

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE (DEB)

Corso di Dottorato di Ricerca in

GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE - xxv Ciclo

RUOLO DELLA PROTEINA CSB NEI MECCANISMI DI NEUROGENESI ADULTA E NEUROPROTEZIONE

s.s.d: BIO/11

Tesi di dottorato di:

Dott. FLAVIA CIAFFARDINI

Coordinatore del corso

Prof. Giorgio Prantera

Tutore

Dott. Luca Proietti De Santis

ABSTRACT

(inglese)

Cockayne syndrome (CS) is a progressive developmental and neurodegenerative disorder that results in premature death during childhood. Most of the patients are mutated in the CSB gene. Although the genetic basis has been established for this disease, the precise molecular cause for neurodegeneration is not entirely clear. The present study was designed to verify whether or not CSB plays a critical role in survival, self-renewal and differentiation capabilities of neural stem/progenitor cells under normal and hypoxic conditions. Our innovative approach makes use of human neural progenitor cell system that is endowed with efficient self-renewal and multi-lineage differentiation capabilities. First we demonstrated that CSB knockdown in neural stem cell showed a dramatic reduction in survival and self-renewal capabilities, a feature which appears to be particularly enhanced under hypoxic condition. Further, CSB knockdown also dramatically reduced the differentiation potential of neural stem/progenitor cells. Along this line, neurite outgrowth, which is a characteristic feature of differentiating neurons, was dramatically affected in CSB silenced cells. Interestingly, CSB protein which is induced during neural differentiation, appear to play a double role during neuronal differentiation: in the nucleus it modulates the transcriptional programs that govern survival and differentiation of neural stem cells, second, in the cytoplasm it participates in the mechanism that orchestrate neurite outgrowth and retrograde axonal transport. Collectively, though currently in progress, this study suggests that CSB is a critical factor for protecting the functional integrity of neural stem/progenitor cells in self-renewal and differentiation processes.

ABSTRACT

(italiano)

La sindrome di Cockayne (CS) è una malattia progressiva dello sviluppo e neurodegenerativa che provoca la morte prematura durante l'infanzia. La maggior parte dei pazienti presentano mutazioni a carico del gene CSB. Anche se le basi genetiche della malattia sono state stabilite, le precise cause molecolari della neurodegenerazione non sono ancora del tutto chiare. Il presente studio è stato progettato per verificare se CSB svolge un ruolo critico nella capacità di sopravvivenza, self-renewal e differenziamento delle cellule staminali/progenitrici neurali in condizioni normali e in ipossia. Il nostro approccio innovativo si avvale di un sistema di cellule progenitrici neurali umane che sono dotate di efficienti capacità di self-renewal e differenziamento. In primo luogo abbiamo dimostrato che il knockdown della proteina CSB nelle cellule staminali neurali comporta una drastica riduzione delle capacità di sopravvivenza e di auto-rinnovamento, riduzione che sembra essere particolarmente aggravata in condizioni di ipossia. Inoltre, il knockdown di CSB riduce notevolmente anche il potenziale di differenziamento delle

cellule staminali/progenitrici neurali. In quest'ottica, l'accrescimento dei neuriti, che è una importante caratteristica del differenziamento dei neuroni, è risultata profondamente colpita nelle cellule silenziate per CSB. È interessante notare, che la proteina CSB, che viene indotta durante il differenziamento neuronale, sembra giocare un doppio ruolo durante il differenziamento neuronale: nel nucleo modula i programmi trascrizionali che regolano la sopravvivenza e il differenziamento delle cellule staminali neuronali, nel citoplasma partecipa al meccanismo che dirige la crescita dei neuriti e il trasporto assonale retrogrado. Nel complesso, anche se attualmente in corso, questo studio suggerisce che CSB è un fattore critico per la protezione dell'integrità funzionale della cellule staminali/progenitrici neurali nei processi di self-renewal e di differenziamento

INDICE

INTRODUZIONE	3
1. Sindrome di Cockayne - aspetti molecolari	3
1.1. L'invecchiamento e la sindrome di Cockayne	3
1.1.1. Manifestazioni cliniche	3
1.1.2. Panoramica delle mutazioni geniche	7
1.1.3. Geni coinvolti nel processo di riparazione per escissione di nucleotidi (NER)	14
1.1.4. Ruolo della proteina CSB nel processo di riparazione accoppiata alla trascrizione (TCR)	20
1.1.5. Risposta trascrizionale in assenza e in presenza di danno al DNA	28
1.1.6. Ruolo della proteina CSB nella riparazione del danno ossidativo	36
1.1.7. Interattori noti di CSB	41
1.1.8. Ruolo di CSB nella risposta apoptotica	44
1.1.9. CSB come mediatore della risposta all'ipossia	61
1.2. DNA e disturbi neurologici: le teorie	66
1.2.1. Modello classico: accumulo di danno al DNA e morte neuronale	66
1.2.2. Modello del fallimento trascrizionale	67
1.2.3. Modello infiammatori	69
SCOPO DEL LAVORO	
2. Ruolo di CSB nella neuropatia in Cockayne	71
2.1 Difetti neurologici	71
2.1.1 Aspetti macroscopici	72
2.1.2 Aspetti microscopici	
2.2 Obiettivi e modelli sperimentali	77
2.2.1 Obiettivo del lavoro	77
2.2.2 Limiti di alcuni modelli e nostro nuovo modello di studio	78
LAVORO SPERIMENTALE	
3. Sistema cellulare e differenziamento	85
3.1 Silenziamento genico e generazione di due linee di progenitori neuronali	85
3.2 Differenziamento	87
4. Risultati	88
4.1. Livelli di espressione del gene csb e tasso di proliferazione cellulare	88
4.2. Validità del modello	90

4.3. Differenziamento – osservazioni morfologiche	92
4.4. Differenziamento – immunofluorescenza indiretta	95
4.5. Differenziamento – espressione della proteina MAP2	102
4.6. Induzione di CSB durante il differenziamento	106
4.7. Interattori di CSB ed esperimenti di ChIP (<i>Chromatin ImmunoPrecipitation</i>)	110
4.8. Differenziamento in condizioni di ipossia	114
5. Discussione	118
6. Materiali e Metodi	129
6.1. Colture cellulari	129
6.1.1. Matrice extracellulare (<i>coating</i>)	129
6.1.2. Terreno di crescita	129
6.2. Silenziamento genico mediante RNA interfering	130
6.3. Procedura di fissaggio per l'immunofluorescenza	130
6.4. Western Blotting	131
6.5. RT-PCR	133
6.6. ChIP	133
7. Bibliografia	134

INTRODUZIONE

1 SINDROME DI COCKAYNE – ASPETTI MOLECOLARI

1.1. L'INVECCHIAMENTO E LA SINDROME DI COCKAYNE

L'instabilità genomica è una componente importante del processo di invecchiamento nei sistemi eucariotici e la maggior parte delle malattie progeroidi umane sono legate a difetti nel mantenimento dell'integrità del genoma. Un'alterazione del processo di trascrizione genica sembra essere alla base della patogenesi di molte sindromi progeroidi e si ritiene che abbia un ruolo chiave nel sostenere il processo di invecchiamento. Spesso queste malattie sono dovute a mutazioni a carico di un singolo gene, come nella Sindrome di Cockayne che è una malattia genetica in cui la maggior parte dei casi presenta una mutazione nel solo gene ERCC6 che codifica per la proteina CSB. La sindrome di Cockayne (CS) può essere descritta come una malattia caratterizzata dall'alterazione della trascrizione e della riparazione del DNA. Essa appartiene alla famiglia delle malattie legate a un difetto nel processo di riparazione per escissione di nucleotide (*Nucleotide excision repair* NER), insieme con lo Xeroderma Pigmentoso (XP) e la Tricotiodistrofia (TTD); le cellule CS, nello specifico, mostrano un difetto nel processo di riparazione del DNA associato alla trascrizione (*Transcription Coupled Repair*), un sottotipo di NER (TC-NER o TCR), che è legato al macchinario base della trascrizione e bersaglia di preferenza le lesioni che inducono distorsioni alla doppia elica del DNA nei geni trascrizionalmente attivi.

1.1.1 Manifestazioni Cliniche

La Sindrome di Cockayne è una malattia genetica rara con ereditarietà autosomica recessiva che colpisce 1 individuo ogni 100.000 e insorge alla nascita e nella prima infanzia. L'aspettativa di vita del paziente Cockayne è di circa 12 anni. La sindrome di Cockayne è stata classificata come sindrome da invecchiamento precoce di tipo segmentale per quei tratti che ricordano il normale processo di invecchiamento come la mancata crescita sistemica e la progressiva degenerazione neurologica. Anche se per un primo riconoscimento della malattia sono richiesti i segni di una cattiva crescita fisica e di anomalie in ambito neurologico, i pazienti Cockayne manifestano fenotipi molto variabili rispetto ad età di insorgenza dei disturbi, tipologia e severità dei sintomi.

Sulla base di aspetti fenotipici diversi ed una serie di parametri specifici analizzati dai ricercatori Nance e Barry in un noto lavoro del 1992 in cui venivano passati in rassegna circa 140 casi, vengono generalmente distinti tre tipi di malattia: il tipo I è la forma classica meglio nota e più diffusa della sindrome, in cui i primi sintomi compaiono alla fine del primo anno di vita del bambino e la morte sopraggiunge prima della fine della seconda decade (a circa 12-14 anni); il tipo II è una variante poco frequente e più severa anche definita congenita, caratterizzata da insorgenza alla nascita e rapida progressione dei sintomi con aspettativa di vita notevolmente abbassata; il tipo III è una forma atipica, a insorgenza tardiva e prolungata sopravvivenza dei pazienti [1]. In questo stesso lavoro i ricercatori suggerivano che per la diagnosi clinica della forma classica della malattia, è richiesta l'individuazione del ritardo della crescita e del ritardo nello sviluppo neurologico accompagnati da almeno tre delle seguenti anomalie: retinopatia o cataratta, perdita uditiva, carie dentali, fotosensibilità e il caratteristico aspetto del volto. Data la natura multisistemica della sindrome di Cockayne, essa presenta manifestazioni cliniche diverse, primo fra tutti un severo deterioramento nello sviluppo fisico con conseguente ritardo nella crescita. La mancata crescita si riscontra sia in altezza che in peso, con la componente in peso maggiormente colpita, da cui deriva il tipico nanismo cachettico. La manifestazione clinica più caratteristica dei pazienti affetti dalla sindrome di Cockayne è la pronunciata fotosensibilità cutanea che si manifesta come un' insolita elevata sensibilità alla componente ultravioletta (UV) della luce solare, con conseguenti anomalie nella pigmentazione corporea con zone ipo- o iperpigmentate, dermatiti esfoliative, eritemi e atrofia diffusa della pelle esposta al sole. E' interessante notare che questo aspetto non risulta essere associato ad un aumento della predisposizione al cancro della pelle, come sarebbe lecito aspettarsi.

La riduzione del pannicolo adiposo sottocutaneo che si osserva di frequente, contribuisce a determinare il caratteristico aspetto del viso dei pazienti Cockayne, spesso definito come "faccia da uccello" in cui si nota: enoftalmo, ossia occhi infossati nel bulbo oculare, naso aquilino e bocca stretta. I pazienti con CS inoltre presentano carie dentarie e anomalie di tipo scheletrico come la cifosi [2].

Fenotipo cellulare

Le caratteristiche principali della malattia sono la fotosensibilità cutanea alla componente ultravioletta della luce solare, l'assenza del rischio di insorgenza del cancro alla pelle e le gravi anomalie neurologiche con decorso progressivo. Attualmente non esistono cure specifiche per la

malattia e i trattamenti palliativi sono finalizzati ad alleviare la sintomatologia. Sull'elevata sensibilità alla radiazione ultravioletta che definisce anche il fenotipo cellulare si basano i due principali test clinici impiegati per la diagnosi prenatale della malattia. Le cellule fetali vengono irradiate con una dose di raggi UV e poi vengono misurate la sopravvivenza cellulare e un parametro relativo il tasso di recupero della sintesi dell' RNA che è stata bloccata al momento dell'irradiazione a causa delle lesioni indotte dalla radiazione. Infatti la sindrome di Cockayne appartiene al gruppo delle malattie dovute al difetto nel processo di riparazione dei danni indotti al DNA mediante una specifica sottovia di riparazione che la riparazione accoppiata alla trascrizione (*TCR Transcription Coupled Repair*). Questo processo ripara i danni nelle regioni di DNA trascrizionalmente attive. Pertanto le cellule CS in seguito al trattamento con i raggi UV mostrano ridotti tassi di sopravvivenza, mancato recupero della sintesi di DNA e ridotta capacità di rimuovere le principali fotolesioni indotte come i dimeri di pirimidina dai geni trascrizionalmente attivi rispetto alle cellule normali. A livello cellulare diversi studi iniziali condotti su linee di fibroblasti derivate da pazienti Cockayne, mostravano la caratteristica ipersensibilità delle cellule agli effetti letali e mutagenici delle radiazioni ultraviolette. In questi primi lavori veniva misurata l'efficienza di formazione delle colonie *in vitro* (come rapporto tra numero di colonie formate e numero di cellule depositate sulla piastra da coltura) in seguito all'irradiazione. La capacità di formare colonie in seguito alla somministrazione di dosi diverse di raggi UV (*Post-UV CFA Colony forming ability*), calcolata come rapporto tra l'efficienza di formazione delle colonie di cellule irradiate e quella delle cellule non irradiate, si mostrava significativamente ridotta nelle cellule Cockayne rispetto ai controlli [3]. Nonostante fosse noto che nello Xeroderma Pigmentoso l'ipersensibilità alla luce solare dipende da un difetto nel processo di rimozione dei danni da raggi UV mediante la via di riparo per escissione di nucleotide, i primi studi non furono in grado di dimostrare un difetto simile nelle cellule CS riguardo ai processi di riparazione nella replicazione, incisione e rimozione dei dimeri di pirimidina dal genoma nel complesso. Tuttavia, i dati riguardanti la riduzione del tasso di sopravvivenza cellulare, l'aumento nell'accumulo di scambi tra cromatidi fratelli, SCE (*sister chromatid exchanges*) e l'elevata mutabilità delle cellule CS suggerivano chiaramente l'ipotesi che anche in questa malattia fosse presente un difetto nel meccanismo di riparazione del DNA.

Seguirono diversi lavori che associavano la sensibilità ai raggi UV con l'incapacità delle cellule CS irradiate di recuperare la sintesi del DNA e riportarla a livelli simili a quelli delle cellule non irradiate, diverse ore dopo la somministrazione della radiazione. In una fase iniziale subito dopo il

trattamento con raggi UV, sia nelle cellule normali che in quelle CS, si osservava una riduzione della sintesi di DNA, misurata esaminando il tasso di incorporazione della [³H]timidina nel DNA a diversi tempi dall'irradiazione. Mentre nelle cellule normali, circa 5-8 ore dopo la caduta iniziale, si osservava il completo recupero del processo di sintesi del DNA, questo non avveniva nelle cellule CS [4][5]. Per verificare se il prodotto del gene CS fosse coinvolto nel solo processo di recupero dei livelli di sintesi del DNA dopo irradiazione e se il mancato ripristino osservato costituisse il difetto primario delle cellule CS o una manifestazione secondaria di qualche altro difetto primario, pochi anni dopo, lo stesso gruppo di ricercatori condusse esperimenti simili per valutare gli effetti della radiazione ultravioletta su cellule in fase stazionaria. Una volta osservato che nelle cellule CS in fase stazionaria, in cui non viene sintetizzato il DNA dopo irradiazione, si manifestava comunque la medesima risposta data da una significativa riduzione del tasso di sopravvivenza cellulare, si concluse che l'ipersensibilità ai raggi UV delle cellule CS non richiedeva la replicazione del DNA per esprimersi. In altre parole, i risultati ottenuti con le cellule in fase stazionaria dimostravano che il mancato recupero della sintesi di DNA nelle cellule CS in attiva proliferazione non poteva costituire il difetto primario di queste cellule. Per avallare tale ipotesi si decise di passare all'analisi del processo di recupero della sintesi dell'RNA, che avviene sia nelle cellule in attiva divisione che nelle cellule in fase stazionaria. I livelli di sintesi dell'RNA venivano misurati nelle cellule CS e in quelle normali, sia in attiva proliferazione che in fase stazionaria, in base al tasso di incorporazione dell' [³H]uridina, come rapporto tra il tasso di incorporazione del nucleotide marcato nelle cellule irradiate e in quelle non irradiate. In condizioni di attiva proliferazione, nelle cellule normali, subito dopo l'irradiazione con i raggi UV, il tasso di sintesi dell'RNA subiva una riduzione di circa il 35-40% rispetto a quello delle cellule non irradiate, e nelle successive 3 ore il livello di sintesi dell'RNA veniva recuperato completamente. Al contrario, nelle cellule CS dopo una riduzione iniziale del tutto simile a quella delle cellule normali, tale recupero non si osservava. In fase stazionaria, in seguito al trattamento con raggi UV, nelle cellule normali si osservava un crollo dei livelli di sintesi dell'RNA non diverso da quello osservato in condizione di attiva proliferazione, che durante le successive 24 ore venivano recuperati riportando il tasso di sintesi a livelli normali. In netto contrasto, nelle cellule CS si osserva il mancato recupero della sintesi dell'RNA anche dopo 30 ore dall'irradiazione [6].

Si va delineando così il caratteristico fenotipo cellulare della malattia, che consiste nell'incapacità di recuperare la sintesi dell'RNA in seguito all'esposizione ai raggi UV.

Su questo mancato recupero si basano semplici e rapidi test di laboratorio usati come strumento per diagnosticare la Sindrome di Cockayne a livello cellulare in quei soggetti che manifestano e riferiscono un quadro clinico e sintomatico che coincide con quello descritto per la malattia. La procedura prevede che una linea di fibroblasti prelevati dal donatore venga coltivata *in vitro* con un normale terreno di crescita ricco di siero, e sia poi passata in un terreno da coltura povero di siero (0,5%) per arrestarne la proliferazione e instaurare una fase stazionaria della crescita. Successivamente le cellule vengono irradiate a dosi variabili di radiazione ultravioletta e il giorno seguente si procede alla marcatura dell'RNA mediante somministrazione di ^3H -uridina, lasciando incorporare il nucleotide radioattivo per un tempo di circa 4 ore.

