



Atassia Telangiectasia

o

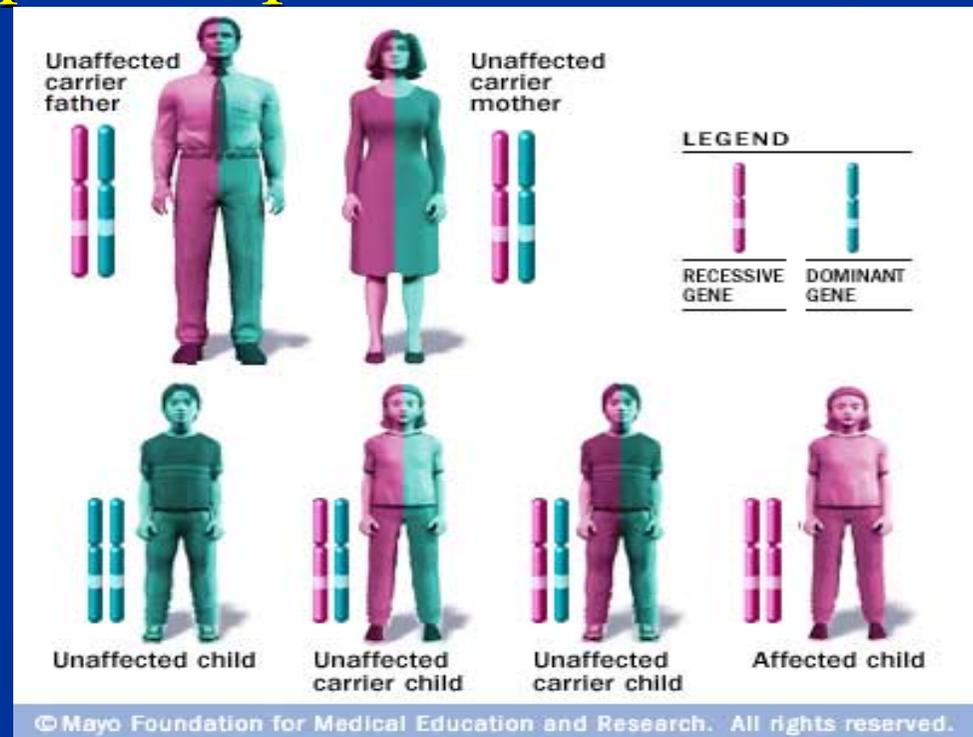
sindrome di Louis-Bar

WWW.FISIOKINESITERAPIA.BIZ

Atassia Telangectasia

atassia : mancata coordinazione dei movimenti
telangiectasia : dilatazione dei vasi sanguigni

L'A-T o sindrome di Louis-Bar è una malattia autosomica recessiva rara di tipo sistemico con effetti pleiotropici



Frequenza Malati:

1:40.000 nati negli USA

1:100.000 nati in Gran Bretagna

Frequenza Portatori: 0.5-1.0%

I portatori Sani presentano rischio di sviluppare cancro circa 3 volte più elevato (6 volte per il cancro alla mammella) del resto della popolazione.

**-Diagnosticata intorno al terzo-quarto
anno di vita**

**- La morte sopraggiunge durante la II-III
decade di vita:**



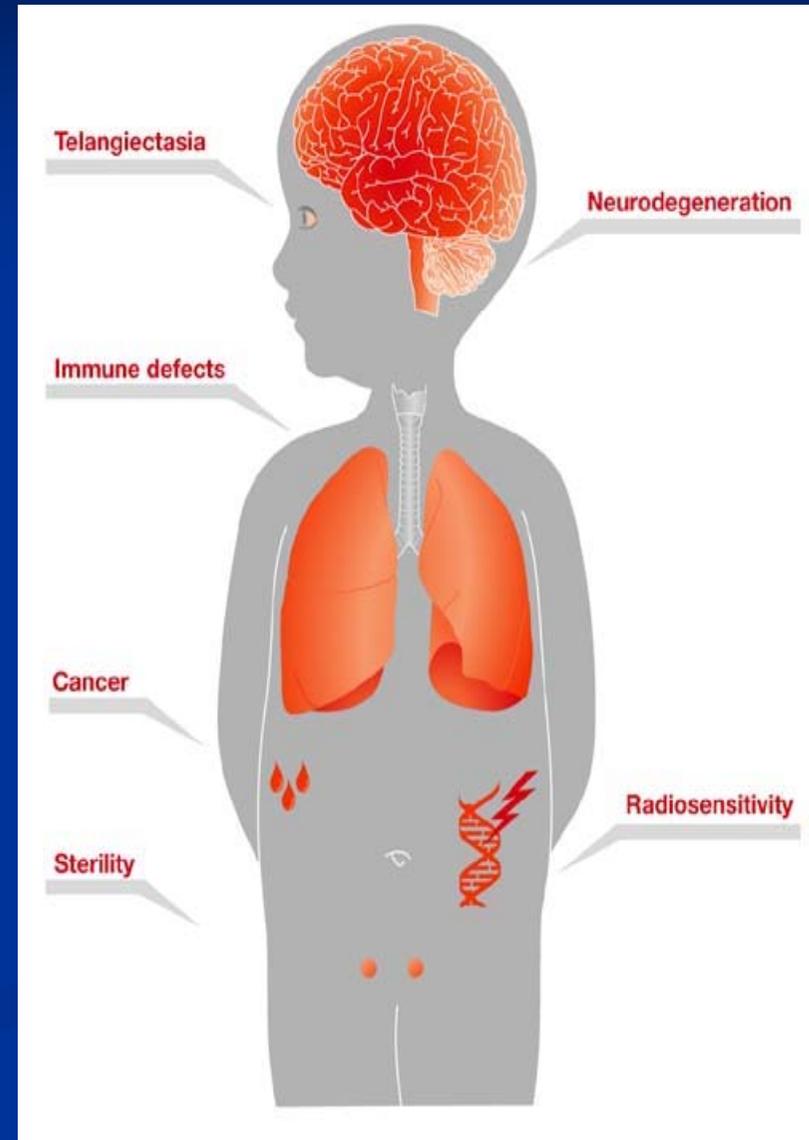
80-90% degenerazione
neurologica

10-15%
linfomi maligni

**Non sono stati scoperti efficaci trattamenti per modificare
il corso di questa malattia.**

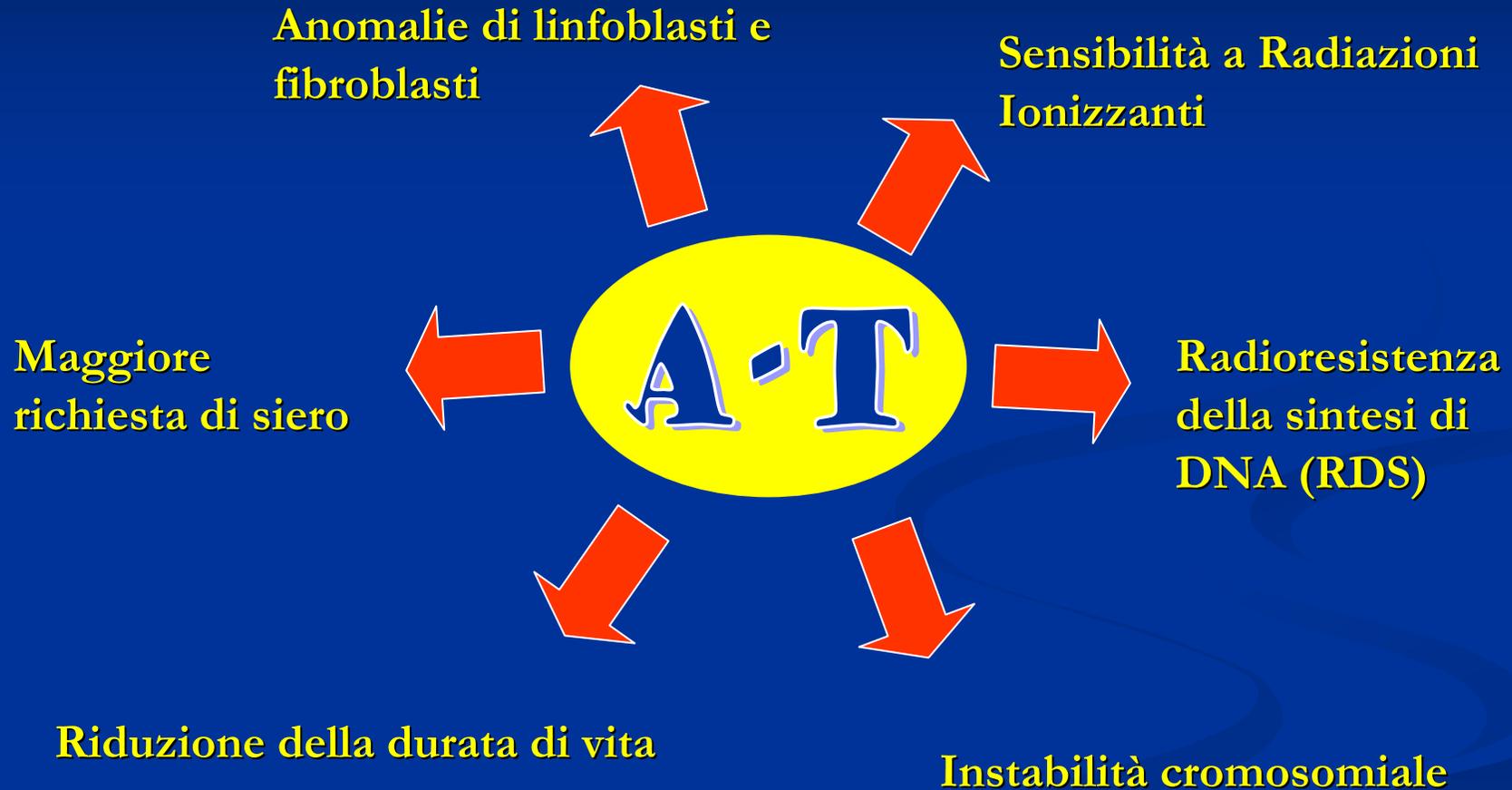
Fenotipo clinico

- **Progressiva Degenerazione Neuronale**
- **Telangiectasia Oculo -Cutanea**
- **Disfunzioni Oculo-Motorie**
- **Disfunzioni Immunologiche**
- **Predisposizione al Cancro**
- **Ipogonadismo**
- **Infezioni Sinopolmonari**
- **Irregolarità delle Ghiandole endocrine**
- **Invecchiamento Precoce**
- **Bassa Statura**
- **Insulino-Resistenza**





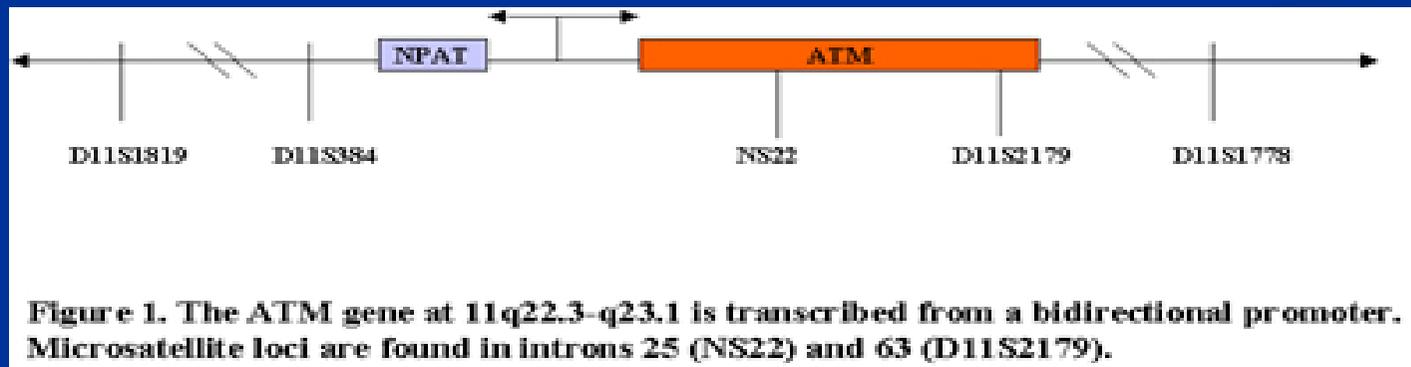
Fenotipo cellulare



Basi genetiche

Nel 1995 sono state scoperte nei pazienti mutazioni a carico del gene **ATM** sul cromosoma **11q22-23** (riscontrate più di **300** mutazioni diverse).

Il gene **ATM** : lungo ~ 150 kb
 ~ 66 esoni



- l'**80%** dei pazienti risulta avere una proteina **ATM** tronca.

ATM appartiene ad una famiglia di proteine, conservata dal lievito all'uomo:

- regola i *checkpoints* del ciclo cellulare
- è coinvolta nella riparazione e ricombinazione del DNA

È una proteina di 350kDa

- contiene un dominio a cerniera di leucine.
- Ha un dominio chinasi C- terminale omologo al dominio catalitico di PI3K
- Ha una subunità catalitica p110 simile a DNA-PK α
- È localizzata soprattutto nel nucleo, ma è stata ritrovata anche in vescicole citoplasmatiche

Alla famiglia di ATM appartiene anche **ATR**

- Il gene *Atr* è stato individuato in un isocromosoma *3q*
- La proteina ATR è in grado, se trasferita in un mioblasto, di inibire la differenziazione cellulare.
- Come ATM è coinvolta nel controllo dei checkpoint del ciclo cellulare e nella riparazione di DSBs

ATM



Attiva p53

ATR



Inibisce p53

ATM e ATR partecipano alla protezione dei telomeri.
Infatti le cellule mancanti di queste proteine subiscono
accorciamento cromosomico

Differenze biochimiche tra ATM – ATR - DNA-PK

ATM	ATR	DNA-PK
L'attività chinasi è Mn ²⁺ dipendente (ione attiva la subunità p110 dell'unità C-term.)	L'attività chinasi è Mn ²⁺ dipendente	Indipendente da Mn ²⁺
Riparazione del danno diretta da omologia		Riparazione del danno non diretta da omologia
Potrebbe essere dipendente dalle KU e dalle estremità del DNA (rottura)		Dipende dalle KU (KU70 e KU80). Le KU legano le estremità a doppio filamento del DNA e forse aumentano l'attività della DNA-Pk, promuovendone l'associazione alle estremità.

Differenze fenotipiche tra ATM – ATR - DNA-PK

ATM	ATR	DNA-PK
Topi e persone privi della proteina mostrano lieve immunodeficienza, ma molti linfomi linfocitari maligni		Topi e persone privi della proteina mostrano lieve immunodeficienza, ma molti linfomi linfocitari maligni
	L'omissione provoca un fenotipo embrionale letale, indicando che è un gene essenziale.	
Risposte anormali a radiazioni ionizzanti in cellule privi della proteina		Risposta a radiazioni ionizzanti relativamente normali in cellule privi della proteina

Conclusione:

Le 3 proteine o hanno substrati diversi o rispondono a diversi segnali.

