



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO
“CARLO BO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMOLECOLARI

Corso di Dottorato di ricerca in
scienze della vita, salute e biotecnologie
XXIX ciclo

Effetti molecolari del Dexamethasone su cellule di
pazienti con Atassia Teleangectasia

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/10

Relatore:

Chiar.mo Prof. Mauro Magnani

Correlatore:

Dott. Michele Menotta

Dottoranda:

Dott.ssa Sara Orazi

Abstract

Ataxia-telangiectasia (AT) is a rare autosomal recessive disorder caused by mutations in the ataxia-telangiectasia mutated gene (ATM), which codifies for a protein kinase mainly involved in DNA damage response. No established therapy is currently available for this disease but, recently, short term treatment with Dexamethasone (Dexa) was shown to improve the symptoms of this syndrome. Nevertheless, the molecular mechanism involved in Dexa action in AT patients is not yet known. Here we examined the effects of dexamethasone treatment in human primary fibroblast $ATM^{-/-}$ GM02052, GM00648 and in the control cell line $ATM^{+/+}$ AG09429. We observed, for the first time, a nucleoplasmic accumulation of Lamin A only in ATM mutated cell lines treated with Dexa, probably induced by an increased phosphorylation in Lamin A Ser22 and Ser404. Lamin A Ser404 is a nuclear target of AKT, and Dexa resulted capable to exclusively activate AKT phosphorylation in $ATM^{-/-}$ GM00648 cell line, endorsing the Lamin A accumulation. Furthermore, ChIP-seq analysis revealed 457 (GM00648 cells) versus 12 (WT cells) genomic sequences for transcription factors binding to Lamin A/C, after Dexamethasone treatment. Among them, the genomic sequences for HIF-1 α , ARNT and E47 transcription factors detected in GM00648 ChIP with Dexa, were also identified as possibly activated in the same cell line by TF array assay. Finally Dexamethasone treatment seemed able to increase HDAC4 reduction and consequent nuclear accumulation through a possible NRF2-mediated up regulation of thioredoxin1 (TXN) gene expression. Also an increased interaction between nuclear HDAC4 and HIF-1 α appeared to be involved in Dexamethasone effect in these cell lines. Hence, Dexamethasone treatment could be involved in epigenetic modulation in AT cell lines increasing Lamin A/C and HDAC4 nuclear content and interactions.

Ringraziamenti

Consapevole che questa potrebbe essere l'unica vera occasione per poterlo fare, desidero ringraziare sentitamente le persone che mi hanno accompagnato in questo percorso.

Al mio correlatore, Dott. Michele Menotta, vanno i miei ringraziamenti per molte cose. E' stato una guida in momenti chiave del mio percorso di dottorato, permettendomi di lavorare indipendentemente per la maggior parte del tempo. La sua grande passione e il suo sincero entusiasmo per la ricerca, sono stati per me contagiosi e motivanti, perfino durante i momenti difficili del mio lavoro.

Sono inoltre molto grata al mio gruppo di ricerca, in particolare alla Dott.ssa Sara Biagiotti e alla Dott.ssa Chiara Spapperi, per avermi affiancata e sostenuta con competenza e simpatia, anche nelle impegnative giornate di lavoro.

Infine un ringraziamento speciale a Davide e alla mia bellissima famiglia, dal cui esempio d'infinito affetto, sostegno e sacrificio, spero di poter sempre attingere per riuscire a dare il meglio di me.

Indice

Abstract	3
Ringraziamenti	4
Capitolo I.	8
Introduzione	8
1.1 La patologia Atassia Teleangectasia (AT).....	8
1.2 Dexamethasone come possibile terapia per AT.	8
1.3 La proteina ATM e suoi signaling cellulari.	10
1.3.1 Il ruolo di ATM nella risposta al danno al DNA (DDR).	10
1.3.2 ATM e stress ossidativo.	13
1.3.3 Interazioni tra ATM e pathways metabolici.	14
1.3.4 ATM e regolazione di AMPK.....	15
1.4 Modificazioni epigenetiche nella neurodegenerazione AT.	16
1.5 Scopo della tesi.....	17
Capitolo II.....	18
Materiali e metodi.....	18
2.1 Colture cellulari	18
2.2 Western Blotting.....	18
2.3 Saggi di Immunofluorescenza.....	19
2.4 Microscopia confocale.....	19
2.5 Estrazione RNA e qRT-PCR	19
2.6 Detection delle proteine ridotte	20
2.7 Coimmunoprecipitazione	20
2.8 ChIP	21
2.9 Analisi ChIP-seq	21
2.10 Transcription Factor Array	22
2.11 Analisi dati AFM.....	22
2.12 Analisi statistiche	23
Capitolo III.....	24
Risultati.	24
3.1 Individuazione dei geni HK (housekeeping) per i saggi di qRT-PCR.	24
3.2 Localizzazione cellulare ed attività di HDAC4 in funzione di Dexa.	24
3.3 Immortalizzazione di linee di fibroblasti primari AT.	31

3.4	Aumento nucleare di HDAC4 in forma ridotta.....	33
3.5	HDAC4 e HIF-1 α in funzione di Dexamethasone.....	36
3.6	Effetti di Dexamethasone sulla lamina A/C.....	40
3.6.1	Lamina A/C nelle linee di fibroblasti immortalizzate	45
3.6.2	Dexamethasone e variazioni delle caratteristiche biofisiche.....	47
3.6.3	Fosforilazioni e accumulo di lamina A/C.....	48
3.6.4	Regolazione trascrizionale mediata da lamina A/C.....	51
3.6.5	Effetto del Dexamethasone sul ciclo cellulare dei fibroblasti AT.....	52
3.6.6	Ruolo della lamina A/C nell'organizzazione cromatinica.....	53
Capitolo IV.	61
Discussione.....	61
4.1	Il Dexamethasone modula HDAC4 nelle cellule di fibroblasti AT	61
4.2	Ruolo delle modificazioni post traduzionali di HDAC4	61
4.3	Aumento di HDAC4 ridotto e possibile ruolo nello spostamento dell'equilibrio red-ox da parte di Dexamethasone.....	62
4.4	Effetto del Dexamethasone sull'attività trascrizionale mediata da HDAC4	63
4.5	Dexamethasone incrementa il contenuto nucleare di lamina A/C	64
4.6	Tattamento con Dexamethasone e alterazioni delle caratteristiche biofisiche e meccaniche cellulari	64
4.7	Effetto di Dexamethasone sul ciclo cellulare dei fibroblasti AT	65
4.8	Possibile modulazione epigenetica di Dexamethasone mediante accumulo nucleare di lamina A/C e HDAC4	65

Capitolo I.

Introduzione

1.1 La patologia Atassia Teleangectasia (AT).

Atassia Teleangectasia (OMIM #208900) è una rara patologia monogenica autosomica recessiva, caratterizzata da mutazione omozigote o eterozigote composta, del gene ATM (Atassia-Teleangectasia Mutated) [1-5]. Il 70% delle diverse mutazioni conosciute in ATM danno proteina tronca, mentre le rimanenti sono mutazioni missenso e piccole delezioni o inserzioni, che danno luogo a varianti instabili della proteina [6]. Nonostante la patologia sia monogenica il suo fenotipo risulta pleiotropico. Il principale sintomo della forma classica di AT è la progressiva atassia cerebellare, dovuta alla perdita di cellule del Purkinje, che comporta una disfunzione motoria generale, relegando molti pazienti alla sedia a rotelle già alla fine della prima decade di vita [7-9]. La teleangectasia oculocutanea (dilatazione dei vasi sanguigni) compare invece a età differenti, normalmente negli occhi, talvolta nelle orecchie e sulla pelle del viso [10,11]. Anche l'immunodeficienza è una caratteristica distintiva di AT. Nei pazienti, infatti, si riscontrano ridotti livelli di IgA, IgE e di diverse sottoclassi di IgG, così come una riduzione del numero di linfociti B e T, ma non di cellule natural killer. Molti pazienti inoltre presentano una minor risposta anticorpale ai vaccini [12]. Un altro elemento clinico caratteristico della patologia AT è la suscettibilità a sviluppare tumori; tra i quali soprattutto linfomi e varie forme di leucemie [13,14]. Anche altre forme di carcinomi sono presenti interessando prevalentemente i malati anziani. Pazienti AT in età infantile, presentano un ritardo della crescita e un conseguente ritardo della pubertà, dovuto secondo alcuni studi, ad un possibile difetto endocrino [15-17]. Altri sintomi clinici caratteristici della patologia AT sono il diabete insulino-resistente, elevati livelli di α -feto proteina sierica e di antigene carcino-embrionale, l'invecchiamento prematuro e l'ipersensibilità a radiazioni ionizzanti (IR). A livello cellulare sono inoltre presenti alti livelli di ROS (Reactive Oxygen Species) e instabilità cromosomica [18]. L'insieme di tutti questi aspetti forma un quadro clinico grave, che riduce l'aspettativa di vita dei malati AT alla seconda, terza decade di vita [19-21].

Sfortunatamente, al momento, non vi è ancora una terapia disponibile per questa patologia. Le cure antibiotiche e con immunoglobuline, utilizzate per cercare di prevenire le infezioni dovute all'indebolimento immunologico, hanno prolungato solo di poco la durata della vita media. Questi trattamenti, infatti, sono esclusivamente sintomatici, di supporto e perlopiù focalizzati a rallentare la neurodegenerazione, a ridurre gli effetti collaterali della chemioterapia e a contrastare l'immunodeficienza. La speranza di trovare una terapia si è però riaccesa recentemente, quando diversi studi [22-28] hanno evidenziato come analoghi di glucocorticoidi siano in grado di migliorare i sintomi neurologici nei pazienti AT.

1.2 Dexamethasone come possibile terapia per AT.

I glucocorticoidi costituiscono le terapie anti infiammatorie più efficaci e sono largamente impiegati nel trattamento di numerose patologie quali asma, artrite reumatoide,

infiammazione intestinale e molte altre [29-31]. Più recentemente si è scoperto che i glucocorticoidi sono utili anche nel trattamento di patologie neurogenetiche e neurometaboliche. La prima fortuita evidenza dell'effetto benefico dei glucocorticoidi in pazienti AT si è riscontrata nel 2006 quando un bambino affetto dalla patologia, trattato per asma con Betamethasone (BETA), ha mostrato una marcata riduzione della sintomatologia neurologica. Lo studio condotto in seguito somministrando al bambino del BETA a 0.05mg/Kg ogni 12 ore per 4 settimane, ha evidenziato un miglioramento dei sintomi neurologici già dal secondo giorno del trattamento e alla quarta settimana il miglioramento è stato eccezionale, tale da permettere al bambino di riuscire ad acquisire la capacità di scendere e salire le scale [22]. Questa evidenza è stata poi confermata in diversi altri studi [24,25,32,33] e anche in un trial clinico del 2011, condotto in Italia su 13 bambini AT, nei quali il trattamento con BETA ha determinato una significativa riduzione dei sintomi di Atassia rispetto al controllo con placebo [23]. Gli effetti collaterali più evidenti, riscontrati in questi brevi studi, sono stati un aumento del peso corporeo e ritenzione idrica, con conseguente comparsa della tipica "faccia a luna piena". Inoltre l'utilizzo di glucocorticoidi su lunghi periodi, è associato all'insorgenza di numerosi effetti collaterali, dose e tempo dipendenti, che includono osteoporosi, diabete, obesità, cataratta, ipertensione e polmonite [34-36]. Per riuscire a contrastare la comparsa di quest'ultimi effetti collaterali dannosi, è stata sviluppata una metodica per l'incapsulamento di Dexamethasone sodio fosfato (DSP) in eritrociti autologhi (metodica EryDex), che permette un lento rilascio di Dexamethasone fino ad un mese [37]. Tra i corticosteroidi il Dexamethasone (Dexa) è il più simile al Betamethasone e la capacità di incorporare (incapsulare) DSP (un farmaco inattivo) in eritrociti autologhi permette un rilascio prolungato nel tempo di piccole dosi di Dexa (farmaco attivo). Questa metodica è stata testata in uno studio pilota condotto su pazienti affetti da differenti patologie di carattere infiammatorio, quali fibrosi cistica, morbo di Chron, coliti ulcerose e broncopneumopatia cronica ostruttiva, mostrando un miglioramento significativo degli indici di infiammazione e nessun effetto collaterale da steroidi [38-40]. Successivamente è stato realizzato un trial clinico di fase II della durata di sei mesi, su 22 pazienti AT in due centri italiani, con lo scopo di valutare l'effetto di EryDex in merito al miglioramento dei sintomi neurologici dei pazienti, oltre a stabilire la sicurezza e la tollerabilità della terapia. I risultati ottenuti hanno mostrato come EryDex migliori i sintomi dell'atassia cerebellare e che tali risultati positivi sono stati maggiori in pazienti con sintomi neurologici moderati, suggerendo un'efficacia del trattamento in funzione della fase della malattia [27,28]. Data la mancanza di una terapia e dato l'importante progresso nella cura di questa patologia mortale, EryDex ha ricevuto nel 2012 la designazione di Farmaco Orfano per il trattamento di AT dalla US FDA. Attualmente è in corso un trial clinico di fase III per valutare il trattamento con EryDex su il maggior numero possibile di pazienti AT, reclutati a questo scopo su scala mondiale. Purtroppo, nonostante l'efficacia riportata del trattamento con Dexa, i meccanismi molecolari che ne sono alla base, devono ancora essere chiariti. Ad oggi, studi in vitro hanno permesso di scoprire alcuni dei possibili meccanismi molecolari coinvolti nell'azione di Dexa in AT. In particolare si è osservato come il Dexamethasone sia in grado di promuovere in cellule linfoblastoidi AT uno splicing non canonico che porta alla traduzione di una variante più piccola di ATM (mini ATM) che mantiene l'attività chinasi [41]. Anche un'importante azione anti ossidante del Dexamethasone in cellule AT è stata recentemente descritta [42]. Inoltre alcuni studi di trascrittomico e proteomico sono stati recentemente svolti

sia su campioni derivanti da pazienti che in modelli cellulari (Menotta et al under review). Ciononostante, ulteriori indagini sono necessarie per cercare di far luce sui signaling molecolari che coinvolgono l'azione del Dexamethasone e che possano aiutare a comprendere i miglioramenti clinici osservati nei pazienti AT.

1.3 La proteina ATM e suoi signaling cellulari.

ATM è una proteina chinasi di peso molecolare pari a 350 KDa, il cui gene omonimo ATM è mappato sul cromosoma 11q22.3-23.1. ATM appartiene alla famiglia delle chinasi simili alle fosfoinositide 3-chinasi (PI3KK), proteine che fosforilano i loro substrati nei motivi amminoacidici SQ o TQ. Altri membri della famiglia includono la proteina ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related), DNA-PKCs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit), SMG1 (suppressor of mutagenesis in genitalia 1), mTOR (mammalian TOR) e TRRAP (Transformation/transcription domain-associated protein, unico membro di questo gruppo che manca di attività catalitica). La regione catalitica al C-terminale di ATM è costituita dal dominio FAT, dal dominio fosfoinositide 3-chinasico (PI3K) e dal dominio FAT-C [43] (Figura 1).

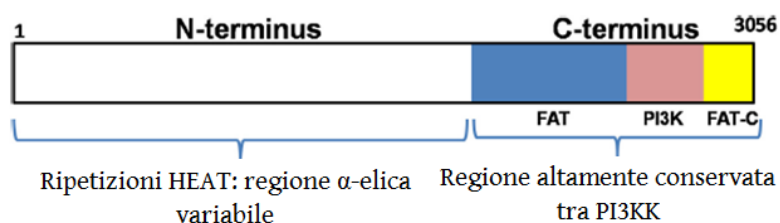


Fig1. Diagramma schematico delle caratteristiche strutturali principali di ATM. La regione N-terminale di questa chinasi è composta da ripetizioni HEAT (huntingtin, elongation factor3, A subunit of protein phosphatase 2A, TOR1). Il C-terminale è costituito dal dominio FAT, PI3H e FAT-C. (A.Gueleira et al, 2016).

La regione N-terminale, o regione non chinasica, è altamente variabile tra i membri della famiglia PI3KK, contrariamente al dominio catalitico C-terminale che mostra una significativa omologia tra le proteine di questa classe. L'N-terminale di queste chinasi è composta da un numero variabile di ripetizioni HEAT (huntingtin, elongation factor3, A subunit of protein phosphatase 2A, TOR1) la cui variabilità numerica contribuisce alla diversificazione delle proteine chinasi PI3KK.

Per un lungo periodo dopo la sua scoperta, si è ritenuto che ATM fosse principalmente coinvolta nei pathways di risposta al danno al DNA (DDR) e nella regolazione dei checkpoint del ciclo cellulare, dal momento che i sintomi classici osservati nei pazienti AT sono riconducibili, almeno in parte, a difetti in queste vie. Tuttavia oggi è noto che alcuni sintomi inusuali osservati in pazienti AT, che non sono attribuibili alla risposta DDR, possono trovare spiegazione nel coinvolgimento di ATM in altri pathways e nelle funzioni extra nucleari di ATM, quali lo stress ossidativo, il signaling legato all'insulina, il funzionamento mitocondriale e la neurogenesi [44-46].

1.3.1 Il ruolo di ATM nella risposta al danno al DNA (DDR).

Diversi membri della famiglia delle PI3KK sono attivati in risposta a differenti tipi di danno al DNA. ATM e DNA-PK mediano la risposta alle rotture a doppio filamento (Double-strand break

DBS) [47], mentre ATR è coinvolta nella risposta, sia delle rotture a singolo filamento del DNA (SSB), che allo stress delle forche replicative in stallo. La riparazione delle rotture DSB del DNA, causate da irraggiamento da radiazioni ionizzanti (IR) o dovute all'azione di radicali liberi, rappresenta un fattore decisivo per la sopravvivenza della cellula. Già a pochi minuti dal verificarsi del danno DSB, le cellule di mammifero richiamano e accumulano nel sito della rottura una plètera di proteine di segnalazione e di riparo. Questa complessa risposta ai DSB, che coinvolge molti pathways cellulari, è regolata principalmente da ATM, sebbene anche altre vie siano attivate. L'intricata risposta cellulare si compone in modo gerarchico attraverso la trasduzione dei messaggi dai "sensori" attraverso i "trasduttori" a varie molecole "effettrici". Quest'ultime infine regolano numerosi processi quali la regolazione dei checkpoint cellulari, i pathway di riparazione del DNA, modulazione di pathway metabolici e signaling pro-sopravvivenza oppure, attivazione di senescenza o morte cellulare. Alle molecole sopra elencate, si aggiunge un ulteriore gruppo di proteine coinvolte nei checkpoint cellulari, che si pongono come "mediatori" tra i "sensori" e i "trasduttori", e che includono tra le altre, proteine quali MDC1 (Mediator of DNA Damage Chekpoint Protein 1) e 53BP1 (Tumor Suppressor p53 Binding Protein 1). La presenza di questi livelli gerarchici determina un'amplificazione dei segnali che attivano numerosi pathways cellulari [48] (Figura 2).

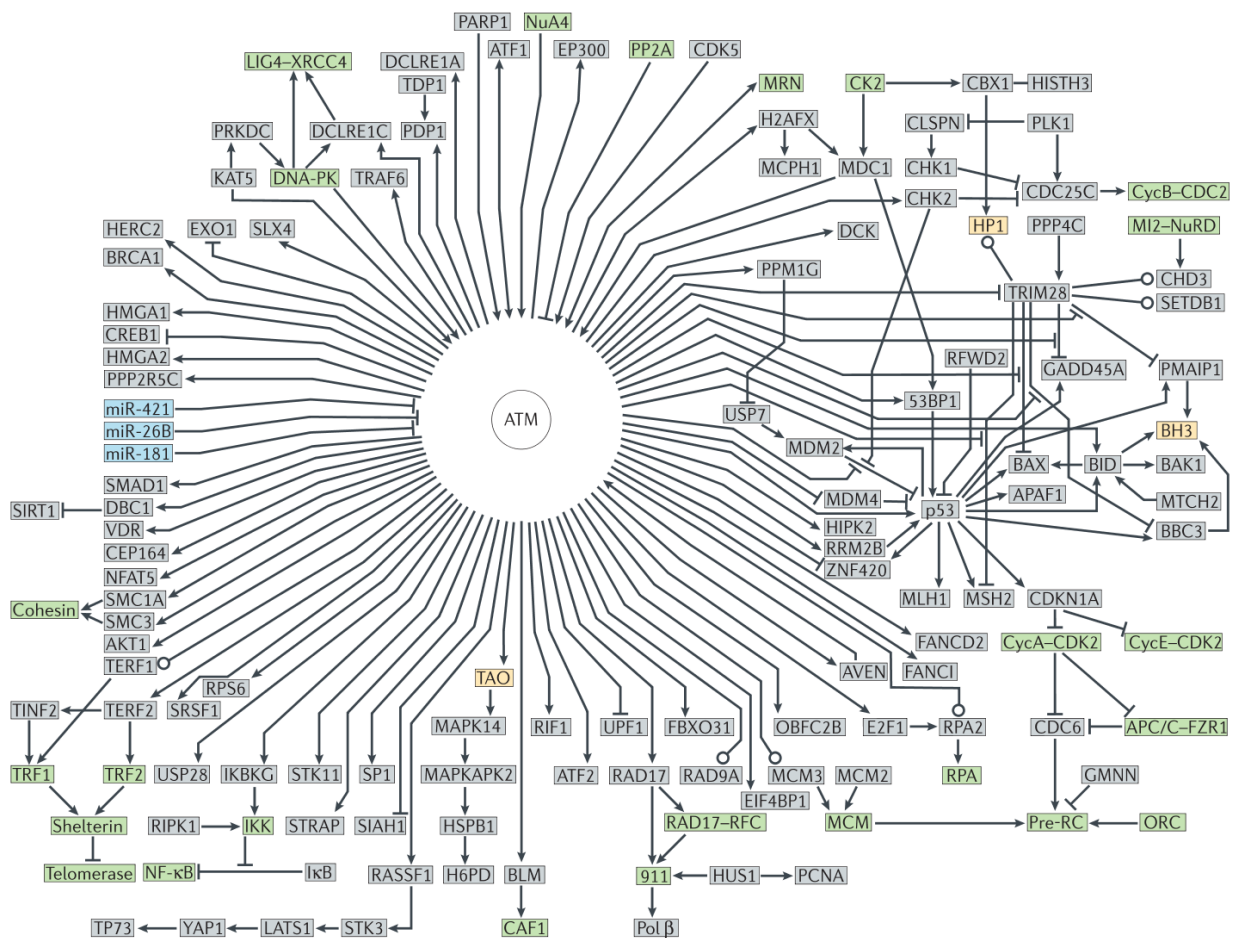


Fig2. Mappa delle interazioni funzionali di ATM nei processi di risposta al riparo del DNA. Le proteine sono rappresentate in grigio, i microRNA in blu, i complessi proteici in verde e le famiglie di proteine in giallo (Travis H.Stracker et al,2013).

Allo stesso tempo, anche processi di rimodellamento della cromatina, quali le modificazioni istoniche e riposizionamento dei nucleosomi, prendono parte al processo di riparo del DNA [49]. La risposta alle DSB ha inizio con il processamento delle rotture dei filamenti del DNA, in modo da renderle capaci di legare le numerose proteine coinvolte nel riparo e nel signaling. Il complesso MRN (Meiotic Recombination Protein-11 (Mre11)/Rad50/Nijmegen Breakage Syndrome-1 (Nbs1)), svolge il ruolo principale nel processare tali rotture. Mre11 forma un etero tetramero con la proteina Rad50 e lega assieme le estremità rotte del DNA attraverso la propria regione centrale e al C-terminale [50].

Il complesso MNR è richiesto per riparare tempestivamente le rotture del DNA sia nel caso della giunzione delle estremità non omologhe (NHEJ), che nel sistema di riparo per omologia diretta (HDR). Il complesso MRN agisce come un sensore e media il reclutamento di ATM, come dimero inattivo, al sito di DSB tramite l'interazione tra il motivo FXF/Y al C-terminale di Nbs1 e ATM. Infatti ATM costitutivamente esiste nelle cellule non trattate, imperturbate, come dimero o come multimeri, tramite legame intermolecolare tra il dominio chinasi e la regione FAT. A seguito del danno al DNA e del reclutamento di ATM al sito di DSB, si attua l'inter-fosforilazione di ATM in corrispondenza della Ser1981 del dominio FAT. Questa fosforilazione libera le molecole di ATM convertendole in monomeri con attività chinasi [51].

Grazie a studi successivi [52-54] sono stati individuati altri tre siti di auto fosforilazione di ATM presenti in Ser367, Ser1893 e Ser2996. Anche l'acetilazione in Lys3016 ad opera di Tip60 (HIV-Tat interactive protein) [55] è coinvolta nell'attivazione di ATM (Figura 3).

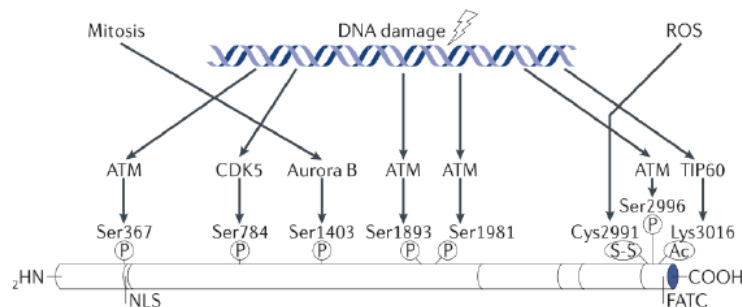


Fig3. Rappresentazione schematica dei principali domini di ATM e dei suoi siti di modificazione post traduzionale e delle proteine responsabili di tali modifiche (Scott et al,2013).

L'auto fosforilazione e la defosforilazione sono parte del meccanismo attraverso il quale ATM è mantenuta in uno stato attivo o inattivo, rispettivamente. Alcune fosfatasi giocano quindi un ruolo importante nel regolare la fosforilazione di ATM. PP2A (protein phosphatase 2A) mantiene ATM

in uno stato basale non fosforilato nelle cellule non irradiate. In seguito ad irraggiamento IR si osserva una dissociazione fosforilazione-dipendente di PP2A da ATM, che è associata alla perdita dell'attività fosfatasi di PP2A. Anche la fosfatasi WIP1 (Wild type p53-induced phosphatase-1) è coinvolta nella defosforilazione di ATM in cellule non irradiate e nel mantenimento del suo stato inattivo. PP5 è un'altra proteina fosfatasi che gioca un ruolo nella regolazione dell'attivazione di ATM in seguito a danno al DNA. Diversamente dalle fosfatasi menzionate sopra, questa proteina è in grado di provocare, attraverso un meccanismo non ancora chiarito, l'attivazione di ATM e del checkpoint di fase S. Il ruolo principale di ATM nella

risposta al DSB è di attivare i checkpoints del ciclo cellulare. Il checkpoint G1-S si compone di due fasi: una prima fase di risposta rapida e transiente al danno al DNA ATM-dipendente e p53-indipendente. In seguito al danno al DNA, ATM fosforila Chk2 che a sua volta fosforila e quindi inattiva la fosfatasi Cdc25A. Questo comporta una fosforilazione persistente di Cdk2 sul residuo Thr14/Tyr15, che causa l'inibizione del complesso Cdk2/ciclina E richiesto per la transizione G1-S, con conseguente arresto [56]. Nella seconda fase, che è ATM e p53-dipendente, ATM fosforila Mdm2 in Ser395 e Chk2 prevenendo la poli ubiquitinazione e degradazione di p53. ATM inoltre fosforila direttamente p53 in Ser15 stimolandone la trans attivazione. p53 così attivato e stabilizzato induce l'over espressione di p21, la quale inibisce il complesso cdk2-ciclina E che non è così in grado di fosforilare la proteina del retinoblastoma pRb provocando l'arresto del ciclo [57]. Il checkpoint di fase S è realizzato da ATM attraverso la fosforilazione di BRCA1, FANCD2, Chk2 e Nbs1. Il checkpoint di fase G2-M viene attivato da ATM in seguito a danno al DNA, attraverso la fosforilazione della Cdc25C in Ser216 via Chk2, che provoca il legame di Cdc25C alla proteina 14-3-3 σ , la quale facilita l'esclusione di Cdc25C dal nucleo; questo impedisce l'azione di Cdc25C sul suo substrato e causa arresto del ciclo [58]. Infine ATM è stata recentemente implicata nella regolazione del checkpoint di assemblaggio del fuso mitotico (SAC spindle assembly checkpoint), attraverso l'interazione con la chinasi Aurora B. In assenza di danno al DNA, ATM è attivato durante la mitosi da Aurora B tramite la fosforilazione della Ser1403. Nonostante questo meccanismo di attivazione di ATM non sia ancora chiarito, una volta attivata ATM fosforila la chinasi Bub1, un regolatore critico di SAC, che pare svolga il ruolo principale nell'attivazione di SAC ATM dipendente [59].

1.3.2 ATM e stress ossidativo.

Coerentemente al ruolo consolidato di ATM nella risposta al danno al DNA, le cellule derivate da pazienti AT mostrano difetti nei checkpoints del ciclo cellulare, radio sensibilità e instabilità cromosomica [60,61]. Tuttavia la capacità globale di riparazione di DSB delle cellule AT è solo parzialmente attenuata, probabilmente a causa di una ridondanza funzionale tra ATM e DNA-PKcs nel riparo del DSB. Inoltre, solo il 10% circa delle DSB, che sono più frequentemente associate a regioni di eterocromatina, richiedono ATM per la riparazione [62].

Alcune caratteristiche chiave della patologia AT, in primo luogo la degenerazione cerebellare e l'atassia, hanno a lungo indicato l'esistenza di proprietà di ATM indipendenti dalle funzioni di checkpoint della risposta al danno al DNA. Infatti i neuroni post mitotici del cervelletto sono poco influenzati dalla regolazione del ciclo cellulare mediata da ATM e associata a DDR [62]. Inoltre sebbene ATM sia considerata una proteina prettamente nucleare, è stato dimostrato che una piccola frazione della proteina è localizzata nel citoplasma di diversi tipi di cellule [63-67]. Ad esempio, nei neuroni del cervelletto, ATM è equamente distribuita tra il nucleo e il citoplasma, suggerendo ulteriori ruoli di ATM al di fuori del nucleo [64-68]. Negli ultimi vent'anni, numerose evidenze hanno permesso di legare la mancanza di ATM all'aumento di stress ossidativo delle cellule, il quale si ritiene che giochi un ruolo chiave nella neurodegenerazione, nella disregolazione metabolica e nell'oncogenesi [69]. Diversi studi hanno infatti dimostrato che cellule AT hanno una ridotta risposta antiossidante [67,69,70], sono sensibili ad agenti ossidanti [18,71,72] e che trattamenti con antiossidanti migliorano i difetti di proliferazione ed inibiscono i pathways associati a stress [73-75]. Tutte queste

evidenze suggeriscono come l'aumento di produzione di ROS contribuisca al fenotipo AT, indipendentemente dai difetti al riparo al DNA. A queste evidenze si è aggiunta, in studi ancor più recenti [76,77], la scoperta di un nuovo meccanismo di attivazione di ATM attraverso la sua ossidazione. Studi in vitro [76] hanno mostrato un'attivazione di ATM in presenza di H₂O₂ che è risultata essere indipendente da DSB e MNR, caratterizzata dalla formazione di un legame covalente intermolecolare tra i residui di Cys2991 di due molecole di ATM e che determina la fosforilazione di p53 e Chk2, senza aumento della fosforilazione dell'istone H2AX, indicatore del DSB. Curiosamente, lo stress ossidativo distrugge il legame del DNA a MNR e inibisce l'attivazione di ATM attraverso questo meccanismo [77], suggerendo che ad altre concentrazioni di ROS, la sola ossidazione può presumibilmente attivare ATM. Queste osservazioni mostrano una complessa interazione tra pathways correlati all'ossidazione e quelli del riparo del DNA. Ulteriori considerazioni emergono da analisi su larga scala di proteomica [52,78-81], dalle quali è stato possibile identificare 1077 proteine come putativi substrati di ATM.

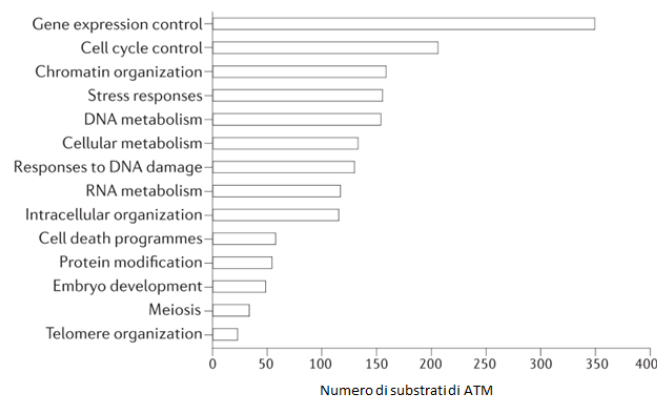


Fig4. Classificazione funzionale di 1077 proteine identificate come possibili substrati di ATM in analisi di proteomica, divisione funzionale realizzata con GeneOntology.

Dalla classificazione funzionale di questi target tramite GeneOntology (Figura 4), è emerso che molti targets appartengono principalmente ai pathways coinvolti nel riparo del DNA e nel controllo del ciclo cellulare, mentre altri targets rientrano in pathways differenti, come quelli metabolici [78].

1.3.3 Interazioni tra ATM e pathways metabolici.

I pazienti AT presentano un aumentato rischio di sviluppare diabete di tipo 2 e mostrano un ritardo della crescita, caratteristiche associate all'insulino-resistenza e all'intolleranza al glucosio [82,83]. Diversi studi hanno in seguito dimostrato l'esistenza di una relazione tra ATM e i signaling metabolici (Figura 5). Ad esempio è noto che linee cellulari AT mostrano ridotti livelli del recettore IGF1R (insulin-like growth factor 1), un difetto che viene parzialmente mitigato tramite l'espressione di ATM [84,85]. Tuttavia il meccanismo che lega ATM all'espressione di IGF1R è sconosciuto. ATM è richiesta anche per l'attivazione di AKT in risposta a insulina e a trattamento con radiazioni ionizzanti (IR) [86-90], che inducono la

fosforilazione di AKT in Ser473 e la traslocazione del trasportatore del glucosio GLUT4 attraverso meccanismi sconosciuti. In risposta a IR e a elevati livelli di ROS, ATM fosforila p53 in Ser15. Tale fosforilazione provoca o apoptosi o una riduzione dei livelli di ROS attraverso l'up regolazione delle proteine sestrine (le quali rigenerano perossiredossine) [91,92], glutatione perossidasi 1 (GPX1) e manganese superossido dismutasi (MnSOD) [93]. ATM è infine richiesta per l'attivazione di NF- κ B a seguito di IR e aumento dei ROS attraverso un meccanismo che richiede l'esportazione di ATM dal nucleo al citoplasma [94].

