmente dovuto a cambiamenti conformazionali dell'enzima (Di Venere et al., 2000), che stabilizzano l'enzima, incrementando l'energia libera richiesta per la sua denaturazione, e diminuiscono l'accessibilità al solvente, rendendo più difficile l'esposizione del sito attivo. Sebbene la TGasi2 sia stata la prima TGasi ad essere identificata, il suo ruolo fisiologico non è stato ancora determinato con esattezza; l'enzima sembra essere coinvolto in diversi processi cellulari come lo sviluppo embrionale, il controllo del differenziamento e l'apoptosi (o morte cellulare programmata) (Melino et al., 1994). Al contrario di altri memrbi della famiglia delle transglutaminasi, le funzioni biologiche della TGasi 2 sono molto diverse. Attualmente, comunque, non è stata trovata alcuna malattia genetica correlata con questo enzima. Topi transgenici mancanti di un gene funzionale per la TGasi 2 sono fenotipicamente normali alla nascita, non presentano anormalità durante lo sviluppo, l'induzione dell'apoptosi sia *in vitro* che *ex vivo* non presenta nessuna sostanziale differenza con topi del ceppo selvatico (De Laurenzi & Melino, 2001; Nanda et al., 2001). Ciò potrebbe dipendere dalla ridondanza fra le sue proprietà e quelle di altre transglutaminasi non ancora ben caratterizzate, come le TGasi 5, 6 e 7. Recentemente, sono state individuate alcune differenze fra i topi selvatici e quelli mancanti della TGasi 2: i fibroblasti hanno una minore adesività in coltura (Nanda et al., 2001); i macrofagi presentano una ridotta attività fagocitaria associata ad uno sviluppo di splenomegalia, autoanticorpi, e glomerulonefriti (Szondy et al., 2003); i topi mancanti della TGasi2 presentano una diversa secrezione di insulina indotta dal glucosio, per cui questi topi sviluppano ipoglicemia in seguito alla somministrazione esogena di insulina, un fenotipo che ricorda quello di pazienti affetti da MODY (maturity-on set diabetes of young), una forma di diabete di tipo 2 autosomica dominante, caratterizzata da una secrezione difettiva di insulina (Bernassola et al., 2002).

### 1.8.5 Altri membri della famiglia delle TGasi

La TGasi 4, o TGasi prostatica il cui cDNA è stato clonato e caratterizzato, è espressa specificamente nella prostata umana ed è implicata nel processo di coagulazione del seme (Grant et al., 1994). Il peso

molecolare di 77 kDa è stato dedotto dalla sequenza nucleotidica del cDNA e confermato da esperimenti di trascrizione/traduzione e successiva elettroforesi su gel denaturante (Dubbink et al., 1996). Il gene è stato localizzato sul cromosoma 3 nella regione 3p21.33-p22 (Gentile et al., 1995). Diversi studi sono stati compiuti sulla TGasi 4 di ratto, che presenta un'alta omologia con la forma umana. Storicamente, la transglutaminasi prodotta dalla prostata dei roditori può essere considerata come il primo membro della famiglia scoperto. Infatti, già nel 1896 era stato riconosciuto che le secrezioni della vescicola seminale dei roditori erano coagulati da un enzima, allora chiamato *vescicolasi*, presente nella secrezione prostatica (Camus e Gley, 1896). In seguito, è stato trovato che la proteina catalitica era prodotta nel lobo anteriore della prostata, chiamato anche ghiandola coagulante (Williams-Ashman, 1984). Le caratteristiche biochimiche di base dell'enzima e la formazione di legami crociati intermolecolari glutamminalisina delle proteine vescicolari secrete sono state descritte per la prima volta nel 1987 (Lorand e Williams-Ashman, 1987). Recentemente, è stato trovato che la transglutaminasi prostatica di ratto è una singola catena polipeptidica altamente glicosilata, del peso di 65 KDa, e possiede un'ancora lipidica che viene mantenuta durante la secrezione (Seitz et al., 1991). Riguardo al suo significato biologico, è generalmente accettato che la coagulazione catalizzata dalla TGasi 4 dello sperma dei roditori, che avviene nella vagina dopo il coito, con la risultante formazione di un tappo copulatorio, potrebbe aiutare la fertilizzazione, facilitando il passaggio degli spermatozoi attraverso la cervice uterina (Williams-Ashman, 1984). Una serie di studi condotti nel ratto su una delle principali proteine secrete presenti nella vescicola seminale suggerisce un ruolo biologico addizionale per la TGasi 4 (Paonessa et al., 1984; Porta et al., 1990; Porta et al., 1991). E' stato infatti dimostrato nel ratto che l'enzima produce forme polimeriche di questa proteina, che in questo modo acquista la capacità di legare le cellule spermatiche e sopprimere la loro immunogenicità. L'enzima avrebbe quindi nei roditori il ruolo di impedire il rigetto degli spermatozoi da parte degli elementi immunocompetenti presenti nel tratto genitale femminile. Lo stesso ruolo è stato ipotizzato anche nell'uomo, poiché è stata riscontrata attività transglutaminasica sia secreta nel plasma seminale umano che legata agli spermatozoi (Porta et al., 1986). Studi biochimici compiuti sulla TGasi 4 di ratto hanno dimostrato che l'enzima presenta una serie di modificazioni post-traduzionali (Esposito et al., 1996). In particolare, l'enzima presenta almeno due residui N-glicosilati, ed è stata confermata la presenza di lipidi legati direttamente alla catena polipeptidica. Sebbene la TGasi 4 di ratto sia

un enzima Ca2+-dipendente come gli altri membri della famiglia, è stato notato che *in vitro* l'enzima risulta essere attivo anche in assenza di calcio aggiunto (Esposito et al., 1996). La TGasi 4 di ratto è capace di legare il GTP, ed una delle metodiche utilizzate per la purificazione prevede una cromatografia di affinità con questo nucleotide (Spina et al., 1999). Tuttavia non è noto se anche la TGasi 4, come la TGasi 2 e la TGasi 3, venga inibita dal legame con il GTP, né se è in grado di idrolizzarlo. Analisi di delezione hanno permesso di dimostrare che il dominio responsabile del legame con il GTP è situato nell'estremità N-terminale della TGasi 4, regione che sembra anche essere importante per l'attività catalitica dell'enzima. Infatti, il mutante privo dei primi 103 amminoacidi della TGasi 4 non è più in grado di legare il GTP, e perde la sua attività transglutaminasica (Mariniello et al., 2003). Il fattore XIII, l'ultimo fattore della cascata enzimatica della coagulazione, è una glicoproteina presente nel plasma in forma di eterotetramero inattivo costituito da due subunità catalitiche a di 79 kDa e da due subunità b di approssimativamente 90 kDa. Il fattore XIII esiste anche come dimero a2 nelle piastrine, nei monociti e nella placenta. L'attivazione del pro-enzima avviene durante la fase terminale della coagulazione in seguito al taglio proteolitico della subunità a catalizzato dalla trombina in corrispondenza del legame Arg37/Gly38. L'azione della trombina promuove il rilascio di un peptide di attivazione (4 kDa) dall'estremità amino-terminale di ciascuna subunità a e la dissociazione delle subunità a e b. In presenza di ioni $Ca^{+2}$, il tetramero $a_2b_2$ dissocia in un omodimero attivo $a_2$ ed in due subunità b. La forma attivata dell'enzima (fattore XIIIa), contenente l'attività TGasica, catalizza la formazione di legami isopeptidici ε-(γ-glutamil)lisina tra le catene laterali di molecole adiacenti di fibrina. In questo modo, il fattore XIII stabilizza il coagulo prodotto dall'aggregazione di monomeri di fibrina. La formazione di legami intermolecolari tra i monomeri di fibrina aumenta infatti notevolmente la forza meccanica, la stabilità e la resistenza alla proteolisi del coagulo. La resistenza e l'insolubilità del coagulo sono ulteriormente incrementati dalla sintesi di legami crociati tra la fibrina ed altre proteine plasmatiche, tra la fibrina e la fibronectina e tra quest'ultima ed il collagene. Il fattore XIIIa viene codificato da un gene di 160 Kbp, contenente 15 esoni (Ichinose e Davie, 1988), localizzato nella regione 6p24-25 del cromosoma 6 (Board et al., 1988). Il secondo esone codifica per il peptide di attivazione rilasciato dalla trombina, il settimo e l'undicesimo contengono le sequenze nucleotidiche che codificano rispettivamente per il sito attivo ed il presunto sito di legame per il calcio. La struttura primaria della subunità a, costituita da 731 aminoacidi, è stata determinata

combinando il clonaggio del cDNA con l'analisi diretta della sequenza aminoacidica. Il residuo di cisteina del sito attivo è localizzato in posizione 314. Il sito attivo contiene un residuo di istidina (His-373) che sembra aumentare la nucleofilicità del gruppo tiolico della cisteina 314, contribuendo così all'azione catalitica del fattore XIII. La banda 4.2 è un costituente ubiquitario della membrana plasmatica nella maggior parte delle cellule eucariote. E' uno dei principali componenti della membrana degli eritrociti umani dove rappresenta il 5% delle proteine totali. La banda 4.2 si associa con il dominio citoplasmatico della banda 3 (Korsgren e Cohen, 1986), una glicoproteina integrale, e con l'anchirina, un polipeptide localizzato sulla superficie citosolica della membrana eritrocitaria (Korsgren e Cohen, 1988). Le associazioni multiple della proteina suggeriscono che la banda 4.2 abbia un ruolo strutturale nella membrana degli eritrociti. La banda 4.2 degli eritrociti umani è una proteina di circa 75 kDa in cui il residuo critico di cisteina, localizzato all'interno della sequenza consenso del sito attivo e necessario per l'attività enzimatica delle TGasi, è sostituito da un residuo di alanina (Korsgren et al., 1990). In accordo con questa sostituzione aminoacidica, la proteina non presenta attività TGasica (Korsgren et al., 1990). D'altra parte, l'esistenza di identità e di omologia di sequenza tra la banda 4.2 e le TGasi giustifica il fatto che la proteina venga considerata un membro della famiglia delle TGasi. Recentemente sono stati caratterizzati altri membri appartenenti alla famiglia delle transglutaminasi: la TGasi 6 ($TG_Y$) e la TGasi 7 ($TG_Z$) (Grenard et al., 2001). Il gene *TGM7* è stato scoperto mappare a circa 9 kb a monte del gene TGM5, sul cromosoma 15q15. La struttura richiesta per la specifica attività transglutaminasica ed il legame con il $Ca^{2+}$ risulta essere altamente conservata, in particolare i residui appartenenti alla triade catalitica (Cys279, His338, and Asp361) ed il dominio catalico sono altamente conservati se paragonato alla sequenza degli altri membri della famiglia. La TGasi 7 è espressa nelle cellule di osteosarcoma (MG-63), nei fibroblasti (TJ6F, HCA2), nei cheratinociti primari, nelle cellule epiteliali di carcinoma mammario (MCF7), nelle cellule HELA, nei testicoli, pelle, cervello, cuore, rene, polmone, pancreas, placenta, muscolo scheletrico, fegato, prostata, e nel carcinoma della prostata. L'ultimo membro caratterizzato delle famiglia delle transglutaminasi è la TGasi6 o TGasiY. Il gene TGM6 mappa nelle vicinanze del gene TGM3 sul cromosoma 20q11/12, ma non se ne conosce la distribuzione tissutale.

## 1.9 Malattie genetiche in relazione con l'involucro corneo

Difetti in ciascuno dei componenti strutturali o nei processi enzimatici che coinvolgono la formazione ed il mantenimento dell'epidermide e dello strato corneo, danno luogo ad una serie di malattie della pelle definite "disordini della cheratinizzazione" o *Genodermatosi*. Sono caratterizzati dalla presenza di un ispessito strato corneo, ipercheratinizzato, dalla presenza di scaglie desquamanti ed in alcuni casi da manifestazioni più gravi come la presenza di bolle dovute allo scollamento dell'epidermide dallo strato sottostante o dal fallito completamento dello sviluppo delle terminazioni degli arti. Le genodermatosi sono così definite perché sono determinate da difetti genetici. Si tratta di un gruppo eterogeneo di patologie in cui le caratteristiche cliniche ed istopatologiche sono molto variabili e spesso sovrapponibili. Per questi motivi e a causa della loro rarità, la loro classificazione è estremamente complessa. L'incidenza per alcuni tipi è molto bassa, circa 1:100.000/250.000, ma hanno comunque un impatto sociale notevole, in quanto sono malattie spesso disfiguranti che costringono i pazienti ad una bassa qualità di vita e che possono comportare notevoli problemi psicologici e sociali. In generale, si tratta di malattie deturpanti ma raramente letali, che si presentano con gradi di severità variabile.

# 1.9.1. Malattie genetiche relative alle TGasi1

## 1.9.2 Ittiosi Lamellare

L' ittiosi congenita autosomica recessiva (ARCI) è un raro disordine della cheratinizzazione. È clinicamente divisa in tre sottotipi, l'ittiosi arlecchino (HI), l'ittiosi lamellare (LI) e l'eritrodermia ittiosiforme congenita non bollosa (NBCIE). Sono stati identificati cinque geni considerati la causa dell'insorgere di questa patologia: il gene TGM1 che codifica per la transglutaminasi 1 (Huber, et al., 1995; Russell, et al., 1995), il gene ABCA12 che codifica per una proteina di membrana ad attività ATPasica (Annilo, et al., 2002; Lefevre, et al., 2003), i geni ALOXE3, ALOX12B che codificano per le lipossigenasi (Jobard, et al., 2002) ed il gene *ichtyin* (Lefevre, et al., 2004).

In particolare, mutazioni nel gene codificante per la TGasi 1 sono state trovate in pazienti affetti da ittiosi lamellare, un disturbo congenito della cheratinizzazione che si trasmette in maniera autosomica recessiva con una incidenza di circa 1 a 250.000, caratterizzato da pelle sottile e squamosa (Huber et al., 1995a; Hazell et al., 1985; Hohl et al., 1993; Huber et al., 1995b; Parmentier et al., 1995; Russel et al., 1994). Spesso, i pazienti affetti alla nascita presentano una membrana ruvida che li circonda, molto fragile, per cui vi è un alto rischio di infezioni e disidratazione. I principali cambiamenti istologici dell'ittiosi lamellare riguardano un disturbo della formazione dello strato corneo o del differenziamento epidermico. E' stata anche trovata una funzione di barriera della pelle ridotta in studi di perdita d'acqua associata ad un cambiamento nei lipidi dello strato corneo (Lavrijsen et al., 1995). Molte delle sostituzioni riscontrate nel gene della TGasi 1 in pazienti affetti da ittiosi lamellare risultano nella perdita della funzione dovuta alla mancata formazione di interazioni ioniche e di legame idrogeno che hanno un ruolo determinante nel garantire l'attività enzimatica. Questi cambiamenti probabilmente causano un ripiegamento non corretto della proteina con conseguente perdita di attività. Altre mutazioni vanno invece ad interferire con l'attivazione proteolitica della TGasi 1, necessaria per l'attività dell'enzima in cheratinociti differenziati (Candi et al., 1998). Recentemente, sono stati prodotti topi transgenici mancanti del gene codificante per la TGasi1 (Matsuki et al., 1998). I topi omozigoti per la mutazione muoiono alla nascita, mancando di un involucro corneo normale e con una funzione di barriera della pelle destabilizzata, un marcato incremento della permeabilità ai coloranti della pelle ed una forte

disidratazione. La pelle dei topi neonati KO per la TGasi1 è rigida ed eritrodermica, ma quando viene transpiantata si sviluppa in una pelle che ricorda quella di pazienti affetti da ittiosi lamellare, con iperplasia epidermica e ipercheratosi marcata (Kuramoto et al., 2002), probabilmente come compensazione fisica per la permeabilità cutanea difettiva, richiesta per la vita nell'ambiente terrestre. I topi eterozigoti per la mutazione, invece, presentano un fenotipo normale. Questi dati recenti dimostrano non solo l'importanza della TGasi 1 nella corretta formazione dello strato corneo, ma anche che per la TGasi 1 non esiste ridondanza, non potendo essere sostituita da un'altra TGasi per svolgere le sue funzioni durante il differenziamento epidermico.

### 1.9.3 Istopatologia dell'Ittiosi Lamellare

La microscopia ottica dell'epidermide affetta da ittioli lamellare mostra ortoipercheratosi massiva e compatta, con lo spessore dello strato corneo maggiore rispetto a quella dell'epidermide di un individuo sano. Lo strato granuloso appare normale o incrementato, il resto dell'epidermide è normale e complessivamente lo spessore dell'epidermide è leggermente aumentato. Tecniche istochimiche di identificazione di glicoconiugati e localizzazione di steroli liberi mostrano una colorazione simile a quella di una pelle normale. Studi cinetici rivelano un turnover cellulare quasi normale, per cui l'ittiosi lamellare è un'ittiosi di ritenzione (Hazell and Marks, 1985).

Le caratteristiche dell'ittiosi lamellare in microscopia ottica sono variabili. In alcuni pazienti sono stati visti prominenti cristalli di colesterolo nello strato corneo, gocce di lipidi nei corneociti ed un involucro corneo sottile od inesistente (Niemi*, et al.*, 1991).

### 1.9.4 Caratteristiche Cliniche dell'Ittiosi Lamellare

Come già detto, alla nascita molti bambini affetti da ittiosi lamellare sono ricoperti da una membrana ruvida e fragile. Entro il primo mese di vita, si riscontra la formazione di squame, che possono ricoprire l'intera superficie della pelle o localizzarsi nel cuoio capelluto, nell'addome e nelle gambe.

Le squame nell'ittiosi lamellare sono di solito simili a placche, larghe, marrone scuro o grigie e frammenti aderenti. Negli individui gravemente affetti, la rigidità delle scaglie e la intermittente perdita di peli provoca profonde e dolorose fenditure soprattutto sulle dita, sul palmo della mano e sulla pianta dei piedi. Si può quindi avere una limitazione nei movimenti

delle giunture. Caratteristiche addizionali, riscontrate in alcuni pazienti, sono cheratoderma palmoplantare e ipoplasia congenita delle cartilagini auricolari e nasali. Generalmente è assente eritroderma, o se presente è mitigato, raramente è presente prurito e la sudorazione è gravemente danneggiata. Capelli, denti e membrane della mucosa non sono affetti, e crescita ed intelligenza sono normali.

Alcune forme più mitigate di ittiosi lamellare hanno le tipiche squame marroni solo nelle gambe, nelle braccia e a lato del tronco. Questi pazienti possono avere squame bianche sulle giunture e sulle ginocchia, di solito presentano palmo delle mani e pianta dei piedi normali, e tendono a migliorare nei mesi estivi.

## 2.1 Giunzioni Comunicanti: struttura e funzioni.

Negli organismi pluricellulari la comunicazione tra le cellule è importante per il mantenimento dell'omeostasi dei tessuti e degli organi. Comunicando tra loro, le cellule ricevano segnali dovuti a cambiamenti ambientali e riescono a rispondere ad eventuali stimoli. Le reazioni causate da questi stimoli possono innescare una risposta coordinata tra le cellule adiacenti cosi da mantenere l'integrità del tessuto (Mese et al., 2007). La comunicazione cellulare può essere mediata da canali intercellulari che si organizzano in regioni specializzate della membrana plasmatica per formare le giunzioni comunicanti (gap junction) (Robertson et al., 1963; Revel and Karnovsky et al., 1967; Wei et al., 2004). Le gap junction mettono in comunicazione il citoplasma di due cellule adiacenti e forniscono un mezzo per lo scambio di ioni ($K^+$ e $Ca^{2+}$), secondi messaggeri (cAMP, cGMP ed inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3)) e piccoli metaboliti (glucosio), consentendo una comunicazione elettrica e biochimica tra le cellule (Kanno and Lowenstein, 1964; Lawrence et al., 1978). La comunicazione cellulare attraverso le giunzioni gap è essenziale per numerosi eventi fisiologici quali la sincronizzazione cellulare, la crescita delle cellule e la coordinazione metabolica di alcuni organi come l'epidermide (White and Paul, 1999; Vinken et al., 2006). Le giunzioni comunicanti sono presenti sia nei vertebrati che negli invertebrati. Nei cordati le proteine che costituiscono le giunzioni comunicanti sono le connessine e sono codificate da una famiglia di geni (Goodenough, 1974) che possono essere distinti in tre gruppi, conosciuti come α, β e γ a seconda della struttura del gene e della specifica sequenza (Harris, 2001). Ci sono due differenti nomenclature convenzionali in letteratura per le connessine, una basata sulla massa molecolare della connessina (ad esempio Cx 26 rappresenta la connessina con il peso molecolare di 26 kDa etc.), l'altra che usa una simbologia basata su considerazioni evoluzionistiche (GJB2 è la gap junction beta 2 che è costituita dalla Cx26). La comunicazione attraverso le giunzioni gap negli animali non-cordate è mediata da un'altra famiglia di proteine integrali di membrana conosciute come innessine (Inxs). Le innessine non sono proteine omologhe alle connessine a livello di sequenza primaria; ció nonostante le giunzioni gap formate dalle innessine mostrano una similarità a livello funzionale con quelle costituite dalle connessine. Recentemente, sono state identificate nei vertebrati un altro gruppo di proteine chiamate pannessine (Panxs), le quali possono essere correlate con le innessine. E' stato dimostrato come queste proteine sono espresse in diversi tessuti quali i

neuroni, i reni e nell'occhio (Panchin t al., 2005; Barbe et al., 2006). Solo le conessine sono state associate nell'uomo a diverse patologie a trasmissione genetica.

## 2.2 Organizzazione strutturale delle connessine e delle giunzioni comunicanti.

Le giunzioni comunicanti sono strutture di membrana altamente specializzate, costituite da una serie di canali. Affinché avvenga la formazione delle giunzione gap due cellule adiacenti devono essere ad una distanza non superiore ai 2-4 nm (Bruzzone et al., 1996; White and Paul, 1999). I membri della famiglia delle connessine mostrano una elevata similarità strutturale. Ogni connessina è costituita da quattro domini transmembrana che rappresentano il poro del canale. Questi domini sono connessi da due loop extracellulari che svolgono un ruolo nel riconoscimento cellula-cellula e nel processo di contatto. I domini transmembrana ed i loop extracellulari sono altamente conservati tra i membri della famiglia. Queste proteine hanno anche la porzione intracellulare costituita da un N- e C-terminale e da un loop citoplasmatico che lega il secondo ed il terzo dominio transmembrana (Figura 20a). Sebbene il dominio N-terminale sia molto conservato, il loop citoplasmatico ed il dominio C-terminale mostrano una grande variabilità a livello di sequenza amminoacidica e di lunghezza che determina la specificità di ogni singola connessina. Il loop citoplasmatico ed il dominio C-terminale subiscono modificazioni post-traduzionali (fosforilazione) che hanno un ruolo regolatorio (Cruciani and Mikalsen, 2002). Molte delle connessine sono fosfoproteine e la fosforilazione è considerata importante per la regolazione dell'assemblaggio e per la modulazione alla base della fisiologia dei canali (Lampe and Lau, 2004; King and Lampe 2005). La biosintesi delle proteine che costituiscono le giunzioni comunicanti ed il loro assemblaggio sono altamente regolati. Le connessine sono caratterizzate da una emivita breve, di solo poche ore (Musil et al., 2000). La combinazione di sei molecole di connessina porta alla formazione di un emicanale denominato connessone; questo processo avviene in maniera progressiva, parte dal reticolo endoplasmatico e si conclude nel Golgi (Musil and Goodenough, 1993; Sarma et al., 2002; Laird 2006). I connessoni sono trasferiti poi sulla superficie della cellula attraverso delle vescicole che vanno a fondersi con la membrana plasmatica. Questi emicanali possono diffondere liberamente

attraverso le regioni di contatto della cellula al fine di trovare un connessone "compagno" nelle cellule adiacenti cosi da completare la formazione di canali intercellulari (Figura 20b.) (Harris, 2001). Questi canali si organizzano elle vere e proprie placche delle giunzioni comunicanti. Questo è un evento altamente dinamico che coinvolge la rimozione dei vecchi canali dal centro della placca, consentendo ad una nuova sub-unitá della giunzione gap di essere aggiunta (Gaietta et al., 2002). I canali intercellulari che vengono rimossi dal centro della placca sono inglobati all'interno di strutture vescicolari chiamate "giunzioni anulari" (Jordan et al., 2001che possono fondersi con i lisosomi, oppure essere indirizzate verso la via del proteosoma per la degradazione proteica dei loro componenti (Laing and Beyer, 1995; Musil et al., 2000; Qin et al., 2003). La continua sintesi e degradazione delle connessine attraverso questi meccanismi può spiegare il rapido adattamento dei tessuti ai diversi cambiamenti delle condizioni ambientali. Singoli connessoni possono risultare funzionali in determinate condizioni di stress, come ad esempio lo stress di origine meccanica. In tal caso questi emicanali aperti possono facilitare il rilascio di una grande varietà di fattori quali l'ATP, il glutammato, e il $NAD^+$ nello spazio extracellulare, generando differenti risposte fisiologiche (Evans et al., 2006). Non è ancora chiaro se questi emicanali attivi vengono degradati solo dopo la formazione delle giunzioni gap o se seguono una via degradativa differente.

Nel genoma umano sono stati identificati almeno 21 geni che codificano per differenti isoforme delle connessine, e quasi tutte le cellule del corpo esprimono almeno uno di questi geni sia durante lo sviluppo embrionale che nella vita post-natale ed adulta. Ad esempio la Cx26 è altamente espressa nella coclea, nel fegato, nella pelle e nella placenta, mentre le Cx46 e Cx50 sono state trovate esclusivamente nell'occhio. In ogni caso, le connessine mostrano un modello di espressione sovrapponibile in quanto una singola cellula può esprimere più di una isoforma. Infatti nei cheratinociti sono espresse le Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx43, ed altre (Wiszniewski et al., 2000; Kretz et al., 2003), mentre nei cardiomiociti troviamo le Cx31.9, Cx40, Cx43, Cx45 (Beyer et al., 1995; Bukauskas et al., 2006). La coespressione di geni diversi all'interno di una singola cellula può portare alla formazione di connessoni e di canali completi misti. I connessoni possono essere costituiti sia da un singolo tipo di connessina che da più di uno con la conseguente formazione rispettivamente di emicanali omomerici ed eteromerici. Inoltre è stato descritto che l'assemblaggio dei canali completi può avvenire attraverso combinazioni differenti: i canali omotipici sono formati dal contatto di due connessoni omomerici o da due connessoni

eteromerici di uguale composizione, mentre i canali eterotipici sono composti da due emicanali (omomerici o eteromerici) di diversa composizione (Figura 20b.). L'assemblaggio di queste strutture dipende dalla compatibilità delle connessine che formano gli emicanali. Non tutte le connessine, infatti, sono in grado di interagire tra loro. Ad esempio, la Cx26 puo formare canali eteromerici con la Cx30 o con la Cx32, ma, non forma canali funzionali con la Cx40 (Segretain and Falk, 2004). Queste complesse interazioni comportano un aumento della diversità e complessità strutturale e funzionale dei canali, aumentando cosi la possibilità di scambio tra le cellule e la varietà di metaboliti trasmessi.

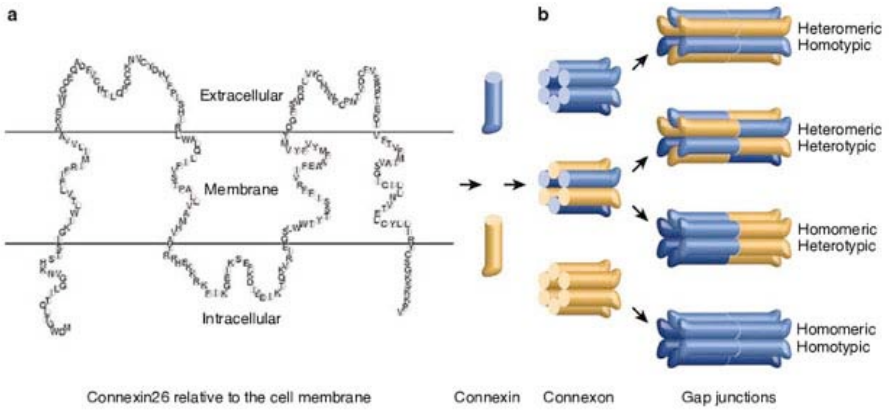



**Figura 20.** *Rappresentazione schematica delle connessine e dei canali comunicanti.* (a) Le connessine sono costituite da quattro domini transmembrana, due domini extracellulari, un loop-citoplasmatico e da due domini N- e C-terminali intracellulari. (b) Assemblaggio delle connessine e formazione delle giunzioni comunicanti.

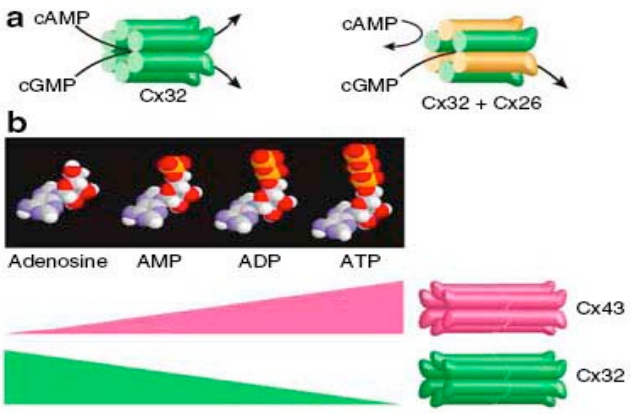



**Figura 21.** *Permeabilità selettiva delle giunzioni comunicanti ai secondi messaggeri.* (a) Le giunzioni comunicanti sono uniche in termini di selettività. (b) Differenza di permeabilità ai secondi messaggeri tra le giunzioni comunicanti formate da diverse connessine.

## 2.3 Selettività delle giunzioni comunicanti.

I primi modelli descritti di comunicazione cellulare attraverso le giunzioni comunicanti evidenziavano una permeabilità non specifica e soprattutto passiva da parte di questi canali, caratterizzata dal passaggio di alcuni ioni e di metaboliti non più grandi di 1.2 kDa (Simpson et al., 1977). Tuttavia, studi recenti hanno evidenziato come anche le giunzioni gap possiedano una permeabilità selettiva, dimostrando che i canali formati da connessine differenti sono unici in termini di conduttanza, e permeabilità a molecole specifiche (Goldberg et al., 2004). Inoltre, l'associazione di alcune patologie umane a connessine specifiche enfatizza l'unicità di ogni proteina, poiché la perdita di una sola isoforma non può essere compensata dalla presenza di altre connessine nello stesso tessuto o nella stessa cellula portando alla manifestazione di difetti fisiopatologici. Le giunzioni gap mediano il trasferimento di ioni e secondi messaggeri tra le cellule, consentendo rispettivamente uno scambio ionico e biochimico. In cellule eccitabili, come i neuroni e le cellule muscolari cardiache, lo scambio elettrico consente la propagazione di risposte rapide e sincronizzate. In cellule non eccitabili, il trasporto metabolico può avere un ruolo nella generazione di risposte coordinate. Nello specifico, è stato dimostrato che lo scambio di ioni attraverso le giunzioni gap costituite da differenti connessine è simile tra loro presentando solo poche differenze (Nicholson et al., 2000; Harris, 2001). Al contrario, è stato chiarito che le connessine presentano notevoli differenze nello scambio di grandi metaboliti e di secondi messaggeri (Nicholson et al., 2000; Goldberg et al., 2004, Weber et al., 2004). Questa caratteristica delle connessine può spiegare perché diversi tessuti hanno bisogno di differenti tipi di canali.

È stato anche possibile dimostrare la variazione di permeabilità dellegiunzioni comunicanti in risposta a diversi segnali. Grazie alla costruzione in vitro di liposomi con giunzioni comunicanti formate da emicanali omomerici di connessina 32 e da emicanali eteromerici di connessine 26 e 32. Questi liposomi artificiali conteneti il cAMP e il cGMP marcati radiattivamente con il trizio hanno permesso di determinare la permeabilità di questi secondi messaggeri attraverso i canali riprodotti in vitro. I canali omomerici costituiti dalla connessina 32 hanno mostrato una uguale permeabilità ad entrambi i secondi messaggeri, mentre i canali eteromerici (Cx32/Cx26) sono risultati essere maggiormente permeabili al cGMP (Figura 21a) (Bevans et al., 1998).