Nelle cellule normali la sintesi dell'RNA è solo transitoriamente inibita dopo l'esposizione ai raggi UV e nel giro di circa 90 minuti esse recuperano il processo al 90%. Le cellule dei soggetti affetti dalla sindrome, invece, non ripristinano il normale tasso di sintesi dell' RNA neanche molto tempo dopo l'irradiazione.

Aspetti neurologici:

Per l'aspetto neuropatologico della malattia, i dati salienti sono: 1) microcefalia con un cervello più piccolo del normale ma ben formato; questa riduzione del volume cerebrale verosimilmente deriva da una combinazione tra l'inadeguata crescita in fase precoce con conseguente microcefalia e una progressiva degenerazione postnatale; 2) perdita irregolare di mielina e progressiva atrofia della sostanza bianca con conseguente espansione ventricolare; 3) calcificazione diffusa in particolare al livello dei nuclei grigi profondi; 4) atrofia cerebellare con perdita neuronale e gliosi; 5) neuropatia demielinizzante periferica; 6) retinopatia pigmentosa, atrofia ottica, opacità corneale e altre anomalie legate all'occhio; 7) perdita uditiva neurosensoriale nell'orecchio interno causata da atrofia del nervo acustico e deterioramento dell'apparato vestibolare [7].

1.1.2 Panoramica delle mutazioni geniche

Diversi genotipi sono stati associati alla sindrome di Cockayne ed è stato osservato che la malattia può venire causata da mutazioni a carico di cinque geni differenti. Effettivamente però, sulla base di una serie di esperimenti di fusione cellulare condotti nei primi anni '90, i pazienti CS sono stati assegnati a due principali gruppi di complementazione, CS-A e CS-B, i cui rispettivi geni sono stati clonati e caratterizzati; uno è il gene CSA (CKN1 o ERCC8), le cui mutazioni rendono conto di circa il

20% dei casi, l'altro è il gene *csb* (CKN2 o ERCC6) coinvolto nella maggior parte dei restanti casi riportati. I sintomi della malattia dovuta ad alterazioni nel gene *CSA* risultano indistinguibili da quelli causati da mutazioni a carico del gene *csb*. Una minoranza di casi deriva da mutazioni a carico di uno dei tre geni *XPB*, *XPD* e *XPG*, che causano una malattia strettamente correlata con la sindrome di Cockayne, lo Xeroderma Pigmentoso (XP), così che pazienti associati al gruppo di complementazione XP-B e alcuni dei gruppi XP-D e XP-G, mostrano un fenotipo intermedio con caratteristiche cliniche associate ad entrambe le malattie [8]. In alcuni casi si è visto come la malattia XPB/CS, dovuta a mutazioni a carico di entrambi i geni, risulta meno severa, con un fenotipo corrispondente alla sindrome di Cockayne di tipo III, mentre in altri casi si osserva un quadro patologico più grave che in parte risulta dipendere dalla localizzazione della mutazione e dal livello di proteina prodotta. I casi di doppia mutazione XPD/CS e in modo specifico, XPG/CS determinano, invece, malattie molto gravi e letali per i piccoli pazienti affetti, alcuni dei quali mostrano gli aspetti clinici tipici della sindrome di Cockayne di tipo II. Più raramente, una mutazione nel gene *csb* porta alla cosiddetta sindrome cerebro-oculo-facciale (COFS), che condivide molti aspetti con la sindrome di Cockayne di tipo II. Inoltre, mutazioni presumibilmente identiche a carico dei geni che causano la sindrome di Cockayne possono portare a fenotipi diversi. Risulta chiaro pertanto, che le relazioni genotipo-fenotipo, e gli stessi geni coinvolti in questi disordini risultano molto difficili da determinare in modo univoco. Tra i fattori che contribuiscono all'indeterminabilità della corrispondenza tra la base genetica e il fenotipo vi sono le mutazioni eterozigoti in parti differenti dello stesso gene che implicano conseguenze diverse riguardo alla trascrizione degli RNA messaggeri e la quantità di proteina sintetizzata [9].

Il gene *CSA*, clonato nel 1995 è situato sul cromosoma 5q12-q13, e codifica per una proteina di 44 kDa di 396 amminoacidi con sette motivi WD-40 ripetuti. Pertanto *CSA* è un membro della famiglia di proteine "*WD repeat*" che contengono un motivo che termina con i residui amminoacidici Trp-Asp (WD). La modellizzazione computerizzata degli elementi di struttura secondaria per queste proteine mostra strutture di "beta 8epletiv" circolarizzate in cui i foglietti beta adottano un arrangiamento toroidale intorno ad un asse centrale che conferisce alla proteina la capacità di interagire con altri membri dei complessi multiproteici in cui è coinvolto, come una sorta di impalcatura per le interazioni proteina-proteina. *CSA* fa parte di un complesso E3 ubiquitina ligasi multiproteico contenente anche le proteine Cullin 4°, Roc1 e DDB1 (*DNA damage binding protein 1*), che è richiesto per il reclutamento dei fattori NER sul sito di riparazione del DNA.

Nel 1992, l'omologo umano del gene ERCC6 di ratto è stato clonato da Troelstra e collaboratori [10]. Una delle prime osservazioni fu che a causa del processo di poliadenilazione alternativa, dall'espressione del gene ERCC6 derivano due molecole di mRNA, una di 5 kb e l'altra di 7,5 kb. Il gene *csb* umano è situato sul cromosoma 10q11 e codifica per una proteina di 1493 amminoacidi che pesa circa 168 kDa. La proteina CSB contiene diversi domini specifici conservati (Figura 1).

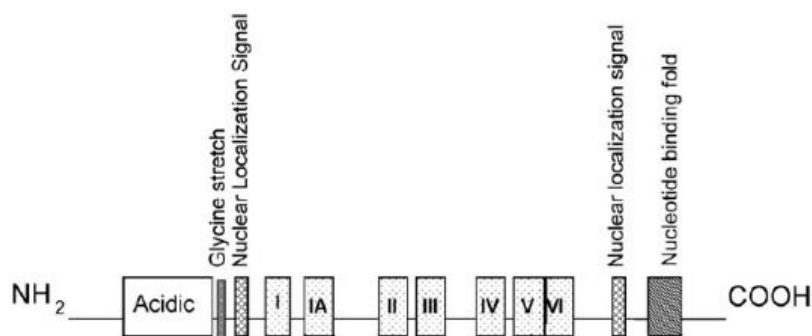


Fig. 1: Rappresentazione schematica dei principali domini strutturali presenti lungo la sequenza amminoacidica di CSB. (riadattata da *Stevnsner et al.* 2008)

Tra questi ci sono un dominio acidico che si estende dall'estremità N-terminale ai motivi ATPasici, costituito per il 60% da residui acidi, una regione di 7 residui, ricca di glicina e un segnale di localizzazione nucleare (NLS) bipartito con due presunti siti di fosforilazione per la caseina chinasi II (CKII) nelle vicinanze. Oltre a questi, sono stati identificati diversi presunti siti di fosforilazione per la protein chinasi C e due siti di fosforilazione per la tirosina chinasi. CSB contiene sette motivi ATPasici consecutivi I, IA, II, III, IV, V, VI che si estendono dall'aminoacido 527 al 950, simili a quelli contenuti negli enzimi a funzione RNA e DNA elicasi; in base a tali omologie di sequenza CSB si pone nella famiglia SWI2/SNF 2 delle proteine ad attività ATPasica DNA-dipendente generalmente coinvolte nel rimodellamento della cromatina, nella trascrizione e nel processo di riparazione del DNA. La regione di CSB che comprende questi motivi è altamente omologa a quella delle altre proteine della famiglia, come ad esempio SWI2/SNF2, Sth1, hBrm, BRG1, ISWI, MOT1 (o TAF-172), SRCAP, RAD54, RAD16, RAD5, e HuF2.[10]. In base ad alcuni dati già riportati per altre proteine della famiglia SWI2/SNF2, si è ritenuto possibile dedurre che i sette motivi elicasici della proteina CSB siano suddivisi in due domini simili a quelli della proteina RecA, avvolti intorno ad un interdominio coinvolto nel legame col DNA e nell'idrolisi dell'ATP. I motivi elicasici I, Ia, II e III sono situati nella superficie interna del dominio 1. I motivi III e IV sono separati tra loro da una regione

di collegamento, e i motivi IV, V e VI si trovano, invece nel dominio 2, fuori dal sito di legame del DNA e si ritiene che possano contattare il DNA dopo che hanno avuto luogo i cambiamenti conformazionali guidati dall'idrolisi dell'ATP [11] [12]. Come nel caso degli altri membri della famiglia cui appartiene, la proteina CSB non ha mostrato alcuna attività elicastica funzionale *in vitro* in esperimenti effettuati usando il cosiddetto saggio di spostamento del filamento (*strand displacement assay*). La proteina CSB possiede attività ATPasica DNA-dipendente, stimolata dalla defosforilazione della proteina stessa a seguito dell'irradiazione ultravioletta. Tale attività è definita DNA-dipendente perché risulta fortemente stimolata dalla presenza del DNA, nonché dalla sua specifica organizzazione strutturale dal momento che risulta marcatamente più pronunciata in presenza di molecole di DNA a doppio filamento rispetto a quelle a filamento singolo. Negli studi che hanno portato a queste conclusioni i ricercatori hanno misurato l'attività ATPasica di CSB in risposta a diversi substrati di DNA, ovvero molecole strutturalmente ben distinte tra loro, valutate come cofattori più o meno efficienti nel guidare l'attività ATPasica della proteina. Le strutture analizzate includevano vari tipi di DNA a doppio filamento come molecole circolari superavvolte, DNA λ , DNA M13 a singolo filamento, oligonucleotidi (74 nucleotidi), oligo(dT)₁₅ a singolo filamento e oligonucleotidi sintetici contenenti diverse strutture secondarie come braccia ramificate, strutture a forcina e steli a doppia elica con loop terminali di ampiezza diversa (8 o 15 nucleotidi). Dalle misurazioni è risultato che l'attività ATPasica della proteina viene stimolata principalmente dal DNA a doppia elica rispetto a quello a singolo filamento, e nelle sequenze a singolo filamento la presenza di elementi di struttura secondaria ha un effetto positivo sull'attività idrolitica. Infatti, utilizzando gli oligonucleotidi sintetici, i ricercatori hanno osservato che la presenza di strutture secondarie di DNA come steli e loop o ripiegamenti a forcina aumentava significativamente l'attività ATPasica di CSB rispetto a strutture a singolo filamento con la stessa sequenza e della stessa lunghezza come oligonucleotidi di RNA o molecole ibride RNA/DNA. Ciò risultava dalla differenza nel ruolo di cofattori, fra le strutture a singolo filamento contenenti sequenze palindromiche che possono formare loop e gli oligonucleotidi a singolo filamento che presentano solo qualche piccola struttura secondaria. Tra questi due tipi di substrato a singolo filamento, quello contenente gli elementi di struttura secondaria ripiegati a loop risultava essere più efficiente come substrato per la proteina CSB [13].

Con un approccio analogo, Christiansen e collaboratori hanno poi ripreso questo tipo di analisi contestualizzando il significato di tali strutture secondarie nei processi di riparazione del DNA danneggiato, di blocco e di allungamento della trascrizione genica, richiamando la valenza che

esse assumono durante questi eventi. I dati hanno mostrato che l'attività ATPasica di CSB subisce un significativo aumento in presenza di molecole substrato contenenti loop e bolle di 15-16 nucleotidi, corrispondenti alla struttura semiaperta del DNA durante la riparazione o l'arresto della trascrizione, rispetto ai cofattori di DNA chiuso. Usando come cofattore un DNA danneggiato mediante trattamenti con cisplatino, raggi UV e altri agenti chimici al fine di indurre diverse tipologie di danno, si è visto che la presenza del danno in sé non influenza l'attività ATPasica di CSB, anche se, relativamente ai vari tipi di alterazione, quelli che determinano una maggiore distorsione della doppia elica del DNA, come i prodotti del cisplatino, correlano con un livello di attività leggermente maggiore rispetto ai fotoprodotto indotti dai raggi UV che provocano una distorsione più lieve della molecola. Questi ultimi dati indicando inoltre, che CSB non è un fattore di riconoscimento del danno di per sé stesso [14].

Come suggeriva la presenza di siti di fosforilazione multipli per enzimi ad attività chinasi diversa lungo la sequenza, nella stessa serie di esperimenti Christiansen e colleghi hanno mostrato che la proteina CSB può venire fosforilata a livelli elevati sia *in vitro* che *in vivo* nelle cellule umane. Poiché le diverse modificazioni post-traduzionali, hanno spesso un ruolo regolativo sulla funzione specifica delle proteine, è stato analizzato l'effetto di questa modificazione sull'attività ATPasica di CSB dopo trattamento con radiazione ultravioletta. È emerso che quattro ore dopo l'irradiazione, la fosforilazione a carico di CSB risulta pressoché assente, mentre si avvicina ai livelli iniziali, precedenti al trattamento, 24 ore dopo la somministrazione dei raggi UV. L'attività ATPasica di CSB è risultata quindi sotto il controllo dell'evento fosforilativo, dal momento che tale attività, nella proteina defosforilata dalla protein fosfatasi 1 (PP1), subisce un aumento del 40% rispetto allo stato fosforilato [14].

La proteina CSB enzimaticamente attiva funziona come omodimero e la dimerizzazione avviene a livello del dominio ATPasico centrale della proteina. CSB è in grado di legare il DNA anche in assenza di ATP, mentre in presenza di un ATP non idrolizzabile (ATPyS) o di ADP la capacità di legame al DNA risulta inibita. Pertanto non è necessario per CSB legare l'ATP per poter interagire con il DNA, ma il legame col DNA è favorito da determinate conformazioni della proteina. Tali conformazioni sono probabilmente compatibili con il legame e l'idrolisi dell'ATP ma non con il legame di una molecola di ATP strutturalmente diversa, non idrolizzabile o con il prodotto finale dell'idrolisi, l'ADP [15]. Con l'uso del microscopio a scansione a forza atomica per analizzare il complesso CSB-DNA, è stato dimostrato l'avvolgimento del DNA intorno ai dimeri di CSB. L'avvolgimento e lo svolgimento del DNA potrebbero permettere alla proteina CSB di alterare

attivamente la conformazione della doppia elica del DNA che può influenzare la distribuzione dei nucleosomi ed altre interazioni proteina-DNA.

In esperimenti condotti attraverso l'uso di cellule CS1AN S3.G2.(derivate da pazienti Cockayne) immunofluorescenti, stabilmente trasfettate con la proteina CSB marcata con CFP, si è potuta osservare la localizzazione nucleare di CSB, in accordo con la presenza del segnale di localizzazione nucleare nella sequenza amminoacidica della proteina [14][16]. Nei fibroblasti umani normali, il segnale relativo a CSB risulta visibile su focolai nucleoplasmatici e si accumula nei nucleoli. In preparazioni di matrice nucleare, CSB è stata trovata nel nucleolo come parte di un complesso multiproteico insieme con l'RNA Pol I, la subunità XPB di TFIIH, TIF-1B che è coinvolto nella sintesi dell'rRNA (RNA ribosomiale) e con XPG, che insieme con TFIIH partecipa al processo di riparazione del DNA. E' risultato che l'integrità di questo complesso dipende da CSB; infatti, nelle cellule derivate da pazienti Cockayne, difettive per CSB, il complesso RNA Pol I/TFIIH risulta dissociato, mentre negli estratti dalle stesse cellule a cui viene aggiunta la proteina CSB ricombinante, l'interazione tra l'RNA Pol I e il fattore TFIIH risulta ripristinata, a dimostrazione del fatto che l'assemblaggio di questo complesso è mediato da CSB. La localizzazione di CSB sembra essere dinamicamente dipendente dall'attività dell'RNA polimerasi poiché quando l'RNA Pol II viene inibita, il segnale nucleoplasmatico di CSB si indebolisce e nel trattamento con actinomicina D, il segnale di localizzazione di CSB viene disperso dai nucleoli [17].

Fin'ora sono state descritte molte mutazioni differenti a carico del gene *csb*, ascrivibili pressoché a tutti i tipi di mutazioni conosciute, che risultano distribuite lungo l'intera sequenza genica senza mostrare nessun tipo di raggruppamento specifico o di ripartizione spaziale organizzata in cluster, né prossimità topografiche di unità affini [18] (Figura 2).

amminoacidico conservato tra la posizione 670 e 687 del dominio elicastico III. Due pazienti apparentemente non in relazione tra loro erano omozigoti per un'estesa delezione genomica che comprendeva l'esone non codificante 1 e la sequenza regolatrice a monte del gene *csb*. Tutti gli esoni codificanti 2-21 erano normalmente presenti in questi pazienti, ma né l'RNA messaggero, né la proteina CSB erano prodotti, né era rintracciabile la proteina di fusione CSB-PGBD3. Entrambi i pazienti erano affetti da una severa forma di sindrome di Cockayne e sono deceduti a 6 e 8 anni di età. Almeno 48 diversi polimorfismi sono stati documentati nella sola sequenza codificante del gene *csb*, soprattutto nella porzione C-terminale della proteina (database di Ensembl e NCBI SNP) [18].

