

# Studio del trattamento di cellule di pazienti AT con corticosteroidi: implicazioni a livello cellulare e molecolare

## Introduzione:

L'Atassia Telangiectasia (A-T) è una rara patologia neurodegenerativa, associata a progressivo deficit neuronale come risultato dell'atrofia cerebellare, immunodeficienza, predisposizione ai tumori e infezioni polmonari ricorrenti. Ad oggi, nell'Atassia Telangiectasia, così come in altre patologie ad essa correlate, non esiste una terapia in grado di arrestare la progressione del danno neurodegenerativo. Sebbene esistano dati in vitro sull'effetto protettivo di molecole antiossidanti quali vitamina E, vitamina C, N-acetilcisteina e acido alfa-lipoico, l'introduzione nella dieta di queste sostanze, non ha dimostrato un miglioramento sensibile dei sintomi. Non è stato tuttavia mai valutato l'effetto a lungo termine di queste sostanze.

Negli ultimi anni, sono stati pubblicati diversi studi effettuati da gruppi italiani che hanno dimostrato come la somministrazione per via orale di corticosteroidi sia in grado di migliorare i sintomi neurologici nei pazienti A-T (Buoni et al. Arch.Neurol.2006; Broccoletti et al. Eur.Journal of Neurology, 2010). Nello studio più recente sono state valutate le dosi minime terapeutiche del betametassone in grado di contenere gli effetti collaterali del farmaco (Prof Claudio Pignata, Dipartimento di Pediatria dell'Università di Napoli). Sei pazienti A-T trattati hanno dato una risposta positiva al trattamento con betametassone anche a dosi molto basse di 0.01 mg/Kg/die, corrispondente al 10% della dose utilizzata in studi precedenti. In questo lavoro gli autori, oltre a descrivere il miglioramento dei sintomi neurologici dei pazienti (postura, deambulazione, linguaggio), hanno anche valutato, a livello molecolare, la variazione dei livelli di espressione dei recettori del glucocorticoidi (GR), espressi in tutti i tessuti, anche quello nervoso, in seguito al trattamento con il betametassone. I glucocorticoidi si legano e attivano i GR i quali si trasferiscono dal citoplasma al nucleo dove modulano una serie di geni che potrebbero essere correlati ad esempio alla risposta infiammatoria delle cellule del sistema immunitario e alla risposta allo stress ossidativo a cui le cellule del sistema nervoso sono particolarmente sensibili. Nei pazienti A-T, l'inattivazione della proteina ATM che ha la funzione di trasduttore in grado di mediare la risposta al danno al DNA, può portare all'accumulo nella cellula di DNA danneggiato e all'alterazione dell'equilibrio ossidoreduztasico.

Pur essendo ormai noti gli effetti che i corticosteroidi hanno a livello del fenotipo clinico grazie alla loro attività antinfiammatoria, non è noto quali siano i meccanismi molecolari e

cellulari attraverso i quali tali farmaci agiscono. Per questo motivo, lo scopo del nostro progetto sarà quello di studiare alcuni meccanismi biologici che sono alterati nelle cellule dei pazienti A-T e verificare se e in che modo il trattamento con corticosteroidi possa portare al ripristino delle alterate funzioni biologiche responsabili della risposta al danno cellulare e allo stress ossidativo.

### **Materiali e metodi:**

Per effettuare questi studi è necessario scegliere il modello cellulare più adatto e facilmente reperibile. Nel nostro laboratorio vengono da anni preparate linee linfoblastoidi derivate dai linfociti di sangue periferico dei pazienti A-T. Le linee linfoblastoidi non possono essere trattate con corticosteroidi, in quanto è nota da tempo la capacità di tali molecole di uccidere queste cellule (Koeffler et al. Cell Death and Differentiation 2004). Per questa ragione abbiamo deciso di utilizzare fibroblasti, ovvero cellule derivate da piccoli prelievi di cute. Poiché nella nostra banca cellulare non è presente al momento una sola linea di fibroblasti, acquisteremo queste cellule presso il *Coriell Institute for Medical Research (USA)*, un istituto americano di ricerca biomedica del New Jersey (USA). Tutti gli esperimenti verranno condotti anche su fibroblasti di controlli sani.

Il progetto di ricerca sarà articolato in quattro diversi punti per comprendere meglio attraverso quali meccanismi i corticosteroidi possano avere un effetto:

1. Valutazione della vitalità cellulare prima e dopo il trattamento con diverse dosi di betametasone a tre diverse tempistiche ( 8, 16 e 24 ore). In base al risultato di questo primo esperimento verranno valutate le due concentrazioni di farmaco e le tempistiche più consone da utilizzare nei successivi esperimenti. Il numero delle cellule vive e morte verrà valutata mediante conta diretta delle cellule con Trypan Blue, un colorante in grado di attraversare la membrana plasmatica solo delle cellule in cui vi sia stata alterazione a suo carico.