Altri studi comparano la permeabilità di canali costituiti dalla Cx32 e della Cx43 a diversi metaboliti cellulari quali il glutammato, il glucosio, l'adenosina, AMP, ADP, ATP e glutatione, grazie allo sviluppo di un sistema di coltura a strati, con una membrana porosa che separa le cellule donatrici da quelle riceventi, durante la formazione delle giunzioni gap. Grazie a questo sistema è stato possibile dimostrare che le giunzioni gap costituite dalla connessina 32 sono dieci volte più permeabili all'adenosina rispetto a quelle formate dalla connesina 43. Al contrario l'adenosina fosforilata risulta essere più permeabile ai canali costituiti dalla connessina 43 rispetto a quelli formati dalla connessina 32. Inoltre canali formati dalla connessina 43 hanno una permeabilità all'ATP circa trecento volte maggiore rispetto a quelli formati dalla Cx32. Queste osservazioni suggeriscono che la differenza di carica e di dimensione delle molecole scambiate attraverso le giunzioni gap risulta essere importante ai fini dell'utilizzo di una o dell'altra connessina per l'assemblaggio di tali strutture (Figura 21b) (Goldberg et al., 2002).

Il concetto che ogni giunzione gap è unica, in termini di permeabilità e selettività, è supportato da un gran numero di studi. Questa specificità è ben dimostrata nelle patologie associate alle connessine, dove la perdita di una isoforma non può essere compensata dalla presenza della connessina coespressa come dimostrano studi in cui è stata analizzata la differenza di permeabilità all'inositolo-3-fosfato ($IP_3$) tra la connessina 26 normale ed una connessina 26 con una singola sostituzione aminoacidica che nell'uomo è associata a sordità (V84L). I canali costituiti da entrambe le connessine, normale e mutata, sono ugualmente permeabili agli ioni $K^+$, mentre era evidente una riduzione nel trasferimento dell'inositolo-3-fosftato tra le cellule che esprimevano la connessina mutata. Una analisi della permeabilità dei canali costituita dalla connessina 30 all'$IP_3$ ha permesso di calcolare il coefficiente di permeabilità per questo metabolita che è approssimativamente la metà di quello calcolato per le giunzioni formate dalla connessina 26 normale. Questo dato suggerisce che, sebbene la connessina 30 sia altamente omologa alla Cx26, queste non sono funzionalmente ridondanti, e che la Cx30 non è in grado di compensare la perdita di scambio dell'inositolo-3-fosfato tra le cellule cocleari dovuta all'assenza della connessina 26 normale nei soggetti con la mutazione V84L (Beltramello et al., 2005). Quindi, sebbene i canali formati dalla connessina 26 mutata mantengono la permeabilità agli ioni, il flusso di metaboliti più grandi attraverso queste giunzioni aberranti può essere compromesso, giocando un ruolo importante nell'eziologia della patologia della sordità.

## 2.4 Gap Junction: comunicazione nella pelle.

Le connessine svolgono un ruolo chiave nell'omeostasi dei tessuti e degli organi, e la causa di numerose patologie è stata associata a mutazioni nei geni delle connessine. La comunicazione fra le cellule nei diversi strati dell'epidermide è basata anche sulle giunzioni gap che hanno un ruolo cruciale nella proliferazione e nel differenziamento dei cheratinociti. È stato dimostrato che durante il processo di differenziamento di un cheratinocita sono espresse nove differenti connessine, tra le quali le Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31 e Cx43 (Kelsell et al., 2000; Di et al., 2001)i cui geni mostrano un pattern d'espressione distinto, sia a livello temporale che spaziale, durante lo sviluppo epidermico, nonché una sovrapposizione della distribuzione nel tessuto (Figura 22.). La connessina 43 è espressa in modo specifico nell'epidermide interfollicolare, mentre la connessina 26 è espressa nell'epidermide palmoplantare. La Cx43 e la Cx26 sono espresse anche nei follicoli piliferi e nelle ghiandole sudoripare (Salomon et al., 1994). Inoltre, le connessine 30, 30.3 e 31, sono presenti nella parte superiore dell'epidermide, in particolare nello strato granuloso. Sebbene l'esatto ruolo della comunicazione attraverso le giunzioni gap durante il differenziamento del cheratinocita non è ancora del tutto chiarito, l'associazione di mutazioni nei geni delle connessine con differenti patologie epidermiche, sottolinea la loro importanza nello sviluppo epidermico (Richard, 2005). La prima patologia ereditaria della pelle associata alle connessine è stata l'eritrocheratodermia variabile (EKV; OMIM# 133200), causata sia da mutazioni nella Cx31 che nella Cx30.3 (Richard et al., 1998; Macari et al., 2000). In aggiunta, mutazioni trovate nella connessina 26, la quale è la causa principale della sordità non sindromica, sono state associate anche a diversi disordini della pelle, quali la cheratodermia palmoplantare associata alla sordità (PPK con SNHL; OMIM 148350, Richard et al 1998), la sindrome keratitis-ichthyosis-deafness (KID sindrome; OMIM 148210, Richard et al., 2002; van Steensel et al., 2002), la sindrome di Bart-Pumphrey (OMIM 149200; Richard et al., 2004), e la sindrome di Vohwinkel (OMIM 124500; Maestrini et al., 1999). Mutazioni nel gene della connessina 30 sono la causa della sindrome di Clouston (OMIM 129500; Lamartine et al., 2000). Infine, la oculo-dento-digital displasia, le cui caratteristiche sono cheratodermia palmoplantare e ipercheratosi focale, è stata associata alla connessina 43 (Paznekas et al., 2003; Gong et al., 2006; Kelly et al., 2006).

Sono state portate a termine delle analisi funzionali di forme mutanti delle connessine associate a patologie epidermiche al fine di decifrare i meccanismi molecolari che portano a questi disturbi e chiarire il loro ruolo nella comunicazione intercellulare nell'epidermide.

La gran varietà delle patologie associate alle diverse mutazioni nelle connessine, hanno indotto ad associare i differenti fenotipi epidermici all'acquisizione da parte dei canali formati da connessine mutate di nuove proprietà funzionali. Sono stati proposti tre differenti meccanismi che possono spiegare il comportamento delle connessine mutanti nelle patologie epidermiche: (i) il trasporto deficitario delle connessine alla membrana con il conseguente problema dell'assemblamento del connessone nella membrana plasmatica, (ii) l'inibizione *trans*-dominante della connessina coespressa, (iii) la produzione di emicanali costitutivamente attivi che potrebbero alterare la sopravvivenza cellulare (Figura 23). L'azione inbitoria trans-dominante delle connessine mutate cambia la tipologia dei canali presenti nell'epidermide ed inoltre può alterare la tipologia delle molecole scambiate e la misura della comunicazione intercellulare. La presenza di emicanali costitutivamente attivi potrebbe causare il rilascio incontrollato di metaboliti e secondi messaggeri nello spazio extracellulare, influenzando la proliferazione ed il differenziamento delle cellule vicine oppure inducendo l'attivazione dei processi di morte cellulare (Mese et al., 2007).

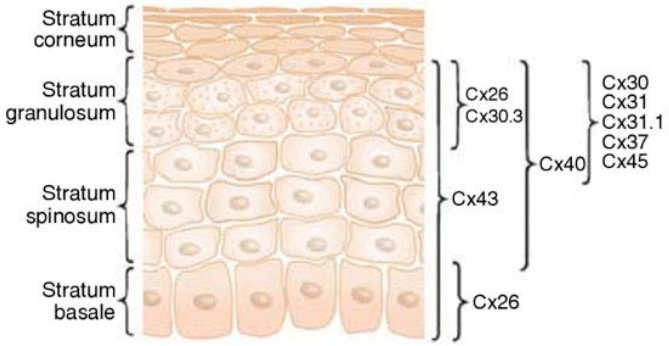



**Figura 22.** *Espressione delle connessine nell'epidermide.*

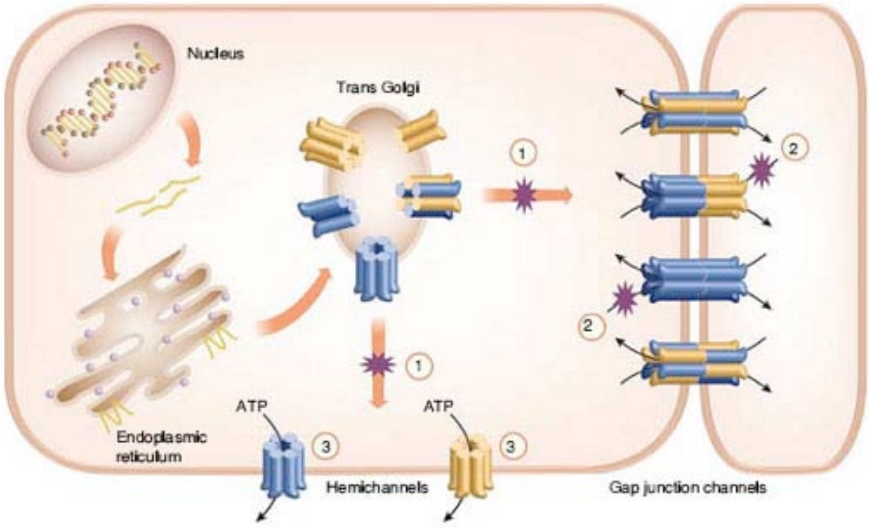



**Figura 23.** *Conseguenze dell'espressione di connessine mutate nella biosintesi e nelle funzioni dei canali comunicanti.*

### 2.4.1 Malattie genetiche associate a mutazioni della connessina 26.

Diverse malattie epidermiche a trasmissione genetica sono legate a mutazioni nel gene della connessina 26 da numerosi studi che oltre a prendere in esame l'associazione genotipo-fenotipo effettuano un'approfondita analisi della funzionalità dei canali formati dalle forme mutanti della connessina 26.

Studi di espressione delle tre mutazioni R75W, delE42 e D66H nel gene della Cx26 che causano la PPK e la SNHL, , hanno dimostrato che queste proteine mutanti non solo perdono la possibilità di formare delle giunzioni gap funzionali, ma esercitano anche un effetto inibitorio (Richard et al., 1998) agendo come dominanti negative sulla connessina normale, ipotizzando un unico meccanismo molecolare responsabile della patologia (Rouan et al., 2001). Quando questi mutanti sono espressi insieme con un'altra connessina epidermica, come la connessina 43, producono una forte inibizione dell'attività dei canali formati dalla Cx43 (Rouan et al., 2001). Questo suggerisce che le mutazioni associate alla PPK potrebbero esercitare la loro funzione inibitoria attraverso un meccanismo comune, agendo anche in maniera *trans*-dominante sulle altre connessine epidermiche espresse.

L'analisi delle mutazioni G59A e D66H nel gene della connessina 26 associate alla sindrome di Vohwinkel, ha fornito nuove informazioni riguardo alla generazione dei diversi fenotipi delle patologie epidermiche (Thomas et al., 2004). Esperimenti di trasferimento di un colorante permeabile attraverso le giunzioni gap, hanno dimostrato che queste proteine mutanti non possono formare dei canali funzionanti. La co-espressione della connessina 26 normale con le due connessine mutanti nella stessa linea cellulare ha dimostrato che entrambe agiscono come dominanti negative sulle connessine normali. Coesprimendo con le forme mutate la connessina 32 oppure la connessina 43 si è ottenuto un effetto selettivo. Infatti il mutante G59A agisce come dominante negativo con entrambe le connessine coespresse, mentre il mutante D66H svolge questo ruolo solo in presenza della connessina 43 (Thomas et al., 2004). La differente abilità delle due mutazioni ad inibire la funzionalità delle due diverse connessine, può spiegare la diversità dei fenotipi epidermici e la severità delle patologie associata a specifiche mutazioni. Una maggiore importanza dell'effetto di dominanza negativa esercitata dalle connessine mutate sulle altre connessine coespresse, è data dallo studio della mutazione D66H mediante la generazione di un modello murino al fine di mimare l'insorgere della sindrome di Vohwinkel (Bakirtzis et al., 2003). Questo animale mostra una

prematura morte cellulare dei cheratinociti associata ad uno "scollamento" degli strati epidermici (ipercheratosi), simile alle caratteristiche cliniche dei pazienti che presentano la mutazione D66H in eterozigosi nel gene GJB2 (Cx26). È stato inoltre osservato l'accumulo della proteina mutata nel citoplasma dei cheratinociti, come risultato di una riduzione del trasporto della proteina verso la membrana plasmatica. Inoltre, i topi transgenici che esprimono la connessina mutante, mostrano un effetto dominante negativo di quest'ultima sulle connessine 26 e 30 normali, influenzando la loro localizzazione alla membrana plasmatica. Sorprendentemente è stato osservato che, in questi topi, la connessina 43 non subisce l'effetto inibitorio della connessina mutata, ne per quel che riguarda la localizzazione in membrana ne per la formazione di canali funzionali.

### 2.4.2 La sindrome KID (keratitis ichthyosis deafness).

La sindrome KID è un raro disordine congenito, secondario ad una displasia dell'ectoderma (alterazione nello sviluppo e nella differenziazione degli epiteli multistratificati) con trasmissione autosomica dominante e caratterizzato dalla comparsa d'infiammazione e successiva neovascolarizzazione a carico della cornea (cheratite), di ittiosi congenita ed ipoacusia sensoriale. Le alterazioni dell'epitelio corneale possono determinare un progressivo calo del visus, potenziale causa di cecità. La sordità sensoriale congenita (SNHL) (Sundaram et al., 2003) è generalmente grave e bilaterale. La cute di questi pazienti si presenta ispessita con placche ben circoscritte, eritematose ed ipercheratosiche che hanno una distribuzione simmetrica sul volto e sulle estremità (Rycroft et al., 1976; Cram et al., 1979; Singh, 1987; Langer et al., 1990; McGrae, 1990; Caceres-Rios et al., 1996; Alli and Gungor, 1997; Kone-Paut et al., 1998). Gli affetti presentano un'aumentata suscettibilità alle infezioni muco-cutanee e nell'11% dei casi è stato osservato l'insorgere di carcinoma squamoso che può essere probabilmente considerato una manifestazione della patologia. La sindrome KID è stata associata a mutazioni, in eterozigosi, del gene GJB2 che codifica per la connessina 26.

Diversi studi su forme mutanti della connessina 26 associate alla sindrome KID, evidenziano che le proteine mutanti hanno un'aberrante localizzazione nel citoplasma della cellula anziché avere quella classica sulla membrana plasmatica. Inoltre, le cellule che esprimono queste connessine mutanti, nello specifico G12R, S17F e D50N, mostravano un'alta mortalità (Common et al., 2003). Le cause e i meccanismi della morte cellulare

associata all'espressione di connesine mutanti non sono stati ancora chiariti, ma si ipotizza che questi mutanti possano influenzare il funzionamento di altre connessine o altre proteine cellulari, oppure che possano alterare l'attività degli emicanali, portando all'insorgere della patologia. Alcune mutazioni nei geni delle connessine, oltre ad avere un forte impatto nell'assemblaggio o nella funzionalità delle giunzioni gap, possono promuovere l'attività degli emicanali. A supportare quest'idea ci sono alcuni lavori che hanno studiato la sostituzione aminoacidica A40V associata alla sindrome KID (Montgomery et al., 2004). Ulteriori studi sul ruolo delle sostituzioni aminoacidiche alla base della sindrome KID saranno necessari per dimostrare in modo chiaro se questo comportamento è l'unico meccanismo alla base di questa patologia, come l'inibizione dominante negativa sembra esserlo per le connessine mutanti nella PPK.

## 3.1 FALDH (Fatty Aldehyde Dehydrogenase).

L'aldeide deidrogenasi degli acidi grassi (FALDH; E.C. 1.2.1.48) (Rizzo et al., 1988; Rizzo and Craft, 1991; Rizzo 2001) è un enzima che catalizza l'ossidazione NAD-dipendente delle aldeidi alifatiche ad acidi grassi (Kelson et al., 1997). La FALDH è un membro della famiglia delle aldeidi deidrogenasi (ALDH), enzimi che sono classificati secondo la sequenza aminoacidica, le proprietà cinetiche e la localizzazione subcellulare (Perozich et al., 1999; Vasiliou et al., 1999). Le ALDH sono generalmente raggruppate in tre classi (1, 2 e 3). La FALDH è un enzima di classe tre, e storicamente è stata definita ALDH microsomale per distinguerla da quella citosolica (classe 1) e mitocondriale (classe 2) (Rizzo et al., 2001). Questo enzima è stato purificato da tessuto epatico umano (Kelson et al., 1997), o di ratto (Nakayasu et al., 1978) e da intestino di coniglio (Ichihara et al 1986). La proteina umana isolata è di 54 kDa , come le altre aldeidi deidrogenasi di tipo tre, ed è, probabilmente, cataliticamente attiva solo come omodimero. La FALDH ha la capacità di ossidare le aldeidi alifatiche che hanno una catena composta di sei-ventiquattro carbonii, ma sembra che sia specifica per quei substrati con catene composte di sedici-venti carbonii (Kelson et al 1997). Per compiere questa funzione, la FALDH sembra interagire strettamente con l'alcool deidrogenasi degli acidi grassi, formando un complesso enzimatico chiamato alcoli grassi:NAD+ ossidoreduttasi (FAO), che catalizza la completa ossidazione degli alcoli grassi ad acidi grassi (Lee 1979; Ichiara et al., 1986). Recentemente è stata evidenziata l'implicazione della FALDH nella ω-ossidazione del metabolita leukotriene B4 (LTB4), un mediatore lipidico della risposta infiammatoria (Willemsen et al., 2001).

Mutazioni all'interno del gene che codifica per la FALDH causano l'insorgere di una patologia chiamata sindrome di Sjogren-Larsson (SLS) (De Laurenzi et al., 1996), che prende il nome dai due ricercatori che per primi (1957) ne descrissero le caratteristiche cliniche. I pazienti affetti da questa sindrome presentano ittiosi congenita, ritardo mentale, diplegia spastica e tetraplegia. Recentemente questo gene è stato rinominato come ALDH3A2 (MIM# 270200) ma è formalmente conosciuto come FALDH e ALDH10. Il gene umano ALDH3A2 è lungo 31 kb ed è costituito da 11 esoni, numerati dall'uno al dieci con un esone addizionale l'esone 9' situato tra gli esoni 9 10 (Chang e Yoshida, 1997; Rogers et al., 1997). Lo splicing alternativo dell'esone 9' porta alla produzione di due trascritti che differiscono nella loro porzione 3' e generano due proteine con differenti

regioni carbossi-terminali (Rogers et al., 1997; Lin et al., 2001). Il trascritto più abbondante nelle cellule è quello che deriva dallo splicing degli esoni dall'1 al 10 e produce una proteina di 485 aminoacidi. Un trascritto minore, che rappresenta circa il 10% dell'mRNA totale della FALDH, è prodotto dallo splicing dell'esone 9' tra l'esone 9 e l'esone 10, e porta alla produzione di una isoforma variante della proteina (FALDHν) di 508 aminoacidi. Entrambe le isoforme della FALDH hanno attività enzimatica. In aggiunta alla presenza dei due trascritti derivanti da splicing alternativo, analisi condotte per Northern Blot hanno rivelato la presenza di tre differenti pesi molecolari di mRNA della FALDH (2.0, 3.8 e 4.0 kb). Tali mRNA derivano dall'utilizzo di tre differenti siti di poliadenilazione nella regione 3' non tradotta (Rogers et al., 1997). I trascritti di 3.8 e 4.0 kb sono molto abbondanti in organi quali cervello, cuore, muscolo scheletrico e pancreas, mentre nel fegato vi è decisamente predominante il trascritto più corto di 2.0 kb. La trascrizione del gene della FALDH è regolata da un promotore mancante di una TATA box e con numerose isole CpG (Chang e Yoshida, 1997; Rogers et al., 1997). Un sito di inizio della trascrizione è situato al nucleotide -258 in rispetto al codone d'inizio della traduzione (Rogers et al., 1997) ma esiste anche un sito alternativo di inizio della trascrizione al nucleotide -195 (Chang e Yoshida 1997).

Da studi condotti mediante Northern blot su RNA estratti da tessuti umani e di roditori, è stato evidenziato che la FALDH è espressa in diversi tessuti, ma in particolare nel fegato e nell'intestino. L'attività enzimatica della FALDH è correlata con la quantità del trascritto dell'ALDH3A2. Nei topi, il trascritto minore che codifica per la FALDHν generalmente rispecchia la quantità del trascritto maggiore, ma sembra essere più abbondante nel cervello e nei testicoli rispetto agli altri tessuti analizzati (Lin et al., 2000). Ironicamente, sebbene i sintomi della SLS sono principalmente associati alla pelle ed al sistema nervoso, l'attività enzimatica della FALDH non è particolarmente elevata in questi due tessuti, se comparata con il fegato, l'intestino o il rene. Studi mediante centrifugazione a gradiente di densità hanno stabilito che la FALDH è localizzata nella frazione microsomale delle cellule epatiche umane (Kelson et al., 1997). Una delezione, di 35 aminoacidi nella porzione carbossi-terminale della FALDH dimostra che tale regione costituisce un dominio idrofobico necessario per l'ancoraggio dell'enzima alla membrana microsomale (Masaki et al., 1994). Nell'uomo e nel topo entrambe le isoforme derivanti dallo splicing alternativo, possiedono i domini carbossi-terminali ricchi di residui aminoacidici idrofobici, suggerendo che entrambe le isoforme siano capaci

di legarsi alla membrana plasmatici mentre la porzione catalitica della proteina è rivolta all'interno del citoplasma.

L'espressione della FALDH in vivo è soggetta ad una fine regolazione fisiologica (Demozay et al., 2004). Nel fegato e nel tessuto adiposo dei ratti trattati con l'insulina, l'espressione genica è notevolmente aumentata mentre i topi diabetici mostrano una riduzione nella espressione della FALDH se comparati con quelli sani.

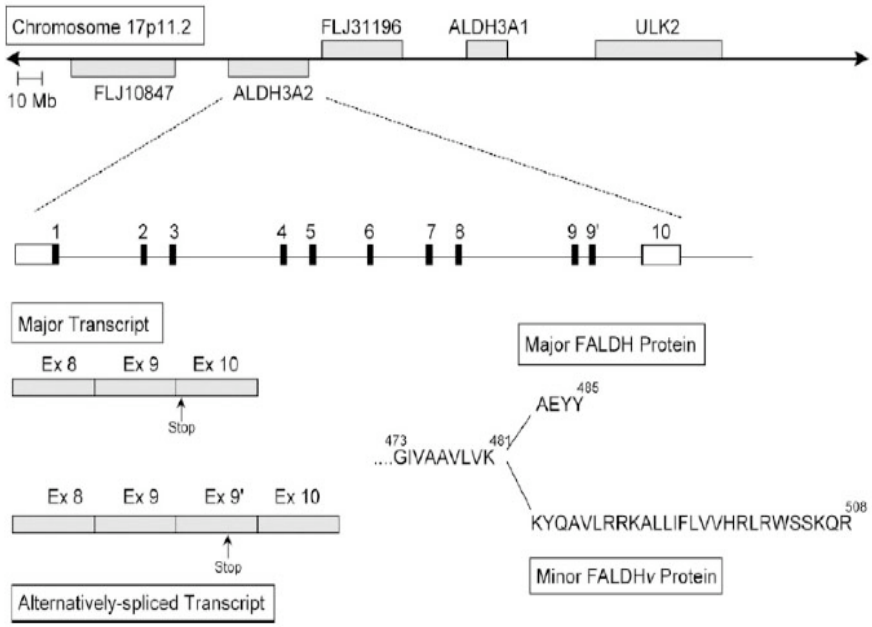



**Figura 24.** *Struttura del gene ALDH3A2*. Nella figura è mostrato il locus del gene ALDH3A2 sul cromosoma 17p11.2. Inoltre si può osservare la struttura del gene e nella porzione inferiore della figura i due trascritti che si vengono a formare grazie allo splicing alternativo tra gli esoni 9 e 10.

## 3.2 SINDROME DI SJOGREN-LARSSON (SLS).

Nel 1957, Sjogren e Larsson hanno descritto una sindrome, clinicamente distinta, caratterizzata da ittiosi congenita, ritardo mentale e diplegia spastica o tetraplegia (Sjogren e Larsson 1957). Molti dei loro pazienti erano originari di una regione isolata del nord della Svezia ed il loro albero genealogico poté essere tracciato a ritroso fino ai loro antenati risalenti ai primi del 1700. La patologia da loro descritta esibiva un'ereditarietà di carattere autosomico recessivo. In seguito pazienti che presentavano i sintomi di questa patologia, furono identificati anche in altre parti del mondo appartenenti a diverse etnie. Ad oggi la sindrome di Sjogren-Larsson (SLS) è la patologia neuroittiosica più diffusa (Theile, 1974; Rizzo, 2001).

I sintomi della SLS sono pienamente evidenti già al primo anno di vita. La maggior parte dei pazienti nasce prematuramente (Willemsen et al., 1999) e la pelle, alla nascita, risulta essere secca con scaglie (ittiosi) ed un caratteristico prurito. Il ritardo nello sviluppo motorio è dovuto a diplegia spastica o tetraplegia e, solitamente, è riscontrabile alla fine del primo anno di vita, comportando dei difetti nella deambulazione. Il ritardo mentale nei pazienti può presentarsi in diversi stadi, da forme lievi fino a forme più severe; a questo solitamente è associato un disturbo dell'articolazione della parola. Alcuni affetti manifestano una prfonda retinopatia associata a fotofobia, dovuta alla presenza sulla retina d'inclusioni, (retinopatia pigmentaria). Eccezionalmente, alcuni pazienti possono mancare di uno dei maggiori sintomi, o avere un fenotipo molto leggero.

I pazienti affetti dalla sindrome di Sjogren-Larsson hanno il metabolismo dei lipidi alterato, dovuto alla mancata attività della aldeide deidrogenasi degli acidi grassi (FALDH). Inoltre, in questi pazienti è stata riscontrata la perdita di funzionalità del complesso FAO, visto il coinvolgimento della FALDH nella formazione di questo complesso multi enzimatico. Finora sono state identificate 72 mutazioni all'interno del gene ALDH3A2, in pazienti SLS. Tra queste vi sono mutazioni missenso e nonsenso, delezioni ed inserzioni, difetti di splicing e numerose mutazioni molto complesse con combinazioni di sostituzioni nucleotidiche, delezioni, inserzioni o duplicazioni. Come mostrato nella figura x, le mutazioni sono distribuite attraverso tutto il gene e coinvolgono tutti gli esoni, ad eccezione degli esoni 9' e 10.

I meccanismi patogenetici che intervengono nell'insorgere di questa sindrome, sono certamente diversi nella pelle e nel sistema nervoso. Tuttavia, è probabile che la patogenesi biochimica della SLS derivi da l'accumulo dei substrati lipidici che non possono essere metabolizzati dalla FALDH (o dalla FAO), mutanti; oppure la mancanza degli acidi grassi prodotti dalla FALDH stessa.

### 3.1.1 Patogenesi cutanea.

I meccanismi biochimici che portano all'insorgere dell'ittiosi nei pazienti affetti da SLS sono indubbiamente correlati con il ruolo cardine che ha il metabolismo dei lipidi nel differenziamento epidermico (Madison 2003). L'istopatologia della pelle dei pazienti SLS mostra evidenti ipercheratosi, papillomatosi, acantosi e una lieve infiammazione nella parte superiore del derma (Hofer et al., 1982). Nella pelle dei pazienti SLS sono presenti dei corpi lamellari deformi, che hanno perso la loro normale struttura della membrana ed appaiono fusi con la membrana plasmatica apicale (Shibaki et al 2004; Ito et al., 1991). Studi ultrastruttrali hanno rivelato la presenza anormale di lipidi all'interno del citoplasma delle cellule granulari e nello strato corneo, suggerendo che le membrane potrebbero avere un'alterata composizione lipidica.

Recentemente è stato proposto un meccanismo per spiegare l'insorgere dell'ittiosi nei pazienti SLS. Studi di linkage genetico, hanno identificato un ruolo nella pelle dei metaboliti 12R-ecosanoidi (epossiline e triossiline) dell'acido arachidonico. Le epossiline esistono come isomeri R- o S-, entrambi con attività biologica mediata da un recettore intracellulare accoppiato ad una proteina G (Nigam et al., 2005). I geni 12R-LOX ed *e*LOX3 codificano rispettivamente per due enzimi: la 12R-lipossigenasi e l'idroperossido isomerasi (epossilina sintasi), che agiscono sequenzialmente sull'acido arachidonico per la sintesi dei prodotti epossialcoli [R-epossilina A3 ((R)-HXA3)] (Yu et al., 2005). Recentemente sono state trovate delle mu

tazioni nei geni 12R-LOX ed *e*LOX3 associate a pazienti con ittiosi, indicando che la mancata sintesi della (R)-HXA3 o dei suoi metaboliti è responsabile della patologia epidermica (Jobart et al., 2002). Il metabolismo della (R)-HXA3 apre l'anello epossidico formando un eicosanoide, R-trioxilin A3 [(R)-TXA3], con tre gruppi idrossilici interni. Come la LTB4, la (R)-TXA3 è metabolizzata mediante ω-idrossilazione a 20-OH-(R)-TXA3 e in seguito ossidata a 20-COOH-(R)-TXA3. Questo ultimo passaggio è potenzialmente catalizzato dalla FAO (e dalla FALDH), sebbene l'aldeide

deidrogenasi-4 è un enzima candidato ad effettuare questa reazione (Collins et al., 2005). Queste conclusioni hanno provocato speculazioni riguardo al fatto che l'ittiosi nei pazienti SLS potesse essere causata da un'errata sintesi del 20-COOH-R-TXA3 dovuta ad un mal funzionamento della FAO e della FALDH. Sebbene si attendono ulteriori prove che la 20-OH-R-TXA3 è ossidata dalla FAO, questi risultati intriganti sottolineano il ruolo chiave del pathway della 12R-lipossigenasi per il normale differenziamento epidermico. Tale funzione potrebbe essere fondamentale nell'insorgere del fenotipo ittiosico nella sindrome di Sjogren-Larsson. Il prurito nei pazienti SLS è probabilmente causato dall'accumulo di LTB4 e di 20-OH-LTB4 nella pelle (Willmsen et al., 2001). L'inibizione farmacologica della sintesi di LTB4, mediante una droga, lo zileutone, allevia infatti il prurito in alcuni pazienti SLS (Willmsen et al., 2001).

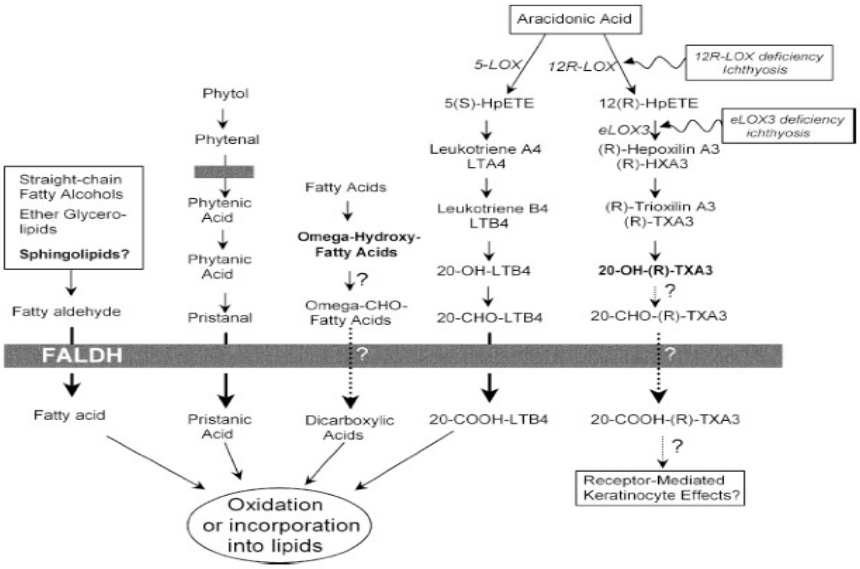



**Figura 25.** *Ruolo della FALDH nel metabolismo dei lipidi.* Nel diagramma è mostrato il ruolo della FALDH nel metabolismo dei lipidi e sono evidenziati i difetti metabolici nella SLS.