Gli stessi tipi di mutazioni si osservano per il gene *CSA*. In questo caso, tutte le mutazioni missenso identificate sono contenute nel motivo WD ripetuto e portano alla modifica dei residui evolutivamente ben conservati. Anche mutazioni non-senso, mutazioni di splicing, delezioni e inserzioni sono state trovate nel gene *CSA*, e tanto le forme tronche all'estremità C-terminale, quanto quelle tronche all'estremità N-terminale della proteina sono parimenti in grado di portare a un fenotipo Cockayne completo. Poiché mutazioni di tipo diverso alterano la proteina in modi diversi, come si può capire dalla differenza che intercorre tra una mutazione puntiforme e una delezione, si era ritenuto legittimo mettere in relazione queste differenti mutazioni con le tre differenti forme della malattia. Inoltre, in seguito ad alcune loro osservazioni, il gruppo di Horibata e collaboratori propose l'ipotesi secondo cui la presenza di una proteina CSB tronca o anormale potesse risultare più deleteria della completa assenza di CSB e fosse responsabile di quelle forme della malattia caratterizzate da maggiore severità dei sintomi [19]. Altri ricercatori, nel tentativo di riprendere e migliorare questa ipotesi, hanno proposto che la proteina di fusione CSB-PGBD3, che (consiste nei primi 5 esoni di CSB uniti al trasposone PGBD3, potesse essere responsabile di un effetto peggiorativo del quadro clinico della malattia in condizioni di completa assenza della proteina CSB normale. Tuttavia, osservazioni successive fatte alla luce di queste ipotesi da Laugel e collaboratori su pazienti gravemente affetti dalla malattia, senza alcuna proteina CSB rilevabile, non sembrano aver supportato il modello proposto. Va notato inoltre, che la sindrome cerebro-oculo-facciale (COFS) molto severa, e la sindrome da sensibilità ai raggi UV (UVSS) molto lieve, la quale presenta esclusivamente fotosensibilità cutanea, senza alterazioni nella crescita né ripercussioni sul piano neurologico, condividono gli stessi difetti cellulari descritti per la sindrome di Cockayne e contribuiscono ad ampliare ulteriormente lo spettro di manifestazioni fenotipiche dovute alle mutazioni nei geni *CSA* e *CSB*. In conclusione, dai dati sulle mutazioni a carico di questi

due geni non è emersa alcuna correlazione genotipo-fenotipo ovvia e indiscutibile e ciò suggerisce di non escludere che i vari aspetti del fenotipo Cockayne possano dipendere anche da altri fattori genetici e ambientali concomitanti.

1.1.3 Geni coinvolti nel processo di riparazione per escissione di nucleotidi (NER)

Per garantire la stabilità del genoma rispetto ai continui attacchi provenienti da fonti endogene ed esogene di agenti genotossici, si sono evoluti nel tempo una serie di sistemi di riparazione del DNA danneggiato. Il mantenimento di una sequenza genica intatta è una delle priorità della cellula, che ha sviluppato a tal fine una varietà di meccanismi di riparazione del DNA che consentano il corretto svolgimento dei processi di trascrizione e replicazione [20]. Questi sistemi forniscono non soltanto l'attivazione della via di riparazione, ma anche delle vie di segnalazione che attivano i punti di controllo del ciclo cellulare, l'apoptosi, la trascrizione e il rimodellamento della cromatina. Come conseguenza del danno al DNA la cellula può arrestare completamente il processo di trascrizione genica, verosimilmente per favorire così la riparazione del DNA danneggiato. Pertanto, uno processo trascrizionale accurato si basa sull'efficienza del processo di riparazione del DNA dal momento che l'RNA Polimerasi non è in grado di bypassare la lesione. In teoria una singola molecola di RNA Polimerasi II bloccata irreversibilmente a livello di un gene essenziale per la cellula è sufficiente a provocare la morte della cellula stessa [21]. Pertanto, non sorprende che si siano evoluti diversi fattori e meccanismi che garantiscono che tali eventi avvengano molto raramente. Una delle principali cause che inducono il blocco prolungato della RNAPol II è il danno al DNA in corrispondenza del filamento trascrizionalmente attivo dei geni della cellula.

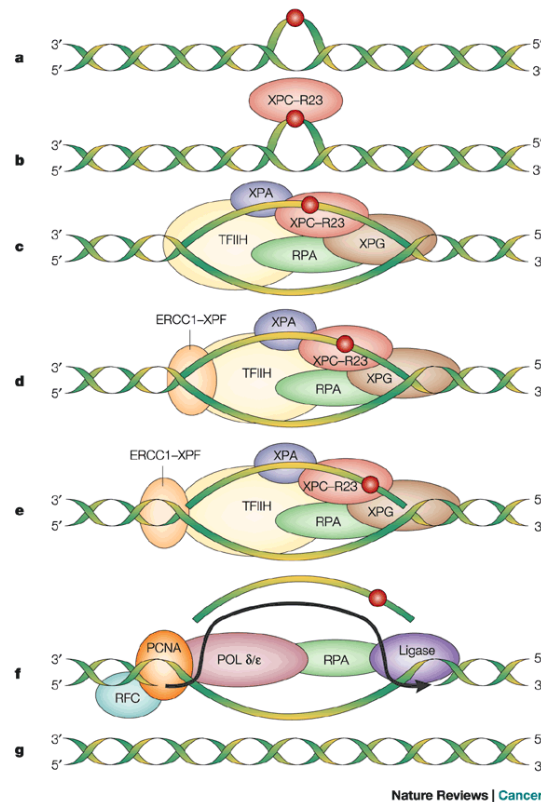
A volte una diminuzione nei livelli di trascrizione può dipendere dalla mancanza di alcune componenti base del macchinario della trascrizione. Ad esempio, il cisplatino, l'agente che induce *crosslink* nella doppia elica, può disturbare l'avvolgimento del DNA attorno ai nucleosomi, influenzando in parte l'arrivo di alcuni fattori di rimodellamento della cromatina che sono necessari per la trascrizione. Sebbene le lesioni possano interferire con la trascrizione, e perciò richiedere tempo per la riparazione del DNA, ci sono situazioni nelle quali la trascrizione può essere necessaria per il processo di riparazione stesso.

Il meccanismo, mediante il quale le cellule eucariotiche rilevano la presenza di un danno al DNA e attivano la via di segnalazione in risposta ad esso è ancora poco conosciuto. E' stato proposto un meccanismo in cui le cellule sono in grado di riconoscere l'RNA Polimerasi in fase di stallo o la

presenza di trascritti abortivi durante la fase di monitoraggio dell'integrità del DNA così da attivare la segnalazione relativa al danno. Il blocco persistente della trascrizione può costituire un forte segnale per l'avvio dell'apoptosi p53-dipendente. Il meccanismo di elezione mediante cui le cellule rimuovono le lesioni al DNA che bloccano la trascrizione è la via di riparo per escissione di nucleotide accoppiato alla trascrizione (*Transcription coupled nucleotide excision repair*) TC-NER o TCR, un sottotipo specializzato di riparazione per escissione di nucleotide (*Nucleotide excision repair*) NER.

Il NER è un sistema multiproteico, molto versatile, capace di rimuovere un'ampia gamma di lesioni strutturalmente non correlate tra loro, con un'apparente preferenza per quelle che causano un ingombro sterico e quindi una distorsione nella doppia elica del DNA come le fotolesioni indotte dai raggi UV, i dimeri pirimidinici contenenti ciclobutano (CPD), i fotoprodotto 6-4 pirimidina-pirimidone (64PP) e gli addotti del DNA causati da agenti chimici come l'aflatossina B1 e l'N-acetossi-2-acetilamminofluorene (NA-AAF). Il NER agisce attraverso un meccanismo di taglio e ricucitura, che media il taglio e la rimozione di un breve tratto di DNA contenente le lesioni e successivamente ripristina la sequenza originale del DNA mediante polimerizzazione dei nucleotidi e ligazione usando il filamento non danneggiato come filamento stampo [20]. Il NER richiede l'azione concertata di circa 30 diversi polipeptidi, che agiscono attraverso l'assemblaggio graduale di diversi sottocomplessi in corrispondenza del sito danneggiato.

Nella prima fase del NER, la distorsione indotta dal danno viene riconosciuta dal complesso XPC-HR23B (l'omologo umano di Rad4/Rad23 di *S. cerevisiae*), probabilmente supportato *in vivo* dal complesso UV-DDB (complesso ubiquitina ligasi E3 contenente DDB1-DDB2) (Figura 3).



Nature Reviews | Cancer

Fig.3: Il danno è riconosciuto da una proteina chiamata XPC, che è stabilmente legata a un'altra proteina chiamata HHRAD23B (R23). C Il legame del subcomplesso eterodimerico XPC-HHRAD23 è seguito dal legame di diverse altre proteine (XPA, RPA, TFIIH e XPG). Di queste, XPA e RPA facilitano il riconoscimento specifico del danno alla base. TFIIH è un subcomplesso del macchinario della RNA polimerasi II di inizio della trascrizione che opera anche durante NER. È costituita da sei subunità e contiene due proteine ad attività DNA elicastica (XPB e XPD) che snodano il duplex DNA nelle immediate vicinanze del danno. Questa denaturazione locale genera una bolla nel DNA, le cui estremità formano giunzioni tra DNA duplex e filamento singolo. D Il successivo legame del subcomplesso eterodimerico ERCC1-XPF genera un complesso multiproteico NER completamente assemblato. e XPG è una endonucleasi di DNA duplex / singola catena che taglia il filamento danneggiato alla giunzione 3' del sito di danno. Viceversa, la proteina eterodimerica ERCC1-XPF è una endonucleasi di DNA duplex / filamento singolo che taglia il filamento danneggiato alle giunzioni 5' del sito di danno. Questa incisione bimodale genera un frammento oligonucleotidico di 27-30 nucleotidi di lunghezza che comprende la base danneggiata. F | Questo frammento viene asportato dal genoma, in concomitanza con il ripristino del divario 27-30 per sintesi di riparazione. La sintesi di riparazione richiede la DNA polimerasi o le proteine di replicazione accessorie PCNA, RPA e RFC. L'integrità covalente del filamento danneggiato viene restaurata dalla DNA ligasi. G Complessivamente, questi eventi biochimici restituiscono al DNA danneggiato la sua configurazione chimica nativa. (Friedberg E.C., et al. 2001)

Questo complesso di ricognizione del danno al DNA, UV-DDB e le proteine XPC e RAD23B sono richieste per il reclutamento di tutte le proteine che intervengono successivamente. In particolare, il fattore base della trascrizione e della riparazione, TFIIH, svolge un ruolo essenziale nel NER poiché due delle sue subunità, le proteine codificate dai geni XPB (Rad25) e XPD (Rad3), esercitando la loro attività rispettivamente ATPasica ed elicastica in maniera DNA-dipendente,

promuovono la formazione di un complesso aperto dove la doppia elica di DNA viene svolta localmente in corrispondenza della lesione. L'azione combinata di TFIIH e XPC-RAD23B porta alla formazione di un breve tratto di DNA a singolo filamento, che viene legato e stabilizzato dalla proteina RPA (*Replication protein A*) cui è affidato il compito di impedire ai due filamenti singoli separati di ripiegarsi e associarsi nuovamente tra loro. Contemporaneamente viene facilitato il reclutamento sul complesso proteico della proteina XPA, che riconoscendo le lesioni che inducono alterazioni nella struttura del DNA, favorisce la demarcazione del tratto contenente il danno. Successivamente, all'interno della struttura aperta danneggiata vengono reclutate le due endonucleasi XPG (Rad2) e XPF-ERCC1 (Rad1/Rad10) che introducono un taglio a singolo filamento su entrambi i lati 3' e 5' della lesione. Il frammento inciso che ne deriva è in genere un oligonucleotide di 25-30 nucleotidi di lunghezza contenente il danno che viene così totalmente rimosso dal DNA; l'interruzione del filamento derivata da questo taglio viene poi suturata mediante una reazione di nuova sintesi del DNA che coinvolge l'antigene nucleare della proliferazione nucleare (PCNA), la proteina di replicazione C (RPC) e le DNA Polimerasi δ e ϵ capaci di sintetizzare il DNA lungo il gap usando il filamento non danneggiato come stampo. L'incisione rimanente viene poi richiusa da una DNA ligasi [22]

Le due sottovie in cui si divide il NER sono la via di riparo per escissione di nucleotide del genoma globale (*Global genome nucleotide excision repair*) GG-NER e il TC-NER che si differenziano sia per la regione del genoma cui è destinata l'azione di riparazione, sia per la modalità di riconoscimento del danno. Il GG-NER è deputato alla riparazione delle lesioni che si vengono a creare in tutto il genoma, anche se la sua efficienza di riparazione varia nelle diverse regioni del genoma verosimilmente a seconda dell'ambiente cromatinico in cui si trova la lesione; il TC-NER, invece, come già detto, è specializzato nella riparazione delle lesioni sui filamenti trascrizionalmente attivi del DNA che sono in grado di bloccare efficacemente il complesso dell'RNA Polimerasi di allungamento (RNAPII). All'inizio, più di 15 anni fa, Hanawalt e i suoi collaboratori intrapresero degli studi allo scopo di verificare se il tasso di riparazione nei geni attivi fosse significativamente differente rispetto a quello nelle regioni non trascritte. I risultati hanno mostrato chiaramente che la riparazione del danno al DNA nei geni attivi avviene molto più velocemente che non nelle regioni del genoma non trascritte attivamente. Ciò è stato dimostrato analizzando la sequenza di DNA corrispondente al gene che codifica per la Diidrofolato Reduttasi, DHFR. Inoltre, questo processo di riparazione più veloce non era semplicemente dovuto alla maggiore accessibilità del DNA delle regioni trascrizionalmente attive, perché venne successivamente mostrato che c'era

un'enorme differenza nell'efficienza di rimozione dei dimeri di pirimidina (CPD) indotti dalla radiazione ultravioletta tra il filamento trascritto e quello non trascritto del gene DHFR, e che era specificamente il filamento trascritto ad essere riparato di preferenza [23]. Queste osservazioni hanno portato alla caratterizzazione del meccanismo di riparazione accoppiata alla trascrizione, TCR, in cui l'eliminazione del danno sul filamento trascritto si basa sul processo di trascrizione in corso. L'aumento del tasso di riparazione nella regione promotrice del gene potrebbe essere attribuito al legame di attivatori trascrizionali che inducono un locale rimodellamento della cromatina ATP-dipendente; questo faciliterebbe non soltanto il posizionamento del complesso trascrizionale di pre-inizio, ma anche l'accessibilità del macchinario di riparazione in corrispondenza della lesione. Pare che la rapida riparazione delle lesioni nei geni trascrizionalmente attivi si basi su almeno due meccanismi: i) il primo coinvolge un locale riarrangiamento della cromatina che consente l'accesso dei fattori di riparazione in prossimità della sequenza promotrice e poi facilita l'arrivo del macchinario della trascrizione; ii) il secondo meccanismo avviene solo in presenza di una RNAPol II di allungamento in fase di stallo. Il primo meccanismo porta ad una rapida riparazione del danno su entrambi i filamenti del DNA, mentre il secondo favorisce la riparazione veloce del solo filamento trascrizionalmente attivo. L'RNAPol II bloccata in corrispondenza di una lesione al DNA è ritenuta capace di innescare efficacemente il reclutamento di specifici fattori del TCR e proteine specifiche del NER. C'è pertanto un legame tra il rimodellamento della cromatina e il TCR [20].

Cinque delle sette proteine coinvolte nel GGR, partecipano anche alla via di riparazione del TCR: TFIIH, XPA, la proteina di replicazione A (RPA), XPG, e XPF-ERCC1. XPE e XPC-hHR23B non sono coinvolte nel processo di TCR poiché si è visto che le cellule derivate da pazienti portatori di mutazioni a carico di XPC e XPE sono comunque in grado di eseguire correttamente il TCR, mentre il processo GGR risulta ridotto o completamente assente [22].

Per il TCR, è stato proposto un modello in cui sarebbe l'RNAPol II di allungamento ad iniziare il processo di riparazione innescando il reclutamento dei fattori NER necessari per la rimozione del danno, ruolo questo che nel GGR è svolto da XPC. Nel TCR, la reazione di riparazione non ha a che fare solo con la lesione al DNA ma anche coll'RNAPol II bloccata, che potrebbe interferire con il macchinario di riparazione stesso. Perciò, in aggiunta ai comuni fattori di rimodellamento della cromatina e di riparazione del DNA, il TCR necessita anche di altri fattori specifici per gestire sia il complesso contenente l'RNAPol II che la lesione che ha indotto il blocco. Indagini condotte su cellule derivate da pazienti CS o pazienti XP che presentano un parziale fenotipo Cockayne, hanno

portato all'identificazione di questi fattori specifici del TCR nelle due proteine CSA e CSB e hanno evidenziato il ruolo svolto dalle subunità XPB e XPD di TFIIH.

Aspetti evolutivi

Il TC-NER è una via di riparazione evolutivamente ben conservata, identificata in vari organismi sia procarioti che eucarioti, che dai batteri, passando per il lievito arriva fino ai mammiferi; tuttavia in alcuni organismi come il moscerino *Drosophila melanogaster* non è stato possibile osservarla direttamente, suggerendo così, l'ipotesi dell'esistenza di una via alternativa per la gestione della trascrizione inibita dal danneggiamento al DNA. Così, l'importanza della prioritaria necessità di tenere il percorso della polimerasi sgombero da impedimenti, risulta ben evidente dal confronto tra i meccanismi di riparazione delle varie specie viventi. Un lavoro pionieristico condotto da Selby e Sancar nel 1991 ha portato all'identificazione di una proteina di 130 Kda codificata dal gene *mfd*, essenziale per lo svolgimento del processo TCR nelle cellule di *E. Coli* irradiate con raggi UV. In questo microrganismo modello la proteina Mfd, anche chiamata TRCF (*transcription-repair coupling factor*) è in grado di rilasciare l'RNA Polimerasi e il trascritto tronco dal DNA secondo un processo ATP-dipendente, attirando altri fattori NER sul sito lesionato, in particolare la proteina UvrA [24]. Nel lievito *S.cerevisiae*, il TCR coinvolge la proteina corrispondente alla proteina Mfd batterica e omologa alla proteina CSB, che è codificata dal gene RAD26. Qui, delezioni a carico del gene determinano difetti nel TCR, anche se non della stessa entità di quelle che si osservano nelle linee cellulari CSB difettive. Inoltre le cellule rad26 difettive non mostrano sensibilità ai raggi UV [25]. In maniera simile al TCR batterico, alcuni dati hanno mostrato come nel fungo, in alcune situazioni, una RNA Polimerasi bloccata dal danno può essere rilasciata dal filamento stampo di DNA mediante un meccanismo che ne determina l'ubiquitinazione e la successiva degradazione. Questo processo richiede l'interazione tra una proteina codificata dal gene DEF1 e il fattore TCR-specifico Rad26. Tuttavia a differenza di quanto osservato nei batteri, Rad26 non promuove la degradazione dell'RNA Polimerasi senza che il macchinario TCR abbia prima tentato di riparare il danno che ha causato il blocco della trascrizione. Solo come ultima possibilità, quando alcuni danni al DNA come le fotolesioni indotte da UV non risultano accessibili al TCR, Def1 promuove il reclutamento di un macchinario di ubiquitinazione che porta alla modificazione e degradazione dei complessi RNA Polimerasi bloccati affinché possa aver luogo la riparazione del DNA [26].