Esempio:

ATM fosforila residui di *Serina* o *Treonina* solo se sono seguiti da *Glutammina* (motivo SQ/TQ).

Se vicino a T o S c'è:

- un aa carico + la frequenza di fosforilazione ↓
- un aa idrofobico o carico – la frequenza di fosforilazione ↑

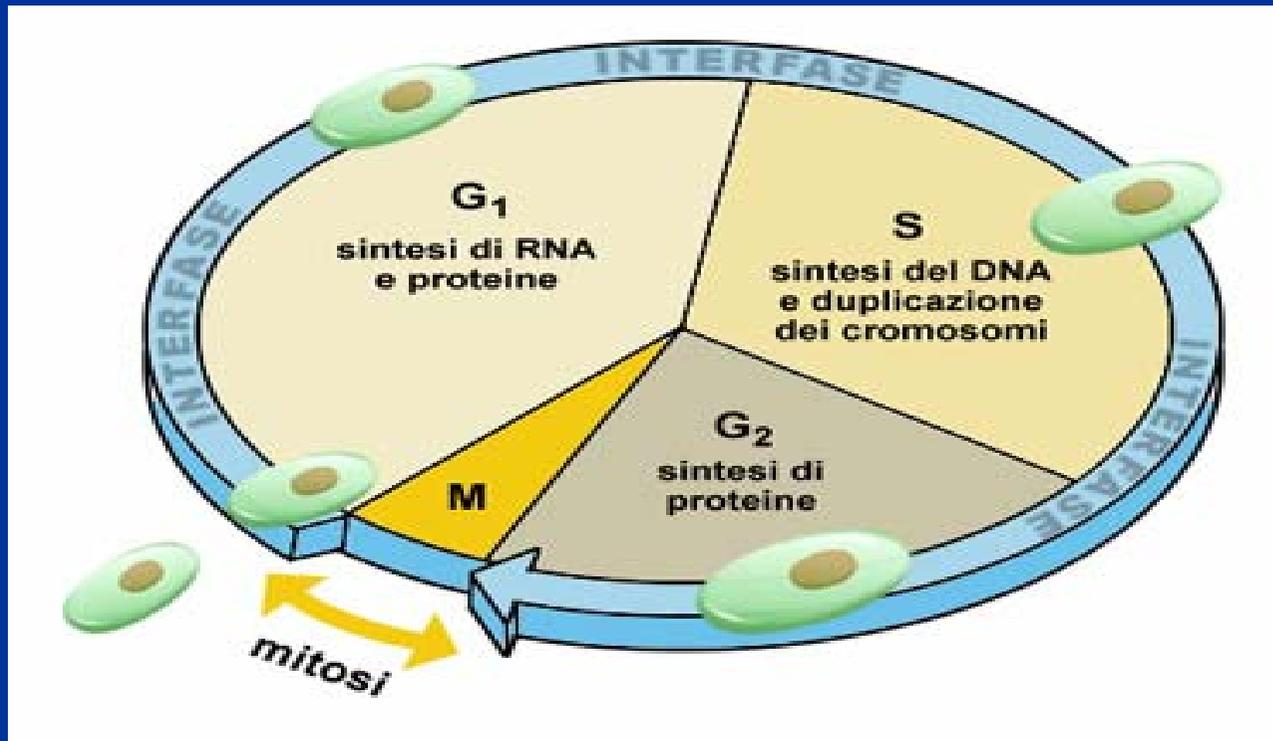
ATM

e

CHECKPOINTS

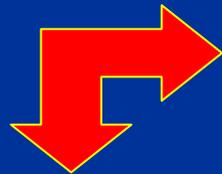
ATM è regolatore dei checkpoints del ciclo cellulare.

Il ciclo cellulare è composto da 4 fasi



I checkpoints forniscono un meccanismo di sorveglianza dopo danno al genoma.

Possono agire:



**Bloccando il ciclo cellulare
per permettere
il riparo del DNA**

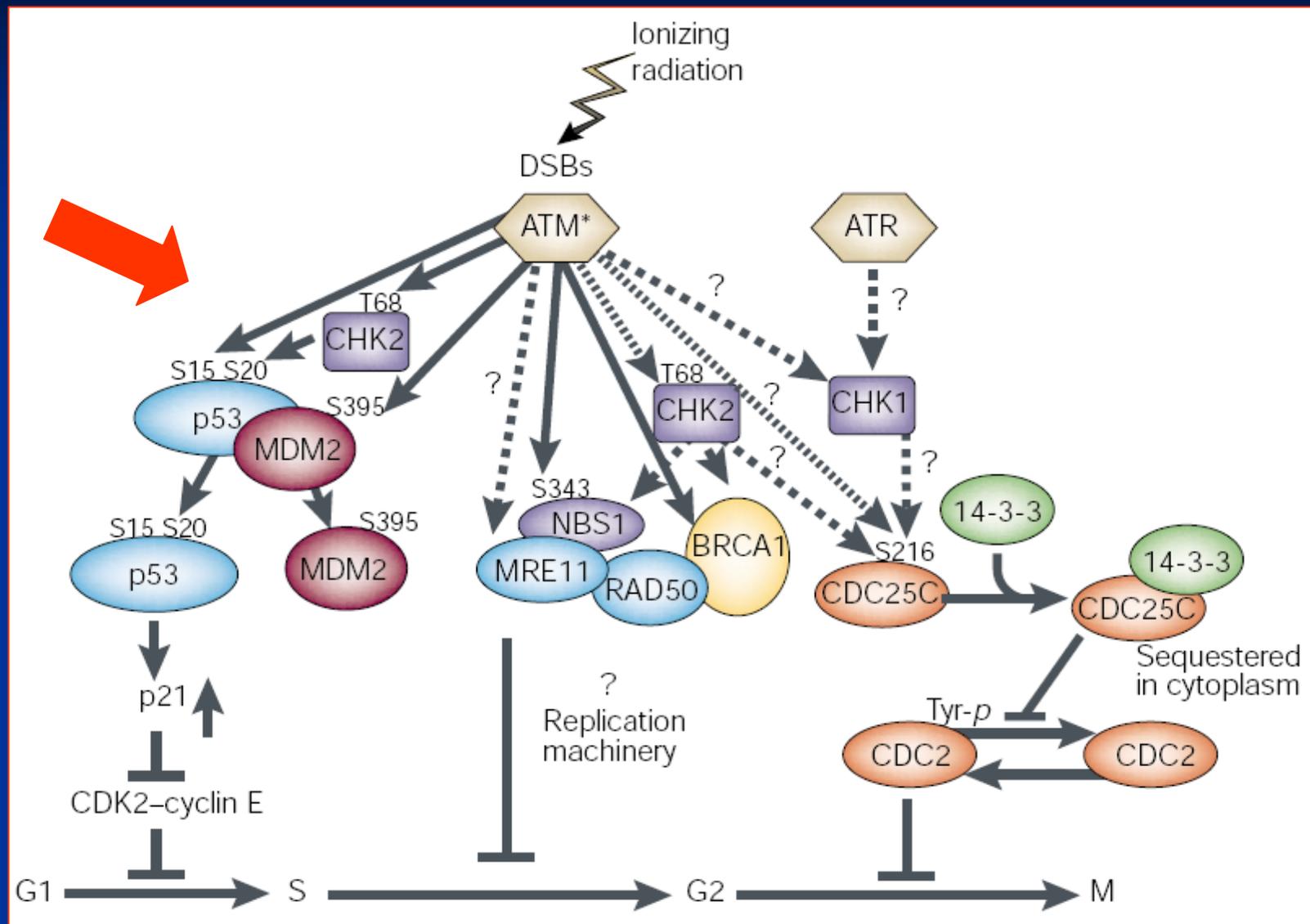
**Inducendo la
morte programmata
della cellula
APOPTOSI**

G1-checkpoint

è localizzato al termine della fase G1 dove la cellula decide se dividersi o entrare in uno stato di quiescenza.

L'arresto in questa fase è dovuto a danni al DNA indotti da radiazioni ionizzanti, mancanza di O₂, rimozione dei trifosfati dei nucleotidi.

Come agisce ATM?



- ATM, attivato da radiazioni ionizzanti, fosforila *p53* a livello di residui di Ser15
- p53* attivato induce *p21* (conosciuto anche come WAF1 o CIP1)
- p21* indotto inibisce il *complesso CycE-cdk2*, importante per la progressione del ciclo cellulare da G1 a S

IL CICLO SI BLOCCA

I livelli di p53 aumentano

in due modi in cui un ruolo importante è svolto da MDM2, regolatore della degradazione di p53



**Dopo IR ATM fosforila
MDM2
a livello di Ser395,
Inibendo la sua capacità di
Trasportare p53 dal nucleo
al citoplasma**

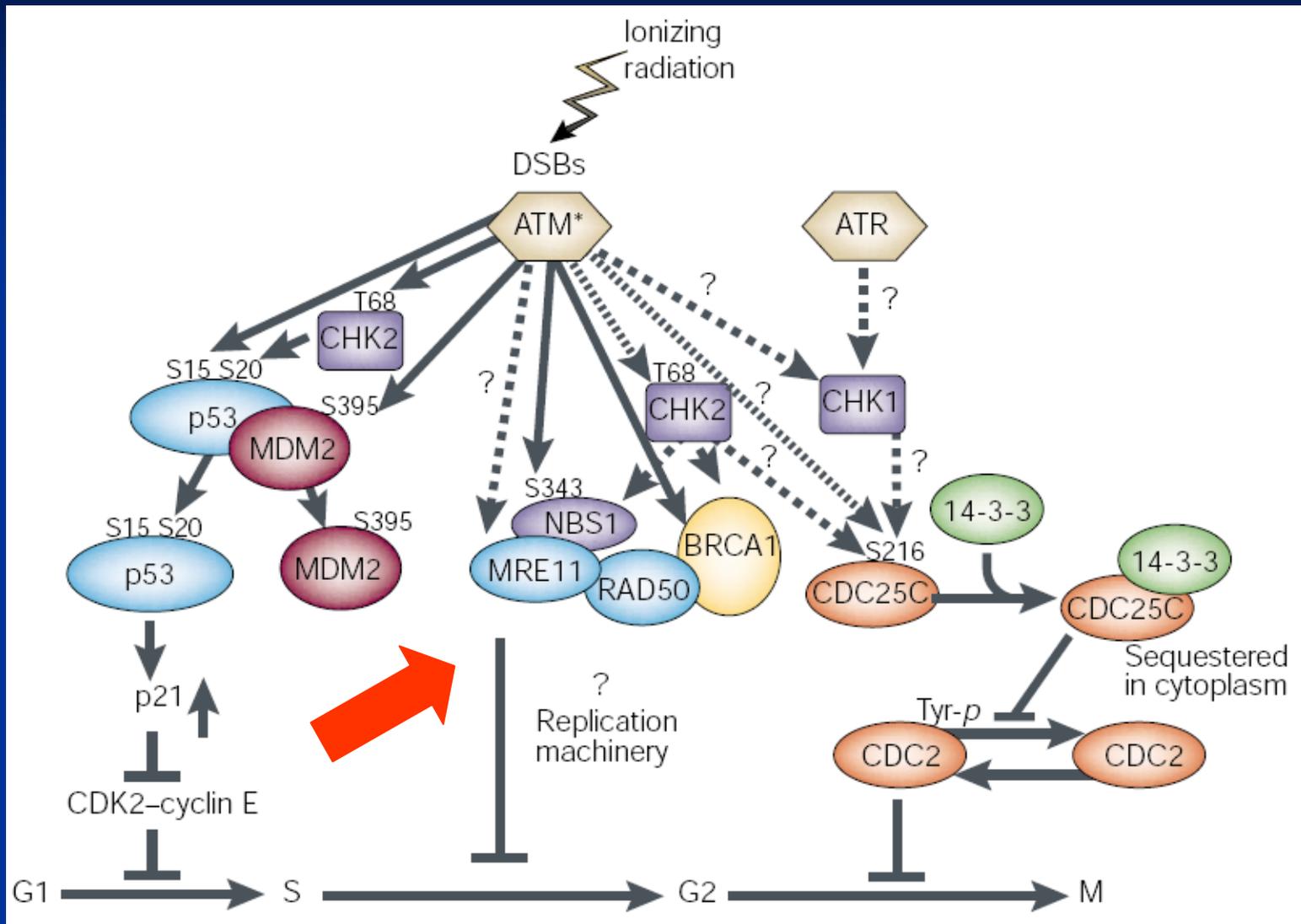


**Dopo IR ATM fosforila
P53
A livello di Ser20,
Inibendo il legame con MDM2**

S-checkpoint

Anche qui il ciclo cellulare, in condizioni normali, si blocca in seguito a danni al DNA.

In cellule con deficit di ATM è stato riscontrato il fenomeno della SINTESI DEL DNA RADIORESISTENTE (RDS), in cui la cellula è incapace di arrestare la sintesi del DNA.



ATM può agire tramite due vie:



**In vitro si è visto che
Un potenziale substrato è
P95 (o NBS1)**

**Che forma un complesso con
Rad5 e MRE11, forse
Impegnato nel legame e nella
Riparazione di DSBs
(un altro componente del
complesso è
BRCA1)**



**Attiva CHK2
Fosforilandolo a livello
Di T68**

Mutazioni dei componenti del complesso

NBS1

Causa la

Nijmegen breakage syndromed (NBS),
una malattia con caratteristiche simili
all'A-T.