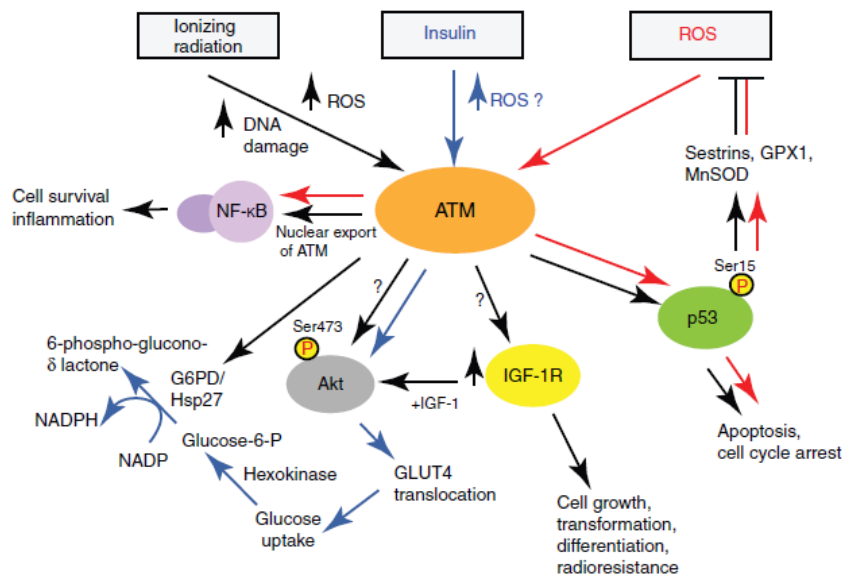


Fig5. Interazioni di ATM con signaling metabolici.

1.3.4 ATM e regolazione di AMPK.

Una nuova via di signaling p53 indipendente è stato recentemente identificata e si esplica attraverso l'attivazione ROS dipendente di ATM nel citoplasma regolando la sintesi proteica e l'autofagia [46]. In questo signaling, livelli elevati di ROS attivano ATM, che a sua volta fosforila e attiva il soppressore tumorale LKB1 in Thr366, il quale fosforila AMPK (AMP-activated protein kinase) in Thr172. AMPK è anche attivato da IGF1 [95] e dall'attivatore di AMPK AICAR [96] in modo ATM dipendente e LKB1 indipendente. AMPK può fosforilare ed attivare TSC2 inibendo l'attività di mTORC1 [97]. Inoltre ATM fosforila direttamente HIF1- α promuovendo anch'esso l'attività di TSC2 e quindi inibendo mTORC1. Inoltre mTORC1 promuove l'espressione di HIF1 [98] e, come parte del complesso più grande mTOR, regola la crescita cellulare e la sintesi proteica. L'inibizione dell'attività di mTORC1 induce autofagia, un processo catabolico che funziona come un pathway di recupero durante periodi di bassa disponibilità energetica nella cellula. L'autofagia inoltre agisce come soppressore tumorale inibendo la crescita cellulare. L'attività di mTORC1 non regolata può portare all'insorgenza di tumori attraverso l'eccessiva promozione della crescita cellulare e della divisione cellulare. Alti livelli di attività di mTORC1 provocano un aumento della produzione di ROS nei mitocondri, causata da un aumentato metabolismo ossidativo che si verifica per mezzo dell'espressione del regolatore trascrizionale

PGC-1 α [99]. L'attivazione di ATM da parte dei ROS generati da un'elevata attività di mTORC1, può quindi funzionare anche come meccanismo di feedback per regolare l'attività stessa di mTORC1 (Figura 6).

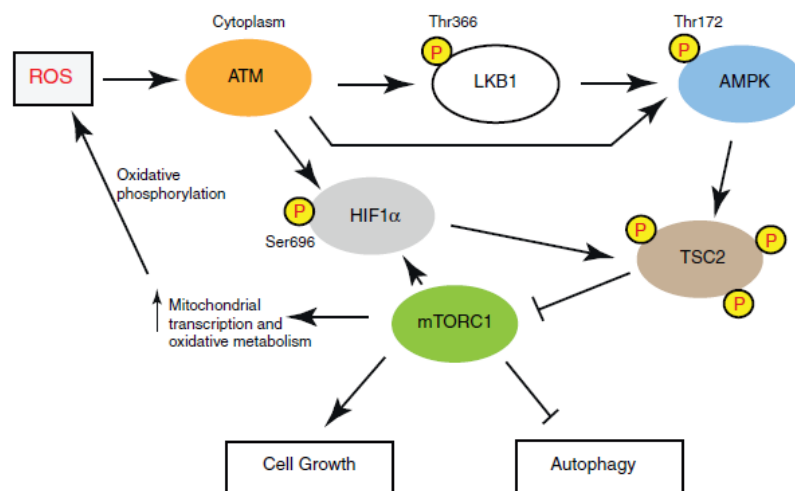


Fig6. Regolazione del signaling di AMPK da parte di ATM.

ATM può essere attivata anche in condizioni d'ipossia tramite un meccanismo MNR indipendente e in assenza di danno al DNA e questa tipologia di ATM si trova generalmente distribuita uniformemente nel nucleo [100]. Inoltre ATM regola direttamente il complesso del fattore di trascrizione HIF1, un etero dimero composto dalle sub unità HIF1 α e HIF1 β , che regola il metabolismo, la funzione mitocondriale e l'angiogenesi in condizioni d'ipossia. Uno dei target genici di HIF1 è REDD1, il cui prodotto lega le proteine 14-3-3 e le dissocia da TSC2; questo provoca l'inibizione di mTORC1 da parte di TSC2 [101]. La fosforilazione da parte di ATM di HIF1- α in Ser696 stabilizza la proteina in condizioni ipossiche, promuovendo l'inibizione di mTORC1 e la soppressione della crescita. Quindi ATM modula l'attività di TSC2 e quindi l'attività di mTOR in almeno due modalità distinte: attraverso AMPK e attraverso 14-3-3-REDD1 (via HIF1- α).

Numerose altre evidenze [64,65,101,102] hanno dimostrato la presenza di un pool di ATM citoplasmatico o di uno shuttle extra nucleare di ATM e alcuni di questi lavori indicano che la perdita di ATM esercita un effetto su vari signaling citoplasmatici, quali la mobilitazione di ioni calcio e potassio in fibroblasti umani e in neuroni murini [103-105].

1.4 Modificazioni epigenetiche nella neurodegenerazione AT.

La caratteristica distintiva del fenotipo neurologico osservato nei pazienti AT è l'atrofia cerebellare. La degenerazione del cervelletto è tuttavia assente o presente con un fenotipo più lieve, in numerosi ceppi di topo AT [63,106] nei quali sono comunque riscontrati una riduzione della funzione sinaptica a livello dei neuroni dell'ippocampo, dei neuroni dopaminergici e mal funzionamento del pathway nigro-striatale. Il ruolo di ATM nel garantire la salute e la sopravvivenza dei neuroni è quindi complesso. In accordo con la sua funzione di riparo al danno al DNA, ATM protegge i neuroni post mitotici dalla degenerazione,

sopprimendo il ciclo cellulare [107-109]. Tuttavia i pathways che portano tali difetti a sfociare nella perdita delle cellule neuronali rimangono sconosciuti. Studi recenti hanno però evidenziato, come specifici sistemi epigenetici siano coinvolti nella vulnerabilità delle cellule ATM^{-/-} del Purkinje. L'accumulo nucleare dell'istone deacetilasi 4 (HDAC4) e l'aumento della tri metilazione H3K27m3 dipendente da EZH2 (elevated enhancer of zeste-2), svolgono un ruolo peculiare nella neurodegenerazione dei pazienti AT.

Le modificazioni istoniche rappresentano importanti eventi epigenetici, coinvolti in molti processi cellulari [110-112]. Le proteine istone deacetilasi (HDACs) di classe I e II sono coinvolte nello sviluppo del cervello e nella sopravvivenza neuronale [113,114]. HDAC4 (classe II) è abbondantemente presente nel cervello ed è una proteina principalmente citoplasmatica nei neuroni [115]. L'attività di HDAC4 si basa essenzialmente sulla propria localizzazione subcellulare e nella formazione di complessi multi subunità con altre proteine. La distribuzione subcellulare di HDAC4 dipende dallo stato di fosforilazione, di ossidazione e dalla proteolisi [116]. Studi recenti hanno evidenziato che la mancanza di ATM provoca l'accumulo nucleare di HDAC4 nei neuroni, promuovendo la neurodegenerazione [117]. HDAC4 nucleare sequestra ed inattiva i fattori di trascrizione MEF2A e CREB, provocando la repressione di geni coinvolti nella sopravvivenza neuronale. La distribuzione di HDAC4 dipende dallo stato di fosforilazione da parte di CaMKII e dalla defosforilazione ad opera della fosfatasi PP2A. Per rimanere citoplasmatico ed inattivo, HDAC4 deve essere fosforilato e legato alla proteina 14-3-3. ATM mantiene HDAC4 al citoplasma, ma la sua azione è indiretta. ATM sopprime l'attività della fosfatasi PP2A, fosforilandone la Ser401 della subunità PP2A-A (PR65). In mancanza di ATM, HDAC4 ipofosforilato trasloca a nucleo inattivando i fattori di trascrizione MEF2A e CREB, con conseguente aumento dell'acetilazione degli istoni H3 e H4 e provocando neurodegenerazione. Un ulteriore fattore epigenetico coinvolto nella neurodegenerazione del AT è l'elevata trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3K27me3 ad opera del repressore trascrizionale EZH2 [118]. EZH2 fa parte del complesso delle proteine polycomb di tipo 2 (PRC2) e catalizza l'aggiunta di tre gruppi metili in H3K27 nei promotori di geni target, determinandone il silenziamento. L'attività di EZH2 deve essere costantemente soppressa nei neuroni in modo da evitare il rientro nel ciclo cellulare e la successiva degenerazione. La proteina ATM è parte essenziale del processo omeostatico che sopprime EZH2 tramite fosforilazione. Nei pazienti AT la mancanza di ATM provoca attivazione di EZH2 che ipermetila H3K27 provocando il rientro nel ciclo cellulare e morte dei neuroni.

1.5 Scopo della tesi.

Questa ricerca si propone di fare luce sugli aspetti molecolari non ancora chiariti, coinvolti nell'azione del Dexamethasone (Dexa) nei pazienti AT. Si è posto come obiettivo iniziale dell'attività di ricerca la valutazione dell'azione del Dexa nella modulazione e attività della proteina HDAC4 in linee cellulari primarie di fibroblasti umani ATM^{-/-} e WT. Gli stessi effetti sono stati valutati su modello di fibroblasti umani immortalizzati hTERT appositamente sviluppato. Durante lo studio si è inoltre osservato un nuovo fenomeno (accumulo nucleare di lamina A/C nelle cellule di fibroblasti AT trattate con Dexa), che è stato ulteriormente indagato al fine di approfondirne il ruolo biologico.

Capitolo II

Materiali e metodi.

2.1 Colture cellulari

Le linee di fibroblasti primari umani wild type AG09429 e mutati (ATM^{-/-}) GM00648, GM02052 e GM03395 (Coriell Institute) sono state coltivate a 37°C e 5% di CO₂ con terreno Minimum Essential Medium Eagle (Sigma Aldrich). Il terreno è stato completato aggiungendo L-glutammina 2 mM, 100 U/mL Penicillina, 0.1 mg/mL Streptomicina (Sigma Aldrich), 10% di FBS per la linea AG09429 e 15% FBS (Thermo Fisher Scientific) per le linee ATM^{-/-}. Le procedure d'immortalizzazione hTERT delle linee di fibroblasti AG09429 e GM00648 sono state realizzate con hTERT Antigen Cell Immobilization Kit (Alstem Cell Advancements) secondo le istruzioni del produttore. Le linee immortalizzate hTERT sono state coltivate nel medesimo terreno completo delle linee di fibroblasti primari, ma con 20% di FBS (Thermo Fisher Scientific) e 10 mM finale di glucosio. Le cellule sono state trattate con 100 nM di Dexamethasone, mentre i rispettivi controlli sono stati realizzati trattando le cellule con il solo veicolo dimetilsolfossido (DMSO).

2.2 Western Blotting

Per l'analisi in Western Blotting le proteine sono state ottenute lisando le cellule dopo 24h o 48h di stimolazione con 100 nM di Dexa o con il rispettivo veicolo DMSO. Per l'estrazione delle proteine totali, le cellule sono state lavate abbondantemente con PBS 1X freddo e poi lisate con buffer P4 (Sigma Aldrich). La sospensione cellulare è stata poi sonicata con 10 pulse da 15s a 45 Watts utilizzando Labsonic 1510 Sonicator (Braun) ed infine centrifugata a 12000 rcf per dieci minuti a 4°C. Le frazioni proteiche citosoliche e nucleari sono state ottenute lisando le cellule in Buffer A (10 mM HEPES/KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl), 1 mM ditiotreitolo (DTT), 0.1% Nonidet-P40, aggiungendo inibitori delle proteasi (Roche Applied Science) e inibitori delle fosfatasi (10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄). La sospensione cellulare è stata mantenuta in ghiaccio per 10 minuti e poi centrifugata a 12000 rcf per 10 minuti a 4°C. Il soprannatante, corrispondente alla frazione di proteine citosoliche, è stato trasferito in un nuovo tubo, mentre il pellet risultante è stato risospeso in Ripa Buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5), 1 mM ditiotreitolo (DTT), 0.1% NP-40, aggiungendo inibitori delle proteasi e inibitori delle fosfatasi (10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄) o in buffer P4. La sospensione cellulare è stata sonicata con 10 pulse da 15s a 45 Watts e dopo centrifugata a 12000 rcf per dieci minuti a 4°C, è stato prelavato il soprannatante contenente le proteine nucleari. I campioni sono stati quantificati tramite saggio Bradford e uguali quantità di proteine sono state risolte tramite SDS-PAGE (8%, 10%, 12% o 4-16%) e successivamente trasferiti in membrane di nitrocellulosa (0.22 µm). I blots sono stati ibridati con gli anticorpi primari elencati di seguito e le bande immunoreattive sono state rilevate tramite anticorpi secondari coniugati a perossidasi di rafano (BioRad laboratories). L'attività della perossidasi è stata osservata tramite metodica enhanced chemiluminescence detection (ECL Kit, Advansta). La normalizzazione del segnale immunoreattivo è stata realizzata su contenuto totale delle proteine caricate in ogni lane, secondo quanto descritto da

[119,120]. Gli anticorpi utilizzati in questo studio sono: anti-HDAC4 (#5392, Cell signaling), anti-phospho HDAC4 Ser632 (#3424, Cell Signaling), anti-Lamina A/C (ANT0072, Diatheva o Cell Signaling), anti-PP2A (#2039, Cell Signaling), anti-AKT (#9272, Cell Signaling), anti-pAKT Ser473 (#9271, Cell Signaling), anti-ERK1/2 (#9102, Cell Signaling), anti-phospho ERK1/2 Thr-202/Tyr-204 (#9101, Cell Signaling), anti-phospho FoxM1 (NB600-848, novusbio), anti-ciclina B1 (#MS-868-P0, Thermo Fisher Scientific), anti-ciclina E (#MS-870-P0, Thermo Scientific), anti-Nrf2 (sc-722, Santa Cruz).

2.3 Saggi di Immunofluorescenza

Per le prove d'immunofluorescenza sono state piastrate 6×10^4 cellule e fatte crescere over night su vetrini coprioggetto depositati in piastre da 6 pozzetti. Il giorno successivo le cellule sono state stimulate con 100 nM di Dexa. Dopo 48h di stimolazione, le cellule sono state lavate con PBS 1X freddo, fissate 10 minuti a temperatura ambiente con una soluzione al 4% di formaldeide in PBS e permeabilizzate prima con metanolo 100% per 10 minuti e poi con una soluzione 0.5% di NP-40 in PBS per altri 10 minuti. I campioni sono quindi stati bloccati per un'ora a temperatura ambiente con una soluzione contenente 20% di siero di capra, 3% BSA e 0.3% Triton X100 in PBS. Gli anticorpi primari sono stati incubati over night a 4°C in PBS 0.1% Triton X100 e 1% BSA e sono stati rilevati con goat anti-mouse coniugato a TRITC e goat anti-rabbit coniugato a FITC (Sigma) in PBS 0.1% Triton X100 e 1% BSA per 1h a temperatura ambiente. Il DNA è stato colorato con 4,6-diamino-2-fenilindolo (DAPI) a una concentrazione finale di 0.2 µg/ml. I campioni montati con resina VECTASHIELD (Vector Laboratories) sono stati osservati al microscopio a fluorescenza Leica DMLB equipaggiato con camera DC300F CCD. Le immagini sono state processate con il software NIH Image J (Rasband, WS, ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2004). Gli anticorpi utilizzati in questi saggi sono: anti-HDAC4 (PA5-29103, Thermo Fisher Scientific), anti-phospho HDAC4 Ser632 (#3424, Cell Signaling), anti-Lamina A/C (ANT0072, Diatheva o Cell Signaling). I dati ottenuti dalle immagini sono stati analizzati con test statistico di Wilcoxon.

2.4 Microscopia confocale

Le analisi di microscopia confocale sono state realizzate su campioni cellulari processati secondo le metodiche descritte nel precedente paragrafo. Le immagini digitali sono state acquisite con Leica TCS-SP5 CSLM montato su microscopio invertito Leica DMI 6000 CS (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) a 1024×1024 utilizzando un obiettivo ad olio 63.0×1.4 (HCX PL APO 63.0 \times 1.40 OIL UV) con un appropriato setting di eccitazione/rilevazione (FITC argon laser 488 nm/500–535 nm emission filter; HeNe laser 543 nm/555–610 nm emission filter). Le immagini sono state analizzate con Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LASAF) e con ImageJ Software (Wayne Rasband, Bethesda, MA).

2.5 Estrazione RNA e qRT-PCR

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule trattate e non con Dexa a 24h e 48h utilizzando RNeasy Plus mini Kit (Qiagen) e la sua concentrazione è stata determinata usando Nanodrop ND-1000 System (NanoDrop Technologies). Aliquote da 500 ng di RNA totale sono state retro trascritte usando esameri random come primers secondo le istruzioni del SMARTScribe reverse transcriptase (Clontech). I cDNA sintetizzati sono stati poi diluiti di 1/5 e usati come templati in

saggi di PCR real time mediante metodica SYBR Green, (Premix Ex Taq Tli RNaseH Plus), e in saggi TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific). Le amplificazioni del cDNA sono state condotte nel sistema ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Ciascun campione è stato analizzato in triplicato e più NTC sono stati inseriti in ogni analisi. PPIA è stato utilizzato come standard interno. I plot di amplificazione sono stati analizzati con il software SDS 7500 System (Applied Biosystem) e i dati delle relative espressioni sono stati calcolati con il metodo $\frac{1}{2}^{\Delta Ct}$.

2.6 Detection delle proteine ridotte

La rilevazione delle proteine cellulari ridotte presenti nella frazione citosolica e in quella nucleare, è stata realizzata tramite marcatura con iodacetammide biotinilata (BIAM), secondo quanto riportato in [121]. Le cellule delle linee di fibroblasti GM00648 e WT immortalizzate, sono state lavate abbondantemente con PBS1X e poi lisate con Buffer A (10 mM Hepes/KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.1% Nonidet-P40) addizionando inibitori delle fosfatasi (10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄) e 400 µM di BIAM risospesa al momento dell'uso. La sospensione cellulare è stata mantenuta in ghiaccio per 10 minuti, centrifugata a 12000 rpm per 10 minuti a 4°C e recuperato il soprnatante contenente la proteina citosolica. Il pellet risultante è stato risospeso in Ripa Buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% NP-40) addizionando inibitori delle proteasi, inibitori delle fosfatasi (10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄) e 400 µM di BIAM. Il campione è stato sonicato 10 pulse da 15s a 45 Watts e dopo centrifugata a 12000 rcf per dieci minuti a 4°C, è stato prelevato il soprnatante contenente le proteine nucleari. I campioni sono stati dosati con saggio Bradford. L'arricchimento di proteine ridotte è stato realizzato tramite ibridazione di 100µg di campione con 60µL 50% di beads coniugate ad avidina in PBS addizionato d'inibitori delle proteasi. Il campione è stato fatto ibridare per 2 ore su bascula rotante a 4°C. Le beads sono state poi abbondantemente lavate in PBS 0.1% Triton X100 e poi sono stati aggiunti 30µL di buffer P4 contenente 50mM di biotina pH12 per 15 minuti a temperatura ambiente. Il campione è stato fatto bollire per 10 minuti e si è poi riportato il pH a 7 con aggiunta di Na acetato 3M pH 5.2. Infine si è aggiunto alle beads 30 µL di Sample Buffer 4X e i campioni sono stati fatti bollire nuovamente. I soprnatanti sono stati caricati su SDS-PAGE gel 8-16% e poi trasferiti su membrane di nitrocellulosa (0.22 µm). I blots sono stati ibridati con l' anticorpo primario anti-HDAC4 e le bande immunoreattive sono state rilevate con la stessa metodica indicata precedentemente.

2.7 Coimmunoprecipitazione

La Coimmunoprecipitazione (CoIP) sugli estratti nucleari è stata realizzata secondo procedure standard. In breve, gli estratti nucleari delle linee cellulari WT hTERT e GM00648 hTERT sono stati ottenuti dopo l'estrazione della frazione proteica citoplasmatica realizzata con buffer di lisi citosolico (10 mM Hepes, pH7.5, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10% glicerolo, 0.2% NP-40, 1 mM DDT e inibitori delle proteasi) tenendo i campioni 10 minuti in ghiaccio. I pellet nucleari sono stati successivamente lisati in buffer di lisi nucleare (10 mM Hepes, pH 7.5, 1.5 mM MgCl₂, 300mM KCl, 10% glicerolo, 0.2% NP-40, 1 mM DTT e inibitori delle proteasi), per 30 minuti a 4°C. 200 µg di estratto nucleare di ogni campione è stato poi immunoprecipitato overnight a 4°C con 1 µg di anticorpo anti-HDAC4 in buffer di lisi nucleare con una concentrazione 150 mM di KCl. Gli immunoprecipitati sono stati incubati con protein A/G beads per 4 ore a 4°C. Le beads sono

state poi lavate abbondantemente con wash buffer (10 mM Hepes, pH7.5, 1.5 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 0.25 NP-40, e 10% glicerolo). Infine le beads sono state risospese in Leamml buffer e fatte bollire a 95°C per 5 minuti. I campioni sono stati sottoposti ad SDS-PAGE ed analizzati in Western Blotting. Il segnale immunoreattivo relativo a HIF1- α è stato rilevato con metodica chemiluminescente come precedentemente descritto. L'anticorpo utilizzato in questo saggio è anti-HIF1- α (#3716, Cell Signaling).

2.8 ChIP

Per ciascun campione WT e GM00648, stimolati con Dexa e non, sono stati mantenuti in coltura 10*10⁶ fibroblasti primari fino alla confluenza di circa il 90%, per poi procedere con il crosslinking del DNA tramite 1% di formaldeide a 37°C per 15 minuti. In seguito è stata aggiunta glicina alla concentrazione finale di 125 mM, per un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state poi lavate tre volte in PBS1X freddo, raccolte con scraper e centrifugate. Per isolare il DNA associato alla cromatina, il pellet di cellule è stato risospeso in 1mL di Cell Lysis Buffer (5mM HEPES-KOH pH7.5, 85 mM KCl, 0.5% NP-40, 1X d'inibitori delle proteasi, 10mM NaF, 2mM Na₃VO₄) per 10 minuti in ghiaccio e poi centrifugato. Il pellet risultante è stato risospeso in Nuclear Lysis Buffer (50mM Tris pH8, 10mM EDTA, 1% SDS, 1X d'inibitori delle proteasi, 10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄) per 30 minuti in ghiaccio. Il campione è stato poi frammentato con venti pulse di sonicazione da 15s a 45 Watts per ottenere frammenti di cromatina con dimensione media tra 200 e 400 bp. Dopo centrifugazione il soprannatante è stato prelevato sottoposto a decrosslinking ed il DNA purificato (GenElute PCR clean-up Kit Sigma) è stato dosato con Nanodrop e controllato su gel. Per l'immunoprecipitazione della cromatina, sono stati incubati overnight a 4°C, 4 μ g di DNA con 50 μ l di beads di agarosio coniugate a proteina A (sc-2001, Santa Cruz Biotechnology), 1 μ g di anticorpo anti-Lamina A/C (ANT0072, Diatheva) in un volume finale di 1mL di buffer d'incubazione (0.2% SDS, 1% Triton X100, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM Tris pH8.5, 1X inibitori delle proteasi). In seguito i campioni sono stati centrifugati e lavati tre volte in wash buffer (0.1%SDS, 1% Triton X100, 2 mM EDTA pH8, 150 mM NaCl, 20 mM tris-HCl pH8) e sottoposti a un ulteriore lavaggio in final wash buffer (0.1% SDS, 1% Triton X100, 2mM EDTA pH8, 500 mM NaCl, 20 mM tris-HCl pH8). Il campione è stato centrifugato, raccolto e sottoposto a decrosslinking aggiungendo 1U di RNase A ed incubandolo a 65°C per 4 ore. Il DNA immunoprecipitato è stato poi purificato con GenElute PCR Clean-Up e dosato al nanodrop.

2.9 Analisi ChIP-seq

Il DNA ottenuto dagli esperimenti di ChIP è stato sequenziato tramite tecnologia NGS. L'Ovation Ultralow Library System v2' kit (NuGEN, San Carlos, CA) è stato utilizzato per la costruzione delle librerie seguendo le indicazioni del fornitore. Le librerie ottenute sono state quantificate tramite Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA) e la loro qualità è stata testata tramite Agilent 2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA assay (Agilent technologies, Santa Clara, CA) e qPCR Stratagen Mx3000P (Agilent technologies, Santa Clara, CA). Le librerie sono quindi state processate con un cBot Illumina per la generazione dei cluster nella cella di flusso in accordo con le specifiche del costruttore. La fase di sequenziamento è stata svolta in

modalità single-end 50bp tramite HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA). L'analisi de-multiplexing dei dati raw è stata svolta tramite CASAVA 1.8.2.

Le analisi bioinformatiche sono state compiute tramite freewares disponibili in ambiente Linux. I file ottenuti dal sequenziamento (bam files) sono stati sottoposti a correzione GC tramite correctGCBias. In seguito è stato eseguito l'allineamento su genoma usando come riferimento lo human hg19. MACS2 è stato usato per creare un modello di arricchimento delle sequenze (callpeak). I parametri sono stati disegnati per ogni campione in funzione dei frammenti ricavati dalle procedure di CHIP. L'FDR del modelling è stato impostato uguale a 0.001 usando un background dinamico. Le distanze "d" ottenute dal modelling (221 bp per i 648 e 158 bp per i WT) sono state impiegate per un altro peak calling usando i campioni DMSO come rispettivi controlli dei campioni Dexa, ricavando le regioni genomiche emergenti (treat_pileup) rispetto al background (control_lambda). A questo punto si è eseguita un'analisi di broad peaks calling tramite MACS2 bdgbroadcall, usando come parametri un "cutoff" di 10 ed "max link" pari a quattro volte "d". Le regioni genomiche individuate sono state utilizzate in CEAS (Enrichment on chromosome and annotation) per annotare funzionalmente le porzioni geniche individuate ed anche per ricavarne le corrispondenti sequenze geniche da 1000 bp in direzione 5'a 1000 bp in direzione 3' dal centro della distribuzione di ogni regione individuata. Le sequenze ottenute sono state utilizzate in MEME-Suite (Motif-based sequence analysis tools) per ricavare i potenziali siti di legame a fattori di trascrizione noti (AME, Analysis of Motif Enrichment E-value <0.05) e per individuare potenziali nuovi motivi ricorrenti (MEME-ChIP Motif Analysis of Large Nucleotide Datasets E-value < 0.05).

2.10 Transcription Factor Array

Gli estratti proteici nucleari utilizzati sono stati ottenuti mediante estrazione in condizioni native da 4×10^6 di cellule WT e AT GM00648 dopo stimolazione per 48 ore con Dexa e rispettivi controlli, seguendo le indicazioni del kit Panomics Protein/DNA arrays II. La detection dei fattori di trascrizione è stata svolta tramite chemiluminescenza secondo le indicazioni del produttore.

2.11 Analisi dati AFM

Il microscopio utilizzato è stato AFM XE-100 della ditta Park Systems Corp. (Suwon, Sud Corea) controllato dal software XEP versione 1.8.1. Lo strumento era dotato di uno X-Y scanner da 50 x 50 μm funzionante ad alto voltaggio in closed loop, e uno Z scanner da 12.5 μm , impostato ad alto voltaggio ed operante in closed loop. L'isolamento vibrazionale è stato garantito da un piano antivibrante Halcyonics. I tips in silicio utilizzati nello studio sono stati forniti dalla ditta Novascan Technologies Inc. (Ames, IA 50010 USA), modificati con una sfera di vetro borosilicato da 10 μm di diametro, e con costante di molla nominale di 0.35N/m. Tutte le leve sono state calibrate utilizzando la metodica di calibrazione "Thermal Tune" [122] implementata nello strumento. Le misurazioni sono state svolte utilizzando un "sample holder" ed un appropriato "probe holder" per analisi in liquido.

Le scansioni sono state eseguite in liquido in NC-Mode ad una velocità compresa tra 0.25 e 1 Hz. I segnali acquisiti sono stati la topografia, l'errore di ampiezza, la fase e l'ampiezza. Le curve F/D sono state eseguite movimentando lo Z scanner da -2 a +1 μm su ogni punto acquisito, con conversione analogica digitale a 10 bit per ogni curva. Le velocità di movimento sull'asse Z sono state rispettivamente di 5 nm al secondo in approccio e 100 nm al secondo in retrazione. Le forze limite di pressione su ogni cellula variavano tra 6 e 12 nN. Il modulo di Young è stato calcolato tramite il programma XEI 1.8.0, utilizzando il modello Hertziano, impostando un Poisson's ratio pari a 0.4. Sono state calcolate anche le forze di Snap-in, Pull-off e l'energia di adesione tra tip e campione.

2.12 Analisi statistiche

Per i dati sperimentali è stato usato il test statistico di Wilcoxon. E' stato scelto un valore di $p < 0.05$ come limite statistico di significatività. Se non indicato in altro modo, tutti i dati delle figure sono medie aritmetiche \pm SEM di almeno tre esperimenti indipendenti.

Capitolo III

Risultati.

3.1 Individuazione dei geni HK (housekeeping) per i saggi di qRT-PCR.

Al fine di poter scegliere un valido normalizzatore per le quantificazioni in qRT-PCR, sono stati valutati i livelli d'espressione di geni comunemente usati come HK quali; GUSB, HPRT1, PPIA e PPIc (Figura 7).

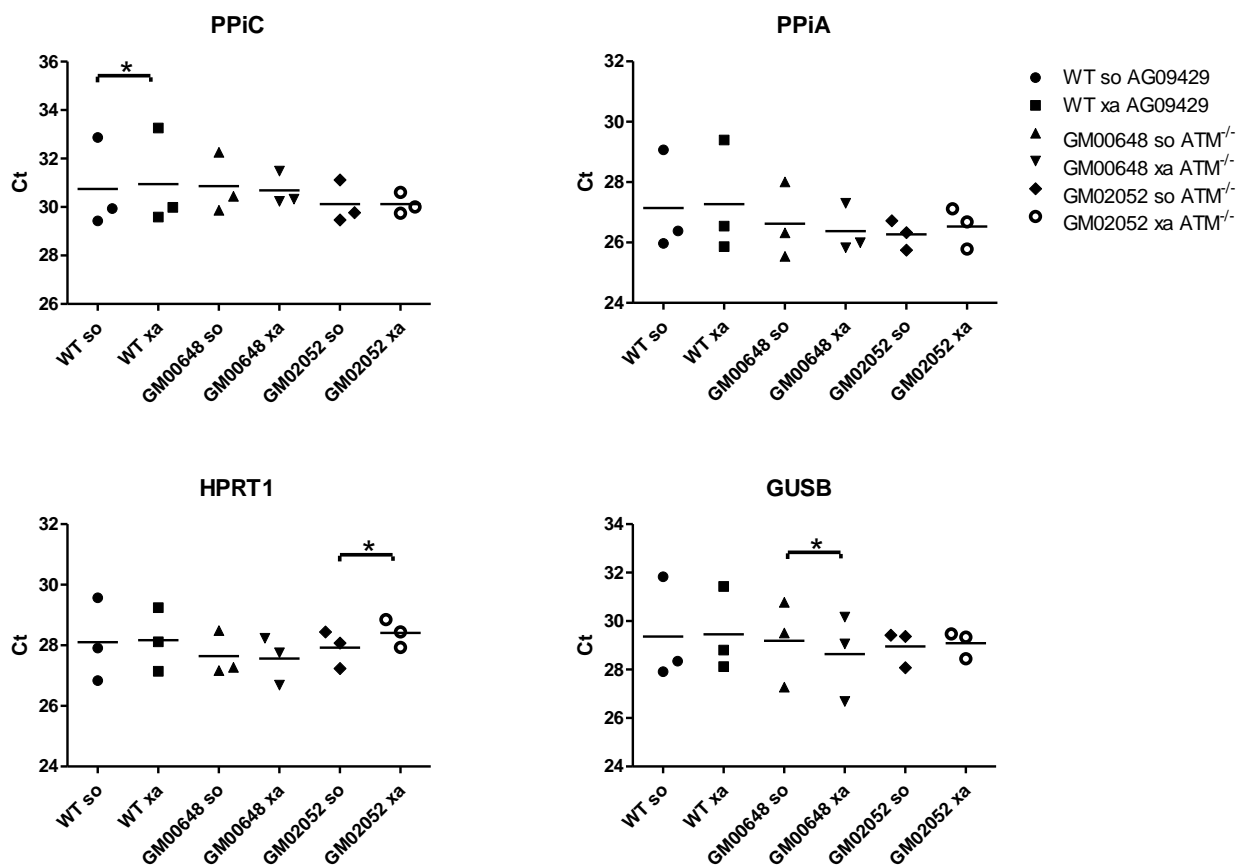


Fig7. qRT-PCR Ct dei geni PPIA, PPIc, GUSB, HPRT1 delle cellule AT GM02052, GM00648 e dei WT, con e senza trattamento con Dexa (* Wilcoxon test $p < 0.05$, Graphs Mean with SEM).

