



**Associazione Un Vero Sorriso
Onlus**
via Morghen, 5
10143 - Torino

Torino, 01/07/2010

Oggetto: presentazione progetto di ricerca anno 2010

**Titolo: Studio degli effetti dei glucocorticoidi in modelli cellulari neuronali di
Atassia Telangiectasia**

Responsabile: *Dott. Alfredo Brusco*

Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, via Santena 19, 10126 Torino, Tel.
011.6706664, Fax. 011.6706582, e-mail: alfredo.brusco@unito.it

Timbro e firma del responsabile scientifico

Dott. Alfredo Brusco

*Ricercatore, Facoltà di Medicina
Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica
Università degli Studi di Torino*



Abstract

L'Atassia Telangiectasia e' una rara patologia genetica neurodegenerativa, causata da mutazioni nel gene *ATM*. La causa della malattia è legata a mutazioni nel gene *ATM* che portano all'assenza o all'alterato funzionamento della proteina da esso codificata.

Ad oggi, nell'Atassia Telangiectasia non esiste una terapia in grado di arrestare la progressione dell'atassia e revertire il fenotipo patologico. L'introduzione delle molecole antiossidanti, quali vitamina E, vitamina C, N-acetilcisteina e acido alfa-lipoico nella dieta dei pazienti AT non si e' dimostrata una terapia palliativa efficace.

Studi recenti hanno evidenziato che la somministrazione del betametasone per via orale e' in grado di migliorare i sintomi neurologici dell'AT. Il nostro progetto si propone di studiare i meccanismi molecolari attraverso i quali il betametasone e il dexametasone possano agire a livello cellulare. In particolare questi studi verranno condotti in un modello di cellule staminali neuronali silenziate per il gene *ATM* in modo da ricreare in vitro una situazione simile a quella presente nelle cellule nervose dei pazienti AT. Nella seconda parte del progetto verra' effettuata l'analisi di espressione genica sulle cellule neuronali a seguito del trattamento con glucocorticoidi per individuare la possibile attivazione o inibizione di geni o gruppi di geni.

Il progetto potrà portare all'individuazione di bersagli terapeutici da studiare in futuri progetti.



Background

L'AtassiaTelangiectasia (A-T) è una rara patologia autosomica recessiva con incidenza variabile da 1:40.000 a 1:100.000 nati vivi, caratterizzata dall'insorgenza in età pediatrica di sintomi atassici, grave compromissione del sistema immunitario, ed elevata predisposizione alle neoplasie di origine linfatica. Sono inoltre spesso presenti tipiche dilatazioni dei capillari oculari e sulle guance (telangiectasie) da cui prende il nome la malattia (Gatti et al. 1988). La malattia è caratterizzata a livello cellulare dal fenomeno della radiosensibilità: le cellule dei pazienti sottoposte a basse dosi di radiazioni ionizzanti non sono in grado di riparare i danni alla doppia elica e muoiono.

Le basi genetiche dell'Atassia-Telangiectasia sono state chiarite nel 1995, quando nei pazienti sono state scoperte mutazioni a carico del gene *ATM*, sul cromosoma 11q23 (Savitsky et al. 1995). La proteina ATM è ubiquitaria, ma i suoi livelli sono particolarmente elevati nel sistema nervoso, nella milza e nel timo. La porzione carbossi-terminale presenta una forte omologia con altre proteine ad attività cinasica di tipo Fosfotidilinositolo 3 kinasico (PI-3K), ed è coinvolta in diversi eventi regolatori che comprendono il controllo del ciclo cellulare e dei sistemi di riparazione del DNA in risposta ad agenti ionizzanti.

La causa della malattia è quindi legata all'assenza o all'alterato funzionamento della proteina ATM. Per questo le mutazioni più frequenti portano, come atteso, alla mancata espressione della proteina per inserimento sul mRNA di un codone di stop (mutazioni troncanti), per piccole delezioni e alterazioni di *splicing* che rendono i trascritti anomali instabili e quindi soggetti a degradazione prima di essere tradotti in proteina.