I pazienti mostrano principalmente:

- sensibilità a IR
- predisposizione a cancro
- instabilità cromosomica
- microencefalopatie

MRE11

Causa la

Ataxia Telangiectasia Like Disorders
(ATLD)

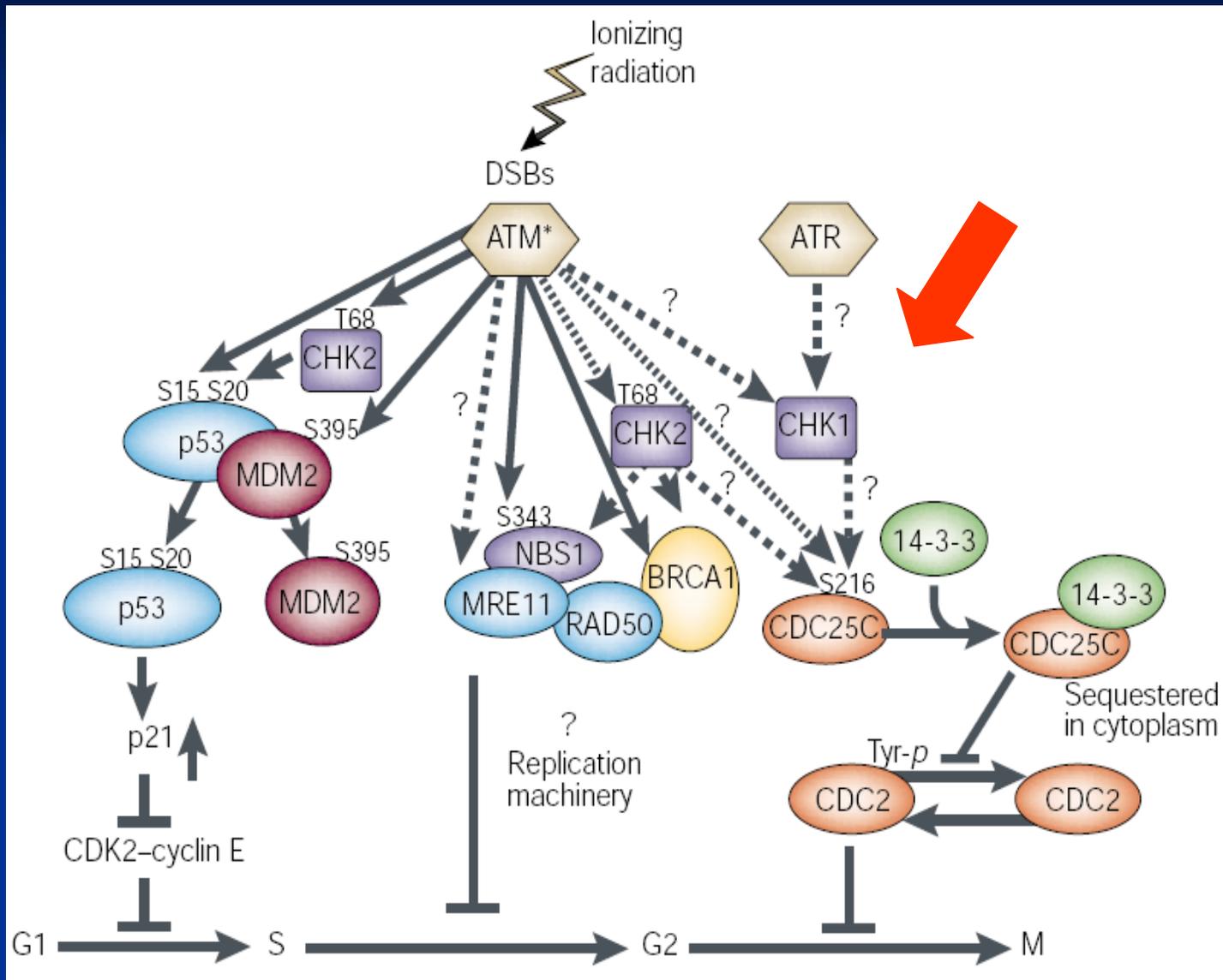
Tra i sintomi include:

- radiosensibilità
- RDS
- degenerazione neuronale

G2- checkpoint

È localizzato al termine della fase G2 e controlla l'ingresso in mitosi. Permette l'avvio della mitosi se le condizioni precedenti sono soddisfatte, come la fine della replicazione.

Si è visto che le cellule con A-T, sottoposte a IR per ~30-90 min., continuano ad entrare in mitosi, poichè incapaci di arrestare il ciclo.



Il processo può svolgersi attraverso due vie



-ATM/ATR attivano la chinasi *CHK1*

-CHK2 fosforila una fosfatasi, *CDC25*, a livello di Ser216

- *CDC25-fosforilata* lega la proteina citoplasmatica *14-3-3*

- progressione G2/M bloccata



-ATM/ATR attivano la chinasi *CHK2*

-CHK2 fosforila *CDC25*

**Le cellule mancanti di ATM mostrano anormale
riparo del DNA
a causa di un'organizzazione anomala
della cromatina**

**ATM dopo danno genetico si lega alla cromatina ed
alla matrice nucleare defosforilando l'istone H1**

**VIENE PERMESSA LA RIPARAZIONE
DEL DNA**

attraverso il complesso NBS1/Mre11/Rad50.

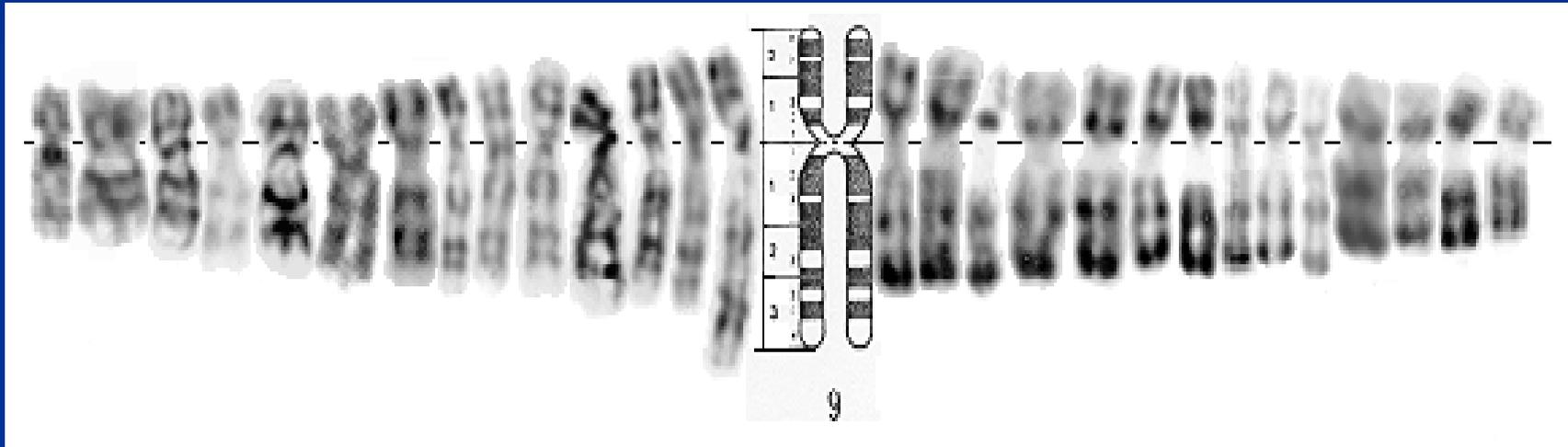
Creazione di Topi Atm





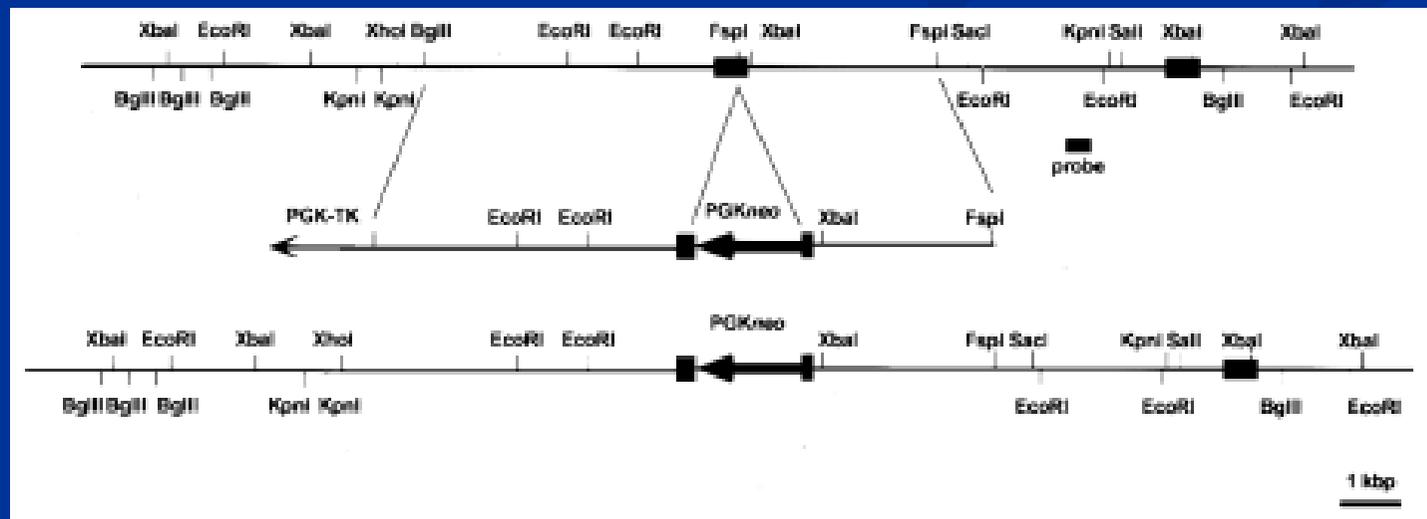
- Sono stati creati topi $Atm^{-/-}$ che rispecchiano la malattia umana e sottolineano il ruolo cruciale di Atm nel mantenimento delle cellule mitotiche, post-mitotiche e meiotiche.
- Il fenotipo del topo $Atm^{-/-}$ è notevolmente simile al fenotipo AT umano, manifestando gran parte dei disordini pleiotropici presenti nell'uomo.
- Per tale motivo viene utilizzato come modello animale.

Il gene omologo del topo è stato mappato sul cromosoma 9C, il quale è sintenico a quello dell'uomo 11q22-23.



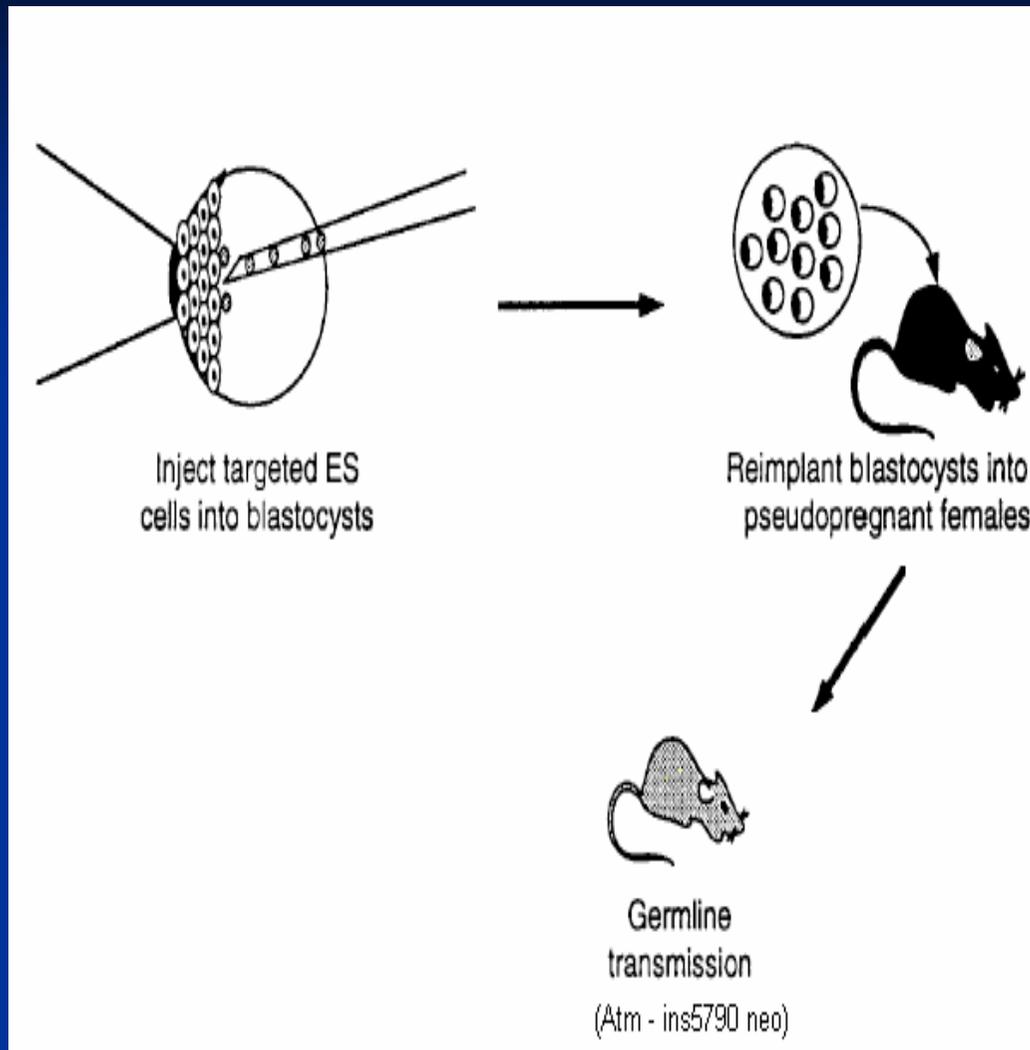
- *Atm* (uomo) = 84% degli aa uguali ad *ATM* (topo)
- 91% similarità complessiva ad *ATM*

- Nel topo è stata introdotta una mutazione da inserzione tramite l'utilizzo di **PGK neo** nella posizione 5790.
- Questo provoca uno scivolamento nella cornice di lettura (frameshift) che porta alla formazione di una proteina tronca.
- L'esone nel quale è stata inserita la cassetta **PGK neo** è di 178 bp e corrisponde ai nt 5705-5882 nell'Atm dell'uomo.



Diapositiva 33

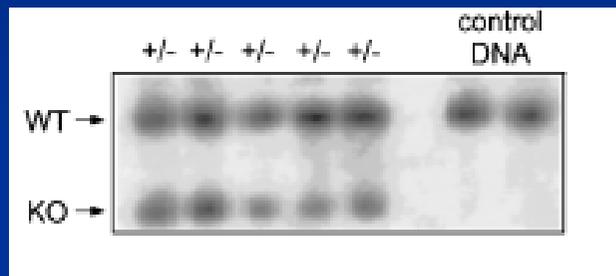
MSOffice1 ; 17/04/2007



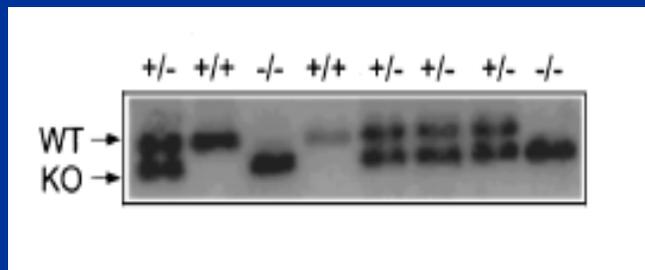
- Il trascritto *Atm*, che include l'esone modificato, viene trasferito nella cellula embrionale staminale TC1
- vengono selezionati i cloni bersaglio (fig.A)
- iniettati nei blastociti e solo uno trasmette la disgregazione dell'allele *Atm* nella linea germinale del topo ($Atm^{ins5790neo}$).