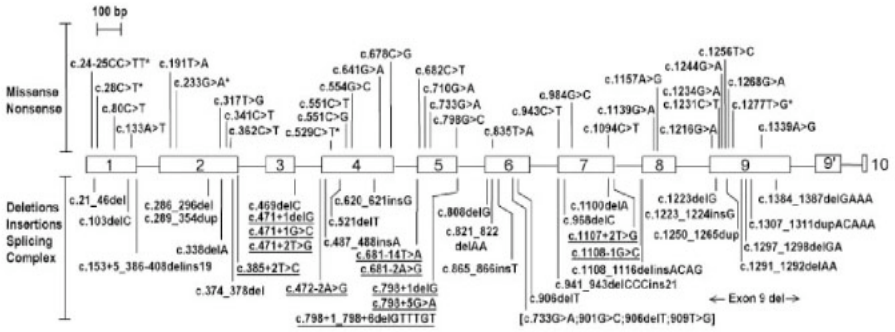



**Figura 26.** *Mutazioni riscontrate nel gene ALDH3A2.*

# SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo della presente tesi è lo studio delle cause molecolari responsabili di tre patologie cutanee a trasmissione genetica dovute a difetti nel differenziamento epidermico. Difetti in ciascuno dei componenti strutturali o nei processi enzimatici che coinvolgono la formazione ed il mantenimento dell'epidermide e dello strato corneo, danno luogo ad una serie di malattie della pelle definite "disordini della cheratinizzazione" o genodermatosi. Queste patologie sono caratterizzate dalla presenza di un ispessito strato corneo (ipercheratinizzazione), di scaglie desquamanti ed in alcuni casi da manifestazioni più gravi quali bolle dovute allo scollamento dell'epidermide dallo strato sottostante, il derma, o il fallimento del completamento dello sviluppo delle terminazioni degli arti.

Le genodermatosi sono così definite perche' hanno come base dei difetti genetici, che hanno come conseguenze caratteristiche cliniche ed istopatologiche sono molto variabili e spesso sovrapponibili. Per questi motivi e a causa della loro rarità, la loro classificazione è molto complessa. In alcune patologie dermatologiche il meccanismo molecolare alla base della malattia può essere identificato nell'alterazione di un singolo gene, mentre in altri casi sono coinvolti numerosi fattori. In generale, si tratta di malattie deturpanti ma raramente letali, che si presentano con gradi di severità variabile. I cambiamenti morfologici dei cheratinociti, durante il loro differenziamento, sono determinati da modificazioni biochimiche che riflettono un programma d'attivazione ed inibizione sequenziale e sincronizzata dei prodotti genici specifici del differenziamento. Qualsiasi difetto nei suoi componenti strutturali, sia proteici che lipidici, o negli enzimi responsabili della loro sintesi, del loro processamento e assemblaggio, possono distruggere la barriera epidermica o alterarne il processo di *turnover* dando luogo ad una varietà di stati morbosi. Lo studio dei diversi fattori che intervengono nello sviluppo epidermico è necessario ai fini di una maggiore comprensione delle cause dell'insorgere delle genodermatosi. In questa tesi sono state affrontate tre diverse patologie epidermiche, associate a tre diversi geni, che possiedono però alcune caratteristiche fenotipiche comuni.

Sono stati analizzati 60 pazienti italiani con diagnosi di ARCI, un disturbo congenito della cheratinizzazione che si trasmette in maniera autosomica recessiva, al fine di avere un quadro più ampio sulle mutazioni ricorrenti nel nella nostra popolazione. Abbiamo utilizzato un approccio specifico per l'analisi molecolare del gene TGM1, che codifica per la transglutaminasi 1 (TGasi1), noto per essere uno dei geni resposnabili dell'insorgere dell'ittiosi lamellare, che rappresenta una buona percentuale delle ARCI. La metodica messa a punto in questo lavoro può essere

considerata un approccio alla diagnosi prenatale specifica per l'ittiosi lamellare TGasi1 dipendente.

È stato inoltre affrontato lo studio di una diversa forma di ittiosi, la sindrome di Sjogren-Larsson (SLS) causata da mutazioni del gene ALDH3A2 che codifica per l'enzima FALDH, fondamentale per il metabolismo degli acidi grassi. L'obiettivo di questo studio è stato il chiarimento delle dinamiche molecolari responsabili dell'insorgere di questa patologia nella popolazione italiana al fine di utilizzare le nostre conoscenze per una diagnosi più completa ed efficace. In questo lavoro presentiamo due casi distinti di cui uno causato dalla presenza di una mutazione fino ad oggi non ancora descritta in letteratura.

La terza patologia oggetto di questo lavoro di tesi, presenta un fenotipo ittiosico ed altre caratteristiche fenotipiche legate al differenziamento epidermico. La KID sindrome (Keratitis-Ichtyosis-Deafness) è causata da mutazioni del gene GJB2 che codifica per la connessina 26, una proteina necessaria per l'assemblaggio delle giunzioni comunicanti (*gap junction*). Nei due pazienti analizzati in questo studio sono state riscontrate due diverse mutazioni, di cui una mai descritta in letteratura, e sono state caratterizzate le due proteine mutanti al fine di evidenziare eventuali differenze funzionali, responsabili dei meccanismi che provocano l'insorgere di questa patologia.

# RISULTATI

# 4.1 Analisi Molecolare del gene TGM1

## 4.1.1 Analisi molecolare del gene TGM1 in pazienti affetti da ittiosi lamellare

L'ittiosi lamellare è un disturbo congenito della cheratinizzazione che si trasmette in maniera autosomica recessiva. In questo lavoro abbiamo analizzato 60 pazienti, clinicamente eterogenei, tutti con diagnosi di cheratidermia ittiosiforme non bollosa. Alcuni dei pazienti presentano un fenotipo ittiosico più accentuato rispetto ad altri, hanno cioè le caratteristiche placche marroni diffuse su una superficie molto estesa del corpo e alcune caratteristiche addizionali quali la cheratodermia palmoplantare.

Per ogni paziente è stato costruito l'albero genealogico della famiglia di provenienza al fine di evidenziare se il tipo di trasmissione del difetto epidermico era autosomica recessiva e probabilmente riconducibile alla malattia da noi studiata.

Successivamente è stata prelevata una biopsia di pelle di 3 mm ad ogni paziente, dalla quale, è stato raccolto il materiale biologico necessario per effettuare un esame istologico in microscopia ottica ed elettronica.

In seguito abbiamo sottoposto i pazienti ad analisi genetico-molecolari per indagare la presenza di mutazioni nel gene TGM1 codificante per l'enzima TGasi1. Dalle biopsie dei pazienti abbiamo estratto l'RNA e da questo, mediante retrotrascrizione (vedi materiali e metodi) siamo riusciti ad amplificare l'intera regione codificante del gene (cDNA) in maniera specifica. I cDNA così ottenuti sono stati in seguito amplificati mediante PCR e successivamente sequenziati con primer senso e antisenso basati sulla sequenza pubblicata, al fine di analizzare l'intera regione codificante.

Dall'analisi delle sequenze abbiamo riscontrato, in 14 dei 60 pazienti analizzati, delle mutazioni all'interno del gene TGM1. Tra queste vi sono 4 mutazioni non ancora descritte e 10 ben descritte in letteratura che rappresentano un ampio spettro delle caratteristiche mutazioni dell'ittiosi lamellare associate alla TGasi1 (Tabella 1).

Dei 60 pazienti analizzati, diagnosticati per l'ittiosi lamellare, la maggior parte mostravano un fenotipo severo, caratterizzato dalla presenza dei chiari sintomi di questa patologia, come le grandi scaglie marroni che ricoprono l'intero corpo e la caratteristica membrana colloidale (collodion baby) presente alla nascita. Abbiamo analizzato anche dei pazienti con un fenotipo meno severo ma in ogni modo ben distinguibile.

Nel paziente numero 1 abbiamo riscontrato una mutazione gia descritta in letteratura, si tratta di una sostizuione nucleotidica nell'esone 11 del gene TGM1 che comporta il cambiamento dell'aminoacido Glu in posizione 520 con l'aminoacido Gly (Esposito et al., 2000) (Tabella 1). Il paziente in esame presentava il classico fenotipo dell'ittiosi lamellare con la presenza alla nascita della membrana colloidale poi sostituita dalle grandi scalgie spesse di colore marrone che ricoprivano l'intero corpo.

Anche nel paziente numero 2 sono state riscontrate le caratteristiche cliniche della patologia corrispondenti ad un fenotipo molto severo, simile a quello descritto nel paziente 1. L'analisi molecolare del probando ha evidenziato una mutazione nel sito accettore di splicing (AG>GG) posizionato al 3' dell'introne 5. Questa sostituzione nucleotidica comporta un difetto nel meccanismo di splicing con la conseguente inserzione dell'intero introne 5 nella sequenza codificante della TGasi1 che risulta nella generazione di un codone di STOP prematuro. L'inserimento di un codone do STOP prematuro causato dal mancato splicing dell'introne 5 causa la formazione di una proteina tronca che perde il dominio catalitico situato all'interno dell'esone 7. L'attività enzimatica di questa proteina può quindi essere drasticamente ridotta. Questa mutazione è stata in precedenza ben caratterizzata (Huber et al., 1995) ed è una mutazione ricorrente nei pazienti affetti da ittiosi lamellare (LI). Abbiamo, infatti, riscontrato questa stessa mutazione in altri cinque pazienti da noi presi in esame (5, 6, 8, 11, 13) che presentavano caratteristiche cliniche similari al paziente numero 2.

Nel paziente numero 3 abbiamo riscontrato una mutazione già descritta in letteratura, caratterizzata dalla sostituzione dell'aminoacido arginina in posizione 142 con l'aminoacido istidina (Huber et al., 1995). Questa mutazione è situata nell'esone 3, all'interno del dominio b-sandwich della trnsglutaminasi 1. Durante la nostra analisi dei pazienti, affetti da ittiosi lamellare, abbiamo riscontrato altre tre mutazioni, in altrettanti soggetti, caratterizzate da sostituzioni aminoacidiche, già presenti in letteratura. Due di queste erano situate nell'esone 5 (Ser272Pro; Arg282Gln), la terza invece è stata trovata nell'esone 7 (Val582Met) dove è situato il dominio catalitico dell'enzima (Esposito et al., 2001; Cserhalmi-Friedman et al., 2001; Petit et al., 1997).

L'analisi della sequenza del cDNA della TGM1 dei pazienti 9 e 12 ha evidenziato la presenza di una nuova mutazione, che nello specifico comporta la sostituzione dell'aminoacido arginina in posizione 315 con l'aminoacido istidina. Entrambi i pazienti mostravano le stesse caratteristiche cliniche e lo stesso grado di severità del fenotipo con grandi

scaglie di colore marrone che ricoprivano l'intera superficie del corpo. Questi pazienti non avevano legami di parentela tra loro.

Nel paziente 10 abbiamo riscontrato due distinte mutazioni in eterozigosi in due diversi domini della proteina. La prima, situata nell'esone 2, nel dominio β-sandwich, è una sostituzione aminoacidica. La sostituzione nucleotidica di una adenina con una guanina comporta il cambiamento dell'aminoacido arginino in posizione 42 con l'aminoacido glicine. La seconda mutazione riscontrata in questo paziente è una delezione di cinque nucleotidi (GAAGTdel) a cavallo del sito donatore di splicing dell'esone 10 che comporta il cambiamento del registro di lettura con la conseguente formazione di un codone di STOP prematuro. Entrambe queste mutazioni non sono state ancora riportate in letteratura.

Nel paziente numero 14 abbiamo riscontrato una mutazione non ancora descritta in letteratura. La sequenza del DNA del probando ha evidenziato una sostituzione nucleotidica che comporta il cambiamento dell'acido glutammico in posizione 519 con un codone di STOP prematuro. Questa mutazione è stata confermata anche mediante digestione enzimatica; infatti il cambiamento nucleotidico, nello specifico la sostituzione di una guanina con una timina, comporta la perdita di un sito di restrizione per l'enzima BseRI (Figura1b) (vedi descrizione nel paragrafo successivo).

Le mutazioni riscontrate durante il nostro studio rappresentano uno spettro abbastanza ampio delle tipologie delle mutazioni caratteristiche della TGasi1 responsabili di un fenotipo di ittiosi lamellare. Alcune rappresentano delle mutazioni che portano alla sostituzione di un aminoacido, altre invece sono caratterizzate da sostituzioni di singole basi, nei siti di splicing molto conservati (Tabella 1).

| Paziente nr | Origine | Gene | Omozigote/ Eterozigote | Esone | Dominio | Mutazione cDNA | Mutazione proteina | Nuova/ ricorrente | Referenza |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Italiana | TGM1 | Omozigote | 11 | Catalytic core | GAG>GGG | Glu520Gly | ricorrente | Esposito et al., 2001 |
| 2 | Italiana | TGM1 | Omozigote | 5 | Catalytic core | AG>GG acceptor splicing site | Premature STOP codon | ricorrente | Huber, et al., 1995 |
| 3 | Italiana | TGM1 | Omozigote | 3 | b-sandwich | CGC>CAC | Arg142His | ricorrente | Huber, et al., 1995 |
| 4 | Italiana | TGM1 | Omozigote | 5 | Catalytic core | TCT>CCT | Ser272Pro | ricorrente | Esposito et al., 2001 |
| 5 | Italiana | TGM1 | Eterozigote | 7 | Catalytic core | GTG>ATG | Val382Met | ricorrente | Petit et al. , 1997 |
| 5 | Italiana | TGM1 | Eterozigote | 5 | Catalytic core | AG>GG acceptor splicing site | Premature STOP codon | ricorrente | Huber, et al., 1995 |
| 6 | Italiana | TGM1 | Omozigote | 5 | Catalytic core | AG>GG acceptor splicing site | Premature STOP codon | ricorrente | Huber, et al., 1995 |
| 7 | Italiana | TGM1 | Omozigote | 5 | Catalytic core | CGG>CAG | Arg286Gln | ricorrente | Cserhalmi-Friedman et al., 2001 |
| 8 | Italiana | TGM1 | Omozigote | 5 | Catalytic core | AG>GG acceptor splicing site | Premature STOP codon | ricorrente | Huber, et al., 1995 |
| 9 | Italiana | TGM1 | Omozigote | 6 | Catalytic core | CGT>CAT | Arg315His | nuova | |
| 10 | Italiana | TGM1 | Eterozigote | 2 | b-sandwich | AGA>GGA | Arg47Gly | nuova | |
| 10 | Italiana | TGM1 | Eterozigote | 10 | Catalytic core | GAAGTdel acceptor splicing site deleted | Premature STOP codon | nuova | |
| 11 | Italiana | TGM1 | Omozigote | 5 | Catalytic core | AG>GG acceptor splicing site | Premature STOP codon | ricorrente | Huber, et al., 1995 |
| 12 | Italiana | TGM1 | Omozigote | 6 | Catalytic core | CGT>CAT | Arg315His | nuova | |
| 13 | Italiana | TGM1 | Omozigote | 5 | Catalytic core | AG>GG acceptor splicing site | Premature STOP codon | ricorrente | Huber, et al., 1995 |
| 14 | Italiana | TGM1 | Omozigote | 10 | Catalytic core | GAG>TAG | Premature STOP codon | novel | |

**Tabella 1.** *Elenco mutazioni.* La tabella riassume le mutazioni riscontrate durante il nostro lavoro.

### 4.1.2 Analisi prenatale

Durante questo studio in particolare abbiamo approfondito l'analisi genetica del paziente 14 e della famiglia tracciando l'albero genealogico. Questo è stato necessario poiché abbiamo sottoposto la madre del nostro paziente ad una diagnosi prenatale, utilizzando il DNA estratto dai villi coriali prelevati entro il terzo mese di gestazione. Conoscendo il sito specifico della mutazione ricorrente nella famiglia, (l'esone 11), abbiamo amplificato con primers specifici senso ed antisenso, la regione d'interesse sia dal DNA estratto dai villi coriali che dai linfociti periferici isolati dal sangue prelevato a tutti i membri della famiglia. Abbiamo inoltre amplificato anche il resto del gene per escludere eventuali nuove mutazioni nel DNA dei villi. Abbiamo quindi sequenziato gli amplificati e come si puo notare dalla figura (1e) il DNA estratto dai villi porta la mutazione Glu519X in eterozigosi. Dal cromatogramma mostrato in figura risulta evidente la sovrapposizione dei picchi, nello specifico il cambiamento di una guanina con una timina, indicata dalla freccia. Sapendo che questa mutazione causa la perdita del sito di restrizione per l'enzima BseRI, abbiamo eseguito una restrizione enzimatica per confermare il dato emerso dalle sequenze. Nella foto del gel d'agarosio mostrata in figura 1b possiamo osservare come il DNA del paziente 14 (II:1) non viene digerito dall'enzima e quindi rimane un'unica banda corrispondente all'amplificato di circa 2.2 kb. Al contrario nella lane II:2 la digestione è completa trattandosi del controllo normale corrispondente alla sorella del probando. Nelle restanti lane (I:1, I:2 e II:3) la digestione è parziale in quanto avviene solo sull'allele mutato, confermando quindi la presenza della mutazione in eterozigosi. Per escludere eventuali contaminazioni nei villi coriali con materiale biologico proveniente dalla madre abbiamo eseguito un test di *linkage* genetico per capire quale dei due genitori ha trasmesso l'allele mutato al feto. Utilizzando dei marker genetici specifici per il cromosoma 14 e per il braccio q11.2, abbiamo potuto scoprire la trasmissione da parte del padre dell'allele mutato potendo quindi diagnosticare con certezza la presenza della mutazione in eterozigosi e quindi escludere l'insorgere della malattia dovuta alla mutazione Glu519X.

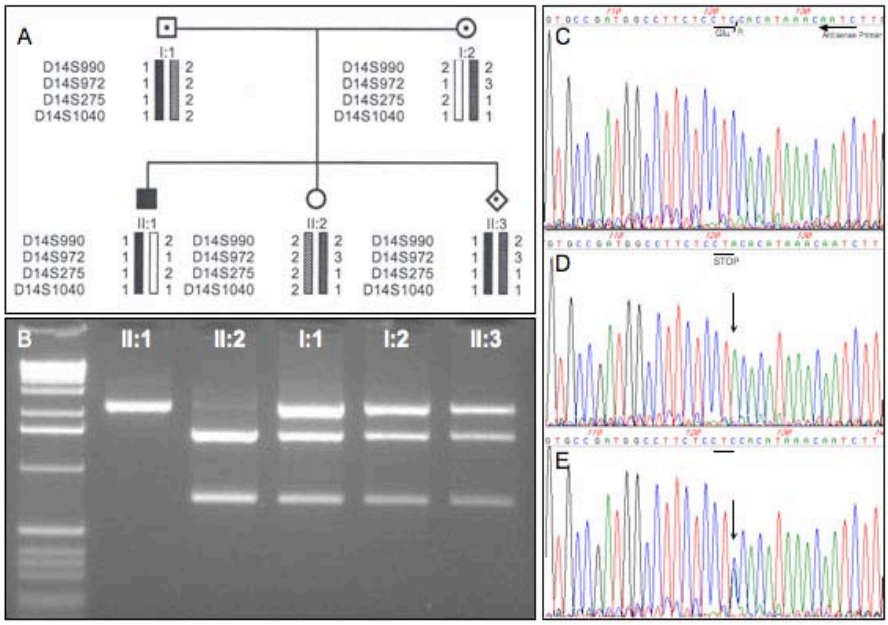



**Figura 1.** *Analisi prenatale.* (a) L'albero genealogio mostra la trasmissione a carattere autosomico recessivo della patologia. Sono inoltre indicati i marcatori genetici specifici del cromosoma 14 utillizzati per l'analisi di *linkage*. (b) L'analisi elettroforesica della digestione enzimatica, eseguita sull'amplificato degli esoni 10-14 del paziente 14, risulta in una singola banda di 2.2kb che evidenzia la perdita del sito di restrizione dell'enzima BseRI causata dalla mutazione (II:1). Nella *lane* II:2 vediamo invece le due bande risultanti dalla completa digestione dell'amplificato. Nelle restanti *lane* vi è la presenza di tre bande risultane dalla digestione di un solo allele (quello wt) che indica la presenza della mutazione in eterozigosi. (c) Il cromatogramma rappresenta la sequenza wt. La sequenza è stata effettuata utilizzando un oligo antisenso (d) La freccia indica il nucleotide mutato in omozigosi (G>T). (e) In questo cromatogramma la freccia evidenzia i due picchi sovrapposti che indicano la presenza in eterozigosi della sostituzione nucleotidica.

## 4.2 Descrizione di una nuova e di una ricorrente mutazione nel gene ALDH3A2 in pazienti Italiani con la Sindrome di Sjogren-Larsson

La sindrome di Sjogren-Larsson (SLS) è un disturbo neurocutaneo a trasmissione genetica autosomica recessiva causato da mutazioni all'interno del gene ALDH3A2 che codifica per l'aldeide deidrogenasi degli acidi grassi (FALDH). La FALDH è un enzima microsomale che catalizza l'ossidazione delle aldeidi alifatiche a media-lunga catena in acidi grassi. In questo lavoro abbiamo analizzato due pazienti SLS Italiani, privi di parentela tra loro, che mostravano i classici sintomi della patologia, quali ittiosi, problemi nella deambulazione, diplegia spastica e ritardo mentale.

### 4.2.1 Descrizione Pazienti

Il paziente 1 è una donna di 12 anni. L'ittiosi è divenuta evidente durante il primo mese di vita. A causa della spasticità alle gambe, la paziente ha iniziato a camminare all'età di due anni ma solamente con dei supporti. Ha subito la correzione chirurgica delle articolazioni delle gambe e ha iniziato a camminare autonomamente, con un andamento spastico, all'età di sette anni. Da quel momento la sua disabilità motoria è rimasta stabile ed attualmente, all'età di dodici anni, la spasticità coinvolge solo gli arti inferiori. La retinopatia pigmentaria è stata esclusa: la conduzione nervosa motoria e sensoriale era normale, cosi come lo sviluppo del linguaggio; il paziente presenta in ogni modo una moderata difficoltà nell'apprendimento.

Il paziente numero due è un maschio di cinque anni. L'ittiosi era presente alla nascita e la spasticità alle gambe è divenuta evidente dopo pochi mesi di vita ma la diplegia è rimasta di lieve entità e nessun intervento chirurgico agli arti inferiori è stato necessario. La retinopatia pigmentaria è stata esclusa ma è stato diagnosticato un lieve ritardo mentale.

Una biopsia della cute prelevata dall'addome del paziente 2 è stata analizzata mediante studi di microscopia elettronica. La sezione esaminata mostrava ipercheratosi, scollamento dello strato granuloso, acantosi e papillomatosi (Figura 1a). La microscopia elettronica ha rivelato delle inclusioni anomale nel citoplasma delle cellule degli strati granuloso e corneo. Nello strato granuloso sono stati osservati numerosi vacuoli legati alla membrana ed elettro-lucenti (Figura 1a). Queste inclusioni

citoplasmatiche spesso mostravano delle strutture lamellari localizzate perifericamente, suggerendo che potevano rappresentare dei cheratinosomi anormali (anche conosciuti come granuli lamellari, corpi di Odland). Lo spazio intercellulare della parte inferiore dello strato corneo appariva frequentemente allargato e parzialmente riempito con materiale amorfo o laminato (Fig 1b). All'interno del citoplasma delle cellule dello strato corneo, erano presenti numerosi vacuoli spesso contenenti strutture lamellari (Fig 1b). La presenza di queste inclusioni lamellari, nelle cellule degli strati corneo e granuloso, è una caratteristica tipica nei pazienti affetti dalla sindrome di Sjogren-Larsson e potrebbe derivare dai cheratinosomi, come suggerito già in altri lavori (Bernardini et al., 2007; Ito et al., 1991; Rizzo 1993).

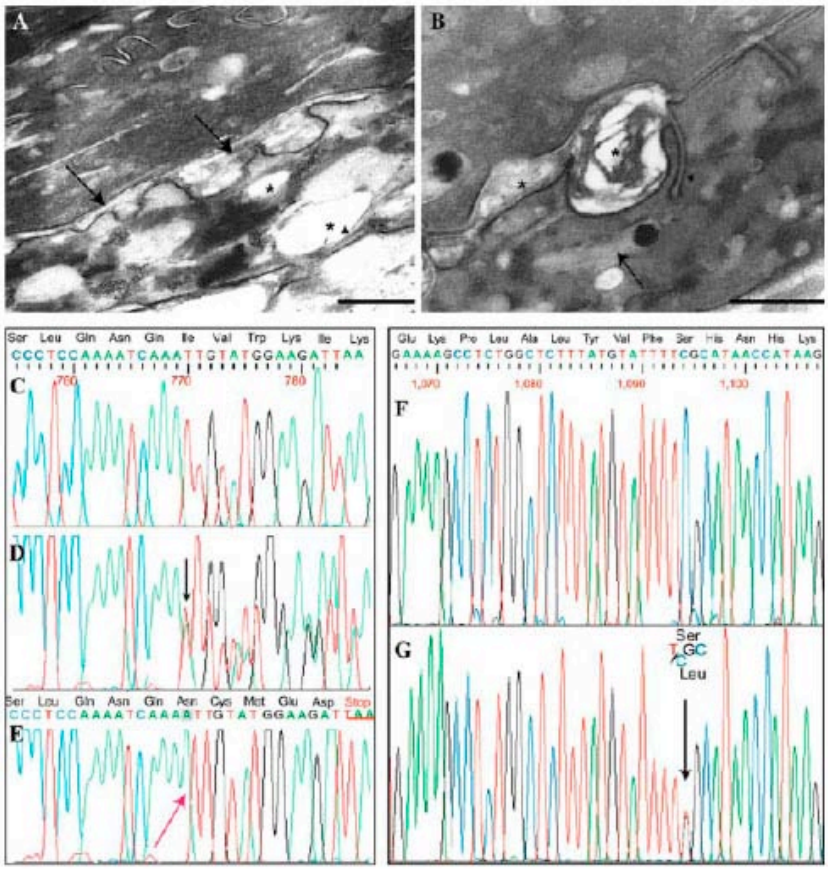



**Figura 1.** *Analisi del Paziente 1 e 2.* (a) Gli asterischi indicano i vacuoli elettro-lucenti presenti nello strato granuloso. Il triangolo evidenzia le strutture lamellari presenti nella periferia del vacuolo, mentre le frecce stanno ad indicare l'irregolarità dello spazio tra lo strato granuloso e lo strato corneo (barra= 500nm). (b) Lo spazio intercellulare della porzione inferiore dello strato corneo appare più ampio e riempito con materiale amorfo (asterisco). Il triangolo indica inoltre la presenza di anomale invaginazioni della membrana plasmatica. All'interno del citoplasma delle cellule dello strato corneo sono presenti numerosi vacuoli che sembrano essere pieni di cheratinosomi (freccia)(barra=200nm). (c) Sequenza *wild type* dell'esone 5. (d) Mutazione in eterozigosi (presente in entrambi i genitori) che mostra l'inserzione di una adenina (freccia nera). (e) Inserzione in omozigosi di una adenina (freccia rossa). Questa mutazione comporta lo spostamento del registro di lettura che causa la generazione di un codone di STOP prematuro (TAA). (f) Sequenza *wild type* dell'esone 7. (g) Mutazione in eterozigosi con cambiamento nucleotdico (C>T freccia nera) che causa una sostituzione nucleotidica, S365L, nel paziente 2.

### 4.2.2 Analisi Molecolare

L'amplificazione ed il seguente sequenziamento del gene ALDH3A2 ha evidenziato nel primo paziente la presenza di una mutazione omozigote; nello specifico si tratta di un'inserzione nucleotidica (c.769insA) nell'esone 5, confermata dalla presenza nei genitori della stessa mutazione in eterozigosi (Figura 2). La mutazione c.insA consiste nell'inserzione di un'adenina in una sequenza di tre adenine dalla base 767 alla base 769, comportando cosi un cambiamento nel codice di lettura e la conseguente sostituzione degli aminoacidi dall'Isoleucina 257 all'Isoleucina 261 e la successiva formazione di un codone di STOP prematuro alla posizione 262. Questo cambiamento porta alla produzione di una proteina tronca di soli 261 aminoacidi. Questa mutazione non era stata ancora descritta in letteratura. La proteina tronca che si viene a formare perde una regione essenziale per l'attività catalitica. Nonostante il tiolo catalitico della Cys241 sia ancora presente, nella proteina tronca vengono a mancare altri residui importanti per la funzionalità dell'enzima, quali il Glu333 che è noto essere una base generale di tutte le aldeidi deidrogenasi di classe 3 (Hempel et al., 2001).

Abbiamo messo in coltura i fibroblasti estratti da una biopsia di pelle prelevata al paziente 2 al fine di analizzare l'attività enzimatica della FALDH. Il test effettuato ha evidenziato una forte riduzione dell'attività della FALDH pari a 935 pmol $min^{-1}$ $mg^{-1}$ rispetto ai normali valori compresi tra 6750-20570. In seguito l'analisi molecolare ha evidenziato la presenza di due mutazioni in eterozigosi all'interno del gene ALDH3A2 già descritte in letteratura. La prima, c.1094C>T (Fig. ) comporta una sostituzione aminoacidica, S365L (Shibaki et al., 2004; Sillen et al., 1999); la seconda, c.471 + 2T>G (Rizzo et al 1999) è una mutazione che coinvolge il sito donatore di splicing (GT > GG) dell'esone 3 e che ha come conseguenza la perdita degli esoni 2 e 3 dalla sequenza codificante (exon skipping). Il risultato di questo exon skipping è la perdita di 106 aminacidi (dal 52 al 157) (figura 2).

La mutazione c.1094C>T è stato già descritta ed associata a due differenti aplotipi del gene ALDH3A2 (#1 e #2) (Rizzo e Carney 2005; Rizzo et al., 1999). Noi abbiamo visto che il nostro paziente è eterozigote per gli aplotipi #1 e #3; la madre invece (c.471 + 2T) risulta essere eterozigote per gli aplotipi #1 e #4, mentre il padre (c.1094C>T) è omozigote per l'aplotipo #3. La mutazione c.1094C>T è quindi situata sull'aplotipo #3 del gene ALDH3A2, indicando che questo allele mutato rappresenta una mutazione ricorrente nella popolazione italiana.

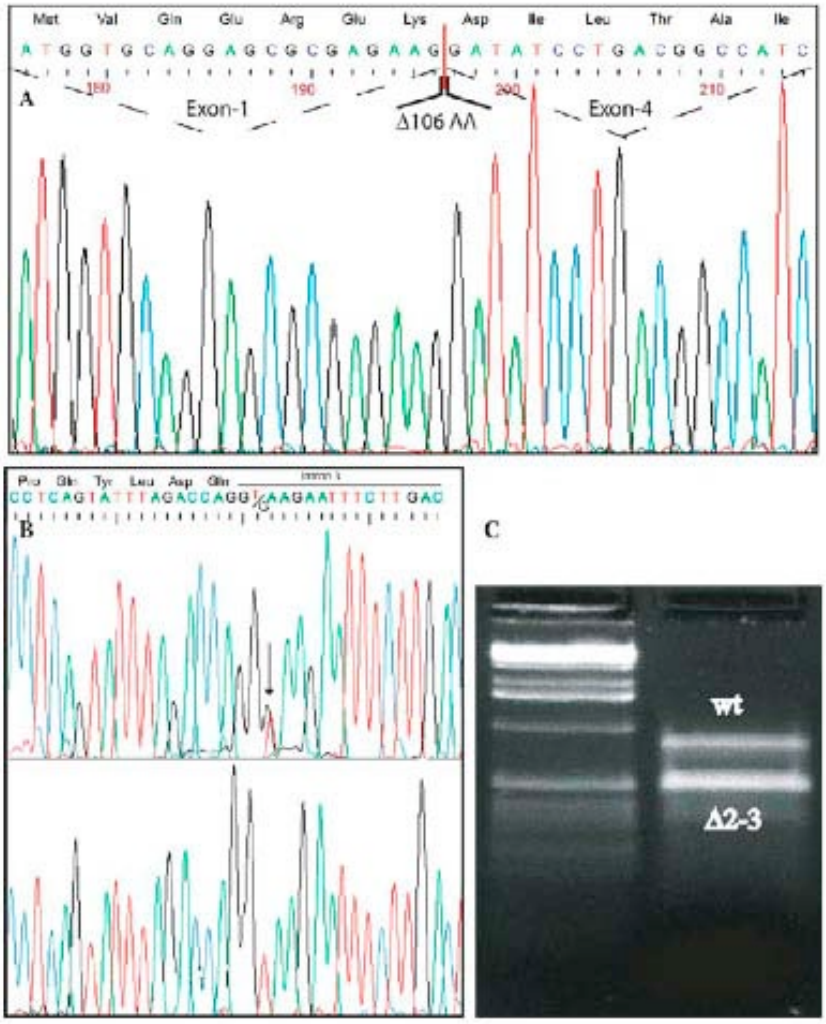



**Figura 2.** *Analisi del Paziente 2.* (a) Analisi della sequenza degli esoni 1-4 del gene ALDH3A2 del paziente 2. Il cromatogramma mostra la sequenza del prodotto più piccolo che risulta dalla delezione degli esoni 2 e 3 causata da un *exon skipping* con la conseguente perdita di 106 aminoacidi. (b) Il cromatogramma mostra la mutazione in eterozigosi del sito di splicing c.471+2T>G. (c) L'analisi elettroforesica dell'amplificato mostra la presenza dei due prodotti, quello wild type e quello deleto che manca di 318 paia di basi.

