

PROGETTI DI RICERCA PER L'ATASSIA FINANZIATI DA TELETHON CON CONCLUSIONE ANNO 2005

- WWW.ATASSIA.IT -

PAG. 2

**SOPRAVVIVENZA E MORTE CELLULARE
NELL'ATASSIA TELANGIECTASIA:
RUOLO DELL'INTERAZIONE ATM/ABL**
BARILÀ DANIELA

PAG. 3

**CARATTERIZZAZIONE DELLA FERRITINA
MITOCONDRIALE RECENTEMENTE
IDENTIFICATA:
IMPLICAZIONE PER L'ATASSIA DI
FRIEDREICH,
L'ANEMIA SIDEROBLASTICA ED ALTRI
DISORDINI CON SOVRACCARICHI
MITOCONDRIALI DI FERRO**
LEVI SONIA

PAG. 4

**IDENTIFICAZIONE DEL GENE
RESPONSABILE DI UNA NUOVA
FORMA DI ATASSIA
SPINOCEREBELLARE AUTOSOMICA
DOMINANTE**
BRUSCO ALFREDO

PAG. 5

**CLONAGGIO E IDENTIFICAZIONE DEI
GENI RESPONSABILI PER L'ATASSIA
DA GLUTINE E NEUROPATIE
CORRELATE**
VENTURA ALESSANDRO

PAG. 6

**XERODERMA PIGMENTOSO E ATASSIA
TELANGIECTASIA: CONNESSIONE
MOLECOLARE TRA "NUCLEOTIDE
EXCISION REPAIR (NER)" E
CHECKPOINT DA DANNO AL DNA**
MUZI FALCONI MARCO

PAG. 7

**MODELLI PER L'IDENTIFICAZIONE DI
GENI E FATTORI NELLA VIA DI
TRASDUZIONE ALTERATA IN
PAZIENTI CON ATASSIA
TELANGIECTASIA**
FOIANI MARCO

DULBECCO TELETHON INSTITUTE

ABSTRACT N. 53Responsabile: **DANIELA BARILÀ**Telethon grant N.: **TCP00061**Durata (anni): **5**Data d'inizio (anno): **2000****SOPRAVVIVENZA E MORTE CELLULARE NELL'ATASSIA TELANGIECTASIA: RUOLO DELL'INTERAZIONE ATM/ABL**

Barilà D. (1, 2), di Bari M.G. (1, 2), Cursi S. (1, 2), Stagni V. (1, 2) Rufini A. (2), Condò I (2), Testi R. (2)

(1) *Dulbecco Telethon Institute e*(2) *Laboratory of Immunology and Signal Transduction, Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, University of Rome "Tor Vergata", Via Montpellier, 1 00133 Rome, Italy. Tel: 06 72596507, Fax: 0672596505, E-mail: dbarila@dti.telethon.it, daniela.barila@uniroma2.it*