Analisi Southern blot

A)



F1: Tramite l'uso di XhoI sono stati individuati gli eterozigoti



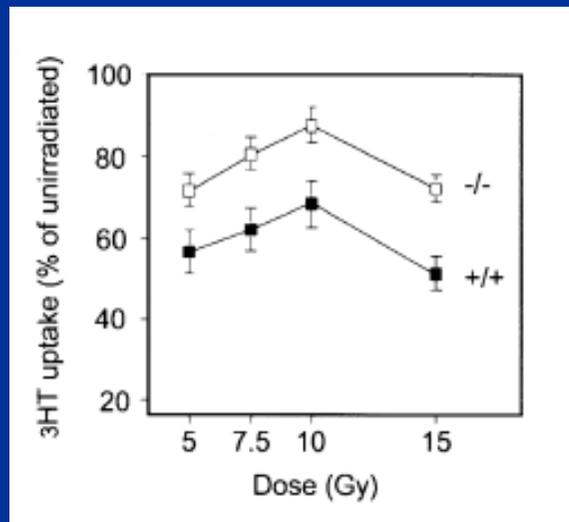
F2: Dopo Incrocio degli eterozigoti.

Tramite digestione con EcoRV

Sono identificati i tre genotipi.

ANOMALIE NEI FIBROBLASTI MUTATI NEI PUNTI DI CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE.

- Cellule provenienti da pazienti AT presentano anomalie nei checkpoint del ciclo cellulare, dopo irradiazione γ .
- Confronto di RDS nei fibroblasti prelevati dalla punta della coda di topi WT e di -/-.



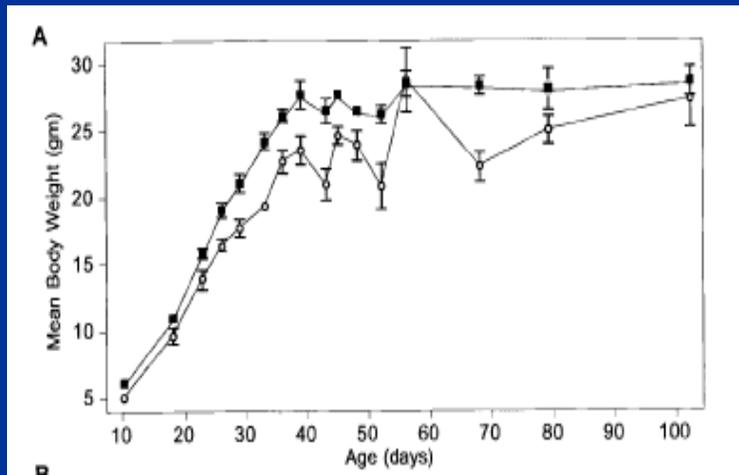
I mutanti mostrano aumentato RDS ($p < 0.03$) dopo aver ricevuto dai 5-15 Gy di irradiazione γ rispetto i WT.

- **Risultato:** i topi con mutazione hanno anormale funzione dell'Atm

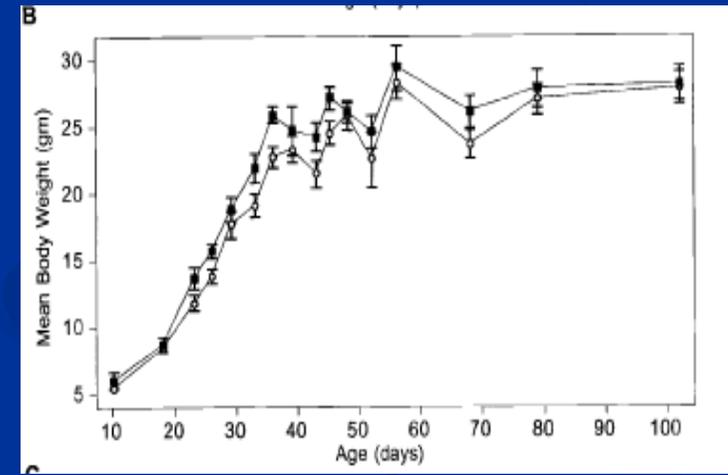
RUOLO ESSENZIALE DELL'ATM NELLA CRESCITA SOMATICA

- I topi ATM^{-/-} sono più piccoli alla nascita
- Sono stati confrontati i tre genotipi in un periodo che va dagli 8 giorni ai 3 mesi di vita.

♀



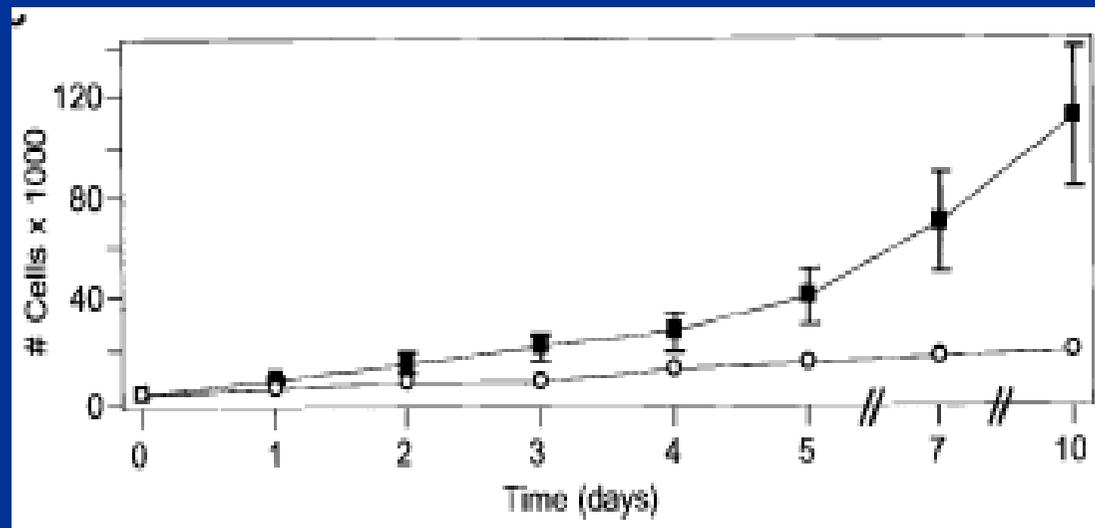
♂



- **Risultato:** i ♂ e le ♀ pesano significativamente meno rispetto ai topi WT e quelli eterozigoti.

SCARSA CRESCITA DEI FIBROBLASTI MUTANTI

- Utilizzando medium contenente il 10% di siero fetale di vitello, si confronta la crescita dei fibroblasti prelevati dalla coda del topo $ATM^{-/-}$, WT.



- Risultato:** i fibroblasti dei WT crescono normalmente, mentre, quelli $ATM^{-/-}$ crescono lentamente, subiscono invecchiamento prematuro ed hanno alta necessità dei fattori di crescita.

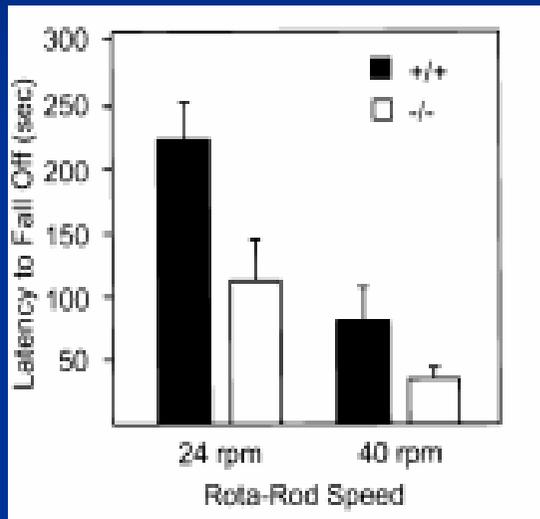
ANOMALIE NEUROLOGICHE NEI TOPI MUTANTI

Per analizzare la risposta motoria dei topi $ATM^{-/-}$ e WT utilizziamo 3 tests specifici :

- **ROTA-ROD**
- **OPEN FIELD**
- **HIND-PAW FOOTPRINT**
- **Risultato:** nei topi knock-out vi è danneggiamento motorio, disfunzione cerebellare e degenerazione dei neuroni motori

ROTA-ROD

- Il test consiste nel posizionare il topino su un cilindro ruotante, per poi misurare il tempo del suo equilibrio prima di cadere.
- Dopo una settimana di allenamenti la velocità del rota-rod ha raggiunto i 24-40 rpm

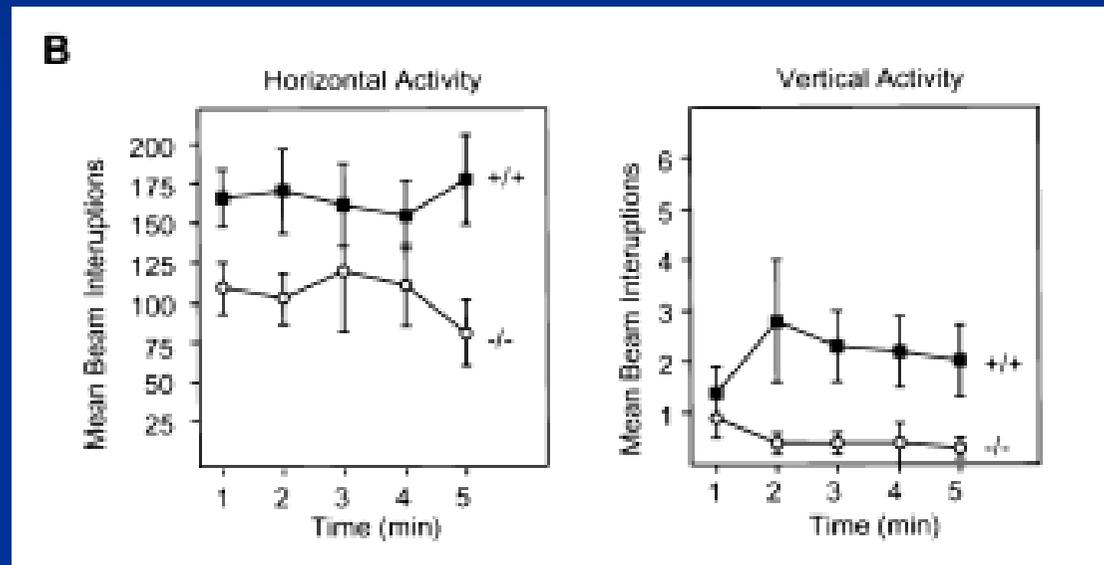


- **Risultato:** i WT e gli eterozigoti hanno > capacità di restare sospesi e di mantenere l'equilibrio rispetto ai topi mutanti.
- I topi di 2-4 mesi hanno le stesse performance
- E' stato effettuato un ulteriore test sospendendo i topi a testa in giù con un filo metallico: tutti i topi sono ugualmente abili a rimanere in sospensione.



OPEN FIELD

- Il test consiste nel posizionare il topino in un contenitore di plexiglass e nel valutare tutti i suoi movimenti orizzontali (camminando) e verticali (impennando) in un tempo non inferiore ai 5 minuti.



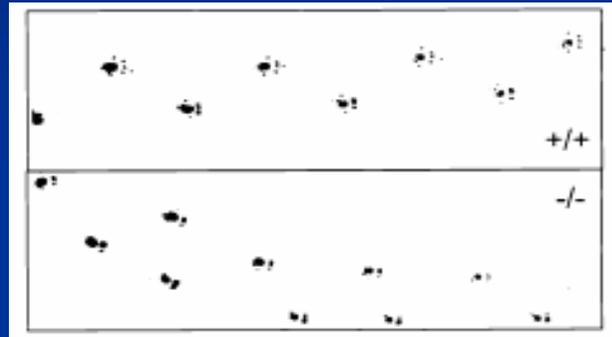
Risultato: ATTIVITA' ORIZZONTALE → mutanti < WT

ATTIVITA' VERTICALE → mutanti < WT

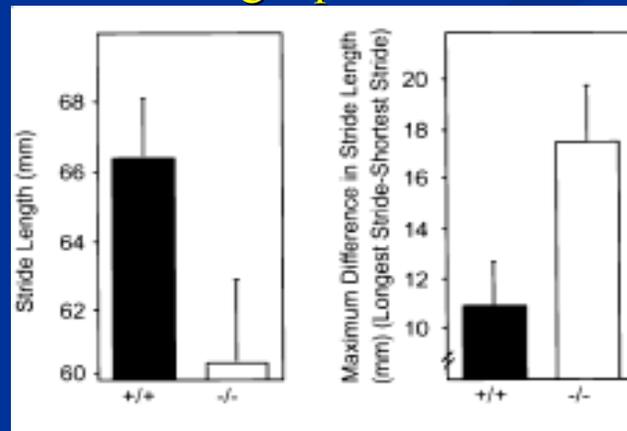
I topi Wild Type sono significativamente più attivi rispetto a quelli mutanti.

HIND-PAW FOOTPRINT

- Il test consiste nell'immergere le zampette posteriori del topo nell'inchiostro e analizzare il percorso da esso svolto lungo un tunnel buio per determinare se il passeggio dei topi mutanti è notevolmente differente da quello dei topi WT.



- E' stata misurata la distanza media tra ogni passo destro



Risultato: i topi mutanti hanno lunghezza del passo < rispetto a quelli WT.
I topi WT hanno una lunghezza del passo più costante.

Analisi istologiche

- cervello di topi ATM $-/-$ colorato con ematossilina-eosina, di età compresa tra i 2-4 mesi, **mostrano** una normale architettura;
 - **Non mostrano:** degenerazioni neuronali nel cervello, nei gangli del midollo spinale e nei nervi periferici
- cervelletto di topi WT e ATM $-/-$, marcati con Tionina e colorati con Ag di Bodian e con Ag di Bielschowsky hanno mostrato:
 - normale morfologia delle cellule di Purkinje
 - normale grandezza delle cellule granulari
 - nessuna evidenza di degenerazione neuronale

➤ **CONCLUSIONE:** dai risultati ottenuti dai tre test, si nota che i topi ATM^{-/-} sono neurologicamente anormali, ma non mostrano anomalie istologiche del cervello e nell'architettura del cervelletto.