## 4.3 Caratterizzazione di una nuova e di una ricorrente mutazione in pazienti Italiani affetti da KID sindrome

La sindrome KID è un raro disordine congenito, secondario ad una displasia dell'ectoderma (alterazione nello sviluppo e nel differenziamento degli epiteli multistratificati) con trasmissione autosomica dominante. Il fenotipo è caratterizzato dalla comparsa d'infiammazione con successiva neovascolarizzazione a carico della cornea (cheratite), ittiosi congenita ed ipoacusia sensoriale. La cute di questi pazienti si presenta ispessita con placche ben circoscritte, eritematose ed ipercheratosiche che hanno una distribuzione simmetrica sul volto e sulle estremità. Gli affetti presentano un'aumentata suscettibilità alle infezioni muco-cutanee e nell'11% dei casi è stato osservato l'insorgere di carcinoma squamoso che può essere quindi considerato una manifestazione della patologia. La sindrome KID è stata associata a mutazioni, in eterozigosi, del gene GJB2 che codifica per la connessina 26.

In questa tesi abbiamo analizzato due pazienti diagnosticati per la sindrome KID.

### 4.3.1 Descrizione Pazienti

Il paziente 1 è una donna italiana di 23 anni che alla nascita non presentava alcun problema dermatologico. All'età di due anni le è stata diagnosticata ipoacusia neurosensoriale. Successivamente si è manifestata un'ipercheratosi frammentaria intorno alla zona periorale ed alle ginocchia, ed inoltre la presenza di cheratodermia palmoplantare. All'età di sei anni altri sintomi, quali fotofobia e secchezza degli occhi, indicavano l'insorgere di cheratite oculare. In seguito, anche se in maniera lenta, è apparsa alopecia cicatriziale del cuoio capelluto. Dall'osservazione diretta del paziente (Figura 1) possiamo notare delle placche ipercheratotiche intorno alla bocca, alle guance (Figura 1b) e alle ginocchia. L'ipercheratosi palmoplantare è ora evidente ed associata ad onicodistrofia. Sono ancora presenti alcune placche di alopecia cicatriziale del cuoio capelluto e l'esame oculare ha mostrato un alto grado di congiuntivite e secchezza degli occhi associate alla cheratite (Figura 1b). Il corpo è ricoperto da placche ipercheratotiche. L'analisi istologica, effettuata su una biopsia di 3mm della pelle, ha evidenziato la presenza di una evidente ipercheratosi dello strato corneo e la formazione di

caratteristiche conformazioni a canestro, che sono spesso presenti nei pazienti affetti dalla sindrome KID (Figura 1a). La paziente presenta inoltre sordità neuro-sensoriale bilaterale.

Il paziente 2 è un maschio di 19 anni. Sin dai primi mesi di vita gli è stata riscontrata sordità neuro-sensoriale di medio grado, associata ad una xerodermia generalizzata con ipercheratosi disomogenea, più accentuata al volto (zigomi, naso), ai gomiti ed alle ginocchia ove era evidente una accentuazione della quadrellatura cutanea con disposizione "a filiera"(Figura 2). Il paziente mistrava un dermografismo positivo con prurito ed ipoidrosi. I capelli nella prima infanzia apparivano chiari e ruvidi al tatto: dall'esame morfologico sono stati riscontrati numerosi peli terminali in anagen distrofico privi di particolari alterazioni del fusto. Associata a queste caratteristiche era evidente una fotofobia ingravescente con congiuntiviti e blefariti ricorrenti, aggravata nella seconda infanzia da cheratiti con ulcere corneali. Ha subito due trapianti corneali all'occhio destro.

In seguito, dopo i due-tre anni si è manifestata un'eritrocheratodermia zonale localizzata prevalentemente alla piramide nasale, agli zigomi, ai padiglioni auricolari, ai gomiti ed alle ginocchia e in seguito alle ascelle, con noduli ipercheratosici di dimensioni rilevanti.

Lo sviluppo intellettivo del probando risulta essere nella norma. Ha subito la ricostruzione del timpano sinistro nel 1996. Presenta onicodistrofia degli alluci fin dall'adolescenza.

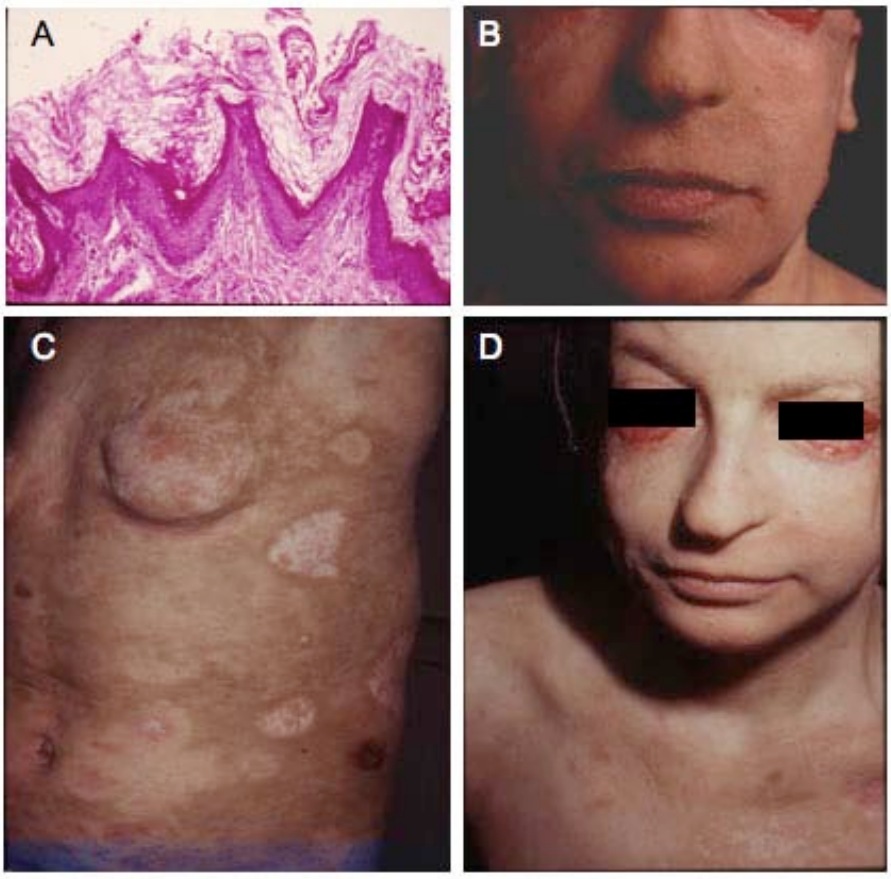



**Figura 1.** *Descrizione Paziente 1.* (a) L'analisi istologica (HE) mostra una evidente ipercheratosi dello strato corneo con la formazione delle caratteristiche *conformazioni a canestro* tipiche della patologia. (b – d) Il paziente mostra delle placche ipercheratotiche e ittiosi diffusa su tutto il corpo, in particolare sono molto evidenti ai lati della bocca (b) e intorno agli occhi (d).

**Figura 2.** *Descrizione Paziente 2*. (a, d) Il paziente presenta una ipercheratosi desmogenea su tutto il corpo, in particolare risulta molto accentuata intorno alla bocca, agli occhi, sul naso e sugli zigomi. (b, c) Il paziente manifesta inoltre una eritrocheratodermia zonale localizzata prevalentemente sui gomiti, sulle ginocchia e sotto le ascelle.

### 4.3.2 Analisi Molecolare

La sindrome KID è associata a mutazioni del gene GJB2 che codifica per la connessina 26 (Richard et al., 2002; van Steensel et al., 2002). Al fine di conoscere le cause genetico-molecolari che hanno portato al manifestarsi di questa patologia nei nostri due pazienti, abbiamo rivolto la nostra attenzione verso il gene GJB2. Dalle biopsie dei pazienti abbiamo estratto l'RNA totale da cui abbiamo ottenuto il DNA complementare mediante retrotrascrizione. Usando questo come templato, in una reazione di PCR, con oligonucleotidi senso ed antisenso specifici per la Cx26 (disegnati in accordo con la sequenza NM_004004), abbiamo amplificato e quindi sequenziato la sequenza codificante della connessina 26 dei pazienti. Dall'analisi delle sequenze abbiamo riscontrato nei nostri pazienti due diverse mutazioni della connessina 26 (Figura 3). Il cromatogramma del paziente 1 mostra chiaramente la sostituzione, presente in eterozigosi, della guanina in posizione 32 con una adenina. Dalla figura risulta evidente la presenza di due picchi sovrapposti che indicano la presenza della sostituzione nucleotidica in eterozigosi. Questa sostituzione causa il cambiamento dell'aminoacido glicina in posizione 11 con un acido glutammico (G11E). La mutazione avviene nel dominio N-terminale della proteina, importante per la localizzazione in membrana della connessina, poiché rappresenta il peptide segnale della proteina, e per la regolazione degli scambi ionici tra le cellule. Questa mutazione non era stata ancora descritta in letteratura.

Il cromatogramma del paziente 2 mostra invece la sostituzione della guanina in posizione 148 con una adenina che causa il cambiamento dell'acido aspartico in posizione 50 con una asparagina (D50N). Questo aminoacido è situato nel primo dominio extracellulare della proteina, anch'esso importante per la regolazione degli scambi itercellulari, ma anche essenziale per il riconoscimento cellula-cellula dei connessoni. Questa mutazione, al contrario della precedente, è stata già descritta in letteratura (Richard et al., 2002; van Geel et al., 2002). Al fine di escludere il coinvolgimento di altre mutazioni nei geni codificanti connessine differenti, abbiamo amplificato e sequenziato nei due pazienti in esame, anche i geni GJB1 e GJB4 (rispettivamente codificanti per le Cx 31 e 30.3), poiché è noto il loro coinvolgimento nella eritrocheratodermia variabile (EKV) associata a sordità ed anche il gene GJB6 (Cx30) resposnabile della sordità non sindromica. Dall'analisi delle sequenze abbiamo escluso mutazioni o polimorfismi in questi geni, potendo cosi affermare che la sindrome KID

diagnosticata ai due pazienti in esame è causata da mutazioni nel gene GJB2 che codifica per la Cx26.

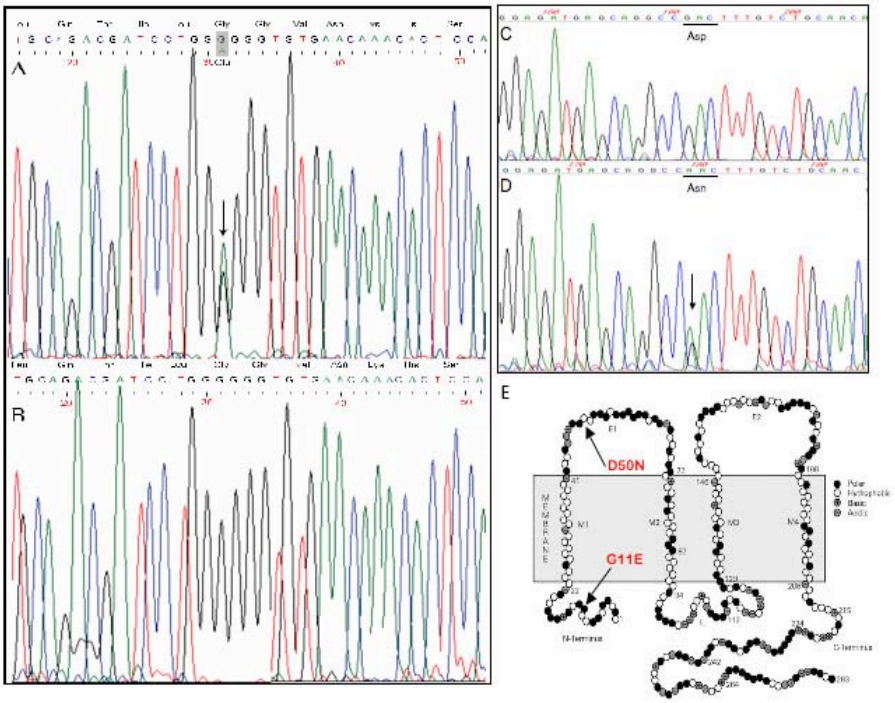



**Figura 3.** *Analisi Molecolare.* (a, b) L'analisi del cromatogramma del paziente 1 mostra la sostituzione nucleotidica G>A (freccia nera ) che causa il cambiamento dell'aminoacido glicina (G) in posizione 11 con un acido glutammico (E). (c, d) L'analisi del cromatogramma del paziente 2 mostra la sostituzione nucleotidica G>A (freccia ) che causa il cambiamento dell'aminoacido aspartato (D) con un asn (N). (e) Nella struttura della connessina 26 sono evidenziate le posizioni delle mutazioni riscontrate nei pazienti analizzati che cadono rispettivamente nel dominio N-terminale (G11E) e nel primo dominio extracellulare (D50N).

### 4.3.3 Analisi funzionale delle connessine wt e mutate

Le mutazioni da noi riscontrate nei pazienti analizzati, sono posizionate in domini della proteina molto importanti per la localizzazione in membrana (G11E) e per l'assemblaggio (D50N) delle giunzioni gap. Al fine di studiare eventuali diversità nella funzionalità delle connessine mutate rispetto alla connessina normale (wild type-WT), abbiamo deciso di clonare la sequenza codificante della connessina WT e delle forme mutate all'interno di un vettore d'espressione per le cellule di mammifero (pcDNA 3.1). I costrutti sono stati sequenziati e quindi trasfettati transientemente in una linea cellulare di osteosarcoma umano (SAOS-2), che non esprime la connessina 26 endogena. Dopo 24h dalla trasfezione abbiamo eseguito una immunofluorescenza al fine di valutare eventuali differenze nell'espressione dei costrutti esprimenti le connessine mutate con quello WT. Come si può osservare dal pannello in figura 4, la colorazione, specifica per la Cx26, nelle cellule esprimenti il costrutto WT, mostrava la presenza in membrana della proteina associata a quella presente nel citoplasma, specificatamente nelle vescicole di trasporto caratteristiche della biosintesi delle connessine (Mese et al., 2007). Al contrario, le cellule trasfettate con entrambi i costrutti esprimenti le connessine mutate mostrano una colorazione citoplasmatica, suggerendo l'ipotesi di un difetto nella localizzazione in membrana delle connessine che portano le mutazioni G11E e D50N (Figura 4).

Durante questi esperimenti di trasfezione e di immunofluorescenza, abbiamo notato anche un minore espressione del mutante G11E associato ad un aumento di letalità cellulare (Figura 5). Il pannello mostra come l'espressione della Cx26 WT, colorata in verde, sembra essere maggiore rispetto ai due mutanti. Per chiarire i meccanismi responsabili di questo evento abbiamo deciso di valutare se le cellule esprimenti i due mutanti potessero andare incontro a morte cellulare mediante analisi citofluorimetrica. Abbiamo trasfettato le cellule SAOS-2 e a 24 ore dalla trasfezione le abbiamo raccolte e analizzate utilizzando la metodica dell'annessina V (AV)- Ioduro di Propidio (PI) che permette di determinare la percentuale di cellule apoptotiche in una data popolazione grazie alla misurazione del legame della AV con la fosfatidilserina, che durante il processo apoptotico si sposta dal foglietto interno a quello esterno della membrana plasmatica. L'utilizzo della doppia marcatura AV-PI permette di distinguere nei campioni in analisi le cellule vive (AV negative, PI negative), le cellule apoptotiche (AV positive, PI negative) e le cellule necrotiche (AV positive, PI positive). Dal grafico mostrato in figura 6a è possibile notare che

non ci sono differenze significative tra le cellule esprimenti i differenti costrutti. Questo dato ci permette di affermare che la morte cellulare non è associata a fenomeni apoptotici. Lo stesso esperimento ci ha permesso di dimostrare che l'espressione della connessina mutata G11E è in grado di indurre morte cellulare via necrosi (Figura 6b). Al fine di quantificare l'effetto della connessina mutante G11E in questo fenomeno, abbiamo ripetuto l'esperimento di trasfezione e dopo 24 ore abbiamo analizzato i nostri campioni al citofluorimetro mediante un saggio specifico per valutare i livelli di necrosi nelle varie popolazioni cellulari. Questo metodo si basa sull'utilizzo della fluoresceina di-acetato (FDA) associata al propidio ioduro: questa colorazione ci permette di stabilire la vitalità cellulare. L'idrolisi della fluoresceina diacetato misura l'attività complessiva di enzimi, come le esterasi, coinvolti nel metabolismo della cellula: quindi solo le esterasi di membrana delle cellule vive sono in grado di processare il colorante che viene accumulato nelle cellule vitali. Ciò ci permette di avere un dato più specifico sulla vitalità cellulare. Dal grafico presente in figura 7a, possiamo notare un incremento significativo dei livelli di necrosi nelle cellule esprimenti la connessina che porta la mutazione G11E rispetto al WT e al mutante D50N che raggiungono il 30%. Anche nelle cellule esprimenti il mutante D50N vi è un aumento dei livelli di necrosi, circa il 12%, ma non sembra essere rilevante. A questo punto possiamo concludere che l'espressione della connessina mutata G11E induce morte cellulare via necrosi. Abbiamo deciso di approfondire lo studio dei livelli di necrosi per quel che riguarda il mutante G11E effettuando esperimenti di cotrasfezione tra la Cx26 WT e quella mutata. I due vettori contenenti i cDNA WT e mutato della connessina 26 sono stati cotrasfettati a differenti *ratio* al fine di valutare l'effetto che il mutante G11E può avere sul WT. Il grafico mostrato nella figura 7b evidenzia l'effetto dominante della mutazione rispetto al WT in quanto già ad una *ratio* del 40% la connessina mutante riesce indurre morte cellulare per necrosi.

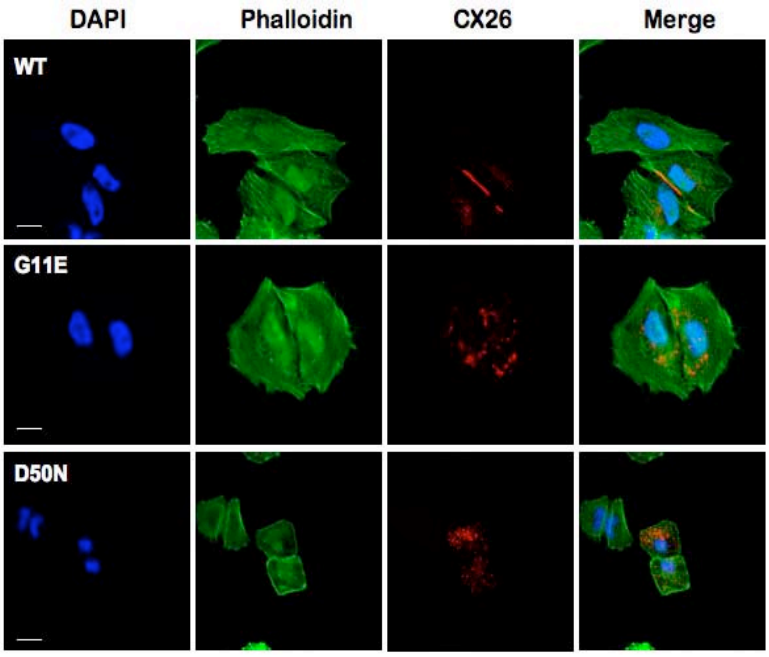



**Figura 4.** *Immunolocalizzazione delle connessine wt e mutate.* Il pannello mostra la localizzazione delle connessine wt e mutanti. In alto è rappresentata l'espressione della connessina 26 *wild type* (in rosso) e come si può osservare la localizzazione è prettamente in membrana e solo in parte nel citoplasma, nello specifico nelle vescicole di trasporto. Al contrario la colorazione delle due connessine mutanti ci mostra una localizzazione esclusivamente citoplasmatica (barra= 20μm).

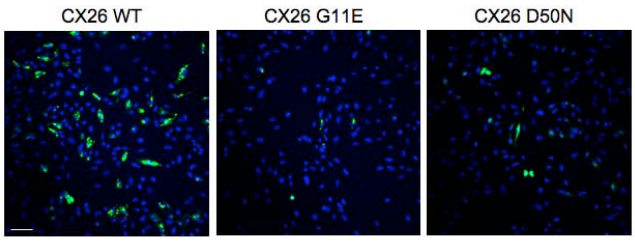
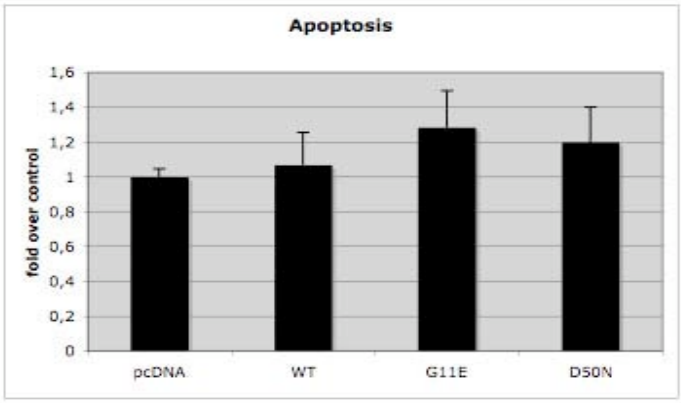



**Figura 5.** *Differenze di trasfezione tra i costrutti wt e mutati.* Il pannello mostra una significativa differenza di espressione della connessina 26 wt ( colorata in verde) rispetto alle connessine mutate (barra=10μm).

A




B

| Transgene | Cx26 (WT) | Cx26 (G11E) | Cx26 (D50N) |
|---|---|---|---|
| Cell Death (PI + annexin V) | 13% (± 1,13 SD) | 53% (± 1,53 SD) | 23% (± 1,24 SD) |
| Positive Cx26 staining after 12h | 45% | 40% | 42% |
| Positive Cx26 staining after 24h | 40% | 3% | 35% |

**Figura 6.** *Analisi dei livelli di apoptosi.* (a) Il grafico mostra che non ci sono differenze significative tra i livelli di apoptosi nelle differenti popolazioni cellulari analizzate. (b) La tabella indica i livelli di mortalità cellulare rilevati durante l'esperimento con la metodica dell'annesina V. Dopo 12h i livelli di trasfezione risultano essere paragonabili tra le tre popolazioni in esame. Al contrario dopo 24h dalla trasfezione i livelli della connessina 26 mutata G11E risultano essere drasticamente ridotti (3%). Questo fenomeno è associato ad un aumento (fino al 53%) dei livelli di mortalità delle cellule esprimenti la connessina 26 mutata G11E.

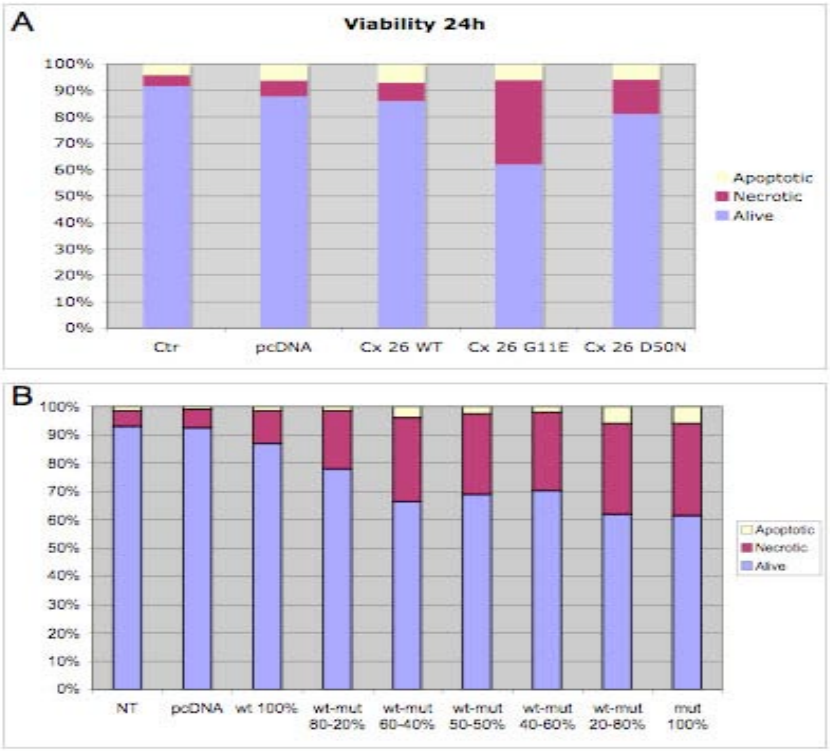



**Figura 7.** *Vitalità cellulare.* (a) Il grafico mostra l'aumento dei livelli di necrosi all'interno delle cellule che esprimono la connessina mutata G11E (30%) rispetto alle cellule che esprimono la Cx26 wt (3%) e la Cx26 mutata D50N (12%). (b) Il grafico mostra la capacità della connessina mutata G11E di indurre necrosi nelle cellule in cui è espressa anche in esperimenti di cotrasfezione con la connessina 26 wt, mostrando quindi un effetto dominante.

### 4.3.4 Regolazione del flusso del calcio

Premesso che le giunzioni comunicanti sono fondamentali nello scambio di ioni e piccoli metaboliti, essendo noto da tempo il ruolo che il calcio svolge nel differenziamento epidermico e che la morte cellulare via necrosi può essere causata anche da un aumento dei livelli di calcio intracellulari (Zong e Thompson 2006), abbiamo ipotizzato il coinvolgimento di questo ultimo nella morte per necrosi delle cellule che esprimono le connessine mutanti.

Per il mutante G11E, gli effetti della necrosi sono molto rapidi, quindi per poter apprezzare eventuali cambiamenti dei livelli del calcio intracellulare dobbiamo considerare tempi inferiori alle 24 ore dalla trasfezione come nei precedenti esperimenti. Abbiamo trasfettato le cellule SAOS-2 a tempi diversi (6, 12 e 16) e abbiamo analizzato i livelli di calcio mediante un saggio di citofluorimetria. Nella figura 8 sono mostrati i risultati che evidenziano un significativo aumento dei livelli di calcio intracellulare, con l'aumentare del tempo, nelle cellule esprimenti la connessina mutata G11E rispetto a quello WT fino ad un picco massimo raggiunto a circa 16 ore dalla trasfezione. Anche i livelli di calcio intracellulare delle cellule esprimenti la connessina mutata D50N sembrano aumentare ma l'effetto risulta essere minore se paragonato al mutante G11E. Inoltre abbiamo osservato durante questo esperimento che le cellule trasfettate con il mutante G11E avevano una morfologia diversa, nello specifico le cellule aumentavano di dimensione fino quasi a raddoppiarla (Figura 8b).

Al fine di approfondire questi risultati abbiamo deciso di affrontare gli esperimenti successivi utilizzando una tecnica di elettrofisiologia specifica, il calcium imaging. Per poter eseguire al meglio i successivi esperimenti, abbiamo deciso di costruire un vettore che esprimesse la nostra proteina fusa con la *green fluorescent protein* (GFP). La GFP viene legata alla connessina nella sua porzione C-terminale, cosi da non modificare la capacità di quest'ultima di assemblarsi in maniera corretta. Una volta prodotto il costrutto abbiamo verificato la sua espressione anche a tempi inferiori alle 24 ore: come si vede nel pannello in figura 9 l'espressione del costrutto è già visibile dopo 12 ore e sembra che la proteina di fusione si comporti in modo analogo alla connessina naturale. L'espressione delle varie forme proteiche è stata confermata mediante immunoblot evidenziando anche che a 16 ore dalla trasfezione i livelli delle tre proteine sembra essere uguale, al contrario dei livelli proteici a 24 ore (Figura 10). Quindi abbiamo trasfettato le SAOS-2 con i differenti costrutti e dopo 16 ore abbiamo analizzato i livelli di calcio

intracellulare mediante la tecnica del calcium imaging. Le cellule SAOS-2 esprimenti i diversi costrutti, sono state caricate con il Fura-2-acetossimetil estere (Fura-2AM). Questo composto è un derivato dell'indicatore del calcio Fura-2, capace però di permeare le membrane cellulari e di misurare la concentrazione di calcio intracitoplasmatica grazie alla fluorescenza. All'interno delle cellula il gruppo acetossimetil del Fura-2AM viene rimosso dalle esterasi cellulari, e questa rimozione rigenera il Fura-2 pentacarbossilato. Quest'ultimo viene eccitato con una fluorescenza della lunghezza d'onda di 340 e 380 nm, e il rapporto (R 340/380) dell'emissione di luce a queste lunghezze d'onda è direttamente correlato alla concentrazione di calcio libero intracellulare. Nei nostri esperimenti è stato misurato il livello di calcio basale presente all'interno delle quattro popolazioni cellulari. Nel wild type la [ $Ca^{2+}$ ]i (R 340/380) è di 0.3215 ± $4.7346e^{-3}$, nelle cellule esprimenti la GFP è di 0.6381 ± 0.0308, mentre il valore riscontrato nelle due popolazioni che esprimono le connessine mutate è nettamente maggiore con una ratio di 0.8216±0.0398 per il mutante D50N, e di 0.9070 ± 0.0403 per il mutante G11E. Grazie a questi esperimenti (Figura 11) abbiamo confermato in modo quantitativo che i livelli di calcio delle cellule che esprimono la connessina mutata G11E sono maggiori di quelle della connessina WT, come indicavano già gli esperimenti precedenti. Abbiamo inoltre potuto constatare che anche nelle cellule esprimenti la connessina mutata D50N vi è un aumento dei livelli di calcio intracellulare di entità minore, ma in ogni modo superiori a quelli della connessina WT. Questo aumento del calcio intracellulare può essere responsabile della morte via necrosi a cui vanno incontro le cellule che esprimono le connessine mutate ed essere alla base della patogenesi della KID sindrome.

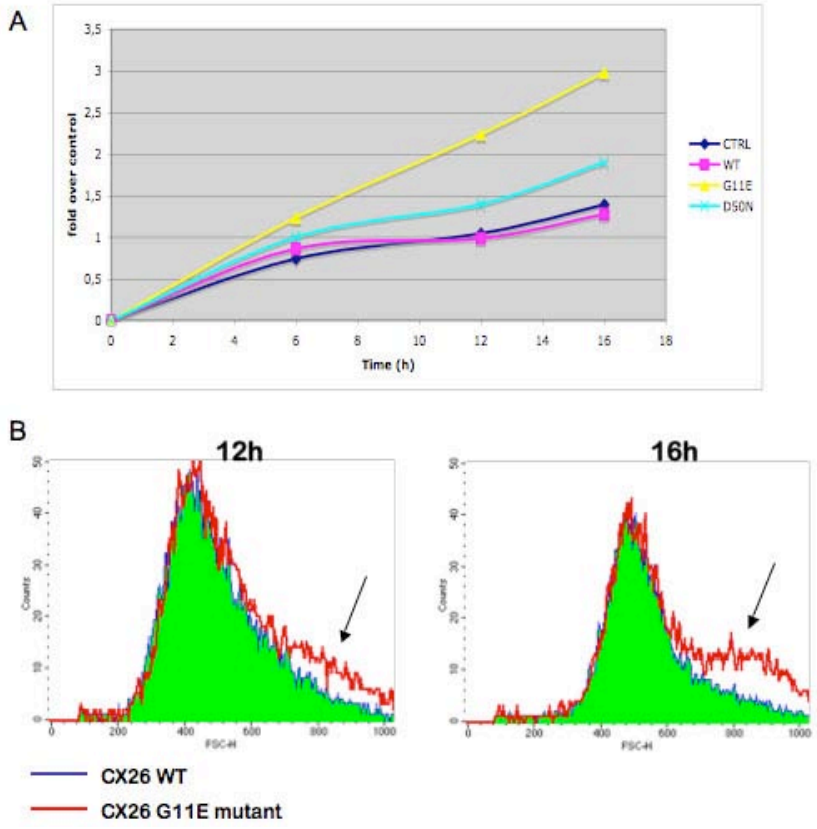



**Figura 8.** *Aumento dei livelli di calcio.* (a) Il grafico mostra l'aumento dei livelli di calcio nelle diverse popolazioni cellulari. Nelle cellule che esprimono le connessine 26 mutanti i livelli di calcio intracellulare aumentano nel tempo. Dopo 16h i livelli di calcio nelle cellule esprimenti la connessina 26 mutante G11E aumentano di circa 2,7 volte rispetto ai livelli riscontrabili nelle cellule che esprimono la Cx26 wt. (b) A questo aumento dei livelli di calcio è associata una crescita delle dimensioni nelle cellule che esprimono la Cx26 mutante G11E come evidenziato dalle frecce negli istogrammi.