Il normalizzatore risultato più stabile all'azione del Dexa è PPIA ($p < 0.05$) che pertanto è stato scelto come gene HK per i saggi di qRT-PCR.

3.2 Localizzazione cellulare ed attività di HDAC4 in funzione di Dexa.

Un ruolo peculiare nella neurodegenerazione dei pazienti AT è svolto dall'accumulo nucleare dell'istone deacetilasi HDAC4 [117]. In mancanza di ATM, infatti, HDAC4 ipofosforilato trasloca a nucleo, dove inattiva i fattori di trascrizione MEF2A, CREB, determinando così l'inibizione trascrizionale di geni coinvolti nella sopravvivenza neuronale. Si è posto quindi, come obiettivo iniziale della ricerca, lo studio dell'eventuale effetto del Dexa in merito alla localizzazione e all'attività di HDAC4 nelle cellule di fibroblasti primari GM00648, GM02052 (ATM^{-/-}) e nel WT

AG09429. Le analisi di Western Blotting (WB) realizzate su estratti proteici totali con l'utilizzo dell'anticorpo anti-HDAC4 hanno evidenziato un aumento di circa il 30% (Wilcoxon test, $p < 0.05$) della proteina HDAC4 nella linea mutata GM00648 dopo Dexa. Un lieve aumento è inoltre presente negli estratti totali della linea AT GM02052 e del WT (Figura 8A). Coerentemente a studi precedenti [117,118], i livelli basali di HDAC4 sono maggiori nelle linee mutate GM00648 e GM02052 rispetto al WT.

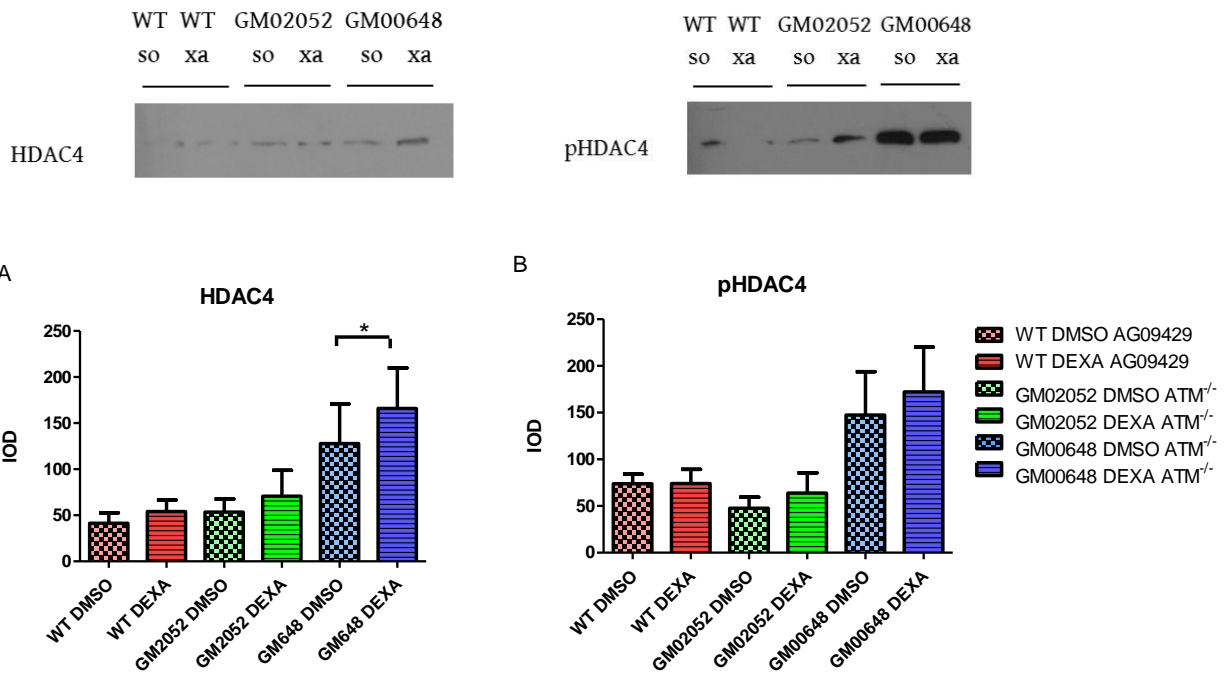


Fig 8. Quantificazione della variazione della proteina HDAC4 A) e della pHDAC4 (Ser632) B) in estratti totali con o senza trattamento con Dexa (* Wilcoxon test $p < 0.05$, Graphs Mean with SEM).

Per indagare il possibile ruolo di Dexa nello shuttle tra citosol e nucleo di HDAC4 si è valutato lo stato di fosforilazione della serina 632 coinvolta in tale meccanismo. Tramite WB gli estratti proteici totali evidenziano un aumento di pHDAC4 in funzione di Dexa in entrambe le linee mutate GM00648 e GM02052. Nessuna variazione è riscontrabile nel WT (Figura 8B). Tuttavia, il rapporto pHDAC4/HDAC4 (Figura 9) non evidenzia aumenti statisticamente significativi della fosforilazione di HDAC4 in funzione del farmaco.

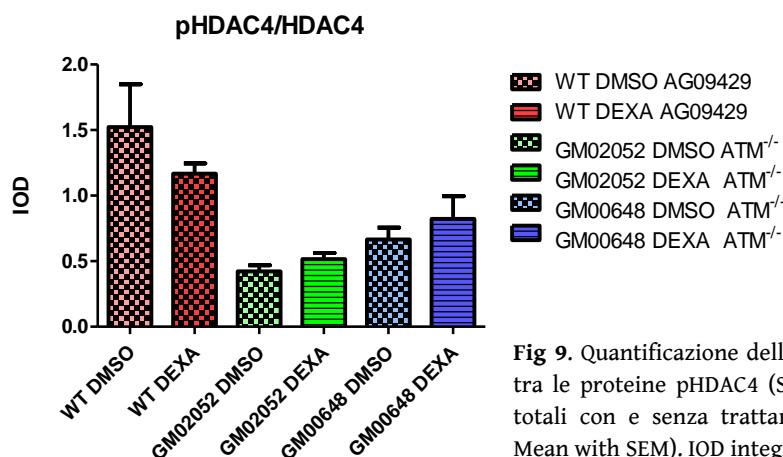


Fig 9. Quantificazione della variazione del rapporto tra le proteine pHDAC4 (Ser632)/HDAC4 in estratti totali con e senza trattamento con Dexa (Graphs Mean with SEM). IOD integrated optical density.

Ciononostante, è stato possibile riscontrare che il Dexametasona (Dexa) induce un lieve aumento del rapporto pHDAC4/HDAC4 in entrambe le linee AT ed una diminuzione nel campione WT. Si è a questo punto deciso di studiare l'eventuale modulazione dell'espressione genica di HDAC4. All'aumento della proteina totale HDAC4 nelle cellule mutate GM00648 trattate con Dexa corrisponde l'aumento dell'espressione del corrispondente gene (Wilcoxon test, $p < 0.05$) (Figura 10).

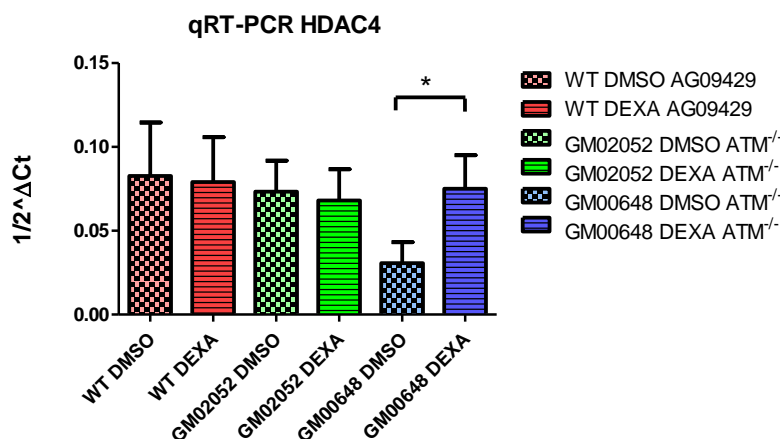


Fig10. Quantificazione della variazione dei livelli d'espressione di HDAC4 nelle linee mutate AT GM02052, GM00648 e nel WT, trattate Dexa e controllo DMSO (*Wilcoxon test, $p < 0.05$, Gaphs Meas with SEM).

Il Dexa sembra ridurre di poco l'espressione genica di HDAC4 nelle cellule WT e nella linea AT GM02052. Tramite WB è stato stimato il contenuto nucleare di HDAC4. Dai risultati ottenuti, si è osservato che il Dexa provoca un aumento di HDAC4 nella linea AT GM00648. Il mutato GM02052 e WT sembrano invece mostrare una riduzione di HDAC4 nucleare dopo stimolazione (Figura 11).

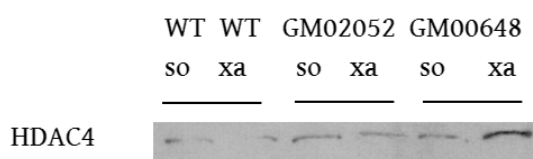
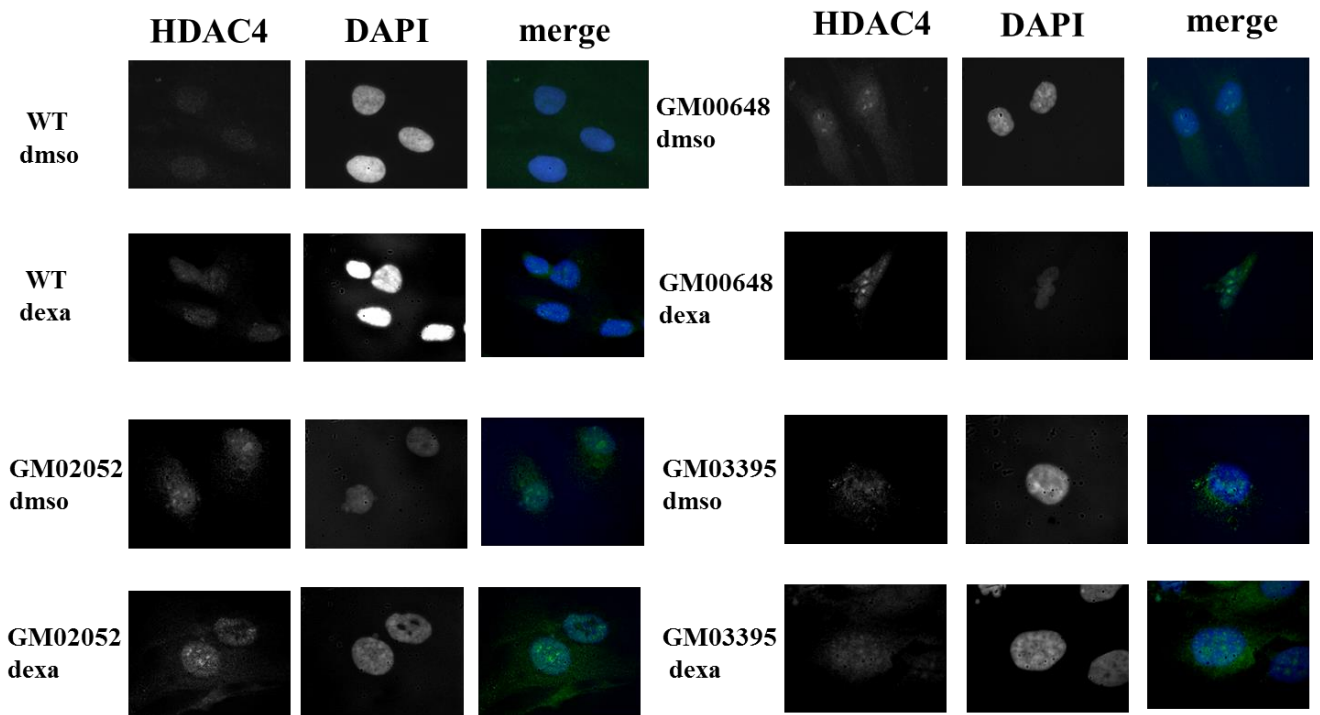


Fig11. Western Blotting rappresentativo che mostra la variazione di HDAC4 in estratti proteici nucleari delle cellule AT GM02052, GM00648 e del WT, trattate con Dexa (xa) o con il controllo DMSO (so).

Le analisi d'immunofluorescenza (Figura 12A), mostrano un aumento del segnale nucleare di HDAC4 in tutte le linee trattate con Dexa (Figura 13A). Al contrario invece, la stimolazione con Dexa, induce un leggero calo della fosforilazione a livello nucleare di HDAC4 (pHDAC4 Ser632) nelle cellule mutate GM00648, GM03395 e anche nel WT (Figura 12B). Mentre un leggero aumento si riscontra nelle cellule AT GM02052 (Figura 13B). Come già osservato dagli esperimenti su estratti proteici totali, anche HDAC4 nucleare si conferma presente a livelli basali in quantità maggiore nelle cellule mutate rispetto ai WT [117].

A Immunolocalizzazione HDAC4



B Immunolocalizzazione pHDAC4

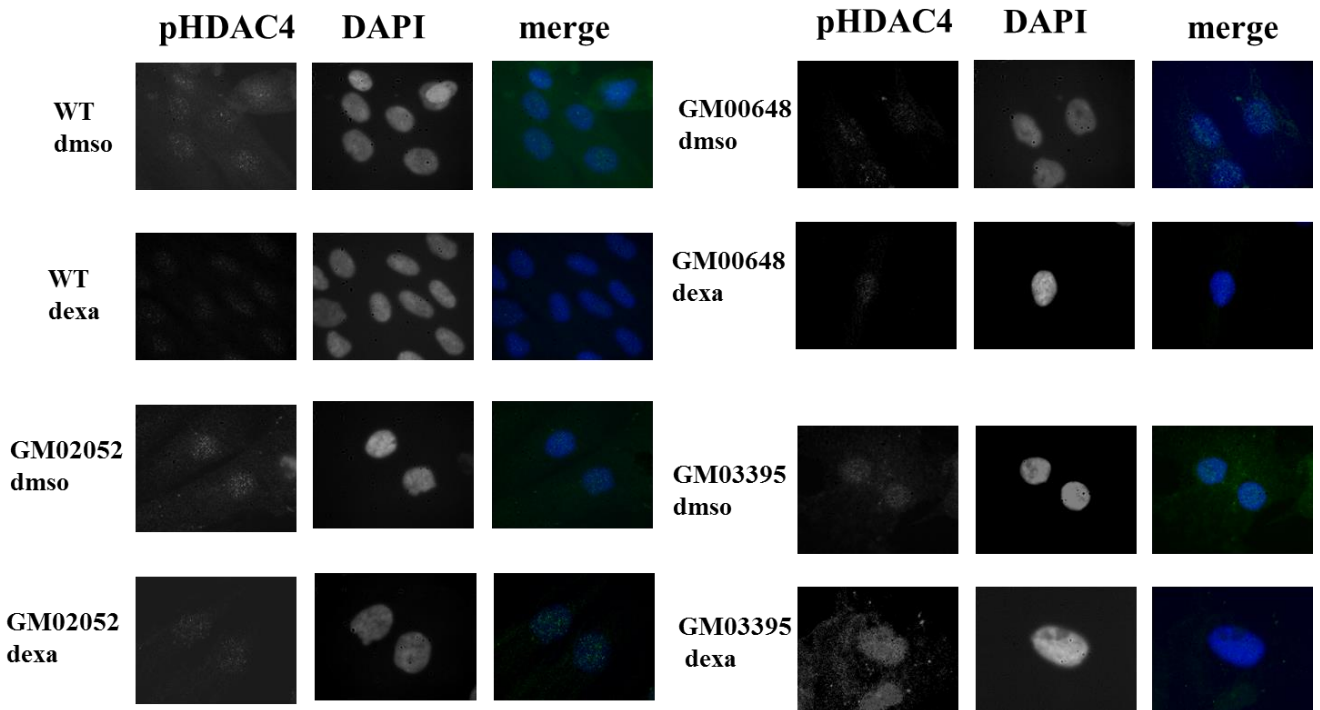


Fig12. A) Immunolocalizzazione di HDAC4 e di pHDAC4 B) dopo 48h di stimolazione con Dexa o DMSO, in cellule AT GM02052, GM00648, GM03395 e nel WT AG09429.

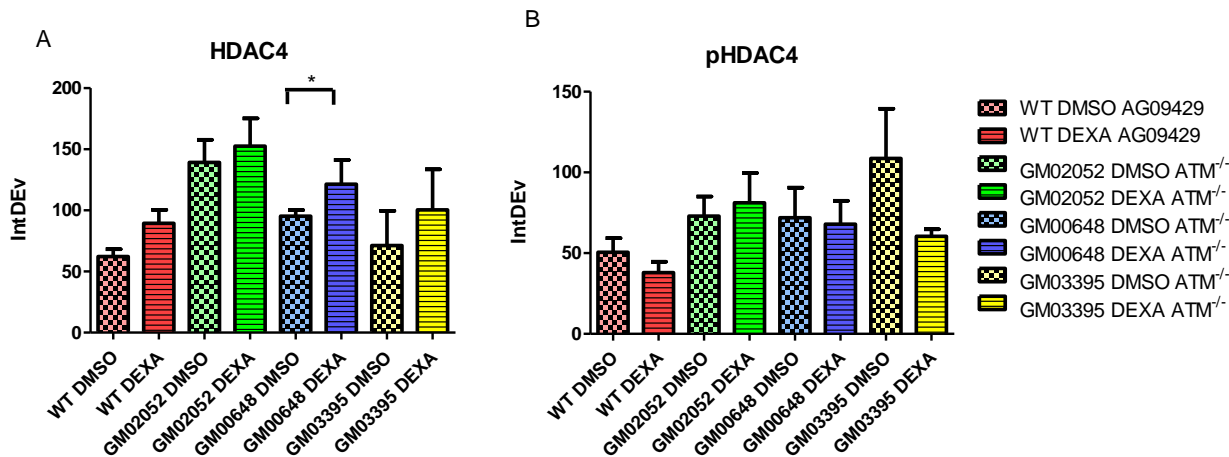


Fig13. Quantificazione dell'immunolocalizzazione di HDAC4 nucleare A) e pHDAC4 nucleare (Ser632) B) in cellule trattate AT e WT, trattate non con Dexa.

E' da notare, inoltre, che anche il contenuto basale di pHDAC4 nucleare (IF) è maggiore nelle linee AT rispetto alla linea WT. Lo shuttle a nucleo di HDAC4 è regolato dal bilancio tra la sua forma fosforilata e defosforilata. La fosfatasi PP2A, in assenza di ATM, defosforila HDAC4 e ne provoca il rilascio dal complesso citosolico con la proteina 14-3-3. Tuttavia la fosfatasi PP2A non presenta con Dexa una variazione significativa del contenuto proteico totale (Figura 14).

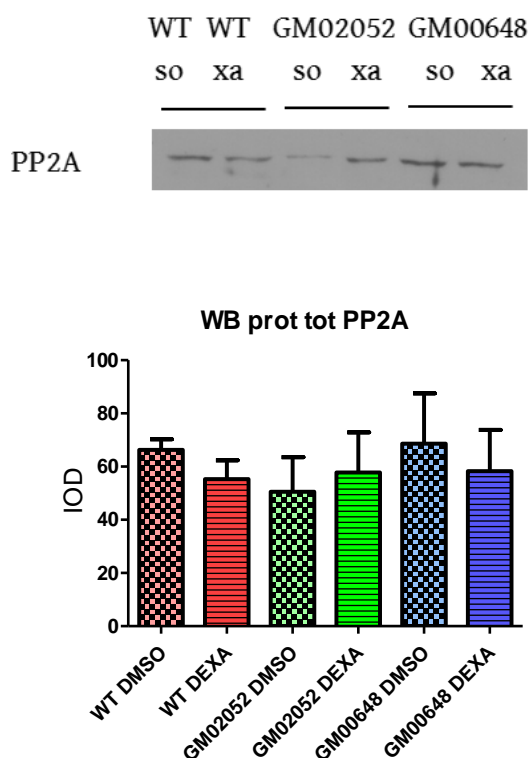


Fig14. Quantificazione WB sugli estratti totali della proteina PP2A (Graphs Mean with SEM).

Si può comunque osservare una lieve diminuzione di PP2A nella linea GM00648 e nella linea WT mentre comportamento opposto è presente nella linea AT GM02052. La localizzazione

subcellulare e la conseguente attività di HDAC4, sono regolate da numerose modificazioni post traduzionali che formano un codice globale capace di adeguarsi a differenti fenomeni in differenti cellule [123]. HDAC4 è sottoposta anche a tagli proteolitici che generano diversi frammenti citosolici e nucleari della proteina, dotati di funzioni peculiari [124]. Inoltre l'utilizzo degli anticorpi per i saggi WB e per le prove di IF riconoscono epitopi differenti della proteina HDAC4, rendendo lo studio ancora più complesso (Figura 15).

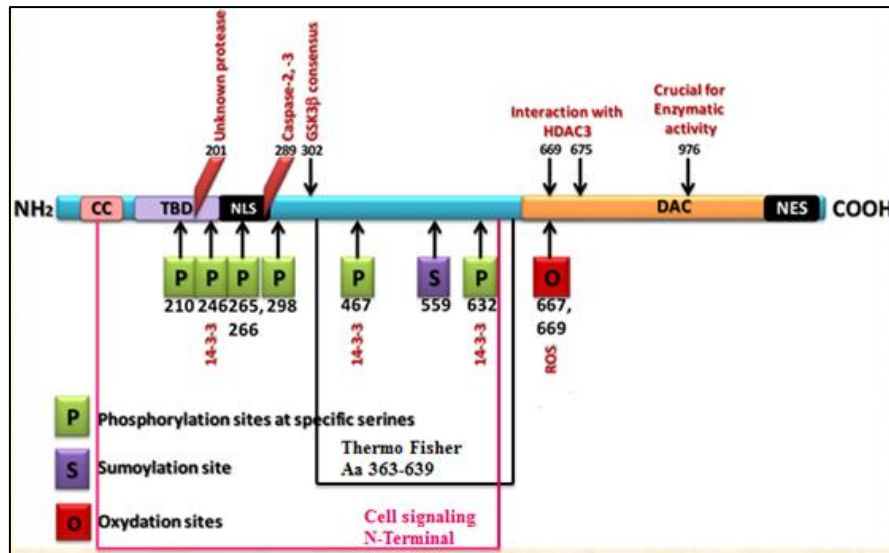


Fig15. Rappresentazione grafica di alcune modifiche post traduzionali di HDAC4 e degli epitopi riconosciuti dagli anticorpi anti-HDAC4 usati nei saggi WB e IF. CC coil-coil domain, TBD transcription binding domain, NLS nuclear localisation signal, NES nuclear export signal, DAC deacetylation domain.

Come descritto in letteratura [117,118], in cellule neuronali AT, si è riscontrata una dannosa inibizione trascrizionale mediata dal legame tra l'N-terminale di HDAC4 nucleare e i fattori di trascrizione MEF2A e CREB. Si è così deciso di indagare il ruolo dell'accumulo di HDAC4 nucleare precedentemente osservato, in relazione alla repressione trascrizionale di tali fattori. Attingendo al pool di geni di LCLs AT, che risultano modulati da parte di Dexa (Menotta M. et al under review), si sono individuati due target geni (DUSP1 e Ubc) che sono sotto il controllo trascrizionale di MEF e CREB. Indagini di qRT-PCR mostrano un aumento dell'espressione di DUSP1 (Wilcoxon test, $p < 0.05$) in tutte le linee trattate con Dexa (Figura 16A). DUSP1 risulta essere modulato positivamente dal fattore di trascrizione CREB e dall'azione di Dexa, ciononostante l'eventuale azione inibitoria esercitata dall'accumulo nucleare di HDAC4 non risulta essere preponderante. Nessuna variazione è invece apprezzabile nell'espressione del gene Ubc (Figura 16B). Altri target geni, quali il recettore dei cannabinoidi (CNR1) e il gene della proteina homeobox del mesoderma (PRRX1), che sono sotto il controllo trascrizionale di MEF2A sono stati selezionati confrontando il pool di geni modulati da Dexa in LCLs con i geni modulati da MEF2A riportati in letteratura [125]. Anche in questo caso, l'azione di repressione trascrizionale mediata dall'inattivazione da parte di HDAC4 di MEF2A non è stata osservata. Infatti, l'espressione di CNR1 aumenta significativamente (Wilcoxon test, $p < 0.05$) nelle linee AT GM02052, GM00648 trattata con Dexa, mentre un lieve aumento è presente anche nel WT (Figura 17A). L'espressione genica di PRRX1, aumenta lievemente con Dexa nella linea AT GM00648 e decrementa significativamente nella linea AT, GM02052 (Figura 17B).

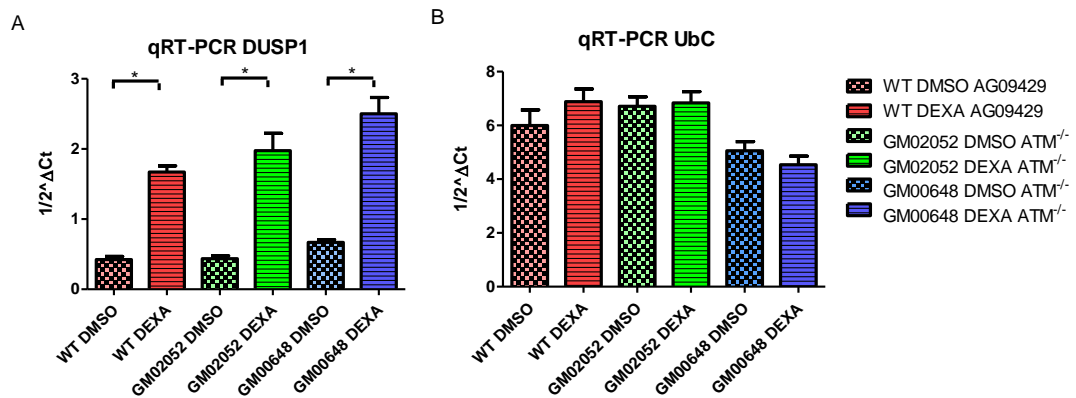


Fig16. A) quantificazione dell'espressione dei geni regolati da MEF, DUSP1 e B) di UbC nelle cellule AT GM02052,GM00648 e nel WT trattati con DMSO o Dexa (Wilcoxon test, $p < 0.05$, graphs Mean with SEM).

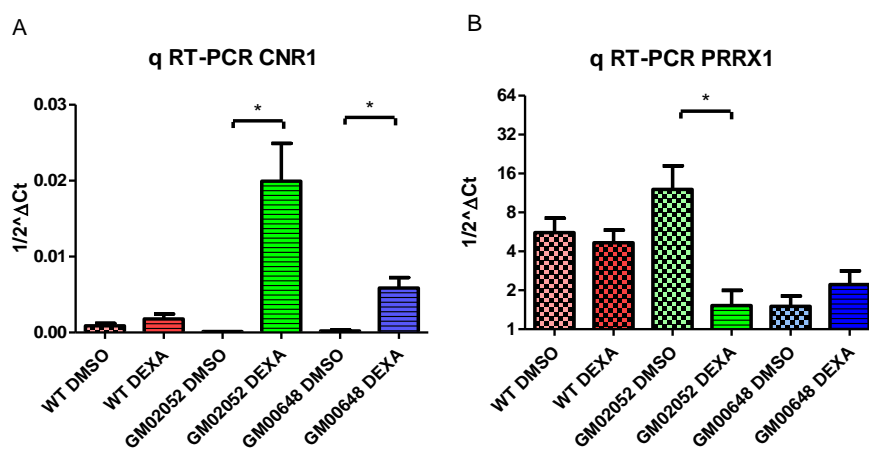


Fig17. A) Quantificazione dell'espressione dei geni regolati da MEF, CNR1 e B) PRRX1 in cellule AT GM02052,GM00648 e nel WT trattati con Dexa o rispettivo controllo DMSO (Wilcoxon test, $p < 0.05$, Graphs Mean with SEM).

Avendo ottenuto risultati contrastanti in merito all'azione inibitoria di HDAC4 sui fattori di trascrizione MEF2A e CREB, si è studiata l'attivazione di questi ed altri fattori di trascrizione tramite saggi array. Dai risultati ottenuti MEF2A e CREB sono inattivi (entro i limiti di sensibilità del saggio) sia nelle cellule AT GM00648 che nella linea WT, indipendentemente dalla stimolazione con Dexa (Figura 18,19). I fattori di trascrizione attivi solo nella linea AT GM00648 trattata con Dexa sono: AHR/ARNT, c-REL, HIF-1 α , PARP, CEF-2, E47 mentre, quelli modulati da Dexa, sono: GATA-1, GATA-1/2, GATA-2, HBS/HAS e HFH-3 (Figura 18). Nel solo campione WT in seguito a trattamento con il Dexa, sono invece attivi i fattori di trascrizione HBS/HAS, E47, c-REL e risultano modulati i fattori GATA-1/2, GATA-2 e HFH-3 (Figura19).

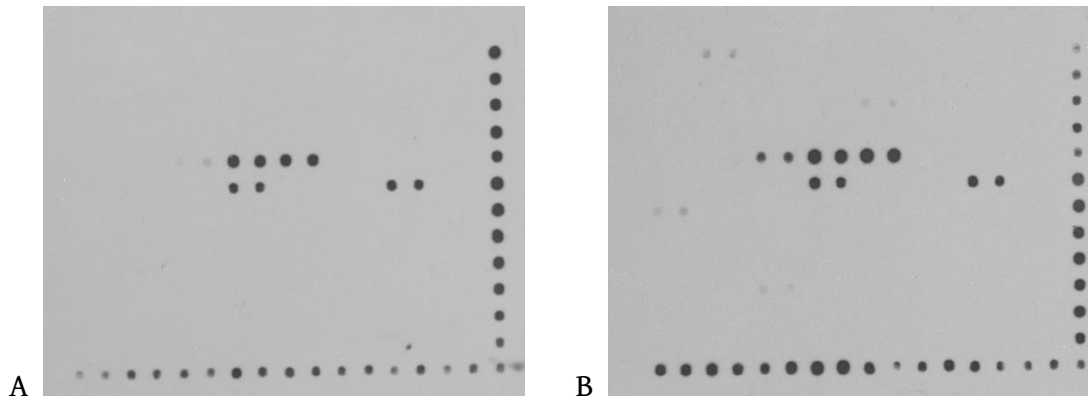


Fig18. Attivazione dei fattori di trascrizione rilevata tramite Array delle cellule GM00648 trattate con DMSO A) e con Dexa B).

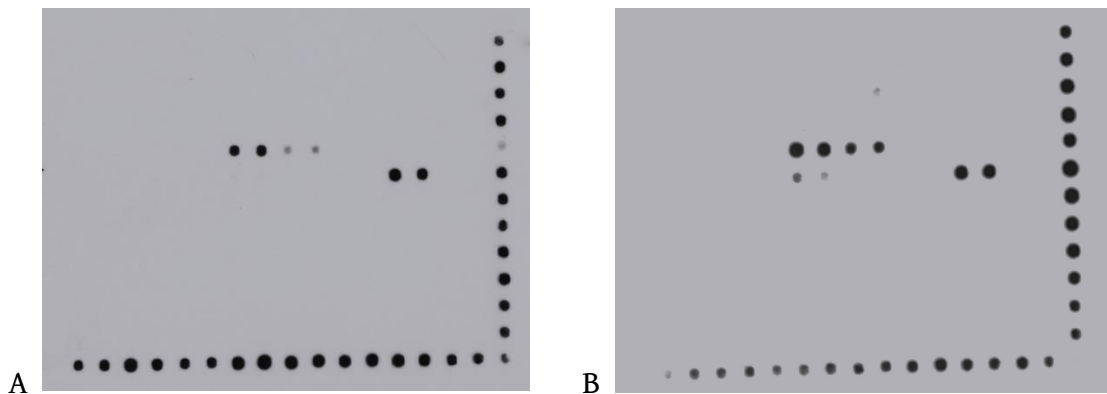


Fig19. Attivazione dei fattori di trascrizione rilevata tramite Array delle cellule WT trattate con DMSO A) e con Dexa B).

Purtroppo il mantenimento in coltura delle linee primarie dei fibroblasti mutati AT è risultato notevolmente difficoltoso e ha reso indispensabile la conversione ad un modello cellulare di fibroblasti immortalizzati.

3.3 Immortalizzazione di linee di fibroblasti primari AT.

Le linee di fibroblasti $ATM^{-/-}$ GM02052 e GM00648, così come il WT AG09429, sono state sottoposte a procedura d'immortalizzazione con hTERT Antigen Cell Immobilization kit. Tale processo ha avuto successo solo nella linea WT e nella linea mutata GM00648 e i cloni cellulari ottenuti sono tuttora in fase selezione. Nelle linee non clonalmente isolate è stata verificata l'espressione della subunità catalitica della telomerasi (hTERT) tramite saggi di qRT-PCR (Figura 20). Tali linee sono state successivamente utilizzate per caratterizzare il fenotipo di risposta al Dexa, per quanto riguarda l'accumulo nucleare di HDAC4 e lamina A/C (capitolo 4). La linea $ATM^{-/-}$ GM00648 immortalizzata hTERT conferma l'aumento ($p < 0.05$) nucleare della proteina HDAC4 (Figura 21A) e l'aumento della sua espressione genica ($p < 0.05$) dopo Dexa (Figura 21B).

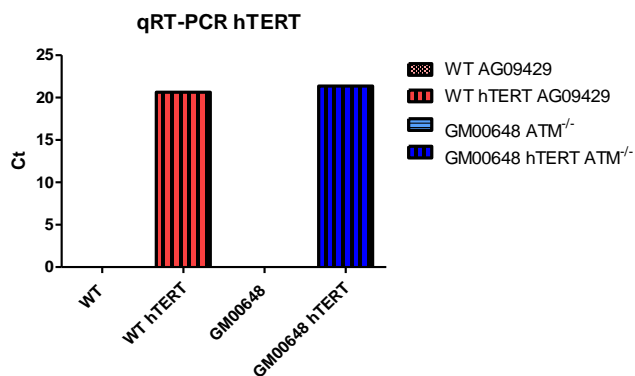


Fig20. Espressione del gene hTERT in linee di fibroblasti primari e corrispondenti linee immortalizzate (hTERT), WT e ATM^{-/-} GM00648.