Questa analisi serve a verificare l'effetto tossico o sulla sopravvivenza dei corticosteroidi a diverse dosi, in pazienti A-T e controlli (tempistica: 1 mese) .

2. Analisi del livello delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) prima e dopo trattamento delle stesse cellule con diverse concentrazioni di corticosteroidi. È noto che nelle cellule

dei pazienti A-T l'inattivazione della proteina *ATM*, che ha la funzione di mediare la risposta al danno al DNA, può portare all'accumulo nella cellula di DNA danneggiato e all'alterazione del suo equilibrio ossidoreduztasico. La principale conseguenza è l'accumulo dei ROS che non vengono correttamente eliminati e che possono causare intossicazione e morte cellulare. La valutazione dei livelli intracellulari di ROS può essere effettuata con diverse metodiche. Una di esse prevede l'impiego del fluoroforo H<sub>2</sub>DCFDA (2'-7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFDA) che misura i livelli intracellulari di perossido di idrogeno. Nel caso delle cellule in adesione, la fluorescenza emessa dal fluoroforo verrà visualizzata al microscopio confocale contando le cellule fluorescenti (tempistica 3 mesi).

3. L'Aumento dei ROS all'interno della cellula può causare diverse alterazioni, dall'aumento dell'apoptosi e morte cellulare all'insorgenza di anomalie a carico di alcuni organelli cellulari quali ad esempio i mitocondri, deputati alla produzione di energia attraverso la fosforilazione ossidativa. Numerosi studi hanno confermato che la mancanza della proteina ATM causa alterazioni dell'omeostasi mitocondriale con conseguente aumento della mitofagia (ovvero accumulo dei mitocondri anomali) ed aumento della produzione dei ROS.

Questo terzo punto dello studio valuterà la capacità dei corticosteroidi di agire come molecole protettive all'interno della cellula. La misurazione di livelli di apoptosi e morte cellulare verrà effettuata sia mediante misurazione dell'attività delle caspasi, proteine intracellulari che si attivano specificamente nella cellula in fase apoptotica, sia mediante analisi citofluorimetrica dopo colorazione con il propidio ioduro. Per misurare la mitofagia, verrà effettuata un'analisi frazionata delle proteine estratte dai fibroblasti e sulla frazione mitocondriale saranno misurati i livelli della proteina LC3-II che viene indotta dallo stimolo autofagico (tempistica: 6 mesi).

4 Realizzazione di un saggio di analisi dell'espressione genica "genomewide" 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 da fibroblasti di pazienti e di controlli trattati e non trattati con diverse dosi del farmaco

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 per l’indagine di tutta la porzione codificante del genoma. L’interesse per tale analisi riguarda la possibilita’ di individuare geni differenzialmente espressi in cellule trattate e non trattate la cui diversa risposta ai glucocorticoidi potrebbe portare all’attivazione di geni o “cluster” di geni.

5 Derivazione di cellule staminali pluripotenti dai fibroblasti dei pazienti AT. Il meccanismo di riprogrammazione cellulare e’ da anni impiegato in molte patologie neurodegenerative dove le cellule di derivazione neuronale sono il miglior modello per comprendere i meccanismi patogenetici della malattia. Purtroppo e’ quanto mai improbabile, a meno che non si analizzino dei reperti biotici, avere la possibilita’ di studiare le cellule nervose dei pazienti. Le cellule staminali pluripotenti possono essere generate in vitro trasfettando i fibroblasti dei pazienti con fattori di trascrizione che rendono queste cellule simili alle staminali embrionali. Quest’ultime, sotto opportuni fattori di crescita neuronali, possono essere successivamente differenziate in cellule staminali neuronali.

La possibilita’ di avere un simile modello cellulare ci permettera’ in futuro di verificare tutti gli esperimenti precedentemente condotti sulle linee di fibroblasti e quindi studiare gli effetti dei corticosteroidi proprio sulle cellule di derivazione neuronale dei pazienti.

## **Conclusioni**

La comprensione dei meccanismi attraverso i quali i glucocorticoidi agiscono a livello sia cellulare che molecolare potrebbe portare ad un miglioramento delle strategie terapeutiche da attuare in successivi trial clinici, sia nel campo dell’Atassia Telangiectasia che di altre patologie neurodegenerative. Inoltre, lo studio del trattamento con corticosteroidi delle cellule staminali neuronali derivate dai fibroblasti dei pazianti A-T potrebbe aiutare ancor di piu’ a comprendere come mai, proprio a livello delle cellule del sistema nervoso l’effetto dei corticosteroidi sia cosi’ eclatante.