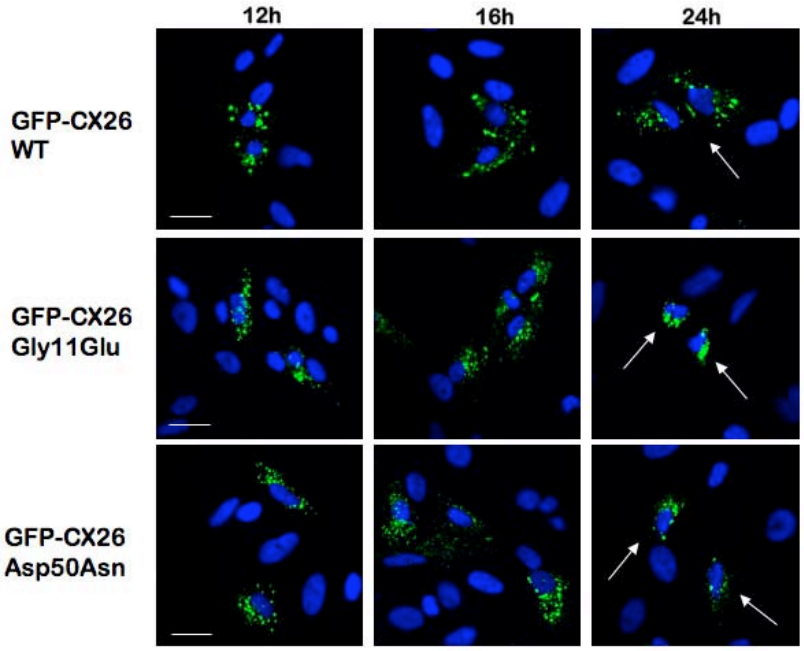



**Figura 9.** *Espressione del costrutto di fusione GFP-Cx26.* Il pannello mostra come l'espressione dei costrutti di fusione GFP-Cx26 sia già rilevabile dopo 12h dalla trasfezione. Inoltre la fusione della GFP con la Cx26 non sembra creare problemi nell'assemblaggio e nella localizzazione della proteina chimerica (barra=20μm).

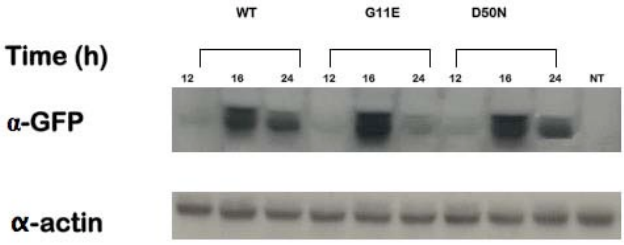



**Figura 10.** *Livelli proteici dei costrutti di fisione GFP-Cx26.* L'espressione delle varie forme proteiche è stata confermata mediante immunoblot. Dalla figura si può constatare come dopo 16 dalla trasfezione i livelli proteici dei tre campioni siano paragonabili, al contrario dei livelli delle tre proteine a 24h.

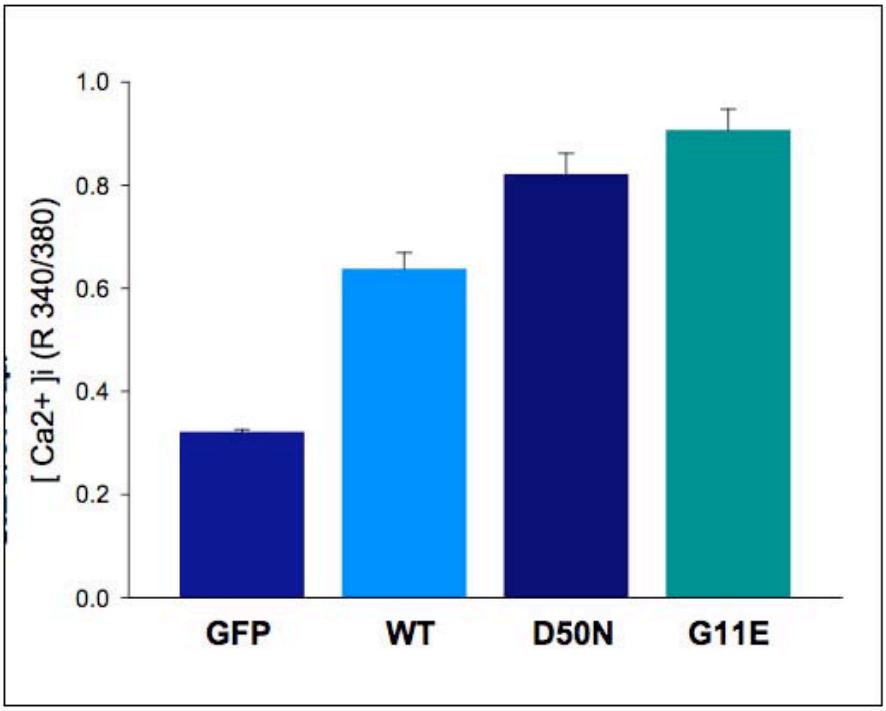



**Figura 11.** *Quantificazione dei livelli intracellulari di calcio.* Il grafico mostra i livelli di calcio basale misurato nelle tre popolazioni cellulari che esprimono le connessine 26 wt e mutanti. Dalla figura risulta evidente l'aumento del calcio intracellulare nelle cellule che esprimono i due mutanti rispetto a quelle esprimenti la Cx26 wt. Nel wild type la [ $Ca^{2+}$ ]i (R 340/380) è di 0.3215 ± 4.7346e$^{-3}$, mentre il valore riscontrato nelle due popolazioni che esprimono le connessine mutate è nettamente maggiore con un rapporto di 0.8216±0.0398 per il mutante D50N, e di 0.9070 ± 0.0403 per il mutante G11E.

# DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo analizzato 60 pazienti, clinicamente eterogenei, diagnosticati come affetti da ittiosi lamellare e, mediante tecniche di analisi molecolare, abbiamo distinto quelli che avevano mutazioni nel gene della TGM1 da quelli che non le presentavano. Le mutazioni caratterizzate in questo studio rappresentano uno spettro abbastanza ampio delle tipologie delle mutazioni caratteristiche della TGasi1. Alcune rappresentano delle mutazioni che portano alla sostituzione di un singolo aminoacido (R47G, R142H, S272P, R286Q, R315H, V382M, E520G), altre invece sono caratterizzate da sostituzioni di singole basi in siti di splicing altamente conservati. Gli errori causati nel meccanismo di splicing dovuti a mutazioni nei siti donatori-accettori o negli *branch sites* producono RNA messaggeri contenenti sequenze introniche normalmente eliminate oppure hanno come conseguenza che una parte o la totalità di una sequenza esonica venga eliminata (Exon Skiping). Questi mRNA aberranti a loro volta codificano proteine tronche oppure dolete rispetto alla proteina di tipo selvatico (*wild type*). Le proteine tronche derivano principalmente da errori di splicing che inseriscono od eliminano una sequenza di nucleotidi modificando il registro di lettura del trascritto e generando dei codoni di stop prematuri. Proteine con sequenze aminoacidiche addizionali o con delezioni possono altresì essere prodotte quando l'inserzione o la delezione non modificano il registro di lettura, ma danno luogo ad un enzima che risulta essere cataliticamente inattivo. Questi cambiamenti causano in genere la mancata formazione di interazioni ioniche e di legami idrogeno che comportano un ripiegamento non corretto della proteina. Questi cambiamenti di tipo conformazionale, non consentono il riconoscimento e/o l'interazione dell'enzima con i substrati di reazione.

Approfondire lo studio dei meccanismi alla base delle diverse forme di ittiosi lamellare è fondamentale per incrementare la conoscenza della malattia al fine di avere un approccio diagnostico più completo. La continua evoluzione delle conoscenze relative a questo difetto della cheratinizzazione, ha come conseguenza la necessità di affrontare la diagnosi della malattia sia da un punto di vista genetico-molecolare, sia da un punto di vista biochimico. L'uso di un test enzimatico associato ad uno genetico potrà portare ad una diagnosi più efficiente soprattutto nel caso di test prenatali. La possibilità di uno screening mediante analisi prenatale è stato messo a punto in questo lavoro grazie allo studio della famiglia del paziente 14. Utilizzando la nostra metodica per amplificare la transglutaminasi 1, dal DNA genomico con oligonucleotidi senso ed antisenso che fiancheggiano i 15 esoni da cui è composto il gene abbiamo potuto stabilire la presenza della mutazione in

eterozigosi Glu519X nel feto. Il DNA utilizzato come templato di amplificazione è stato estratto dai villi coriali prelevati dalla madre. Questa metodologia ci permetterà di effettuare ulteriori test per migliorare la diagnosi di questa patologia.

Nella seconda parte di questo lavoro abbiamo analizzato due pazienti di razza italica affetti dalla sindrome di Sjogren-Larsson, una patologia autosomica recessiva causata da mutazioni all'interno del gene ALDH3A2 che codifica per l'aldeide deidrogenasi degli acidi grassi (FALDH). Questi pazienti presentano dei sintomi sia a livello della cute, con la comparsa di ittiosi a pochi mesi dalla nascita, sia a livello neuronale, con ritardo mentale e sviluppo motorio alterato. Grazie all'analisi molecolare di uno dei pazienti abbiamo riscontrato una nuova mutazione, non ancora descritta in letteratura. Si tratta dell'inserzione di una adenina in posizione 767, nell'esone 5 del gene ALDH3A2. Questa inserzione causa lo spostamento del registro di lettura con la formazione di un codone di STOP prematuro. Il risultato è una proteina tronca formata da soli 261 aminoacidi che ha perso alcuni domini fondamentali per l'attività enzimatica della FALDH. Nonostante la presenza del tiolo catalitico della cisteina 241, l'enzima però perde dei residui molto importanti per il suo corretto funzionamento quali il Glu333, riconosciuta come base generale in tutte le aldeidi deidrogenasi di classe-3 (Hempel et al., 2001b); il Glu268 importante per l'attivazione dell'acqua idrolitica dopo il trasferimento dell'idrite (Hemoel et al., 2001b); e la Phe335 importante per il posizionamento dell'anello di nicotinamide necessario per il trasferimento dell'idrite (Hempel et al., 2001a). Inoltre questa proteina tronca perde il dominio idrofobico carbossi-terminale, il quale è essenziale per l'ancoraggio dell'enzima alla membrana microsomale (Masaki et al., 1994). Questa mutazione potrebbe inoltre abolire l'attività catalitica dell'enzima, poiché una proteina tronca di entita più lieve, causata dalla mutazione c.1297-1298delGA, possiede un'attività residua minore del 1% (Rizzo and Carney 2005). Nel secondo paziente abbiamo riscontrato due mutazioni già descritte in letteratura. La mutazione c.1094C>T (S365L) è stata descritta in numerosi pazienti SLS con antenati tedeschi (Rizzo et al., 1999; Sillen et al., 1998). Studi di espressione hanno evidenziato che la FALDH che possiede questa mutazione ha solo il 3% di attività enzimatica residua (Rizzo et al., 1999). La mutazione cade nel dinucleotide CpG ed è stata trovata essere associata con due differenti aplotipi del gene ALDH3A2, suggerendo che si sia originata in due occasioni distinte. Questa mutazione si è apparentemente presentata in maniera indipendente in un antenato del nostro paziente italiano, poiché è stata associata ad un aplotipo differnte del gene ALDH3A2,

il #3. I nostri studi genetici ci permettono di speculare sul fatto che l'allele mutante c.1094C>T nel nostro paziente italiano si è presentato indipendentemente in Italia. È inoltre interessante notare il fatto che questa mutazione non è mai stata associata a pazienti non Caucasici, come nella popolazone giapponese (Sakai et al., 2006), indicando che questo sito non è incline ad essere mutato in tutte le popolazioni, probabilmente a causa di backgrounds genetici differenti.

Nella terza ed ultima parte di questo studio, abbiamo analizzato due pazienti affetti dalla sindrome KID (Keratitis-Ichtyosis-Deafness). Questa patologia si manifesta con carattere autosomico dominante ed è causata da mutazioni all'interno del gene GJB2 che codifica per la connessina 26, necessaria per la formazione delle giunzioni gap. I pazienti sono caratterizzati da un fenotipo epidermico che si presenta con la cute ispessita, con placche ben circoscritte, eritematose ed ipercheratosiche che hanno una distribuzione simmetrica sul volto e sulle estremità. A questo è associata una ipoacusia sensoriale bilaterale. Abbiamo analizzato due pazienti non correlati tra loro ed abbiamo riscontrato in ciascuno una mutazione nel gene GJB2 che codifica per la connessina 26. Al paziente 1 è stata riscontrata una mutazione non ancora descritta in letteratura, si tratta della sostituzione dell'aminoacido Glicine in posizione 11 con un acido glutammico. Questa mutazione è situata nel dominio N-terminale della proteina necessario per la corretta localizzazione della connessina in membrana (peptide segnale) e per la regolazione dei flussi ionici della cellula attraverso le giunzioni gap. La mutazione riscontrata nel paziente 2 è invece nota. Si tratta della sostituzione dell'aminoacido acido aspartico in posizione 50 con una asparagina. Questa mutazione è situata nel primo dominio extracellulare della connessina 26, importante per l'interazione tra due connessoni di due cellule adiacenti. La presenza di queste mutazioni nel gene GJB2 è la causa della malattia manifestatasi nei due pazienti. Abbiamo quindi voluto analizzare la funzionalità delle connessine mutate. Dopo aver clonato i cDNA di tipo selvatico (*wild type*) e mutati in un vettore d'espressione per le cellule eucariotiche, abbiamo analizzato la localizzazione delle connessine prodotte all'interno delle cellule. Abbiamo visto che la connessina 26 *wild type* (WT) manteneva una localizzazione di membrana al contrario delle due proteine mutanti che avevano una localizzazione prettamente citoplasmatica. La delocalizzazione del mutante G11E poteva essere prevista, in quanto la mutazione è situata nel dominio N-terminale che come detto in precedenza è importante per la localizzazione della proteina in membrana. Inoltre questo

mutante si comporta come la mutazione G12R, una mutazione già descritta in letteratura e comune anche alle connessine 30.3 e 31(Richard et al., 2002).

La successiva fase del lavoro è stata quella di valutare la vitalità delle cellule che esprimevano le proteine mutate e rispetto a quelle WT. È gia noto in letteratura che l'espressione di connessine mutate può causare un aumento della letalità cellulare (Common et al., 2003.). Gli esperimenti al citofluorimetro da noi eseguiti ci hanno permesso di escludere un coinvolgimento delle proteine mutanti G11E e D50N in fenomeni apoptotici ma hanno evidenziato, per una delle due (G11E) una forte induzione della morte cellulare attraverso i meccanismi necrotici. Abbiamo, infatti, osservato un aumento del 30%, rispetto al controllo WT, dei livelli di necrosi nelle cellule esprimenti la connessina mutata G11E. Anche i livelli di necrosi della popolazione cellulare che esprime la connessina mutata D50N subiscono un aumento, ma solo del 5% rispetto al WT. La presenza di livelli di necrosi cosi elevati potrebbe essere responsabile dell'insorgere del fenotipo epidermico della malattia. Come descritto in letteratura, in alcuni casi la necrosi cellulare può essere causata anche dall'aumento dei livelli intracellulari di calcio (Zong e Thompson 2006.) che può innescare l'attivazione di diversi segnali di necrosi. È noto anche che le giunzioni comunicanti partecipano allo scambio tra le cellule di ioni, secondi messaggeri e piccoli metaboliti. In letteratura è riportato inoltre la differenza di permeabilità delle giunzioni comunicanti formate dalla connessina 26 mutata V84L, all'inositolo 3P, un secondo messaggero appartenente alla cascata del $Ca^{2+}$ (Beltramello et al., 2005). Abbiamo quindi analizzato i livelli di calcio delle cellule esprimenti i nostri mutanti della connessina 26 utilizzando due metodologie differenti. Il primo citofluorimetrico (FACS) ci ha dato la possibilità di avere un quadro più generale evidenziando comunque un aumnento dei livelli di calcio nelle popolazioni cellulari esprimenti i due mutanti. Nello specifico l'aumento risulta significativamente più marcato per la connessina 26 mutante G11E rispetto alla connessina 26 D50N, che è circa tre volte superiore rispetto alla popolazione esprimente la connessina 26 WT. Il secondo approccio, elettrofisiologico (*calcium imaging*) ci ha permesso di effettuare una analisi quantitativa dei livelli di calcio intracellulare delle cellule che esprimono le differenti connessine (WT e mutanti). Questi esperimenti confermano l'aumento dei livelli di calcio basale in presenza delle due proteine mutanti. Anche se l'aumento dei livelli di calcio intracellulare sembra essere paragonabile tra le due proteine mutanti questi si comportano in maniera diversa nell'indurre morte cellulare via necrosi. Questo si potrebbe spiegare

ipotizzando che la forma mutante D50N formi degli emicanali costitutivamente attivi nella membrana evento gia noto per altri mutanti delle connessine (Mese et al., 2007) in grado di influenzare i flussi di calcio all'interno della cellula. Lo stesso potrebbe non avvenire nelle cellule che esprimono la connessina mutata G11E con un conseguente accumulo sempre maggiore di calcio all'interno della cellula fino all'attivazione dei pathways necrotici che inducono la morte cellulare.

# MATERIALI
# E METODI

# 5.1 MATERIALI E METODI

## 5.1.1 Estrazione del DNA e del RNA nei lavori presentati

Il DNA genomico è stato estratto dai linfociti periferici del sangue dei pazienti secondo metodologie standard già descritte in letteratura (Sambrook *et al.*, 1989)

Per l'estrazione dell'RNA e per la reazione di RT-PCR sono state utilizzate biopsie di 3 mm prelevate dalle zone affette dei diversi pazienti analizzati per tutte le patologie descritte in questa tesi. L'RNA totale è stato estratto utilizzando il Qiagen RNAeasy mini kit (Qiagen, Crawley, UK).

## 5.2 Amplificazione del gene TGM1

La reazione di RT-PCR è stata eseguita con il kit Improm II (Promega) utilizzando 100 ng di RNA totale. La retrotrascrizione è stata eseguita utilizzando 0.75µM del primer TG1R2 (5' TTAGCATCTGTTCCCCCAGTGC 3') specifico per la TGasi1.

E' stato amplificato il cDNA specifico per la TGasi1, precedentemente preparato, utilizzando i primers TG1F1 (5' TCCTGTCCCATCCATCCTGACC 3') per il filamento (+) e TG1R1 (5' CCCCCAGTGCAAGTGAAGACTC 3') per il filamento (-). La PCR è stata eseguita in un tampone standard contenente 1.5 mM $MgSO_4$, 0.2 mM di dNTPs, 2% di DMSO, e 0.1U di *Taq* polimerasi HiFi (Invitrogen). La reazione è stata condotta utilizzando il seguente programma di amplificazione: 95°C per 3 minuti seguiti da 40 cicli a 94°C per 45s, 58.5°C per 45s e 68°C per 1m e 45s.

Per l'amplificazione della TGasi1 da DNA gnomico sono stati utilizzati primers senso ed antisenso specifici (tabella 1).

I frammenti del peso molecolare atteso sono stati purificati da gel utilizzando Qiaex II Extraction Kit (Qiagen, Crawley, UK).

| Esone | Strand | Sequenza oligonucleotide | Nome | Dimensioni bp |
|---|---|---|---|---|
| 2-3 | + | TCCTGTCCCATCCATCCTGACC | F1 | 1500 |
| | - | GCCTCTCCCCACCAAACATAG | 2A | |
| 4 | + | GTCCCAGGCTCCATCCCCTCTCCT | 3S | 364 |
| | - | TCCCTGTCTTTCCCTCCCATCTAC | 3A | |
| 5-6 | + | GGTGAGGCCCAGGGAGAGAAC | 4S | 484 |
| | - | CAGGAGGAGGGTGGGGGGTGTG | 4A | |
| 7-8-9 | + | CTGTAGGGCCCGGGCCACTCCT | 5S | 1100 |
| | - | TGTTAATCAGGTGGGGGGAGATAAG | 6A | |
| 10-11-12-13-14 | + | CTGTGTGGACCTTACCCAGG | 7F | 2235 |
| | - | GATAGTGAGGCAGGGCAAGGA | 9R | |

**Tabella 1.** *Primer utilizzati per l'amplificazione del gene TGM1 da DNA genomico.*

## 5.3 Studio dei pazienti affetti dalla Sjogren-Larsson

### 5.3.1 Microscopia elettronica

I campioni per la microscopia elettronica sono stati prefissati in 2% glutaraldeide per 2 ore a 4°C. La fissazione completa dei campioni è stata ottenuta mediante incubazione con 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer 0.1 M, 4.5% di saccarosio per 1 ora a 4°C. I campioni quindi sono stati reidratati in etanolo e bloccati in paraffina. Sono state tagliate sezioni di 1μm dai campioni e colorate con 1% uranyl-acetato.

### 5.3.2 Coltura dei Fibroblasti

I fibroblasti sono stati estratti da una biopsia cutanea del paziente 2 e messi in coltura utilizzando tecniche standard.

## 5.4 Amplificazione del gene ALDH3A2

La reazione di RT-PCR è stata eseguita con il kit Improm II (Promega) utilizzando 100 ng di RNA totale. La sintesi del cDNA è stata eseguita utilizzando degli esameri random. La regione codificante della FALDH è stata amplificata utilizzando primers specifici: F1 (5' ATTGTGGCTGTGGGTTGAGG 3') per il filamento (+) e R1 (5' AGSGGCACTAGGAGGTTGAACAGG 3') per il filamento (-).La PCR è stata eseguita in un tampone standard contenente 1.5 mM $MgSO_4$, 0.2 mM di dNTPs, 2% di DMSO, e 0.1U di *Taq* polimerasi HiFi (Invitrogen). La reazione è stata condotta utilizzando il seguente programma di amplificazione: 95°C per 3 minuti seguiti da 40 cicli a 94°C per 45s, 56°C per 45s e 68°C per 1m e 30s. La reazione di PCR per amplificare il segmento deleto (figura 2 risultati SLS) è stata eseguita con i primers: F1del (5' ATTGTGGCTGTGGGTTGAGG 3') per il filamento (+) e R1del (5' ACAATGTCCAGGTCACAATC 3') per il filamento (-).I frammenti del peso molecolare atteso sono stati purificati da gel utilizzando Qiaex II Extraction Kit (Qiagen, Crawley, UK).

L'amplificazione del gene ALDH3A2 dal DNA genomico è stata eseguita utilizzando dei primers specifici per sequenze introniche fiancheggianti gli esoni (tabella 2). La PCR è stata eseguita utilizando 500 ng di gDNA in un

tampone standard già descritto in precedenza. Gli aplotipi del gene ALDH3A2 sono stati determinati come descritto in *Rizzo et al., 1999.*

## 5.5 Attività enzimatica della FALDH

L'attività enzimatica della FALDH nei fibroblasti messi in coltura è stata misurata come descritto precedentemente in *Kelson et al., 1997*.

| Esone n | strand | sequenza oligonucleoti | Nome | dimension bp |
|---|---|---|---|---|
| 1 | + | TGTGGCTGTGGGTTGACGGT | FALDHex1Forw | 352 |
| | – | AGCTCCAGTCCACAAGTGCG | FALDHex1Rev | |
| 2–3 | + | TGAATGGCAAACAGCTAGTC | FALDHex2–3Forw | 2,057 |
| | – | CCGAACATGTCCGAACA | FALDHex2–3Rev | |
| 4–5 | + | ATTTATTTGGCAGTGCAAGA | FALDHex4–5Forw | 1,612 |
| | – | GCTGCCTGCGAATAGTTAAT | FALDHex4–5Rev | |
| 6 | + | TGGCTGGATTTTGTACTTAC | FALDHex6Forw | 349 |
| | – | ACCAGAAAGCAGGATTTAGT | FALDHex6Rev | |
| 7 | + | GGGAGAGGGAAAGGCATGGA | FALDHex7Forw | 430 |
| | – | GCAACCTCGGAACACAACCT | FALDHex7Rev | |
| 8 | + | GGCCATGAGTGTTCCCTAAG | FALDHex8Forw | 242 |
| | – | TTTCAGCAGCCCATACAATC | FALDHex8Rev | |
| 9 | + | TTCCCGGTCGTTGTTAGA | FALDHex9Forw | 465 |
| | – | CAGTGACAAAAACGGGTAGC | FALDHex9Rev | |
| 9′ | + | ACAGTATCCCAGCCTTAGTG | FALDHex9′Forw | 230 |
| | – | GCCCACCTTACATATAGAAA | FALDHex9′Rev | |
| 10 | + | TTAAAGCAGCTGAGTAAACT | FALDHex10Forw | 207 |
| | – | GATGAATGGCAATGACT | FALDHex10Rev | |

**Tabella 2.** *Primer utilizzati per l'amplificazione del gene ALDH3A2 da DNA genomico.*

## 5.6 Amplificazione del gene GJB2 nei pazienti affetti dalla sindrome KID

La reazione di RT-PCR è stata eseguita con il kit Improm II (Promega) utilizzando 100 ng di RNA totale estratto dalle biopsie dei pazienti. La sintesi del cDNA è stata eseguita utilizzando degli esameri random. La regione codificante della connessina 26 è stata amplificata utilizzando primers specifici: Cx26F1 (5' TGTTCCTGTGTTGTGTGCATTCG 3') per il filamento (+) e Cx26R1 (5' TGTGGCATCTGGAGTTTCACCTG 3') per il filamento (-) disegnati sulla sequenza NM_004004. La PCR è stata eseguita in un tampone standard contenente 1.5 mM $MgSO_4$, 0.2 mM di dNTPs, 2% di DMSO, e 0.1U di *Taq* polimerasi HiFi (Invitrogen). La reazione è stata condotta utilizzando il seguente programma di amplificazione: 95°C per 3 minuti seguiti da 40 cicli a 94°C per 40s, 56°C per 40s e 68°C per 40s. I frammenti del peso molecolare atteso sono stati purificati da gel utilizzando Qiaex II Extraction Kit (Qiagen, Crawley, UK).

## 5.7 Clonaggio delle Connessine WT e Mutanti

Dal cDNA precedentemente preparato è stata amplificata la regione codificante della Cx26 utilizzando i primers Cx26F1EcoRI (+) (5' TGTTCCTGTGTTGTGTGAATTCGTC 3') e Cx26RKpnI (-) (5' TGCGTTACGGTACCTTTTTTGAC 3') per inserire i siti di restrizione di EcoRI e KpNI alle estremità dell'amplificato. Il prodotto di amplificazione è stato corso su un gel allo 1,5% di agarosio e colorato successivamente con etidio bromuro, quindi prelevato ed estratto come già descritto. Il frammento è stato poi clonato sia in pcDNA3.1 (Invitrogen) che in pGFPN1 (Invitrogen) e quindi trasformati nelle cellule competenti TOP10 (Invitrogen).

## 5.8 Microscopia confocale

Le colture cellulari (Saos-2) sono state piastrate alla densità di 30000 cellule/$cm^2$ o 25000 cellule/$cm^2$ su vetrini copri-oggetto da 20 mm e poi trasfettate utilizzando il Calcio Fosfato (Invitrogen). Le cellule (Saos-2) sono state fissate con formalina tamponata 4% per 10 minuti a temperatura ambiente (RT). Le cellule sono state in seguito permeabilizzate con PBS-Triton 0,25% per 5 minuti a RT e incubate per 1 ora a RT in PBS-goat serum 5%. Le cellule sono state incubate successivamente per 1h a temperatura

ambiente utilizzando i seguenti anticorpi: anti-Cx26 ( Zymed lab; diluizione 1/100), anti-GFP (Roche; diluizione1/100) e falloidina-fitch (Sigma; diluizione 1/100). La fluorescenza è stata valutata mediante microscopia confocale (Nikon, C1 on Eclipse TE200; EZC1 software).

### 5.9 Trasfezioni e Western blot

La linea cellulare Saos-2 è stata cresciuta in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con l'aggiunta di siero FBS al 10%. Le cellule sono state trasfettate utilizzando il Calcio Fosfato (Invitrogen) ed i Western blot sono stati realizzati come già descritto da *Candi et al., 2006*. Gli anticorpi utilizzati sono i seguenti: anti-GFP (Roche; diluizione1/100), anti-actina (H-235, Santa Cruz, diluizione 1:1000). Le proteine sono state rilevate mediante ECL.

### 5.10 Saggio per valutare i livelli di apoptosi

Le cellule trasfettate sono state raccolte insieme al terreno di crescita e quindi centrifugate per 10 minuti a 1200 rpm. Le cellule sono state poi risospese in PBS e fissate con etanolo 70% a 4°C per 2 ore. Successivamente incubate per 15 minuti a 37°C con RNasi 20 ug/ml e quindi è stata eseguita una seconda incubazione con Ioduro di propizio (50 ug/ml) per 20 minuti a 37°C. I campioni sono stati analizzati al citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA) ed i dati acquisiti con il programma CellQuest.

### 5.11 Saggio ANNESSINA V

Dopo la trasfezione le cellule adese sono state raccolte, recuperando anche il surnatante, e quindi centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso e quindi incubato a 37°C per 30 minuti in assenza di luce con una soluzione di PBS contenente 2ug/ml di propizio ioduro e 5 ul di Annessina V secondo la modalità descritta dalla casa produttrice (Bender). I campioni sono stati analizzati al citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA) ed i dati acquisiti con il programma CellQuest.

### 5.12 Saggio per valutare i livelli di necrosi mediante fluoresceina di-acetato (FDA)

Dopo la trasfezione le cellule adese sono state raccolte, recuperando anche il surnatante, e quindi centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso e quindi incubato con una soluzione di PBS contenente 4ug/ml di propizio ioduro e 100nM di Fluoresceina Diacetato (FDA) per 5 minuti a RT e poi trasferito in ghiaccio. I campioni sono stati analizzati al citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA) ed i dati acquisiti con il programma CellQuest.

### 5.13 Saggio per valutare i livelli di calcio mediante FLUO-3-AM

Le cellule sono state raccolte come descritto in precedenza. Sono state quindi risospese e lavate con un PBS privo di Ca2+ e Mg2+ e quindi incubate con 5 uM di Fluo-3AM (invitrogen) per 30 minuti a 37°C in agitazione in assenza di luce. I campioni sono stati lavati con un tampone HBSS in presenza di Ca2+ e Mg2+ e quindi analizzati al citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA) ed i dati acquisiti con il programma CellQuest.

### 5.14 CALCIUM IMAGING

La concentrazione intracellulare di calcio è stata misurata utilizzando il colorante Fura-2-AM (Molecola Probe). Le cellule sono state incubate in assenza di luce con 18 ul di Fura-2-AM in un mezzo contenete 1% FCS e 1% BSA (Bovine serum albumine) per 1 ora a 37°C. In seguito le cellule sono state lavate con un mezzo contenente 15% FCS ed incubate per 1 ora a 37°C. La fluorescenza è stata valutata mediante microscopia (Axioscope FS, C. Zeiss).

# BIBLIOGRAFIA

Abdel-Hafez K., Safer A.M., Selim M.M., Rehak A. Familial continual skin peeling. *Dermatologica*, 1983. **166**: 23-31.

Achyuthan K.E., Greenberg C.S., Identification of a guanosine triphosphate-bindind site on guinea pig liver transglutaminase. *J Biol Chem*, 1987. **262**: 1901-1906.

Aeschlimann D., Paulsson M., Transglutaminases: protein crosslinking enzymes in tissue and body fluids. *Thromb Haemostasis*, 1994.**71**:402-415

Aeschlimann D., Koeller M.K., Allen-Hoffmann B.L., Mosher D.F., Isolation of a cDNA encoding a novel member of the transglutaminases gene family from human keratinocytes. *J Biol Chem*, 1998.**273**: 3452-3460.