Il nostro laboratorio si occupa da più di dieci anni di diagnostica molecolare dell' Atassia Telangiectasia. Attualmente la ricerca di mutazioni in *ATM* viene svolta attraverso l'impiego combinato di diverse metodiche che comprendono l'analisi di quattro marcatori microsatelliti fiancheggiati e interni al gene per lo studio degli aplotipi associati a mutazioni ricorrenti, l'analisi della porzione codificante la proteina ATM mediante DHPLC (esoni 4-65) e lo studio delle delezioni/duplicazioni mediante la tecnica MLPA. Il gene *ATM*, che ha un trascritto di quasi 10.000 basi, è uno tra i geni più grandi finora noti. La ricerca delle mutazioni responsabili dell'inattivazione della proteina ATM è perciò assai



complessa e richiede la messa a punto di numerosi test da effettuare per ciascun soggetto.

L'utilizzo di tutte queste tecniche ci ha permesso di trovare il 97% delle mutazioni nella casistica di pazienti AT giunti fino ad oggi nel nostro laboratorio. Questa percentuale è al momento una delle più alte registrate tra tutti i laboratori nel mondo che si occupano della diagnostica dell'Atassia Telangiectasia. (Cavalieri et al, 2006; Cavalieri et al.,2008).

Dati preliminari e basi di partenza del progetto

Com'è noto dalla letteratura, non esiste ad oggi una terapia efficace per la cura dell'Atassia Telangiectasia. Studi recenti hanno evidenziato che la somministrazione del betametassone per via orale è in grado di migliorare i sintomi neurologici dell'AT. In alcuni casi i risultati sembrano sorprendenti, poiché si è osservata una completa reversione del fenotipo atassico con conseguente miglioramento delle funzioni neurologiche, anche se alla sospensione del trattamento la malattia è ritornata allo stadio pre-trattamento (Buoni, Zannolli et al. 2006; Gatti and Perlman 2009;). Purtroppo questa terapia presenta molti limiti legati alla durata incerta dell'effetto terapeutico e alla comparsa di effetti collaterali. L'interesse per questi risultati ha suggerito una migliore valutazione delle conseguenze che la terapia con glucocorticoidi potrebbe avere a lungo termine sui pazienti, e la determinazione del dosaggio ottimale e delle possibili variazioni nella dose terapeutica. Quali possono essere a livello cellulare i meccanismi attraverso i quali queste molecole agiscono? Al momento non esistono studi in proposito che permettano di capire meglio come funzionano i corticosteroidi.

Da recenti dati di letteratura è emerso che il betametassone possa avere un'effetto sulle capacità antiossidanti delle cellule AT. Ciò è stato di recente suggerito in un lavoro pubblicato sulla rivista *European Journal of Neurology* da Russo e coll. (Russo, Cosentino et al. 2009). Gli autori misurano i livelli intracellulari di glutatione, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), e la perossidazione lipidica in 6 pazienti AT trattati con betametassone per 10 giorni. Una riduzione marcata nei livelli ROS è stata osservata in uno dei pazienti, suggerendo che meccanismi antiossidanti possono giocare un ruolo