Sebbene il meccanismo molecolare del TCR risulta essere conservato dal lievito all'uomo, il modo in cui vengono rimosse le lesioni sul filamento non trascritto e lungo l'intero genoma può variare considerevolmente tra le varie specie. Mentre la maggior parte delle proteine che si sono mostrate essere coinvolte nel TCR nell'uomo, presenta un omologo funzionale nel lievito, il macchinario proteico che è dedicato al GGR è molto meno conservato. Ad esempio, gli omologhi funzionali delle proteine di lievito Rad7 e Rad16 non sono state identificati negli eucarioti superiori. E' interessante notare inoltre, che mentre le cellule umane possiedono un processo GGR consolidato, questo processo risulta gravemente difettoso nei roditori. Essi infatti, mostrano un livello di espressione molto basso del gene p48, che codifica per la subunità DDB2 del fattore di legame del DNA danneggiato da UV, UV-DDB. Un'ulteriore differenza fra i meccanismi GGR nel lievito e nell'uomo è che nelle cellule umane il prodotto del gene XPC è richiesto solo per il GGR, mentre il suo omologo Rad4, nel lievito, è richiesto sia per il GGR che per il TCR [27].

1.1.4 Ruolo della proteina CSB nel processo di riparazione accoppiata alla trascrizione (TCR)

La scoperta che le cellule CS hanno un difetto specifico nel processo di riparazione accoppiata alla trascrizione, (TCR) del danno indotto dai raggi UV, venne fatta per la prima volta nel 1990 dal gruppo di Venema e collaboratori. Poco dopo, il gene murino *ercc6*, che codifica per l'omologo umano di CSB, venne clonato in base alla sua capacità di complementare il difetto nel TCR [16]. Come già detto, il TCR è il processo attraverso cui la cellula elimina le lesioni che inducono un blocco nell'espressione dei geni trascrizionalmente attivi, con un meccanismo che prevede, previa rimozione dell' RNA Polimerasi bloccata in corrispondenza del danno, il reclutamento di specifici fattori di riparazione a livello della lesione.

I fattori proteici che sono richiesti per il TCR e il riparo globale del genoma (GGR) rientrano in due categorie principali [27]. La prima comprende i fattori che sono coinvolti unicamente nel dirigere il macchinario di riparazione in prossimità della lesione in un filamento specifico del DNA o in una data regione del genoma. La seconda include fattori che hanno una funzione ben definita nella riparazione del DNA, ma con ruoli distinti tra le due vie di riparazione del GGR o del TCR. CSA e CSB sono i due fattori specifici del processo TCR di mammifero (Figura 4).

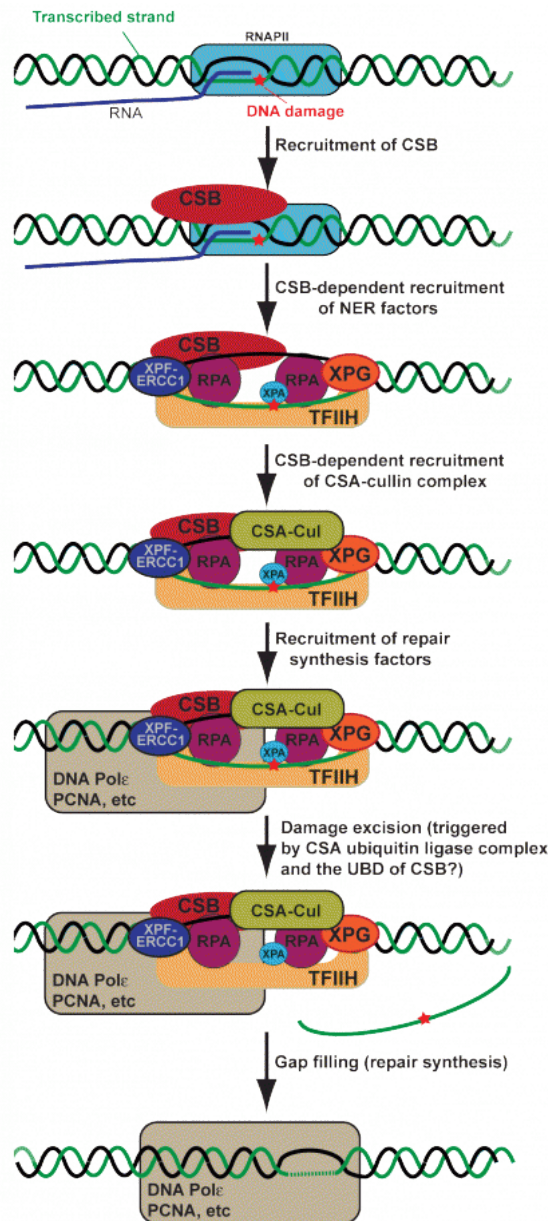


Figure 1. Stepwise model for TC-NER. Note that RNAPII is likely to be present during the whole reaction and to restart transcription after repair, but it has been omitted from the cartoon in later steps for simplicity.

Fig. 4: Serie successiva di fasi che compongono il meccanismo di TCR per la rimozione di una lesione che blocca l'RNA Polimerasi attiva nella trascrizione genica. Il reclutamento della proteina CSB è indispensabile affinché venga assemblato il complesso TC-NER completo

Linee cellulari che esprimono forme difettive di queste proteine sono quasi completamente incapaci di riparare le lesioni a carico del filamento trascritto dei geni attivi, anche se mostrano un processo GGR normale. Poiché gli eventi molecolari che si susseguono durante il TCR devono ancora essere definiti chiaramente, sono stati proposti diversi modelli per spiegare come possa essere trattata l'RNA Polimerasi bloccata sulla lesione in modo tale da favorire la rimozione del

danno che costituisce un'ostruzione più rapidamente rispetto alle lesioni non ostruenti sui filamenti non trascritti e altrove nel genoma.

L'RNA Polimerasi bloccata costituisce il segnale richiesto per innescare il processo TCR. La dipendenza del TCR da un processo trascrizionale attivo è stata messa in evidenza in diversi esperimenti condotti sia su cellule di mammifero che su cellule di lievito. Nel primo caso l'aggiunta dell' α -amanitina, agente inibitore dell'RNA Polimerasi II, provocava il blocco immediato del TCR; nel secondo caso, nelle linee di lievito che esprimevano l'allele temperatura-sensibile di RPB1 (che codifica per la subunità catalitica dell'RNA Pol II), in condizioni di temperatura non permissive, l'inibizione della trascrizione portava al blocco immediato del processo di riparazione del DNA [27]. Nei mammiferi, il processo di riparazione delle lesioni al DNA, in particolare di quelle indotte dai raggi UV come i dimeri di pirimidina (CPD), manifesta una cinetica eterogenea lungo il genoma, che può dipendere dalle specifiche sequenze nucleotidiche in cui si trovano le mutazioni. La gerarchia della riparazione differenziale prevede che di preferenza vengano riparati prima i geni attivi rispetto a quelli silenti, e il filamento trascrizionalmente attivo è riparato più velocemente rispetto a quello non trascritto. Lo specifico ambiente cromatinico in cui si trova la lesione è considerato un fattore importante in grado di influenzare la ricognizione del danno e il tasso di riparazione.

Evidenze importanti sul ruolo della trascrizione derivano dagli studi sui livelli di riparazione nel NER, nei geni attivi, sia internamente che nelle vicinanze della sequenza codificante [28]. Nei primi lavori condotti in tal senso, la cinetica di riparazione dei CPD è stata studiata con risoluzione nucleotidica mediante la tecnica di reazione a catena della polimerasi mediata dalla ligazione, LMPCR (*ligation-mediated polymerase chain reaction*), che per la sua sensibilità consente lo studio delle lesioni presenti anche ad una frequenza molto bassa. Il tasso di riparazione dei CPD è stato analizzato per il gene JUN, che è uno dei geni rapidamente attivati nella cosiddetta risposta agli UV avviata nei mammiferi in seguito all'irradiazione, come risposta trascrizionale con funzione protettiva per la sostituzione dei componenti danneggiati; esso codifica per il fattore di trascrizione AP-1, soggetto ad un meccanismo di autoregolazione a feedback positivo. La cinetica di riparazione varia a seconda della posizione in cui si trova il dimero lungo la sequenza, mostrando chiaramente la dipendenza della reazione di riparazione dalla specifica sequenza nucleotidica [28]. Attraverso tecniche di footprinting, sono stati identificati diversi siti di riconoscimento per fattori di trascrizione sequenza-specifici disposti in serie lungo la sequenza promotrice; si è visto che a livello del promotore del gene i dimeri di pirimidina nelle sequenze di

legame specifiche per gli attivatori della trascrizione, venivano riparati lentamente, con un livello massimo di riparazione circa 10 ore dopo l'irradiazione. E' possibile che ciò dipenda dal fatto che le lesioni non sono accessibili al macchinario di riparazione del DNA a causa della formazione di un grosso complesso costituito dalla schiera di fattori di trascrizione sequenza-specifici e altre proteine associate. Riguardo alla regione di seguito al promotore, quella che viene trascritta, si è osservata la presenza di una sorta di gradiente di riparazione, dal momento che il filamento trascritto viene riparato più rapidamente verso l'estremità 5' che non verso quella 3'. Il tasso di riparazione subisce un significativo incremento a partire da circa 40 nucleotidi a monte del principale sito di inizio della trascrizione, vicino al sito di legame del fattore RSRF (*Related to serum response factor*). Un tasso di riparazione sorprendentemente più alto veniva registrato nelle sequenze che circondano il sito di inizio della trascrizione, dove la maggior parte degli eventi riparativi avviene nel giro di 1 o 2 ore dall'irradiazione. La spiegazione fornita tiene conto del fatto che in corrispondenza di tale sito, si instaura una situazione di elevata concentrazione locale di fattori di riparazione favorita dalla conformazione aperta che la cromatina assume in corrispondenza del sito di inizio della trascrizione; in tal modo il DNA diventa facilmente accessibile agli enzimi di riparazione, nello stesso modo in cui si rende accessibile al complesso di inizio della trascrizione che comprende un certo numero di polipeptidi. Tuttavia, tenendo conto che la rapida attivazione della trascrizione del gene JUN come risposta agli UV, è pressoché simultanea ai rapidi eventi riparativi, una spiegazione più verosimile è che la riparazione di questo dominio risulti più veloce a causa del coinvolgimento specifico di proteine che hanno una duplice funzione, cioè sia nella trascrizione che nella riparazione del DNA. Questo modello è sostenuto dai dati secondo cui il fattore di trascrizione generale TFIIH contiene subunità che sono parte integrante del meccanismo di riparazione per escissione di nucleotide, XPB e XPD ad attività elicastica, stabilendo così la connessione tra la trascrizione e la riparazione del DNA. Nel processo di riparazione per escissione di nucleotide, il fattore TFIIH sembra essere coinvolto nello svolgimento della doppia elica del DNA in corrispondenza del sito lesionato, in modo simile a ciò che fa nella formazione di un complesso aperto durante l'inizio della trascrizione; in questa fase del processo, il fattore TFIIH interagisce con altre due proteine, XPA e XPC, e oltre a favorire lo stabilirsi di una conformazione aperta, sembra favorire anche la fosforilazione dell'estremità C-terminale dell'RNA Polimerasi II e la liberazione del promotore. Viene proposto, pertanto, un modello secondo cui ci sarebbe una connessione tra la rapida riparazione della sequenza vicino al sito di inizio della trascrizione e la presenza di TFIIH e altri fattori di riparazione nel complesso stesso di inizio della

trascrizione o strettamente associati ad esso. In generale comunque, questa riparazione dominio-specifica è un meccanismo che dipende dai livelli trascrizionali e dall'estensione del danno al DNA [28]. La serie successiva di esperimenti analoghi, ha esteso il discorso ad un contesto patologico in cui la mappatura del tasso di riparazione del danno e la sua dominio-specificità sono analizzate su linee cellulari umane derivate da pazienti affetti da Xeroderma Pigmentoso e Sindrome di Cockayne[29]. Focalizzando l'attenzione su quest'ultima, ricordiamo che le cellule CS sono caratterizzate da un difetto nella riparazione del DNA che riguarda selettivamente la riparazione del filamento trascritto dei geni attivi. La linea cellulare CSB difettiva mostrava un riparazione efficiente del danno a carico del DNA genomico totale, che raggiungeva livelli simili a quelli osservati nei fibroblasti normali; invece riguardo alla mappa del tasso di riparazione dei CPD nel gene JUN, la rimozione del danno risulta inefficiente nella regione che va dal nucleotide 105 al 40 a monte del promotore (posizioni da -105 a -40), mentre c'è un livello di riparazione ridotto del filamento trascritto a partire dalla posizione +20 proseguendo nella regione a valle. Tuttavia, una finestra di attività ripartiva residua resta nelle sequenze che circondano il sito di inizio della trascrizione, dalla posizione -40 alla posizione +20 della sequenza. E' come se il processo di TCR potesse essere ulteriormente suddiviso in due sottovie: una che coinvolge la riparazione preferenziale del filamento trascritto e dipende dall'RNA Polimerasi di allungamento; l'altra, selettiva per sequenze vicine al sito di inizio della trascrizione. Questo scenario implica pertanto, che il prodotto del gene *csb* non è richiesto per la riparazione di questi siti ma funziona specificamente nella riparazione di sequenze che l'RNA Polimerasi incontra quando si trova in modalità di allungamento, cioè a valle della posizione +20. Questo modello trova conferma con quanto avviene in *E. coli*, dove, in condizioni di trascrizione *in vitro*, la stimolazione della riparazione, da parte del fattore di accoppiamento trascrizione-riparazione nel filamento trascritto, inizia solo alla posizione +15 della sequenza [29]. Si ritiene che il fattore TFIIH venga rilasciato dal complesso dell'RNA Pol II quando la polimerasi lascia il promotore 30-60 basi a valle del sito di inizio della trascrizione. Questo potrebbe spiegare perché CSB non è richiesta per il rapido processo di TCR vicino al punto di inizio della trascrizione, ma solo nella regione codificante più a valle dove è di nuovo richiesto il caricamento di TFIIH nel complesso della RNA Pol II in fase di stallo. Studi di legame condotti *in vitro* con l'RNA Pol II bloccata, CSB e TFIIH indicano che CSB è in grado di legarsi a una polimerasi bloccata e reclutare TFIIH su questo complesso [27]. Per completare e concludere il discorso generale relativo all'efficienza filamento-specifica del NER, informazioni aggiuntive sono derivate da studi condotti nel lievito, dove si è visto che il tasso di

riparazione nel filamento non trascritto è indipendente dal fattore Rad26 (omologo di CSB), ma dipende invece dai fattori Rad7 e Rad16 che sono coinvolti nel GGR ed è significativamente influenzato dalla presenza dei nucleosomi. Infatti il tasso di riparazione sul filamento non trascritto è molto più basso a livello del core interno delle strutture nucleotidiche rispetto alle regioni comprese tra nucleosomi adiacenti. Al contrario, il tasso di riparazione del filamento trascritto sembra largamente indipendente dalla presenza e dalla posizione di quegli stessi nucleosomi.

Quasi tutti i modelli proposti per il TCR contemplano una fase di spostamento dell'RNA Polimerasi II dal sito lesionato. Teoricamente, ciò può essere ottenuto mediante diversi meccanismi. In *E. coli*, il fattore di accoppiamento trascrizione-riparazione (TCRF) dissocia dal DNA la polimerasi bloccata sfruttando la sua attività ATPasica DNA-dipendente. Questi dati sono stati usati per suggerire che le controparti eucariotiche CSB e Rad26 agirebbero in modo simile. Tuttavia vanno considerati due aspetti: il fatto che c'è una piccola omologia di sequenza fra TCRF e CSB/Rad26, e inoltre, poiché la fase di allungamento è più complessa negli eucarioti rispetto ai procarioti, non c'è ragione di aspettarsi che la dissociazione del complesso RNA Pol II di allungamento dal sito danneggiato sia un aspetto conservato del TCR. In effetti, CSB non pare essere in grado di dissociare il complesso bloccato in corrispondenza del danno *in vitro*. Inoltre, si potrebbe discutere se fattori come il fattore umano di rilascio della trascrizione 2- che è in grado di rilasciare sia l'RNA Pol I che l'RNA Pol II bloccate su siti danneggiati *in vitro*, e TFIIH, che è in grado di promuovere il movimento retrogrado dell'RNA Pol II bloccata *in vitro*, siano coinvolti nel TCR *in vivo* (Figura 5° e 5b). E' inoltre probabile che CSB (Rad26) utilizzi la sua attività ATPasica come membro della famiglia Snf2 per alterare l'architettura del complesso DNA-RNAPol II bloccato sul danno. E' stato dimostrato che CSB può consentire il rimodellamento dell'interfaccia DNA-Polimerasi sulla lesione. Pertanto, questa proteina può riarrangiare le interazioni tra l'RNA Pol II e il DNA danneggiato in maniera molto simile a ciò che fanno i complessi Swi/Snf all'interfaccia istoni-DNA (Fig. 5c). Questa ipotesi dell'alterazione dell'interfaccia RNA Pol II-DNA, mediata da CSB come evento biochimico importante del processo, potrebbe spiegare perché la riparazione mediante il TCR procede più velocemente di quello mediante il GGR. Infatti, una lesione che è esposta in un contesto di DNA a doppia elica già parzialmente sciolta dall'RNA Pol II, può costituire un substrato eccellente per il macchinario di riparazione, che può spiegare perché XPC, che è l'iniziatore generale del NER, non è richiesto nel TCR. Altri modelli propongono che CSB promuova il *bypass* del sito lesionato da parte della polimerasi, per mezzo della sua attività ATPasica intrinseca o con l'intervento di fattori accessori; in alternativa CSB potrebbe essere coinvolta nell'instaurarsi di una condizione in cui

l'RNA Pol II venga mantenuta a distanza grazie alla presenza di fattori che legano il danno (Fig. 5d e 5e) [27].