Ahvazi B., Kim H.C., Kee S.H., Nemes Z., Steinert P.M., Threedimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation. *EMBO J*, 2002.**21**: 2055- 2067.

Ahvazi B., Steinert P.M., A model for the reaction mechanism of the transglutaminase 3 enzyme. *Exp Mol Med*, 2003.**35**: 228-242.

Ahvazi B., Boeshans K.M., Idler W., Baxa U., Steinert P.M. Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase 3 enzyme. *J Biol Chem*, 2003. **278**: 23834-41.

Ahvazi B., Boeshans K.M., Idler W., Baxa U., Steinert P.M., Rastinejad F. Structural basis for the coordinated regulation of transglutaminase 3 by guanine nucleotides and calcium/magnesium. *J Biol Chem,* 2004a. **279:** 7180-92

Albers K., Fuchs E., The expression of mutant epidermal keratin c-DNAs transfected in simple epithelial and squamous cell carcinoma lines. *J Cell Biol*, 1987 **105**: 791-806.

Albers K., Fuchs E., The molecular biology of intermediate filament proteins. *Int Rev Ciytol*, 1992 **134**: 243-279.

Alli N, Güngör E. Keratitis, ichthyosis and deafness (KID) syndrome. *Int J Dermatol*, 1997. **36(1):** 37-40.

Alkemade J.A., Molhuizen H.O., Ponec M., Kempenaar J.A., Zeeuwen P.L., de Jongh G.J., SKALP/elafin is an inducible proteinase inhibitor in human epidermal keratinocytes. *J Cell Sci*, 1994.**107**: 2335-2342.

Attar P.S., Wertz P.W., Ncarthur M., Imakado S., Bickenback J.R. & Roop D.R. (1997) Inhibition of retinoid signalling in transgenic mice alters lipid processing and disrupts epidermal barrier function. *Mol. Endocrinol*. **11**, 792-800.

Baar, H. S., and Galindo, J. Pathology of the Sjogren-Larsson syndrome. *J Maine Med Assoc,* 1965. **56**: 223-226.

Bakirtzis G, Choudhry R, Aasen T, Shore L, Brown K, Bryson S, Forrow S, Tetley L, Finbow M, Greenhalgh D, Hodgins M. Targeted epidermal expression of mutant Connexin 26(D66H) mimics true Vohwinkel syndrome and provides a model for the pathogenesis of dominant connexin disorders. *Hum Mol Genet*, 2003. **12(14):** 1737-44.

Barbe, M. T., Monyer, H., and Bruzzone, R. (). Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda)*, 2006. **21:** 103-114.

Beltramello M, Piazza V, Bukauskas FF, Pozzan T, Mammano F. Impaired permeability to Ins(1,4,5)P3 in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**: 63-9.

Bernassola F., Federici M., Corazzari M., Terrinoni A., Hribal M.L., De Laurenzi V., Ranalli M., Massa O., Sesti G., McLean W.H.I., Citro G., Barbetti F., Melino G., Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient. *FASEB J*, 2002.**16**: 1371-1378.

Bevans CG, Kordel M, Rhee SK, Harris AL. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J Biol Chem*, 1998. **273:** 2808-16. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem*, 1996. **238(1)** :1-27. Review.

Beyer, E. C., Davis, L. M., Saffitz, J. E., and Veenstra, R. D. Cardiac intercellular communication: consequences of connexin distribution and diversity. *Braz J Med Biol Res,* 1995. **28:** 415-425.

Board P.G., Weeb G.C., McKee J., Ichinose A., Localization of the coagulation factor XIIIa subunit gene to chromosome band 6p24-25. *Cytogenet Cell Genet*, 1988.**48**: 25-27.

Bouwstra J.A., Honeywell-NguyenP.L., Gooris G.S. & Ponec M. (2003) Structure of the skin barrier and modulation by vesicular formulation. *Prog. Lip. Res*., **42**, 1-36.

Brody L., The modified pasma membrane of the transition and horny cells in normal human epidermis as revealed by electron microscopy. *Acta Derm Venereol*, 1969.**49**: 128-138.

Bruzzone R, Veronesi V, Gomès D, Bicego M, Duval N, Marlin S, Petit C, D'Andrea P, White TW. Loss-of-function and residual channel activity of connexin26 mutations associated with non-syndromic deafness.
*FEBS Lett*, 2003. **533**:79-88

Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem*, 1996. **238**:1-27.

Bukauskas, F. F., Kreuzberg, M. M., Rackauskas, M., Bukauskiene, A., Bennett, M. V., Verselis, V. K., and Willecke, K. Properties of mouse connexin 30.2 and human connexin 31.9 hemichannels: implications for atrioventricular conduction in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**: 9726-9731.

Caceres-Rios H, Tamayo-Sanchez L, Duran-Mckinster C, de la Luz Orozco M, Ruiz-Maldonado R. Keratitis, ichthyosis, and deafness (KID syndrome): review of the literature and proposal of a new terminology. *Pediatr Dermatol*, 1996. **13(2):** 105-13. Review.

Cadot B., Rufini A., Pietroni V., Ramadan S., Guerrieri P., Melino G., Candi E. Overexpressed transglutaminase 5 triggers cell death. *Amino Acid*, 2004. **26**(4): 405-8.

Camus L., Gley E., *C R Soc Biol (Paris)*, 1896. **48**: 787..

Candi E., Melino G., Lahm A., Ceci R., Rossi A., Kim I.G., Ciani B., Steinert P.M., Transglutaminase 1 mutations in lamellar ichthyosis. Loss of activity due to failure of activation by proteolytic processing. *J Biol Chem*, 1998. **273**: 13693-13702.

Candi E., Tarcsa E., Kartasova T., Idler W.W., Marekov L.N., Steinert P.M., Biochemical and transglutaminase substrate properties of the small proline rich 1 family of cornified cell envelope proteins: integration with loricrin. *J Biol Chem*, 1999. **274**: 7226-7237.

Candi E., Oddi S., Terrinoni A., Paradisi A., Ranalli M., Finazzi-Agrò A., Melino G., Transglutaminase 5 cross-links loricrin, involucrin and small proline-rich proteins *in vitro*. *J Biol Chem*, 2001.**276**: 35014-35023.

Candi E., Oddi S., Paradisi A., Terrinoni A., Ranalli M., Teofoli P., Citro G., Scarpato S., Puddu P., Melino G., Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis. *J Invest Dermatol*, 2002.**119**: 670-677.

Candi E., Paradisi A., Terrinoni A., Pietrosi V., Oddi S. Cadot B., Jogini V., Meiyappan M., Clardy J., Finazzi-Agrò A., Melino G. Transglutaminase 5 is regulated by guanine/adenite nucleotides. *Biochem J*, 2004. **381**: 313-9.

Carafoli E., Molinari M. Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun,* 1998. **247**: 193-203

Cariello L., Wilson J., Lorand L., Activation of transglutaminase during embryonic development. *Biochemistry*, 1984.**23**: 6843-6850.

Cassidy A., van Steensel M.A.,Steijlen P.M., van Geel M., van der Velden J., Morley S.M., Terrinoni A., Melino G., Candi E., McLean W.H. A homozygous missense mutation in TGM5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *Am J Hum Genet*, 2005. **77**: 907-17.

Chakravarty R., Rice R.H., Acylation of keratinocyte transglutaminase by palmitic and myristic acids in the membrane anchorage region. *J Biol Chem*, 1989.**264**: 625-629.

Chang S.K., Chung S.I. Cellular transglutaminase. The particulate-associated transglutaminase from hondrosarcoma and liver: partial purification and characterization. *J Biol Chem,* 1986. **261**(18): 8112-21.

Chang C, Yoshida A. Human fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH10): organization and tissue-dependent expression. *Genomics*, 1997. **40(1):** 80-5.

Chavanas S., Bodemer C., Rochat A., Hamel-Teillac D., Ali M., Irvine A. D., Bonafe J.L., Wilkinson J., Taieb A., Barrandon Y., Harper J.I., de Prost Y., Hovnaian A. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, causes netherton syndrome. *Nat Genet*, 2000, **25:** 141-142.

Chen B.S., Wang M.R., Xu X., Cai Y., Xu Z.X., Han Y.L., Wu M., Transglutaminase-3, an esophageal cancer-related gene. *Int J Cancer*, 2000. **88**: 862-865.

Cheng T., Hitomi K., van Vlijmen-Willems I.M., de Jongh G.J., Yamamoto K., Nishi K., Watts C., Reinheckel T., Schalkwijl J., Zeeuwen. Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and the Short Chain Form of Cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification. *J Biol Chem*, 2006**. 281**:15893-9.

Chung S.I., Comparative studies on tissue transglutaminase and factor XIII. *Ann N Y Acad Sci*, 1972. **69**: 303-307.

Common JE, Di WL, Davies D, Galvin H, Leigh IM, O'Toole EA, Kelsell DP. Cellular mechanisms of mutant connexins in skin disease and hearing loss. *Cell Commun Adhes*, 2003. **10:** 347-51.

Citron B.A., SantaCruz K.S., Davies P., Festoff B.W., Intron-exon swapping of transglutaminase mRNA and neuronal Tau aggregation in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 2001.**276**: 3295-3301.

Clarke D.D., Mycek M.J., Neidle A., Waelsch H., The incorporation of amines into proteins. *Arch Biochem Biophys*, 1957.**79**: 338-354.

Collins XH, Harmon SD, Kaduce TL, Berst KB, Fang X, Moore SA, Raju TV, Falck JR, Weintraub NL, Duester G, Plapp BV, Spector AA. Omega-

oxidation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in cerebral microvascular smooth muscle and endothelium by alcohol dehydrogenase 4. *J Biol Chem*, 2005. **280(39):** 33157-64.

Cram DL, Resneck JS, Jackson WB. A congenital ichthyosiform syndrome with deafness and keratitis. *Arch Dermatol*, 1979. **115(4):** 467-71

Cruciani, V., and Mikalsen, S. O. Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases. *Biol Cell*, 2002. **94**: 433-443.

Cserhalmi-Friedman PB, Milstone LM, Christiano AM. Diagnosis of autosomal recessive lamellar ichthyosis with mutations in the TGM1 gene. *Br J Dermatol*, 2001. **144(4):** 726-30.

D'Andrea P, Veronesi V, Bicego M, Melchionda S, Zelante L, Di Iorio E, Bruzzone R, Gasparini P. Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin26 alleles. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **296(3):** 685-91.

Dadabay C.Y., Pike L.J.,. Rapid increases in the transglutaminases activity of A431 cells following treatment with epidermal growth factor. *Biochemistry*, 1987. **26**: 6587-6591.

De Laurenzi V, Rogers GR, Hamrock DJ, Marekov LN, Steinert PM, Compton JG, Markova N, Rizzo WB. Sjögren-Larsson syndrome is caused by mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Nat Genet*, 1996. **12(1):** 52-7.

De Laurenzi, V., Rogers, G. R., Tarcsa, E., Carney, G., Marekov, L., Bale, S. J., Compton, J. G., Markova, N., Steinert, P. M., and Rizzo, W. B. Sjogren-Larsson syndrome is caused by a common mutation in northern European and Swedish patients. *J Invest Dermatol*, 1997. **109**: 79-83.

De Laurenzi V., Melino G., Gene disruption of tissue transglutaminase. *Mol Cell Biol*, 2001.**148**: 148-155.

Demozay D, Rocchi S, Mas JC, Grillo S, Pirola L, Chavey C, Van Obberghen E. Fatty aldehyde dehydrogenase: potential role in oxidative stress protection and regulation of its gene expression by insulin. *J Biol Chem*, 2004. **279(8):** 6261-70.

Di, W. L., Rugg, E. L., Leigh, I. M., and Kelsell, D. P. Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. *J Invest Dermatol,* 2001. **117**: 958-964.

Dickinson D.P., Cysteine peptidases of mammals: Their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Cri.Rev Oral Biol Med*, 2002. **13**:238-275

Di Venere A., Rossi A., De Matteis F., Rosato N., Finazzi-Agrò A., Mei G., Opposite effects of Ca2+ and GTP binding on tissue transglutaminase tertiary structure. *J Biol Chem*, 2000. **275**: 3915-3921.

Djian, P., Easley K. & Green H. (2000) Targeted ablation of the murine involucrin gene. *J. Cell Biol*, 2000. **151**: 381-388.

Dlugosz A.A., Yuspa S.H., Protein kinase C regulates keratinocyte transglutaminase (TGK) gene expression in cultured primary mouse epidarmal keratinocytes induced to terminally differentiate by calcium. *J Invest Dermatol*, 1994. **102**: 409-414.

Dubbink H.J., Verkaik N.S., Faber P.W., Trapman J., Schroder F.H., Romijn J.C., Tissue specific and androgen-regulated expression of human prostate-specific transglutaminase. *Biochem J*, 1996. **315**: 901-908.

Eckert R.L., Green H., Structure and evolution of the human involucrin gene, *Cell*, 1986. **46**: 583-589.

Eckert R.L., Crish J.F., Robinson N.A., The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev*, 1997. **77**: 397-424.

Eckert R.L., Sturniolo M.T., Broome A.M., Ruse M., Rorke E.A. Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol*, 2005. **124:** 481-492.

Egberts F., Heinrich M., Jensen J.M., Winoto-Morbach S., Pfeiffer S., Wickel M., Schunck M., Steude J., Saftig P., Proksch E., Schutze S. Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J Cell Sci*, 2004. **117**: 2295-2307.

Elias P.M. & Friend D.S. (1975) The permeability barrier in mammalian epidermis. *J Cell Biol* 1975. **65**, 180-191.

Esposito C., Pucci P., Amoresano A., Marino G., Cozzolino A., Porta R., Transglutaminase from rat coagulating gland secretion. Posttranslational modifications and activation by phosphatidic acids. *J Biol Chem*, 1996.**271**: 27416-27423.

Esposito G, Auricchio L, Rescigno G, Paparo F, Rinaldi M, Salvatore F. Transglutaminase 1 gene mutations in Italian patients with autosomal recessive lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol*, 2001. **116(5):** 809-12.

Evans, W. H., De Vuyst, E., and Leybaert, L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J*, 2006. **397**: 1-14.

Farbman A.I., Plasma membrane changes during keratinization. *Anat Rec*, 1966. **156**: 269-282.

Floyd E.E., Jetten A.M., Regulation of type I (epidermal) transglutaminase mRNA levels during squamous differentiation: down regulation by retinoid. *Mol Cell Biol*, 1989.**9**: 4846-4851.

Folk J.E. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. VI. Order of substrate addition. *J Biol Chem*, 1969.**244**: 3707-3713.

Folk J.E., Finlayson J.S., The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv Protein Chem*, 1977. **31**: 1-133.

Forslind B.A. (1994) A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Ven. Venereol*., **74**, 1-6.

Franke W.W., Schmid E., Mittnacht S., Grund C., Jorcano J.L., Integration of different keratins into the same filament system after microinjection of mRNA for epidermal keratins into kidney epithelial cells. *Cell*, **36**:813-825

Franke W.W., Schmid E., Winter S., Osborn M., Weber K., Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp Cell Res*, 1979.**123**: 25-46.

Freinkel R.K. & Traczyk T.N. (1985) Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. *J. Invest. Dermatol*., **85**, 295-298.

Fuchs E., Epidermal differentiation. *Curr Opinion Cell Biol*, 1990.**2**: 1028- 1035.

Fuchs E., Weber K., Intermediate filaments: Structure, Dynamics, Function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 1994.**63**: 345-382.

Gan S.Q., Idler W.W., McBride O.W., Markova N., Steinert P.M., The structure organization and polymorphism of the human profilaggrin gene. *Biochemistry*, 1990.**29**: 9432-9440.

Gentile V., Grant F.J., Porta R., Baldini A., Localization of the human prostate transglutaminase (type IV) gene (TGM4) to chromosome 3p21.33- p22 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 1995. **27**: 219-220.

Goldberg, G. S., Moreno, A. P., and Lampe, P. D. Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J Biol Chem,* 2002. **277**: 36725-36730.

Goldberg, G. S., Valiunas, V., and Brink, P. R. Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1662**: 96-101.

Goldman A.E., Steinert P.M., Cellular and Molecular Biology of Intermediate Filaments. *Plenum Press*, 1990. New York, N.Y.

Goldsmith L.A, Martin C.M., Human epidermal transamidase. *J Invest Dermatol*, 1975. **64**: 316-321.

Goldstein A.M. &Abramovitz W. (2003) Ceramides and the stratum corneum: structure, function and new mwthods to promote repair. *Int. J. Dermatol*., **42**, 256-259.

Gong, X. Q., Shao, Q., Lounsbury, C. S., Bai, D., and Laird, D. W. Functional characterization of a GJA1 frameshift mutation causing oculodentodigital dysplasia and palmoplantar keratoderma. *J Biol Chem,* 2006. **281**: 31801-31811.

Goodenough, D. A. Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Characterization of the principal protein, connexin. *J Cell Biol*, 1974. **61**: 557-563.

Grant F.J., Taylor D.A., Sheppard P.O., Mathewes S.L., Lint W., Vanaja E., Bishop P.B., O'Hara P.J., Molecular cloning and characterization of a novel transglutaminase cDNA from human prostate cDNA library. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **203**: 1117-1123.

Green K.J., Jones J.C., Desmosomes and haemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J*, 1996.**10**: 871-881.

Grenard P., Bates M.K., Aeschlimann D., Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene clusteron human chromosome 15q15. *J Biol Chem*, 2001. **276**: 33066-33078.

Harris, A. L. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys*, 2001. **34:** 325-472.

Hashimoto K., Cellular envelope of keratinized cells of human epidermis. *Arch Klin Exp Derm*, 1969. **235**: 374-385.

Hashimoto K., Hamzavi I., Tanaka K., Shwayder T. Acral peeling skin syndrome. *J Am Acad Dermatol,* 2000. **43**: 1112-1119.

Hazell M., Marks R., Clinical, histologic and cell kinetic discriminants between lamellar ichthyosis and non-bullosus congenital lamellar ichthyosisform erythroderma. *Arch Dermatol*, 1985.**121**: 489-493.

Hempel J, Lindahl R, Perozich J, Wang B, Kuo I, Nicholas H. Beyond the catalytic core of ALDH: a web of important residues begins to emerge. *Chem Biol Interact*, 2001a. **130-132**: 39-46.

Hempel J, Kuo I, Perozich J, Wang BC, Lindahl R, Nicholas H. Aldehyde dehydrogenase. Maintaining critical active site geometry at motif 8 in the class 3 enzyme. *Eur J Biochem*, 2001b. **268**: 722-6.

Hettasch J.M., Peoples K.A., Greenberg C.S., Analysis of factor XIII substrate specificity using recombinant human factor XIII and tissue transglutaminase chimeras. *J Biol Chem*, 1997. **272**: 25149-25156.

Hitomi K., Kanehiro S., Ikura K., Maki M., Characterization of recombinant mouse epidermal-type transglutaminase (TGase 3): regulation of its activity by proteolysis and guanine nucleotides. *J Biochem (Tokyo)*, 1999.**125**: 1048-1054.

Hitomi K., Ikura K., Maki M., GTP, an inhibitor of transglutaminases, is hydrolyzed by tissue-type transglutaminase (TGase 2) but not by epidermal-type transglutaminase (TGase 3). *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000.**64**: 657-659.

Hitomi K., Horio Y., Ikura K., Maki K., Analysis of epidermal-type transglutaminase expression in mouse tissue and cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001. **33**: 491-498.

Hitomi K., Presland R.B., Nakayama T., Fleckman P., Dale B.A., Maki M., Analysis of epidermal-type transglutaminase (transglutaminase 3) in human stratified epithelia and cultured keratinocytes using monoclonal antibodies. *J Dermatol Sci*, 2003. **32**: 95-103.

Hofer, P. A., and Jagell, S. (1982). Sjogren-Larsson syndrome: a dermato-histopathological study. J Cutan Pathol *9*, 360-376.

Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E. Manipulating the mouse embryo. *Cold Spring harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, 1994.

Hohl D., The cornified cell envelope. *Dermatologica*, **1**1990.**80**: 201-211.

Hohl D., Meherel T., Lichti U., Turner M.L., Roop D.R., Steinert P.M., Characterization of human loricrin. *J Biol Chem*, 1991.**266**: 6626-6636.

Hohl D., Huber M., Frenk E., Analysis of the Conrnified Cell Envelope in Lamellar Ichthyosis. *Arch Dermatol*, 1993. **129**: 618-624.

Huber M., Rettler I., Bernasconi K., Wyss M., Hohl D., Lamellar Ichthyosis Is Genetically Heterogeneous - Cases with Normal Keratinocyte Transglutaminase. *J Invest Dermatol*, 1995b.**105**: 653-654.

Ichihara, K., Kusunose, E., Noda, Y., and Kusunose, M. Some properties of the fatty alcohol oxidation system and reconstitution of microsomal oxidation activity in intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta*, 1986a. **878**: 412-418.

Ichihara, K., Noda, Y., Tanaka, C., and Kusunose, M. Purification of aldehyde dehydrogenase reconstitutively active in fatty alcohol oxidation from rabbit intestinal microsomes. *Biochim Biophys Acta*, 1986b. **878**: 419-425.

Iismaa S.E., Wu M.J., Nanda N., Church W.B., Graham R.M., GTP binding and signaling by Gh/transglutaminase II involves distinct residues in a unique GTP-binding pocket. *J Biol Chem,* 2000. **275**: 18259-18265.

Ichinose A., Davie E.W., Characterization of the gene for a subunit of human factor XIII, a blood coagulation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988. **85**: 5829-5833.

Ishida-Yamamoto A., Iizuka H., Differences in involucrin immunolabeling within cornified cell envelopes in normal and psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*, 1995.**104**: 391-395.

Ito, M., Oguro, K., and Sato, Y. Ultrastructural study of the skin in Sjogren-Larsson syndrome. Arch Dermatol Res *283*, 141-148.

Jarnik M., Simon M.N., Steven A.C., Cornified cell envelope assembly: model based on eletrocton miscriscopic determinations of thickness and projected density. *J Cell Sci*, 1998.**111**: 1051-1060.

Jobard F, Lefèvre C, Karaduman A, Blanchet-Bardon C, Emre S, Weissenbach J, Ozgüc M, Lathrop M, Prud'homme JF, Fischer J. Lipoxygenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1. *Hum Mol Genet*, 2002. **11(1):** 107-13.

Jones J.C.R., Goldman A.E., Steinert P.M., Yuspa S.H., Goldman R.D., The supramolecular organization of intermediate filaments networks in cultured epidermal cells. *Cell Motility*, 1982. **2**: 197-214.

Jones P.H., Green H., Intermediate filament-plasma membrane interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 1991. **3**: 127-132.

Jones P.H., Watt M.F., Separation of human epidermal stem cells from transient amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 1993. **73**: 713-724.

Jordan, K., Chodock, R., Hand, A. R., and Laird, D. W. (2001). The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J Cell Sci*, 1991. **114**: 763-773.

Judge M.R., McLean W.H.I., Munro C.S. Disorders of keratinization. In: Burns T., Breathnach S. Cox C., Griffiths C. (eds) Rook's Textbook of dermatology, 2004. Vol 2. Blackwell Scientific Publishing, Oxford, pp 34.54-34.5.

Kanno Y, Loewenstain WR. Low-Resistance coupling between gland cells. Some observations on intercellular contact membranes and intercellular spaces. *Nature*, 1964. **201:** 194-5.

Kalinin A.E., Kajava A.V., Steinert P.M., Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified envelope. *BioEssay*, 2002. **24**: 789-800.

Kaufman R.J.. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*, 2002. **110**:1389-1398

Kelly SC, Ratajczak P, Keller M, Purcell SM, Griffin T, Richard G. A novel GJA 1 mutation in oculo-dento-digital dysplasia with curly hair and hyperkeratosis. *Eur J Dermatol*, 2006. **16:** 241-5.

Kelsell, D. P., Wilgoss, A. L., Richard, G., Stevens, H. P., Munro, C. S., and Leigh, I. M. Connexin mutations associated with palmoplantar keratoderma and profound deafness in a single family. *Eur J Hum Genet*, 2000. **8**: 141-144.

Kelson, T. L., Secor McVoy, J. R., and Rizzo, W. B. Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification, and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1335**: 99-110.

King, T. J., and Lampe, P. D. (). Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues. *Biochim Biophys Acta,* 2005. **1719**: 24-35.

Kim I.G., McBride O.W., Wang M., Kim S.Y., Idler W.W., Steinert P.M., Structure and organization of the human transglutaminase 1 gene. *J Biol Chem*, 1992. **267**: 7710-7717.

Kim I.G., Gormanfi J.J., Park S.C., Chung S.I., Steinert P.M.,. The deduced sequence of the novel protranglutaminase E (TGase3) of human and mouse. *J Biol Chem*, 1993 **268**: 12682-12690.

Kim H.C., Lewis J., Gorman J.J., Park S.C., Girand J.E., Folk J.E, Chung S.I., Protransglutaminase E from human guinea pig skin. Isolation and partial characterization. *J Biol Chem*, 1990.**265**: 21971-21978.

Kim H.C., Idler W.W., Kim I.G., Han J.H., Chung S.H., Steinert P.M., The complete aminoacid sequence of the human transglutaminase K enzyme deduced from nucleic acid sequences of cDNA clones. *J Biol Chem*, 1991.**266**: 536-539.

Kim H.C., Nemes Z., Idler W.W., Hyde C.C., Steinert P.M., Ahvazi B., Crystallization and preliminary X-ray analysis of human transglutaminase 3 from zymogen to active form. *J Struct Biol*, 2001.**135**: 73-77.

Kim S.Y., Lee S.C., Lee J.H., Yang J.M., Chung S.L., Steinert P.M., Structure and organization of the human transglutaminase 3 gene: evolutionary relationship to the transglutaminase family. *J Invest Dermatol*, 1994.**103**: 137-142.

Kim S.Y., Kim I.G., Chung S.I., Steinert P.M., The structure of the transglutaminase 1 enzyme. Deletion cloning reveals domains that regulate its specific activity and substrate specificity. *J Biol Chem*, 1994a. **269**:27979-27986.

Kim S.Y., Chung S.I., Steinert P.M., Highly active soluble processed forms of the transglutaminase 1 enzyme in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*, 1995a.**270**: 18026-18035.

Kim S.Y., Chung S.I., Yoneda K., Steinert P.M., Expression of transglutaminasi 1 in human epidermis. *J Invest Dermatol*, 1995.**104**: 211- 217.

Kim S.Y., Grant P., Lee J.H., Pant H.C., Steinert P.M., Differential expression of multiple transglutaminases in human brain. Increased expression and cross-linking by transglutaminases 1 and 2 in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 1999.**274**: 30715-30721.

Koné-Paut I, Hesse S, Palix C, Rey R, Rémédiani K, Garnier JM, Berbis P. Keratitis, ichthyosis, and deafness (KID) syndrome in half sibs. *Pediatr Dermatol*, 1998. **15(3):** 219-21. Review.

Korner G., Schneider D.E., Purdon M.A., Bjornsson T.D., Bovine aortic endothelial cell transglutaminase. Enzyme characterization and regulation of activity. *Biochem J*, 1989. **262**: 633-641.

Korsgren C., Cohen C.M., Purification and properties of human erythrocyte band 4.2. Association with the cytoplasmatic domain of band 3. *J Biol Chem*, 1986.**261**: 5536-5543.

Korsgren C., Cohen C.M., Association of human erytrocyte band 4.2. *J Biol Chem*. 1988.

Korsgren C., Lawler J., Lambert S., Speicher D., Cohen C.M., Complete aminoacid sequence and homologies of human erythrocyte membrane protein band 4.2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990.**87**: 613-617.

Kowalczyk A.P., Stappenbeck T.S., Parry D.A., Palka H.L., Virata M.L., Bornslaeger E.A., Nilles L.A., Green K.J., Structure and function of desmosomal transmembrane core and plaque molecules. *Biophys Chem*, 1994. **50**: 97-112.

Krutovskikh, V., and Yamasaki, H. Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutat Res*, 2000. **462**: 197-207.

Kuramoto N., Takizawa T., Takizawa T., Matsuki M., Morioka H., Robinson J.M., Yamanishi K., Development of ichthyosiform skin compensates for defective permeability barrier function in mice lacking transglutaminase 1. *J Clin Invest*, 2002. **109**: 243-250.

Kurban A.K., Azar H.A. Familial continual skin peeling. *Br J Dermato*l, 1969. **81**: 191-195

Lane E.B., McLean W.H.I. Keratins and skin disorders. *J Pathol*, 2004. **204**: 355-366.

Langer K, Konrad K, Wolff K. Keratitis, ichthyosis and deafness (KID)-syndrome: report of three cases and a review of the literature. *Br J Dermatol*, 1990. **122(5):** 689-97. Review.

Lai T.S., Slaughter T.F., Koropchak C.M., Haroon Z.A., Greenberg C.S., C-terminal deletion of human tissue transglutaminase enhances magnesium-dependent GTP/ATPase activity. *J Biol Chem*, 1996. **271**: 31191-31195.

Laing, J. G., and Beyer, E. C. The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem*, 1995. **270**: 26399-26403.

Laird, D. W. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J*, 2006. **394**: 527-543.

Lampe, P. D., and Lau, A. F. (). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36:** 1171-1186.

Lai T.S., Slaughter T.F., Peoples K.A., Hettasch J.M., Greenberg C.S., Regulation of human tissue transglutaminase function by magnesiumnucleotide complexes. *J Biol Chem*, 1998.**273**: 1776-1781.

Lavrijsen A.P.M., Bouwstra J.A., Gooris G.S. et al., Reduced skin barrier function parallels abnormal stratum corneum lipid organization in patients with lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol*, 1995.**105**: 619-624.

Lawrence TS, Beers WH, Gilula NB. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature*, 1978. **272**: 501-6.

Lee K.N., Birckbichler P.J., Patterson M.K.J., GTP hydrolysis by guinea pig liver transglutaminase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989.**162**: 1370-1375.

Lichti U., Ben T., Yuspa S.H., Retinoic acid-induced transglutaminase in mouse epidermal cells is distinct from epidermal transglutaminase. *J Biol Chem*, 1985. **260**: 1422-1426.

Liew F.M., Yamanishi K., Regulation of transglutaminase 1 gene expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, dexamethasone, and retinoic acid in cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res*, 1992.**202**: 310-315.

Liu S., Cerione R.A., Clardy J., Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002. **99**: 2743-2747.

Mack J.W., Steven A.C., Steinert P.M., Mechanism of interaction of filaggrin with intermediate filaments: the ionic zipper hypotesis. *J Mol Biol*, 1993.**232**: 50-66.

Macari F, Landau M, Cousin P, Mevorah B, Brenner S, Panizzon R, Schorderet DF, Hohl D, Huber M. Mutation in the gene for connexin 30.3 in a family with erythrokeratodermia variabilis. *Am J Hum Genet*, 2000. **67(5):**1296-301.

Madison, K.C. (2003) Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J. Invest. Dermatol*., **121**, 231-241.

Maestrini, E., Korge, B. P., Ocana-Sierra, J., Calzolari, E., Cambiaghi, S., Scudder, P. M., Hovnanian, A., Monaco, A. P., and Munro, C. S. A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum Mol Genet,* 1999. **8**: 1237-1243.

Mano, T., Ono, J., Kaminaga, T., Imai, K., Sakurai, K., Harada, K., Nagai, T., Rizzo, W. B., and Okada, S. Proton MR spectroscopy of Sjogren-Larsson's syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol*, 1999. **20**: 1671-1673.

Marekov L.N., Steinert P.M., Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*, 1998. **273**: 17763-17770.

Mariniello L., Esposito C., Caputo I., Sorrentino A., Porta R., Nterminus end of rat prostate transglutaminase is responsible for its catalytic activity and GTP binding. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**: 1098-1108.

Markova N., Chipew C.C., Marekov L., Idler W.W., Steinert P.M., Profilaggrin is major epidermal calcium binding protein. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**: 613-625.

Masaki R, Yamamoto A, Tashiro Y. Microsomal aldehyde dehydrogenase is localized to the endoplasmic reticulum via its carboxyl-terminal 35 amino acids. *J Cell Biol*, 1994. **126(6):** 1407-20.

Matolsy A.G., Matolsy M.N., The membrane protein of horny cells. *J Invest Dermatol*, 1966. **46**: 127-129.

Matolsy A.G., Matolsy M.N., The chemical nature of keratinocyte granules of the epidermis. *J Cell Biol*, 1970.**47**: 593-603.