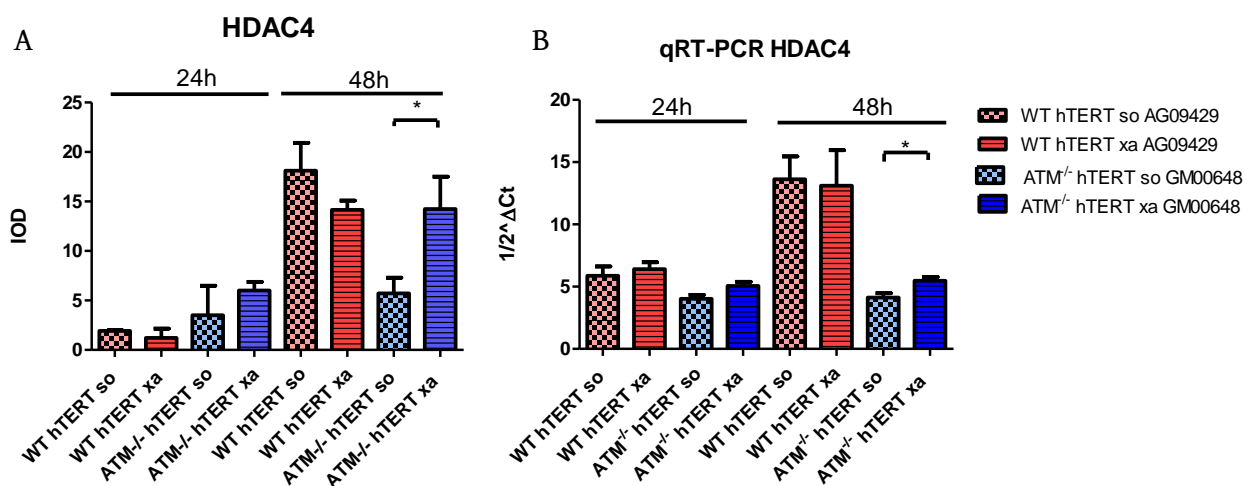
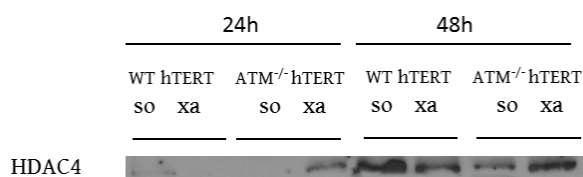


Fig21. A) Quantificazione di HDAC4 negli estratti nucleari di cellule di fibroblasti immortalizzati, a 24h e 48h di stimolazione con Dexa (xa) o con rispettivo controllo DMSO (so)(*Wilcoxon test, p<0.05, Graphs Mean with SEM) e B) corrispondente quantificazione della variazione d'espressione genica di HDAC4 (*Wilcoxon test, p<0.05, Graphs Mean with SEM).

Infine, si è confermato il fenotipo delle linee immortalizzate hTERT in risposta al Dexa valutando anche l'espressione del gene del recettore dei cannabinoidi CNR1, precedentemente studiato nelle linee primarie, ottenendo risultati simili (Figura 22).

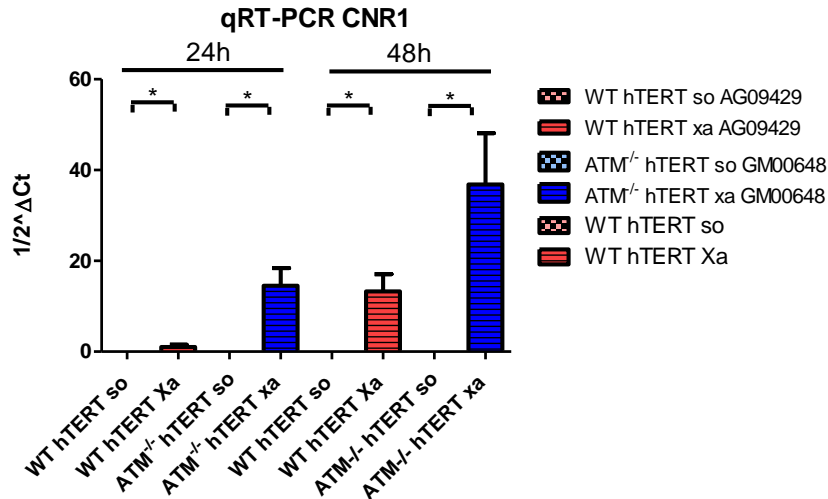


Fig22. Rappresentazione dei livelli d'espressione genica del recettore dei cannabinoidi CNR1, in linee immortalizzate e stimulate con Dexa o con il controllo DMSO per 24h e 48h (*Wilcoxon test $p < 0.05$, Graphs Mean with SEM).

3.4 Aumento nucleare di HDAC4 in forma ridotta.

Numerose modificazioni post traduzionali regolano la localizzazione subcellulare e l'attività di HDAC4. In particolare la riduzione del ponte disolfuro tra Cys667/Cys669 di HDAC4 inibisce la sua fuoriuscita dal nucleo, indipendentemente dal suo stato di fosforilazione (112). Si è così deciso di indagare se all'accumulo di HDAC4 nucleare osservato nella linea AT GM00648 hTERT fosse correlato un aumento della forma ridotta della proteina. Saggi preliminari in WB su estratti nucleari di proteine ridotte, sembrano mostrare come il Dexa favorisca, sia a 24h che a 48h, un sostanziale incremento di HDAC4 in forma ridotta nella linea ATGM00648 hTERT e non nella linea WT(Figura 23).

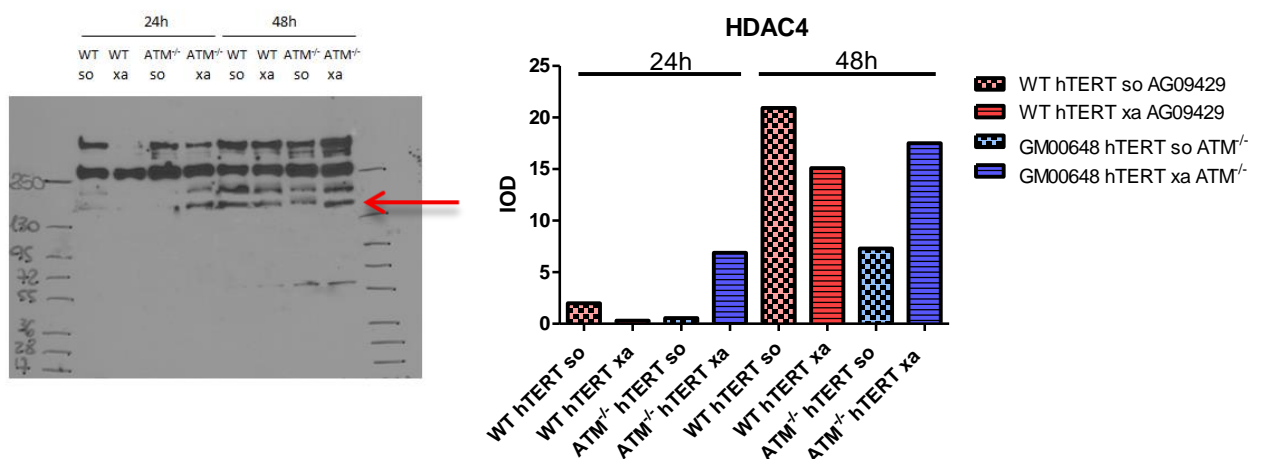


Fig23. Valutazione dello stato red-ox di HDAC in linee WT hTERT e GM00648 hTERT. La freccia indica HDAC4.

E' interessante notare come in questo saggio di WB e in altri (non mostrati), siano visibili bande immunoreattive relative a modificazioni post traduzionali di HDAC4. Infatti, oltre alla banda

attesa (freccia rossa, 140 KDa), sono presenti segnali immunoreattivi ad altezze superiori a 250 KDa e a 140 KDa ed un frammento di circa 55-60 KDa.

La regolazione dell'equilibrio dello stato red-ox cellulare è svolto principalmente dal fattore di trascrizione NRF2, il quale in presenza di stress ossidativo, contribuisce alla trascrizione di geni codificanti per enzimi antiossidanti, detossificanti ed enzimi che regolano la rigenerazione di NADPH. Un aumento di HDAC4 ridotto dopo stimolazione con Dexametasona (Dexa) nella linea AT GM00648 hTERT, può indicare uno spostamento dell'equilibrio red-ox cellulare ad uno stato più riducente. Prove preliminari di WB sembrano mostrare come il Dexa, sia a 24h che a 48h, aumenti il contenuto di NRF2 negli estratti nucleari proprio della linea mutata GM00648 hTERT (Figura 24).

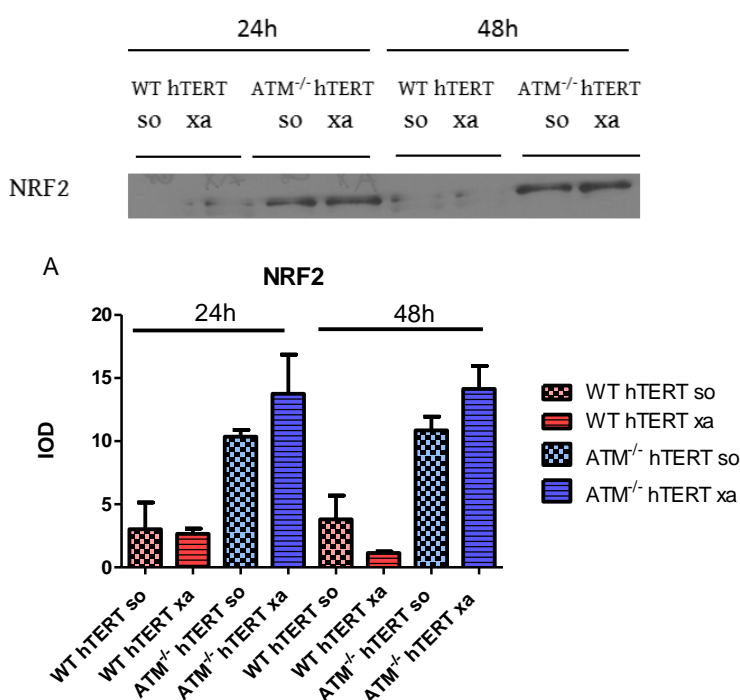


Fig24. Quantificazione del contenuto di NRF2 tramite saggi WB in estratti proteici nucleari delle cellule immortalizzate GM00648 e WT dopo 24h e 48h di stimolazione con Dexa o con il controllo DMSO

Uno dei principali target genici sotto il controllo di NRF2 e che è coinvolto nella riduzione di HDAC4, è la tioredossina (TXN). Un aumento dell'espressione genica ($p < 0.05$) di TXN è evidenziabile dopo Dexa, nella linea AT GM00648 hTERT a 24h e nel WT hTERT a 48h (Figura 25). L'espressione di TXN resta comunque alta nel linea AT GM00648 anche a 48h di stimolazione.

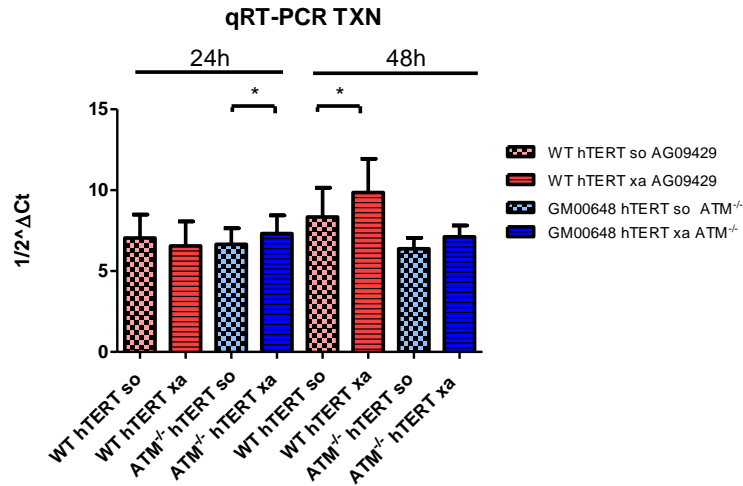


Fig25. Analisi in qRT-PCR dell'espressione genica di TXN (tioredossina) in cellule immortalizzate WT e ATM^{-/-}GM00648, dopo 24h e 48h di stimolazione con Dexa o con il rispettivo controllo DMSO (*Wilcoxon test, p<0.05, Graphs Mean with SEM).

Inoltre una conformazione ridotta di HDAC4 mediata dall'azione del pathway NRF2-TXN può modulare l'espressione genica di HDAC4 stessa tramite miR206 [126]. L'analisi in RT-qPCR sembra confermare questa evidenza nella linea mutata GM00648 hTERT trattata con Dexa (Figura 26) e non nella linea WT, in accordo con i corrispondenti stati red-ox di HDAC4.

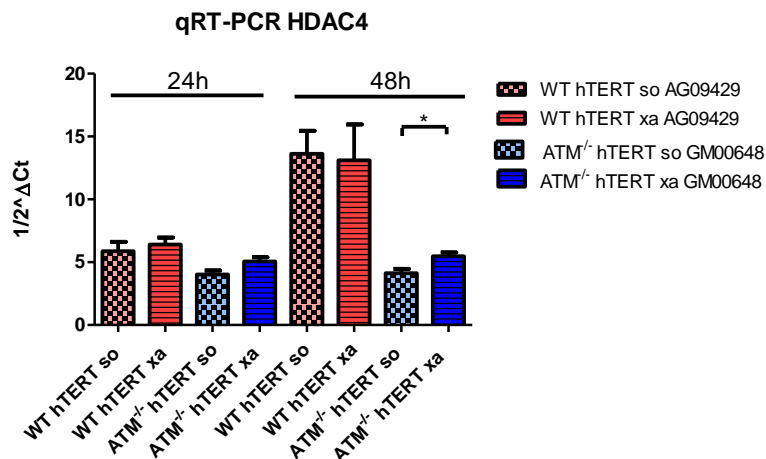


Fig26. Espressione del gene HDAC4 dopo trattamento con Dexa a 24h e 48h nella linea mutata GM00648 hTERT e nel WT hTERT, (Graphs Mean with SEM *Wilcoxon test, p<0.05).

Il Dexa non fa invece variare l'espressione del gene eme ossigenasi 1 (HMXO1) modulato da NRF2 (Figura 27A). NRF2 inoltre, una volta attivata, è in grado di aumentare l'espressione di enzimi chiave della via del pentosio fosfato (PPP) quali la glucosio 6-fosfato deidrogenasi (G6PD) [126]. Tuttavia l'espressione di tale gene non sembra variare a seguito al trattamento con Dexa (Figura 27B).

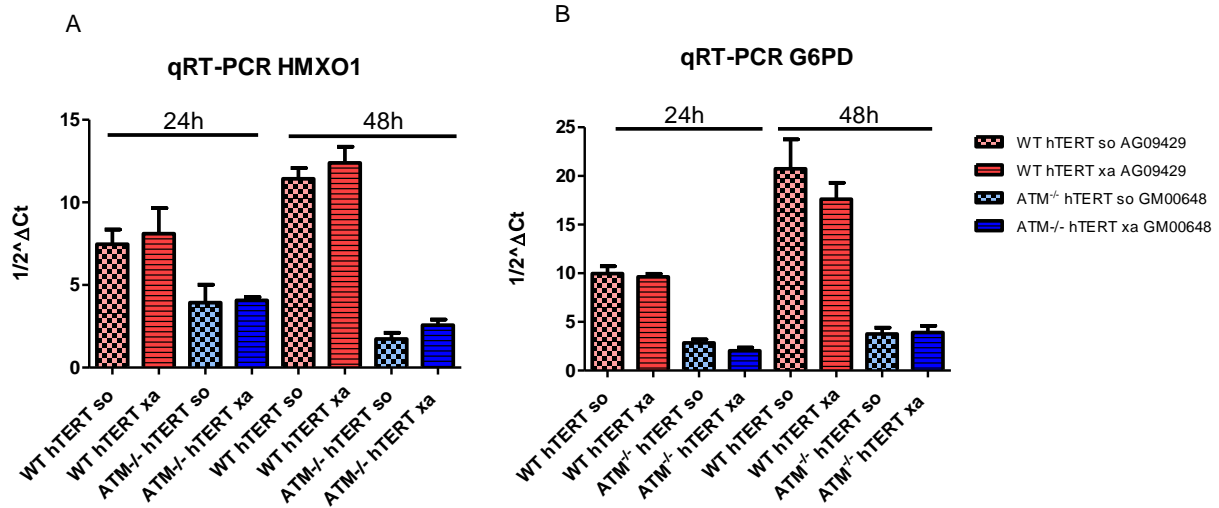


Fig27. A) Espressione del gene HMXO1, target di NRF2 e B) del gene G6PD, dopo trattamento con Dexa nella linea mutata GM00648 hTERT e nel WT hTERT, dopo 24h e 48h (Graphs Mean with SEM *Wilcoxon test, $p < 0.05$).

3.5 HDAC4 e HIF-1 α in funzione di Dexamethasone.

Evidenze riportate in letteratura mostrano come HDAC4 possa formare un complesso con la proteina 14-3-3 ζ e HIF-1 α , determinando la stabilizzazione di HIF-1 α [127]. L'eventuale presenza del complesso HDAC4-HIF-1 α , si è testata tramite immunoprecipitazione di HDAC4 in estratti proteici nucleari. In figura 28 è riportata la banda immunoreattiva di HIF-1 α che incrementa dopo trattamento con Dexa nelle linee cellulari WT hTERT ed in maniera più preponderante nella linea AT GM00648 hTERT. Anche HIF-1 α non processata è stata osservata.

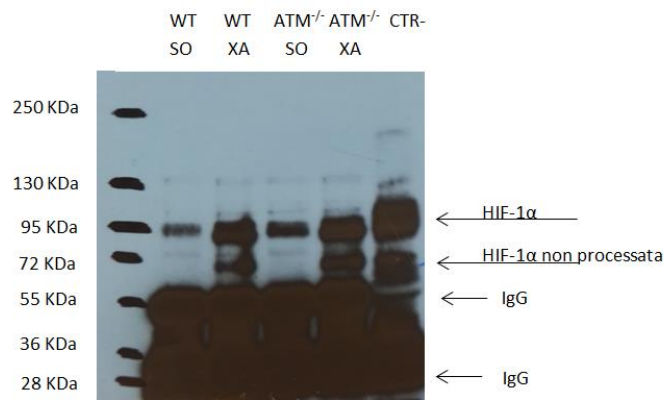


Fig28. Bande immunoreattive di HIF-1 α e HIF-1 α non processata, ottenute da immunoprecipitazione di HDAC4 in estratti proteici nucleari.

Analisi in WB condotte su estratti proteici nucleari, hanno evidenziato un aumento dopo Dexa del contenuto di HIF-1 α nella linea GM00648 hTERT (Figura 29) in accordo con quanto precedentemente riportato.

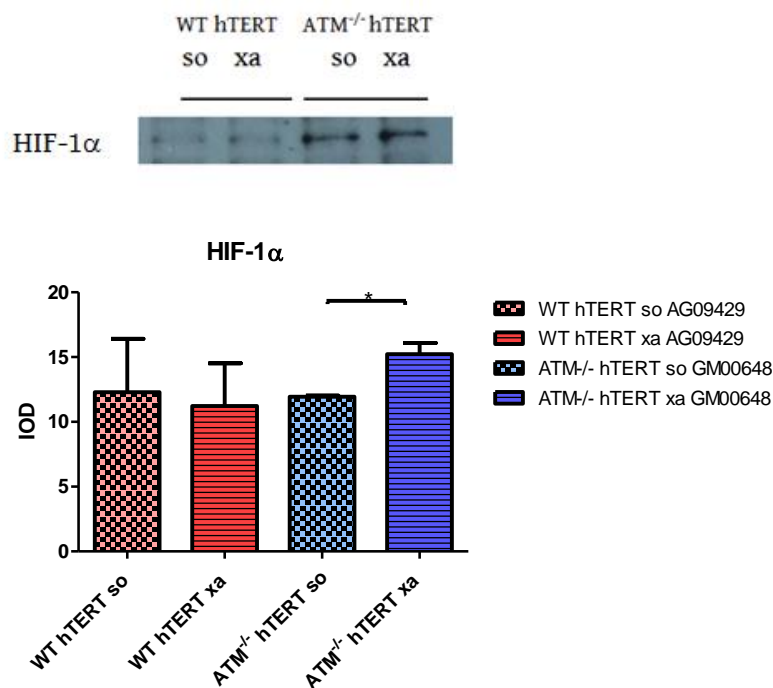


Fig29. Quantificazione di HIF-1 α in estratti proteici nucleari di cellule immortalizzate AT GM00648 e del WT, trattato con Dexa o con controllo DMSO (Graphs Mean with SEM).

Inoltre, le analisi IF condotte sulle linee GM00648 hTERT, mostrano un incremento di HIF-1 α nucleare (Figura 30) e, qualitativamente, una co-localizzazione di HDAC4 e HIF-1 α , che sembra aumentare dopo trattamento con Dexa (Figura 31). HIF-1 α gioca un ruolo cruciale nella sopravvivenza cellulare, regolando la trascrizione di oltre 100 geni coinvolti nel metabolismo del glucosio, nella proliferazione cellulare, nella migrazione e nell'angiogenesi [128].

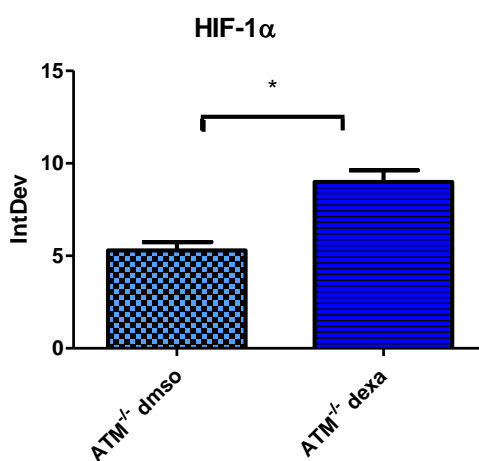


Fig30. Quantificazione in immunofluorescenza del contenuto di HIF1 α nucleare nella linea cellulare GM00648 hTERT stimolata con Dexa o con corrispettivo veicolo DMSO.

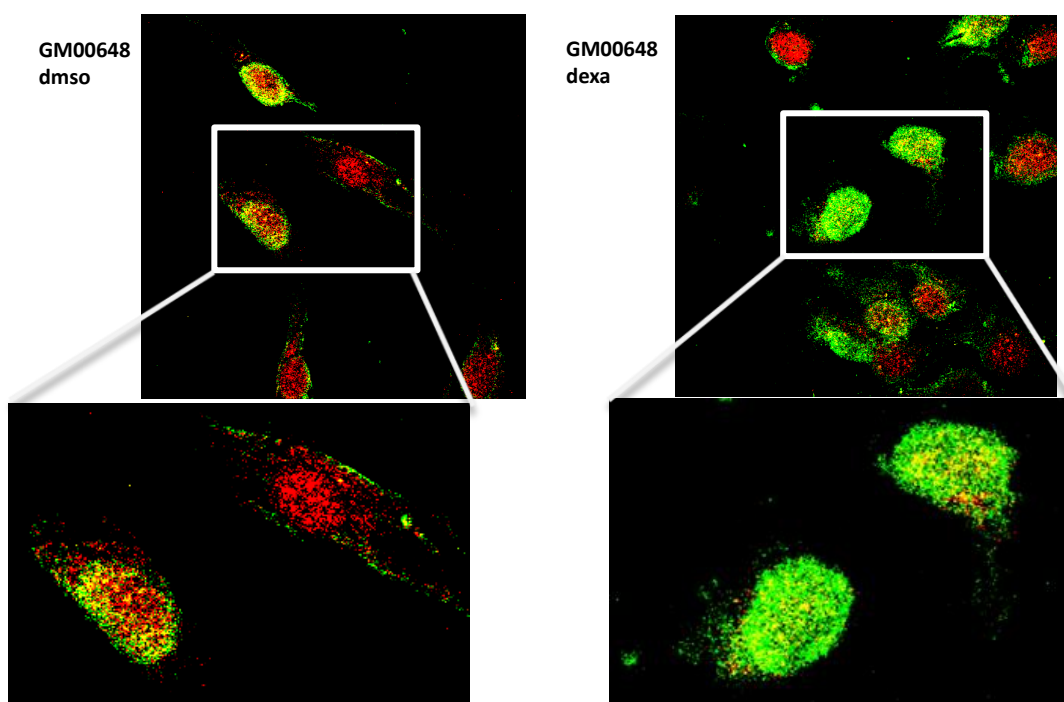


Fig31. Immagini rappresentative in IF di co-localizzazione di HIF-1 α (green) e HDAC4 (red) nella linea AT GM00648 stimolata con Dexa o con il controllo DMSO.

Con lo scopo di comprendere l'eventuale funzione trascrizionale di HIF-1 α mediata da HDAC4, è stato deciso di verificare l'espressione di alcuni geni controllati da HIF-1 α . Uno dei geni regolati positivamente da HIF-1 α nel pathway dell'angiogenesi è il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), la cui espressione dopo Dexa, risulta significativamente ridotta nel WT hTERT a 24h e 48h e nell'AT GM00648 hTERT a 24h (Figura 32). HIF-1 α regola anche geni del metabolismo, quali la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (G3PDH), il trasportatore di glucosio GLUT-1, IGF-BP3 e p21. Dopo 24h di stimolazione con Dexa, l'espressione di p21 aumenta significativamente ($p < 0.05$) nella linea AT GM00648 hTERT mantenendosi a livelli superiori rispetto al controllo DMSO anche a 48h (Figura 33A). Una riduzione ($p < 0.05$) è invece presente nel WT hTERT trattato con Dexa a 48 ore.

Il Dexamethasone promuove, inoltre, una riduzione dell'espressione di IGF-BP3 a 24h e 48h nelle cellule AT GM00648 hTERT (Figura 33B), riportandone i livelli a valori simili a quelli del WT hTERT. Nessuna modulazione ad opera del Dexa è stata riscontrata nell'espressione di G3PDH (Figura 34A), mentre nelle cellule WT hTERT, l'espressione del trasportatore del glucosio GLUT-1, risente di un aumento ($p < 0.05$) dell'espressione genica a 24h, seguito da una riduzione ($p < 0.05$) a 48h (Figura 34B).

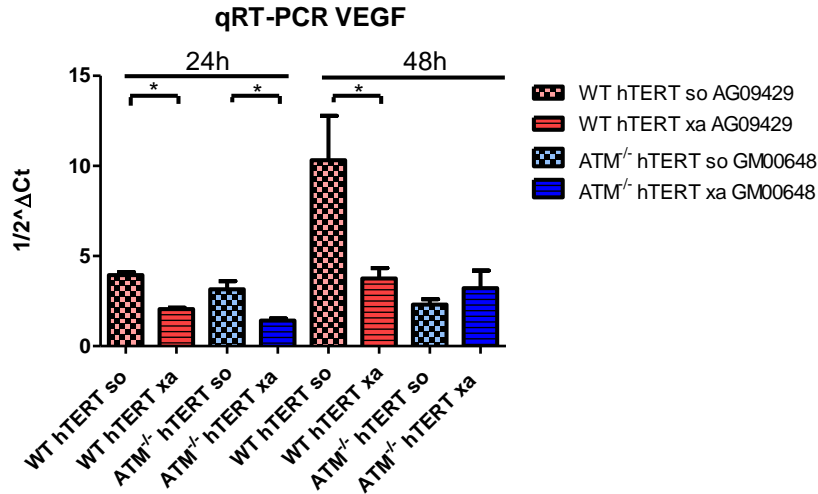


Fig32. Quantificazione dell'espressione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) in cellule AT GM00648 e WT immortalizzate, a 24h e 48 h di stimolazione con DEXA o con il controllo DMSO (Graphs Mean with SEM, *Wilcoxon test, p<0.05).

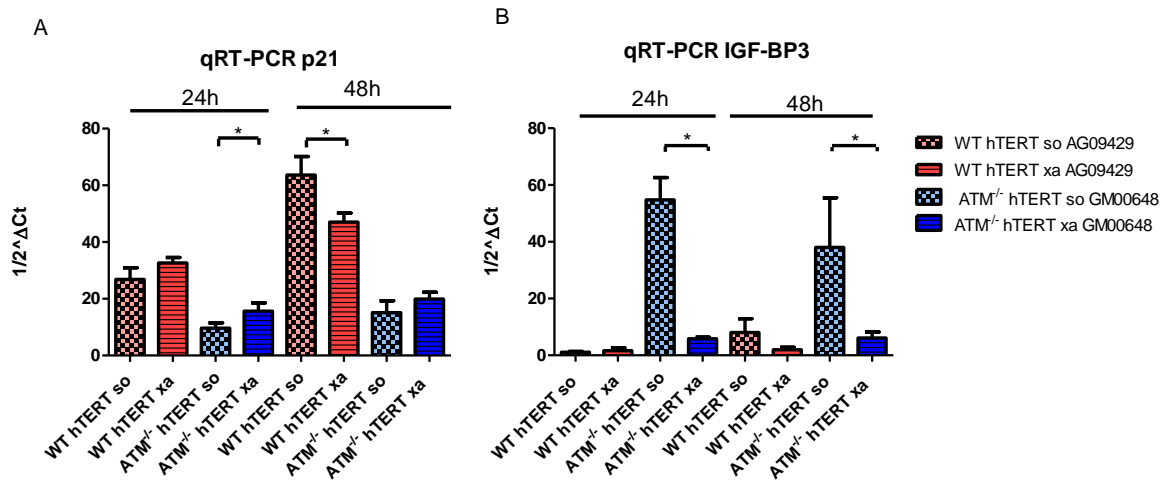


Fig33. Quantificazione dei livelli di espressione di p21 A) e di IGF-BP3 B) in cellule immortalizzate AT GM00648 e nel WT, dopo trattamento di 24h e 48h con DEXA o con il controllo DMSO (*Wilcoxon test, p<0.05, Graphs Mean with SEM).

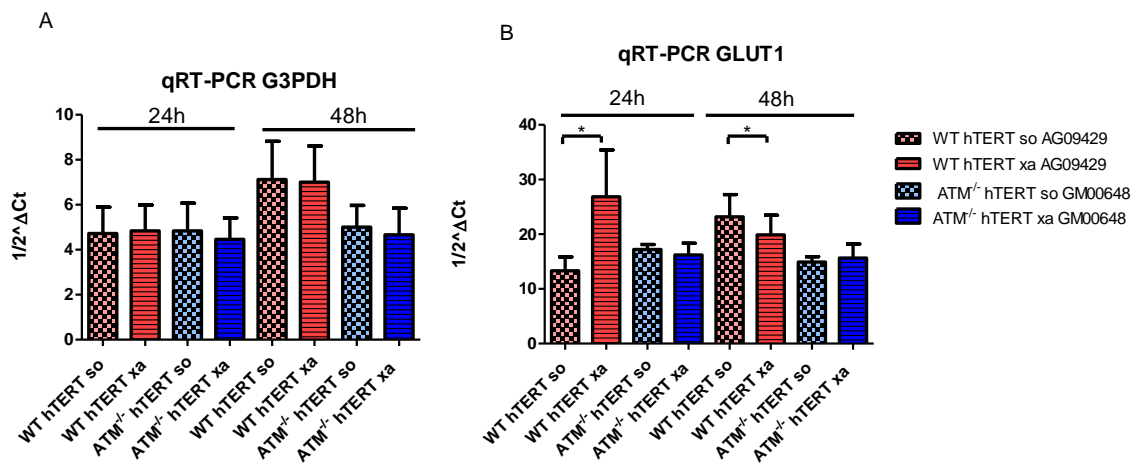


Fig34. Quantificazione di saggi qRT-PCR del gene G3PDH A) e GLUT-1 B) in cellule immortalizzate ATM^{-/-} GM00648 e WT, dopo trattamento con DEXA e con il controllo DMSO (*Wilcoxon test, p<0.05, Graphs Mean with SEM).

3.6 Effetti di Dexamethasone sulla lamina A/C.

LA lamina A/C è stata inizialmente utilizzata come normalizzatore per le proteine nucleari indagate tramite Western Blotting. L'analisi degli estratti proteici nucleari in saggi di WB ne ha però evidenziato un aumento significativo ($p < 0.05$) in funzione di Dexa, nelle linee mutate AT GM00648 e GM02052 (Figura 35A). Nessuna variazione è invece emersa nelle analisi WB del contenuto proteico totale di tali linee (Figura 35B).