L'atassia telangiectasia è una malattia genetica caratterizzata da progressiva neurodegenerazione che determina l'atassia, elevata tumorigenesi ed immunodeficienza. Il gene responsabile di questa patologia codifica per una proteina di 350 Kda, denominata ATM, contenente un dominio di serina/treonina chinasi. ATM gioca un ruolo centrale nella risposta al danno del DNA, ma il suo ruolo fisiologico è ancora ampiamente sconosciuto. Il nostro obiettivo è studiare il ruolo di ATM nella morte cellulare programmata indotta da danno al DNA e da stimolo dei recettori di morte. La tirosina chinasi c-Abl è un substrato ed un effettore noto di ATM. In seguito a danno del DNA, ATM viene attivata e fosforila c-Abl determinandone induzione dell'attività chinasi nel nucleo. L'attivazione di c-Abl nel nucleo cellulare svolge un ruolo attivo nel controllo dell'apoptosi in risposta a danno del DNA. I nostri studi sono quindi mirati a chiarire i meccanismi molecolari che consentono di modulare la morte cellulare programmata ed in particolare il ruolo delle tirosine chinasi non recettoriali in questa risposta. Il nostro lavoro ha quattro obiettivi principali: 1) studiare il ruolo di ATM in una via di traduzione del segnale puramente apoptotica come la morte da stimolo dei recettori di morte Fas e TNF. Abbiamo osservato che lo stimolo dei recettori di morte determina anche l'attivazione caspasi dipendente di ATM. I nostri risultati sono estremamente interessanti perché indicano per la prima volta un possibile ruolo di ATM nella traduzione del segnale a valle dei recettori di morte. Questa via di trasduzione del segnale gioca un ruolo importante nella selezione del sistema immunitario. Il nostro lavoro è mirato a comprendere il ruolo di ATM in questa risposta e ad identificare i suoi substrati rilevanti. 2) Abbiamo identificato c-Abl come substrato diretto di caspasi, sia in seguito a stimolo dei recettori di morte Fas e TNF, che in seguito a trattamento delle cellule con agenti che danneggiano il DNA. Il taglio da caspasi produce la rimozione del segnale di esporto nucleare di c-Abl e il conseguente accumulo di c-Abl nel nucleo dove la sua attività ha un effetto apoptotico (Barilà et al., 2003). 3) Analizzare l'effetto di proteine acetiltransferasi sulla modulazione della localizzazione cellulare e della funzione di Abl. 4) Caratterizzare il ruolo delle tirosine chinasi non recettoriali nel controllo dell'attività enzimatica delle caspasi. Abbiamo identificato per la prima volta una caspasi come substrato nuovo della tirosina chinasi Src. Caspasi-8, una caspasi iniziatrice fondamentale per la trasduzione del segnale apoptotico a valle dei recettori di morte, viene fosforilata da Src. Tale fosforilazione ne inibisce l'attività enzimatica, e conferisce alle cellule un'a certa resistenza alla morte indotta da stimolo del recettore Fas. I nostri studi ci hanno consentito di identificare la fosforilazione di caspasi-8 come un nuovo marker dei tumori umani del colon e suggeriscono un nuovo meccanismo attraverso il quale le tirosine chinasi della famiglia di Src contribuiscono allo sviluppo dei tumori e regolano la morte cellulare.

Referenze:

1) Barilà, D., A. Rufini, I. Condò, Ventura N., Dorey K., Superti-Furga G., and Testi R. (2003). Caspase-dependent cleavage of

INFORMAZIONI TRATTE:
Fonte: TELETHON - www.telethon.it**AISA - ASSOCIAZIONE ITALIANA PER LA LOTTA
ALLE SINDROMI ATASSICHE - www.atassia.it -**Pubblicazione: Paolo Zengara
© AISA 2006

c-Abl contributes to apoptosis. Mol Cell Biol. 23:2790-2799.

2) Baskaran, R., L.D. Wood, L.L. Whitaker, C.E. Canman, S.E. Morgan, Y. Xu, C. Barlow, D. Baltimore, A. Wynshaw-Boris, M.B. Kastan, and J.Y.J. Wang. 1997. Ataxia telangectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. Nature. 387:516-519.

3) Shafman, T., K.K. Khanna, P. Kedar, K. Spring, S. Kozlov, T. Yen, K. Hobson, M. Gatel, N. Zhang, D. Watters, M. Egerton, Y. Shiloh, S. Kharbanda, D. Kufe, and M.F. Lavin. 1997. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. Nature. 387:520-523.

4) Shiloh, Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nat Rev Cancer. 3:155-167.

PROGETTI DI RICERCA TELETHON - MALATTIE NEUROMUSCOLARI

ABSTRACT N. 78

Responsabile: **SONIA LEVI**
Telethon grant N.: **GP0075Y01**
Totale €: **123.950**
Centri: **1**
Durata (anni): **3**
Data d'inizio (anno): **2001**

CARATTERIZZAZIONE DELLA FERRITINA MITOCONDRIALE RECENTEMENTE IDENTIFICATA: IMPLICAZIONE PER L'ATASSIA DI FRIEDREICH, L'ANEMIA SIDEROBLASTICA ED ALTRI DISORDINI CON SOVRACCARICHI MITOCONDRIALI DI FERRO

Levi S. (1), Corsi B. (1), Campanella A.(1), Santambrogio P. (1), Cozzi A. (1), Sanvito F. (2), Olivieri S. (2), Taroni F. (3), Biasiotto G. (4), Arosio P. (4)