Matsuki M., Yamashita F., Yamamoto A.I., Yamada K., Kinoshita C., Fushiki S., Ueda E., Morishima Y., Tabata K., Yasuno H., Hashida M.,

Iizuka H., Ikawa M., Okabe M., Kondoh G., Kinoshita T., Takeda J., Yamanishi K., Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. **95**: 1044-1049.
McGrae JD Jr. Keratitis, ichthyosis, and deafness (KID) syndrome with adult onset of keratitis component. *Int J Dermatol*, 1990. **29(2):** 145-6.
McLennan, J. E., Gilles, F. H., and Robb, R. M. Neuropathological correlation in Sjogren-Larsson syndrome. Oligophrenia, ichthyosis and spasticity. *Brain,* 1974. **97**: 693-708.
Meşe G, Richard G, White TW. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 2007. **127(11):** 2516-24.

Montgomery, J. R., White, T. W., Martin, B. L., Turner, M. L., and Holland, S. M. A novel connexin 26 gene mutation associated with features of the keratitis-ichthyosis-deafness syndrome and the follicular occlusion triad. *J Am Acad Dermatol,* 2004. **51**: 377-382.
Musil, L. S., and Goodenough, D. A. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell*, 1993. **74**: 1065-1077.
Musil, L. S., Le, A. C., VanSlyke, J. K., and Roberts, L. M. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem*, 2000. **275**: 25207-25215
Mehrel T., Hohl D., Rothnagel J.A., Longley M.A., Bundman D., Cheng C., Lichti U., Bisher M.E., Steven A.C., Steinert P.M., Yupsa S.H., Roop D.R., Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell*, 1990.**61**: 1103-1112.
Melino G., Annicchiarico-Petruzzelli M., Piredda L., Candi E., Gentile V., Davis P.J., Piacentini M., Tissue Transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**: 6584-6596.
Menon, J.K., Feingold K.R. & Elias P.M. (1992) Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J. Invest. Dermatol*., **98**, 279-289
Mevorah B., Frenk E., Saurat J.H., Siegenthaler G. Peeling skin syndrome: a clinical, ultrastructural and biochemical study. *Br J Deramatol*, 1987. **116**: 117-125.
Micanovic R., Procyk R., Lin W., Matsueda G.R., Role of histidine 373 in the catalytic activity of coagulation factor XIII. *J Biol Chem*, 1994. **269**: 9190-9194.

Michel, S., Schmidt R., Shoroot, B & Reichert, U. (1988) Morphological and biochemical characterization of the cornified envolope from human epidermal keratinocytes of different origin. *J. Invest. Dermatol.*, **91**, 11-15

Mischke D., Korge B.P., Marenholz I., Volz A., Ziegler A., Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol*, 1996. **106**: 989-992.

Molhuizen H.O., Alkemade H.A., Zeeuwen P.L., de Jongh G.J., Wieringa B., Schalkwijk J., SKALP/elafin: an elastase inhibitor from cultured human keratinocytes. Purification, cDNA sequence, and evidence for transglutaminase crosslinking. *J Biol Chem*, 1993.**268**: 12028- 12032.

Moll R., Franke W.W., Schiller D.L., Geiger B., Krepler R., The catalog of human cytokeratins: Pattern of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 1982. **31**: 11-24

Nanda N., Iismaa S.E., Owens W.A., Husain A., Mackay F., Graham R.M., Targeted inactivation of Gh/tissue transglutaminase II. *J Biol Chem*, 2001. **276**: 20673-20678.

Nemes Z., Steinert P.M., Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med*, 1999. **31**: 5-19.

Nemes Z., Marekov L.N., Steinert P.M., Involucrin cross-linking by transglutaminase 1. *J Biol Chem*, 1999a.**274**: 11013-11021.

Nemes Z., Marekov L.N., Fesus L., Steinert P.M., A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain w-hydroxyceramides to involucrin by ester bound formation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 1999b.**96** :8402-8407.

Nicholson, B. J., Weber, P. A., Cao, F., Chang, H., Lampe, P., and Goldberg, G. The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz J Med Biol Res*, 2000. **33**: 369-378.

Nigam, S., and Zafiriou, M. P. Hepoxilin A3 synthase. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**: 161-168.

Nonomura K., Yamanishi K., Yasuno H., Nara K., Hirose S., Upregulation of elafin/SKALP gene expression in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*, 1994. **103**: 88-91.

Ogawa H., Goldsmith L.A., Human epidermal transglutaminase. Preparation and properties. *J Biol Chem*, 1976. **251**: 7281-7288.

O'Keele E.J., Hamilton E.H., Lee S.C. & Steinert P.M. (1993) Trichoyalin: a structural protein of hair, tongue, nail and epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 658-618

Paonessa G., Metafora S., Tajana G., Abrescia P., De Santis A., Gentile V., Porta R., Transglutaminase-mediated modifications of the rat sperm surface in vitro. *Science*, 1984. **226**: 852-855.

Panchin YV. Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *J Exp Biol*, 2005. **(Pt 8):**1415-9.

Park G.T., Lim S.E., Jang S.I., Morasso M.I., Suprabasin, a novel epidermal differentiation marker and potential cornified envelope precursors. *J Biol Chem*, 2002. **277**: 45195-45202.

Park S.C., Kim S.Y., Kim H.C., Thacher S., Chung S.I., Differential expression of transglutaminases in human foreskin and cultured keratinocytes. *J Cell Biol*, 1988. **107**: 139a.

Parmentier L., Blanchette-Bardon C., Nguyen S., Prud'homme J.F., Dubertret L., Weissenbach J., Autosomal recessive lamellar ichthyosis: identification of a new mutation in transglutaminase 1 and evidence for genetic heterogeneity. *Human Molecolar Genetics*, 1995. **4**: 1391-1395.

Petit E, Huber M, Rochat A, Bodemer C, Teillac-Hamel D, Müh JP, Revuz J, Barrandon Y, Lathrop M, de Prost Y, Hohl D, Hovnanian A. Three novel point mutations in the keratinocyte transglutaminase (TGK) gene in lamellar ichthyosis: significance for mutant transcript level, TGK immunodetection and activity. *Eur J Hum Genet*, 1997. **5(4):** 218-28.

Phillips M.A., Steware B.E., Qin Q., Chakravarty R., Floyd E.E., Jetten A.M., Rice R.H., Primary structure of keratinocyte transglutaminase. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1990.**87**: 9333-9337.

Piacentini M., Martinet N., Beninati S., Folk J.E., Free and proteinconjugated polyamines in mouse epidermal cells. *J Biol Chem*, 1988.**263**: 3790-3794.

Pisano J.J., Finlayson J.S., Peyton M.P., Cross-link in fibrin polymerized by factor 13: ε-(γ-glutamyl)lysine. *Science*, 1968.**160**: 892-893.

Plewig G., Marples R.R., Regional differences of cell sizes in the human stratum corneum. Part 1. *J Invest Dermatol*, 1970. **54**: 13-18.

Polakowska R.R., Goldsmith L.A., The cell envelope and transglutaminases. In *Biochemistry, Physiology and Molecular Biology of the Skin* (L.A. Goldsmith, ed.), 1991. pp. 168-201, Oxford University Press, New York, Oxford.

Polakowska R.R., Herting E., Goldsmith L.A., Isolation of cDNA for human epidermal Type I transglutaminase. *J Invest Dermatol*, 1991. **96**: 285-288.

Polgar L., Mercaptide-imidazolium ion-pair: the reactive nucleophile in papain catalysis. *FEBS Lett*, 1974. **47**: 15-18.

Polgar L., Deuterium isotope effects on papain acylation. Evidence for lack of general base catalysis and for enzyme-leaving-group interaction. *Eur J Biochem*, 1979. **98**: 369-374.

Porta R., Esposito C., De Santis A., Fusco A., Iannone M., Metafora S., Sperm maturation in human semen: role of transglutaminasemediated reactions. *Biol Reprod*, 1986. **35**: 965-970.

Porta R., Esposito C., Gentile V., Mariniello L., Peluso G., Metafora S., Transglutaminase-catalyzed modifications of SV-IV, a major protein secreted from the rat seminal vesicle epithelium. *Int J Pept Protein Res*, 1990. **35**: 117-122.

Porta R., Esposito C., Metafora S., Malorni A., Pucci P., Siciliano R., Marino G., Mass spectrometric identification of the amino donor and acceptor sites in a transglutaminase protein substrate secreted from rat seminal vesicles. *Biochemistry*, 1991. **30**: 3114-3120.

Potter D:A., Tirnauer J.S., Janssen R., Croal D.E., Hughes C.N., Fiacco K.A., Mier J.W., Maki M., Herman I.M. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol*, 1998**. 141**: 647-662.

Qian R.Q., Glanville R.W., Alignment of fibrillin molecules in elastic microfibrils is defined by transglutaminase-derived cross-links. *Biochemistry*, 1997. **36**: 15841-15847.

Qin, H., Shao, Q., Igdoura, S. A., Alaoui-Jamali, M. A., and Laird, D. W. Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells. *J Biol Chem*, 2003. **278**: 30005-30014.

Reichert U., Michel S., Schmidt R., The cornified envelope: a key structure of terminally differentiating keratinocytes. In *Molecular biology of the Skin. The Keratinocyte*. (M. Darmon and M. Bloomenberg, eds), 1993.pp. 107-150, Academic Press, San Diego.

Resing K.A., Dale B.A., & Walsh, K.A. (1985)Multiple copies of phosphorylated filaggrin in epidermal profilaggrin demonstrated by analysis of tryptic peptides. *Biochemistry*, **24**, 4167-4175.

Resing K.A., Dale B.A., & Walsh K.A. (1993) Characterization of protease processing sites during conversion of rat profilaggrin to filaggrin. *Biochemistry*, **32**, 10036-10045

Rice R.H., & Green H. (1977) The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked proteins. *Cell*. **11**, 417-422.

Richard, G. Connexin disorders of the skin. *Clin Dermatol*, 2005. **23**: 23-32.

Richard, G., Brown, N., Ishida-Yamamoto, A., and Krol, A. Expanding the phenotypic spectrum of Cx26 disorders: Bart-Pumphrey syndrome is caused by a novel missense mutation in GJB2. *J Invest Dermatol*, 2004. **123**: 856-863.

Richard, G., Rouan, F., Willoughby, C. E., Brown, N., Chung, P., Ryynanen, M., Jabs, E. W., Bale, S. J., DiGiovanna, J. J., Uitto, J., and Russell, L. Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. Am *J Hum Genet*, 2002. **70**:1341-1348.

Richard, G., Smith, L. E., Bailey, R. A., Itin, P., Hohl, D., Epstein, E. H., Jr., DiGiovanna, J. J., Compton, J. G., and Bale, S. J. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratodermia variabilis. *Nat Genet*, 1998a. **20**: 366-369.

Richard, G., White, T. W., Smith, L. E., Bailey, R. A., Compton, J. G., Paul, D. L., and Bale, S. J. Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum Genet*, 1998b. **103**: 393-399.

Rizzo, W. B., Carney, G., and De Laurenzi, V. A common deletion mutation in European patients with Sjogren-Larsson syndrome. *Biochem Mol Med*, 1997. **62**: 178-181.

Rizzo, W. B., Carney, G., and Lin, Z. The molecular basis of Sjogren-Larsson syndrome: mutation analysis of the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Am J Hum Genet*, 1999. **65**: 1547-1560.

Rizzo, W. B., and Craft, D. A. Sjogren-Larsson syndrome. Deficient activity of the fatty aldehyde dehydrogenase component of fatty alcohol:NAD+ oxidoreductase in cultured fibroblasts. *J Clin Invest*, 1991. **88**: 1643-1648.

Rizzo, W. B., and Craft, D. A. Sjogren-Larsson syndrome: accumulation of free fatty alcohols in cultured fibroblasts and plasma. *J Lipid Res* 2000. **41**: 1077-1081.

Rizzo, W. B., Craft, D. A., Kelson, T. L., Bonnefont, J. P., Saudubray, J. M., Schulman, J. D., Black, S. H., Tabsh, K., Dirocco, M., and Gardner, R. J. Prenatal diagnosis of Sjogren-Larsson syndrome using enzymatic methods. *Prenat Diagn*, 1994. **14**: 577-581.

Rizzo, W. B., Dammann, A. L., and Craft, D. A. Sjogren-Larsson syndrome. Impaired fatty alcohol oxidation in cultured fibroblasts due to deficient fatty alcohol:nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase activity. *J Clin Invest*, 1988. **81**: 738-744.

Rizzo, W. B., Heinz, E., Simon, M., and Craft, D. A. Microsomal fatty aldehyde dehydrogenase catalyzes the oxidation of aliphatic aldehyde derived from ether glycerolipid catabolism: implications for Sjogren-Larsson syndrome. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1535**: 1-9.

Rizzo, W. B., Lin, Z., and Carney, G. Fatty aldehyde dehydrogenase: genomic structure, expression and mutation analysis in Sjogren-Larsson syndrome. *Chem Biol Interact*, 2001. **130-132**: 297-307.

Rycroft RJ, Moynahan EJ, Wells RS. Atypical ichthyosiform erythrodernam deafness and keratitis. A report of two cases. *Br J Dermatol*, 1976. **94(2):** 211-7.

Robertson, J. D. The Occurrence of a Subunit Pattern in the Unit Membranes of Club Endings in Mauthner Cell Synapses in Goldfish Brains. *J Cell Biol*, 1963. **19**: 201-221.

Robinson N.A., Lapic S., Weter J.F., Eckert R.L., S100A10, annexin I, desmosomal proteins, small proline-rich proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*, 1997. **272**: 12035 12046.

Rogers, G. R., Markova, N. G., De Laurenzi, V., Rizzo, W. B., and Compton, J. G. Genomic organization and expression of the human fatty aldehyde dehydrogenase gene (FALDH). *Genomics*, 1997. **39:** 127-135.

Roth W., Deussing J., Bitchkarev V.A., Pauly-Evers M., Saftig P., Hafner A. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J*, 2000. **14**: 2075-2086.

Rouan, F., White, T. W., Brown, N., Taylor, A. M., Lucke, T. W., Paul, D. L., Munro, C. S., Uitto, J., Hodgins, M. B., and Richard, G. trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation. *J Cell Sci*, 2001. **114:** 2105-2113.

Russel L.J., Di Giovanna J.J., Hashem N., Compton J.G., Bale S.J., Linkage of Autosomal Recessive Lamellar Ichthyosis to Chromosome 14q. *Am J Hum Genet*, 1994.**55**: 1146-1152.

Salomon, D., Masgrau, E., Vischer, S., Ullrich, S., Dupont, E., Sappino, P., Saurat, J. H., and Meda, P. Topography of mammalian connexins in human skin. *J Invest Dermatol*, 1994. **103**: 240-247.

Sarma, J. D., Wang, F., and Koval, M.. Targeted gap junction protein constructs reveal connexin-specific differences in oligomerization. *J Biol Chem,* 2002. **277**: 20911-20918.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis, T: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1989. *Cold Spring Harbor Laboratory Pre*ss NY Vol. 1-2-3.

Saunders N.A., Jetten A.M., Control of growth regulatory and differetiation-specific genes in human epidermal keratinocytes by interferon ã. *J Biol Chem*, 1994. **269**: 2016-2022.

Saurat J.M., Grosshans E., Laugier P., Lachapelle J.M., *Dermatologie et venerologie*. Editore Masson. Schalkwijk J., de Roo C., de Jongh G.J., 1991. Skin-derived antileuko proteinase (SKALP), an elastase inhibitor form human keratinocytes. Purification and biochemical properties. *Biochim Biophys Acta*, 1990. **1096**. 148-154.

Schalkwijk J., van Vlijmen I.M., Alkemade J.A., de Jongh G.J., Immunohistochemical localization of SKALP/elafin in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*, 1993.**100**: 390-393.

Shevchenko Y.O., Compton J.R., Toro J.R., DiGiovanna J.J., Bale S.J. Splice-site mutation in TGM1 in congenital recessive ichthyosis in American families : molecular, genetic, genealogic and clinical studies. Hum Genet , 2000. **106**: 492-496.

SchmuthM., Man M.Q., Weber F., Gao W., Feingold K.R., Fritsch P., Elias P.M. & Holleran W.M. (2000) Permeability barrier disorder in Niemann-Pick disease: sphingomyelin-ceramide processing required for normal barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol*., **115**, 459-466.

Schroeder M., Kaufman R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, 2005. **74**: 739-789

Schroeder W.T., Thacher S.M., Stewart-Galetka S., Annarella M., Chema D., Siciliano M.J., Davies P.J.A., Tang H.Y., Sowa B.A., Duvic M., Type I keratinocyte transglutaminase: expression in human skin and psoriasis. *J Invest Dermatol*, 1992. **99**: 27-34.

Schultz J., Ponting C.P., Hofmann K. & Bork P. (1997) SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci*., **6**, 249-253.

Segretain, D., and Falk, M. M. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta,* 2004. **1662**: 3-21.

Seitz J., Keppler C., Huntemann S.B., Purification and characterization of transglutaminases from the genital tract of the male rat. *J Chromatogr*, 1991. **587**: 55-60.

Shan L., Molberg O., Parrot I., Hausch F., Filiz F., Gray G.M., Sollid L.M., Khosla C., Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 2002. **297**: 2218-2220.

Shevchenko Y.O., Compton J.G., Toro J.R., DiGiovanna J.J., Bale S.J., Splice-site mutation in TGM1 in congenital recessive ichthyosis in American families : molecular, genetic, genealogic, and clinal studies. *Hum Genet*, 2000. **106**: 492-499.

Shibaki, A., Akiyama, M., and Shimizu, H. Novel ALDH3A2 heterozygous mutations are associated with defective lamellar granule formation in a Japanese family of Sjogren-Larsson syndrome. *J Invest Dermatol*, 2004. **123**: 1197-1199.

Scwayder T., Conn S., Lowe L. Acral peeling skin syndrome. *Arch Dermatol*, 1997. **133:** 535-536.

Silverman A.K., Ellis C.N., Beals T.F., Woo T.Y. Continual skin peeling syndrome. An electron microscopic study. *Arch Dermatol*, 1986. **122**: 71-75.

Simon M., The epidermal cornified envelope and ist precursors. In *The Keratinocyte Handbook* (I.M. Leigh, E.B. Lane and F.M. Watt, eds), 1994. pp. 275-292, Cambridge University Press, Cambridge.

Spina A.M., Esposito C., Pagano M., Chiosi E., Mariniello L., Cozzolino A., Porta R., Illiano G., GTPase and transglutaminase are associated in the secretion of the rat anterior prostate. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **260**: 351-356.

Stappenbeck T.S., Bornslaeger E.A., Corcoran C.M., Luu H.H., Virata M.L.A. et al., Functional analysis of desmoplakin domains: specification of the interaction with keratin versus vimentin intermediate filaments networks. *J Cell Biol*, 1993 **123**: 691-706.

Stappenbeck T.S., Lamb J.A., Corcoran C.M., Green K.J., Phosphorylation of the desmoplakin COOH terminus negatively regulates its interaction with keratin intermediate filament networks. *J Biol Chem*, 1994.**269**: 29351-29354.

Steinert P.M., Cantieri J.S., Teller D.C., Lonsdale-Eccles J.D., Dale B.A., Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact

with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981. **78**: 4097-4101.
Steinert P.M., Roop D.R.., The molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem*, 1988 **57**: 593-625.
Steinert P.M., Mack J.W., Korge B.P., Gan Song-Qing, Haynes S.R., Steven
A., Glycine loops in proteins: their occurence in certain intermediate filament chains, loricrins and single-stranded RNA binding proteins. *Int J Biol Macromol*, 1991. **13**: 130-139.
Steinert P.M., Marekov L.N., The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isopeptide crosslinked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*, 1995. **270**: 17702-17711.
Steinert P.M., Chung S.I., Kim S.Y., Inactive zymogen and highly active proteolytically processed membrane-bound forms of the transglutaminase 1 enzyme in human epidermal keratinocyte. *Biochem Biophis Res Commun*, 1996a. **221**: 101-106.
Steinert P.M., Kim S.Y., Chung S.I., Marekov L.N., The transglutaminase 1 enzyme is variably acylated by myristate and palmitate during differentiation in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*, 1996b.**271**: 26242-26250.
Steinert P.M., Marekov L., Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified envelope. *J Biol Chem*, 1997.**272**: 2021-2030.
Steinert P.M., Candi E., Kartasova T., Marekov L.N., Small prolinerich proteins are cross-bridging proteins in the cornified cell envelopes of stratified squamous epithelia. *J Struct Biol*, 1998a.**122**: 76-85.
Steinert P.M., Candi E., Tarcsa E., Marekov L.N., Sette M., Paci M., Ciani B., Guerrieri P., Melino G., Transglutaminase crosslinking and structural studies of the human small proline rich 3 protein. *Cell Death Diff*, 1999. **6**: 916-930.

Stewart M., Intermediate filaments: structure, assembly and molecular interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 1990. **2**: 91-100.
Sun T., Green H., Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope. *Cell*, 1976. **9**: 512-522.
Swartzendruber D.C., Wertz P.W., Kitko D.J., et al., Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 1989. **92**: 251-257.

Szondy Z., Sarang Z., Molnar P., Nemeth T., Piacentini M., Mastroberardino P.G., Falasca L., Aeschlimann D., Kovacs J., Kiss I., Szegezdi E., Lakos G., Rajnavolgyi E., Birckbichler P.J., Melino G., Fesus L., Transglutaminase 2 -/- mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2003.**100**: 7812-7817.

Sylvester, P. E. Pathological findings in Sjogren-Larsson syndrome. *J Ment Defic Res,* 1969. **13**: 267-275.

Takagi, Y., Ito, A., and Omura, T. Biogenesis of microsomal aldehyde dehydrogenase in rat liver. *J Biochem,* 1985. **98**: 1647-1652.

Takahashi M., Tezuka T., The cystine-rich envelope protein from human epidermal stratum corneum cells. *J Invest Dermatol*, 1987.**88**: 47-51.

Tarcsa E., Candi E., Kartasova T., Idler W.W., Marekov L.N., Steinert P.M., Structural and transglutaminase substrate properties of the small proline rich 2 family of cornified cell envelope proteins. *J Biol Chem*, 1998. **273**: 23297-23303.

Thacher S.M., Rice R.H., Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: regulation of crosslinked envelope formation and terminal differentiation. *Cell*, 1985. **40**: 685-695.

Thibaut S., Candi E., Pietroni V., Melino G., Schmidt R., Bernard B.A. Transglutaminase 5 expression in human hair follicle. *J Invest Dermatol*, 2005. **125** (3): 581-585.

Thomas, T., Telford, D., and Laird, D. W. Functional domain mapping and selective trans-dominant effects exhibited by Cx26 disease-causing mutations. *J Biol Chem,* 2004. **279**: 19157-19168.

Thomazy V., Fesus L. Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Re*s, 1989. **255(**1): 215-24.

Traupe H. The ichtyoses. A guide to clinical diagnosis, genetic counselling, and therapy. Springer-Verlag, Berlin 1969.

Tucholski J., Kuret J., Johnson G.V., Tau is modified by tissue transglutaminase in situ: possible functional and metabolic effects of polyamination. *J Neurochem*, 1999. **73**: 1871-1880.

Uitto J., Richard G. Progress in epidermolysis bullosa: genetic classification and clinical implications. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2004. **131**: 61-74.

van Steensel, M. A., van Geel, M., Nahuys, M., Smitt, J. H., and Steijlen, P. M. A novel connexin 26 mutation in a patient diagnosed with

keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *J Invest Dermatol,* 2002. **118**: 724-727.

Vinken, M., Vanhaecke, T., Papeleu, P., Snykers, S., Henkens, T., and Rogiers, V. Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell Signal,* 2006. **18**: 592-600.

Vikstrom K.L., Borisy G.G., Goldman R.D., Dynamic aspects of intermediate filament networks in BHK-21 cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*., 1989.**86**: 549-553.

Volz A., Korge B.P., Compton J.C., Ziegler A., Steinert P.M., Mischke D., Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics*, 1993. **18**: 92-99.

Wang M., Kim I.G., Steinert P.M., McBride O.W., Assignment of the human transglutaminase 2 (TGM2) and transglutaminase 3 (TGM3) genes to chromosome 20q11.2. *Genomics*, 1994. **23**: 721-722.

Weber, P. A., Chang, H. C., Spaeth, K. E., Nitsche, J. M., and Nicholson, B. J. The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin composition and permeant-pore affinities. *Biophys J,* 2004. **87**: 958-973.

Wei, C. J., Xu, X., and Lo, C. W. Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004. **20**: 811-838.

Weiss M.S., Jabs A., Hilgenfeld R., Peptide bonds revisited. *Nat Struct Biol*, 1998a. **5**: 676.

Weiss M.S., Metzner H.J., Hilgenfeld R., Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII function. *FEBS Lett*, 1998b. **423**: 291-296.

White, T. W. Functional analysis of human Cx26 mutations associated with deafness. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000. **32**: 181-183.

White, T. W., and Paul, D. L. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annu Rev Physiol,* 1999. **61**: 283-310.

Willemsen, M. A., Rotteveel, J. J., de Jong, J. G., Wanders, R. J., L, I. J., Hoffmann, G. F., and Mayatepek, E. (2001b). Defective metabolism of leukotriene B4 in the Sjogren-Larsson syndrome. *J Neurol Sci*, 2001b **183**: 61-67.

Wiszniewski L, Limat A, Saurat JH, Meda P, Salomon D. Differential expression of connexins during stratification of human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2000. **115(2):** 278-85.

Yada Y., Polakowska R.R., Okano Y., Nozawa Y., Protein kinase Cdependent expression of type I transglutaminase mRNA in ganglioside

GQ1b and calcium-stimulated human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **190**. 688-694.

Yaffe M.B., Beegen H., Eckert R.L., Biophysical characterization of involucrin reveals a molecule ideally suited to function as an intermolecular cross-bridge of the keratinocyte cornified envelope. *J Biol Chem*, 1992. **267**: 12233-12238.

Yamada H., Takamori K., Ogawa H., Localization and some properties of skin sulfhydryl oxidase. *Arch Dermatol Res*, 1987. **279**: 194-197.

Yamada K., Yamanishi K., Kakizuka A., Kibe Y., Doi H., Yasuno H., Transcriptional regulation of human transglutaminase 1 gene by signaling systems of protein kinase C, RAR/RXR and Jun/Fos in keratinocytes. *Bioch Mol Biol Intern*, 1994.**34**: 827-836.

Yamada K., Matsuki M., Morishima Y., Ueda E., Tabata K., Yasuno H., Suzuki M., Yamanishi K., Activation of human transglutaminase 1 promoter in transgenic mice: terminal differentiation-specific expression of the TMG1-LacZ transgene in keratinized stratified squamous epithelia. *Hum Mol Gen*, 1997. **6**:2223-2231.

Yamanishi K., Inazawa J., Liew F.M., Nonomura K., Ariyama T., Yasuno H., Abe T., Doi H., Hirano J., Fukushima S., Structure of the gene for human transglutaminase 1. *J Biol Chem*, 1992. **267**: 17858-17863.

Yan Z.H., Noonan S., Nagy L., Davies P.J., Stein J.P., Retinoic acid induction of the tissue transglutaminase promoter is mediated by a novel response element. *Mol Cell Endocrinol*, 1996.**120**: 203-212.

Yee V.C., Pedersen L.C., LeTrong I, Bishop P.D., Stenkamp R.E., Teller D.C., Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994. **91**: 7296-7300.

Yee V.C., Le Trong I., Bishop P.D., Pedersen L.C., Stenkamp R.E., Teller D.C., Structure and function studies of factor XIIIa by x-ray crystallography. *Semin Thromb Hemost*, 1996. **22**: 377-384.

Yu, Z., Schneider, C., Boeglin, W. E., and Brash, A. R. Mutations associated with a congenital form of ichthyosis (NCIE) inactivate the epidermal lipoxygenases 12R-LOX and eLOX3. *Biochim Biophys Acta*, 2005 **1686 3**, 238-247.

Yuspa S.H., Kilkenny, A. E., Steinert, P. M. Roop, D. R. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol*, 1989. **109**: 1207-17.

Zatloukal K., Denk H., Lackinger E., Rainer I., Hepatocellular cytokeratins as substrates of transglutaminases. *Lab Invest*, 1989. **61**: 603-608.

Zavalova L., Lukyanov S., Baskova I., Snezhkov E., Akopov S., Berezhnoy S., Bogdanova E., Barsova E., Sverdlov E.D., Genes from the medicinal leech (Hirudo medicinalis) coding for unusual enzymes that specifically cleave endo-å(ã-glutamil)lysine isopeptide bonds and help to dissolve blood clots. *Mol Gen Genet*, 1996. **253**: 20-25.

Zhou X.M., Idler W.W., et al., The complete sequence of the human intermediate filament chain keratin 10. *J Biol Chem*, 1988. **263**: 15584-15589.

Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*, 2006. **20(1):** 1-15. Review

# CURRICULUM E PUBBLICAZIONI

# Curriculum Vitae di Andrea Codispoti


**Dati personali**

- **Nazionalità** : Italiana
- **Data di nascita** : 26-07-1977
- **Luogo di nascita** : Roma
- **Residenza** : L.go O. Zuccarini n 9, 00149 Roma
- **Domicilio** : L.go O. Zuccarini n 9, 00149 Roma
- **e-mail** : andrea.codispoti@gmail.com
- **Telefono** : 065514855 /3286170031


**Istruzione**

1996–2004 Università degli Studi di Roma TRE

**Laurea in Scienze Biologiche – Indirizzo Biomolecolare**

- **Votazione**:.107/110
- **Titolo Tesi**: Alterazioni Biochimiche della TGasi1 alla base dei meccanismi patogenetici dell'Ittiosi Lamellare. *Identificazione di mutazioni e sviluppo di nuove strategie geniche.*
- **Relatori**: Prof. Gerry Melino; Prof Govanni Antonini

Supera con profitto l'Esame di Stato per l'esercizio della Professione di Biologo

**Esperienze professionali**

- **Ott.2004-Ott.2008** Università "Tor Vergata" Roma

Dottorando (Biochimica e Biologia Molecolare) nel laboratorio del prof. G.Melino. Facoltà di Medicina Dip. Medicina sperimentale e Scienze Biochimiche

- **Nov.2002-Mag.2004** Università "Tor Vergata"

Lavoro di tesi presso il laboratorio del prof. Gerry Melino nella Facolta' di Medicina Dip Medicina sperimentale e Scienze Biochimiche

**Conoscenze Specifiche**

Ha acquisito buona esperienza nel campo della biologia molecolare apprendendo le seguenti tecniche:

- Estrazione di DNA e RNA da batteri e da tessuti
- clonaggio di DNA
- Analisi di sequenze di DNA
- PCR e RT-PCR
- Western Blot
- Colture Cellulari
- Trasfezione transiente e stabile
- Saggio Luciferasi
- Immunoistochimica ed immunocitochimica
- Real Time PCR
- Saggio di immunoprecipitazione della cromatina
- Stabulazione

## Corsi di Formazione

EPISTEM 29 Maggio-4 Giugno 2006 **Chip Training**, Università di Milano, Milano.

EPISTEM 28 Maggio-1 Giugno 2007 **Chip on Chip Training**, Università di Milano, Milano.

## Conoscenze informatiche

Buona conoscenza dei principali programmi informatici sia in ambiente Macintosh che Windows (Microsoft Word, Power Point, Excel, Adobe Photoshop). Buona familiarità nell'uso di Internet, motori di ricerca e medline,

**Lingue straniere**

- Buona conoscenza della lingua Inglese, sia parlata che scritta.

**Partecipazione Congressi Nazionali**

- Candi E. ,Pietroni V.,**Codispoti A**.

"Molecular Mechanism Involved in the Pathogenesis of Lamellar Icthyosis: role of Transglutaminases" Thelethon Scientific convention March 6-8-2005 Salsomaggiore Terme (PR).

- Organizzazione del I° Simposio dei Dottorandi "Proteine al Lavoro", Villa Mondragone, Frascati (RM) 12/05/06.

**Partecipazione Congressi Internazionali**

- Terrinoni A., Didona B., **Codispoti A.**, Zocchi L., Melino G.

"The novel Connexin 26 Gly11Glu heterozygous mutation is responsabile of a case of KID Syndrome, via the impairment of membrane trafficking and connexion assembly." SID 2006 Philadelphia PA, (USA) Maggio 2006.