ATM E' ESSENZIALE PER LO SVILUPPO DELLE CELLULE STAMINALI E PER LA FERTILITA'

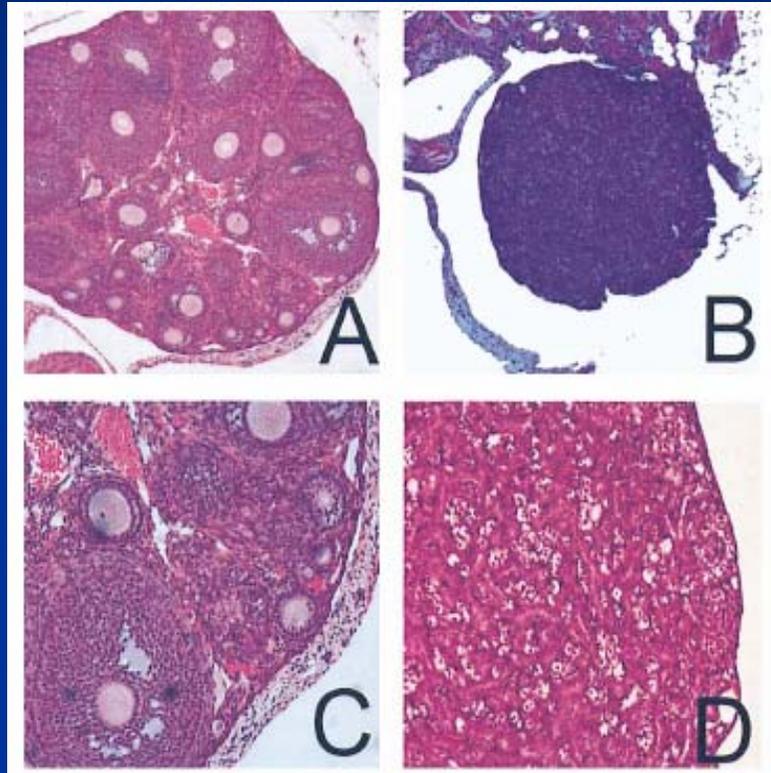
Accoppiando topi mutanti con WT ed eterozigoti, si nota che:

- **Mutanti ♂** : si accoppiano, ma dal momento che successivamente non si presentano gravidanze, si conclude che sono Infertili.
- **Mutanti ♀** : non si accoppiano mai dopo 1 mese di età e sono incapaci di avere un normale ciclo ovarico

CONCLUSIONI: i topi mutanti presentano organi riproduttivi normali, eccetto per le gonadi che sono di dimensioni più piccole in entrambi i sessi. Esami istologici mostrano completa assenza di gameti maturi

Ovaie di ♀ WT

- diversi follicoli primordiali
- follicoli in sviluppo
- ovociti
- cellule stromali ed interstiziali tra i follicoli



Ovaie di ♀ ATM^{-/-}

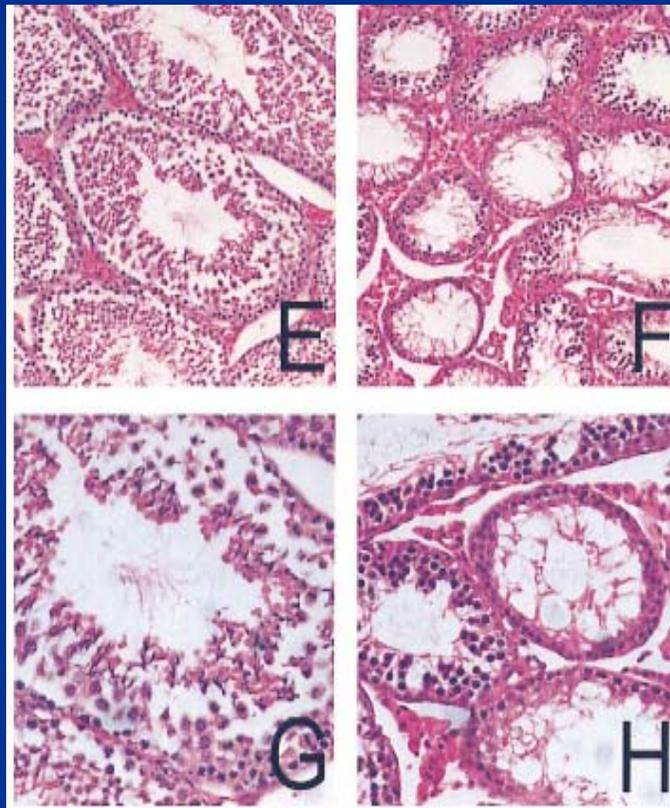
- prive di ovociti
- prive di follicoli primordiali e maturi
- lo stroma contiene numerose cellule interstiziali con chiaro citoplasma
- Rivestimento uterino non mostra prove di proliferazione o degenerazione

Testicoli di ♂ WT (di 2 mesi di età) :

➤ cellule di Leyding e cellule di sostegno fra i tubuli seminiferi.

I **tubuli seminiferi** sono costituiti da:

- una membrana di basamento
- uno strato esterno di cellule di Sertoli e Spermatogonia (c. staminali Primogenia)
- diversi strati di spermatociti maturi (c. che si trasforma in un'altra cellula)
- spermatidi (c. sessuali giovani) e spermatozoi maturi



Testicoli di ♂ ATM^{-/-}

- completa disgregazione di spermatogenesi (formazione di sperma)
- cellule di Leyding e cellule di sostegno:
 - 1) nei topi giovani → normali in numero e aspetto
 - 2) nei topi anziani → numero aumentato
- spesso privi di tutte le cellule, eccetto quelle di Sertoli
- Epididimo (sopra il testicolo) in struttura appare normale, ma è privo di spermatozoi e di spermatidi

ANOMALIE IMMUNOLOGICHE NEI TOPI MUTANTI

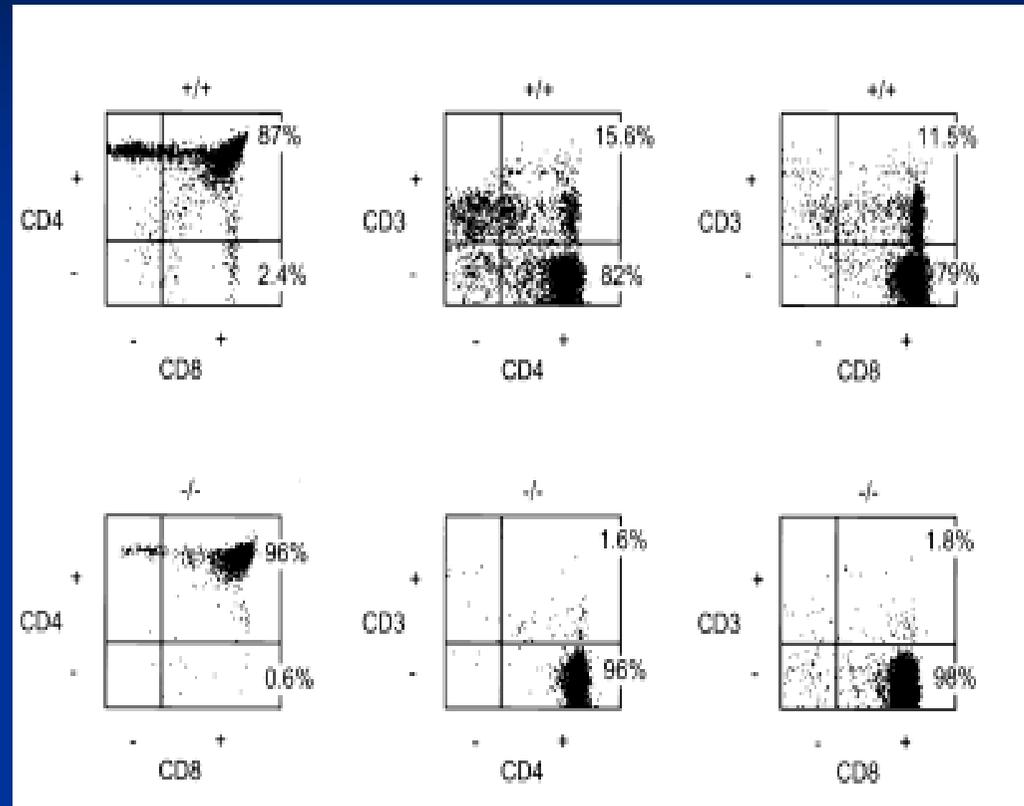
- I tessuti linfoidei dei topi mutanti sono più piccoli di quelli dei WT. Analisi istologiche dei tre genotipi (età 2-8 settimane) non mostrano divergenze nell'architettura del timo, della milza, dei linfonodi e del midollo osseo.
- Per indagare sulle potenziali anomalie immunologiche, si effettua l'analisi di Citometria a Flusso dei timociti, degli splenociti, dei linfonodi e del sangue periferico, utilizzando Ag di Superficie.

- analisi simultanea di **CD3+/CD4+** presenta 59% di riduzione dei linfociti T maturi
- analisi simultanea di **CD3+/CD8+** presenta 67% di riduzione dei linfociti T maturi
- analisi simultanee con **CD3,CD4 e CD8** mostrano simili riduzioni in linfociti T maturi

CD69 è stato utilizzato come marcatore per visualizzare l'attivazione delle cellule T nei linfonodi e nel sangue periferico.

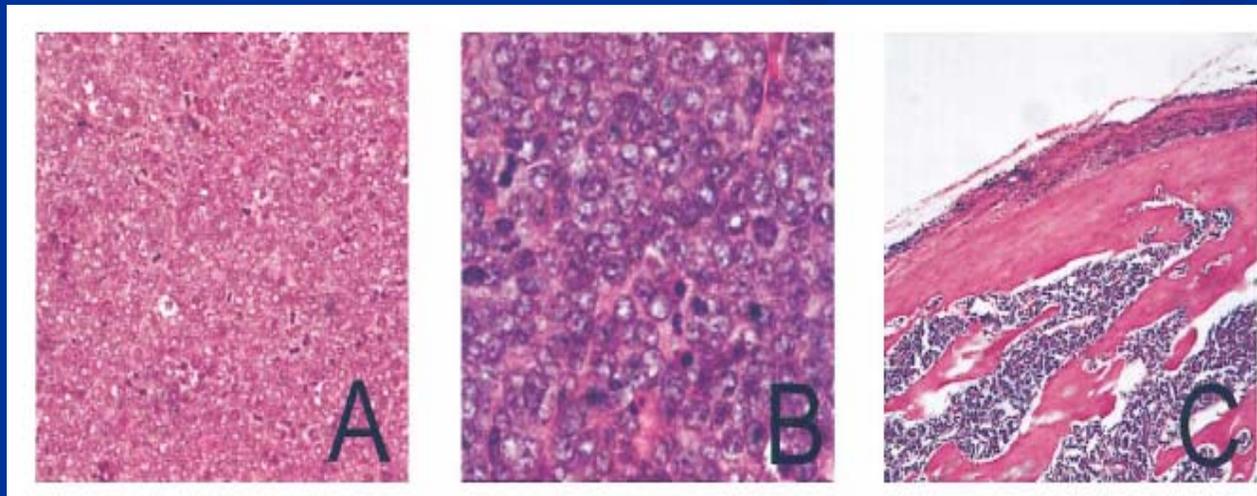
Risultato: dato che nei topi mutanti il numero assoluto di **CD3+/CD69+** e **CD8+/CD69+** è ridotto, capiamo che i pochi linfociti T maturi presenti sono capaci di attivarsi

CONCLUSIONE: i topi ATM hanno una diminuzione di cellule T mature e sviluppano linfoma del timo

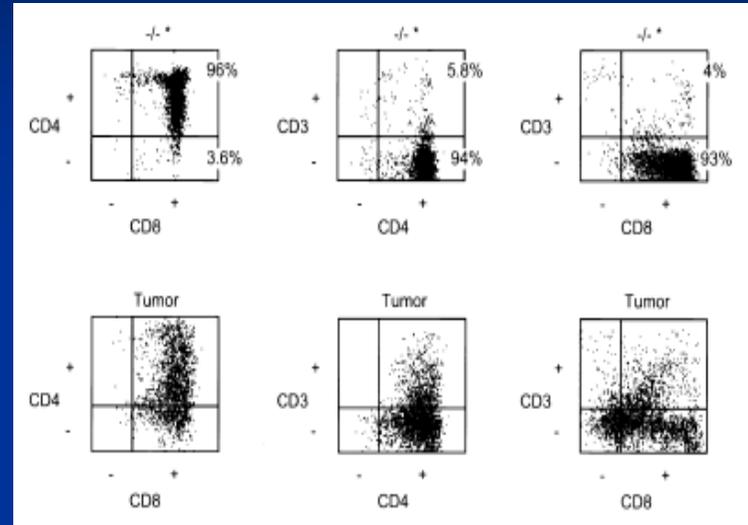


SVILUPPO DI LINFOMA TIMICO MALIGNO NEI TOPI MUTANTI

- Comparsa: tra i 2 e i 4 mesi di età proliferazione/crescita rapida e natura altamente aggressiva
- **causa morte:** compressione del cuore, dei polmoni e presenza di metastasi
- I topi mutanti che muoiono spontaneamente presentano tumori massivi.
- Analisi istologiche colorate con ematossilina-eosina indicano che i tumori primari consistono di cellule linfoblastiche monomorfe e con numerose figure mitotiche.



- Una linea cellulare è stata stabilizzata da uno di questi tumori, questa è IL-2 dipendente (t. replicazione 18-20 h)
- Analisi di citometria a flusso indicano che le cellule della linea tumorale sono: CD4+, CD8+, e CD5-, CD3-



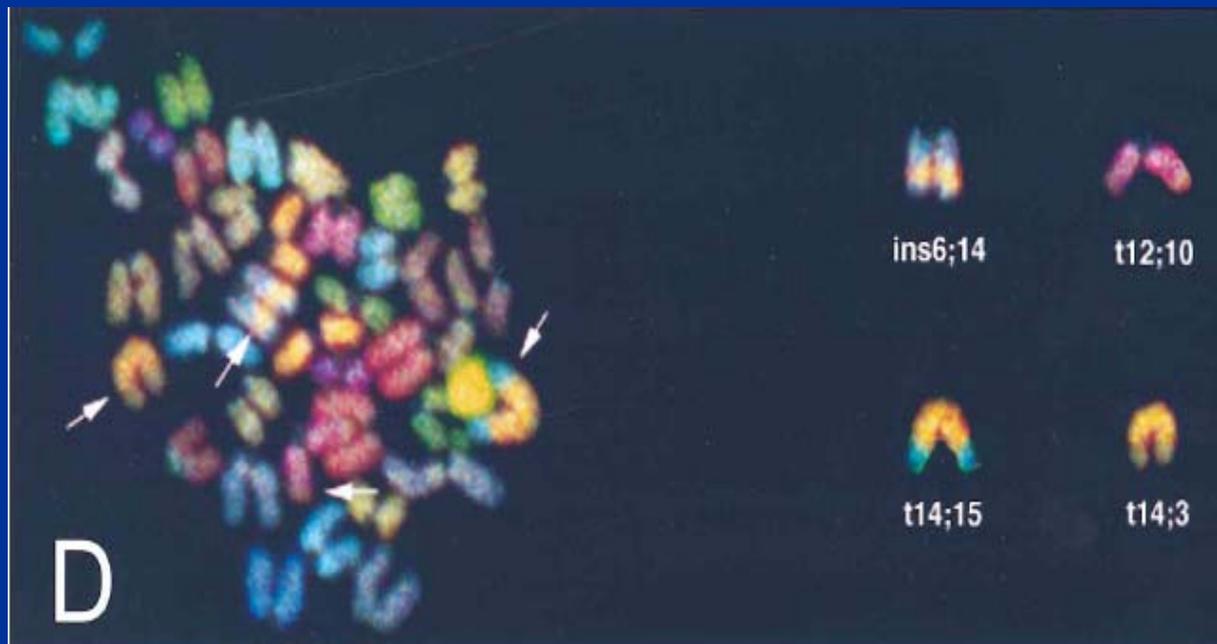
- Analisi su un topo $Atm^{-/-}$ apparentemente sano rivelano la presenza di una popolazione di cellule simili alle cellule tumorali, che probabilmente rappresentano cellule di un tumore precoce
- Queste cellule sono state trovate esclusivamente nel timo confermando l'origine timica del tumore che consiste di cellule T immature



I Topi *Atm*^{-/-} sviluppano neoplasie aggressive del timo, simili alle neoplasie linforeticolari nei pazienti con ATM.