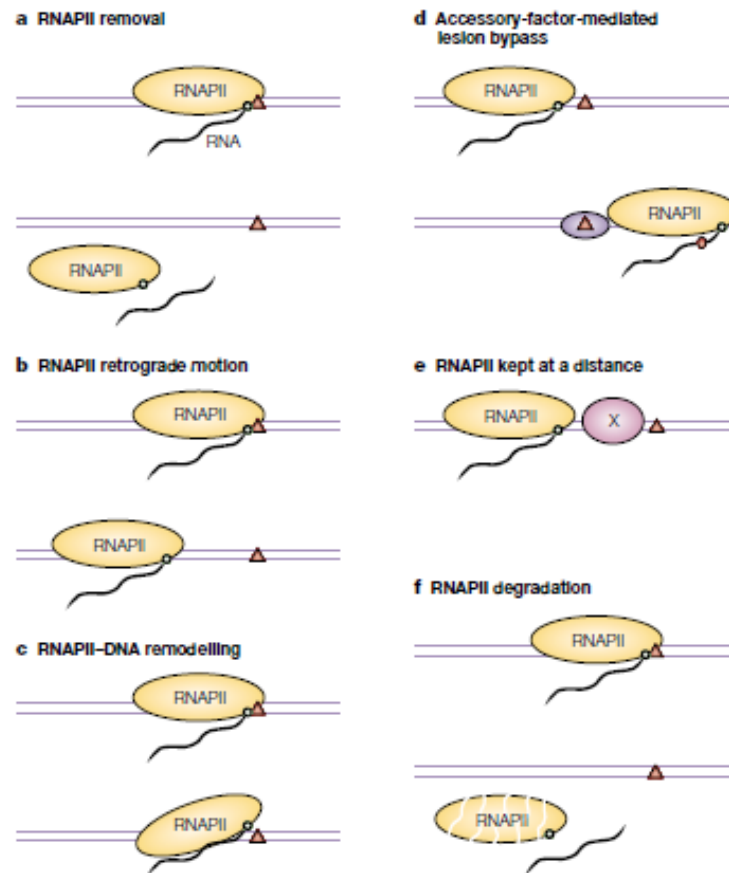


Fig. 5: **a)** dissociazione dell' RNAPol II dal sito del danno. Tale dissociazione potrebbe essere ottenuta mediante l' attività di CSB come membro della famiglia SWI/SNF2 o di un fattore di rilascio della trascrizione. **b)** l'RNAPII è allontanata dal danno. Ancora una volta, tale spostamento potrebbe essere effettuata mediante attività di CSB come SWI/SNF2 e/o l'uso di altre attività, come quella di TFIIS. **c)** Rimodellamento dell' interfaccia DNA danneggiato-RNAPII mediato da CSB. **d)** Il bypass di certe lesioni potrebbe essere promossa da fattori accessori. Anche in questo caso è possibile che sia coinvolta CSB con la sua attività di rimodellatore SWI/SNF. **e)** fattori di legame del danno che arrivano prima dell'RNAPII potrebbero facilitare la riparazione, mantenendo il polimerasi a distanza. **f)** Degrado delle RNAPII in fase di stallo a una lesione è un evento sconosciuto, ma è stata valutata l'importanza del TCR. (Svejstrup *et al.* 2002)

Altri modelli si basano sul fatto che l'RNA Pol II subisce delle modificazioni in seguito a trattamenti che possono portare al danneggiamento del materiale genetico. Trattamenti con raggi UV o cisplatino, che inducono lesioni che bloccano la Polimerasi II e sono rimosse dal TCR, inducono ubiquitinazione dell' RNA Pol II nei fibroblasti normali, ma non nei fibroblasti CSA o CSB difettivi

[30]. Circa il 7-10% del contenuto cellulare totale della subunità maggiore dell'RNA polimerasi II viene ubiquitinata nel giro di pochi minuti dopo che le cellule umane in coltura vengono esposte a raggi UV o all'agente chimico cisplatino, e a questa modificazione corrisponde una significativa riduzione transitoria nei livelli della subunità stessa, dal momento che nel giro di circa 16-24 ore, nuovi cicli di sintesi proteica ne restaurano il livello di base. Esistono forme fosforilate multiple dell' RNA Polimerasi II. Infatti, il dominio C-terminale (CTD) della subunità più grande della Polimerasi II va incontro a cambiamenti ciclici nello stato fosforilativo col succedersi delle varie fasi della trascrizione; esso passa da un stato ipofosforilato (Pol Iia), con cui di preferenza avviene il legame al promotore e l'inizio della trascrizione, a uno stato iperfosforilato, (Pol Iio), derivato dal processo di fosforilazione associato alla fase di allontanamento dal promotore e allungamento della trascrizione. Il CTD è un componente importante della subunità maggiore della polimerasi; esso è costituito da un eptapeptide con una sequenza consenso data dagli amminoacidi Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser che nei mammiferi è ripetuta 52 volte. Molte proteine coinvolte nella regolazione della trascrizione legano il CTD ed è probabile che il suo stato fosforilativo determini quali proteine si legheranno. E' stato dimostrato che la forma di RNA Pol II ubiquitinata identificata dopo circa 1-8 ore dal trattamento con una certa dose di raggi UV è quella che si trova in uno stato iperfosforilato, ed è quella i cui livelli risultano preferenzialmente ridotti in seguito al trattamento. L'ubiquitinazione sia *in vitro* che *in vivo* della subunità maggiore dell'RNA Pol II necessita dell'intervento di una ubiquitina ligasi altamente conservata, Rsp1, e comporta la rapida degradazione di questa subunità nei proteosomi. Così, le cellule che hanno subito un pesante trattamento con raggi UV, perdono temporaneamente una frazione considerevole di molecole di RNA Pol II, mediante il processo di degradazione proteosomale; ciò è supportato dal fatto che due inibitori dell'attività dei proteosomi, l'MG132 e la lactocistina, inibiscono questo processo di riduzione UV-dipendente del livello base della subunità maggiore della Polimerasi. Il coinvolgimento di CSB nell'ubiquitinazione dell'RNA Polimerasi è supportato dall'interazione preferenziale di CSB con la Polimerasi in fase di allungamento o in fase di stallo. E' significativo in proposito, il fatto che l'ubiquitinazione e la degradazione dell' RNA Pol II non avviene in maniera efficiente nelle cellule difettive per CSA o per CSB, suggerendo così che il TCR potrebbe coinvolgere la degradazione dell'RNA Polimerasi II di allungamento, cioè la subunità maggiore iperfosforilata,(Pol Iio), per consentire la sostituzione del complesso trascrizionale con il macchinario di riparazione sui siti lesionati (Fig.4f) [31]. Altri dati però, mettono in dubbio l'importanza di questa degradazione finalizzata alla riparazione preferenziale del danno al DNA,

sottolineando come nel lievito l'attività dell'ubiquitina ligasi Rsp5 non sembri essere richiesta per il TCR. Si ritiene pertanto che la degradazione dell'RNA Pol II bloccata sul sito di danno, possa essere un'alternativa al TCR, piuttosto che un prerequisito affinché avvenga il processo di riparazione. Quindi, dato il suo effetto potenzialmente dannoso, le cellule potrebbero aver evoluto una risposta duplice al blocco persistente dell'RNA Pol II in corrispondenza del danno: prima, esse tentano di riparare velocemente la lesione ostruente mediante il meccanismo di TCR, così che la trascrizione possa riprendere immediatamente; o in alternativa la polimerasi bloccata viene degradata. Questa degradazione fa abortire il complesso trascrizionale, ma almeno consente ad altri meccanismi di riparazione di rimuovere la lesione e mantenere l'integrità del genoma [27].

1.1.5 Risposta trascrizionale in assenza e in presenza di danno al DNA

Come già riportato, le cellule che presentano mutazioni a carico dei geni CSA e CSB non riescono a recuperare la sintesi dell'RNA in seguito al trattamento con i raggi UV. Tuttavia, ci sono dati che dimostrano che la trascrizione è compromessa in generale quando la proteina CSB è mutata, sia in presenza che in assenza di danno indotto da fonti esogene [27]. Diversi studi hanno dimostrato che un certo numero di proteine di riparazione del DNA sono essenziali per la funzione trascrizionale dell'RNA Polimerasi II; il fattore di trascrizione TFIIH contiene almeno due proteine note coinvolte nel meccanismo di riparazione per escissione di nucleotide, e forse di più. Altre proteine di riparazione possono essere associate in modo meno completo alle funzioni di TFIIH. Il grado di sovrapposizione e di collegamento tra la riparazione e la trascrizione del DNA rende difficile, quando non impossibile, distinguere chiaramente i due processi. In alcuni lavori è stato dimostrato che una forma mutata di TFIIH era in grado di inibire sia la trascrizione che la riparazione di cellule normali *in vitro*. Si intravede così, la prospettiva secondo cui un difetto primario nella trascrizione, piuttosto che un difetto primario nella riparazione del DNA, potrebbe essere la causa di specifiche condizioni cliniche che sono sempre state attribuite ai disturbi nella riparazione del DNA. La sindrome di Cockayne può rientrare in una condizione del genere. Diversi anni fa è stata formalizzata la nozione delle "sindromi della trascrizione", e diversi dati sono orientati in questo senso. Nel suo lavoro del 1997, Balajee dimostra chiaramente che nelle cellule CS, la trascrizione si presenta ridotta del 50% rispetto a quella di varie linee cellulari normali e rispetto a linee cellulari derivate da pazienti con Xeroderma pigmentoso del gruppo A (XP-A) [32]. Le analisi vengono condotte sia *in vivo* che *in vitro* usando approcci sperimentali differenti. Il

saggio di trascrizione della cromatina *in vitro* misurava essenzialmente la fase di allungamento del processo, a livello di quei siti trascrizionali che erano stati avviati alla trascrizione *in vivo*; i risultati mostravano che il tasso di allungamento della trascrizione nelle cellule CS-B era significativamente ridotto. In questo lavoro veniva fatto uso anche di cellule permeabilizzate, in cui veniva studiata la trascrizione nella frazione cromatinica in condizioni quasi fisiologiche; il vantaggio di questo sistema sperimentale risiedeva nel fatto che gli estratti cellulari potevano essere integrati con altri estratti cellulari o con componenti specifici, poiché la cromatina risulta prontamente accessibile ad una varietà di proteine e particolarmente adatta per i test di complementazione su cromatina intatta *in vitro*. Si analizzò la variazione delle attività che potevano essere modulate mediante l'estrazione differenziale delle proteine al variare della concentrazione salina del tampone. Nelle cellule normali, i livelli di trascrizione rimanevano essenzialmente gli stessi dopo la rimozione dalla cromatina di più dell'85% delle proteine solubili, mentre nelle cellule CS-B si registrava una riduzione drastica della trascrizione all'aumentare delle proteine rimosse. Nelle cellule normali i fattori coinvolti nell'organizzazione del complesso trascrizionale non sembravano venire facilmente solubilizzati, confermando osservazioni precedenti secondo cui i complessi trascrizionali sono fortemente adesi al nucleoscheletro. Non così per le cellule CS-B in cui la progressiva rimozione delle proteine portava ad un abbassamento critico dei livelli trascrizionali; così l'associazione tra il complesso trascrizionale e la cromatina poteva essere distrutta, dimostrando che nelle cellule CS-B l'organizzazione cromatinica è più lassa rispetto a quella delle cellule normali, e che un difetto nell'organizzazione della cromatina poteva rendere conto della riduzione dei livelli di trascrizione. Il difetto trascrizionale negli estratti cromatinici di CSB poteva essere riportato a livelli normali con l'aggiunta di estratti di cellule normali. Questo suggeriva che, piuttosto che essere presente un fattore inibitore della trascrizione, nelle cellule CS-B venivano persi alcuni fattori richiesti per la formazione e per il mantenimento di un complesso trascrizionale efficiente. In aggiunta, la trascrizione alterata poteva essere ristabilita quando le cellule venivano trasfettate con un cDNA del gene *csb*, dimostrando ulteriormente che le mutazioni a carico di questo gene sono direttamente coinvolte nel difetto a livello trascrizionale [32].

Pertanto, l'incapacità delle cellule di Cockayne di recuperare la sintesi dell'RNA in seguito al danneggiamento, non è dovuta esclusivamente all'inabilità di queste cellule di rimuovere le lesioni a carico del filamento trascritto dei geni attivi, ma è stato dimostrato che un difetto della proteina CSB altera la fase di allungamento della trascrizione da parte dell'RNA Polimerasi II. In quest'ottica

e alla luce dei dati derivati da numerosi studi, la proteina CSB funzionerebbe come un fattore di allungamento per l'RNA Pol II attiva sul DNA non danneggiato.

Per studiare l'effetto della proteina CSB sulla trascrizione guidata dalla RNA Pol II, Selby e Sancar, in un noto lavoro del 1997, hanno fatto ricorso ad un cosiddetto sistema trascrizionale ricostituito (RTS), contenente i fattori TFIIB, TFIIE e TFIIF ricombinanti, il fattore TFIIH umano nativo e l'RNAPII con un stampo che portava alla formazione di un trascritto lungo 112 nucleotidi, in cui veniva messa ad incubare la proteina CSB per diverso tempo [33]. E' risultato che CSB: i) aumentava il tasso di allungamento della trascrizione di 3 volte; ii) induceva il superamento dei siti di attenuazione della trascrizione, localizzati sull'unità trascrizionale maggiore, tardiva dell' elemento adenovirale presente nel costrutto utilizzato; iii) stimolava la fase di allungamento quando la trascrizione veniva eseguita su uno stampo privo del promotore, senza il bisogno di aggiungere i fattori basali della trascrizione. Inoltre, venne utilizzato un costrutto di DNA contenente un dimero di timina T<>T sul filamento stampo, che induce il blocco completo della Polimerasi in fase di allungamento; in base alle caratteristiche specifiche del costrutto utilizzato, dalla trascrizione derivavano prodotti trascrizionali multipli, in cui il più rappresentato era un trascritto che terminava un nucleotide prima del dimero di timina. La proteina CSB aggiunta a questo sistema trascrizionale contenente il danno, promuoveva l'allungamento della trascrizione stimolando di circa 3 volte l'attività dell' RNA Polimerasi II e inducendo l'inserimento di un nucleotide davanti al dimero di timina. Si osservò anche che la proteina CSB era capace di contrastare l'azione di accorciamento del trascritto nascente da parte del fattore TFIIS. TFIIS, induce l'RNA Pol II bloccata sul dimero di pirimidine, a digerire il suo trascritto nascente, rimuovendo alcuni nucleotidi, al fine di esporre la lesione agli enzimi di riparazione. Contrariamente a quanto ritenuto circa il coinvolgimento di CSB nell' affiancare questa azione, CSB risultava invece contrastare l'azione di TFIIS sull'RNA Pol II bloccata, mediante la conservazione dei nucleotidi terminali. Si ipotizzò che questo effetto anti-TFIIS, potrebbe costituire un altro modo in cui CSB favorisce la fase di allungamento della trascrizione da parte della RNA Pol II. Dati come questi hanno contribuito ad inquadrare la sindrome di Cockayne come malattia causata da un difetto trascrizionale, e suggeriscono tre ruoli indiretti della proteina CSB nel TCR. Primo, stimolando la fase di allungamento della trascrizione, CSB porterebbe ad un incremento della velocità con cui la polimerasi finisce con il bloccarsi sui siti lesionati, in questo modo, aumentando il segnale della presenza di un danno, verrebbe favorito la riparazione. Secondo, CSB potrebbe aumentare l'effettiva concentrazione dei fattori di riparazione sui siti lesionati, dal momento che CSB è capace

di interagire con XPA, TFIIH, XPG e con l'RNA Pol II. Infine, è possibile che con la sua azione, TFIIIS inibisca la riparazione; infatti, il NER inizia con la formazione di un'incisione sul filamento danneggiato, circa 2-10 posizioni al 3' rispetto alla lesione, e TFIIIS causa la degradazione del trascritto proprio davanti alla lesione. Accorciamento e allungamento ripetuti del trascritto possono inibire la riparazione, e CSB può posizionare e stabilizzare la polimerasi sul sito in cui si trova il dimero [33].

Quando le cellule CS vengono trattate con un agente che mima l'effetto dei raggi UV, l'NA-AAF, la sintesi dell'RNA non viene ripresa, nonostante gli addotti al DNA che ne derivano vengano riparati a velocità simili, e senza specificità di filamento, sia nelle cellule normali che in quelle Cockayne. Questi dati indicano che sebbene questi addotti al DNA non vengano rimossi più lentamente nelle cellule CS rispetto alle cellule normali, la loro induzione influenza severamente la capacità delle cellule Cockayne di recuperare la trascrizione anche dopo che è avvenuto la riparazione. In modo simile, estratti preparati da cellule normali e cellule CS raccolte un'ora dopo l'irradiazione con raggi UV, non riescono a supportare la trascrizione *in vitro*, neanche in un plasmide di DNA non danneggiato. Estratti di cellule normali raccolte diverse ore dopo l'irradiazione recuperano la capacità di sostenere la trascrizione, ma tale recupero non si osserva per gli estratti di cellule con sindrome di Cockayne. Ciò indica che le cellule reprimono globalmente la trascrizione in risposta al danno al DNA, e che le cellule CS sono difettive non solo nel riparare rapidamente le lesioni che ostacolano la trascrizione, ma anche nel ritornare alla trascrizione dopo che la riparazione è stata completata. Diversi meccanismi potrebbero spiegare il modo in cui la trascrizione viene soppressa durante il danneggiamento al DNA (Figura 6).