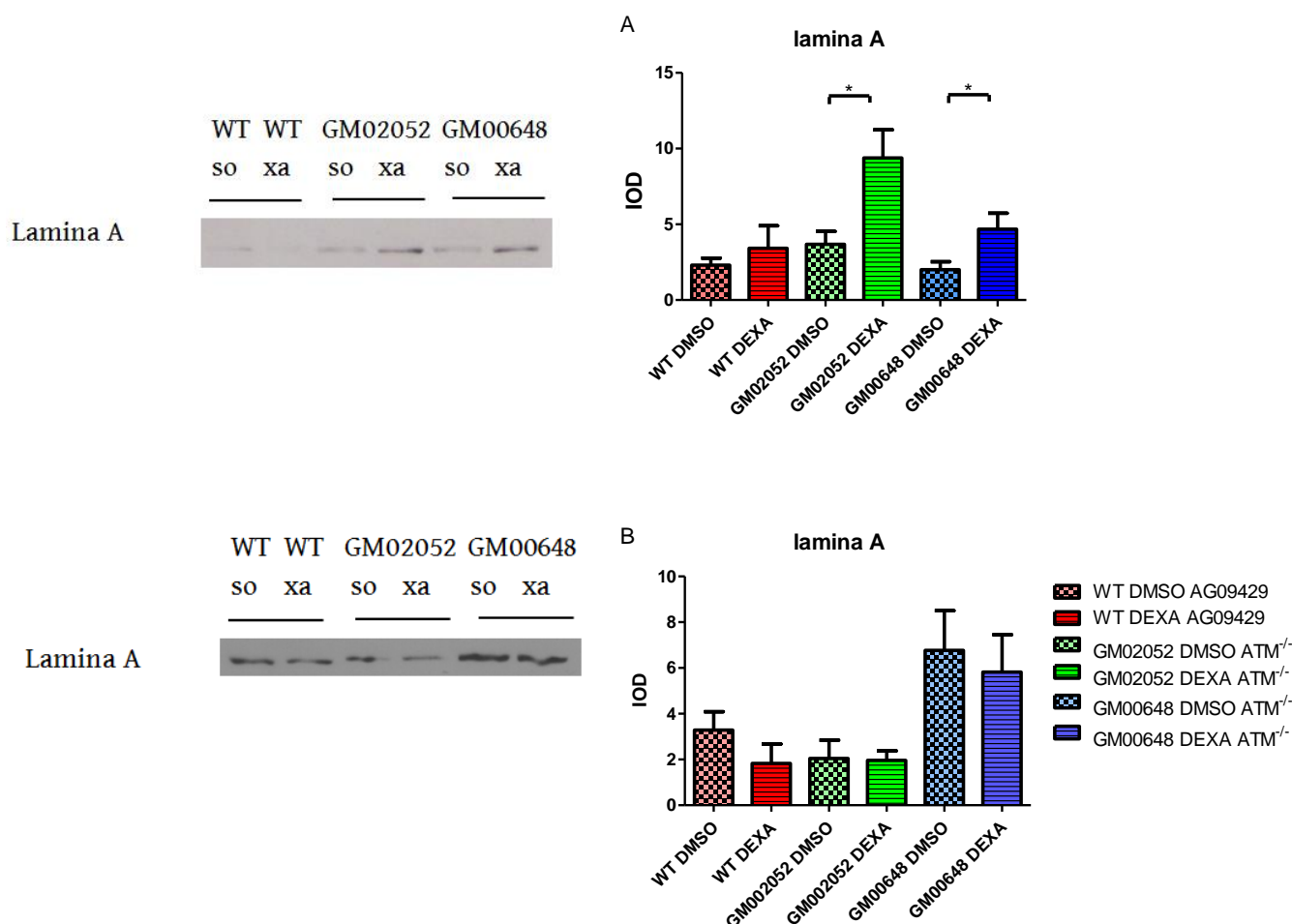


Fig 35. Quantificazione di lamina A in prove di WB, di estratti proteici nucleari A) e in estratti proteici totali B) di linee di fibroblasti primari AT GM02052, GM00648 e nel WT, trattate con Dexa o con il corrispettivo controllo DMSO (*Wilcoxon test, $p < 0.05$, Graphs Mean with SEM).

La lamina C, prodotto di splicing dell'mRNA del gene della lamina A/C (LMNA), non mostra alcuna variazione significativa a seguito del trattamento con il Dexa negli estratti proteici nucleari, ad eccezione di una riduzione ($p < 0.05$) nel campione WT (Figura 36A). Anche il contenuto proteico totale analizzato in WB, non sembra evidenziare cambiamenti ascrivibili al trattamento con Dexa (Figura 36B).

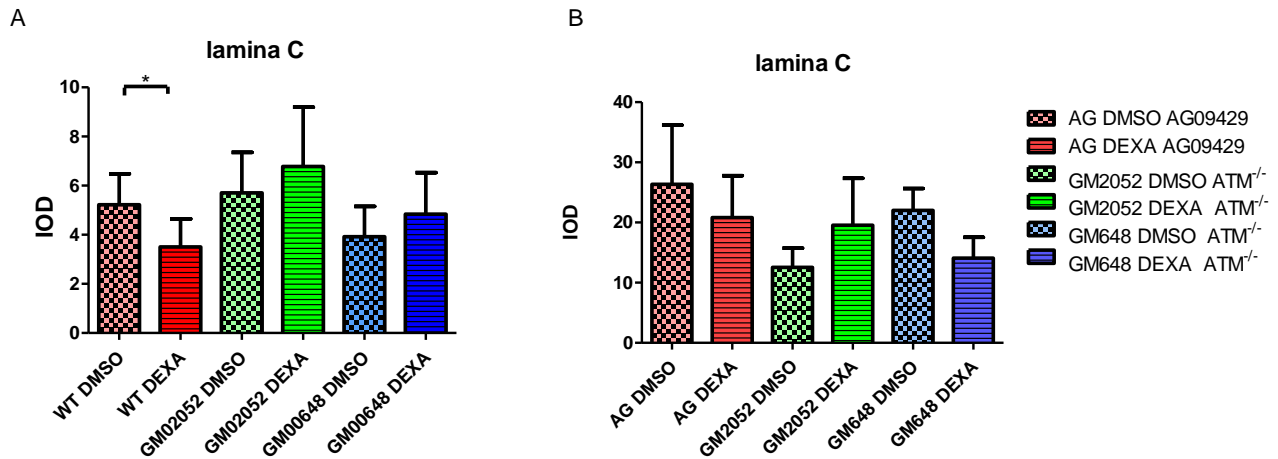
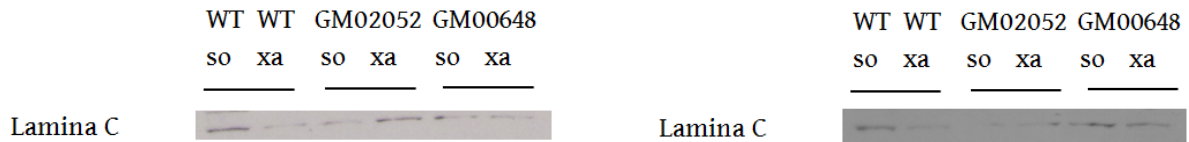


Fig36. Quantificazione delle analisi WB di lamina C in estratti proteici nucleari A) e totali B) delle linee di fibroblasti primari AT GM02052, GM00648 e nel WT, trattate con Dexa o con controllo DMSO (*Wilcoxon test, $p < 0.05$, Graphs Mean with SEM).

Analisi di qRT-PCR sono state successivamente condotte per poter verificare l'eventuale modulazione dell'espressione del gene della lamina A/C da parte del Dexamethasone. Il Dexa provoca unicamente una riduzione significativa ($p < 0.05$) dell'espressione di LMNA nel campione mutato GM02052 (Figura 37); l'espressione rimane invariata nel campione WT e nel campione mutato GM00648.

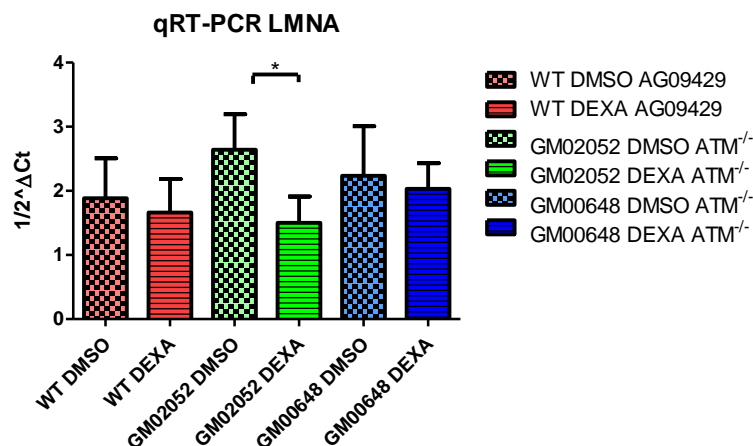


Fig37. Analisi della variazione dell'espressione del gene LMNA in saggi qRT-PCR, su fibroblasti primari mutati AT GM02052, GM00648 e nel WT, stimolati con Dexa o con controllo DMSO (*Wilcoxon test $p < 0.05$, Graphs Mean with SEM).

Per stabilire la concentrazione di Dexa capace di aumentare maggiormente il contenuto di lamina A/C, si sono realizzate prove d'immunofluorescenza (IF) trattando le cellule con quantità crescenti del farmaco. La concentrazione di Dexa pari a 100 nM si è dimostrata la più efficace e quindi è stata mantenuta anche per le successive analisi (Figura 38).

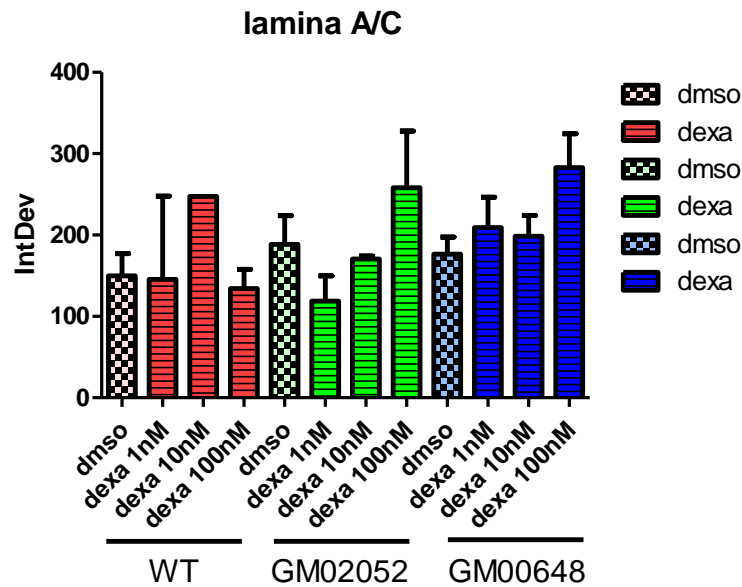


Fig38. Quantificazione tramite saggi IF, del contenuto di lamina A/C, in funzione di diverse concentrazioni di Dexa nelle linee di fibroblasti primari AT GM02052, GM00648 e WT (Graphs Mean with SEM).

Ulteriori saggi d'immunofluorescenza hanno confermato un significativo aumento di lamina A/C nucleoplasmatica in tutte le linee mutate trattate con Dexa ed in maniera statisticamente significativa nella linea mutata GM00648 (Figura 39A e B).

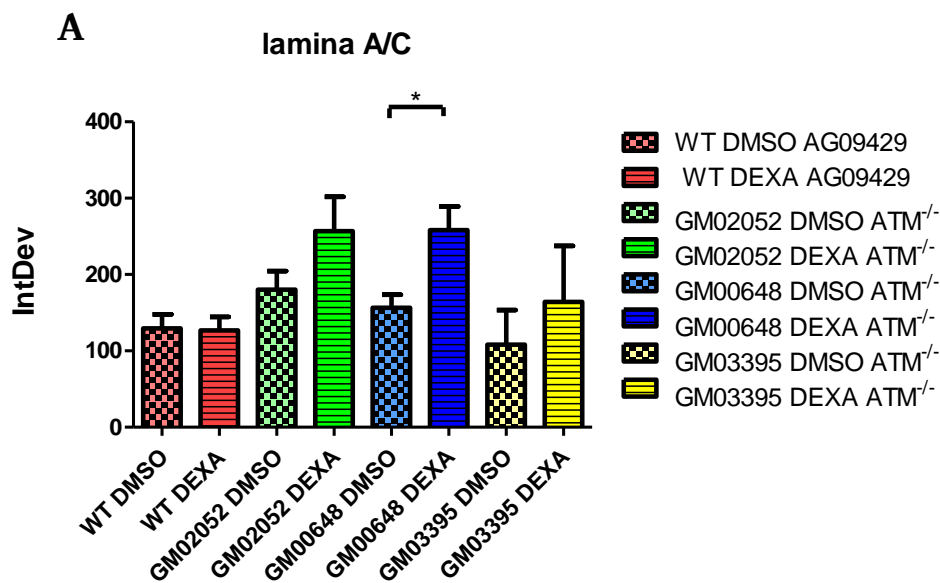


Fig 39. A) Quantificazione del contenuto nucleare di lamina A/C in saggi di IF su cellule $ATM^{-/-}$ GM02052, GM00648, GM03395 e nel WT, stimolati per 48h con Dexa o con il rispettivo controllo DMSO.

B Immunolocalizzazione lamina A/C

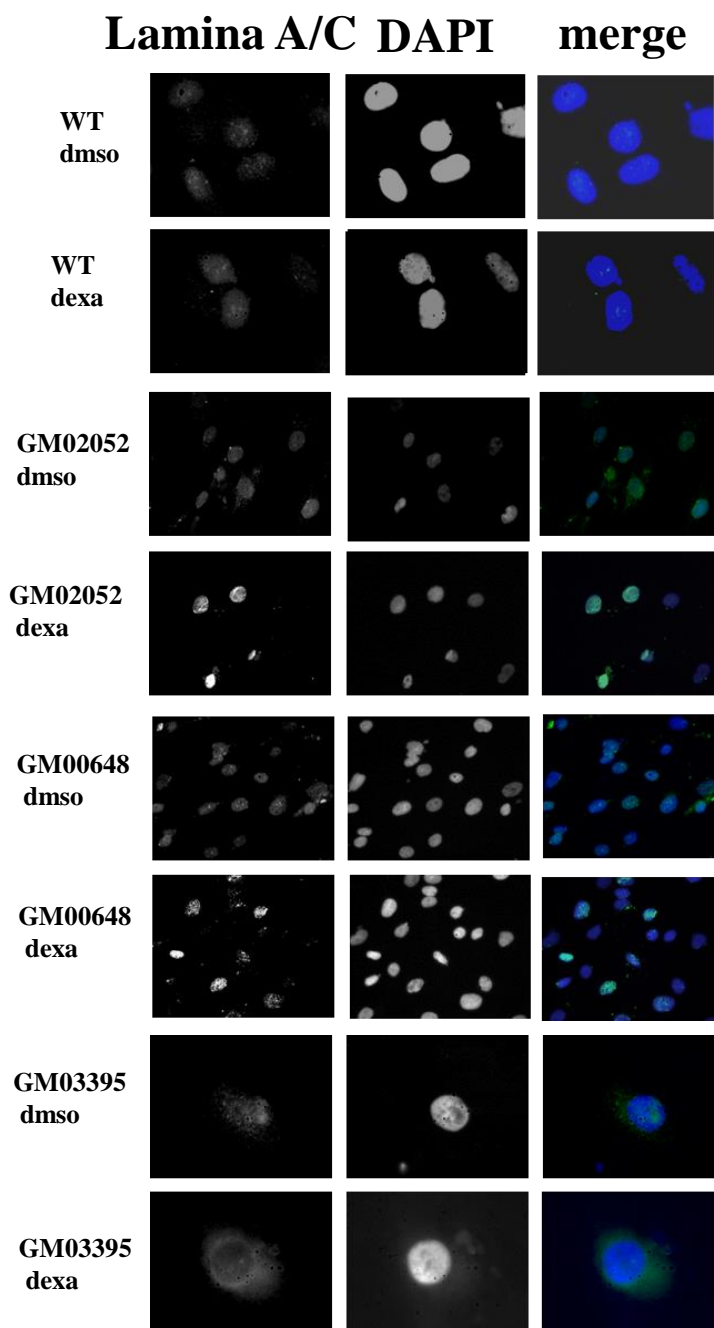
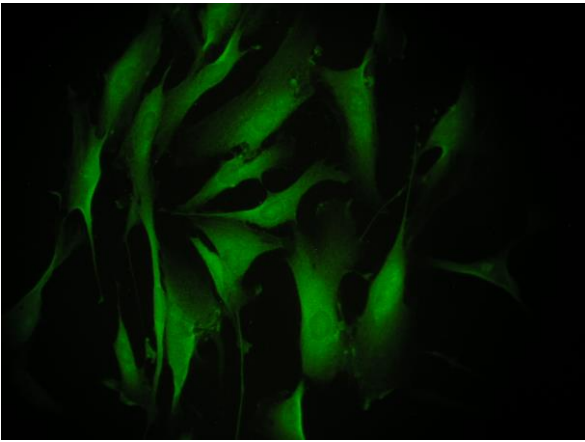


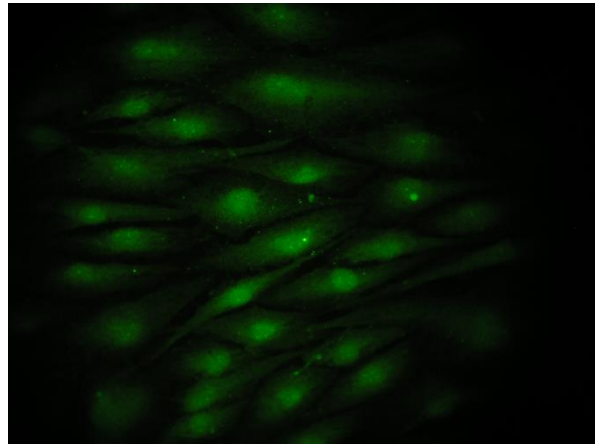
Fig39.B) Immunolocalizzazione di lamina A/C in linee AT GM02052, GM00648, GM03395 e WT, dopo 48h di stimolazione con Dexa o con il rispettivo controllo DMSO.

Analisi d'immunolocalizzazione della lamina A/C sono state inoltre condotte con tempi di stimolazione pari a sette giorni, per verificarne il comportamento anche a tempistiche che possano maggiormente avvicinarsi a quelle del trattamento dei pazienti AT. Le immagini ottenute mostrano come la localizzazione nucleoplasmatica della lamina A/C risulti maggiormente presente a 7 gg di stimolazione anche nelle cellule WT anche se con intensità inferiore rispetto le linee AT (Figura 40).

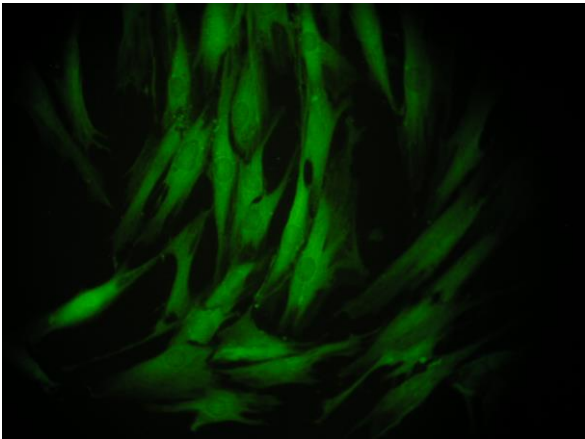
WT DEXA 24h



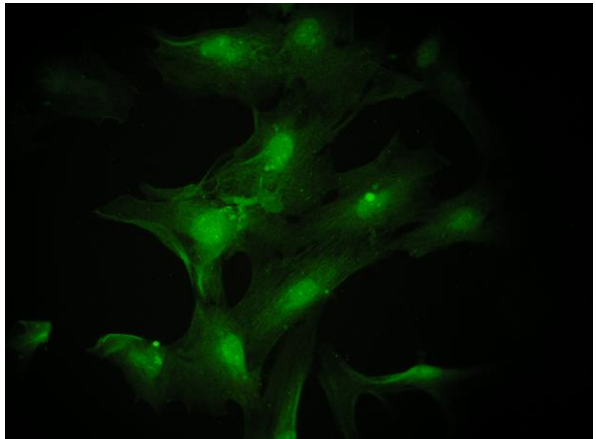
WT DEXA 7GG



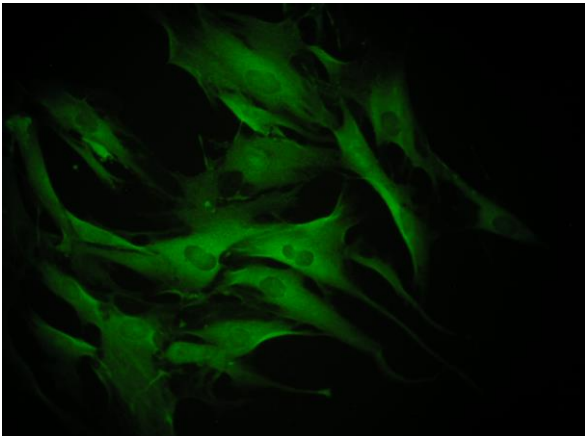
GM02052 DEXA 24h



GM02052 DEXA 7GG



GM00648 DEXA 24h



GM00648 DEXA 7GG

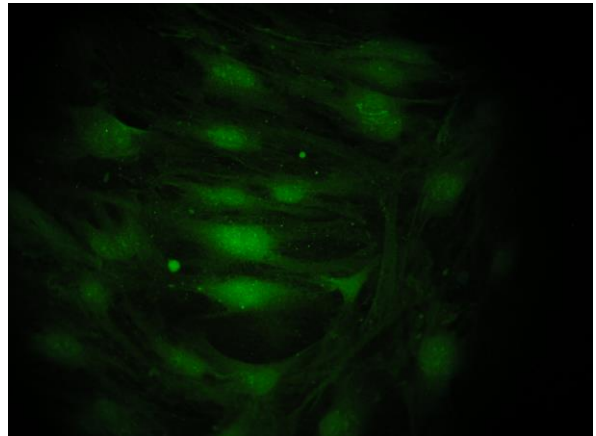


Fig40. Immagini rappresentative dell'analisi IF della lamina A/C in cellule WT e AT GM02052, GM00648 stimulate con Dexa per 24h o 7 giorni.

L'analisi delle immagini di microscopia confocale mostrano, in aggiunta, un incremento delle invaginazioni e una riduzione del segnale di lamina A/C sul ring nucleare, nelle cellule della linea GM00648 stimulate con il Dexa (Figura 41 A e B).

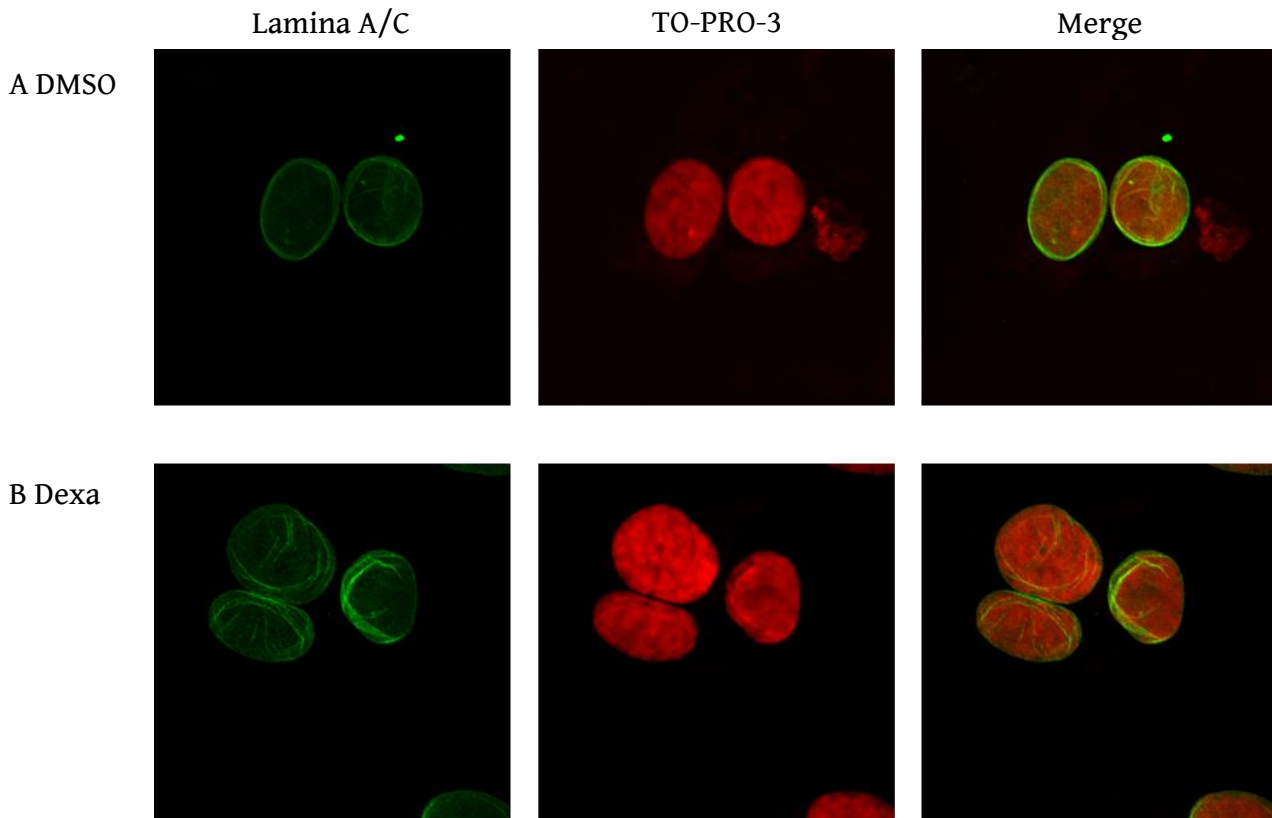


Fig41. A) Immagini rappresentative al microscopio confocale dell'analisi IF della lamina A/C in cellule della linea mutata AT GM00648 stimulate con DMSO e B) con Dexa per 48h.

3.6.1 Lamina A/C nelle linee di fibroblasti immortalizzate

Il modello cellulare ottenuto tramite immortalizzazione delle linee cellulari di fibroblasti WT e GM00648, è stato testato anche per quel che riguarda il fenotipo legato alla variazione di lamina A/C, precedentemente osservato nelle corrispettive linee primarie. L'accumulo nucleare di lamina A/C, è stato confermato nella linea GM00648 immortalizzata ed è stato osservato anche nella linea WT hTERT la cui corrispondente linea primaria mostrava accumulo solo dopo 7gg di trattamento. (Figura 42 A e B).

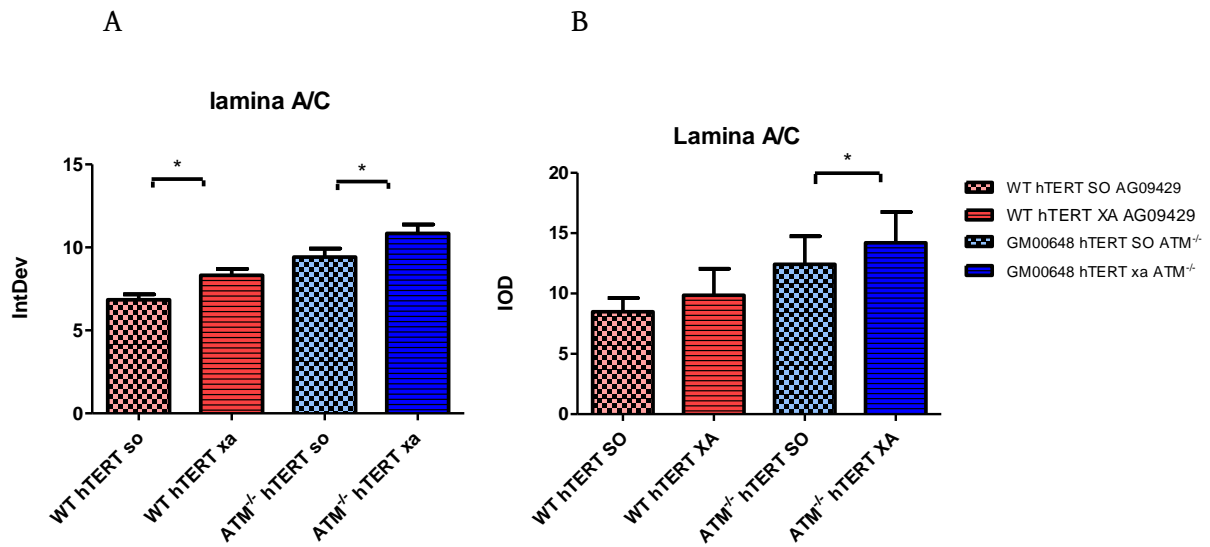
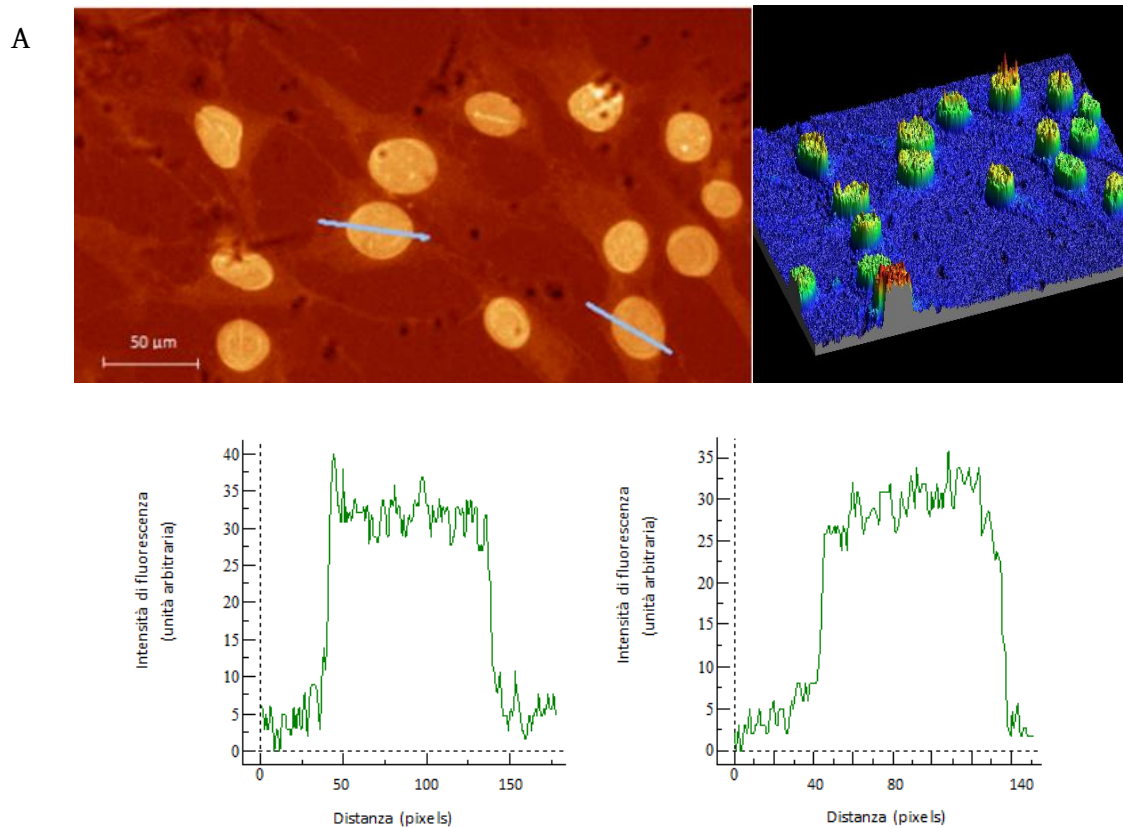


Fig42. Quantificazione in IF A) e WB B) del contenuto nucleare di lamina A/C in cellule WT e ATM^{-/-} GM00648 immortalizzate e stimulate con dexa (xa) o con il controllo DMSO (so) per 48h. (*Wilcoxon test, p<0.05, Graphs Mean with SEM)

In figura 43A e B sono inoltre riportate immagini in microscopia IF con le corrispondenti distribuzioni del segnale nucleare della lamina A/C.



B

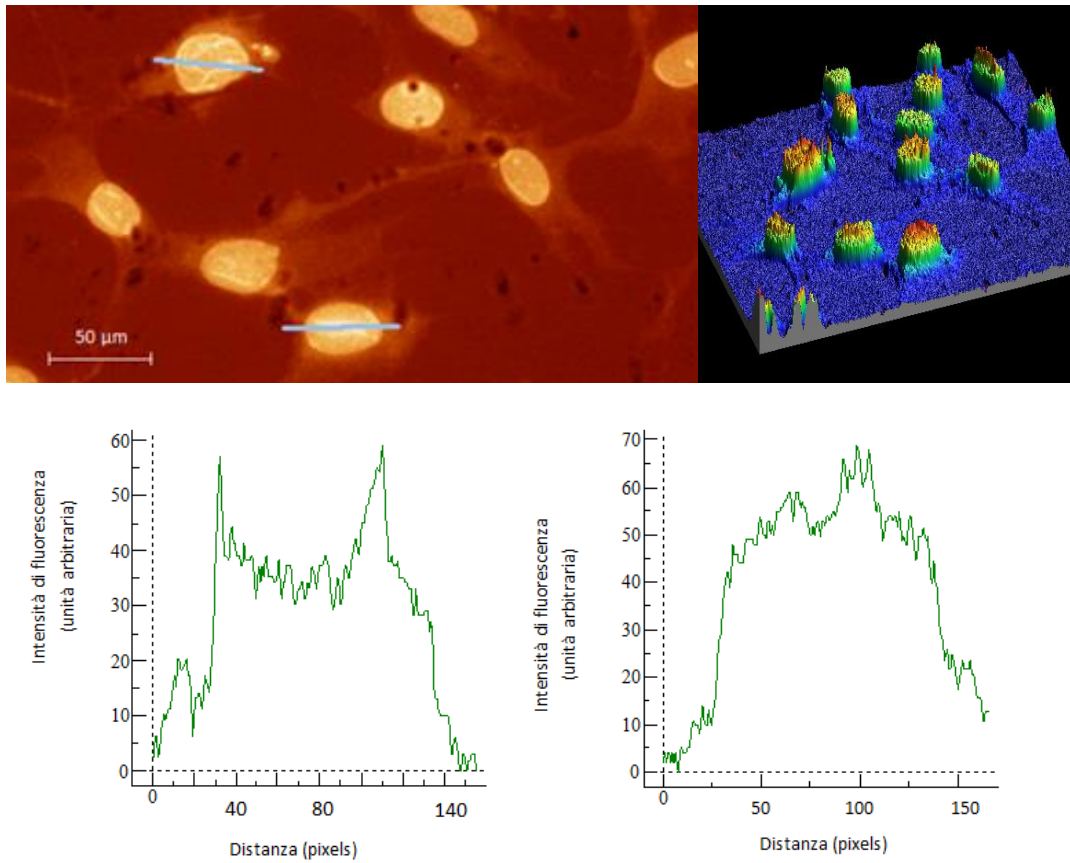


Fig43. Immagini rappresentative in analisi IF della distribuzione nucleare di lamina A/C in cellule GM00648 hTERT di controllo A) e stimulate con Dexa B).

3.6.2 Dexamethasone e variazioni delle caratteristiche biofisiche

Le lamine sono le principali componenti del nucleo e in quanto tali, contribuiscono a determinare le proprietà biofisiche e meccaniche sia del nucleo, che dell'intera cellula. Analisi con microscopio a forza atomica (AFM) hanno permesso di osservare come il trattamento con Dexa provochi un aumento della rigidità cellulare (in corrispondenza del nucleo) sia delle cellule mutate GM00648 che del WT (Figura 44). Inoltre si può notare come la rigidità basale delle cellule WT sia superiore a quella delle AT GM00648.