(1) Department of Biological and Technological Research, IRCCS H. San Raffaele, 20132 Milano, Tel. 0226434755; Fax 02-26434844, E-mail: levi.sonia@hsr.it

(2) Department of Pathology, IRCCS H. San Raffaele, Milano

(3) IRCCS C. Besta, Milano

(4) Section of Chemistry, Faculty of Medicine, University of Brescia

Base di partenza: Il sovraccarico di ferro mitocondriale genera stress ossidativo con produzione di radicali liberi che inibiscono la respirazione e degradano il mtDNA, promuovendo la morte cellulare. Abbiamo identificato nel mitocondrio una nuova proteina denominata ferritina mitocondriale (MtF), con caratteristiche strutturali e funzionali simili alla ferritina citosolica (1, 2). L MtF ha permesso lo studio del metabolismo del ferro mitocondriale e la messa a punto di sistemi atti a ridurre la tossicità del ferro in questo orfanello. I modelli cellulari utilizzati a tale scopo sono: HeLa, dove è stata over-espressa (3), anemia sideroblastica (SA), determinata da un'alterata sintesi dell'eme, atassia di Friedreich (FRDA), causata da deficienza genetica di fratassina, entrambi modelli cellulari di patologie caratterizzate da sovraccarico di ferro mitocondriale. Scopo: 1) studiare la funzione della MtF; 2) sviluppare modelli cellulari per lo studio della MtF nell'omeostasi del ferro mitocondriale e nella protezione dal danno ossidativo; 3) studiare l'espressione della MtF in tessuti normali e in condizioni patologiche associate al sovraccarico mitocondriale di ferro, es. FRDA e SA. Risultati: L'identificazione della MtF nei siderociti dei pazienti affetti da SA (4) e i dati raccolti dallo studio del modello di lievito di FRDA dove è stata espressa (5), suggeriscono che la MtF possa proteggere il mitocondrio dalla tossicità del ferro in eccesso. I risultati ottenuti da esperimenti condotti sul clone di HeLa che over-esprime la MtF (clone MtF) indicano che la proteina compete con la ferritina citosolica per l'incorporazione del ferro ed ha un ruolo attivo nel determinare la distribuzione del ferro intracellulare. Per verificare una sua eventuale azione di protezione delle cellule dal danno ossidativo mediato da ferro, abbiamo trattato il clone MtF con agenti ossidanti quali la H₂O₂ e l'antimicina A, ed abbiamo analizzato la vitalità cellulare e la funzionalità mitocondriale. Dopo trattamento con H₂O₂ le cellule che esprimono la MtF aumentano del 40% la vitalità cellulare, riducono di circa il 30% il livello delle specie radicaliche dell'ossigeno ed aumentano del 35% la produzione di ATP rispetto alle cellule che non esprimono MtF. La maggior parte degli effetti causati dal trattamento con Antimicina A, come il mancato rilascio del citocromo C dal mitocondrio o la riduzione dell'attività enzimatica degli enzimi Fe/S mitocondriale, sono ridotti dalla presenza di MtF; inoltre la deplezione di ATP risulta essere del 75% nelle cellule di controllo mentre è solo del 40 % nel clone MtF. Stiamo ora indagando, mediante analisi della sua espressione in linee di fibroblasti da pazienti con FRDA, se questo ruolo protettivo della MtF si espliciti anche in situazioni patologiche. Inoltre per definire il pattern d'espressione della proteina abbiamo analizzato i tessuti di topo con tecniche

immunoistochimiche. I risultati mostrano un'elevata espressione della proteina nel testicolo e negli spermatozoi e un minor livello della stessa in altri organi come nel cuore, cervello, midollo spinale, isole pancreatiche; nel fegato e nella milza, tessuti con funzioni di immagazzinamento del ferro, risulta invece essere non espressa. I dati sono confermati da analisi in blotting di preparazioni mitocondriali di tessuti di topo. Conclusioni. I dati ottenuti sui modelli cellulari confermano l'ipotesi che la MtF protegge i mitocondri dal danno ossidativo, probabilmente regolando localmente la disponibilità del ferro. Questa funzione è in accordo con la sua distribuzione, infatti, la sua espressione è ristretta ad un numero limitato di tipi cellulari e non è apparentemente in relazione alla funzione di immagazzinamento del ferro. L'espressione dell'MtF sembra essere elevata in tessuti con alta attività metabolica dove potrebbe proteggere i mitocondri dal danno ossidativo mediato dal ferro.

