



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

Titolo del progetto:

Corticosteroidi nei pazienti con Atassia Telangiectasia (A-T):
effetto del dexametasone sull'attività delle cellule A-T.

Responsabili scientifici:

Dott. Alfredo Brusco e Dott.ssa Simona Cavalieri

Indirizzo:

Via Santena 19, 10126 Torino, Tel. 011.6334480, Fax. 011.6706582, e-mail:
alfredo.brusco@unito.it

Istituto ospitante:

Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Torino

Direttore: Prof. Franco Veglio



INTRODUZIONE

Ad oggi, non esiste una terapia in grado di curare o arrestare la progressione dell'Atassia Telangiectasia (A-T), una rara malattia genetica autosomica recessiva. Il trattamento con antibiotici e/o l'infusione periodica di immunoglobuline vengono impiegati per ridurre il rischio di infezioni ricorrenti, mentre l'introduzione di composti antiossidanti, quali vitamina E, vitamina C, N-acetilcisteina e acido alfa-lipoico nella dieta dei pazienti A-T si è dimostrata solo una terapia palliativa incapace di alleviare i sintomi neurologici.

Negli ultimi anni sono stati pubblicati studi che hanno dimostrato che il trattamento con basse dosi di glucocorticoidi (betametasona e dexametasona) sono in grado di ridurre i sintomi neurologici in pazienti affetti da Atassia Telangiectasia e possibilmente ritardare la naturale progressione della malattia (Broccoletti *et al.* 2011; Giardino *et al.* 2013; Zannolli *et al.* 2012). Il loro impiego deve essere tuttavia valutato in considerazione dei possibili effetti collaterali, legati al tempo e alla dose di somministrazione. Una delle strategie proposte per limitare gli effetti collaterali dei glucocorticoidi, si basa su un sistema di somministrazione a rilascio modificato (EryDex) sviluppato dal gruppo del Professor Magnani (Università di Urbino). I glucocorticoidi (in particolare il dexametasona) sono introdotti, *ex vivo*, nei globuli rossi del paziente. Questi ultimi sono reinfusi nel paziente stesso, e rilasciano gradualmente il dexametasona in circa 30 giorni (Magnani and Rossi 2014). Utilizzando questo approccio è stato recentemente condotto uno trial clinico di Fase II che ha coinvolto 22 pazienti A-T in due centri italiani per sei mesi (Roma e Brescia). I risultati preliminari ottenuti hanno dimostrato un'ottima tollerabilità del farmaco e un miglioramento dei sintomi neurologici, in particolare nei pazienti con fenotipo più lieve (Chessa *et al.* 2014).

Se tramite questi studi è stato confermato un possibile effetto dei corticosteroidi nel modificare alcuni segni neurologici della malattia, non è chiaro quali siano i meccanismi molecolari e cellulari attraverso i quali tali farmaci agiscano.

I glucocorticoidi sono noti per le loro proprietà antiinfiammatorie e sono stati recentemente impiegati nel trattamento di patologie sia neurometaboliche che neurodegenerative.

Durante il workshop internazionale sull'Atassia Telangiectasia, tenutosi a Pechino (Cina) dall'11 al 14 ottobre 2015, sono stati presentati diversi lavori che hanno evidenziato come l'Atassia Telangiectasia non sia solo una patologia neurodegenerativa, ma anche



mitocondriale e metabolica. Il gene ATM (mutato nei malati) produce una proteina utile non solo alla risposta al danno al DNA ma anche coinvolta in numerosi processi che controllano la risposta allo stress ossidativo (dato dall'accumulo delle specie reattive dell'ossigeno che sono tossiche per la cellula), la carenza di fattori nutritivi come glucosio e aminoacidi essenziali, e molti altri.

Questi lavori suggeriscono che il dexametasone possa avere un effetto sistemico su uno o più vie del segnale che coinvolgono ATM e che questo effetto non sia necessariamente diretto su ATM, ma su altre proteine che possono in parte vicariare la funzione di ATM in sua assenza.

SVILUPPO DEL PROGETTO

Scopo del nostro progetto sarà quello di indagare, all'interno delle principali vie di trasduzione del segnale in cui ATM svolge un ruolo chiave, quali effetti possano avere i glucocorticoidi. Utilizzeremo linee cellulari di pazienti A-T e controlli sani, in cui verranno studiate le risposte con e senza trattamento con glucocorticoidi.

Il progetto si articolerà in due parti principali in cui verranno valutati:

- La risposta al danno al DNA
- La risposta allo stress ossidativo

Parte Prima:

- Valutazione della risposta al danno al DNA in presenza di glucocorticoidi.