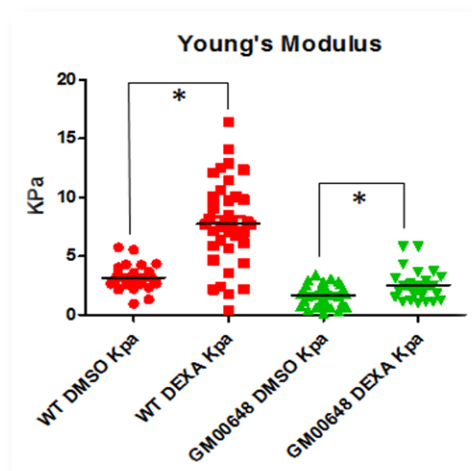


Fig44. Quantificazione della variazione del modulo di Young, misurato tramite AFM, in cellule AT GM00648 e WT, dopo trattamento con Dexa o con il controllo DMSO per 48h.

Dalle analisi in microscopia IF è inoltre stato possibile misurare le aree (esprese in pixels²) dei nuclei delle cellule osservate. Dopo trattamento con Dexa è stato possibile riscontrare un aumento della superficie nucleare sia in cellule WT hTERT che in cellule AT hTERT (Figura 45A) ottenendo anche un rapporto tra quantità di lamina A/C in precedenza illustrato e superficie (Figura 45B).

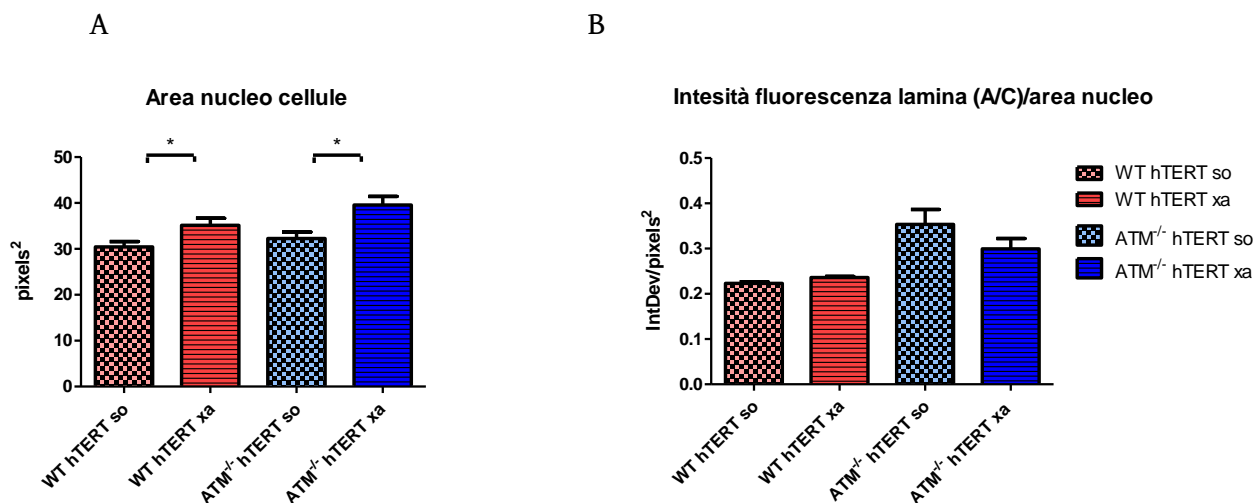


Fig45. Stima in microscopia IF di A) area nucleare e in B) relativo rapporto intensità lamina (A/C)/area nucleare in cellule WT hTERT e G000648 hTERT, trattate con Dexa o con controllo DMSO (*Wilcoxon test, $p < 0.05$, Graphs Mean with SEM).

3.6.3 Fosforilazioni e accumulo di lamina A/C.

Dalle prove d'immunolocalizzazione è stato possibile osservare che l'aumento del contenuto di lamina A/C interessa la regione nucleoplasmatica. Sono state così indagate alcune fosforilazioni riportate in letteratura che costituiscono una delle principali modificazioni post traduzionali coinvolte nella localizzazione a nucleoplasma della lamina A/C. La fosforilazione in Ser22 è coinvolta principalmente nella disgregazione dell'envelope nucleare all'inizio della mitosi, ed è stata studiata tramite immunolocalizzazione. Il trattamento con Dexa sembra aumentare tale fosforilazione in tutte le linee, con un aumento maggiore nel mutato GM02052 (Figura 46).

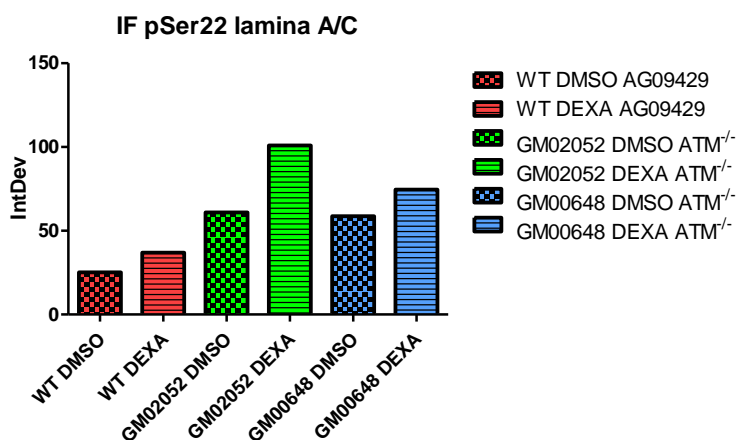


Fig 46. Quantificazione tramite immunolocalizzazione della fosforilazione in Ser22 della Lamina A.

Anche la fosforilazione di Ser404 della lamina A è coinvolta nei processi di localizzazione a nucleoplasma. Diversi studi [129,130] dimostrano come Ser404 della lamina A sia un sito di fosforilazione di AKT, proteina chinasi coinvolta nella sopravvivenza cellulare, nella proliferazione e nelle risposte metaboliche a valle del signaling della fosfoinositide 3-chinasi. Analisi di WB sugli estratti proteici totali evidenziano come il Dexametasona aumenti significativamente ($p < 0.05$) il rapporto pSer404 lamina A/lamina A (Figura 47)

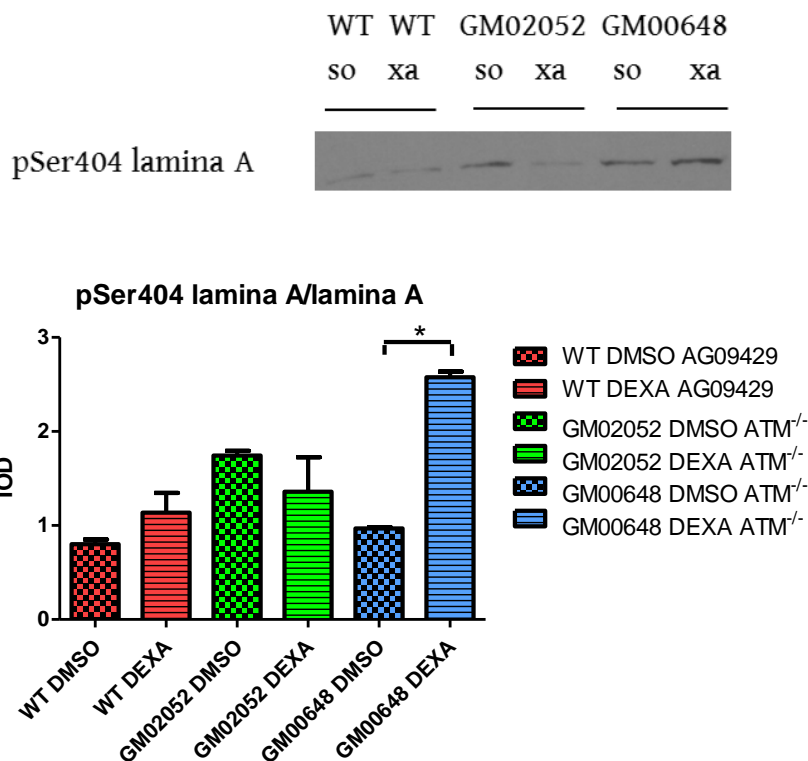


Fig47. Quantificazione tramite WB di pSer404 lamina A/lamina A, su estratti proteici totali di cellule AT GM02052, GM00648 e nel WT, stimolati con Dexa o con il rispettivo controllo DMSO (*Wilcoxon test, $p < 0.05$; Graphs Mean with SEM).

Ulteriori indagini di WB hanno permesso di verificare l'aumento del rapporto pSer473 AKT/AKT in funzione di Dexa nella linea mutata GM00648 (Figura 48A). Il Dexametasona sembra quindi in grado di attivare AKT, provocando l'accumulo nucleoplasmatico di lamina A. Uno dei target a valle di AKT è la glicogeno sintasi chinasi 3 ($GSK3\alpha/\beta$), che risente dell'inibizione da parte di pAKT. Analisi preliminari di WB su estratti proteici totali (dati non mostrati), evidenziano come il Dexa riduca leggermente la fosforilazione di $GSK3\alpha/\beta$ nel mutato GM00648, mentre nessuna variazione sembra apprezzabile nel WT e nel campione AT GM02052. I signaling Raf/ERK e PI3K/AKT/mTOR sono entrambi attivati da set di recettori di fattori di crescita simili e promuovono entrambi la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. Analisi preliminari realizzate tramite WB sugli estratti proteici totali mostrano un incremento della fosforilazione di ERK1/2 nel campione AT GM00648 mentre andamento opposto sembra essere presente nel WT e nel campione AT GM02052 (Figura 48B).

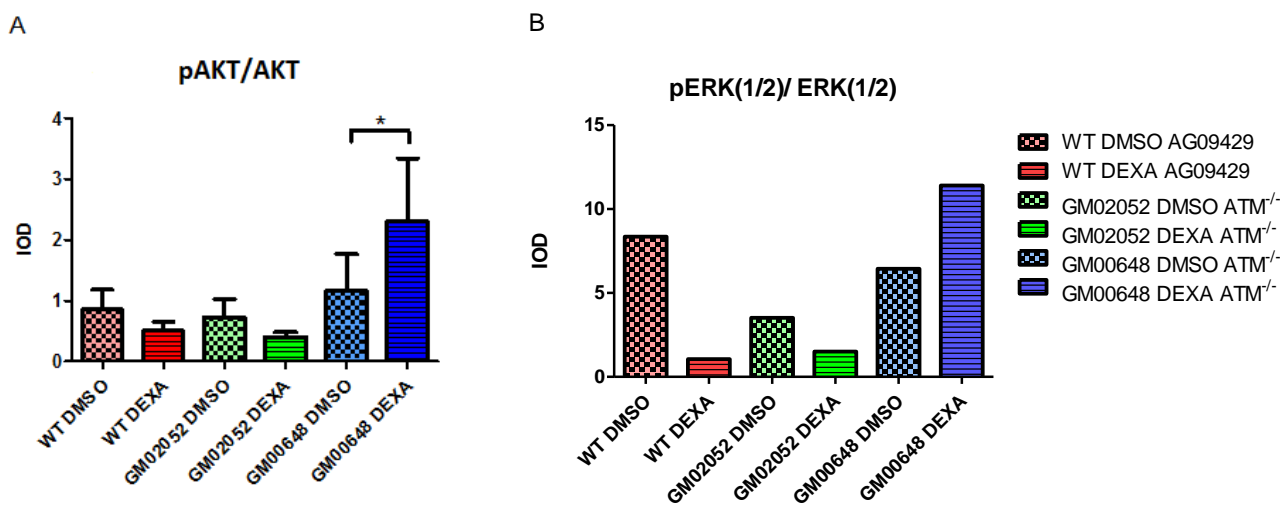
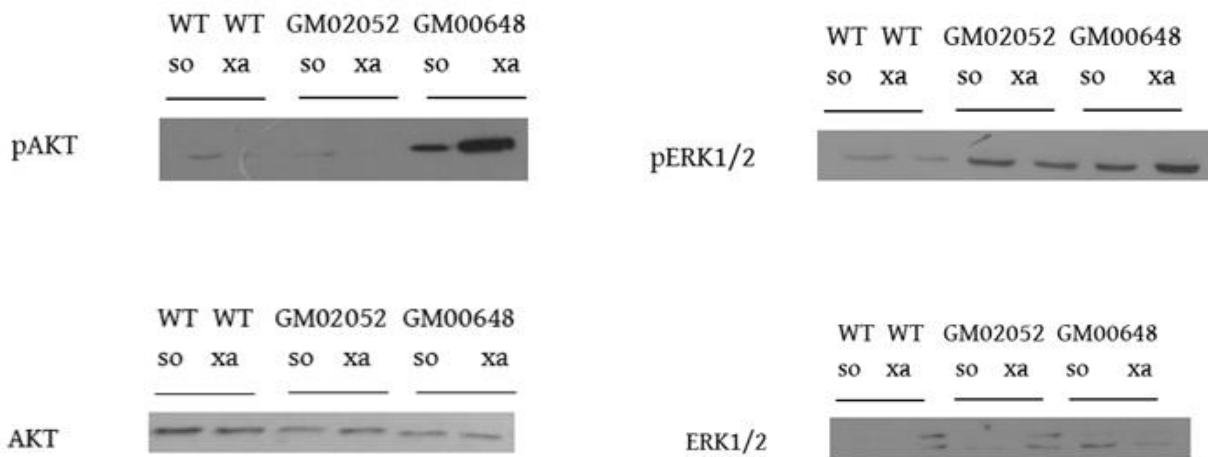


Fig48.A) Quantificazione in WB della variazione del contenuto di pAKT(Ser473)/AKT in estratti totali di cellule AT GM02052, GM00648 e nel WT trattato con Dexa o con il rispettivo controllo DMSO(*Wilcoxon test, $p < 0.05$, Graphs Mean with SEM). B) quantificazione tramite WB dei livelli del rapporto pERK(1/2)/ ERK(1/2) in estratti proteici totali delle cellule mutate GM02052, GM00648 e del WT, stimolati con Dexa o con il rispettivo controllo DMSO.

La proteina fosforilata p38, coinvolta anch'essa nei pathways di sopravvivenza cellulare, non risulta essere presente in quantità rilevabile né basalmente né dopo Dexa nelle linee mutate $ATM^{-/-}$, mentre vede un aumento a seguito di stimolazione nel WT (Figura 49).

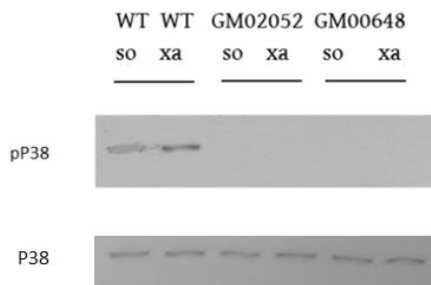


Fig49. Immagine rappresentativa di fosfoP38 in cellule mutate GM02052, GM00648 e nel WT dopo trattamento con Dexa o con il controllo DMSO.

3.6.4 Regolazione trascrizionale mediata da lamina A/C

La lamina A/C e le proteine associate, sono coinvolte in un'ampia varietà d'interazioni intermolecolari, componendo diversi pathways di trasduzione del segnale, capaci di modulare l'espressione di target genici che si trovano a valle [131]. In letteratura, geni modulati da lamina A/C sono stati studiati in relazione alle mutazioni del gene LMNA, presenti nelle laminopatie. Volendo indagare la possibile modulazione trascrizionale dovuta all'accumulo nucleoplasmatico di lamina A/C osservata con Dexa, si sono studiati alcuni potenziali geni target. Il gene *mdm2* coinvolto nel signaling dell'apoptosi, presenta una riduzione ($p < 0.05$) dell'espressione con Dexa nella linea GM02052 mentre un lieve aumento si registra nella linea GM00648. Una riduzione non significativa è invece presente nel WT (Figura 50A).

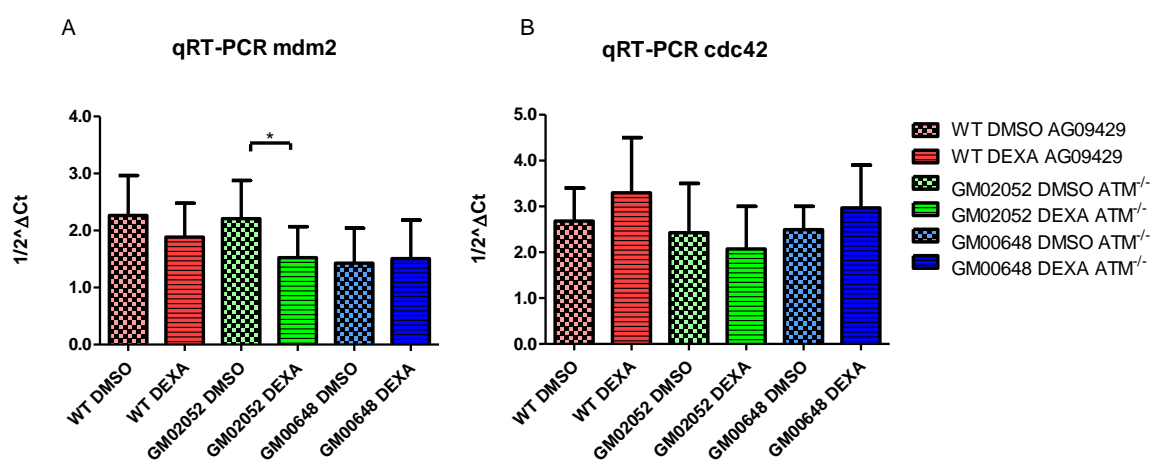


Fig50. Quantificazione dell'espressione del gene A) *mdm2* e B) *cdc42* in linee AT GM02052, GM00648 e nel WT stimolati con Dexa o con controllo DMSO (*Wilcoxon test, $p < 0.05$, Graphs Mean with SEM).

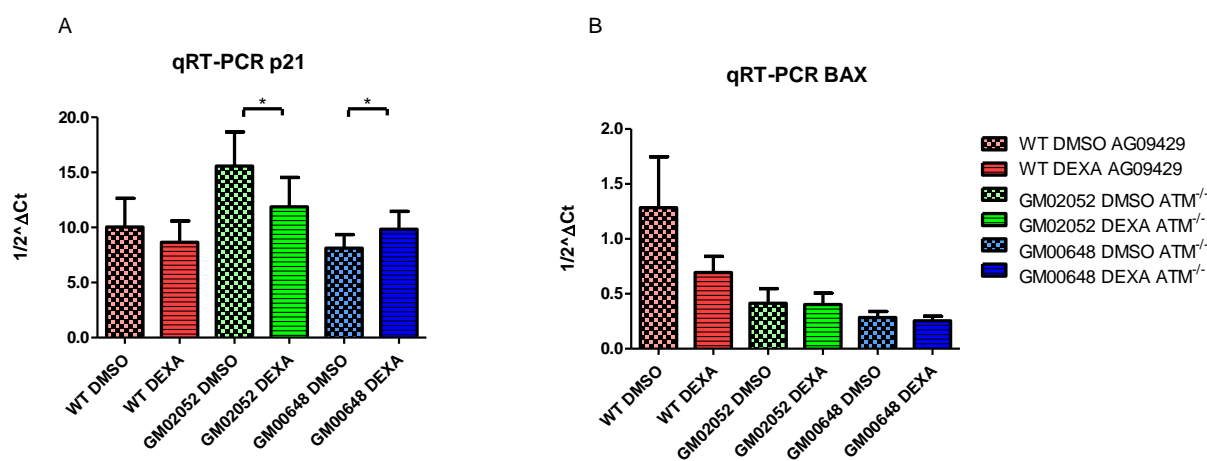


Fig51. Quantificazione dell'espressione del gene A) *p21* e B) *BAX* in linee cellulari AT GM02052, GM00648 e nel WT, stimolate con Dexa o con il rispettivo controllo DMSO (*Wilcoxon test, $p < 0.05$, Graphs Mean with SEM).

L'espressione del gene *cdc42*, anch'esso legato a pathway dell'apoptosi e del differenziamento, non mostra alterazioni significative dell'espressione in funzione di Dexamethasone (Figura 50B). Le analisi di qRT-PCR del gene *p21*, mostrano invece come Dexamethasone ne riduca l'espressione nella linea GM02052 e l'aumentano nella linea GM00648 (Figura 51A). Nessuna variazione apprezzabile in funzione di Dexamethasone è invece presente per quanto riguarda l'espressione del gene *BAX* (Figura 51B). Essendo numerosi i target genici, sotto il controllo trascrizionale della lamina A/C, che sono coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare si è deciso di studiare l'eventuale modulazione di Dexamethasone su tale aspetto.

3.6.5 Effetto del Dexamethasone sul ciclo cellulare dei fibroblasti AT.

Il ciclo cellulare è stato indagato tramite saggi WB su estratti proteici totali analizzando le cicline E ed B1, che rispettivamente presentano il loro picco nella fase G1-S, e nella fase M. Entrambe queste fasi del ciclo cellulare presentano un checkpoint mediato da ATM.

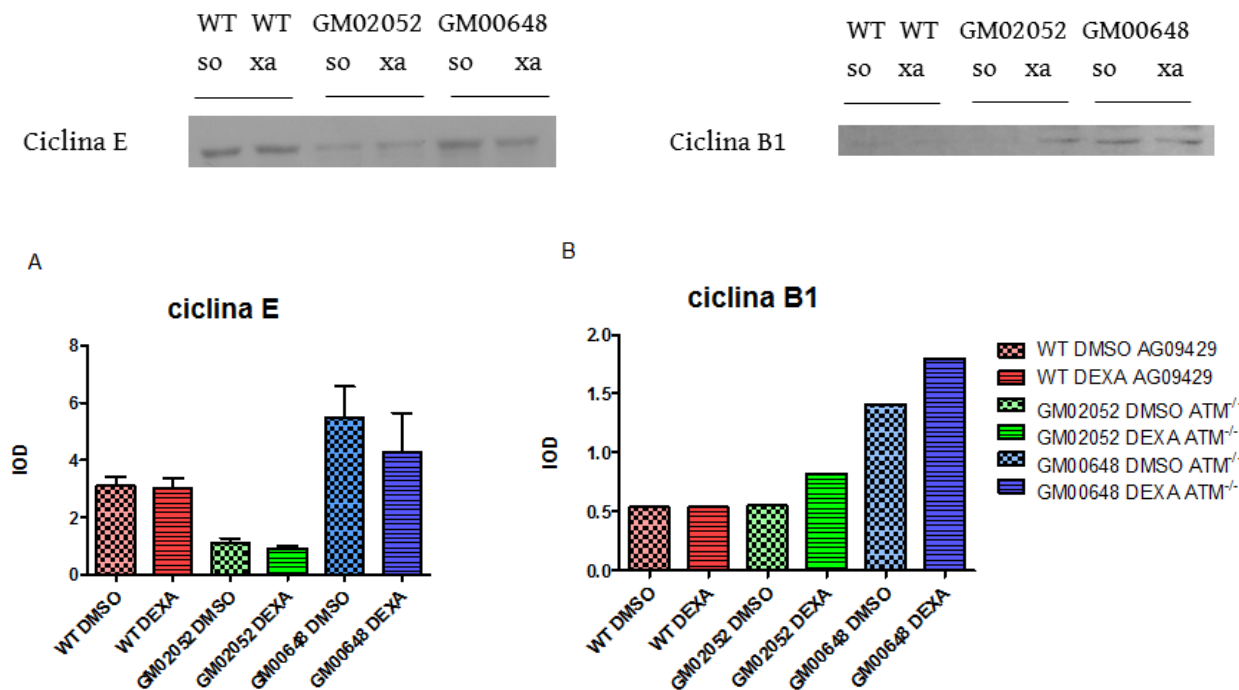


Fig52. Quantificazione del contenuto di A) ciclina E e di B) ciclina B1 in estratti proteici totali di linee di fibroblasti AT GM02052, GM00648 e nel WT, stimulate con Dexamethasone o con il controllo DMSO

Il contenuto della ciclina E diminuisce nella linea GM00648 con Dexamethasone mentre nessuna variazione apprezzabile è presente nel WT e nella linea GM02052 (Figura 52A). La ciclina B1, che lega CDK1 in fase M, sembra aumentare nelle sole cellule AT stimulate con Dexamethasone (Figura 52B). Anche la proteina FOXM1 è coinvolta nella progressione in fase M, tramite attivazione mediata da fosforilazione. Tale proteina è inoltre uno dei target a valle di AKT. La stimolazione con Dexamethasone provoca una riduzione di pFOXM1 nella linea GM00648 e nel WT, mentre la linea GM02052 segue un andamento opposto (Figura 53).

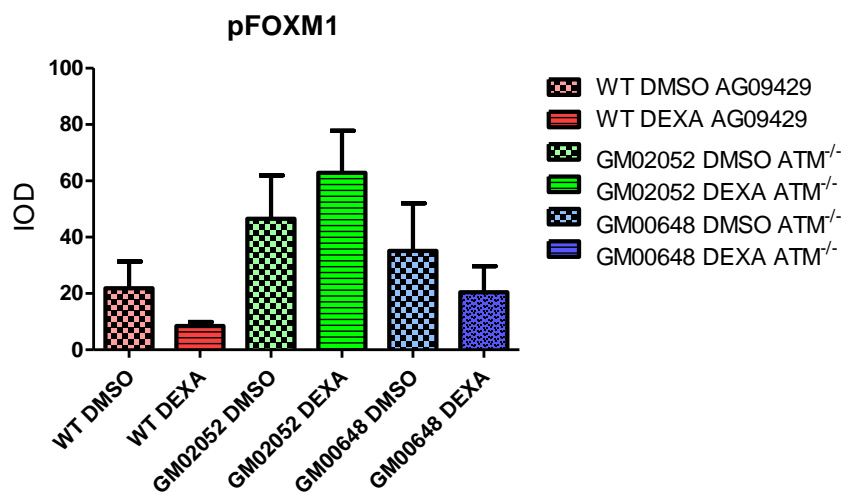
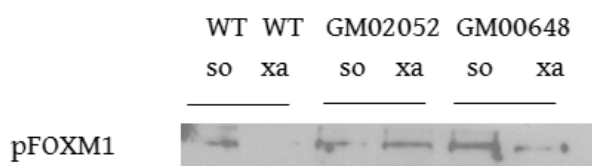


Fig53.Quantificazione in saggi WB della proteina pFOXM1 in linee AT GM02052,GM00648 e WT, stimolati con Dexa o con il rispettivo controllo DMSO.

3.6.6 Ruolo della lamina A/C nell'organizzazione cromatinica.

Poiché dalle precedenti qRT-PCR di potenziali target genici controllati dalla lamina A/C non sono emersi risultati coerenti, si è deciso di indagare il recente ruolo epigenetico di quest'ultima. In primo luogo si è provveduto a realizzare un'analisi di CHIP per valutare l'eventuale variazione in funzione di Dexa, del contenuto di DNA immunoprecipitato utilizzando l'anticorpo anti lamina A/C, nella linea WT e nella linea mutata GM00648. I risultati ottenuti dalla CHIP mostrano come il Dexa aumenti ($p < 0.05$) il contenuto di DNA immunoprecipitato con lamina A/C nella linea GM00648 (Figura 54).

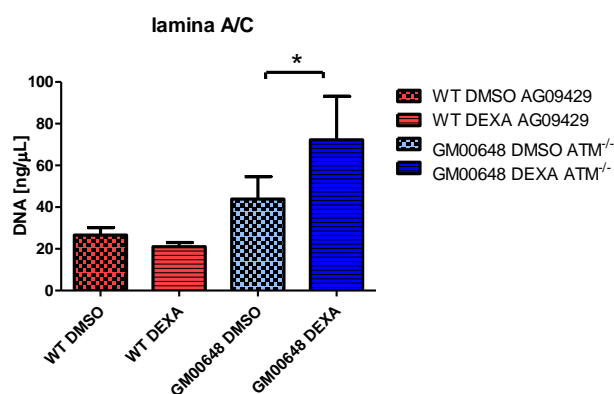


Fig54. CHIP Valutazione del contenuto di DNA immunoprecipitato con anticorpo anti lamina A/C, in seguito a trattamento con Dexa o con il controllo DMSO, nella linea GM00648 e nel WT (*Wilcoxon test, $p < 0.05$; Graphs Mean with SEM).

Si è quindi proceduto alla realizzazione dell'analisi di sequenziamento tramite tecnologia NGS. Essendo di fronte ad un accumulo diffuso di lamina A/C e non propriamente ad un fattore di trascrizione, gli algoritmi utilizzati per individuare le zone di interazione del genoma, sono stati opportunamente adattati a questo scopo. Per ricavare le regioni genomiche emergenti rispetto al background si sono utilizzati i campioni DMSO come rispettivi controlli dei campioni Dexa. La successiva analisi di broad peak calling o arricchimenti di sequenze (MACS2 broad peak call) ha evidenziato 185 peak calls nel campione WT e 3160 peak calls nel campione GM00648 (Figura 55).

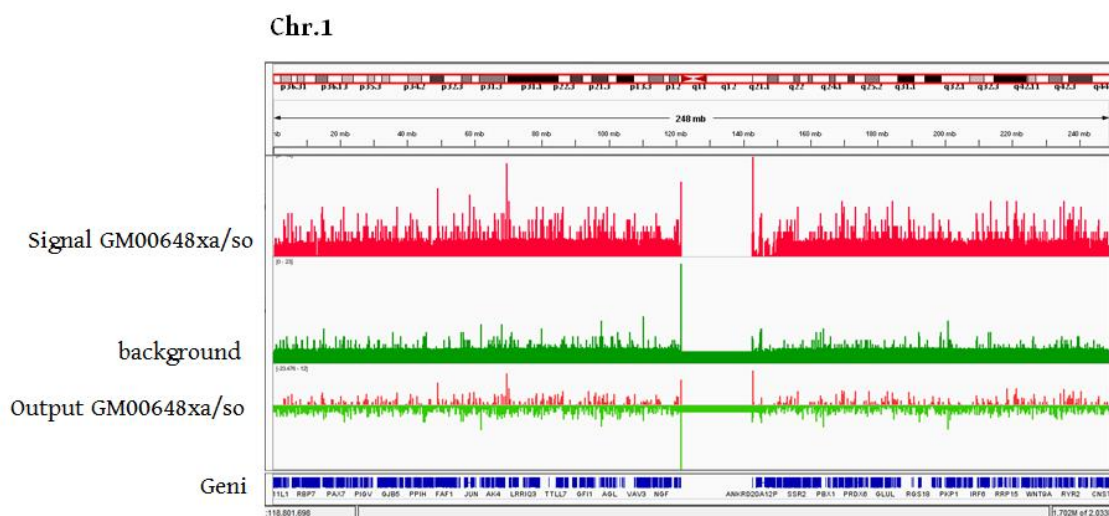


Fig55. Visualizzazione del browser IGV relativa all'analisi di broad peak calling del campione GM00648 xa/so, sul cromosoma 1.

Le sequenze di DNA arricchite nella ChIP-seq del campione AT GM00648 sono distribuite in modo piuttosto uniforme sui vari cromosomi (Figura 56A), mentre le sequenze ChIP-seq del campione WT sono maggiormente presenti sui cromosomi 2, 4, 10, 16, e 21 mentre nessun arricchimento di tali sequenze interessa i cromosomi 13 e 15 (Figura 56 B). Inoltre le sequenze arricchite nella ChIP del campione WT sono legate per il 77% a regioni intergeniche, per il 17.3% a introni e solo per lo 0.08% a esoni codificanti (Figura 57A). Mentre le regioni genomiche arricchite nella ChIP del campione AT GM00648 sono composte per il 51.6% da regioni intergeniche, 42% da introni e dall' 1.1% da esoni codificanti (Figura 57B).

A

Chromosomal Distribution of ChIP Regions

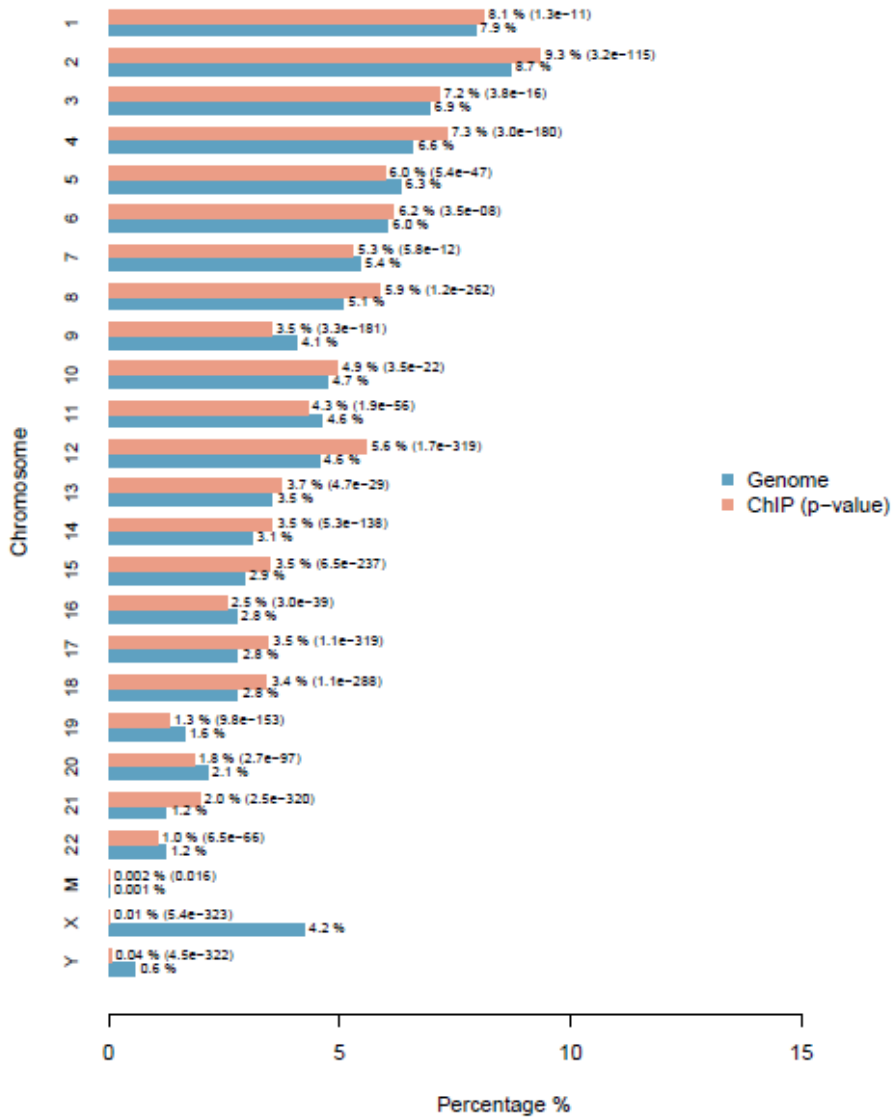


Fig56. A) Distribuzione delle sequenze ottenute dalle procedure di ChIP ottenute con anticorpo anti lamina A/C e arricchite nella stimolazione con Dexa rispetto al DMSO della linea AT GM00648 .