Referenze:

- 1) Levi S, Corsi B, Bosisio M, Invernizzi R, Volz A, Sanford D, Arosio P, Drysdale J. A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem.* 276(27), 24437-40, 2001.
- 2) Langlois D'Estaintot B, Santambrogio P, Granier T, Gallois B, Chevalier JM, Precigoux G, Levi S, Arosio P. Crystal Structure and Biochemical Properties of the Human Mitochondrial Ferritin and its Mutant Ser144Ala. *J Mol Biol.* 340(2): 277-93, 2004.
- 3) Corsi B, Cozzi A, Arosio P, Drysdale J, Santambrogio P, Campanella A, Biasiotto G, Albertini A, Levi S. Human mitochondrial ferritin expressed in HeLa cells incorporates iron and affects cellular iron metabolism. *J Biol Chem.* 277(25), 22430-7, 2002.
- 4) Cazzola M., Invernizzi R., Bergamaschi G., Levi S., Corsi B., Travaglio E., Rolandi V., Biasiotto G., Drysdale J., Arosio P. Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. *Blood*, 1;101(5):1996-2000, 2003.
- 5) Campanella A, Isaya G, O'Neill HA, Santambrogio P, Cozzi A, Arosio P, Levi S. The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin-deficient yeast. *Hum Mol Genet.* 13(19):2279-88, 2004.

PROGETTI DI RICERCA TELETHON - MALATTIE NEUROLOGICHE

ABSTRACT N. 184

Responsabile: **ALFREDO BRUSCO**
Telethon grant N.: **GGP04254**
Totale €: **95.000**
Centri: **1**
Durata (anni): **2**
Data d'inizio (anno): **2004**

IDENTIFICAZIONE DEL GENE RESPONSABILE DI UNA NUOVA FORMA DI ATASSIA SPINOCEREBELLARE AUTOSOMICA DOMINANTE

Alfredo Brusco (1), Claudia Cagnoli (1), Caterina Mariotti (2), Cinzia Gellera (2), Marco Seri (3), Alessandro Brussino (1), Chiara Michielotto (1), Roberto Fancellu (2), Daniela Di Bella (2), Franco Taroni (2), Nicola Migone (1), Stefano Di Donato (2)

(1) Dipartimento di Genetica Biologia e Biochimica, Università di Torino, via Santena 19- 10126 Torino, Italy.
Email: alfredo.brusco@unito.it

(2) Dipartimento di Biochimica e Genetica, Istituto Neurologico "C. Besta", Milano- Italy

(3) Dipartimento di Medicina Interna, Cardioangiologia ed Epatologia, Università degli Studi di Bologna

Le atassie spinocerebellari (SCA) sono un gruppo di disordini neurodegenerativi autosomici dominanti, caratterizzati da atassia cerebellare progressiva spesso associata con altri segni neurologici (Schols et al., 2004, Taroni et al., 2004). Le SCA sono geneticamente eterogenee ed attualmente sono suddivise in 25 sottotipi diversi, tutti con trasmissione autosomica dominante (SCA1-8, SCA10-23, SCA25, FGF14-SCA e DRPLA). Dodici di questi sottotipi sono assegnati a specifici geni (SCA1-3, 6-8, 10, 12, 14, 17, FGF14, e geni di DRPLA). La prevalenza di ogni SCA varia in differenti paesi, ed il 40-60% delle famiglie clinicamente identificate non ha mutazioni in alcun gene noto, ad indicare un'ampia eterogeneità genetica (Schols et al., 2004). Questi dati sono stati ulteriormente sostenuti da un nostro recente screening su 225 famiglie italiane SCA con eredità autosomica dominante che ha mostrato circa 40% dei pazienti senza mutazioni nei geni noti SCA1-3, 6-8, 10, 12, 17, né espansioni > 40 CAG nel loro genoma (Brusco et al., 2004). Per il progetto proposto, abbiamo raccolto una famiglia italiana di quattro generazioni (11 membri affetti e 14 non-affetti), in cui segrega una forma d'atassia cerebellare autosomica dominante a lenta progressione. I risultati preliminari della ricerca consistono in una descrizione clinica dettagliata della malattia, e un'analisi di esclusione di linkage per i loci SCA noti. L'età media all'inizio della malattia è di 19.5 anni (intervallo 12-36), e non vi