Mullenders e collaboratori hanno osservato che i livelli proteici della maggior parte dei fattori trascrizionali basali non sono influenzati dall'irradiazione con i raggi UV, ma che la forma ipofosforilata dell'RNAPII scompare specificamente dagli estratti nucleari e resta soltanto la forma iperfosforilata. Come già riportato, l'RNAPol II nella forma non fosforilata è necessaria per entrare nel complesso di pre-inizio della trascrizione che si forma a livello del promotore genico, mentre la fosforilazione dell'estremità carbossilica della subunità maggiore della RNA Pol II, avviene nella transizione successiva, quella che porta verso la fase di allungamento della trascrizione. I risultati ottenuti in questo studio dimostrano in modo inequivocabile, che la riduzione dell'attività trascrizionale può essere ottenuta anche in assenza di fotolesioni nel filamento stampo del DNA [34]. Poiché un processo trascrizionale attivo *in vitro* necessita di una fase di inizio efficiente, la ridotta attività trascrizionale osservata negli estratti nucleari di cellule irradiate con raggi UV, è

molto probabilmente il risultato di una fase di inizio compromessa. L'analisi dello stato fosforilativo della subunità maggiore dell'RNAPII avvalorava fortemente l'idea che nella condizione successiva all'irradiazione, la funzione di inizio della trascrizione venga alterata. Come si sa, almeno due forme della RNA Polimerasi II sono state identificate nelle cellule; una forma contenente la subunità CTD ipofosforilata, (Iia), e la seconda contenente la forma iperfosforilata di questo dominio (Iio). Lo stato fosforilativo correla con funzioni diverse delle due forme, poiché la forma ipofosforilata dell'RNAPII viene reclutata sul complesso di inizio, mentre il complesso di allungamento dell'RNA Polimerasi contiene il dominio CTD iperfosforilato. Analisi di Western blot di estratti nucleari rivelano che l'attività trascrizionale in vitro correla significativamente con la presenza della forma ipofosforilata dell'RNA Polimerasi II.

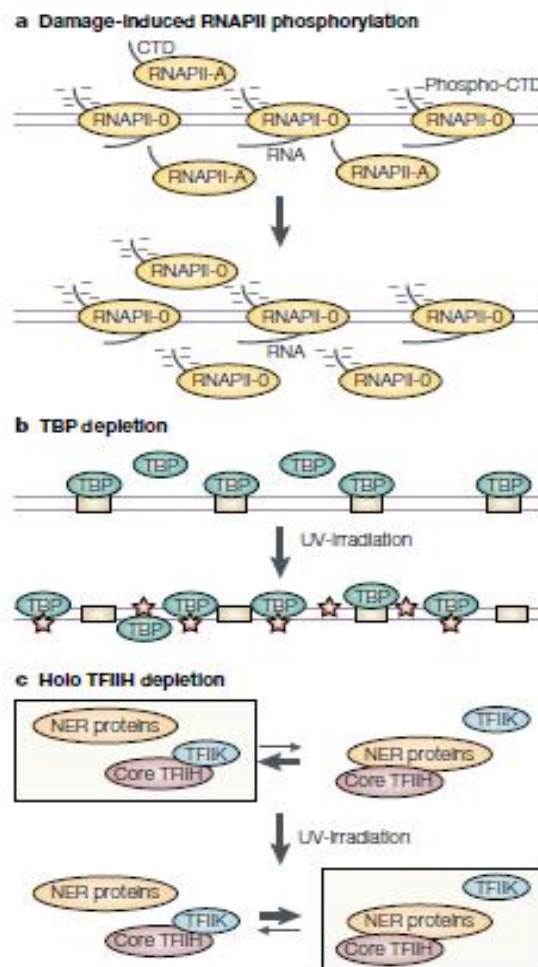


Fig. 6: **a)** il danno al DNA porta all'iperfosforilazione dell' RNA polimerasi II (RNAPII), che impedisce il suo inserimento in nuovi complessi di pre-apertura. **b)** Il danno al DNA sequestra la TATA-binding proteina (TBP), diminuendone la disponibilità per essere utilizzata nella trascrizione. **c)** La riparazione dei danni al DNA converte tutto il fattore TFIIH disponibile per la trascrizione/riparazione nella forma preposta alla sola riparazione, ed esclude la sua utilizzazione nella trascrizione.

Una simile osservazione ha portato ad ipotizzare che la riduzione dell'RNAPII in seguito all'irradiazione con UV potesse essere dovuta alla conversione della forma IIa in quella Ilo. Per prima cosa l'RNAPIIa era assente nella frazione cromatinica estratta dalle cellule irradiate con raggi UV, escludendo l'ipotesi che questa potesse venire intrappolata dalle fotolesioni indotte al DNA. In secondo luogo, l'impoverimento dell'RNAPIIa negli estratti nucleari, coincide con un incremento dell'RNAPIIo. Tali dati concordano con l'ipotesi secondo cui la repressione del processo di inizio della trascrizione negli estratti nucleari in seguito all'irradiazione, deriva dal declino della forma ipofosforilata della polimerasi, RNAPIIa. Nelle cellule non irradiate, la maggior parte dell'RNAPIIo risulta associata con la porzione cromatinica e si ritiene generalmente che questa frazione contenga l'RNA Polimerasi II di allungamento fortemente adesa al DNA. Lo scenario che si delinea sulla base di questi dati è il seguente: durante l'irradiazione con raggi UV, l'RNAPIIa viene consumata rapidamente con l'inizio della trascrizione, fosforilata, e successivamente durante la fase di allungamento, bloccata sui siti lesionati del DNA. Questi complessi di RNAPIIo bloccati, non vengono bersagliati per essere riciclati in RNAPIIa. Nelle cellule di Cockayne irradiate, il declino dei livelli di RNAPIIa procede nel tempo, portando infine al suo completo esaurimento [34].

Quindi secondo questo modello, l'inattivazione dell'RNAPII mediante fosforilazione potrebbe essere la causa della repressione della trascrizione successiva all'irradiazione.

Un secondo meccanismo deriva da una serie di evidenze sperimentali che indicano il coinvolgimento della proteina di legame della sequenza TATA del promotore, TBP, (dall'inglese *TATA-Binding Protein*), nella regolazione della trascrizione in risposta al danno al DNA. Egly e collaboratori hanno condotto esperimenti basati su saggi di trascrizione *in vitro*, in cui venivano usate unità trascrizionali non danneggiate come filamenti stampo, in presenza di DNA danneggiato – sia con raggi UV che con cisplatino – come competitore [35]. L'esistenza di strette connessioni tra i processi di riparazione per escissione,NER, e la trascrizione, ha indotto i ricercatori ad indagare sulla possibilità che il DNA danneggiato costituisca un sito ad alta affinità capace di sequestrare i fattori che intervengono nell'uno o nell'altro di questi processi.

La prima osservazione riguardava il fatto che l'aggiunta di DNA danneggiato – mediante trattamento con raggi UV o con cisplatino – all'estratto cellulare totale, era in grado di inibire la trascrizione su un filamento stampo di DNA indipendente e funzionalmente abilitato alla trascrizione. Per determinare gli specifici fattori di trascrizione coinvolti nell'indurre la perdita di attività trascrizionale in presenza di DNA danneggiato, i ricercatori, non potendovi risalire con

l'utilizzo dell'estratto cellulare totale, hanno utilizzato un sistema di trascrizione ricostituito (RTS), contenente i fattori altamente purificati TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH e l'RNA Polimerasi. Questo RTS veniva pre-incubato con il DNA danneggiato e veniva misurata la capacità di ciascun fattore purificato di ripristinare l'attività trascrizionale. Il risultato fu che l'aggiunta di TBP e, in misura minore l'aggiunta di TFIIB e TFIIH permetteva di ristabilire la trascrizione; tuttavia, l'aggiunta di TFIIH e TFIIB, sia da soli che in combinazione con TBP, non portava ad un livello significativamente più alto di ripristino dell'attività, rispetto a quello indotto dal solo TBP, suggerendo che questo rappresenti di fatto il fattore primario coinvolto.

L'interpretazione più probabile di questo effetto sulla trascrizione era che alcuni fattori fossero sequestrati per eventi di riparazione rendendoli non più disponibile per l'inizio della trascrizione. Di fatto, dai dati ottenuti con lo screening dei singoli fattori, si poteva dedurre che la soppressione della trascrizione derivasse almeno in parte dal sequestro della proteina TBP sui siti lesionati del DNA. In effetti, si osservava che la microiniezione della proteina TBP esogena, da sola, era in grado di superare la soppressione della trascrizione indotta dagli UV (cioè da un DNA competitore danneggiato con radiazione UV).

Si vide che la proteina TBP da sola o in associazione con il fattore associato a TBP, TAF (*TBP Associated Factor*), o anche TFIID, sia nel contesto di un estratto cellulare grezzo, e quindi in presenza di tutte le proteine di riparazione, che in presenza di tutti i fattori generali della trascrizione e l'RNA Polimerasi II, interagisce direttamente con il DNA danneggiato. Questa associazione sembra essere rapida e persistente, e si osserva anche in reazioni in cui è presente la sequenza TATA, indicando che le lesioni possono legare in maniera efficiente TBP anche in presenza del suo naturale, specifico, sito di legame. Inoltre, la forza dell'interazione tra TBP e il DNA danneggiato è funzione della natura della lesione, e delle sequenze fiancheggianti che contribuiscono in varia misura alla distorsione della doppia elica del DNA.

Accanto a queste osservazioni venne fatta l'analisi delle caratteristiche strutturali di tali interazioni, mediante la comparazione della struttura di un addotto del cisplatino su un oligonucleotide a doppia elica (DNA platinato), con la sua corrispondente sequenza TATA derivante da un complesso umano TBP-TATA. Entrambe le sequenze appaiono piegate verso il solco maggiore e parzialmente svolte senza distruggere lo schema Watson-Crick di legami idrogeno. Nel complesso TBP-TATA, il core a forma di sella del fattore TBP si avvolge attorno al DNA a livello del solco minore. La pronunciata curvatura è indotta dall'inserimento della catena laterale della fenilalanina nel primo e nell'ultimo passo dell'elemento TATA, ed è favorito

dall'intrinseca flessibilità delle sequenze TA. Nelle strutture con l'addotto del cisplatino, una curvatura simile viene prodotta dalla coordinazione dello ione platino con gli atomi di azoto N7 di due guanine adiacenti, sullo stesso filamento, che forza il disappaiamento delle basi complementari. Il risultato è che l'addotto del cisplatino mima la conformazione distorta della sequenza TATA quando si trova nel complesso con TBP. Il combaciare quasi perfetto tra il core della proteina TBP, come si osserva nel complesso con la sequenza TATA e con la sequenza platinata, sostiene fortemente i risultati ottenuti circa il legame specifico di TBP agli addotti del cisplatino. Nel primo caso, l'interazione TBP-TATA è un adattamento indotto, mentre nel secondo caso, TBP si lega ad un DNA piegato preformato secondo una modalità chiave-serratura. Piuttosto che la sequenza di basi in sé, TBP riconosce l'intrinseca ripiegatura della TATA box. E' l'apertura del solco minore indotta dalla proteina che favorisce una perfetta aderenza della superficie concava di TBP con il DNA; nel caso degli addotti con il cisplatino, il solco minore si trova già esposto, attraendo così il legame di TBP.

Il saggio di competizione *in vitro* ha mostrato anche che, non solo TBP, ma anche TFIIB e TFIIF, sebbene in misura minore, sono necessari per ripristinare l'attività trascrizionale precedentemente inibita dalla presenza del frammento di DNA danneggiato. Tuttavia, alcuni dati suggeriscono che l'associazione tra TFIIF e TFIIB alla lesione del DNA o con il complesso TBP-DNA danneggiato, è piuttosto debole rispetto alle interazioni che sono richieste per la formazione di un complesso trascrizionale attivo. Il parziale ripristino della trascrizione da parte di TFIIF e TFIIB potrebbe quindi riflettere qualche interazione con le lesioni o la capacità di questi fattori di scalzare il legame di TBP col DNA danneggiato [35]. Quindi, il sequestro della proteina TBP che va a legarsi direttamente al DNA lesionato, ne riduce la disponibilità per la trascrizione, determinando quella modulazione negativa del processo trascrizionale che si osserva quando il DNA subisce un danneggiamento.

Un terzo meccanismo deriva da esperimenti su sistemi di lievito *in vitro*. In quest'organismo i due processi, la riparazione mediante il NER e la trascrizione, risultano in competizione fra loro per le limitate disponibilità del fattore di trascrizione e di riparazione TFIIF. La capacità del NER di ridurre l'efficienza di trascrizione negli estratti di lievito, veniva mitigata da mutazioni a carico dei geni che codificano per i fattori basali del NER, come RAD14. Significativamente, la competizione veniva meno se il fattore TCR, RAD26, era assente, nonostante gli estratti rad26 riparano efficacemente il danno al DNA. In questo sistema, l'inibizione della trascrizione dovuta alla riparazione veniva specificamente ridotta mediante l'aggiunta del fattore TFIIF purificato nella forma

trascrizionalmente competente (detta holo-TFIIH), ma non dall'aggiunta del core di TFIIH. Questi indicano che Rad26 potrebbe consentire alla forma TFIIH competente per la riparazione di rendersi disponibile per la trascrizione. Un modello simile a questo è stato proposto per l'azione della proteina CSB [36].

1.1.6 Ruolo della proteina CSB nella riparazione del danno ossidativo

Relativamente alla risposta cellulare al danno ossidativo, uno dei primi importanti contributi sono stati forniti da Balajee nei suoi esperimenti del 1999 [37]. In seguito all'irradiazione con raggi UV, nelle cellule che non sono attive nella divisione, l'antigene nucleare della proliferazione cellulare, PCNA, forma un complesso insolubile con le sottostrutture nucleari. Ciò avviene con una cinetica che è due volte più bassa nelle cellule UV61 rispetto alle cellule murine normali e questo difetto può venire eliminato trasfettando le cellule con un gene csb umano normale. L'antigene PCNA può formare una sorta di morsetto trimerico scorrevole, che viene caricato sul DNA dal Fattore di replicazione C ed è coinvolto nella replicazione da parte delle Polimerasi δ ed ϵ che avviene durante la fase di risintesi del tratto mancante nel NER, nel processo BER diretto alla riparazione di lunghi tratti, nella riparazione post-replicativo e nella riparazione dei mismatch. Balajee ha analizzato l'induzione del complesso PCNA nelle cellule umane in risposta alla radiazione ultravioletta e al trattamento con perossido di idrogeno (H_2O_2), trovando che nelle cellule normali dopo somministrazione di raggi UV, si aveva un aumento dell'induzione del complesso di nove volte, rispetto ai fibroblasti CSB in cui questo aumento è invece di quattro volte. Il danno ossidativo indotto dal perossido di idrogeno, induce un incremento nella formazione del complesso PCNA di cinque volte nella frazione insolubile ai detergenti delle cellule normali. Tale induzione risulta 1,7 volte più bassa nelle cellule CSB-difettive. Questa ridotta formazione del complesso PCNA nelle cellule mutate per CSB, dopo il trattamento con H_2O_2 , indica chiaramente che in queste cellule è presente un difetto nella risposta al danno ossidativo [37].

Un consistente numero di lavori ha avuto come scopo quello di analizzare lo specifico ruolo della proteina CSB nel meccanismo di riparazione del danno ossidativo che può derivare da fonti cellulari endogene ed esogene [7]. Queste tipologie di danno al DNA, come l'ipoxantina che si può formare spontaneamente, le basi ossidate come l'8-oxo-guanina (8-oxo-G), le basi alchilate come la 3-metil-adenina, vengono riparate principalmente attraverso il meccanismo di riparazione per escissione delle basi, BER, dall'inglese *Base Excision Repair*, sebbene molte di queste lesioni

costituiscono substrati anche per il NER [38]. Una delle differenze fondamentali tra il NER e il BER è che il NER fa uso di un limitato numero di proteine per riconoscere molti diversi tipi di danno, mentre il BER usa varie proteine di riconoscimento del danno, ciascuna specifica per un numero assai limitato di lesioni (Figura 7). Nella prima fase del processo sono coinvolte le DNA glicosilasi specifiche per ogni tipo di lesione. La riparazione procede con l'azione della Endonucleasi 1 apurinica/apirimidinica (APE1), che lascia un'interruzione a singolo filamento sul DNA, che viene poi colmata dall'attività della DNA Polimerasi β (Pol β) e suturata dalla DNA ligasi.

