

TITOLO DEL PROGETTO: Valutazione del ruolo citoplasmatico della chinasi ATM nel pathway lisosomiale-autofagico e sua implicazione patogenetica nella sindrome Atassia-Teleangectasia: potenziale effetto modulatore del Betametassone.

INTRODUZIONE

L'Atassia-Teleangectasia (AT) (MIM #208900) è una rara patologia autosomica recessiva caratterizzata da neurodegenerazione cerebellare con perdita delle cellule di Purkinje, teleangectasie oculocutanee ed immunodeficienza (1). Tale disordine è dovuto a mutazioni a carico del gene Ataxia Teleangectasia Mutated (*ATM*) che codifica per una serin/treonina chinasi coinvolta nel ciclo cellulare e nel riparo di rotture a doppio filamento del DNA.

ATM è principalmente una proteina nucleare ma, recenti evidenze indicano una sua possibile localizzazione nel citoplasma di cellule di Purkinje murine (3,4). Inoltre è stato dimostrato che *ATM*, a livello del citoplasma e delle regioni sinaptiche dei neuroni murini, lega VAMP2 e la sinapsina, proteine di membrana vescicolari (5), sostenendo così un ruolo di *ATM* nel processo di esocitosi. Le cellule di pazienti affetti da AT e le cellule di topi mutanti *Atm*^{-/-} mostrano accumuli anomali di lisosomi (4) e difetti dell'esocitosi. È anche noto che, in assenza di *ATM*, possono essere presenti anomalie delle vescicole intracellulari e/o del trasporto proteico che conducono ad alterazioni della funzione endosomiale (6), indicando in tal modo un ruolo di *ATM* nel citoplasma, indipendentemente dalla sua funzione nucleare.

Recenti evidenze suggeriscono, inoltre, che *ATM* giochi un ruolo importante nel pathway dell'autofagia. Infatti, in presenza di elevati livelli di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), *ATM* attiva il tumor suppressor TSC2 che, a sua volta, inattiva mTORC1 mediante LKB1/AMPK, inducendo così i meccanismi autofagici (8).

Recentemente, è stato dimostrato che il Transcription Factor EB (TFEB) controlla la biogenesi e la funzionalità lisosomiale e la formazione degli autofagosomi regolando positivamente i geni del network Coordinated Lysosomal Expression and Regulation (CLEAR) come *VPS11*, *VPS18*, *ATG9B*, *SOSTM1*, *UVRAG*, *WIPI*, *MAPLC3B* (10,11). TFEB è inoltre richiesto per l'espressione di un vasto numero di geni posti sotto il controllo di mTORC1. mTORC1 è un importante regolatore della crescita cellulare e agisce in risposta a specifici nutrienti che sono in grado di indirizzarlo sulla superficie dell'endosoma/lisosoma tardivo.

Recentemente abbiamo documentato un miglioramento indotto dei sintomi neurologici in pazienti affetti da AT trattati con un breve ciclo di Betametasone per os (12) e, in netto contrasto con il ben noto effetto immunosoppressivo dei glucocorticoidi, un incremento paradossale della risposta proliferativa dei linfociti allo stimolo mitogenico, che risulta in genere severamente ridotta nei pazienti con AT (13). L'IL-7R α , che esercita un effetto pro-proliferativo sui linfociti, è stato riconosciuto come un gene indotto dai glucocorticoidi (14). L'IL-7R α viene trasportata o al complesso tardivo endosoma-Golgi, attraverso gli endosomi e i corpi multivescicolari, per essere espressa sulla superficie cellulare o ai lisosomi per essere degradata.

Studi recenti condotti da McLeod et al. hanno mostrato che l'IL-7R α , dopo esser stata internalizzata, viene riciclata sulla superficie cellulare oppure degradata e che Vps34, la PI3K di classe III, gioca un ruolo fondamentale nel trasporto intracellulare dell'IL-7R α (15). Di conseguenza, linfociti T mancanti di Vps34 mostrano un'aumentata morte cellulare e presentano una ridotta espressione di IL-7R α sulla membrana.

Dati preliminari suggeriscono una anomalia nel processo dell'autofagia in linfociti isolati dai pazienti con AT. In particolare, la microscopia a trasmissione di elettroni (TEM) ha rivelato un numero aumentato di vescicole autofagiche e mitocondri. Abbiamo ipotizzato che l'effetto paradossale che basse dosi di Betametasone determinano sulla proliferazione dei linfociti possa essere correlato ad una up-regulation del gene codificante per la citochina proliferativa IL-7R α , che è stata riconosciuta come un gene inducibile dai glucocorticoidi, in maniera dose-dipendente (14). Dunque, abbiamo valutato con esperimenti preliminari la risposta proliferativa in vitro alla stimolazione con IL-7 nei pazienti con AT. I dati hanno mostrato che i linfociti raccolti da pazienti affetti da AT mostrano un'anomala risposta proliferativa alla stimolazione con IL-7.