Queste neoplasie negli uomini sono associate a riarrangiamenti cromosomici vicini ai geni del T-cell receptor.(TCR)

Nella linea cellulare derivata dal tumore di uno dei mutanti sono state riscontrate aberrazioni cromosomiche, come la t (14;13) vicina ai geni α/δ del TCR sul cromosoma 14, ins (6;14) vicino ai geni β TCR e i geni della catena leggera κ delle Ig, la t (12;10) vicina al gene della catena pesante delle Ig



- L'alto numero di aberrazioni cromosomiche riscontrate in queste cellule tumorali suggerisce un elevato grado di instabilità genomica nei soggetti affetti da ATM.
- Probabilmente i difetti della maturazione dei timociti, come dimostra la ↓ di linfociti T maturi CD4(+) o CD8(+) e ↑ di linfociti T immaturi CD4(+) e CD8(+), e le neoplasie timiche sono correlate, come risultato delle anomalie a carico del riparo delle rotture del DNA a doppio filamento (DSBs).
- Infatti la proteina Atm potrebbe partecipare al riparo del DSBs introdotti durante il riarrangiamento del gene del TCR durante la normale maturazione delle cellule T. Difetti in questo processo potrebbero portare all'incapacità dei timociti immaturi di sintetizzare un TCR attivo e completamente maturo.
- Inoltre l'iperproliferazione dei linfociti T immaturi per compensare lo scarso numero di cellule T mature e/o un anormale riparo di questi DSBs che potrebbe portare a traslocazioni e coinvolgere protooncogeni portano allo sviluppo di neoplasie maligne del timo.

Sensibilità alle radiazioni ionizzanti dei topi Atm -/-

- **ESPERIMENTO:** i topi WT, portatori eterozigoti ed omozigoti di 10 settimane sono stati irradiati con raggi γ :

DOSE 4 Gy (Gray): tutti gli eterozigoti e i WT sopravvivono per le 4 settimane di durata dell'esperimento senza mostrare alcuno stato patologico.

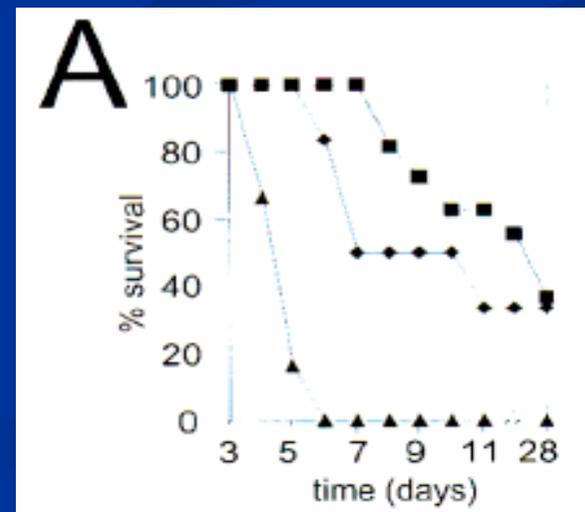
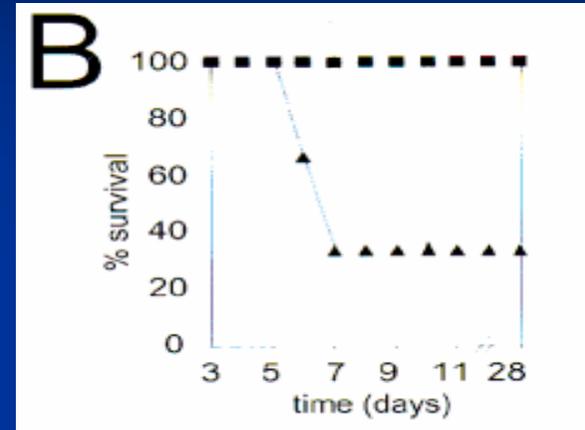
$\frac{2}{3}$ dei topi mutanti muoiono tra 5 e 7 giorni dopo l'irradiazione.

Gli altri non mostrano sintomi.

DOSE 8 Gy: $\frac{2}{3}$ degli eterozigoti e dei topi WT muoiono, molti immediatamente (a partire dal sesto giorno dopo irradiazione), altri muoiono più tardi (18g dopo l'irradiazione):

Questi topi mostrano un impoverimento di globuli bianchi nel midollo osseo e concomitanti infezioni.

Invece tutti i mutanti muoiono 3-5 giorni dopo l'irradiazione, mostrando un'evidente infiammazione del peritoneo e diarrea.



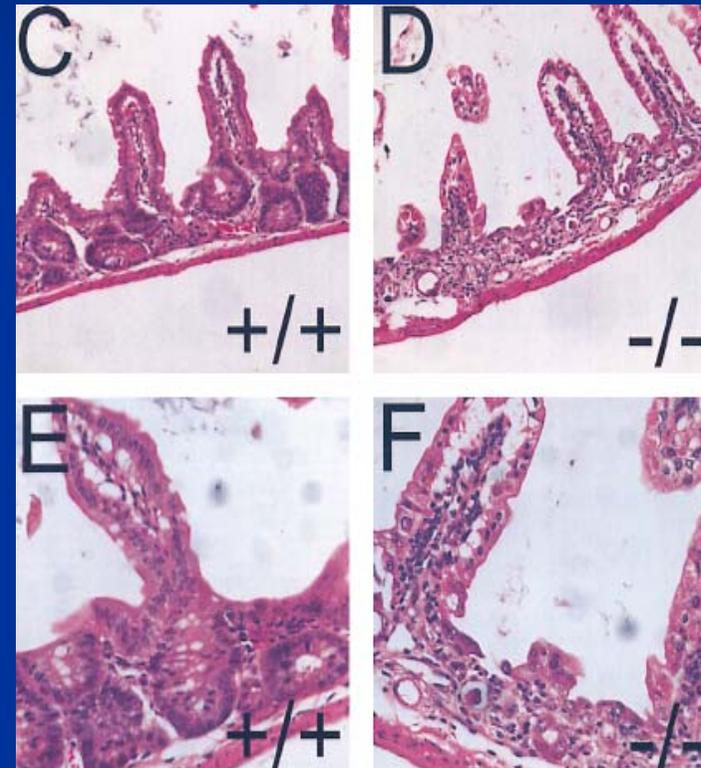
Per stabilire la causa della morte sono stati analizzati diversi tessuti; dopo aver irradiato i topi con una dose di 8 Gy:

- cervello, polmoni, cuore, pancreas, sembrano normali nei WT e nei mutanti omozigoti.
- timo, milza, linfonodi e midollo osseo (tessuti più sensibili alle radiazioni γ) erano impoveriti di cellule sia nei WT che negli omozigoti, sebbene i tessuti linfoidei dei mutanti contenevano leggermente più cellule → è improbabile che la maggiore sensibilità dei mutanti alle radiazioni sia dovuta agli effetti sulla funzione immune.
- La morte è invece dovuta all'effetto tossico delle radiazioni sul **tratto gastrointestinale**.

Tratto gastrointestinale

- **STOMACO** : mutanti e WT mostrano una degenerazione delle cellule, più severa nei mutanti a 2 giorni dall'irradiazione.

INTESTINO : WT a 2 e 4 giorni dall'irradiazione, mostrano una degenerazione dell'epitelio da minima a moderata. Gli effetti delle radiazioni sull'intestino dei mutanti sono invece molto più severi a 4 giorni dall'esposizione ai raggi γ , i villi intestinali appaiono smussati e accorciati e sono evidenti alcune aree dove le cripte sono completamente distrutte. Nei topi mutanti inoltre si nota un'aumentata sensibilità alle radiazioni delle ghiandole salivari.



- La morte nei topi *Atm* $-/-$ è dovuta quindi ai severi effetti tossici delle radiazioni su specifici tessuti, in particolare sul tratto gastrointestinale

Topi mutanti Atm- Δ SRI



Premesse scientifiche

- Circa il 20% dei pazienti AT esprimono la proteina Atm mutata
- Nessuno dei topi Atm ^{-/-} prodotti finora esprimeva la proteina Atm

Obiettivo

- **Generare un topo esprime la proteina Atm mutata, per Stabilire se la sua presenza influenzasse il fenotipo A-T**

- Generazione di una proteina priva di 3 amminoacidi (SRI; 2556-2558)

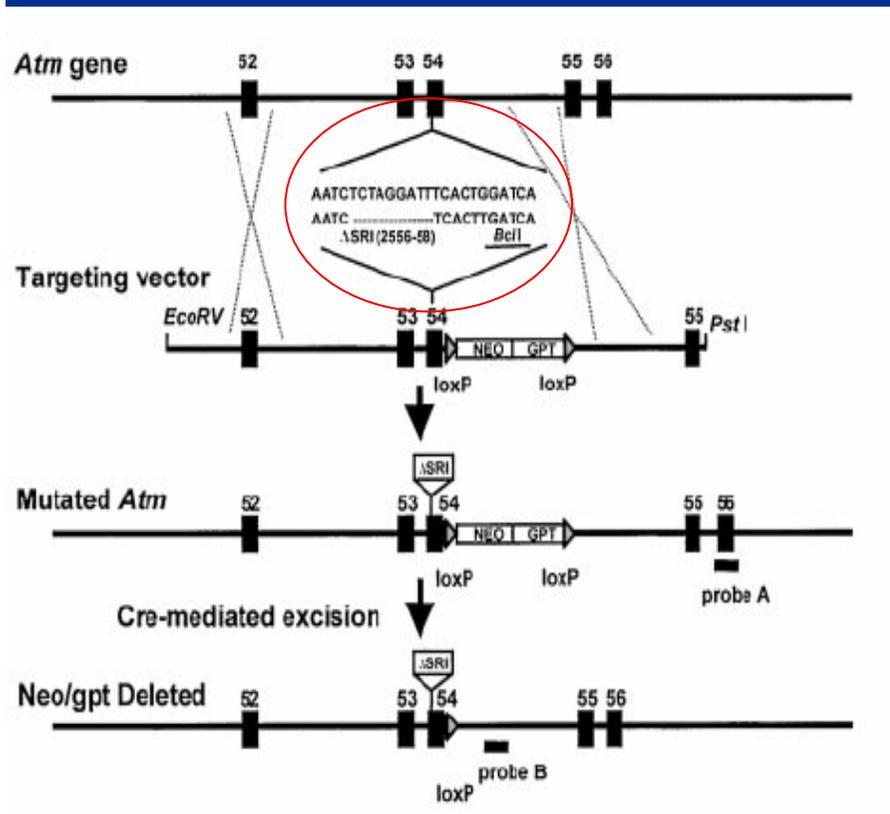


Atm- Δ SRI

- S= Serina
- R=Arginina
- I=Isoleucina

Strategia usata per introdurre la mutazione Δ SRI nel gene *Atm*

Delezione in frame di 9 nucleotidi (7666 del 9) nel gene *Atm*



1) inserzione di una cassetta contenente un gene marker selezionabile (*NEO*) fiancheggiata da 2 siti loxP nell'introne a valle dell'esone 54 contenente la delezione di 9 nucleotidi

2) topi chimerici generati da 2 cloni di cellule staminali embrionali (ES) 129Svj indipendenti sono stati incrociati con topi C57BL/6J per produrre *Atm*- Δ SRI eterozigoti

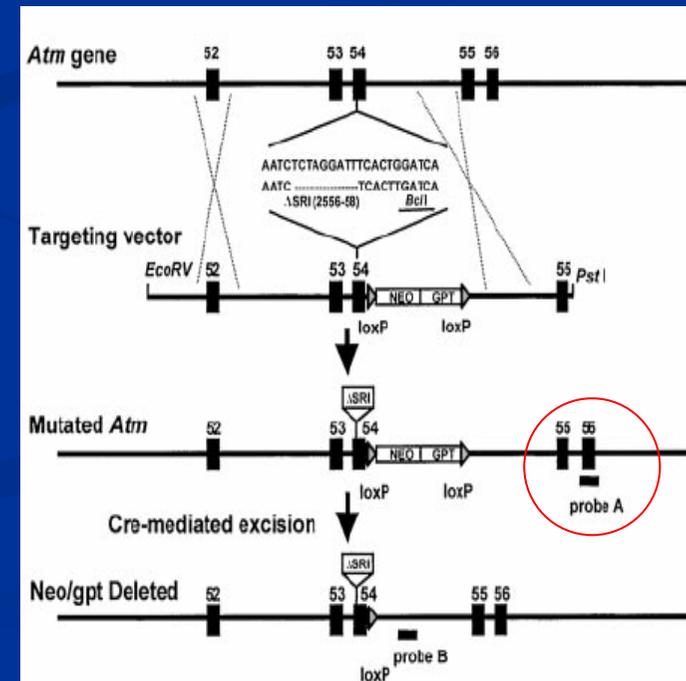
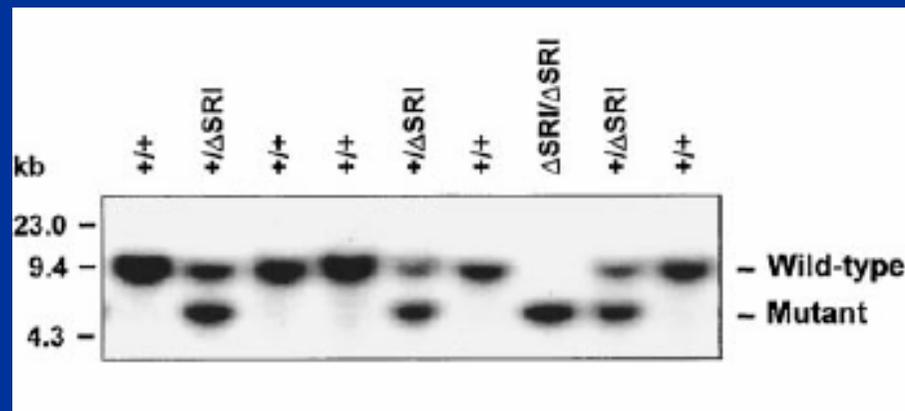
3) la cassetta loxP è stata rimossa tramite incrocio tra topi eterozigoti *Atm*- Δ SRI con un topo consanguineo esprime costitutivamente la ricombinasi Cre