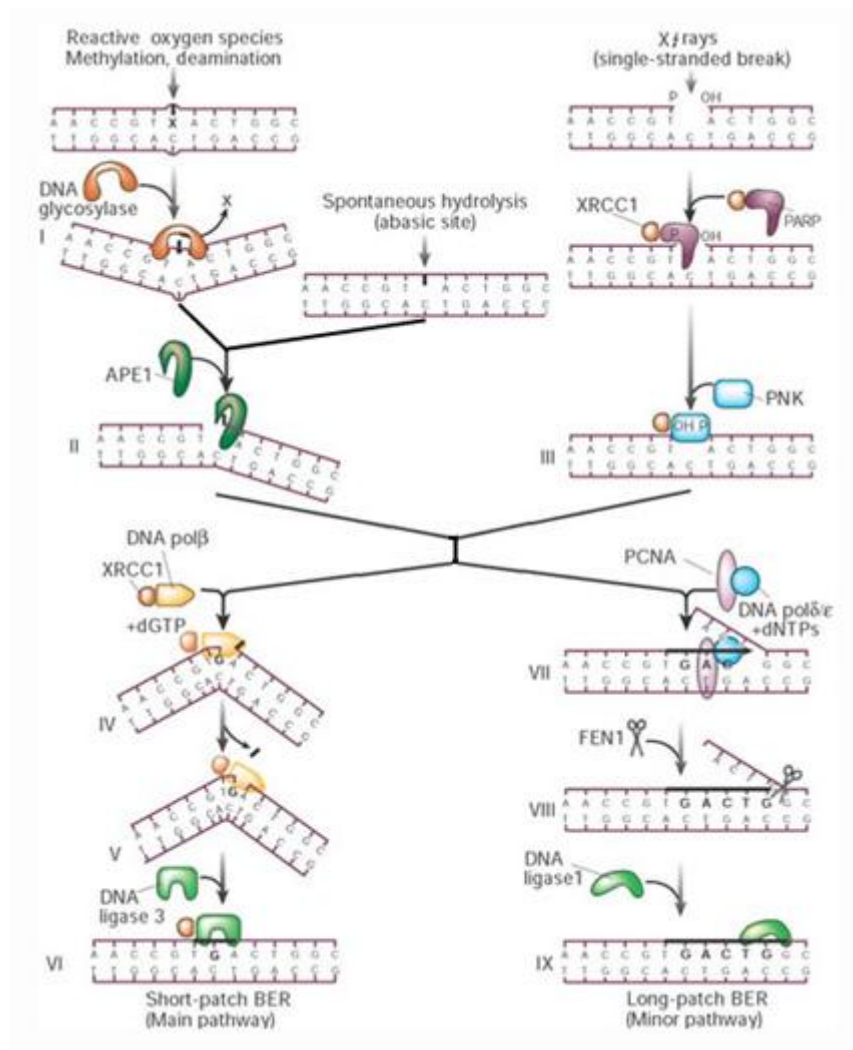


Fig. 7: Schematizzazione delle principali fasi del processo di riparazione del danno ossidativo al DNA

Diversi studi indicano che il BER va in contro a mutamenti legati all'invecchiamento in vari tipi di tessuto. Questi cambiamenti comprendono una riduzione dell'attività delle DNA glicosilasi o della Polimerasi β , e una riduzione con l'età, nei livelli delle proteine coinvolte o nell'espressione della Pol β e di APE1. Pertanto, un declino nella funzione del BER con l'età potrebbe contribuire all'accumulo di danno ossidativo e di mutazioni al DNA che favoriscono l'insorgenza dell'invecchiamento. Sebbene ci siano limitate evidenze che correlano la diminuzione nel contenuto e nell'attività di queste proteine centrali del BER con l'invecchiamento precoce, è probabile che difetti a carico di altri fattori che hanno funzioni ausiliari, non essenziali nel BER, contribuiscano significativamente alle caratteristiche dell'invecchiamento precoce.

Studi condotti a livello cellulare dimostrano, che nelle cellule CSB-difettive, in seguito a diversi stress di natura ossidativa, si rileva un accumulo di danno ossidativo al DNA, avvalorando così, l'idea di un importante ruolo della proteina CSB nel BER. Al fine di delineare i meccanismi molecolari che sottostanno al ruolo di CSB nella riparazione del danno ossidativo, sono stati usati diversi approcci biochimici. Nel 1999, Dianov dimostrò per la prima volta che le cellule mutate per CSB presentavano un difetto nel processo di incisione della 8-oxo-G [39]. Il ridotto riparazione di questa lesione, nelle cellule CSB mutate, risulta associata alla regolazione negativa dell'espressione del gene umano che codifica per la 8-oxoguanina DNA glicosilasi (hOGG1) e dei livelli della proteina stessa. Questo difetto viene compensato trasfettando le cellule CSB-difettive con il gene csb normale. Le cellule CSB mutate sono difettive anche nella riparazione dell' 8-oxo-A, un'altra lesione presente in abbondanza nel DNA con danno ossidativo, indicando che CSB potrebbe essere uno dei fattori importanti nella riparazione di questa specifica lesione [7].

Esperimenti condotti usando estratti cellulari derivati da linee cellulari umane con mutazioni a carico del gene csb dirette contro diversi domini ATPasici della proteina, hanno mostrato che i domini ATPasici V e VI di CSB sono importanti per il ruolo della proteina nel processamento della lesione 8-oxo-G, mentre solo il dominio VI sembra essere coinvolto nella riparazione della lesione 8-oxo-A [40]. E' anche possibile che CSB svolga un ruolo nella riparazione delle basi ossidate mediante la sua interazione con gli enzimi DNA glicosilasi specifici.

Nell'uomo, la glicosilasi OGG1 esiste nelle due isoforme, nucleare e mitocondriale, che vengono prodotte mediante splicing alternativo. Nelle cellule CSB-difettive si osserva un basso livello della proteina OGG1 mitocondriale (mtOGG1), ed è stata dimostrata una ridotta attività di incisione della lesione 8-oxo-G, sia negli estratti mitocondriali delle cellule CSB difettive, che in quelli derivati da cellule di fegato dei topi knockout per CSB; questi dati indicano un potenziale ruolo di

CSB nella riparazione delle basi ossidate a livello mitocondriale. Questa attività della proteina CSB nei mitocondri, sembra essere specifica per la riparazione della lesione 8-oxo-G, poiché le cellule CSB mutate hanno livelli di riparazione normali per l'attività di incisione dell'uracile, e dell'ipoxantina. Il mitocondrio possiede un macchinario BER indipendente, i cui componenti sono codificati dai geni nucleari e assomiglia al BER nucleare nelle principali fasi molecolari. Il BER mitocondriale svolge un ruolo cruciale nel proteggere l'integrità del DNA del mitocondrio (mtDNA); infatti, poiché i mitocondri rappresentano la fonte primaria di ROS endogeni, l'accumulo del danno ossidativo e le mutazioni a carico del mtDNA possono portare a gravi disfunzioni mitocondriali e di conseguenza alla morte cellulare [41]. Alcuni aspetti clinici caratteristici della sindrome di Cockayne, coincidono con i fenotipi associati alle disfunzioni mitocondriali, come le severe disfunzioni neurologiche, le disfunzioni a carico dei muscoli scheletrici e l'invecchiamento precoce. E' stato precedentemente proposto un quadro secondo il quale, le cellule difettive per CSB accumulano mutazioni nel DNA mitocondriale e sviluppano disfunzioni a livello del mitocondrio che contribuiscono al caratteristico fenotipo e alla progressione della malattia nei pazienti CS-B [42].

Oltre che mediante saggi di incisione *in vitro*, il ruolo di CSB nella riparazione del danno ossidativo è stato esaminato anche *in vivo*, mediante lo studio del processo di rimozione dei siti sensibili alla formamidopirimidina DNA glicosilasi (FPG) nel genoma delle cellule CS-B, in seguito all'induzione del danno al DNA con fotosensori attivati dalla luce come l'arancio di acridina o il blu di metilene. Questi agenti chimici introducono principalmente lesioni 8-oxo-G. La FPG è una glicosilasi di *E.coli* che rimuove le lesioni 8-oxo-G e la formamidopirimidina, in seguito all'introduzione di un taglio del filamento di DNA. E' stato dimostrato che l'espressione del gene *csb* normale o mutato a livello del dominio ATPasico II, aumenta il tasso di riparazione dei siti FPG sensibili nel mtDNA delle cellule CSB difettive. Inoltre, estratti mitocondriali derivati da queste cellule CSB mutanti, difettive per l'attività ATPasica, sembrano capaci di stimolare la riparazione dei siti FPG sensibili, o l'incisione della 8-oxo-G allo stesso modo degli estratti di cellule con proteina CSB normale, indicando che questo dominio o in generale l'attività ATPasica della proteina CSB non è necessaria per la riparazione del danno ossidativo delle basi a livello mitocondriale [42].

Sebbene queste osservazioni suggeriscano che CSB è coinvolta nel processo di incisione delle basi ossidate, il meccanismo preciso con cui CSB partecipa alla riparazione delle lesioni 8-oxo-G sia nel DNA nucleare che in quello mitocondriale, non è del tutto chiaro. Nonostante CSB influenzi la funzione dell'enzima hOGG1, non sembra instaurarsi un'interazione fisica diretta tra CSB e hOGG1,

anche se le due proteine sono presenti nello stesso complesso proteico. CSB, inoltre, pare stimolare l'espressione stessa di hOGG1, ma non è stato ancora possibile dimostrare la presenza di CSB nel mitocondrio. Alcuni lavori, sostengono invece, che CSB operi in maniera indipendente da OGG1 nel rimuovere le 8-oxo-G dal genoma complessivo [43].

La proteina CSB, interagisce con numerose proteine coinvolte nella via di riparazione del BER, inclusa la Poli ADP ribosio polimerasi 1 (PARP-1) e APE1. PARP-1 è una proteina di monitoraggio del danno al DNA, molto abbondante nel nucleo, che può essere considerata come un sensore molecolare. La proteina PARP-1 si lega con elevata affinità, alle rotture a singolo filamento del DNA (*single strand break* SSBs) e viene attivata da questo legame. Una volta attivata, PARP-1 aggiunge polimeri di ADP-ribosio a varie proteine usando il NAD^+ come substrato. CSB interagisce con PARP-1 *in vivo*, sia in assenza che in presenza di stress ossidativo, ed è interessante il fatto che il complesso CSB/PARP-1 si trasferisce sui siti danneggiati del DNA nelle cellule che hanno subito uno stress ossidativo. E' stato, quindi, proposto che la stimolazione del BER da parte di PARP-1 dipenda in qualche misura da CSB [44]. La proteina CSB, è in grado di interagire anche con l'enzima APE1, stimolando la sua attività di incisione dei siti AP in maniera ATP dipendente. Alcuni dati hanno suggerito l'idea per cui l'interazione CSB-APE1 sia maggiormente critica nelle regioni del genoma in cui si formano complesse conformazioni strutturali del DNA, come durante la replicazione o la trascrizione, o a livello dei siti di ricombinazione, dove la relativa, locale concentrazione di queste proteine potrebbe essere più alta. Pertanto, in aggiunta alla coordinazione con le DNA glicosilasi nella riparazione del danno endogeno alle basi e con PARP-1 nella risposta al danneggiamento del DNA, l'interazione con APE1 suggerisce per CSB una funzione più generale nel modulare i processi coinvolti nel BER [45] .

In più occasioni è stato proposto che il danno ossidativo al DNA possa venire riparato anche attraverso il TCR, e che il difetto nella riparazione del danno ossidativo per questa via, potrebbe essere alla base del disordine neurologico progressivo osservato nei pazienti Cockayne. Questo aspetto della questione risulta piuttosto controverso. Un modello propone che la riparazione mediante TCR del danno ossidativo potrebbe essere indotto dall'arresto dell'RNA Polimerasi a livello delle basi ossidate del DNA, in modo tale che l'avviamento del processo deriverebbe dalla presenza di una RNAPol II bloccata in corrispondenza di una lesione situata sul filamento trascrizionalmente attivo del gene. Tuttavia, esistono alcune discordanze tra i vari studi effettuati in questa direzione, nel dimostrare la capacità delle lesioni ossidative, di bloccare l'RNA Pol II durante la trascrizione. Alcuni studi mostrano che l'RNA Pol II è in grado di bypassare una lesione

8-oxo-G, che è una lesione non-ostruente, riparata mediante il BER, mentre altri studi mostrano un blocco parziale dell'RNA Pol II [46] [47]. Alcuni ricercatori sostengono che la riparazione della 8-oxo-G sul filamento trascritto, è il risultato di una competizione tra i componenti del BER e del TCR, il cui esito dipende da quali enzimi vengono a trovarsi per primi in corrispondenza della lesione. C'è una particolare classe di lesioni ossidative endogene che riescono a bloccare la trascrizione da parte dell'RNA Pol II e sono riparate mediante il NER, che sono gli 8,5'-ciclopurine-2'-deossinucleosidi. Queste lesioni non vengono riparate attraverso il BER a causa del legame covalente 8,5'. Si ritiene che l'accumulo di queste lesioni possa causare un blocco della trascrizione che induce morte neuronale, e che questa sia la possibile causa della neurodegenerazione osservata nello Xeroderma Pigmentoso. Di conseguenza, anche nelle cellule CSB difettive, incapaci di riparare questo tipo di lesioni, il loro accumulo può contribuire al fenotipo neurologico della sindrome di Cockayne [38].

1.1.7 Interattori noti di CSB

Molti studi si sono concentrati sullo studio delle proteine che interagiscono con CSB, a volte con risultati contraddittori [2].

La prima più importante proteina da considerare è la proteina CSA, espressa dal gene ERCC8/CSA che è il gene mutato nei pazienti con sindrome di Cockayne appartenenti al gruppo di complementazione A. Il gene è situato sul cromosoma 5q12-q31 e codifica per una proteina di 46 kDa con cinque motivi WD40 ripetuti. Le proteine che costituiscono questa famiglia sono funzionalmente diverse, con ruoli nella trasduzione del segnale, nel processamento dell'RNA, nella trascrizione generale e nella divisione cellulare, ma condividono una struttura simile. L'unica struttura cristallografica risolta è quella della subunità G β delle proteine G eterotrimeriche. Le cellule difettive per CSA condividono molte caratteristiche cellulari con le cellule CSB difettive e presentano un'inibizione del recupero della sintesi di RNA e del TCR dopo somministrazione di raggi UV. CSA interagisce con XAB2, *in vitro* ed *in vivo* e con la subunità p44 del fattore TFIIH *in vitro*. Di recente è stata mostrata anche un'interazione con il dominio N-terminale della topo isomerasi I. CSA è stata trovata in un complesso con DDB1, Cul4A, Roc1 e CSN. Questo complesso possiede attività di ubiquitina ligasi, regolata in maniera UV-dipendente. Non sono state trovate interazioni con p62, XPD, XPB o XPG.

In merito all'interazione tra le proteine CSA e CSB esistono risultati contrastanti. In alcuni studi, è stata trovata un'interazione mediante tecniche di co-immunoprecipitazione (co-IP) delle proteine tradotte, *in vitro*, che sembrerebbero supportati da uno studio su doppi ibridi nel lievito [48]. Tuttavia, nessuna interazione è stata trovata usando la tecnica co-IP su estratti cellulari totali, filtrazione su gel e co-purificazioni. CSA e CSB non sembrano colocalizzare all'interno del nucleo quando viene usata l'immunofluorescenza, e CSB può essere isolata in un grosso complesso in cui non si ritrova CSA. Pur implicando la mancanza di una forte interazione diretta, questi risultati non escludono la possibilità di un'interazione debole e transitoria tra le due proteine, probabilmente indotta dal danneggiamento al DNA. CSA viene traslocata nella matrice nucleare in seguito al danno, in maniera CSB-dipendente, dove essa interagisce con l'RNA Pol Iio [49]. Oltretutto, il complesso che contiene CSA interagisce con l'RNA Pol Iio dopo l'irradiazione con luce UV.

Il gene XPB, localizzato sul cromosoma 2q21, codifica per un polipeptide di 89 kDa. Mutazioni a carico di questi geni provocano la malattia di tipo XPB/CS, o la tricotiodistrofia TTD. La proteina XPB è una elicasi 3'-5' ed è una delle nove subunità di TFIIH. XPB funziona come parte del fattore TFIIH nell'inizio della trascrizione dell'RNA Pol I e II e nella fase di svolgimento del DNA nel NER. Attraverso l'uso di un *tag* di proteina fluorescente verde (GFP-tag), si è visto che la proteina XPB è omogeneamente distribuita nel nucleoplasma, con un particolare arricchimento a livello dei nucleoli. La localizzazione nucleolare risulta abrogata dall'irradiazione con raggi UV. XPB interagisce con la subunità XPD di TFIIH, con p62, p44, p34 e con XPG. Si è visto che XPB e CSB interagiscono; un'interazione è indicata anche dalla capacità di un fattore contenente XPB di spostare un complesso di allungamento RNA Pol II:DNA:RNA:CSB solo quando in esso è contenuta la proteina CSB. Alcuni ricercatori hanno trovato che usando la cromatografia le proteine XPB e CSB sono frazionate in maniera differenziale. Al contrario, altri studi recenti riportano la colocalizzazione di XPB con CSB e l'RNA Pol I in preparazioni di matrice nucleare e identificano XPB in complessi contenenti CSB immunoprecipitati a concentrazioni saline fisiologiche [50].

XPD è un'elicasi simile a XPB, ma con direzionalità opposta, 5'-3'. E' anche una subunità di TFIIH e partecipa agli stessi processi menzionati per XPB. Il gene è localizzato sul cromosoma 19q13.2-q13.3 e quando è mutato da origine a uno dei tre disordini: XP, TTD o XPD/CS. Come XPB, essa interagisce con alcune altre subunità di TFIIH, chiamate p62, p44 e p34 e può coprecipitare con XPG *in vitro*. XPD non viene purificato insieme con CSB. Tuttavia, XPD può essere trovato nello stesso grosso complesso contenente CSB con cui si è visto interagire anche XPB. Questo complesso sembra essere in grado di sostituire il fattore TFIIH nella trascrizione e nel saggio di incisione in

vitro. E' stato proposto che mutazioni a carico di XPB e XPD, che possono portare entrambe a un parziale fenotipo CS, potrebbero destabilizzare questo complesso e perciò compromettere la funzione di CSB [50].

XPG è il terzo gene le cui mutazioni possono dare origine a un fenotipo intermedio XP/CS. E' localizzato sul cromosoma 13q33 e codifica per una DNA endonucleasi responsabile dell'incisione al 3' della lesione al DNA nel processo di riparazione mediante il NER. In tutti i casi riportati, le mutazioni nel gene XPG, producono una proteina trunca severamente compromessa nelle sue funzionalità, mentre in un caso è stata trovata una proteina integra con una mutazione che abolisce la sua attività endonucleasica. E' stato suggerito che la proteina XPG può stimolare l'attività di incisione della DNA glicosilasi Nth1, che è coinvolta nella riparazione mediante BER del danno ossidativo *in vitro*. Sono state dimostrate le interazioni tra XPG e XPB, XPD, p62 e p44. Usando la tecnica di co-IP *in vitro*, è stata mostrata l'interazione tra XPG e CSB, ma esse non co-purificano né co-precipitano dagli estratti cellulari totali derivati dalle HeLa [51]; tuttavia, XPG prende parte al grande complesso contenente CSB. Le mutazioni che producono il troncamento severo della proteina possono potenzialmente destabilizzare questo complesso, come osservato nel caso di XPB e XPD.