sono differenze significative fra le generazioni, suggerendo l'assenza di anticipazione. La malattia è caratterizzata da una progressione molto lenta; la maggior parte dei pazienti resta in grado di deambulare senza aiuto anche oltre i sessant'anni. La caratteristica più interessante è la presenza di anomalie di oculomozione. In 5 pazienti un era presente un grave nistagmo orizzontale evocato dallo sguardo, mentre nei pazienti restanti erano presenti movimenti saccadici lenti. Un'oftalmoparesi da moderata a severa era presente in sei su 11 pazienti, ed in 5 tra questi era anche presente una ptosi. Le risonanze magnetiche sul cervello hanno mostrato un'atrofia cerebellare che coinvolge il verme e gli emisferi cerebellari. Non era visibile alcun coinvolgimento del midollo allungato. Biopsie muscolari non hanno mostrato anomalie morfologiche e istoenzimatiche. Le analisi biochimiche sugli omogenati di muscolo hanno dimostrato una normale attività degli enzimi della catena respiratoria (complessi I-V), e un'analisi in Southern blot ha escluso la presenza di delezioni del DNA mitocondriale. Nei geni noti SCA1-3, 6-8, 10, 12, e 17 non sono presenti espansioni patogenetiche, ed un'analisi mediante Repeat Expansion Detection (RED) non ha rilevato ripetizioni CAG/CTG >40 triplette. Abbiamo inoltre effettuato un'analisi di linkage ai loci SCA4, SCA5/20, SCA11, SCA13-16, SCA18, SCA19/22, SCA21, SCA25, e FGF14-SCA con calcolo del LOD score a due punti e multipoint, e la ricostruzione degli aplotipi. Tutti i loci noti sono risultati esclusi. Recentemente è stata avviata un'analisi di linkage sull'intero menoma (genomewide screening) usando ~380 marcatori fluorescenti del linkage mapping set 2.5 (Applera) in grado di coprire i 22 autosomi. La valutazione completa dei risultati è in corso. I valori stimati di LOD score tramite simulazione sono a teta= 0.00 Z=4.64, 4.26 e 3.30 rispettivamente con valori di penetranza 90%, 80% e 50%. I valori di LOD score sono tutti sopra il valore suggerito di 3.0. La regione critica sarà ulteriormente ristretta studiando marcatori supplementari nei soggetti ricombinanti, ed il gene malattia verrà ricercato con un approccio gene candidato.

Referenze:

- 1) Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurology* 2004;3:291-304.
- 2) Taroni F, Di Donato S. Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:641-655.
- 3) Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, et al. Molecular genetics of hereditary ataxia. *Arch Neurol* 2004;61:727-733.

PROGETTI DI RICERCA TELETHON - ALTRE MALATTIE GENETICHE

ABSTRACT N. 196

Responsabile: **ALESSANDRO VENTURA**
 Telethon grant N.: **E.1270**
 Totale €: **185.925**
 Centri: **2**
 Durata (anni): **3**
 Data d'inizio (anno): **2000**

CLONAGGIO E IDENTIFICAZIONE DEI GENI RESPONSABILI PER L'ATASSIA DA GLUTINE E NEUROPATIE CORRELATE

Ventura A (1), Tongiorgi E (2), Boscolo S (2), Sblattero D (2), Stebel M (2), Sarich A (2), Lorenzon A (2), Rui V (2), Marzari R (2), Baldas V (1), Not T (1)