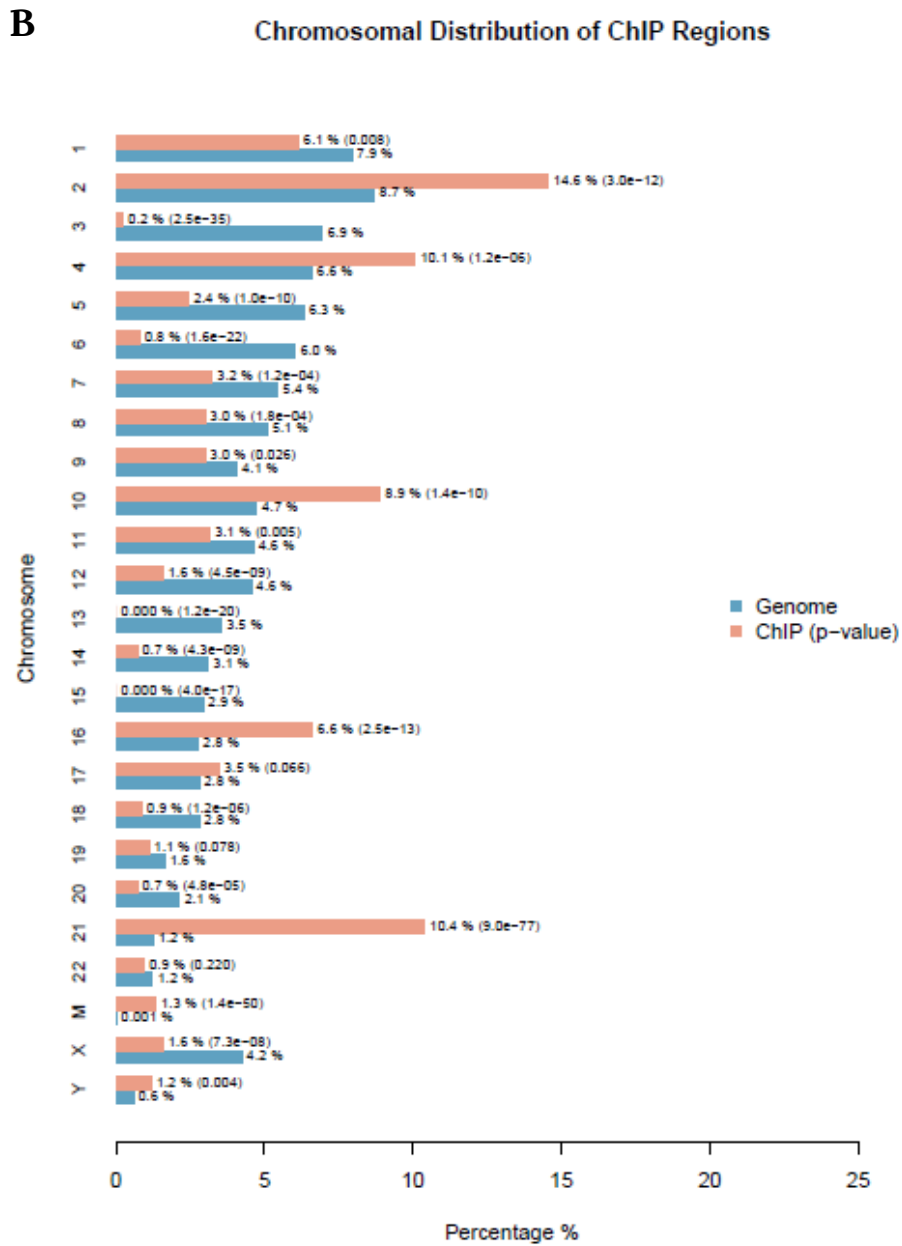


Fig56. B) Distribuzione delle sequenze ottenute dalle procedure di ChIP con l'anticorpo anti lamina A/C e arricchite nella stimolazione con Dexa rispetto al DMSO della linea WT.

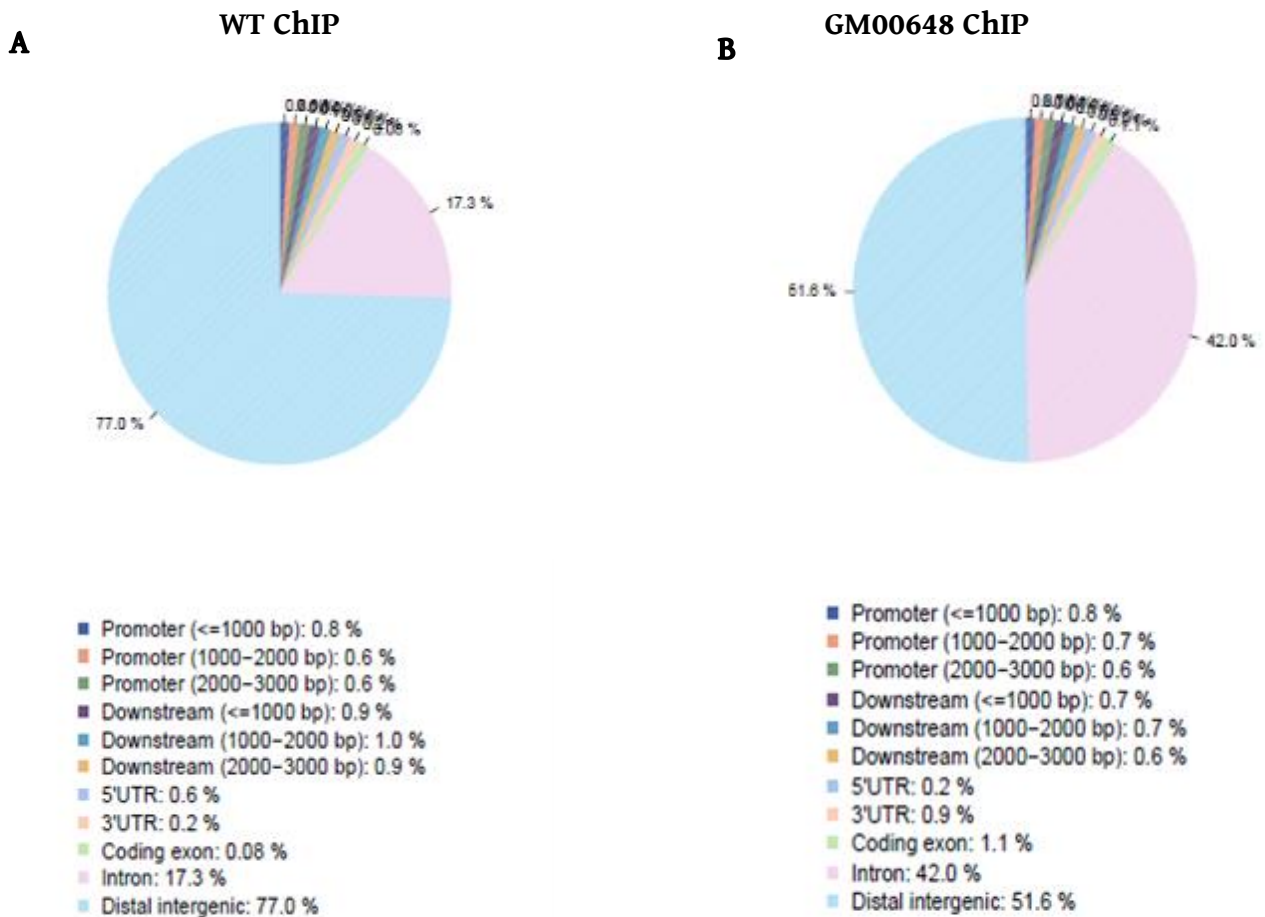


Fig57. A) Rappresentazione della composizione delle regioni ottenute dalla ChIP con anticorpo anti lamina A/C nel WT e B) nel campione GM00648 in funzione di Dexa.

Le regioni genomiche individuate sono state utilizzate per individuare tramite MEME-Suite, i potenziali siti di legame a fattori di trascrizione (TF) noti, presenti in un intorno di 1000 bp dal centro della distribuzione di ogni regione selezionata. E' stato così possibile, individuare 457 siti di binding per fattori di trascrizione nel campione GM00648 (Tabella 1), mentre sono 12 le sequenze di binding per TF estrapolate dalle sequenze ottenute dal campione WT (Tabella 2). Le sequenze di binding di TF noti presenti sia nel campione WT che nel campione mutato GM00648 sono invece 16 (Tabella 2). Nel campione AT GM00648 sono presenti, tra gli altri i fattori di trascrizione, HIF-1 α , ARNT e E47 (TCF3)(evidenziati in tabella 1), precedentemente individuati anche negli array Panomics della medesima linea cellulare. Oltre ai siti di binding per fattori di trascrizione noti, dalle analisi ChIP-seq sono state individuate 24 sequenze geniche, alcune costituite da ripetizioni nucleotidiche, potenzialmente capaci di legare direttamente o indirettamente la lamina A/C. Successive analisi di qRT-PCR verranno realizzate per verificare la modulazione dell'espressione di geni da parte dei fattori di trascrizione individuati e d'interesse.

Tabella 1

GM00648 TF id (457)			
ARNTL_DBD	HOXC11_full_2	MA0599.1	UP00015_1
ARX_DBD	HOXC12_DBD_1	MA0600.1	UP00016_1
Alx4_DBD	HOXD11_DBD_2	MAX_DBD_1	UP00021_1
Ascl2_DBD	HOXD12_DBD_1	MAX_DBD_2	UP00022_1
Atoh1_DBD	HOXD12_DBD_4	MEF2A_DBD	UP00023_2
BARHL2_DBD_3	HOXD8_DBD	MEF2B_full	UP00024_2
BARX1_DBD_1	Hic1_DBD_1	MEF2D_DBD	UP00025_1
BHLHB2_DBD	Hlf_DBD	MEIS3_DBD_2	UP00025_2
BHLHB3_full	Hoxc10_DBD_1	MESP1_DBD	UP00026_1
BHLHE41_full	Hoxc10_DBD_2	MGA_DBD_1	UP00026_2
Bhlhb2_DBD_1	Hoxd13_DBD_1	MGA_DBD_3	UP00028_2
Bhlhb2_DBD_2	Hoxd9_DBD_2	MLXIPL_full	UP00029_1
CDX1_DBD	ID4_DBD	MLX_full	UP00030_1
CDX2_DBD	IRF3_full	MNT_DBD	UP00031_1
CLOCK_DBD	IRF7_DBD_1	MTF1_DBD	UP00032_1
CPEB1_full	IRF7_DBD_2	Meis2_DBD_2	UP00033_2
CREB3L1_DBD_1	IRF8_DBD	Meis3_DBD_2	UP00034_1
CREB3L1_DBD_2	IRF9_full	Mlx_DBD	UP00036_2
CREB3L1_DBD_3	IRX5_DBD	NEUROD2_full	UP00037_1
CREB3L1_DBD_4	Irx3_DBD	NEUROG2_DBD	UP00039_1
CREB3L1_full_1	Jdp2_DBD_2	NFKB1_DBD	UP00039_2
CREB3L1_full_2	KLF14_DBD	NHLH1_DBD	UP00041_1
Creb3l2_DBD_2	KLF16_DBD	NHLH1_full	UP00042_1
DLX1_DBD	Klf12_DBD	NR2F1_DBD_2	UP00042_2
EGR1_DBD	MA0002.2	NR2F1_DBD_3	UP00043_2
EGR1_full	MA0004.1	NR2F6_DBD_1	UP00046_1
EGR2_DBD	MA0006.1	NRF1_full	UP00046_2
EGR2_full	MA0014.2	Nr2f6_DBD_1	UP00050_1
EGR3_DBD	MA0018.2	OLIG2_DBD	UP00050_2
EGR4_DBD_1	MA0019.1	OLIG2_full	UP00051_1
EGR4_DBD_2	MA0024.2	OLIG3_DBD	UP00053_1
EHF_full	MA0025.1	ONECUT3_DBD	UP00054_2
ELF1_DBD	MA0030.1	PKNOX1_DBD	UP00057_1
ELF1_full	MA0032.1	PKNOX2_DBD	UP00058_2
ELF3_DBD	MA0039.2	POU1F1_DBD_1	UP00059_1
ELF3_full	MA0040.1	POU1F1_DBD_2	UP00059_2
ELF4_full	MA0041.1	POU2F1_DBD_1	UP00060_1
ELF5_DBD	MA0042.1	POU2F1_DBD_2	UP00060_2
ELF5_full	MA0043.1	POU2F2_DBD_1	UP00061_1
EMX1_DBD_2	MA0046.1	POU2F2_DBD_2	UP00061_2
EMX2_DBD_2	MA0047.2	POU2F3_DBD_1	UP00062_1
ERG_DBD_1	MA0048.1	POU2F3_DBD_2	UP00064_1
ERG_full_1	MA0050.2	POU3F1_DBD_1	UP00065_1

ESR1_DBD	MA0051.1	POU3F1_DBD_2	UP00065_2
ETS1_DBD_1	MA0052.2	POU3F2_DBD_1	UP00071_1
ETS1_full_1	MA0058.2	POU3F2_DBD_2	UP00072_1
ETV6_full_1	MA0059.1	POU3F3_DBD_1	UP00073_1
ETV6_full_2	MA0062.2	POU3F3_DBD_2	UP00073_2
Egr1_mouse_DBD	MA0068.1	POU3F3_DBD_3	UP00074_1
Egr3_DBD	MA0073.1	POU3F4_DBD_1	UP00074_2
Elf5_DBD	MA0076.2	POU3F4_DBD_2	UP00076_2
FIGLA_DBD	MA0079.3	POU4F1_DBD	UP00077_2
FLI1_full_1	MA0080.3	POU4F2_DBD	UP00078_1
FOXB1_DBD_1	MA0081.1	POU4F2_full	UP00080_2
FOXB1_DBD_2	MA0088.1	POU4F3_DBD	UP00082_1
FOXB1_full	MA0090.1	POU5F1P1_DBD_1	UP00084_2
FOXC1_DBD_1	MA0093.2	POU5F1P1_DBD_2	UP00086_1
FOXC1_DBD_2	MA0095.2	PRDM1_full	UP00090_1
FOXC1_DBD_3	MA0098.2	PROP1_DBD	UP00090_2
FOXC2_DBD_1	MA0103.2	Pou2f2_DBD_1	UP00093_1
FOXC2_DBD_2	MA0104.3	Pou2f2_DBD_2	UP00094_2
FOXC2_DBD_3	MA0108.2	RARA_DBD_2	UP00096_1
FOXD2_DBD_1	MA0111.1	RARA_full_2	UP00097_2
FOXD2_DBD_2	MA0112.2	RARG_DBD_1	UP00099_1
FOXD3_DBD_1	MA0124.1	RFX4_DBD_1	UP00099_2
FOXD3_DBD_2	MA0135.1	RUNX2_DBD_2	UP00100_2
FOXG1_DBD_1	MA0138.2	RUNX3_DBD_3	UP00101_1
FOXI1_full_1	MA0139.1	Rara_DBD_3	UP00101_2
FOXI1_full_2	MA0142.1	Rarb_DBD_1	UP00102_1
FOXJ2_DBD_1	MA0147.2	Rarg_DBD_1	UP00105_1
FOXJ2_DBD_2	MA0148.3	SNAI2_DBD	UP00114_1
FOXJ2_DBD_3	MA0149.1	SP1_DBD	UP00121_1
FOXJ3_DBD_1	MA0152.1	SP3_DBD	UP00129_1
FOXJ3_DBD_2	MA0156.1	SP4_full	UP00133_1
FOXJ3_DBD_3	MA0157.1	SP8_DBD	UP00134_1
FOXL1_full_1	MA0162.2	SPDEF_DBD_3	UP00150_1
FOXL1_full_2	MA0163.1	SPDEF_full_3	UP00158_1
FOXO1_DBD_1	MA0259.1	SPI1_full	UP00168_1
FOXO1_DBD_2	MA0442.1	SPIB_DBD	UP00169_1
FOXO1_DBD_3	MA0464.1	SPIC_full	UP00179_1
FOXO3_full_1	MA0465.1	SREBF2_DBD	UP00188_1
FOXO3_full_3	MA0466.1	Sox3_DBD_1	UP00191_1
FOXO4_DBD_1	MA0469.1	Spic_DBD	UP00194_1
FOXO4_DBD_2	MA0470.1	Srebf1_DBD	UP00207_1
FOXO6_DBD_1	MA0471.1	TBX15_DBD_2	UP00211_1
FOXO6_DBD_2	MA0472.1	TBX1_DBD_1	UP00213_1
FOXP3_DBD	MA0473.1	TBX1_DBD_3	UP00217_1
Foxc1_DBD_1	MA0474.1	TBX20_DBD_1	UP00218_1
Foxc1_DBD_2	MA0475.1	TBX20_full_2	UP00223_1
Foxg1_DBD_1	MA0478.1	TBX2_full_1	UP00223_2

Foxg1_DBD_3	MA0480.1	TBX4_DBD_1	UP00225_1
Foxj3_DBD_2	MA0481.1	TBX4_DBD_2	UP00236_1
Foxj3_DBD_3	MA0483.1	TBX5_DBD_1	UP00240_1
Foxj3_DBD_4	MA0493.1	TBX5_DBD_2	UP00242_1
Foxk1_DBD_2	MA0497.1	TCF3_DBD	UP00244_1
GCM1_full_1	MA0499.1	TCF4_DBD	UP00250_1
GLI2_DBD_1	MA0500.1	TCF4_full	UP00254_1
GLI2_DBD_2	MA0506.1	TEF_DBD	UP00255_1
HES5_DBD_1	MA0507.1	TFAP2A_DBD_2	UP00260_1
HES5_DBD_2	MA0508.1	TFAP2A_DBD_4	USF1_DBD
HES7_DBD	MA0511.1	TFAP2B_DBD_2	XBP1_DBD_1
HEY1_DBD	MA0513.1	TFAP2C_DBD_2	YY2_full_1
HEY2_DBD	MA0514.1	TFAP2C_full_3	YY2_full_2
HEY2_full	MA0516.1	TFE3_DBD	ZBTB7A_DBD
Hif1-α_full	MA0517.1	TFEB_full	ZBTB7C_full
HINFP1_full_1	MA0521.1	TFEC_DBD	ZIC3_full
HINFP1_full_2	MA0522.1	Tcfap2a_DBD_2	ZNF238_DBD
HINFP1_full_3	MA0526.1	UP00000_2	ZNF238_full
HNF1A_full	MA0527.1	UP00002_1	ZNF524_full_1
HOMEZ_DBD	MA0528.1	UP00004_1	ZNF524_full_2
HOXA10_DBD_2	MA0591.1	UP00005_2	ZNF713_full
HOXA13_full_1	MA0593.1	UP00006_1	ZSCAN4_full
HOXA13_full_2	MA0595.1	UP00007_1	
HOXC10_DBD_2	MA0596.1	UP00011_2	
HOXC11_DBD_2	MA0598.1	UP00013_2	

Tabella 2

WT TF id (12)	GM00648 and WT TF id (16)
CENPB_full	ETV2_DBD
E2F4_DBD_1	FOXB1_DBD_3
MA0027.1	HOXA13_DBD_1
MA0122.1	HOXB13_DBD_1
MA0137.3	HOXC10_DBD_1
MA0479.1	HOXC13_DBD_1
NFATC1_full_3	HOXD13_DBD_1
NKX2-8_full	Hoxd9_DBD_1
TEAD1_full_1	MA0033.1
TEAD3_DBD_2	MA0130.1
TEAD4_DBD	MA0136.1
UP00086_2	MA0146.2
	UP00008_2
	UP00027_1
	UP00052_1
	UP00180_1

Capitolo IV.

Discussione

4.1 Il Dexamethasone modula HDAC4 nelle cellule di fibroblasti AT

L'accumulo nucleare dell'istone deacetilasi 4 (HDAC4) svolge un ruolo peculiare nella neurodegenerazione dei pazienti AT [117]. Nelle cellule neuronali, HDAC4 è principalmente localizzata a citoplasma, grazie alla fosforilazione in Ser632 che ne permette il legame alla proteina 14-3-3. In assenza di ATM, la fosfatasi PP2A risulta attivata e capace di defosforilare HDAC4, provocandone l'accumulo a nucleo. I risultati finora ottenuti indicano un ruolo del Dexa nel modulare HDAC4. Un aumento di HDAC4 nucleare è stato evidenziato nella linea cellulare AT GM00648 ed un andamento simile sembra interessare anche la linea AT GM02052. Inoltre anche l'aumento dei livelli di espressione sia proteica che genica è stata riscontrata principalmente nella linea cellulare AT GM00648. E' interessante notare che la quantità basale di HDAC4 totale e nucleare è maggiore nelle linee AT rispetto al corrispettivo WT, così come descritto in letteratura su cellule neuronali umane ATM^{-/-} [117,118].

La forma fosforilata in Ser632 di HDAC4 (pHDAC4/HDAC4), coinvolta nello shuttle a citosol, aumenta in maniera non statisticamente significativa nelle linee cellulari mutate GM00648 e GM02052 in seguito a trattamento, mentre da analisi di IF il Dexa sembra favorire una riduzione di pHDAC4 nucleare nelle linee AT GM00648 e GM03395. Un andamento opposto è stato riscontrato nella linea cellulare AT GM02052. Tali andamenti, suggeriscono che il Dexa possa favorire un incremento del contenuto citosolico di pHDAC4 nella linea cellulare GM00648. I risultati descritti non concordano con l'accumulo nucleare che è stato verificato nelle analisi riportate in precedenza.

La localizzazione cellulare di HDAC4 è mediata anche dall'azione della fosfatasi PP2A il cui contenuto però non presenta variazioni in funzione di Dexa.

4.2 Ruolo delle modificazioni post traduzionali di HDAC4

La localizzazione subcellulare e le interazioni con proteine partner di HDAC4, sono influenzate da modificazioni post-traduzionali. Recenti evidenze [123] indicano che HDAC4 oltre ad essere fosforilata può essere ossidata, sumosilata, carbonilata, ubiquitinata e soggetta a degradazione proteolitica. La fosforilazione di HDAC4 da parte della calcio calmodulina chinasi (CaMKII) aumenta l'export nucleare e previene l'import nucleare di HDAC4. Anche l'attivazione della chinasi ERK1/2 è coinvolta nell'accumulo nucleare di HDAC4 in cellule di mioblasti C2C12 [132]. E' interessante notare come similmente nella linea AT GM00648 stimolata con Dexa, è presente un aumento della fosforilazione di ERK1/2. La fosforilazione di HDAC4 in posizione 298 e 302 è invece mediata dalla glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK3 α/β), che ne determina la degradazione tramite proteosoma. Nel modello AT indagato la GSK3 α/β è attiva nonostante la concomitante attivazione di AKT. Anche questa evidenza è in disaccordo con eventuale degradazione di HDAC4 mediata da proteosoma.

Da evidenze riportate in letteratura a livello nucleare può essere presente un frammento N-terminale di circa 30KDa di HDAC4, ottenuto dal taglio in Ser289 ad opera delle caspasi 2 e 3. Questo frammento caspasi dipendente di HDAC4 si accumula a livello nucleare irreversibilmente poiché privo del segnale di export nucleare (NES) che si trova al C-terminale della proteina. A nucleo tale frammento è in grado di indurre efficacemente la morte cellulare, sequestrando tramite la sua porzione N-terminale i fattori RUNX2 e SRF, coinvolti nella sopravvivenza cellulare. Dalle analisi di WB condotte sugli estratti proteici totali e nucleari, con anticorpi in grado di riconoscere l'N-terminale di HDAC4, non è mai stato individuato alcun frammento di dimensioni riconducibili al taglio caspasi dipendente di HDAC4. Quest'evidenza suggerisce come l'accumulo nucleare di HDAC4 osservato della linea cellulare GM00648 possa non essere coinvolto nell'induzione dell'apoptosi, ma bensì in altri pathways cellulari.

Ulteriori forme di HDAC4 risultano da prove di WB sugli estratti proteici nucleari. In particolare il segnale immunoreattivo presente all'altezza di circa 280 KDa può essere riconducibile al dimero di HDAC4, che può formarsi tramite un ponte disolfuro intermolecolare tra la Cys669 e la Cys700 [133]. Un'altra modifica post traduzionale a cui è sottoposta HDAC4 è la sumosilazione, che vede coinvolto il riconoscimento della lisina 559 di HDAC4 da parte di SUMO-1. Tale modifica tuttavia sembra non interferire con la distribuzione subcellulare di HDAC4. Altre bande immunoreattive ad altro peso molecolare osservate verranno indagate in ulteriori indagini.

4.3 Aumento di HDAC4 ridotto e possibile ruolo nello spostamento dell'equilibrio red-ox da parte di Dexamethasone

Lo shuttle nucleocitoplasmatico di HDAC4 può essere regolato anche dal proprio stato di ossidazione. In risposta a stress ossidativo le Cys667/Cys669 di HDAC4 vengono ossidate e formano un ponte disolfuro intramolecolare, che determina l'esposizione di NES (Nuclear Export Signal) a CRM1 (exportina1), provocando l'export a citosol. La riduzione di tale legame inibisce la fuoriuscita di HDAC4 dal nucleo, indipendentemente dal suo stato di fosforilazione [124]. Il Dexamethasone sembra favorire un incremento della proteina HDAC4 in forma ridotta, determinandone così un accumulo nucleare. Un ruolo peculiare nella riduzione di HDAC4 è svolto dalla tioredossina tramite un meccanismo NRF2 dipendente. La localizzazione a nucleo di NRF2 sembra aumentare con Dexa nella linea AT GM00648. L'espressione genica della tioredossina (TXN) presenta a 24h di stimolazione con Dexa un aumento nella linea GM00648, che si mantiene tale anche dopo 48h. E' da notare tuttavia che l'aumento dell'espressione genica della TXN è moderato rispetto alla quantità di HDAC4 in forma ridotta evidenziata. La stimolazione con Dexamethasone potrebbe quindi indurre uno spostamento dell'equilibrio red-ox cellulare verso un ambiente più ridotto, in accordo con quanto visto dal nostro gruppo di ricerca in linee LCLs di pazienti AT [42]. Tuttavia l'analisi di altri geni sotto il controllo di NRF2 quali HMOX1 e G6PD non hanno mostrato alcuna variazione apprezzabile in disaccordo con quanto osservato nelle linee LCLs AT. Infatti in tali linee è stato verificato come il Dexamethasone, attraverso NRF2, medi un aumento dell'espressione di G6PD favorendo l'incremento di NADPH, importante cofattore riducente. Inoltre il moderato incremento di TXN rispetto l'entità di riduzione di HDAC4 può far supporre che altri meccanismi molecolari possano essere coinvolti in questo pathway.

4.4 Effetto del Dexamethasone sull'attività trascrizionale mediata da HDAC4

La localizzazione nucleare di HDAC4 in cellule neuronali AT, provoca l'inattivazione, tramite legame alla regione N-terminale di HDAC4, dei fattori di trascrizione MEF2A e CREB. L'analisi di qRT-PCR di alcuni target genici sotto il controllo di questi fattori non ha però evidenziato la presenza preponderante di questo effetto inibitorio. Infatti nessuna variazione dell'espressione genica in funzione di Dexa interessa il gene UbC, mentre un andamento discordante dell'espressione del gene PRRX1 riguarda le due linee mutate, stimulate con il farmaco. Un incremento dell'espressione genica di tutte le linee stimulate da Dexa interessa invece il gene DUSP1, notoriamente indotto da Dexa. Tale gene è coinvolto nell'inibizione tramite defosforilazione dell'attività di p38. Analisi preliminari in WB indicano come la fosforilazione in Thr180/Tyr182 di p38 risulti non rilevabile nei limiti di sensibilità del saggio, nelle linee AT GM02052 e GM00648, mentre un aumento della fosforilazione a seguito di stimolazione con Dexa interessa la linea cellulare WT. Infine un up regolazione dell'espressione genica del recettore per i cannabinoidi CNR1, è stata rilevata in maniera superiore nelle linee mutate GM02052 e GM00648, sia primarie che hTERT, ed in misura notevolmente inferiore nelle linee WT nonostante tale farmaco risulti da letteratura indiscriminatamente coinvolto nell'aumento dell'espressione di tale gene [134]. I recettori CNR1 si trovano in diversi organi, ma sono principalmente presenti nell'encefalo e in misura minore nel cervelletto e nell'ipotalamo, dove svolgono la loro azione antiemetica, antiossidante, ipotensiva, immunosoppressiva, antinfiammatoria, analgesica e antispastica.

Per ottenere chiarezza in merito ai risultati contrastanti sull'azione inibitoria di HDAC4 nei confronti dei fattori MEF2A e CREB, si è deciso di studiare l'attivazione di tali fattori di trascrizione tramite saggi TF array. I pannelli di fattori di trascrizione analizzati, hanno permesso di verificare che CREB e MEF2A sono inattivi nel limite di sensibilità di tale saggio, sia nelle cellule WT che nella linea AT GM00648, indipendentemente dal trattamento con Dexa. Quindi la loro inattivazione trascrizionale da parte di HDAC4 nucleare può considerarsi incoerente con il nostro modello cellulare. Altri fattori di trascrizione, tra cui HIF-1 α , AHR/ARNT, c-REL, CEF2, E47, PARP sono invece attivi sotto l'effetto di Dexa nelle sola linea cellulare GM00648. Tra questi HIF-1 α è stato inizialmente preso in considerazione poiché presente anche tra le sequenze di binding di fattori di trascrizione, ottenute tramite analisi ChIP-seq. Inoltre in letteratura è descritta la formazione di un complesso HDAC4- HIF-1 α e 14-3-3 ζ che favorisce la stabilità di HIF-1 α . Tramite saggi d'immunoprecipitazione è stato possibile verificare la presenza del complesso HDAC4- HIF-1 α in tutte le linee analizzate. Inoltre un aumento di HIF-1 α è stato riscontrato in entrambe le linee cellulari WT e GM00648 in funzione di Dexa, così come un aumento, ancor più eclatante, della forma non processata di HIF-1 α . Inoltre è stato riscontrato anche un incremento di HIF-1 α nucleare nella linea cellulare AT testata. Tuttavia verificando l'espressione di alcuni geni target modulati da HIF-1 α , si è potuto constatare solo un incremento dell'espressione genica di p21 nelle linee cellulari GM00648 primaria ed hTERT stimulate da Dexa. Probabilmente l'attività trascrizionale di HIF-1 α interessa porzioni genomiche non ancora valutate da PCR quantitativa.

Come precedentemente descritto nell'introduzione, HIF-1 α può essere target di ATM, ed è possibile quindi speculare che in linee AT il Dexa possa in qualche modo agire su HIF-1 α indipendentemente da ATM. In linee cellulari WT l'azione descritta potrebbe essere ininfluenza mentre in linee mutate potrebbe rappresentare una potenziale via di attivazione ATM indipendente.

4.5 Dexamethasone incrementa il contenuto nucleare di lamina A/C

Inizialmente la quantificazione della lamina A/C è stata utilizzata come normalizzatore per le proteine nucleari indagate tramite Western Blotting. Il Dexamethasone si è tuttavia dimostrato capace di incrementare il contenuto proteico nucleare della lamina A nelle sole linee cellulari mutate GM02052 e GM00648. Il Dexamethasone inoltre non sembra incrementare l'espressione genica della lamina A/C nelle linee cellulari mutate.

La presenza di lamina A/C nucleoplasmatica è stata inizialmente investigata in merito al suo coinvolgimento nel disassemblaggio dell'envelope nucleare durante la mitosi. La fosforilazione della lamina A gioca un ruolo fondamentale in questo processo. La defosforilazione della stessa ad opera della fosfatasi 1, alla fine della mitosi, è richiesta invece per la ricomposizione dell'envelope nucleare. Si è quindi deciso di indagare alcune delle principali fosforilazioni che da letteratura [135] risultano essere coinvolte nell'accumulo nucleoplasmatico di lamina A/C, quali la fosforilazione in Ser22 e in Ser404. Nella lamina A/C il sito di fosforilazione in Ser22 e in Ser392 costituiscono i cosiddetti "siti mitotici" poiché la loro fosforilazione da parte di CDK1 porta alla disgregazione della lamina durante la fase M del ciclo cellulare. Entrambi questi siti di fosforilazione sono coinvolti nella polimerizzazione testa-coda dei dimeri di lamina, ma un ruolo maggiore in questo processo è svolto dal sito in Ser22 della lamina A/C. La stimolazione con Dexamethasone sembra poter favorire l'accumulo nucleoplasmatico di lamina A/C nelle linee cellulari mutate tramite due meccanismi distinti. Il primo tramite un incremento della fosforilazione della Ser22 ed il secondo tramite attivazione di AKT, che comporta la fosforilazione della Ser404. In analisi future sarà indagato il possibile ruolo del Dexa nell'attivazione di CDK1 coinvolto nella fosforilazione della Ser22 della lamina A/C.

4.6 Trattamento con Dexamethasone e alterazioni delle caratteristiche biofisiche e meccaniche cellulari

Le lamine giocano un ruolo essenziale nel determinare le proprietà biofisiche e meccaniche del nucleo. Analisi al microscopio a forza atomica hanno permesso di verificare un aumento della rigidità delle linee cellulari WT e GM00648 dopo trattamento con Dexa. Da letteratura [136] è noto che il Dexamethasone è in grado di aumentare la rigidità di linee primarie di cellule trabecolari umani. Alcuni aspetti simili sono stati evidenziati anche su linee LCLs AT (Menotta et al. under review) Si può speculare quindi come l'aumento di rigidità osservato nelle linee analizzate possa risentire in modo preponderante di un uguale meccanismo. Tuttavia altre evidenze riportate in letteratura [137] indicano come in cellule staminali mesenchimali (MSCs) l'aumento della rigidità della matrice cellulare medi attraverso l'azione della miosina-II, una riduzione della defosforilazione del residuo Ser22 della lamina A/C. Il trattamento con Dexamethasone nonostante aumenti la rigidità delle cellule trattate, sembra essere in grado,

contrariamente a quanto riportato in letteratura, di aumentare la fosforilazione di tale residuo della lamina A/C. Le modificazioni della rigidità della matrice cellulare sono coinvolte non solo nelle proprietà di adesione e contrattilità delle cellule ma anche nel differenziamento cellulare [138,139]. Pertanto la relazione tra rigidità della matrice cellulare e fosforilazione di Ser22 della lamina A/C in funzione di Dexa, merita ulteriori approfondimenti. La stiffness osservata potrebbe essere anche correlata alla variazione delle misure nucleari (area) precedentemente descritte.