Identificazione di topi omozigoti per *Atm*- Δ SRI

A) Analisi Southern-blot

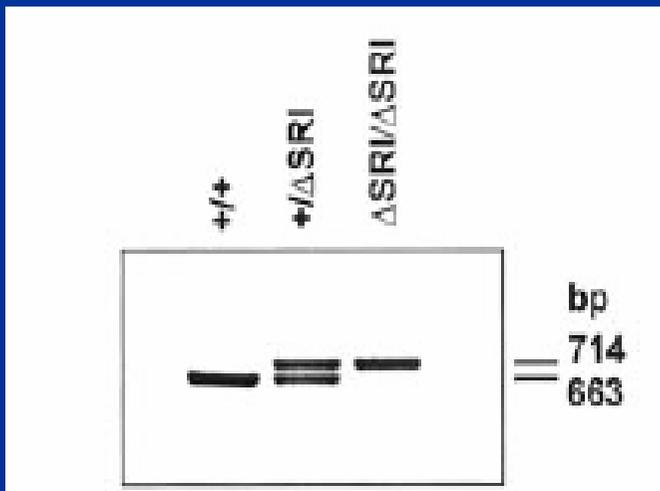
Su DNA estratto dalla punta della coda del topo

- Utilizzo della sonda A
- Il DNA genomico è stato digerito con *EcoRV*
- I frammenti identificati mediante l'utilizzo della sonda A sono:
9.2 kb per il wild-type e 5.9 kb per i mutanti

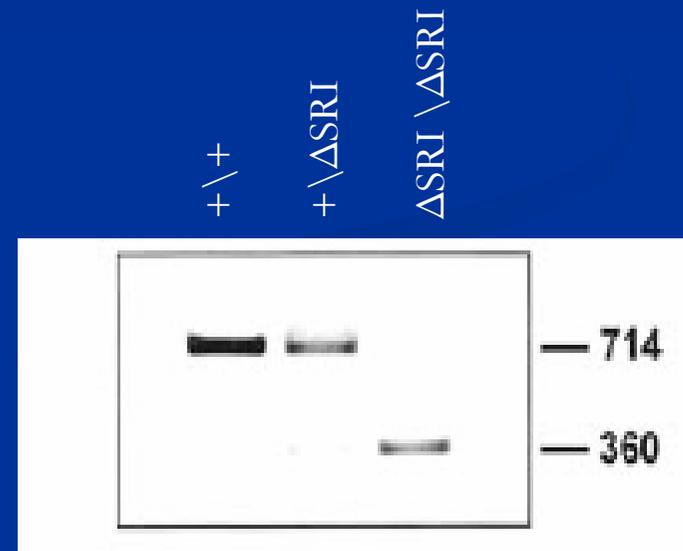
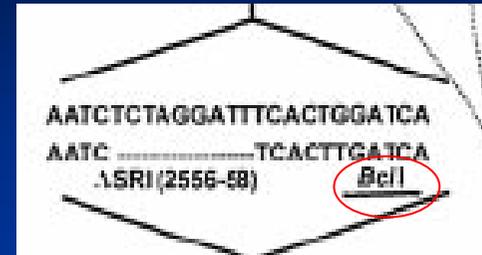


B) Analisi PCR

della regione contenente la mutazione da delezione e il sito *BclI*

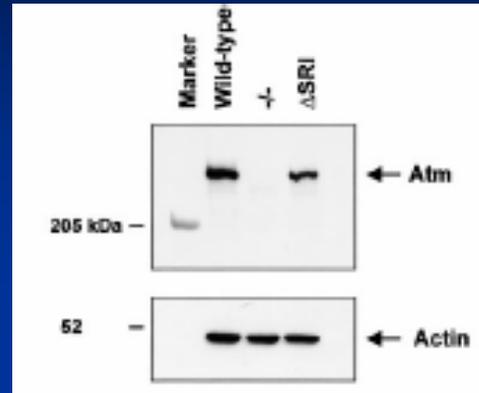


C) Digestione con *BclI*



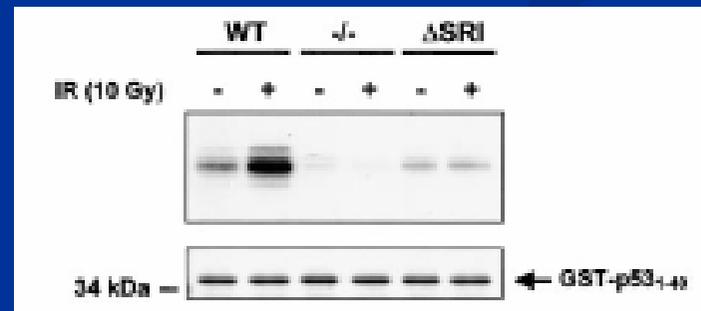
Analisi western blotting

L'analisi è stata condotta su estratti proteici ottenuti da cellule della milza, con un anticorpo anti Atm (MAT3)



Saggio di attività chinastica

•La corrispondente proteina umana mutata, caratterizzata nella linea AT1ABR, perde la capacità di fosforilare la serina15 di p53



L'analisi ha evidenziato un marcato aumento di attività chinastica negli estratti di cellule wild-type in seguito all'esposizione a radiazioni; solo un debole aumento nelle cellule **AtmΔSRI**

Sviluppo dei topi $Atm-\Delta SRI$

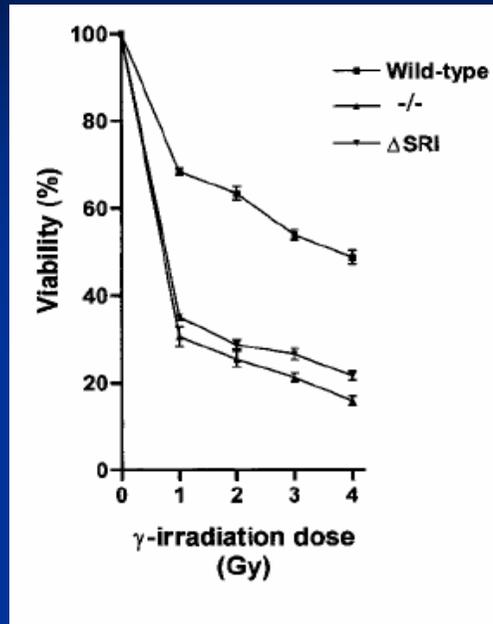
I topi $Atm-\Delta SRI$ mostravano un ritardo nello sviluppo

- ♂ (riduzione del 20%)
- ♀ (riduzione del 18%)



dalla nascita ai 45 giorni di età persistendo per tutta la vita adulta

Sensibilità alle radiazioni ionizzanti



La % di timociti vitali, cresciuti in un mezzo contenente IL-2 per 24h, prima dell'esposizione a radiazioni (48h), era maggiore nei wild-type rispetto ai timociti dei topi Atm - Δ SRI e Atm ^{-/-}.

Cell	Number of Aberrations			
	sb	cb	int	ICA/metaphase
WT (50) ^a	45	0	0	0.9
-/- (25)	62	0	1	2.81
Δ SRI (50)	135	0	4	2.78

Il numero di aberrazioni indotte nei cromosomi, in seguito a radiazioni era approssimativamente = a 1 nei timociti wild-type; Nei topi Atm - Δ SRI e Atm ^{-/-} risultava triplicato

Anomalie neurologiche

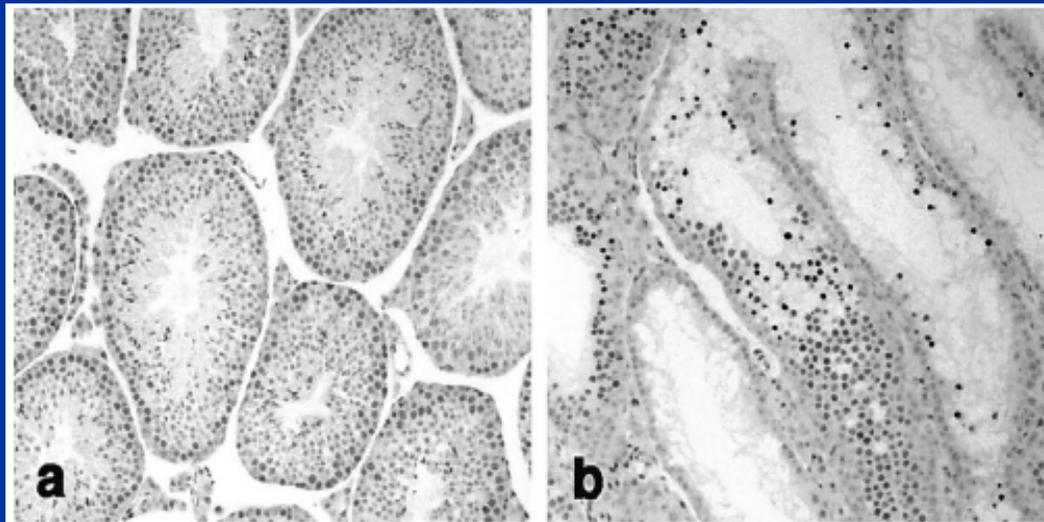


- **topi $Atm^{-/-}$** : neurodegenerazione non è presente ad eccezione di due casi in cui, al microscopio elettronico, era evidente la degenerazione di differenti tipi di neuroni, nella corteccia cerebellare e l'anormale differenziazione delle cellule di purkinje.
- **$Atm-\Delta SRI$** : 2-16 mesi di età non c'era la manifestazione di neurodegenerazione o differenziazione delle cellule di purkinje.

ANOMALIE DELL'APPARATO RIPRODUTTIVO

- Topi $Atm^{-/-}$ e $Atm-\Delta SRI$ presentavano anomalie dei testicoli e perdita della spermatogenesi
- **Tubuli seminiferi:** topi wild-type non furono osservate anomalie
- topi $Atm-\Delta SRI$ erano distrutti con degenerazione degli spermatociti e perdita di spermatidi

Wild-Type



Atm- ΔSRI

- **ovogenesi:** Topi $Atm-\Delta SRI$ era interrotta con mancata maturazione di follicoli e ovociti

Anomalie immunologiche nei topi $Atm-\Delta SRI$

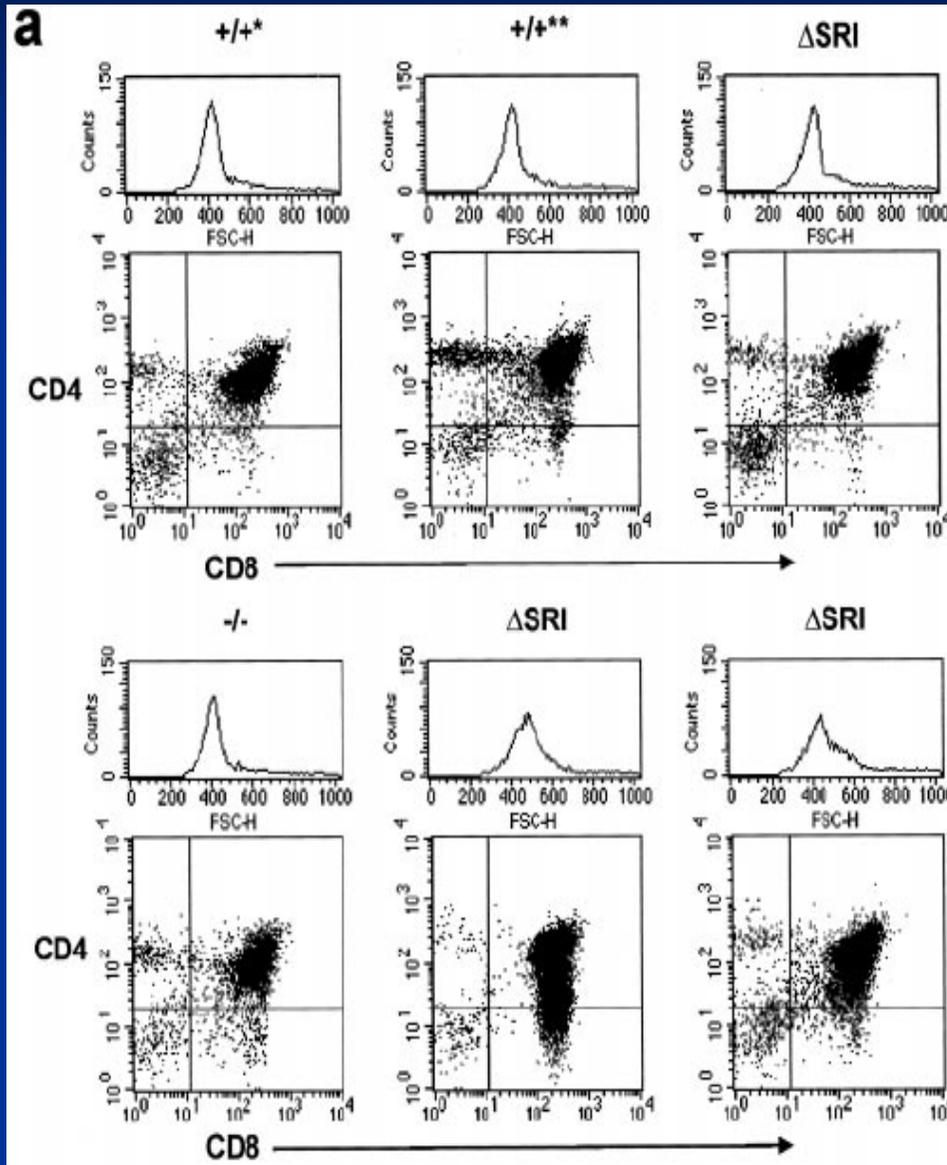
caratterizzazione delle cellule T:

analisi di cellule modello del timo e del linfonodo inguinale tramite citometria a flusso nei topi

$Atm-\Delta SRI$, wild-type e $Atm^{-/-}$ (7-12 settimane)

- I topi $Atm-\Delta SRI$ e $Atm^{-/-}$ hanno : timo milza e linfonodi più piccoli e un numero 10 volte minore di timociti rispetto ai wild-type
- Nel timo di topi $Atm^{-/-}$ e $Atm-\Delta SRI$ riduzione del 30-50% nel numero totale di timociti che esprimevano $\alpha/\beta TCR$ e $CD3$

Analisi di 8 topi Atm- Δ SRI di 12 settimane



- 3 di questi topi mostravano un significativo aumento della grandezza delle cellule, come si poteva vedere dalle analisi scatter, e apparente accumulo random di

CD4⁻/Low CD8⁻/Low (60%)
CD8⁺ (39%) CD4⁺ (64%)
popolazioni SP.