OBIETTIVI

Scopo di questo progetto è di chiarire il ruolo citosolico di ATM ed, in particolare, nel traffico vescicolare e nel trasporto proteico, nuovi aspetti patogenetici dell'AT e la possibilità di modulare mediante farmaci le funzioni cellulari alterate. Gli scopi specifici sono:

1. Valutazione del ruolo della frazione citosolica dell'ATM nell'ambito del pathway autofagico-lisosomiale nell'AT;
2. Valutazione del ruolo di TFEB nel network Coordinated Lysosomal Expression and Regulation (CLEAR) nell'AT.

Inoltre sarà valutato il potenziale effetto modulatore del Betametasone.

PROGRAMMA DI RICERCA, DISEGNO DELLO STUDIO E METODI

Il progetto verrà condotto in due fasi, come di seguito riportato:

Nella prima fase, saranno identificati e saranno raccolti i campioni di pazienti affetti da AT seguiti presso l'UOC di Immunologia Pediatrica e/o presso altri Centri IPINET. Saranno create linee cellulari EBV, isolate proteine nucleari/citoplasmatiche ed RNA a partire da cellule ematiche mononucleate periferiche (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells). Le PBMCs isolate saranno utilizzate per il saggio di proliferazione in vitro al fine di valutare come le cellule rispondono allo stimolo con IL-7. Estenderemo lo studio con TEM a tutti i nuovi pazienti reclutati e ai controlli, in collaborazione con il Laboratorio Polishchuk presso il Telethon Institute for Genetic and Medicine (TIGEM) di Napoli. Per valutare l'integrità del pathway citoplasmatico mediato da ATM nel processo dell'autofagia, effettueremo un Western Blot (WB) sulle seguenti proteine: ATM, LKB1, AMPK, TSC2, Rheb, mTORC1, 4EBP1, p70S6K e p-p70S6K e sulle loro forme fosforilate nei lisati cellulari frazionati. Allo scopo di verificare se l'ATM può interagire con mTORC1, effettueremo una co-immunoprecipitazione di ATM ed mTORC1 seguita da un'analisi WB. Inoltre, per verificare la co-localizzazione delle due proteine sui lisosomi, isoleremo i lisosomi dai linfociti con kit per anticorpi specifici per l'ATM e mTORC1. Infine, per verificare che l'autofagia sia alterata nell'AT, verrà effettuata una analisi WB di LC3 e una analisi in microscopia confocale su cellule che coesprimono LAMP e LC3.

In una seconda fase, analizzeremo il possibile ruolo di TFEB nel processo dell'autofagia nei pazienti con AT. Inoltre, per comprendere appieno il potenziale coinvolgimento di ATM nei pathways che governano il traffico intracellulare, valuteremo la distribuzione subcellulare di TFEB e pTFEB in presenza ed in assenza di inibitori di mTORC1 (RAD001, rapamicina, TORIN1/2) tramite WB sui lisati cellulari. Effettueremo anche una real-time PCR per valutare il livello di espressione dei geni implicati nel traffico intracellulare dell'IL-7R \rightarrow per i quali un ruolo regolatorio da parte di TFEB non è chiaro.

Inoltre, tenuto conto che i neuroni e i linfociti condividono numerosi pathway che regolano il traffico intracellulare e che entrambi i tipi di cellule sono coinvolti nell'AT, useremo in vitro culture di linfociti e linee cellulari indotte da EBV ottenute da pazienti affetti da AT come modello per i nostri esperimenti. Tutti gli esperimenti descritti saranno effettuati in presenza e in assenza del trattamento con Betametasone.

L'analisi dei dati sarà eseguita mediante metodi standard di tipo statistico.

POTENZIALI BENEFICI CLINICI

Benefici per il paziente.

Recenti lavori clinici hanno documentato un effetto benefico prodotto dal Betametasone nei pazienti con AT, che è stato correlato con l'estensione dell'atrofia cerebellare e l'età del paziente. Dunque, l'identificazione di un potenziale sito d'azione degli steroidi nell'AT aprirà la strada ad un nuovo spettro di interventi clinici in tale disordine, attualmente non curabile. Infine, l'identificazione di un'anomalia nel pathway autofagico-lisosomiale nell'AT sarà estremamente utile nell'identificare strategie terapeutiche e nuovi bersagli farmacologici.