4.7 Effetto di Dexamethasone sul ciclo cellulare dei fibroblasti AT

Al fine di approfondire l'eventuale effetto del Dexamethasone sul ciclo cellulare in linee cellulari AT, sono stati indagati i livelli di cicline E e B1, che rispettivamente incrementano nella fase G1-S e nella fase M. Il trattamento con il Dexa provoca una riduzione della ciclina E nelle sole linee cellulari mutate GM00648 e GM02052, compatibile con una riduzione di tali cellule nella fase G1-S. Mentre un aumento della ciclina B, il cui aumento si verifica in fase M interessa solo le cellule mutate trattate con Dexa.

La fosforilazione di FOXM1 che incrementa all'inizio della mitosi, vede una riduzione a seguito di trattamento con Dexa nella linea mutata GM00648 e un aumento nella linea cellulare GM02052. Combinando tali evidenze e sapendo che la lamina A si accumula a nucleoplasma dall'inizio della mitosi e fino al completamento di questa, si può speculare che il Dexa possa favorire uno spostamento del ciclo cellulare in fase M. Una certa porzione di lamina A a nucleoplasma è tuttavia osservabile anche alla fine della mitosi e in fase G1 in cellule progenitrici proliferanti (in fibroblasti murini proliferanti). In questa fase la localizzazione della lamina A a nucleoplasma sembra essere dovuta al legame con la proteina di binding alla cromatina LAP2 α (lamin-associated polypeptide 2 alpha) [140-142].

4.8 Possibile modulazione epigenetica di Dexamethasone mediante accumulo nucleare di lamina A/C e HDAC4

Oltre al ruolo nel mantenere la stabilità del nucleo, sta diventando sempre più evidente come la lamina A e le proteine associate dell'envelope nucleare, svolgano un ruolo peculiare nei processi che regolano la sintesi del DNA, la risposta al danno al DNA, l'organizzazione cromatinica, la trascrizione genica [131,143,144]. Recentemente è stato anche descritto un ruolo epigenetico della lamina A/C [145,146]. Dalle analisi di ChIP-seq eseguite è stato possibile dimostrare l'incremento del legame della lamina A/C a regioni genomiche riconosciute da fattori di trascrizione noti. Tra questi sono presenti alcuni dei fattori di trascrizione funzionalmente attivi ottenuti dalle analisi tramite array di TF quali ARNT, HIF-1 α ed E47 (TCF3). Parallelamente il fattore di trascrizione HIF-1 α oltre ad aumentare a livello nucleare, incrementa la sua interazione con HDAC4 nucleare. Un possibile meccanismo d'azione ipotizzato è riportato in figura 58. Il Dexamethasone modulando lo stato redox cellulare (tramite NRF2-TRX1 ma altri fattori potrebbero essere coinvolti) provoca l'accumulo nucleare di HDAC4 in forma ridotta che stabilizza trascrizionalmente HIF-1 α a sua volta modulato dalla lamina A/C. Infine recenti lavori indicano come la lamina A sia in grado di legare anche NRF2

[147]. Tutte le evidenze descritte e quest'ultimo altro aspetto rivelano nuovi e inediti meccanismi molecolari che coinvolgono l'azione del Dexamethasone nelle cellule dei pazienti AT.

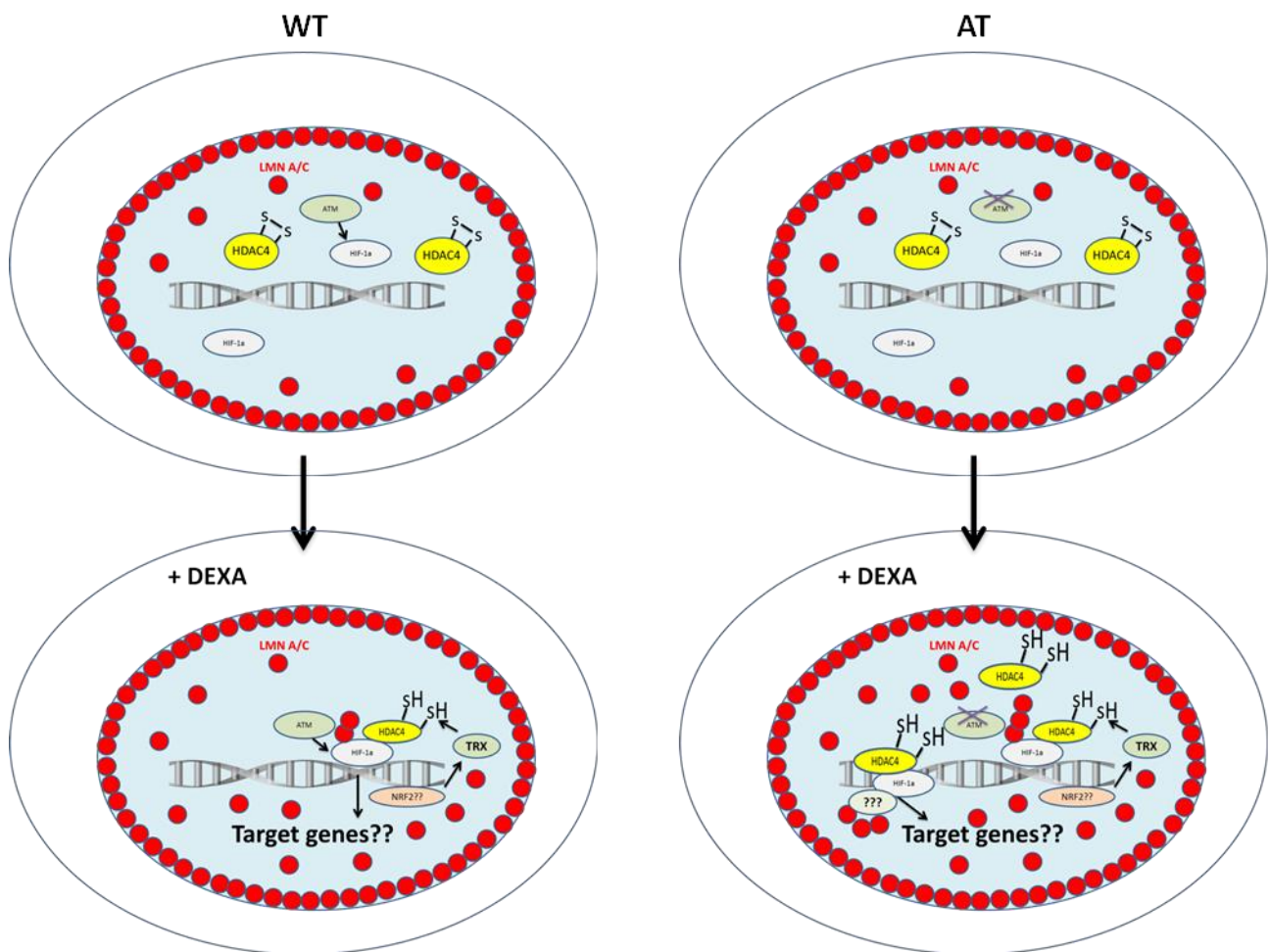


Fig58. Rappresentazione grafica della modulazione di HDAC4 e lamina A/C da parte del Dexamethasone in cellule WT e AT. Nelle linee AT l'incremento dell'espressione genica della tioredossina, induce HDAC4 in forma ridotta e coniugata a HIF-1 α , quest'ultima potenzialmente modulata anche da lamina A/C.

Reference List

- [1] Barone G, Groom A, Reiman A, Srinivasan V, Byrd PJ, Taylor AM 2009 Modeling ATM mutant proteins from missense changes confirms retained kinase activity. *Hum. Mutat.* **30** 1222-30
- [2] Gilad S, Khosravi R, Shkedy D, Uziel T, Ziv Y, Savitsky K et al 1996 Predominance of null mutations in ataxia-telangiectasia. *Hum. Mol. Genet.* **5** 433-9
- [3] Taylor AM, Lam Z, Last JI, Byrd PJ 2015 Ataxia telangiectasia: more variation at clinical and cellular levels. *Clin. Genet.* **87** 199-208
- [4] Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P et al 1988 Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* **336** 577-80
- [5] Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L et al 1995 A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268** 1749-53
- [6] Castellvi-Bel S, Sheikhavandi S, Telatar M, Tai LQ, Hwang M, Wang Z et al 1999 New mutations, polymorphisms, and rare variants in the ATM gene detected by a novel SSCP strategy. *Hum. Mutat.* **14** 156-62
- [7] Gatti RA 1995 Ataxia-telangiectasia. *Dermatol. Clin.* **13** 1-6
- [8] Nissenkorn A and Ben-Zeev B 2015 Ataxia telangiectasia. *Handb. Clin. Neurol.* **132** 199-214
- [9] Chun HH and Gatti RA 2004 Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst)* **3** 1187-96
- [10] Greenberger S, Berkun Y, Ben-Zeev B, Levi YB, Barziliai A, Nissenkorn A 2013 Dermatologic manifestations of ataxia-telangiectasia syndrome. *J. Am. Acad. Dermatol.* **68** 932-6
- [11] Perlman SL, Boder DE, Sedgewick RP, Gatti RA 2012 Ataxia-telangiectasia. *Handb. Clin. Neurol.* **103** 307-32
- [12] Nowak-Wegrzyn A, Crawford TO, Winkelstein JA, Carson KA, Lederman HM 2004 Immunodeficiency and infections in ataxia-telangiectasia. *J. Pediatr.* **144** 505-11
- [13] Loeb DM, Lederman HM, Winkelstein JA 2000 Lymphoid malignancy as a presenting sign of ataxia-telangiectasia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **22** 464-7
- [14] Murphy RC, Berdon WE, Ruzal-Shapiro C, Hall EJ, Kornecki A, Daneman A et al 1999 Malignancies in pediatric patients with ataxia telangiectasia. *Pediatr. Radiol.* **29** 225-30
- [15] Ehlayel M, Soliman A, De S, V 2014 Linear growth and endocrine function in children with ataxia telangiectasia. *Indian J. Endocrinol. Metab* **18** S93-S96

- [16] Pommerening H, van 6DS, Kieslich M, Schubert R, Zielen S, Voss S 2015 Body composition, muscle strength and hormonal status in patients with ataxia telangiectasia: a cohort study. *Orphanet. J. Rare. Dis.* **10** 155
- [17] Voss S, Pietzner J, Hoche F, Taylor AM, Last JI, Schubert R et al 2014 Growth retardation and growth hormone deficiency in patients with Ataxia telangiectasia. *Growth Factors* **32** 123-9
- [18] Yi M, Rosin MP, Anderson CK 1990 Response of fibroblast cultures from ataxia-telangiectasia patients to oxidative stress. *Cancer Lett.* **54** 43-50
- [19] Blevins LS, Jr. and Gebhart SS 1996 Insulin-resistant diabetes mellitus in a black woman with ataxia-telangiectasia. *South. Med. J.* **89** 619-21
- [20] Morrell D, Chase CL, Kupper LL, Swift M 1986 Diabetes mellitus in ataxia-telangiectasia, Fanconi anemia, xeroderma pigmentosum, common variable immune deficiency, and severe combined immune deficiency families. *Diabetes* **35** 143-7
- [21] Nissenkorn A, Levy-Shraga Y, Banet-Levi Y, Lahad A, Sarouk I, Modan-Moses D 2016 Endocrine abnormalities in ataxia telangiectasia: findings from a national cohort. *Pediatr. Res.* **79** 889-94
- [22] Buoni S, Zannolli R, Sorrentino L, Fois A 2006 Betamethasone and improvement of neurological symptoms in ataxia-telangiectasia. *Arch. Neurol.* **63** 1479-82
- [23] Zannolli R, Buoni S, Betti G, Salvucci S, Plebani A, Soresina A et al 2012 A randomized trial of oral betamethasone to reduce ataxia symptoms in ataxia telangiectasia. *Mov Disord.* **27** 1312-6
- [24] Broccoletti T, Del GE, Amorosi S, Russo I, Di BM, Imperati F et al 2008 Steroid-induced improvement of neurological signs in ataxia-telangiectasia patients. *Eur. J. Neurol.* **15** 223-8
- [25] Broccoletti T, Del GE, Cirillo E, Vigliano I, Giardino G, Ginocchio VM et al 2011 Efficacy of very-low-dose betamethasone on neurological symptoms in ataxia-telangiectasia. *Eur. J. Neurol.* **18** 564-70
- [26] Russo I, Cosentino C, Del GE, Broccoletti T, Amorosi S, Cirillo E et al 2009 In ataxia-telangiectasia betamethasone response is inversely correlated to cerebellar atrophy and directly to antioxidative capacity. *Eur. J. Neurol.* **16** 755-9
- [27] Chessa L, Leuzzi V, Plebani A, Soresina A, Micheli R, D'Agnano D et al 2014 Intra-erythrocyte infusion of dexamethasone reduces neurological symptoms in ataxia teleangiectasia patients: results of a phase 2 trial. *Orphanet. J. Rare. Dis.* **9** 5
- [28] Leuzzi V, Micheli R, D'Agnano D, Molinaro A, Venturi T, Plebani A et al 2015 Positive effect of erythrocyte-delivered dexamethasone in ataxia-telangiectasia. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2** e98
- [29] Ferreira JF, Ahmed Mohamed AA, Emery P 2016 Glucocorticoids and Rheumatoid Arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **42** 33-46, vii
- [30] Sales-Campos H, de Souza PR, Basso PJ, Nardini V, Silva A, Banquieri F et al 2016 Amelioration of experimental colitis after short-term therapy with glucocorticoid and its relationship to the induction of different regulatory markers. *Immunology*
- [31] Bodor N and Buchwald P 2006 Corticosteroid design for the treatment of asthma: structural insights and the therapeutic potential of soft corticosteroids. *Curr. Pharm. Des* **12** 3241-60

- [32] Giardino G, Fusco A, Romano R, Gallo V, Maio F, Esposito T et al 2013 Betamethasone therapy in ataxia telangiectasia: unraveling the rationale of this serendipitous observation on the basis of the pathogenesis. *Eur. J. Neurol.* **20** 740-7
- [33] Quarantelli M, Giardino G, Prinster A, Aloj G, Carotenuto B, Cirillo E et al 2013 Steroid treatment in Ataxia-Telangiectasia induces alterations of functional magnetic resonance imaging during prono-supination task. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **17** 135-40
- [34] Harms C, Albrecht K, Harms U, Seidel K, Hauck L, Baldinger T et al 2007 Phosphatidylinositol 3-Akt-kinase-dependent phosphorylation of p21(Waf1/Cip1) as a novel mechanism of neuroprotection by glucocorticoids. *J. Neurosci.* **27** 4562-71
- [35] Hoijman E, Rocha-Viegas L, Kalko SG, Rubinstein N, Morales-Ruiz M, Joffe EB et al 2012 Glucocorticoid alternative effects on proliferating and differentiated mammary epithelium are associated to opposite regulation of cell-cycle inhibitor expression. *J. Cell Physiol* **227** 1721-30
- [36] Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW, Buttgereit F 2007 Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol. Cell Endocrinol.* **275** 71-8
- [37] Magnani M, Rossi L, D'ascenzo M, Panzani I, Bigi L, Zanella A 1998 Erythrocyte engineering for drug delivery and targeting. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28 (Pt 1)** 1-6
- [38] Bossa F, Latiano A, Rossi L, Magnani M, Palmieri O, Dallapiccola B et al 2008 Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with mild-to-moderate ulcerative colitis, refractory to mesalamine: a randomized, controlled study. *Am. J. Gastroenterol.* **103** 2509-16
- [39] Castro M, Rossi L, Papadatou B, Bracci F, Knafelz D, Ambrosini MI et al 2007 Long-term treatment with autologous red blood cells loaded with dexamethasone 21-phosphate in pediatric patients affected by steroid-dependent Crohn disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **44** 423-6
- [40] Rossi L, Castro M, D'Orio F, Damonte G, Serafini S, Bigi L et al 2004 Low doses of dexamethasone constantly delivered by autologous erythrocytes slow the progression of lung disease in cystic fibrosis patients. *Blood Cells Mol. Dis.* **33** 57-63
- [41] Menotta M, Biagiotti S, Bianchi M, Chessa L, Magnani M 2012 Dexamethasone partially rescues ataxia telangiectasia-mutated (ATM) deficiency in ataxia telangiectasia by promoting a shortened protein variant retaining kinase activity. *J. Biol. Chem.* **287** 41352-63
- [42] Biagiotti S, Menotta M, Orazi S, Spapperi C, Brundu S, Fraternali A et al 2016 Dexamethasone improves redox state in Ataxia Telangiectasia cells by promoting NRF2-mediated antioxidant response. *FEBS J.*
- [43] Shiloh Y 2003 ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* **3** 155-68
- [44] Ambrose M and Gatti RA 2013 Pathogenesis of ataxia-telangiectasia: the next generation of ATM functions. *Blood* **121** 4036-45
- [45] Stracker TH, Roig I, Knobel PA, Marjanovic M 2013 The ATM signaling network in development and disease. *Front Genet.* **4** 37
- [46] Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH et al 2010 ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107** 4153-8

- [47] Lee JH and Paull TT 2005 ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308** 551-4
- [48] Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S 2004 Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **73** 39-85
- [49] Lukas J, Lukas C, Bartek J 2011 More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell Biol.* **13** 1161-9
- [50] de JM, van NJ, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C 2001 Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol. Cell* **8** 1129-35
- [51] Bakkenist CJ and Kastan MB 2003 DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421** 499-506
- [52] Bensimon A, Schmidt A, Ziv Y, Elkon R, Wang SY, Chen DJ et al 2010 ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage. *Sci. Signal.* **3** rs3
- [53] Kozlov SV, Graham ME, Peng C, Chen P, Robinson PJ, Lavin MF 2006 Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J.* **25** 3504-14
- [54] Kozlov SV, Graham ME, Jakob B, Tobias F, Kijas AW, Tanuji M et al 2011 Autophosphorylation and ATM activation: additional sites add to the complexity. *J. Biol. Chem.* **286** 9107-19
- [55] Sun Y, Xu Y, Roy K, Price BD 2007 DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Mol. Cell Biol.* **27** 8502-9
- [56] Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuasen RG, Welcker M, Bartek J et al 2000 Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288** 1425-9
- [57] Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P 1995 Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82** 675-84
- [58] Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnicka-Worms H 1997 Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* **277** 1501-5
- [59] Yang C, Tang X, Guo X, Niikura Y, Kitagawa K, Cui K et al 2011 Aurora-B mediated ATM serine 1403 phosphorylation is required for mitotic ATM activation and the spindle checkpoint. *Mol. Cell* **44** 597-608
- [60] Lavin MF 2008 Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** 759-69
- [61] Lavin MF and Shiloh Y 1997 The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu. Rev. Immunol.* **15** 177-202
- [62] Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lohrich M et al 2008 ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell* **31** 167-77
- [63] Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F et al 1996 Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* **86** 159-71

- [64] Boehrs JK, He J, Halaby MJ, Yang DQ 2007 Constitutive expression and cytoplasmic compartmentalization of ATM protein in differentiated human neuron-like SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* **100** 337-45
- [65] Li J, Han YR, Plummer MR, Herrup K 2009 Cytoplasmic ATM in neurons modulates synaptic function. *Curr. Biol.* **19** 2091-6
- [66] Lim DS, Kirsch DG, Canman CE, Ahn JH, Ziv Y, Newman LS et al 1998 ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95** 10146-51
- [67] Watters D, Kedar P, Spring K, Bjorkman J, Chen P, Gatei M et al 1999 Localization of a portion of extranuclear ATM to peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **274** 34277-82
- [68] Barlow C, Ribaut-Barassin C, Zwingman TA, Pope AJ, Brown KD, Owens JW et al 2000 ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97** 871-6
- [69] Barzilai A, Rotman G, Shiloh Y 2002 ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **1** 3-25
- [70] Meredith MJ and Dodson ML 1987 Impaired glutathione biosynthesis in cultured human ataxia-telangiectasia cells. *Cancer Res.* **47** 4576-81
- [71] Ward AJ, Olive PL, Burr AH, Rosin MP 1994 Response of fibroblast cultures from ataxia-telangiectasia patients to reactive oxygen species generated during inflammatory reactions. *Environ. Mol. Mutagen.* **24** 103-11
- [72] Shackelford RE, Innes CL, Sieber SO, Heinloth AN, Leadon SA, Paules RS 2001 The Ataxia telangiectasia gene product is required for oxidative stress-induced G1 and G2 checkpoint function in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276** 21951-9
- [73] Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I et al 2004 Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **431** 997-1002
- [74] Kim J and Wong PK 2009 Oxidative stress is linked to ERK1/2-p16 signaling-mediated growth defect in ATM-deficient astrocytes. *J. Biol. Chem.* **284** 14396-404
- [75] Kurz EU, Douglas P, Lees-Miller SP 2004 Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **279** 53272-81
- [76] Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, Person MD, Paull TT 2010 ATM activation by oxidative stress. *Science* **330** 517-21
- [77] Guo Z, Deshpande R, Paull TT 2010 ATM activation in the presence of oxidative stress. *Cell Cycle* **9** 4805-11
- [78] Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, III, Hurov KE, Luo J et al 2007 ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316** 1160-6
- [79] Mu JJ, Wang Y, Luo H, Leng M, Zhang J, Yang T et al 2007 A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATR substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints. *J. Biol. Chem.* **282** 17330-4

- [80] Choi S, Srivas R, Fu KY, Hood BL, Dost B, Gibson GA et al 2012 Quantitative proteomics reveal ATM kinase-dependent exchange in DNA damage response complexes. *J. Proteome. Res.* **11** 4983-91
- [81] Jung M, Timofeeva O, Cheema AK, Varghese R, Ressom H, Dritschilo A 2011 Human fibroblasts for large-scale "omics" investigations of ATM gene function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **720** 181-90
- [82] Bar RS, Levis WR, Rechler MM, Harrison LC, Siebert C, Podskalny J et al 1978 Extreme insulin resistance in ataxia telangiectasia: defect in affinity of insulin receptors. *N. Engl. J. Med.* **298** 1164-71
- [83] Schalch DS, McFarlin DE, Barlow MH 1970 An unusual form of diabetes mellitus in ataxia telangiectasia. *N. Engl. J. Med.* **282** 1396-402
- [84] Peretz S, Jensen R, Baserga R, Glazer PM 2001 ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-I receptor in a pathway regulating radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98** 1676-81
- [85] Shahrabani-Gargir L, Pandita TK, Werner H 2004 Ataxia-telangiectasia mutated gene controls insulin-like growth factor I receptor gene expression in a deoxyribonucleic acid damage response pathway via mechanisms involving zinc-finger transcription factors Sp1 and WT1. *Endocrinology* **145** 5679-87
- [86] Khalil A, Morgan RN, Adams BR, Golding SE, Dever SM, Rosenberg E et al 2011 ATM-dependent ERK signaling via AKT in response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* **10** 481-91
- [87] Viniegra JG, Martinez N, Modirassari P, Hernandez LJ, Parada CC, Sanchez-Arevalo Lobo VJ et al 2005 Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM. *J. Biol. Chem.* **280** 4029-36
- [88] Halaby MJ, Hibma JC, He J, Yang DQ 2008 ATM protein kinase mediates full activation of Akt and regulates glucose transporter 4 translocation by insulin in muscle cells. *Cell Signal.* **20** 1555-63
- [89] Li Y and Yang DQ 2010 The ATM inhibitor KU-55933 suppresses cell proliferation and induces apoptosis by blocking Akt in cancer cells with overactivated Akt. *Mol. Cancer Ther.* **9** 113-25
- [90] Fraser M, Harding SM, Zhao H, Coackley C, Durocher D, Bristow RG 2011 MRE11 promotes AKT phosphorylation in direct response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* **10** 2218-32
- [91] Armata HL, Golebiowski D, Jung DY, Ko HJ, Kim JK, Sluss HK 2010 Requirement of the ATM/p53 tumor suppressor pathway for glucose homeostasis. *Mol. Cell Biol.* **30** 5787-94
- [92] Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM 2005 The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* **11** 1306-13
- [93] Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I et al 2004 p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res.* **64** 2350-6
- [94] Miyamoto S 2011 Nuclear initiated NF-kappaB signaling: NEMO and ATM take center stage. *Cell Res.* **21** 116-30
- [95] Suzuki A, Kusakai G, Kishimoto A, Shimojo Y, Ogura T, Lavin MF et al 2004 IGF-1 phosphorylates AMPK-alpha subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324** 986-92

- [96] Sun Y, Connors KE, Yang DQ 2007 AICAR induces phosphorylation of AMPK in an ATM-dependent, LKB1-independent manner. *Mol. Cell Biochem.* **306** 239-45
- [97] Shaw RJ 2009 LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)* **196** 65-80
- [98] Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ 2010 mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 α . *Mol. Cell* **40** 509-20
- [99] Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P 2007 mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature* **450** 736-40
- [100] Bencokova Z, Kaufmann MR, Pires IM, Lecane PS, Giaccia AJ, Hammond EM 2009 ATM activation and signaling under hypoxic conditions. *Mol. Cell Biol.* **29** 526-37
- [101] DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW 2008 Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev.* **22** 239-51
- [102] Kim TS, Kawaguchi M, Suzuki M, Jung CG, Asai K, Shibamoto Y et al 2010 The ZFH3 (ATBF1) transcription factor induces PDGFRB, which activates ATM in the cytoplasm to protect cerebellar neurons from oxidative stress. *Dis. Model. Mech.* **3** 752-62
- [103] Famulski KS, Al-Hijailan RS, Dobler K, Pienkowska M, Al-Mohanna F, Paterson MC 2003 Aberrant sensing of extracellular Ca²⁺ by cultured ataxia telangiectasia fibroblasts. *Oncogene* **22** 471-5
- [104] Chiesa N, Barlow C, Wynshaw-Boris A, Strata P, Tempia F 2000 Atm-deficient mice Purkinje cells show age-dependent defects in calcium spike bursts and calcium currents. *Neuroscience* **96** 575-83
- [105] Rhodes N, D'Souza T, Foster CD, Ziv Y, Kirsch DG, Shiloh Y et al 1998 Defective potassium currents in ataxia telangiectasia fibroblasts. *Genes Dev.* **12** 3686-92
- [106] Elson A, Wang Y, Daugherty CJ, Morton CC, Zhou F, Campos-Torres J et al 1996 Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93** 13084-9
- [107] Yang Y and Herrup K 2005 Loss of neuronal cell cycle control in ataxia-telangiectasia: a unified disease mechanism. *J. Neurosci.* **25** 2522-9
- [108] Rimkus SA, Katzenberger RJ, Trinh AT, Dodson GE, Tibbetts RS, Wassarman DA 2008 Mutations in String/CDC25 inhibit cell cycle re-entry and neurodegeneration in a Drosophila model of Ataxia telangiectasia. *Genes Dev.* **22** 1205-20
- [109] Li J, Chen J, Vinters HV, Gatti RA, Herrup K 2011 Stable brain ATM message and residual kinase-active ATM protein in ataxia-telangiectasia. *J. Neurosci.* **31** 7568-77
- [110] Chouliaras L, Rutten BP, Kenis G, Peerbooms O, Visser PJ, Verhey F et al 2010 Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **90** 498-510
- [111] Ma DK, Marchetto MC, Guo JU, Ming GL, Gage FH, Song H 2010 Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat. Neurosci.* **13** 1338-44
- [112] Fagiolini M, Jensen CL, Champagne FA 2009 Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **19** 207-12

- [113] Haberland M, Montgomery RL, Olson EN 2009 The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* **10** 32-42
- [114] Majdzadeh N, Morrison BE, D'Mello SR 2008 Class IIA HDACs in the regulation of neurodegeneration. *Front Biosci.* **13** 1072-82
- [115] Darcy MJ, Calvin K, Cavnar K, Ouimet CC 2010 Regional and subcellular distribution of HDAC4 in mouse brain. *J. Comp Neurol.* **518** 722-40
- [116] Yao YL and Yang WM 2011 Beyond histone and deacetylase: an overview of cytoplasmic histone deacetylases and their nonhistone substrates. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011** 146493
- [117] Li J, Chen J, Ricupero CL, Hart RP, Schwartz MS, Kusnecov A et al 2012 Nuclear accumulation of HDAC4 in ATM deficiency promotes neurodegeneration in ataxia telangiectasia. *Nat. Med.* **18** 783-90
- [118] Li J, Hart RP, Mallimo EM, Swerdel MR, Kusnecov AW, Herrup K 2013 EZH2-mediated H3K27 trimethylation mediates neurodegeneration in ataxia-telangiectasia. *Nat. Neurosci.* **16** 1745-53
- [119] Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O et al 2010 Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* **401** 318-20
- [120] Gilda JE and Gomes AV 2013 Stain-Free total protein staining is a superior loading control to beta-actin for Western blots. *Anal. Biochem.* **440** 186-8
- [121] Matsushima S, Kuroda J, Ago T, Zhai P, Park JY, Xie LH et al 2013 Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **112** 651-63
- [122] Lozano JR, Kiracofe D, Melcher J, Garcia R, Raman A 2010 Calibration of higher eigenmode spring constants of atomic force microscope cantilevers. *Nanotechnology.* **21** 465502
- [123] Wang Z, Qin G, Zhao TC 2014 HDAC4: mechanism of regulation and biological functions. *Epigenomics.* **6** 139-50
- [124] Mielcarek M, Zielonka D, Carnemolla A, Marcinkowski JT, Guidez F 2015 HDAC4 as a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases: a summary of recent achievements. *Front Cell Neurosci.* **9** 42
- [125] Wales S, Hashemi S, Blais A, McDermott JC 2014 Global MEF2 target gene analysis in cardiac and skeletal muscle reveals novel regulation of DUSP6 by p38MAPK-MEF2 signaling. *Nucleic Acids Res.* **42** 11349-62
- [126] Singh A, Happel C, Manna SK, Acquah-Mensah G, Carrerero J, Kumar S et al 2013 Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* **123** 2921-34
- [127] Tang Y, Liu S, Li N, Guo W, Shi J, Yu H et al 2016 14-3-3zeta promotes hepatocellular carcinoma venous metastasis by modulating hypoxia-inducible factor-1alpha. *Oncotarget.* **7** 15854-67
- [128] Semenza GL 2001 HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13** 167-71

- [129] Bertacchini J, Beretti F, Cenni V, Guida M, Gibellini F, Mediani L et al 2013 The protein kinase Akt/PKB regulates both prelamin A degradation and Lmna gene expression. *FASEB J.* **27** 2145-55
- [130] Cenni V, Bertacchini J, Beretti F, Lattanzi G, Bavelloni A, Riccio M et al 2008 Lamin A Ser404 is a nuclear target of Akt phosphorylation in C2C12 cells. *J. Proteome. Res.* **7** 4727-35
- [131] Andres V and Gonzalez JM 2009 Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J. Cell Biol.* **187** 945-57
- [132] Zhou X, Richon VM, Wang AH, Yang XJ, Rifkind RA, Marks PA 2000 Histone deacetylase 4 associates with extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, and its cellular localization is regulated by oncogenic Ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97** 14329-33
- [133] Bottomley MJ, Lo SP, Di GP, Cirillo A, Scarpelli R, Ferrigno F et al 2008 Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain. *J. Biol. Chem.* **283** 26694-704
- [134] Zheng Y, Wang XL, Mo FF, Li M 2014 Dexamethasone alleviates motion sickness in rats in part by enhancing the endocannabinoid system. *Eur. J. Pharmacol.* **727** 99-105
- [135] Kochin V, Shimi T, Torvaldson E, Adam SA, Goldman A, Pack CG et al 2014 Interphase phosphorylation of lamin A. *J. Cell Sci.* **127** 2683-96
- [136] Raghunathan VK, Morgan JT, Park SA, Weber D, Phinney BS, Murphy CJ et al 2015 Dexamethasone Stiffens Trabecular Meshwork, Trabecular Meshwork Cells, and Matrix. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **56** 4447-59
- [137] Buxboim A, Swift J, Irianto J, Spinler KR, Dingal PC, Athirasala A et al 2014 Matrix elasticity regulates lamin-A,C phosphorylation and turnover with feedback to actomyosin. *Curr. Biol.* **24** 1909-17
- [138] Discher DE, Janmey P, Wang YL 2005 Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310** 1139-43
- [139] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE 2006 Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126** 677-89
- [140] Dechat T, Vlcek S, Foisner R 2000 Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J. Struct. Biol.* **129** 335-45
- [141] Dechat T, Korbei B, Vaughan OA, Vlcek S, Hutchison CJ, Foisner R 2000 Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins. *J. Cell Sci.* **113 Pt 19** 3473-84
- [142] Naetar N, Korbei B, Kozlov S, Kerenyi MA, Dorner D, Kral R et al 2008 Loss of nucleoplasmic LAP2alpha-lamin A complexes causes erythroid and epidermal progenitor hyperproliferation. *Nat. Cell Biol.* **10** 1341-8
- [143] Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB, Hutchison CJ 2006 Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev.* **86** 967-1008
- [144] Verstraeten VL, Broers JL, Ramaekers FC, van Steensel MA 2007 The nuclear envelope, a key structure in cellular integrity and gene expression. *Curr. Med. Chem.* **14** 1231-48

- [145] Lund E, Oldenburg AR, Delbarre E, Freberg CT, Duband-Goulet I, Eskeland R et al 2013 Lamin A/C-promoter interactions specify chromatin state-dependent transcription outcomes. *Genome Res.* **23** 1580-9
- [146] Marullo F, Cesarini E, Antonelli L, Gregoret F, Oliva G, Lanzaolo C 2016 Nucleoplasmic Lamin A/C and Polycomb group of proteins: An evolutionarily conserved interplay. *Nucleus.* **7** 103-11
- [147] Kubben N, Zhang W, Wang L, Voss TC, Yang J, Qu J et al 2016 Repression of the Antioxidant NRF2 Pathway in Premature Aging. *Cell* **165** 1361-74