- Linfonodi dei topi *Atm*^{-/-} contengono solo il 50% dei linfociti, esprimendo o CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺ e CD62L o CD44
- Sulla base dell'associazione di bassa espressione di CD3, CD62L e CD44, i linfonodi di *Atm* sembrano consistere principalmente di cellule T al primo stadio di sviluppo

Durata della vita

In uno stato non SPF (stato non libero da patogeni) i topi $Atm^{-/-}$:

- sviluppano linfoma al Timo
- muoiono dopo 2-5 mesi di vita

I topi $Atm-\Delta SRI$ vivevano molto di più, infatti morivano

- Dei topi $Atm^{-/-}$ 100%
- Dei topi $Atm-\Delta SRI$ 50%

Quasi il 30% dei topi $Atm-\Delta SRI$ era sopravvissuto dopo i 16 mesi

La differenza nella sopravvivenza di questi topi non era attribuibile al background genetico poiché entrambi erano di misto quadro genetico:

- a) C57BL/6J incrociati con 129SvJ per $Atm-\Delta SRI$
- b) C57BL/6J incrociati con 129SvEv per $Atm^{-/-}$.

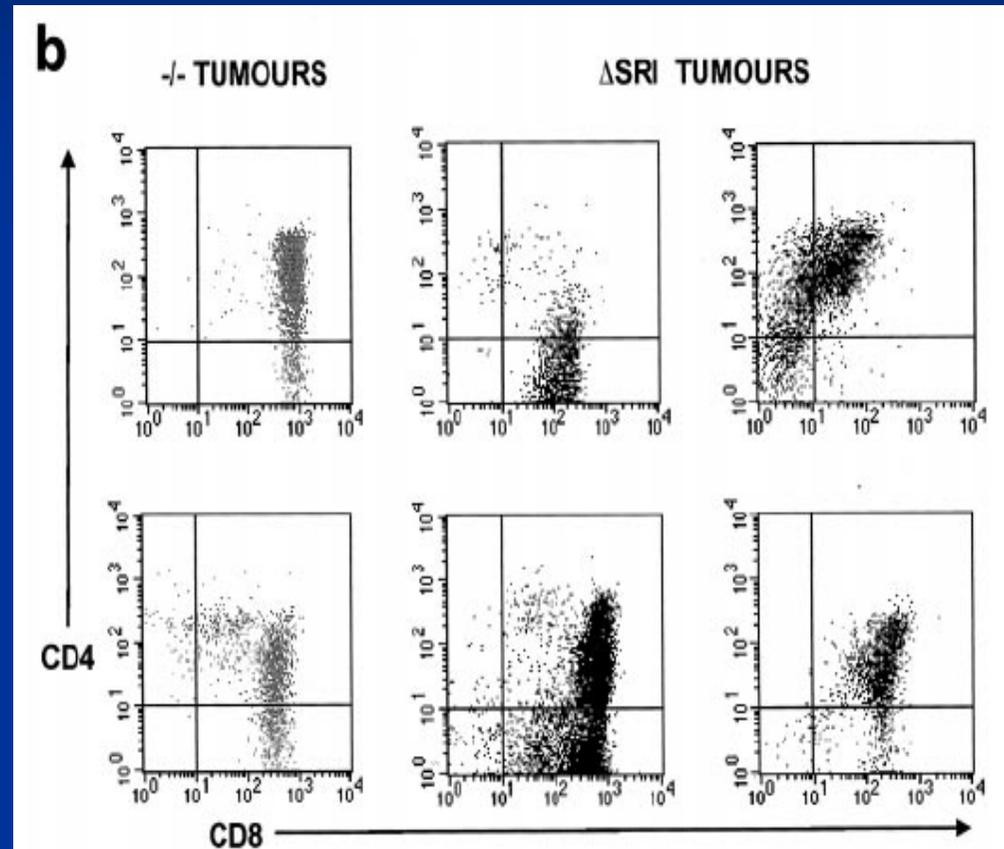


- Topi $Atm^{-/-}$ ΔSRI presentavano due periodi di suscettibilità al tumore:
 - a) un periodo iniziale fino a 10 mesi dove gli animali sviluppano i linfomi del timo (morti 19 su 43 (44%) a 14 mesi di età).
 - b) un periodo tardivo per i sopravvissuti di tumorigenesi con distinti tumori (tumore alla milza, all'ovaio e alle cellule B con evidenze di metastasi) che può essere spiegato mediante lo sviluppo di tumori correlati all'età.
- nei topi $Atm^{-/-}$ non sono stati rilevati tumori alle cellule B né evidenze di metastasi
- Non sono stati osservati tumori nei controlli wild-type

Linfoma timico

Analisi fenotipiche

- fenotipo $Atm^{-/-}$ caratterizzato principalmente da CD4⁺ CD8⁺ cellule DP e basso CD3
- fenotipo $Atm-\Delta SRI$ diversi, riflettendo la grande eterogeneità delle popolazioni DP e SP delle cellule T viste nel timo di questi animali che potrebbero rappresentare tumori policlonali.

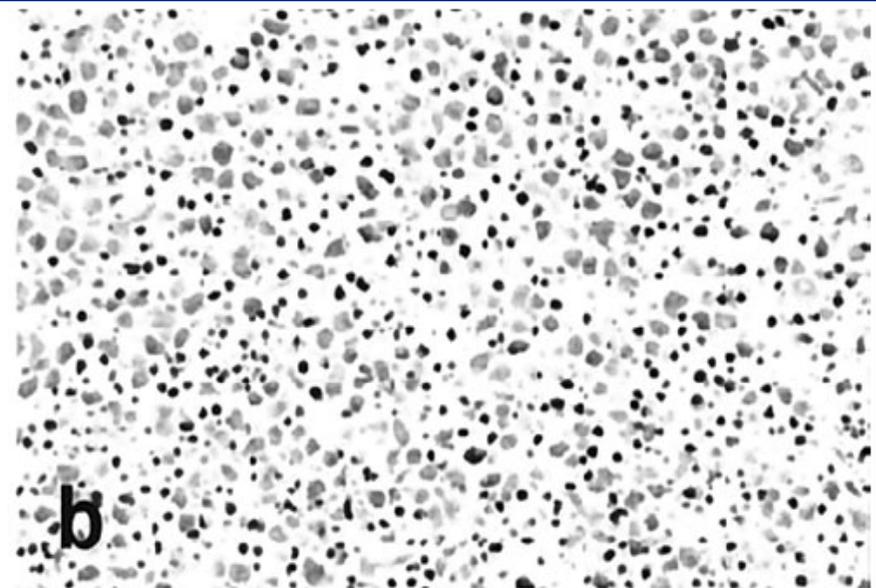
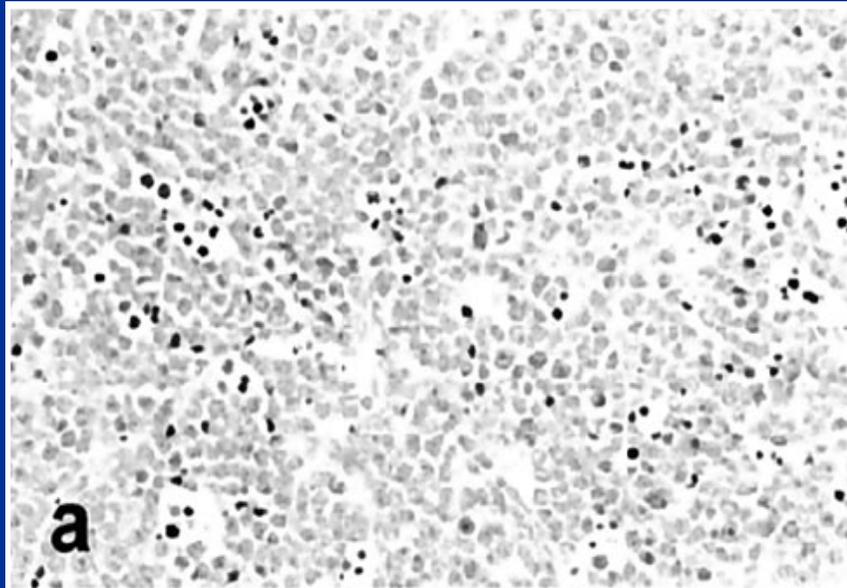


Esame morfologico

- Il tessuto a livello del linfonodo timico di topi *Atm-ΔSRI* (>3 mesi) era più spugnoso e le cellule erano più piccole e formavano degli aggregati più stretti rispetto ai topi *Atm^{-/-}*.

Esame istologico

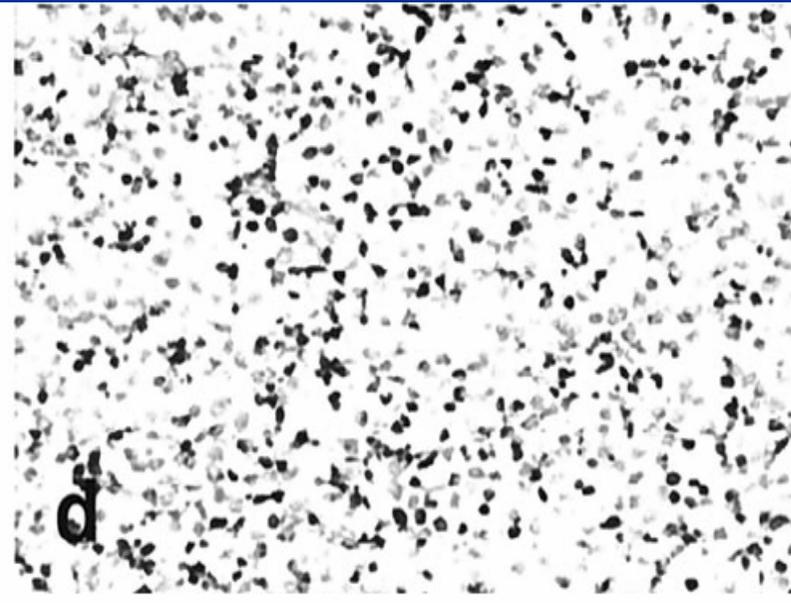
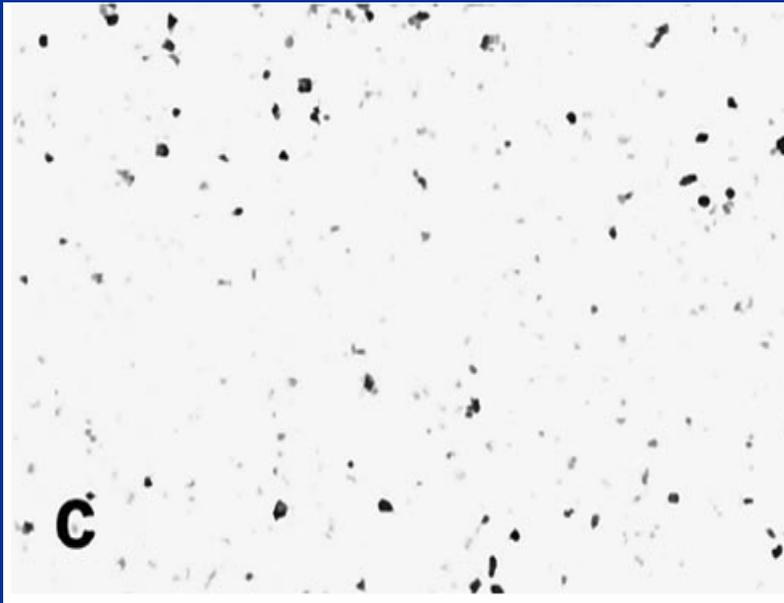
Nei topi $Atm-\Delta SRI$ (fig.b) c'era un significativo aumento di cellule che sembrava avessero apoptosi spontanea basata su frammentazione nucleare, rispetto ai topi $Atm-/-$ (fig.a)



La conferma che queste cellule erano apoptotiche è stata ottenuta tramite colorazione ISEL (fig.c e d)

positive all' AnnessinaV :

- ~ 50% delle cellule *Atm*- Δ SRI (d)
- ~ 15% *Atm*^{-/-} (c)



Analisi citometrica di Fas e FasL

Table 1 Flow cytometric analysis of Fas and FasL in *Atm*^{-/-} and *Atm*-ΔSRI thymic lymphoma

Tissue and genotype ^a	Fas	FasL
Thymus		
Wild-type	90.6 ± 0.8 ^b	3.0 ± 0.6
<i>Atm</i> ^{-/-}	62.7 ± 2.4	2.8 ± 1.2
<i>Atm</i> -ΔSRI	54.8 ± 4.5	2.2 ± 0.4
Thymic lymphoma		
<i>Atm</i> ^{-/-}	60.8 ± 7.7	7.5 ± 1.5
<i>Atm</i> -ΔSRI	57.8 ± 10.8	30.7 ± 0.9

^a *n* = ≥5 mice in each group.

^b Percentage of total thymocytes ± SE.

La down-regulation del recettore Fas (Fas/CD95) era evidente sia nei topi *Atm*-ΔSRI che in quelli *Atm*^{-/-} con il 30-40% di cellule Fas positive in meno rispetto al wild-type.

L'espressione di Fas L risultava

- approssimativamente la stessa nei timociti dei topi wild-type e nei topi mutanti.
- C'era un piccolo aumento nei linfomi timici dei topi *Atm*^{-/-}.
- C'era un aumento di circa 14 volte nei linfomi timici dei topi *Atm*-ΔSRI
- Questo è in accordo con l'aumento di superficie apoptotica riscontrata nei linfomi timici nei topi *Atm*-ΔSRI rispetto a quelli *Atm*^{-/-}.

Analisi della funzionalità di fas-L nei tumori *Atm- Δ SRI*

- L'incubazione delle cellule con linfoma timico con cellule AT1ABR, una linea linfoblastoide di un paziente A-T, contenente la stessa mutazione dei topi *Atm- Δ SRI*, ha rivelato la presenza di una elevata espressione di Fas.
- In rapporto di 3:1 linfoma:cellule target la vitalità di AT1ABR era ridotta dell'80% dopo 12h di incubazione, dimostrando che Fas-L up.regolato era attivo nel processo apoptotico osservato nei tumori *Atm- Δ SRI*.

CONCLUSIONE



Il topo $Atm-\Delta SRI$ rappresenta un modello che esprime una proteina mutante a differenza dei topi $Atm^{-/-}$ che non esprimevano la proteina a causa della natura della distruzione del gene.



- il gene ATM è coinvolto nell' appropriato funzionamento di una varietà di cellule post-mitotiche, mitotiche e meiotiche, come in processi fondamentali quali il riparo delle rotture a doppio filamento del DNA (DSB), la ricombinazione meiotica e il controllo del ciclo cellulare.
- L'analisi dei topi *Atm*^{-/-} e *Atm*- Δ SRI e la comparazione del loro fenotipo con quello dei soggetti affetti da AT, suggerisce una cornice di lettura per capire la relazione tra questi diversi processi.
- Questi topi costituiscono quindi un eccellente modello per capire il ruolo di ATM sia nella normale funzione cellulare che nella patologia e per testare potenziali agenti terapeutici per trattare le progressive e debilitanti manifestazioni dell'AT.