Il danno alla doppia elica del DNA può esser indotto da diversi stimoli, sia interni alla cellula che esterni, quali radiazioni ionizzanti (IR) e raggi UV. La cellula risponde alla formazione dei DSBs (Double Strand Breaks) attivando una serie di vie di trasduzione del segnale (Fig.1)

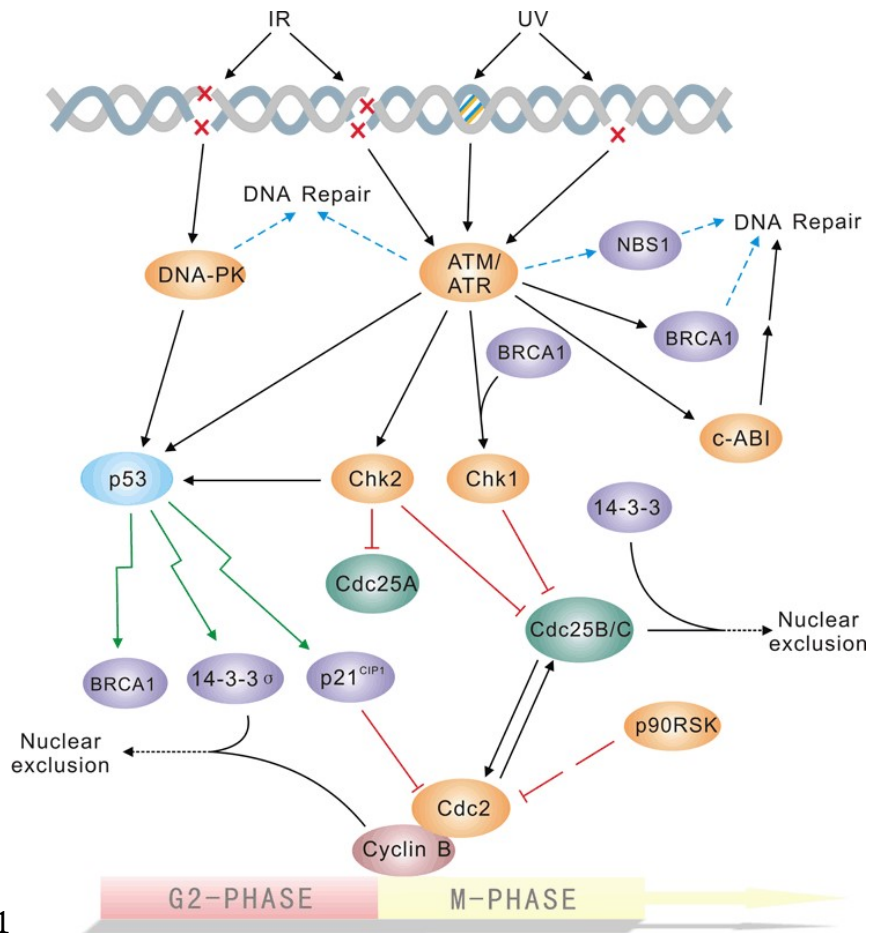


Fig.1

Come dimostrato in figura 1, parallelamente all'attivazione di ATM, vengono attivate direttamente altre proteine quali ATR e DNA-PK che a loro volta attivano altri effettori mediante fosforilazione in siti specifici. Dati di letteratura dimostrano come queste tre proteine, appartenenti alla famiglia delle PI3KK, abbiano un ruolo ridondante nella risposta al danno alla doppia elica. (Stiff et al. 2004; Jing An et al. 2010).

Dati preliminari condotti nel nostro laboratorio su tre linee di linfoblasti A-T hanno dimostrato che a seguito del trattamento con dose 0,1µM dexametasone per 48 ore è stato riscontrato un aumento della fosforilazione di H2AX, uno dei diretti effettori di ATM in risposta al danno alla doppia elica, anche in assenza di ATM stessa.

Questo risultato fa presupporre che l'attivazione di H2AX e di altre proteine che fanno parte della cascata del segnale di ATM, possa dipendere da altre proteine in grado di vicariare la funzione di ATM in sua assenza.



Materiali e Metodi:

- Trattamento delle linee linfoblastoidi di 6 pazienti A-T e 3 controlli sani con dose 0,1 μ M dexametasone per 48 ore e successivo irraggiamento (10Gy) per indurre danno al DNA
- a 48 ore dal trattamento analisi dell'eventuale aumento di l'espressione di DNA-PK mediante analisi Real-time PCR.
- a 72 analisi della fosforilazione di molecole effettori a valle di DNA-PK, quali H2AX e Chk2 in risposta al danno al DNA, mediante analisi di proteine in western blot.