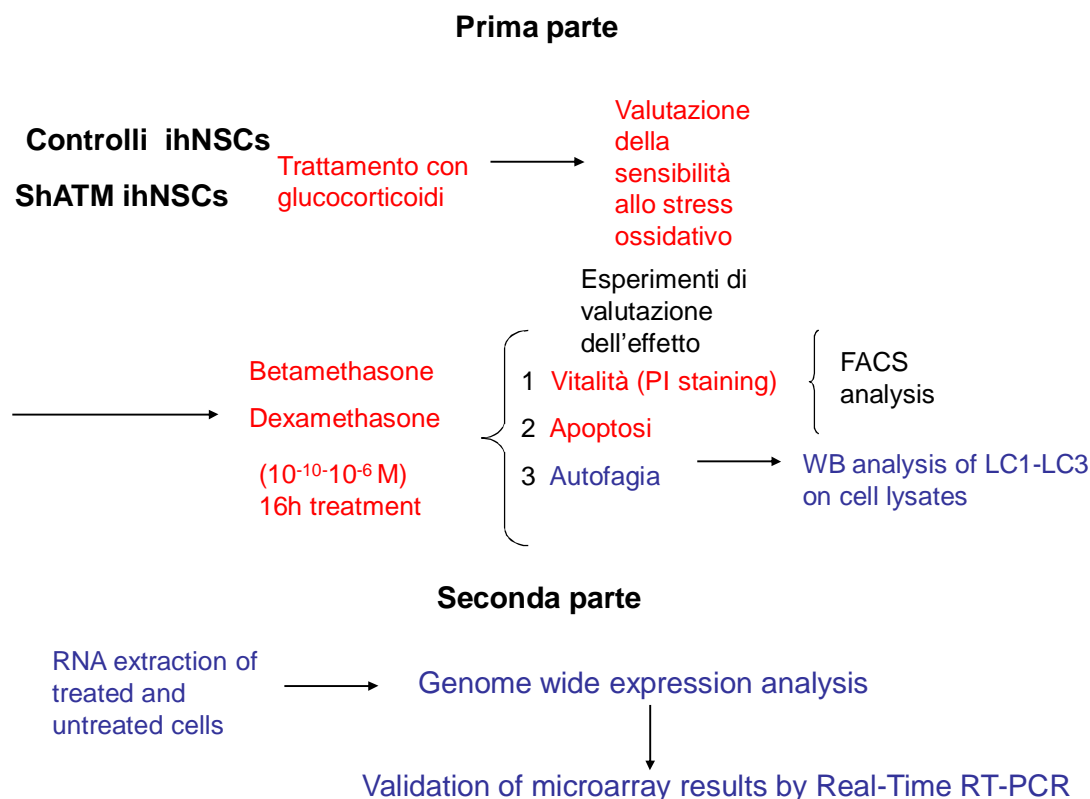


nel miglioramento delle funzioni cerebellari. Comunque, come in precedenti studi in cui sono stati somministrati i glucocorticoidi per un tempo limitato, dopo 7 giorni dall'interruzione del betametassone, i ROS ritornano a livelli patologici.

Questo studio suggerisce quindi che i livelli di ROS possono essere utilizzati come riferimento nell'indicare se i glucocorticoidi possano avere un effetto protettivo delle cellule nei confronti dello stress ossidativo.

Sviluppo del progetto

Il razionale del progetto e' schematizzato nella figura sottostante.



La prima parte del progetto sara' focalizzata sullo studio dell'attivita' di due glucocorticoidi, il betametassone e il dexametassone (che da effetti collaterali meno gravi del betametassone in vivo) su linee cellulari di derivazione neuronali.

Questo studio verra' condotto in collaborazione con il gruppo del Dottor Domenico Delia,



direttore del dipartimento di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Europeo dei Tumori di Milano. Nel suo laboratorio sono state sviluppate in vitro linee stabili di cellule staminali neuronali che in presenza di opportuni fattori di crescita sono in grado di differenziarsi nei diversi tipi cellulari neuronali (neuroni, astrociti, oligodendrociti) (Carlessi et al.2009).Inoltre da queste stesse cellule staminali e' stata creata anche una linea con deficit di ATM come modello per lo studio dei meccanismi neuropatogenetici collegati al deficit di proteina ATM. In queste ultime il gene ATM e' stato silenziato (ovvero spento) artificialmente cosi' da creare una situazione simile a quella presente nelle cellule nervose dei pazienti AT.

Sia le cellule staminali di controllo che quelle con deficit di ATM verranno trattate in vitro con diverse dosi di beta e dexametasone (da 10^{-10} a 10^{-6} M, in base a dati di letteratura presenti nell'articolo di Bruscoli et al. 2006) e indotte a differenziare. A seguito del trattamento saranno valutati prima di tutto la vitalita' cellulare e l'effetto neurogenico e gliogenico delle due molecole. Successivamente verra' valutata la risposta all'apoptosi e i meccanismi di autofagia attraverso analisi delle proteine coinvolte in questo meccanismo cellulare (LC1 e LC3).

Contemporaneamente verra' valutata il possibile ruolo protettivo di tali steroidi in risposta a stress genotossico ed ossidativo trattando preventivamente le cellule con il Dietilmaleato (DEM), una sostanza che crea condizioni di stress ossidativo. In pratica, a seguito dell'incubazione delle cellule con DEM verranno valutati sia la vitalita' cellulare che alcuni parametri biochimici quali i livelli di GSH (glutazione ridotto) per studiare la risposta delle cellule allo stress ossidativo. Le stesse cellule a seguito del trattamento con DEM verranno incubate con dosi crescenti di beta e dexametasone per valutarne il possibile effetto antiossidante.