- **Codispoti A**. (comunicazione orale)

"A novel KID (Keratitis-Ichthyosis-Deafness) Syndrome mutation in Connexin 26 induces calcium deregulation and cell death." Villa Vigoni (IT) Giugno-Luglio 2008.

**Pubblicazioni**

- Campione E., Terrinoni A., Orlandi A., **Codispoti A**., Melino G., Bianchi L., Mazzotta A., Garaci F.G., Ludovici A., Cimenti S.

**Cerebral cavernomas in a family with multiple cutaneous and uterine leiomyomas associated with a new mutation in the fumarate hydratase gene.**

**J Invest Dermatol. 2007 Sep;127(9):2271-3.**

- Didona B., **Codispoti A**., Bertini E., Rizzo WB., Carney G., Zambruno G., Dionisi-Vici C., Paradisi M., Pedicelli C., Melino G., Terrinoni A.

**Novel and recurrent ALDH3A2 mutations in Italian patients with Sjögren-Larsson syndrome.**

**J Hum Genet. 2007;52(10):865-70.**

- Zocchi L., Bourdon JC., **Codispoti A.,** Knight R. Lane DP., Melino G., Terrinoni A.

**Scotin: A new p63 target gene expressed during epidermal differentiation.**

**Biochem Biophys Res Commun. 2008 Mar 7;367(2):271-6.**

## Autorizzazione al trattamento dei dati personali (L.675/96)

J Hum Genet (2007) 52:865–870
DOI 10.1007/s10038-007-0180-z

SHORT COMMUNICATION

# Novel and recurrent ALDH3A2 mutations in Italian patients with Sjögren–Larsson syndrome

**Biagio Didona · Andrea Codispoti · Enrico Bertini · Wiliam B. Rizzo · Gael Carney · Giovanna Zambruno · Carlo Dionisi-Vici · Mauro Paradisi · Cristina Pedicelli · Gerry Melino · Alessandro Terrinoni**

Received: 4 May 2007 / Accepted: 13 July 2007 / Published online: 28 September 2007
© The Japan Society of Human Genetics and Springer 2007

**Abstract** Sjögren–Larsson syndrome (SLS; MIM#270200) is an autosomal recessive neurocutaneous disease caused by mutations in the *ALDH3A2* gene for fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH), a microsomal enzyme that catalyzes the oxidation of medium- and long-chain aliphatic aldehydes to fatty acids. We studied two unrelated Italian SLS patients with ichthyosis, developmental delay, spastic diplegia and brain white matter disease. One patient was homozygous for a novel *ALDH3A2* insertion mutation (c.767insA) in exon 5. The other SLS patient was a compound heterozygote for two previously reported mutations: a splice-site mutation (c.471 + 2T > G) in intron 3 and a missense mutation (c.1094C > T; S365L) in exon 7. Analysis of fibroblast RNA by RT-PCR indicated that the splice-site mutation caused skipping of exons 2 and 3. The c.1094C > T mutation, previously associated with two *ALDH3A2* haplotypes, was found on a third distinct haplotype in our patient, which indicates that it arose independently in this kindred. These results add to understanding of the genetic basis of SLS and will be useful for DNA diagnosis of this disease.

**Keywords** Ichthyosis · Mental retardation · Spastic diplegia · Mutation · Leukotriene · $\omega$-Oxidation · Fatty aldehyde · Fatty alcohol

## Introduction

Sjögren–Larsson syndrome (SLS; MIM#270200) is a rare autosomal recessive disorder characterized by mental retardation, spastic di- or tetraplegia and congenital ich-

Biagio Didona and Andrea Codispoti equally contributed to the work.

B. Didona
I Dermatology Division, IDI-IRCCS,
Via Monti di Creta, 104, Rome, Italy

A. Codispoti · G. Melino (✉) · A. Terrinoni (✉)
Department of Experimental Medicine, IDI-IRCCS
Biochemistry Laboratory, c/o University of Tor Vergata,
Via Montpellier 1, 00133 Rome, Italy
e-mail: gerry.melino@uniroma2.it

A. Terrinoni
e-mail: alessandro.terrinoni@uniroma2.it

E. Bertini · C. Dionisi-Vici
Department of Laboratory Medicine,
Unit of Molecular Medicine,
Bambino Gesu Hospital, Rome, Italy

W. B. Rizzo · G. Carney
University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA

G. Zambruno
Molecular Biology Laboratory, IDI-IRCCS,
Via Monti di Creta, 104, Rome, Italy

M. Paradisi · C. Pedicelli
VII Dermatology Division, IDI-IRCCS,
Via Monti di Creta, 104, Rome, Italy

G. Melino
Medical Research Council, Toxicology Unit,
Leicester University, Hodgkin Building,
Lancaster Road, P.O. Box 138, Leicester LE1 9HN, UK

G. Melino
Mondino-Tor Vergata Center for Experimental Neurobiology,
University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy

thyosis (Jagell et al. 1981; Rizzo 2001; Sjogren and Larsson 1957). The syndrome has a high prevalence in northern Sweden where it was first described, but it is also found worldwide. Mental retardation has variable severity and is profound in at least one-third of cases (Rizzo 2001). The ichthyosis in SLS is usually present at birth, although it can appear later in the 1st year of life (Jagell et al. 1981). Retinal glistening white dots and pigmentary degeneration are often present, and photophobia is common (Jagell et al. 1980).

SLS is caused by mutations in the *ALDH3A2* gene that codes for fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH) (De Laurenzi et al. 1996). The *ALDH3A2* gene is located on chromosome 17p11.2 (Pigg et al. 1994; Rogers et al. 1995) and consists of 11 exons encoding a protein of 485 amino acids (Chang and Yoshida 1997). Alternative splicing of the gene generates a second minor transcript that codes for a variant FALDH protein of 508 amino acids possessing a unique carboxy-terminus (Rogers et al. 1997). The *ALDH3A2* gene is expressed in most mammalian tissues.

FALDH is a microsomal enzyme that oxidizes medium- and long-chain aliphatic aldehydes derived from metabolism of fatty alcohol, phytanic acid, ether glycerolipids and leukotriene B4 (Rizzo 2007). Fatty alcohols are oxidized by a fatty alcohol:$NAD^+$ oxidoreductase enzyme complex consisting of two protein components, fatty alcohol dehydrogenase and FALDH, which sequentially metabolize fatty alcohol to fatty aldehyde and fatty acid, respectively (Ichihara et al. 1986). As a consequence of FALDH deficiency, SLS patients have impaired hexadecanol oxidation (Rizzo et al. 1988) and accumulate long-chain fatty alcohols in cultured fibroblasts and plasma (Rizzo and Craft 2000). FALDH deficiency also leads to accumulation of leukotriene B4 (Willemsen et al. 2001b) and aldehyde-modified phosphatidylethanolamine (James and Zoeller 1997). Altered membrane lipid composition in skin and brain is thought to be responsible for the symptoms in SLS (Rizzo 2007).

A number of mutations involving the *ALDH3A2* gene have been reported in SLS patients (De Laurenzi et al. 1996; Rizzo 2007; Rizzo and Carney 2005; Sillen et al. 1998; Willemsen et al. 2001a). Here we describe disease-causing mutations in two Italian patients.

## Materials and methods

### Patients

All clinical investigations were approved by the Institutional Review Boards, according to the Helsinki Declaration, and performed after obtaining informed consent.

### Electron microscopy

Electron microscopy samples were prefixed with 2% (w/v) glutaraldehyde for 2 h at 4°C; complete fixation was achieved by incubation with 1% (w/v) osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer, 4.5% (w/v) sucrose, for 1 h at 4°C. Samples were dehydrated in ethanol and embedded in epoxy resin. Semithin sections (1 μm) of embedded samples were cut using a microtome and stained with uranyl acetate 1% (w/v).

### Fibroblast culture

Cultured skin fibroblasts were grown from a skin biopsy of patient 2 using standard techniques.

### RT-PCR and sequence analysis

RNA was isolated from cultured fibroblasts of patient 2 and a skin biopsy of patient 1 using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Crawley, UK). Randomly primed cDNA synthesis was performed using the ImProm-II Reverse Transcription System Kit (Promega). The FALDH coding region was amplified by PCR using primers: (+)ATTGTGGCTGT GGGTTGAGG and (–)AGAGGCACTAGGAGGTTGAA CAGG.

PCR amplification of the cDNA spanning exons 1 to 4 was performed using the following primers: (+)ATTGT GGCTGTGGGTTGAGG and (–)ACAATGTCCAGGT CACAATC.

### Genomic DNA analysis

DNA was extracted and purified from blood samples using Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). The *ALDH3A2* gene was amplified by PCR using primers derived from genomic intronic sequences flanking the *ALDH3A2* exons (Table 1). PCR was performing by adding 500 ng of gDNA to a 50-μl PCR reaction. The PCR product size and quality were checked on an agarose gel. DNA was purified from the agarose gel using the SV DNA Gel Purification Kit (Promega) and directly sequenced using the amplification primers and a 377 automatic sequencer (Applied Biosystems). *ALDH3A2* haplotypes were determined as described (Rizzo et al. 1999).

### FALDH enzyme activity

The FALDH enzyme activity in cultured fibroblasts was measured as previously described (Kelson et al. 1997).

**Table 1** Forward and reverse primer sequence, and size of PCR products, based on NT_030843 genomic contig (01/02)

| Exon no | Strand | Sequence | Name | Size (bp) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | + | TGTGGCTGTGGGTTGACGGT | FALDHex1Forw | 352 |
| | – | AGCTCCAGTCCACAAGTGCG | FALDHex1Rev | |
| 2–3 | + | TGAATGGCAAACAGCTAGTC | FALDHex2–3Forw | 2,057 |
| | – | CCGAACATGTCCGAACA | FALDHex2–3Rev | |
| 4–5 | + | ATTTATTTGGCAGTGCAAGA | FALDHex4–5Forw | 1,612 |
| | – | GCTGCCTGCGAATAGTTAAT | FALDHex4–5Rev | |
| 6 | + | TGGCTGGATTTTGTACTTAC | FALDHex6Forw | 349 |
| | – | ACCAGAAAGCAGGATTTAGT | FALDHex6Rev | |
| 7 | + | GGGAGAGGGAAAGGCATGGA | FALDHex7Forw | 430 |
| | – | GCAACCTCGGAACACAACCT | FALDHex7Rev | |
| 8 | + | GGCCATGAGTGTTCCCTAAG | FALDHex8Forw | 242 |
| | – | TTTCAGCAGCCCATACAATC | FALDHex8Rev | |
| 9 | + | TTCCCGGTCGTTGTTAGA | FALDHex9Forw | 465 |
| | – | CAGTGACAAAAACGGGTAGC | FALDHex9Rev | |
| 9′ | + | ACAGTATCCCAGCCTTAGTG | FALDHex9′Forw | 230 |
| | – | GCCCACCTTACATATAGAAA | FALDHex9′Rev | |
| 10 | + | TTAAAGCAGCTGAGTAAACT | FALDHex10Forw | 207 |
| | – | GATGAATGGCAATGACT | FALDHex10Rev | |

## Result and discussion

### Case report

One of the patients is a 12-year-old female. Ichthyosis became evident during the 1st month of life. Due to spasticity in the legs, the patient first walked at 24 months of age only with support, on her tip-toes, and with adducted hips and flexed knees. She underwent surgical correction of leg contractures and started to walk independently with a spastic gait at 7 years of age. Since then, her motor disability has remained stable and currently, at 12 years of age, spasticity involves only the lower limbs. Pigmentary retinopathy was ruled out. Motor and sensory nerve conduction velocities were normal. Language development was normal, but the patient had moderate learning difficulties.

The other patient is a 5-year-old male. Ichthyosis present at birth and leg spasticity became evident in the subsequent few months, but the diplegia remained mild and surgical intervention has been avoided so far. Pigmentary retinopathy was ruled out, and he had a mild mental retardation.

In patient 2 a skin biopsy from the abdomen was processed for electron microscopy study. Semithin section examination showed orthokeratotic hyperkeratosis, thickening of the granular layer, acanthosis and papillomatosis (not shown). Electron microscopy revealed abnormal inclusions in the cytoplasm of granular and horny cells. In the granular layer several membrane-bound electron-lucent vacuoles were observed (Fig. 1a). These cytoplasmic inclusions often displayed peripherally located lamellar structures, suggesting that they may represent abnormal keratinosomes (also known as lamellar granules, Odland bodies, and membrane-coated granules). Numerous normal-sized keratinosomes filled with parallel stacks of lamellae were also observed in the granular layer (not shown). The intercellular spaces of the lower stratum corneum appeared frequently widened and partly filled with a laminated or amorphous material (Fig. 1b). Within the horny layer cell cytoplasm, numerous vacuoles often containing lamellar structures were observed (Fig. 1b). Such abnormal lamellar inclusions in the granular and horny layer cells are a typical finding in SL syndrome and may be derived from keratinosomes, as already suggested by various authors (Bernardini et al. 2007; Ito et al. 1991; Rizzo 1993).

### Molecular analysis

Mutation analysis of the *ALDH3A2* gene, revealed in the first patient a homozygous insertion mutation (c.769insA) in exon 5 (Fig. 1e), with parents heterozygous carriers (Fig. 1d). The c.769insA mutation consists of an adenine insertion into to a stretch of three adenines from 767 to 769 bp, resulting in a frame-shift and substitution of amino acids from Ile 257 to Ile 261 and a premature stop codon (TAA) at codon 262. The result is a severely truncated protein of only 261 amino acids. This mutation has not been previously reported in other SLS patients.

The second patient was also tested for FALDH enzyme activity in cultured skin fibroblasts, resulting severely deficient (935 pmol $min^{-1}$ $mg^{-1}$ protein; normal values 6,750–20,570). Sequence analysis revealed the presence of

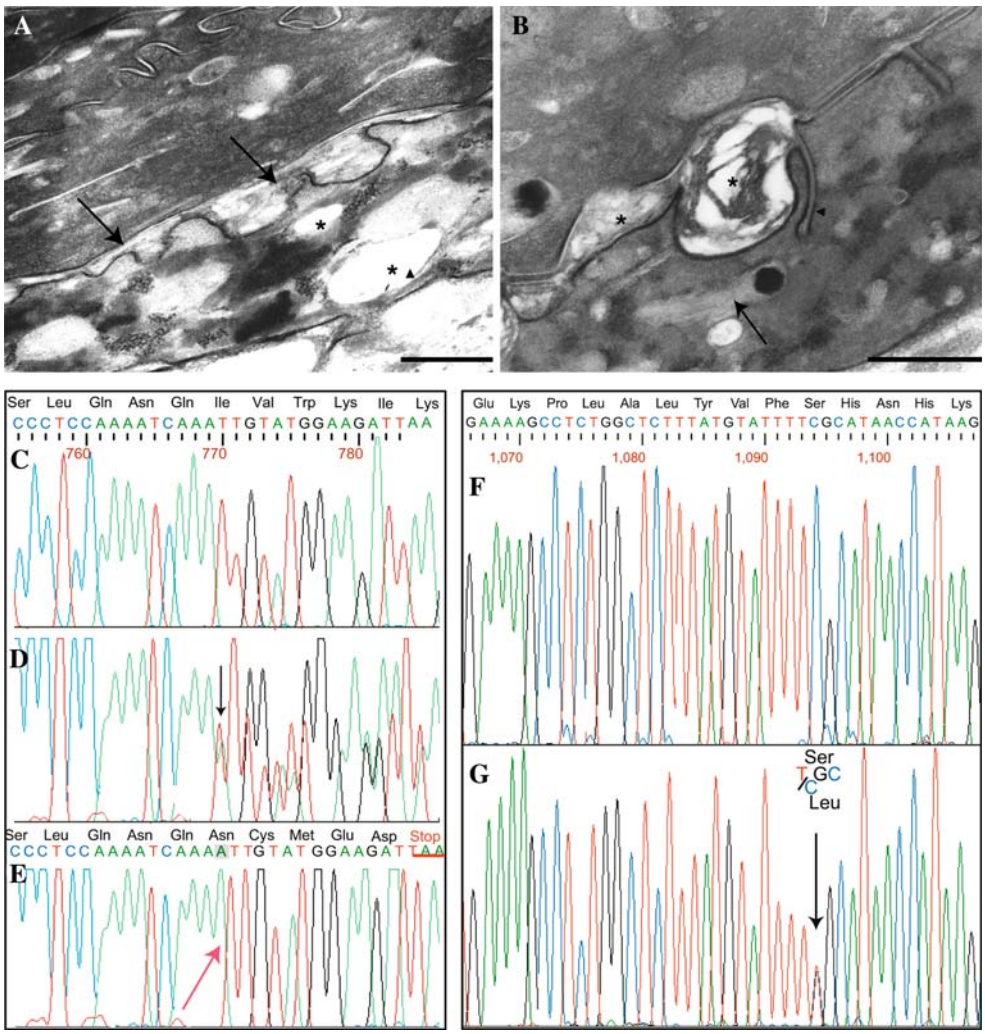



**Fig. 1** Electron micrographs from involved skin. **a** Membrane-bound electron-lucent vacuoles (*asterisks*) in the granular layer: remnants of lamellar structures (*arrowhead*) are visible at the periphery of a vacuole. The intercellular space at the interface between the granular layer and the stratum corneum appear focally and irregularly enlarged, in particular at places of keratinosome fusion with the apical cell surface (*arrows*, *bar* = 500 nm). **b** The intercellular spaces of the lower stratum corneum appear also focally widened and partly filled with a laminated or amorphous material (*asterisk*). Unusual plasma membrane invaginations containing parallel stacks of lamellae are also visible (*arrowhead*). Numerous vacuoles, which appear empty or filled with lamellar structures reminiscent of keratinosomes (*arrow*) and/or an amorphous material, are present within the cytoplasm of horny cells (*bar* = 200 nm). Sequence analysis of the *ALDH3A2* gene, exon 5 of patient 1 and exon 7 of patient 2. **c** Wild-type sequence of exon 5. **d** Heterozygous mutation (present in both parents), showing the insertion of an adenine, the mutation is visible as a scrambling of the chromatogram (beginning from *black arrow*). **e** Homozygous insertion of an adenine into a stretch of three adenines (*red arrow*). This mutation leads to a frame-shift with a premature stop codon, TAA, underlined in red. **f** Wild-type sequence of exon 7. **g** Heterozygous mutation that results in C to T transversion (*black arrow*), determining the aminoacid substitution S365L in patient 2

two already described mutations: c.1094C > T (Fig. 1f–g), leading to the substitution S365L (Shibaki et al. 2004; Sillen et al. 1998), and c.471 + 2T > G (Fig. 2a–b) (Rizzo et al. 1999). The heterozygous c.471 + 2T > G splice site mutation found in patient 2 involves the donor splice-site (GT to GG) of exon 3. The mutation has been previously described (Rizzo et al. 1999), and causes skipping of exons 2 and 3 from the mRNA. The skipping results in the loss of 106 amino acids (52–157). Exon skipping caused by mutations affecting donor acceptor splice sites might not have full penetrance. Interestingly, cloning and sequencing of the full length cDNA (50 clones, Fig. 2c) only showed the presence of the mutated S365L allele (data not shown), thus demonstrating that the exon skipping is essentially complete.

The c.1094C > T mutation has been reported to be associated with two *ALDH3A2* haplotypes (#1 and #2) (Rizzo and Carney 2005; Rizzo et al. 1999). We found that this patient was heterozygous for haplotypes #1 and #3; while the mother (c.471 + 2T > G) was heterozygous for haplotype 1 and 4, and the father (c.1094C > T) was homozygous for haplotype #3. The c.1094C > T mutation

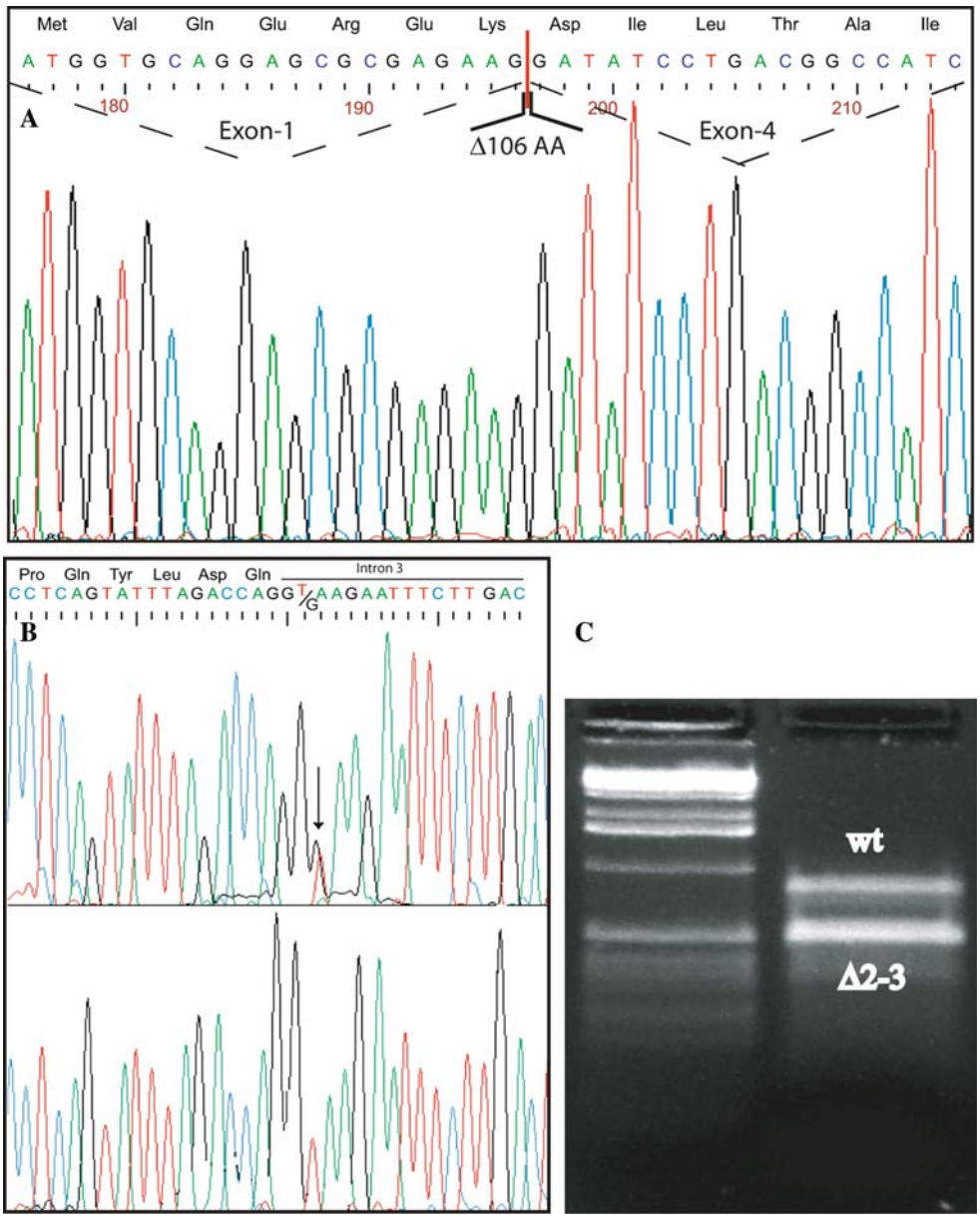



**Fig. 2** Sequence analysis of the *ALDH3A2* gene, exons 1–4, of patient 2. The entire CDS was amplified, and the two products obtained directly sequenced. **a** The chromatograms analysis of the smaller product shows the deletion generating the skipping of exons 2 and 3, resulting in the loss of 106 amino acids. **b** The chromatogram of the genomic sequence shows the heterozygous c.471 + 2T→G transversion (*black arrow*). **c** The electrophoresis analysis showing the full length and a smaller transcript lacking 318 bp due to the skipping of exons 2–3. In this case, the PCR was performed with primers amplifying exon 1 to exon 4 of the patient's cDNA (see Materials and methods)

was therefore on *ALDH3A2* haploytpe #3, indicating that this mutant allele represents a recurrent mutation on our Italian kindred.

We identified three mutations in the *ALDH3A2* gene causing SLS in our Italian patients. The novel insertion mutation (c.767insA) in patient 1 gives rise to a severely truncated protein missing almost one-half of the amino acids, including a region essential for catalytic activity. The catalytic thiol of Cys241 is still present in the truncated protein, but other important residues are deleted, including: Glu333 recognized to be a general base in all class-3 aldehyde dehydrogenase enzymes (Hempel et al. 2001b); Glu268 important in activating the hydrolytic water after hydrite transfer (Hempel et al. 2001a); and Phe335 important for the positioning of the nicotinamide ring necessary for the hydrite transfer (Hempel et al. 2001a). In addition, this mutant protein lacks the hydrophobic carboxyl terminus, which is essential for anchoring it to the microsomal membrane (Masaki et al. 1994). This mutation should abolish enzyme catalytic activity, since a much less severe protein truncation (c.1297–1298delGA) results in <1% of residual enzyme activity (Rizzo and Carney 2005). The c.767insA mutation occurs at a 3-bp adenine stretch separated by 2-bp from an upstream four adenine sequence. This suggests that the mutation arose from a polymerase error at this site or unequal crossing over.

The c.1094C > T (S365L) mutation found in patient 2 has been reported in several SLS patients of German ancestry (Rizzo et al. 1999; Sillen et al. 1998). Expression studies have shown that the S365L mutant FALDH has only 3%

residual enzyme activity (Rizzo et al., 1999). The mutation occurs at a CpG dinucleotide and has been found to be associated with two *ALDH3A2* haplotypes (#1 and #2), suggesting that it originated on at least two separate occasions. This mutation has also apparently arisen independently in an ancestor of our Italian patient, since it is associated with haplotype #3. Our genetic studies lead us to speculate that the mutant c.1094C > T allele in our Italian patient arose independently again in Italy. Interestingly this mutation has never been reported in non-Caucasians, such as the Japanese population (Sakai et al. 2006), indicating that this GT donor splice site is not prone to mutation in such a population, probably due to a different genetic backgrounds.

In summary, we report both novel and recurrent *ALDH3A2* mutations in Italian SLS patients. These results provide new genetic findings on the molecular etiology of SLS and should be useful for DNA-based diagnosis of this disease.

**Acknowledgments** Contract grant sponsor: EU grants EPISTEM (LSHB-CT-019067), FIRB grants RBNE01KJHT_004,RBNE01NWCH_008; MIUR/PRIN 004064744_003; AIRC rif. 1338; ISS n. 530/F-A19. The work was also supported by Grant Telethon GGPO4110 to Gerry Melino, and ISS Programma Italia-USA "Malattie Rare" N.526D/5.

## References

Bernardini ML, Cangiotti AM, Zamponi N, Porfiri L, Cinti S, Offidani A (2007) Diagnosing Sjogren–Larsson syndrome in a 7-year-old Moroccan boy. J Cutan Pathol 34:270–275

Chang C, Yoshida A (1997) Human fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH10): organization and tissue-dependent expression. Genomics 40:80–85

De Laurenzi V, Rogers GR, Hamrock DJ, Marekov LN, Steinert PM, Compton JG, Markova N, Rizzo WB (1996) Sjogren–Larsson syndrome is caused by mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene. Nat Genet 12:52–57

Hempel J, Kuo I, Perozich J, Wang BC, Lindahl R, Nicholas H (2001a) Aldehyde dehydrogenase. Maintaining critical active site geometry at motif 8 in the class 3 enzyme. Eur J Biochem 268:722–726

Hempel J, Lindahl R, Perozich J, Wang B, Kuo I, Nicholas H (2001b) Beyond the catalytic core of ALDH: a web of important residues begins to emerge. Chem Biol Interact 130–132:39–46

Ichihara K, Kusunose E, Noda Y, Kusunose M (1986) Some properties of the fatty alcohol oxidation system and reconstitution of microsomal oxidation activity in intestinal mucosa. Biochim Biophys Acta 878:412–418

Ito M, Oguro K, Sato Y (1991) Ultrastructural study of the skin in Sjogren–Larsson syndrome. Arch Dermatol Res 283:141–148

Jagell S, Polland W, Sandgren O (1980) Specific changes in the fundus typical for the Sjogren–Larsson syndrome. An ophthalmological study of 35 patients. Acta Ophthalmol (Copenh) 58:321–330

Jagell S, Gustavson KH, Holmgren G (1981) Sjogren–Larsson syndrome in Sweden. A clinical, genetic and epidemiological study. Clin Genet 19:233–256

James PF, Zoeller RA (1997) Isolation of animal cell mutants defective in long-chain fatty aldehyde dehydrogenase. Sensitivity to fatty aldehydes and Schiff's base modification of phospholipids: implications for Sjogren–Larsson syndrome. J Biol Chem 272:23532–23539

Kelson TL, Secor McVoy JR, Rizzo WB (1997) Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification, and biochemical characterization. Biochim Biophys Acta 1335:99–110

Masaki R, Yamamoto A, Tashiro Y (1994) Microsomal aldehyde dehydrogenase is localized to the endoplasmic reticulum via its carboxyl-terminal 35 amino acids. J Cell Biol 126:1407–1420

Pigg M, Jagell S, Sillen A, Weissenbach J, Gustavson KH, Wadelius C (1994) The Sjogren–Larsson syndrome gene is close to D17S805 as determined by linkage analysis and allelic association. Nat Genet 8:361–364

Rizzo WB (1993) Sjogren–Larsson syndrome. Semin Dermatol 12:210–218

Rizzo WB (2001) Sjogren–Larsson syndrome: fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. McGraw-Hill, New York, pp 2239–2258

Rizzo WB (2007) Sjogren–Larsson syndrome: molecular genetics and biochemical pathogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. Mol Genet Metab 90:1–9

Rizzo WB, Carney G (2005) Sjogren–Larsson syndrome: diversity of mutations and polymorphisms in the fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH3A2). Hum Mutat 26:1–10

Rizzo WB, Craft DA (2000) Sjogren–Larsson syndrome: accumulation of free fatty alcohols in cultured fibroblasts and plasma. J Lipid Res 41:1077–1081

Rizzo WB, Dammann AL, Craft DA (1988) Sjogren–Larsson syndrome. Impaired fatty alcohol oxidation in cultured fibroblasts due to deficient fatty alcohol: nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase activity. J Clin Invest 81:738–744

Rizzo WB, Carney G, Lin Z (1999) The molecular basis of Sjogren–Larsson syndrome: mutation analysis of the fatty aldehyde dehydrogenase gene. Am J Hum Genet 65:1547–1560

Rogers GR, Rizzo WB, Zlotogorski A, Hashem N, Lee M, Compton JG, Bale SJ (1995) Genetic homogeneity in Sjogren–Larsson syndrome: linkage to chromosome 17p in families of different non-Swedish ethnic origins. Am J Hum Genet 57:1123–1129

Rogers GR, Markova NG, De Laurenzi V, Rizzo WB, Compton JG (1997) Genomic organization and expression of the human fatty aldehyde dehydrogenase gene (FALDH). Genomics 39:127–135

Sakai K, Akiyama M, Watanabe T, Sanayama K, Sugita K, Takahashi M, Suehiro K, Yorifuji K, Shibaki A, Shimizu H (2006) Novel ALDH3A2 Heterozygous mutations in a Japanese family with Sjogren–Larsson syndrome. J Invest Dermatol 126:2545–2547

Shibaki A, Akiyama M, Shimizu H (2004) Novel ALDH3A2 heterozygous mutations are associated with defective lamellar granule formation in a Japanese family of Sjogren–Larsson syndrome. J Invest Dermatol 123:1197–1199

Sillen A, Anton-Lamprecht I, Braun-Quentin C, Kraus CS, Sayli BS, Ayuso C, Jagell S, Kuster W, Wadelius C (1998) Spectrum of mutations and sequence variants in the FALDH gene in patients with Sjogren–Larsson syndrome. Hum Mutat 12:377–384

Sjogren T, Larsson T (1957) Oligophrenia in combination with congenital ichthyosis and spastic disorders; a clinical and genetic study. Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl 113:1–112

Willemsen MA, L IJ, Steijlen PM, Rotteveel JJ, de Jong JG, van Domburg PH, Mayatepek E, Gabreels FJ, Wanders RJ (2001a) Clinical, biochemical and molecular genetic characteristics of 19 patients with the Sjogren–Larsson syndrome. Brain 124:1426–1437

Willemsen MA, Rotteveel JJ, de Jong JG, Wanders RJ, L IJ, Hoffmann GF, Mayatepek E (2001b) Defective metabolism of leukotriene B4 in the Sjogren–Larsson syndrome. J Neurol Sci 183:61–67