Benefici per la comunità medica.

Una migliore comprensione delle alterazioni specifiche che causano l'AT sarà molto utile per migliorare lo specifico approccio clinico a questa patologia. Una più dettagliata conoscenza delle alterazioni molecolari dei pathways coinvolti nel signalling dell'ATM contribuirà ad aprire una nuova finestra di interventi nell'ambito delle strategie terapeutiche per l'AT.

Benefici per la comunità scientifica.

È già stato mostrato che anomalie dell'autofagia sono implicate in altri disordini neurodegenerativi, come la malattia di Parkinson o la malattia di Alzheimer. La dimostrazione che le alterazioni del pathway autofagico-lisosomiale siano implicate nella patogenesi dell'AT potrà profondamente contribuire a chiarire il ruolo delle molecole citosoliche nella biologia cellulare e nella patogenesi.

COSTI DELLA RICERCA

Il piano di ricerca sarà portato a termine entro un anno e il budget richiesto è di 30.000 €.

Budget dettagliato	(€)
Reagenti	
Anticorpi	5.000
Dispositivi sterili	1.000
Oligonucleotidi per PCR	6.000
Radioisotopi	1.000
Reagenti chimici	1.000
Assay Kits	2.500
Reagenti per test di proliferazione	1.000
Equipment	
Apparecchio per elettroforesi su gel di poliacrilamide e agarosio	2.600
Termociclo per PCR	3.000
Computer portatile	1.000
Computers e softwares	2.000
Stampante e scanner	700
Hard disk	500
Costi di viaggio	
Meeting ESID biennale e meeting FOCIS annuale	2.000
Altre spese	
Raccolta e spedizioni di campioni, data management	700
COSTI TOTALI	30.000

BIBLIOGRAFIA

1. Sedgwick RP, Boder E. Ataxia-Telangiectasia. Handbook of Clinical Neurology. New York: Elsevier;1991.
2. Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008; 9:759-69.
3. Kuljis RO, Chen G, Lee EY, Aguila MC, Xu Y. ATM immunolocalization in mouse neuronal endosomes: implications for ataxia-telangiectasia. Brain Res.1999;842:351-8.

4. Barlow C, Ribaut-Barassin C, Zwingman TA, Pope AJ, Brown KD, Owens JW, et al. ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:871-6.
5. Li J, Han YR, Plummer MR, Herrup K. Cytoplasmic ATM in neurons modulates synaptic function. *Curr Biol*. 2009;19:2091-6.
6. Lim DS, Kirsch DG, Canman CE, Ahn JH, Ziv Y, Newman LS, et al. ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:10146-51.
7. Yang DQ, Halaby MJ, Li Y, Hibma JC, Burn P. Cytoplasmic ATM protein kinase: an emerging therapeutic target for diabetes, cancer and neuronal degeneration. *Drug Discov Today*. 2011;16:332-8.
8. Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, et al. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:4153-4158.
9. Sardiello M, Palmieri M, Di Ronza A, Medina LD, Valenza M, Gennarino VA, et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*. 2009;325:473-7.
10. Settembre C, Ballabio A. TFEB regulates autophagy: an integrated coordination of cellular degradation and recycling processes. *Autophagy*. 2011;7:1379-81.
11. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Arencibia MG, Vetrini F, Erdin S, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*. 2011;332:1429-33.
12. Broccoletti T, Del Giudice E, Amorosi S, Russo I, Di Bonito M, Imperati A, et al. Steroid-induced improvement of neurological signs in ataxia-telangiectasia patients. *Eur J Neurol*. 2008;15:223-8.
13. Broccoletti T, Del Giudice E, Cirillo E, Vigliano I, Giardino G, Ginocchio VM, et al. Efficacy of Very-low-dose betamethasone on neurological symptoms in ataxia-telangiectasia. *Eur J Neurol*. 2011;18:564-70.
14. Franchimont D, Galon J, Vacchio MS, Fan S, Visconti R, Frucht DM, et al. Positive effect of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. *J Immunol*. 2002;168:2212-18.
15. McLeod IX, Zhou X, Li QJ, Wang F, He YW. The class III kinase Vps34 promotes T lymphocyte survival through regulating IL-7R α surface expression. *J Immunol*. 2011;187:5051-61.