



Associazione "Gli amici di Valentina"
via C.L.N. 42/A
10095 - Grugliasco (TO)

Gent.li famiglie dell'Associazione,

Come per l'anno in corso, anche per il prossimo anno la nostra attività di laboratorio procederà da un lato portando avanti l'attività di diagnostica sui nuovi casi di Atassia Telangiectasia e dall'altro sviluppando un progetto di ricerca incentrato sullo studio dell'effetto dei corticosteroidi sul comportamento in vitro di cellule di derivazione neuronale.

Parte Prima. L'attività di Diagnostica

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. 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). Inoltre dallo scorso anno abbiamo introdotto un altro test diagnostico basato sull'analisi della fosforilazione della proteina SMC1 da parte di ATM a seguito dell'irraggiamento delle cellule dei pazienti con raggi gamma. Questo test è in grado di identificare sia i soggetti AT che i portatori, analisi quest'ultima di grande importanza per stabilire il rischio di avere un figlio affetto da AT.

Parallelamente alla diagnostica di AT abbiamo iniziato anche l'analisi del gene SETX che codifica per la proteina senataxina, le cui mutazioni sono responsabili di una



patologia piu' recente scoperta, (AOA2). Quest'ultima patologia condivide con l'Atassia Teleangiectasia non solo segni clinici quali l'atassia cerebellare, le telangiectasie, la disartria, il nistagmo, la neuropatia periferica, ma anche elevati livelli di alfa-feto proteina, uno dei marcatori biochimici che differenziano l'A-T dalle altre atassie cerebellari recessive.

Per questo motivo in molti casi diventa difficile discriminare dal punto di vista diagnostico le due malattie e nel caso di pazienti negativi per A-T , ma con alfa-fetoproteina elevata, potrebbe risultare utile indagare sulla AOA2.

Parte Seconda. L'attivita' di Ricerca

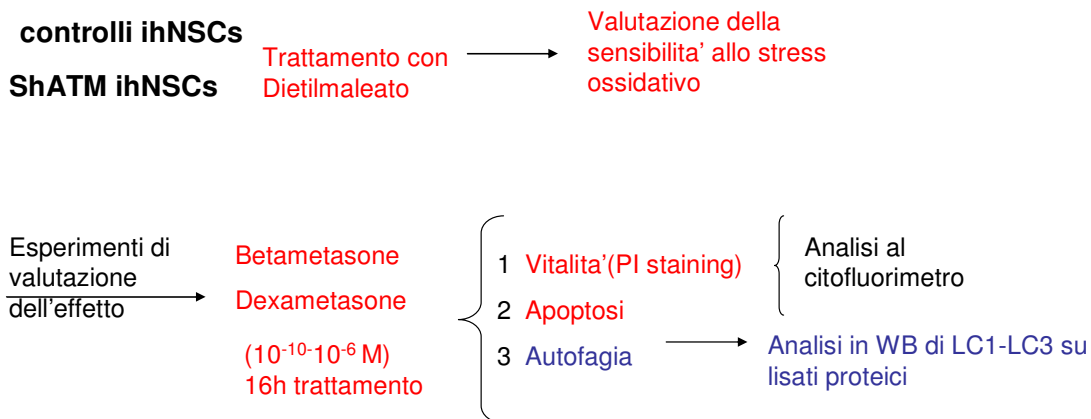
Com'è noto dalla letteratura, non esiste ad oggi una terapia efficace per la cura dell'Atassia Telangiectasia. Studi recenti hanno evidenziato che la somministrazione del betametassone per via orale e' in grado di migliorare i sintomi neurologici dell'AT. In alcuni casi i risultati sembrano sorprendenti, 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.

Il nostro progetto di ricerca si propone di studiare i possibili meccanismi molecolari attraverso i quali queste molecole agiscono a livello cellulare.

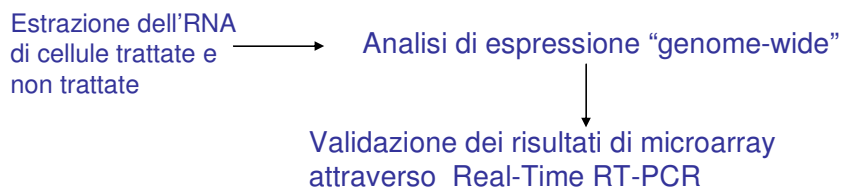
Il rationale del progetto, che verra' suddiviso in due parti, e' schematizzato nella figura sottostante.



Prima parte



Seconda parte



La prima parte del progetto sara' focalizzata sullo studio dell'attivita' di due glucocorticoidi, il betametasone e il dexametasone (che da effetti collaterali meno gravi del betametasone 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 vitalità cellulare e l'effetto neurogenico e gliogenico delle due molecole. Successivamente verrà valutata la risposta all'apoptosi e i meccanismi di autofagia attraverso analisi delle proteine coinvolte in questo meccanismo cellulare (LC1 e LC3).

Contemporaneamente verrà 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 vitalità cellulare che alcuni parametri biochimici quali i livelli di GSH (glutathione 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.

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 Technologies 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.

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-telangiectasia 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* 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.