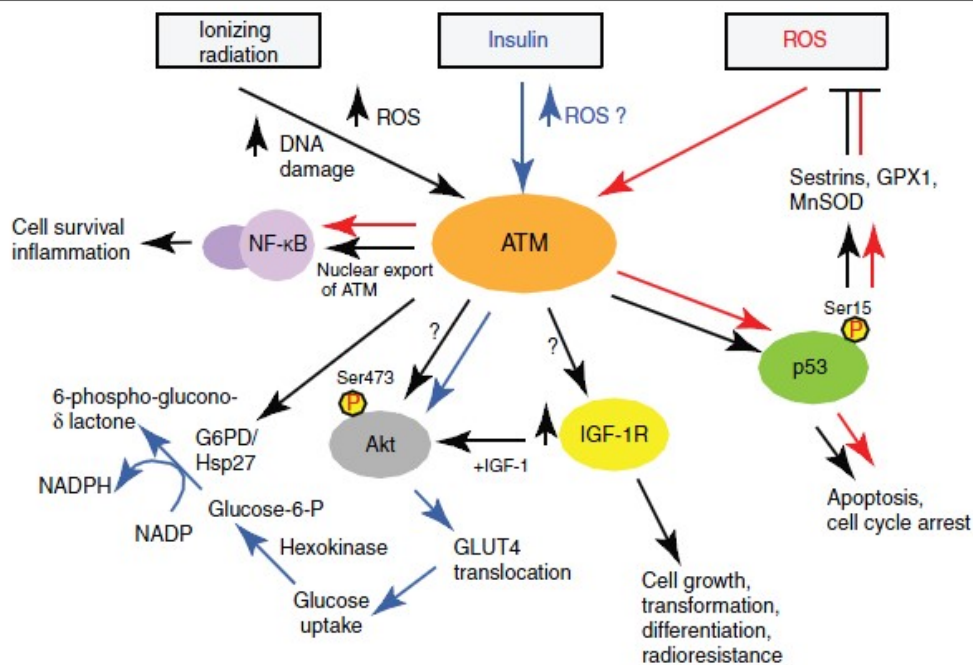
Parte Seconda:

- Valutazione della risposta allo stress ossidativo in presenza di glucocorticoidi.

La proteina ATM, in particolare la sua componente citoplasmatica, svolge un ruolo chiave nella risposta allo stress ossidativo, attivando vie di trasduzione del segnale totalmente indipendenti da quelle attivate in risposta al danno al DNA. Queste vie si attivano sia la risposta all'aumentato livello di ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno), sia alla variazione di componenti nutritizi quali il glucosio (Fig.2) (Alexander et al. 2010; Scott Ditch and Tanya Paull, 2012; Cosentino et al. 2011).

Nelle cellule dei pazienti A-T, la mancanza di ATM causa alterazione dell' equilibrio ossidoreduttasico. La principale conseguenza è l'accumulo dei ROS che non vengono correttamente eliminati e che possono causare intossicazione e morte cellulare, in particolare nelle cellule di derivazione neuronale, che nell'Atassia Telangiectasia sono le cellule maggiormente colpite dalla degenerazione.

In un lavoro recentemente pubblicato dal gruppo del Dott. Brusco in collaborazione con la dott.ssa Squadrone dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte (Squadrone et al. 2015, Neurobiology of Disease), abbiamo dimostrato come la presenza di alterati livelli di alcuni metalli quali rame e zinco che sono cofattori essenziali di enzimi antiossidanti, abbiano un ruolo fondamentale nella patogenesi della malattia. Inoltre in alcuni pazienti A-T è presente una alterazione dell'espressione dell'enzima mitocondriale catalasi (che aumenta) e dell'enzima citoplasmatico SOD1 (che diminuisce), entrambi correlati ad alterazioni dell'omeostasi cellulare e ad elevati livelli di ROS.



(Fig.2).

Alla luce di questi dati, nella seconda parte del nostro progetto valuteremo se il trattamento con glucocorticoidi possa avere un effetto sia sui livelli di ROS all'interno della cellula e sull'attività degli enzimi direttamente coinvolti nella risposta all'aumento dei ROS, sia sui livelli di espressione di proteine coinvolte in alcuni dei "pathways" cellulari (figura 2).

Materiali e Metodi:

- Trattamento delle linee linfoblastidi di 6 pazienti A-T e 3 controlli sani con dose 0,1 μ M Dexa per 48ore.
- Analisi dei livelli di espressione mediante Real-Time PCR di alcune proteine coinvolte nella risposta all'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) quali catalasi, manganese superossido dismutasi (MnSOD) e glutatione perossidasi (GPX1) e altre coinvolte nel metabolismo cellulare (Akt).

I risultati ottenuti dagli esperimenti condotti sulle linee linfoblastidi verranno validati anche su quattro linee di fibroblasti A-T la cui coltura è stata programmata per i prossimi mesi.

Questo perché alcune delle vie di trasduzione del segnale esaminate sono tessuto-specifiche, ovvero possono variare a seconda del tessuto preso in esame.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

Risultati attesi:

I risultati che ci attendiamo dallo svolgimento del progetto potrebbero verosimilmente aiutare a comprendere quale sia il possibile ruolo dei glucocorticoidi nelle cellule A-T . Questo ci permetterà di rendere più chiari i possibili risvolti nella terapia e permetterà di sviluppare nuove linee di trattamento.