(1) *IRCSS Burlo Garofolo, Trieste*

(2) *BRAIN Centre for Neuroscience, Dep. of Biology, University of Trieste*

Il morbo celiaco (MC) è una malattia autoimmune molto frequente provocata dall'ingestione di glutine; circa il 10% dei pazienti MC sviluppano patologie neurologiche tra cui atassia, neuropatia periferica, mielopatia, demenza ed epilessia. Sono state riportate associazioni di queste patologie nello stesso paziente e molti pazienti neurologici sono stati dimostrati essere dei malati celiaci criptici in quanto non mostrano aperti sintomi gastrointestinali. Molti pazienti sviluppano anticorpi contro la gliadina, componente del glutine, ma è stato proposto un meccanismo autoimmune poiché i pazienti sviluppano anche anticorpi contro la transglutaminasi tissutale, antigene self. Tuttavia non è chiaro il meccanismo di queste malattie e la natura dell'associazione con il MC. Scopo del progetto: A) scoprire quali tipi di cellule del sistema nervoso centrale vengono riconosciute dai sieri di pazienti celiaci; B) clonare e sequenziare i

cDNA delle proteine del sistema nervoso centrale riconosciute dagli autoanticorpi; C) clonare e sequenziare i cDNA degli autoanticorpi e sviluppare nuovi test diagnostici; D) determinare gli effetti in vitro degli autoanticorpi su colture cellulari neuronali

Scopo A) Abbiamo trovato che i sieri di pazienti celiaci producono marcature specifiche su sezioni di cervello di ratto, rispetto ai sieri di donatori sani. Abbiamo raccolto le immagini di queste marcature in un database denominato "Trieste-Autoimmune Brain Atlas" (TABA), accessibile sul WEB all'indirizzo <http://dbiodbs.univ.trieste.it/TABA/main>. Il database contiene anche le immagini quelle prodotte da sieri di pazienti affetti da gluten ataxia, diabete, sclerosi multipla, neurolupus, stiff man syndrome e di varie forme di epilessia idiopatica che sono sospettate avere una relazione con la celiachia (Hadjivassiliou et al., 2002, Boscolo et al., 2005a,b). Scopo B) È stata creata una genoteca di cDNA da cervello di ratto e dopo screening mediante sieri e anticorpi purificati di pazienti celiaci sono stati isolati 15 cloni. Scopi C e D) Librerie anticorpali fagiche di IgA sono state ottenute da linfociti ottenuti da sangue periferico e da biopsia intestinale da una paziente con celiachia e atassia. Due diverse classi di anticorpi anti transglutaminasi tissutale sono state isolate dalla sola libreria ottenuta da biopsia intestinale (classe 1 e classe 2). La classe 2 è risultata positiva per la marcatura su cervello di ratto e su topo transgenico tTG -/- a dimostrazione che questi anticorpi riconoscono specifiche strutture del cervello di ratto e topo che non sono la tTG stessa. Anticorpi monoclonali purificati scFv di classe 1 e 2 sono stati iniettati intraventricolarmente in topi C57black e gli effetti sulla loro capacità motoria sono stati studiati con il test del rotarod. Entrambi gli anticorpi diminuiscono significativamente ($P < 0.002$) la performance motoria dei topi a 3h e 6h post-inoculo e si osserva un ritorno vicino alle condizioni di piena performance a 24h (Boscolo et al., 2005c).

Referenze:

1) Hadjivassiliou M., Boscolo S, Davies-Jones G.A.B., Grünwald R.A., Not T., Sanders D.S., Simpson J.E., Tongiorgi E., Williamson C.A. and Woodroffe M.N. (2002) The humoral response in the pathogenesis of gluten ataxia. *Neurology* 58:1221-1226
2) Boscolo S., Baldas V., Gobbi G., Giordano L., Cioni G., Not T., Ventura A., Tongiorgi E. (2005a) Anti-brain but not celiac disease antibodies in Landau-Kleffner Syndrome and related epilepsies. *J. Neuroimmunol.* in press.
3) Boscolo S, Baldas V, Cancelli I, Hadjivassiliou M, Ventura A and Tongiorgi E. (2005b) Standardization of a semi-quantitative immunohistochemical method to detect anti-brain serum autoantibodies in patients with neurological diseases. SUBMITTED.
4) Boscolo S, Lorenzon A, Sarich A, Passoni M, Rui V, Not T, Stebel M, Ventura A, Hadjivassiliou M and Tongiorgi E. (2005c) Gluten ataxia: passive transfer in a mouse model. SUBMITTED.