Parte seconda

La seconda parte del progetto che verrebbe interamente svolta nel nostro laboratorio, prevede la realizzazione di un saggio di espressione genica "genome-wide" per valutare quali geni possano essere differenzialmente espressi a seguito del trattamento con glucocorticoidi e in quali pathways essi agiscono: ad esempio nella risposta al danno del



DNA, nel controllo del ciclo cellulare e nell'apoptosi, nella risposta infiammatoria . Questa analisi verrà effettuata su campioni di RNA estratti dalle cellule staminali neuronali sia di controllo che con deficit della proteina ATM. L'espressione genica verrà valutata su estratti di RNA provenienti dalle colture cellulari non trattate o trattate per 16 h con diverse dosi di beta e dexametasone. L'RNA estratto verrà quantificato e la purezza sarà controllata corsa su gel e Bioanalyzer. L'analisi di espressione genica verrà effettuata attraverso l'impiego del " Whole Human Genome Microarray Kit" 4x44K dell'Agilent Thecnologies che contiene 44.000 sonde a RNA localizzate lungo l'intero trascrittoma. Questa tecnologia microarray per lo studio dei profili di espressione genica rappresenta un sistema "highthroughput" per l'indagine di tutta la porzione codificante del genoma. L'interesse di tale analisi riguarda la possibilità di individuare geni differenzialmente espressi nelle cellule trattate e non trattate, la cui diversa risposta ai glucocorticoidi potrebbe portare alla attivazione o inibizione di geni o di "cluster" di geni. I risultati ottenuti dall'analisi di espressione saranno successivamente validati attraverso l'impiego della Real Time PCR.

Conclusioni

Con questo lavoro ci proponiamo di studiare i meccanismi molecolari attraverso i quali i glucocorticoidi agiscono in modelli di linee cellulari neuronali e individuare eventuali geni la cui espressione possa essere condizionata da tali molecole. In particolare vogliamo valutare le differenze fra cellule senza il gene ATM e cellule normali. Le proteine codificate dai geni variabilmente espressi a seguito del trattamento con beta e dexametasone potrebbero diventare dei "targets" per possibili approcci terapeutici nella cura dell'Atassia Telangiectasia.

Bibliografia

- Gatti RA et al. (1988) "Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23", Nature (336) 577-580.
- Bruscoli et al. (2006) DNA-damage response, survival and differentiation in vitro of a human neural stem cell line in relation to ATM expression. Eur J. Pharmacology (529) 63-



70.

Buoni, S., R. Zannolli, et al. (2006). "Betamethasone and improvement of neurological symptoms in ataxia-telangiectasia." Arch Neurol 63(10): 1479-82.

Gatti, R. A. and S. Perlman (2009). "A proposed bailout for A-T patients?" Eur J Neurology 16(6): 653-5.

Russo, I., C. Cosentino, et al. (2009). "In ataxia-teleangiectasia betamethasone response is inversely correlated to cerebellar atrophy and directly to antioxidative capacity." Eur J Neurology 16(6): 755-9.

Cavaliere S et al. (2006) ATM Mutations In Italian Families With Ataxia Telangiectasia Include Two Distinct "Large Genomic Deletions". Human.Mutation, 925 (Mutation in Brief).

Cavaliere S et al. (2008). Large genomic Mutations within the ATM gene detected by MLPA, including a duplication of 41 kb from exon 4 to 20. Annals of Human Genetics Annals of Human Genetics, 72(Pt1).10-8

Savitsky K et al. (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. Science (268) 1700-1.

Carlessi et al.(2009) DNA-damage response, survival and differentiation in vitro of a human neural stem cell line in relation to ATM expression.Cell Death and Differentiation (16) 795-806.

Richiesta Fondi

Spese per reagenti (colture cellulari e biologia molecolare)	€ 10.000
Spese per personale, 1° anno	€ 25.000
Spese per analisi di espressione genica "genome wide"	€ 10.000
Spese per piccola strumentazione	€ 3.000
Spese congressuali e missioni varie	€ 2.000
Totale	€ 50.000