PROGETTI DI RICERCA TELETHON - ALTRE MALATTIE GENETICHE

ABSTRACT N. 253

Responsabile: **MARCO MUZI FALCONI**
Telethon grant N.: **GGP030406**
Totale €: **193.200**
Centri: **1**
Durata (anni): **3**
Data d'inizio (anno): **2003**

XERODERMA PIGMENTOSO E ATASSIA TELANGIECTASIA: CONNESSIONE MOLECOLARE TRA "NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR (NER)" E CHECKPOINT DA DANNO AL DNA

Michele Giannattasio, Federico Lazzaro, Paolo Plevani, Marco Muzi-Falconi

Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Unniversità degli Studi di Milano, Via Celoria 26, 20131

Milano tel. 0250315036, fax 0250315044, E-mail: marco.muzifalconi@unimi.it

La risposta al danno al DNA è un evento critico per le cellule esposte ad agenti genotossici. È stato provato che difetti nelle vie di trasduzione del segnale coinvolte nella reazione al danno al DNA, sono associate a sindromi genetiche come l'Ataxia telangiectasia, Xeroderma pigmentosum, sindrome di Cockayne e altri. Il checkpoint da danno al DNA è un meccanismo di sorveglianza attivato dalla lesione al DNA ed è rivolto al mantenimento della stabilità genomica. Questo è considerato come una cascata di trasduzione del segnale che coinvolge l'attivazione di un set di proteine chinasi e la trasmissione e amplificazione del segnale attraverso diversi eventi di fosforilazione. Abbiamo isolato un mutante di lievito che è specificamente difettivo nell'attivazione del checkpoint in risposta a radiazioni UV. Questo mutante è allelico a RAD14, l'omologo di XPA umano, coinvolto nel riconoscimento della lesione durante il Nucleotide Excision Repair (NER). Abbiamo dimostrato un'interazione fisica tra Rad14 e il complesso PCNA-like, coinvolto nei primi step dell'attivazione del checkpoint. I nostri dati suggeriscono che il riconoscimento della lesione da parte di Rad14 non è sufficiente per l'attivazione del checkpoint, ma il processamento, effettuato da fattori riparativi, è richiesto per questa attivazione. Inoltre abbiamo ottenuto una versione mutata di Rad14 ancora in grado di riparare le lesioni indotte da radiazioni UV, ma difettive nell'interazione con le proteine di checkpoint e che non è in grado di attivare la cascata di trasduzione del segnale. Questi dati confermano che l'interazione fisica tra il NER e i fattori di checkpoint è effettivamente importante per la risposta cellulare al danno al DNA. Infine, abbiamo analizzato mutazioni in diversi altri geni riparativi. I nostri dati rivelano che quando il NER non è in grado di intervenire, come nel caso di pazienti XP, il checkpoint G1 e G2 in risposta agli UV non è in grado di essere attivato. Inoltre se manca solamente il ramo del transcription coupled repair, come nei pazienti CS, il checkpoint è normalmente attivato dalle radiazioni UV, suggerendo una possibile interpretazione per le differenze fenotipiche osservate in pazienti di differenti sindromi NER. Recentemente abbiamo identificato un nuovo pathway che sembra essere funzionale in cellule che sono mantenute in condizioni non proliferanti. Questo meccanismo è mediato da rotture del DNA indotte da UV e porta all'attivazione del checkpoint in assenza di NER. Le richieste genetiche per questo pathway devono ancora essere investigate.

PROGETTI DI RICERCA TELETHON - ALTRE MALATTIE GENETICHE

ABSTRACT N. 254

Responsabile: **MARCO FOIANI**
 Telethon grant N.: **GGP030412**
 Totale €: **170.900**
 Centri: **1**
 Durata (anni): **3**
 Data d'inizio (anno): **2003**

MODELLI PER L'IDENTIFICAZIONE DI GENI E FATTORI NELLA VIA DI TRASDUZIONE ALTERATA IN PAZIENTI CON ATASSIA TELANGIECTASIA

Marco Foiani, Chiara Lucca, Elisa Ferrari, Enrica Amicucci

Fondazione Istituto F.I.R.C. di Oncologia Molecolare, Via Adamello 16, 20139, Milano, Italy, and DSBB, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 26, 20133, Milano, Italy. Tel. +39-02-574303238, Fax. +39-02-574303244, E-mail: marco.foiani@ifom-ieo-campus.it

La proteina ATM appartiene ad una famiglia altamente conservata di chinasi che svolgono un ruolo essenziale nell'attivazione del checkpoint in seguito a danneggiamento del DNA, coordinando la progressione del ciclo cellulare con la replicazione, la ricombinazione e la riparazione del danno. Pazienti con alterazioni nel gene ATM sono affetti dalla malattia ereditaria recessiva Ataxia Telangiectasia (A-T), caratterizzata da instabilità genomica, immunodeficienza, invecchiamento precoce e predisposizione all'insorgenza di tumori. Una manifestazione peculiare della sindrome A-T è la presenza di difetti neurologici: pazienti A-T, infatti, soffrono di degenerazione progressiva delle cellule nervose, che inizia in età giovanile a partire dalle cellule cerebellari del Purkinje. Questa evidenza, insieme all'osservazione che cellule derivate da pazienti A-T mostrano segni di stress ossidativo cronico, suggerisce che il ruolo svolto da ATM non sia limitato al nucleo. Nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* la proteina Mec1, ortologa di ATM, e i trasduttori a valle Rad53 e Dun1, sono parte della cascata di checkpoint che, come nelle cellule umane, è richiesta per prevenire l'instabilità genomica. Mutazioni a carico di ognuno di questi fattori causano un accumulo di cellule petite, suggerendo quindi difetti nel mantenimento dell'integrità del genoma mitocondriale. Abbiamo usato il lievito *S. cerevisiae* come sistema modello per indagare il ruolo del pathway di checkpoint nel controllo della fisiologia del mitocondrio. In particolare, abbiamo analizzato il contributo dei geni di checkpoint nel controllo del fenomeno chiamato mitochondrial DNA escape (MDE). Questo processo è stato descritto in cellule di organismi sia animali che vegetali, ed è stato proposto che i frammenti di mtDNA, integrandosi nei cromosomi, contribuiscano non solo all'evoluzione, ma siano anche causa di instabilità del genoma. I risultati ottenuti mostrano un aumento dei livelli di MDE in cellule recanti un particolare allele di rad53; al contrario, la delezione del gene dun1 risulta in una diminuzione di MDE. Inoltre, stiamo indagando il contributo del livello di dNTPs al MDE, dal momento che la replicazione del DNA mitocondriale è particolarmente sensibile alla carenza di nucleotidi. Per chiarire questo aspetto, abbiamo costruito ceppi di lievito nei quali il gene SML1 è stato deletato. Studi recenti hanno inoltre chiarito il ruolo essenziale che le proteine di checkpoint svolgono nella stabilizzazione delle forche replicative; questo aspetto diviene ancora più evidente quando la replicazione è rallentata o bloccata, per la presenza di regioni particolarmente difficili da replicare, o a causa di un danno al DNA. Il genoma mitocondriale è caratterizzato dalla presenza di lunghi tratti di DNA ripetuto, che possono causare il rallentamento della forza replicativa e possono pertanto richiedere il checkpoint per mantenere l'integrità del genoma. Per analizzare il contributo delle proteine di checkpoint nel mantenimento delle forche replicative nel mitocondrio stiamo sfruttando la tecnica di gel elettroforesi bidimensionale, che permette di visualizzare gli intermedi replicativi e l'eventuale accumulo di strutture patologiche.

Referenze:

- 1) Barzilai A., Rotman G. and Shiloh Y. (2002). ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA repair (Amst)* 1, 3-25.
- 2) Lopes M., Cotta-Ramusino C., Pellicoli A., Liberi G., Plevani P., Muzi-falconi M., Newlon C.S. and Marco Foiani. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* 412: 557-561.
- 3) Muzi-Falconi M., Liberi G., Lucca C. and Foiani M. (2003). Mechanisms controlling the integrity of replicating chromosomes in budding yeast. *Cell cycle* 2, 564-567.
- 4) Richter C. (1988) Do mitochondrial DNA fragments promote aging and cancer? *FEBS letters* 241, 1-5.
- 5) Thorsness P.E. and Fox T.D. (1990). Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 346, 376-379.