Il gene XPA è coinvolto nelle fasi precoci del NER, ma il suo ruolo preciso non è ben chiaro. Si ritiene che contribuisca al riconoscimento del danno al DNA e che sia necessario sia per il GG-NER che per il TC-NER. La proteina XPA interagisce con altre proteine del NER, tra cui TFIIH, XPF/ERCC1 e RPA. XPA è stato trovato in interazione con una proteina prima sconosciuta, XAB2. Un'interazione tra CSB e XPA potrebbe teoricamente fornire il collegamento tra il TCR e un fattore precoce classico del NER. Tuttavia, ciò è stato provato mediante due metodi differenti, con risultati contrastanti.

Come suggerito dal suo ruolo nella trascrizione e nella riparazione, CSB interagisce con la RNA Pol II, *in vitro* e risiede in un grosso complesso in comune con essa. La proteina CSB interagisce con la Polimerasi I α e I β , con una preferenza per la Polimerasi I β . La proteina CSB è coinvolta anche nella trascrizione da parte dell'RNA Pol I ed è stata trovata in un complesso contenente la proteina RPA 116 (dell'RNA Polimerasi I) e TAF₆₈, ma senza RPB1 (dell'RNA Pol II) né TAF₁₂₅. Queste discrepanze si spiegano considerando il fatto che CSB si trova nel complesso con RNA Pol I quando viene purificata usando il KCl 150mM, mentre si trova nel complesso con l'RNA Pol II quando viene usato il KCl 50 mM. E' possibile che le variazioni dipendenti dalla concentrazione salina dell'

associazione di CSB con questi complessi, rifletta le differenze nella concentrazione osmotica tra il nucleolo e le regioni trascritte dall'RNA Pol II [50].

I complessi contenenti CSB isolati a concentrazioni saline fisiologiche, contengono anche le subunità p44 e p62 di TFIIH. Tutte e due interagiscono con XPB, XPD, XPG, mentre soltanto p44 interagisce direttamente con CSA.

E' stato riportato che CSB interagisce con la subunità p34 del fattore TFIIIE, con il soppressore tumorale p53 e con la coda N-terminale delle proteine istoniche. Di recente, p53 è stata proposta come fattore di accessibilità alla cromatina durante il processo di riparazione GG-NER. Il rilassamento della cromatina viene iniziato probabilmente dal blocco di un complesso RNA Polimerasi attivo nella trascrizione, ma è indipendente dal processo di riparazione TCR e dalle funzioni di CSB.

Diverse proteine sono state saggiate per la loro capacità di interagire con la proteina CSB con esito negativo, tra cui la subunità p56 di TFIIIE, TFIIF, RPA e XPC/ERCC1. Riassumendo, CSB interagisce fisicamente con CSA, con l'RNA Pol II, XAB2, gli istoni, TFIIIE e p53 e può trovarsi in complessi con XPA, XPB, XPD, XPG, RNA Pol I e le subunità p44 e p62 di TFIIH [2].

1.1.8 Ruolo di CSB nella risposta apoptotica.

Considerando che il DNA di una cellula diploide umana ha una lunghezza di circa 2 metri e che la molecola è impacchettata in una struttura cromatinica complessa attraverso l'interazione con le proteine istoniche, ci si potrebbe chiedere come possa la cellula analizzare il proprio DNA alla ricerca di eventuali lesioni e determinare la severità del danno. La replicazione e la trascrizione sono due processi che spogliano il DNA del suo rivestimento istonico e scorrono il DNA separando i due filamenti accoppiati. Mentre la replicazione avviene soltanto nelle cellule in attiva proliferazione, e in particolare durante la fase S del ciclo cellulare, la trascrizione genica si realizza sia nelle cellule in proliferazione che non, e durante ogni fase del ciclo cellulare, eccetto che durante la mitosi, quando la cromatina si trova al massimo grado di condensazione e la trascrizione è soppressa. Per questo, il macchinario della trascrizione potrebbe essere utilizzato dalle cellule per monitorare l'integrità del DNA e per attivare la segnalazione relativa al danno. Inoltre, la trascrizione potrebbe essere considerata e agire come un dosimetro, per cui la severità del danno, la capacità di rimuovere le lesioni e la cinetica del recupero della sintesi dell'mRNA andranno a determinare se le cellule vivono o muoiono [52].

La trascrizione, negli eucarioti, viene realizzata da tre differenti RNA Polimerasi: la RNA polimerasi I trascrive il DNA ribosomiale in RNA ribosomiale usato per la produzione dei ribosomi; l'RNA Polimerasi II trascrive i geni in mRNA; e l'RNA Polimerasi III sintetizza l'RNA transfer e i piccoli RNA nucleari. Sebbene l'RNA Polimerasi I e III trascrivono il DNA a livelli elevati, l'estensione del DNA genomico trascritto è piuttosto ridotta in confronto con la lunghezza dell'mRNA dei geni trascritti dalla RNA Polimerasi II. Perciò ci si aspetta che l'RNA Polimerasi II passi in rassegna una porzione molto più grande del genoma rispetto alle altre due polimerasi, e possa per questo essere considerata un sensore migliore rispetto alle altre due RNA Polimerasi. Per di più, quando i complessi di RNA Polimerasi II sono bloccati sui siti di DNA lesionati, essi sono in grado di reclutare le proteine di riparazione del DNA, per avviare il processo TCR per la rimozione delle lesioni ostruenti, cosa che non sembra essere associata con le RNA Polimerasi I e III. Per queste ragioni l'RNA Polimerasi II risulta perfettamente adatta ad agire come sensore per le alterazioni a carico del DNA sul filamento stampo e allertare la cellula mediante l'attivazione delle vie che segnalano la presenza del danno [52].

Le lesioni al DNA che bloccano la fase di allungamento dell'RNA Polimerasi II possono avere severe conseguenze per le cellule, come l'induzione dell'apoptosi. Per contrastare l'apoptosi, le lesioni bloccanti la trascrizione vengono rimosse mediante TCR. Il blocco della trascrizione, innesca anche l'attivazione della risposta al danno al DNA che coinvolge il soppressore tumorale p53.

La sorveglianza e la riparazione del DNA sono fasi particolarmente importanti per le cellule in attiva proliferazione, prima che il DNA venga replicato nella fase S o che avvenga la segregazione dei cromosomi durante la mitosi. Un certo numero di proteine di segnalazione del danno, si sono evolute per mantenere le cellule bloccate in corrispondenza di specifici punti del ciclo cellulare per concedere alle cellule più tempo per riparare il proprio DNA prima di entrare nella fase S o nella mitosi. Esiste un fine equilibrio tra la riparazione delle lesioni che bloccano la trascrizione mediante il TCR per evitare l'apoptosi e la conseguente perdita di segnalazione del danno. Se il TCR è troppo efficiente, le cellule sopravvivono, ma potrebbero non avere il tempo sufficiente per riparare tutte le lesioni prima che queste vengano permanentemente fissate con la replicazione, una condizione, questa, che promuove la cancerogenesi. D'altra parte, un processo di TCR poco efficiente potrebbe portare a un'eccessiva morte per apoptosi, condizione che promuove il processo di invecchiamento [52].

Il danno al DNA può essere classificato come citotossico o mutagenico. Il danno citotossico al DNA, che include le lesioni ingombranti, i ponti interfilamento e le rotture a doppio filamento,

interferiscono con la trascrizione, la replicazione e la segregazione corretta dei cromosomi. Le lesioni mutageniche, invece, sono lesioni che non necessariamente interferiscono con i processi metabolici del DNA, ma che se non rimosse prima della replicazione possono causare errori di codifica della sequenza nucleotidica che portano a mutazioni e conseguentemente alla carcinogenesi. I meccanismi di segnalazione del danno al DNA sembrano essersi evoluti principalmente per rispondere alle lesioni di natura citotossica, mentre i meccanismi di riparazione si sono evoluti per fronteggiare entrambe le classi di lesioni al DNA.

Le lesioni stericamente ingombranti come i dimeri di pirimidina indotti dai raggi UV e gli addotti del cisplatino, che causano una consistente distorsione all'elica del DNA, possono agire sia come lesioni citotossiche che mutageniche a seconda della loro localizzazione nel genoma. Se sono situate sul filamento trascritto dei geni attivi, esse risultano citotossiche, poiché sono in grado di indurre l'apoptosi mediante il blocco della trascrizione. La citotossicità di queste lesioni viene soppressa mediante la loro rimozione attraverso il TCR, mentre lesioni simili altrove nel genoma vengono rimosse mediante l'altro sistema NER, la riparazione del genoma globale GGR. Pertanto, la funzione del TCR è primariamente quella di contrastare la segnalazione dovuta al danno al DNA e bloccare così l'apoptosi, mentre il GGR rimuove le lesioni pre-mutageniche e quindi reprime la carcinogenesi [52].

La proteina con funzione di soppressore tumorale, p53, ha un ruolo importante nel determinare il destino delle cellule in seguito all'esposizione al danno al DNA e a vari tipi di stress cellulari. In seguito a questi insulti, la proteina p53 si accumula all'interno del nucleo dove agisce come fattore di trascrizione nei confronti di specifici geni target. A seconda del tipo cellulare, e del livello di danneggiamento indotto, p53 può aumentare la sopravvivenza delle cellule colpite, mediante la trans-attivazione dei geni che codificano per enzimi di riparazione del DNA e inibitori del ciclo cellulare, o indurre le cellule al suicidio per apoptosi. In entrambi i casi, il risultato è quello di reprimere la mutagenesi e la successiva cancerogenesi. Diversi studi che hanno fatto uso di linee cellulari umane con specifici difetti nei processi di riparazione TCR e GGR, come fibroblasti primari provenienti da pazienti affetti da Xeroderma pigmentoso e sindrome di Cockayne, hanno dimostrato che il meccanismo che porta all'accumulo di p53 e all'apoptosi in seguito all'irradiazione con raggi UV, è dipendente dal danno al DNA [53]. Inoltre, l'attivazione di p53 e dell'apoptosi non dipende dalle rotture introdotte sul filamento di DNA dal processo stesso di riparazione del DNA, ma piuttosto, dipende dalle lesioni persistenti in modo specifico sul filamento trascritto dei geni attivi. Altri studi che hanno usato fibroblasti umani trattati con agenti che

inducono lesioni ingombranti al pari dei raggi UV, hanno mostrato che l'accumulo di p53 e l'apoptosi sono indotte a dosi molto più basse nelle cellule che sono difettive nel processo di rimozione delle lesioni ostruenti la trascrizione, rispetto alle cellule competenti. Queste osservazioni, secondo cui il danno persistente sul filamento trascritto attiva p53 e l'apoptosi, è stato confermato in esperimenti che hanno fatto uso di modelli murini con specifici difetti genetici nel GGR e nel TCR. Nei topi con un difetto a carico del processo TCR, ad esempio topi knockout per il gene *csb* (*Csb*^{-/-}) e per il gene *Xpa* (*Xpa*^{-/-}), lo sviluppo di una reazione cutanea come un' eritema solare, dovuta all'apoptosi, si verifica a dosi di raggi UV-B molto più basse rispetto ai corrispettivi animali normali. In aggiunta, questa elevata ipersensibilità all'induzione di p53 dovuta ai raggi UV, è stata osservata nei topi *Csb*^{-/-} e *Xpa*^{-/-}, ma non nei topi knockout per il gene *Xpc* (*Xpc*^{-/-}), che sono competenti per la riparazione mediante TCR, ma difettivi per il GGR. L'ipersensibilità alla luce ultravioletta correla strettamente con la ridotta capacità di queste cellule di recuperare la sintesi dell' RNA in seguito all'irradiazione [54].

Molti complessi RNA polimerasi II in genere si arrestano brevemente dopo l'inizio della trascrizione. Perciò, ci si potrebbe chiedere come fanno le cellule ad evitare l'induzione di p53 e dell'apoptosi in queste situazioni. Pare che ci sia una differenza nella segnalazione che si attiva in risposta agli stress, indotta in seguito all'arresto dell'RNA Polimerasi II nelle fasi precoci del ciclo di trascrizione, rispetto all'inibizione della fase di allungamento della trascrizione.

L'inibizione della trascrizione durante la fase di allungamento, comporta l'accumulo all'interno del nucleo della proteina p53 modificata a livello della serina 15 e della lisina 382. Queste modificazioni post-traduzionali sono normalmente associate alla stabilizzazione della proteina. Al contrario, l'inibizione dell'RNA Polimerasi II nella fase di transizione fra l'inizio e l'allungamento della trascrizione attraverso l'inibizione della fosforilazione del dominio carbossilico della RNA Polimerasi II, determina l'accumulo della proteina p53 nel nucleo senza la concomitante fosforilazione a livello della serina 15 né acetilazione della lisina 382 di p53 [55]. Pertanto, sembra che solo dopo che l'RNA polimerasi II viene completamente fosforilata a livello del suo dominio carbossi-terminale e sia stata coinvolta nel processo di allungamento, il blocco va ad innescare l'induzione della via di risposta allo stress che risulta nelle modificazioni post-traduzionali della proteina p53. In questo modo le cellule evitano l'attivazione inappropriata di una risposta da stress, consentendo il normale stallo dei complessi di RNA Polimerasi II in prossimità del promotore.

Alcune linee di ricerca si sono poste come obiettivo quello di studiare in che modo possa verificarsi l'accumulo della proteina p53 nel nucleo senza che questa venga fosforilata al livello della serina 15, e hanno posto l'attenzione sul principale regolatore dei livelli di p53, MDM2.

La proteina MDM2 è un regolatore chiave della localizzazione e della stabilizzazione di p53, partecipando direttamente nel processo di esportazione di p53 dal nucleo. Si è visto che il livello cellulare di MDM2, diminuisce rapidamente in seguito al blocco della trascrizione. Di conseguenza, è possibile che l'accumulo di p53 in seguito al blocco della trascrizione sia legato alla diminuzione dei livelli di espressione di MDM2 [56].

Una questione ulteriore considerata è se la proteina p53 possa essere indotta dal blocco dei processi trascrizionali guidati dalle altre due polimerasi, le RNA Polimerasi I e III. Sono stati fatti diversi studi che indicano che il blocco della trascrizione mediata dall'RNA Polimerasi II, è sufficiente a determinare l'induzione della proteina p53 e la successiva apoptosi nelle cellule umane. Per prima cosa, il TCR è un processo che riguarda i geni di competenza dell'RNA Polimerasi II, ma non i geni trascritti dalle RNA Polimerasi I o III, e le cellule difettive per il TCR sono ipersensibili all'induzione di p53 e dell'apoptosi in seguito all'irradiazione con raggi UV. Secondo, gli inibitori dell'RNA Polimerasi II, come l' α -amanitina, il DRB e l'H7, sono in grado di indurre p53 e l'apoptosi nelle cellule umane, e l' α -amanitina è specifica per l'RNA Polimerasi II. Infine, la microiniezione di anticorpi diretti contro l'RNA polimerasi II nel nucleo delle cellule umane, induce l'accumulo nucleare di p53, mentre questo non avviene con la microiniezione di altri anticorpi come ad esempio quelli contro l'actina o contro l'immunoglobulina G, dimostrando l'esistenza di una certa specificità del processo. Sebbene questi dati indichino che l'inibizione dell'RNA Polimerasi II è sufficiente per indurre p53 e l'apoptosi, è possibile che tale induzione in seguito al trattamento con agenti che danneggiano il DNA, venga guidata anche dal blocco dell'attività delle RNA Polimerasi I e III. In uno studio in cui si osservava che l'accumulo di p53 poteva avvenire in seguito all'inibizione dell'RNA Polimerasi I, in realtà non veniva misurata direttamente l'inibizione della trascrizione guidata da questa polimerasi, ma si osservava che le normali strutture nucleolari in queste cellule venivano distrutte. E' stato proposto che, in condizioni normali, p53 può venire scortata fuori del nucleo da MDM2 attraverso il nucleolo. Pertanto, la distruzione delle strutture nucleolari potrebbe inibire l'esportazione di p53, determinando l'accumulo della proteina nel nucleo. Poiché sia l'inibizione dell'RNA Polimerasi II che quella dell'RNA Polimerasi I porta alla rottura della struttura nucleolare, è probabile che l'accumulo di p53 nel nucleo in seguito al blocco

dei processi trascrizionali mediati dalle RNA Pol I e II, sia dovuto all'inibizione del processo di esporto di p53 attraverso il nucleolo [57].

Un altro meccanismo mediante il quale p53 si accumula nel nucleo in seguito all'inibizione della trascrizione, è che l'esportazione potrebbe essere legata al trasporto fuori del nucleo dell'RNA messaggero. E' stato recentemente dimostrato che inibendo specificamente due componenti chiave del macchinario di esportazione dell'mRNA dal nucleo, come TAP e NUP160, la generale esportazione dal nucleo delle proteine contenenti il segnale di esportazione nucleare (NES), risultava anch'essa soppressa. Pertanto, l'esportazione fuori del nucleo, mediata dal segnale NES delle proteine, sembra essere legato all'esportazione dell'mRNA. Poiché, la proteina p53 contiene diverse sequenze NES, è probabile che il suo trasporto fuori dal nucleo sia assistito anche dall'esportazione dell'mRNA. Infatti, p53 può interagire con l'RNA e questa interazione può reprimere la funzione della proteina. La sequenza NES di p53 può essere attivata dall'ubiquitinazione mediata da MDM2 e diviene inattiva mediante la fosforilazione a livello della serina 15 di p53. E' stato dimostrato che la microiniezione di un vettore di espressione dominante negativo NUP160 o di un anti-TAP per inibire specificamente l'esportazione dell'mRNA dal nucleo, comporta un significativo accumulo di p53 in questo compartimento cellulare. Pertanto, se la trascrizione viene inibita, meno RNA risulta disponibile per l'associazione con p53, portando ad una diminuzione del trasporto della proteina fuori dal nucleo [58] [59].

Quindi, il blocco della trascrizione dovuto al danneggiamento del DNA determina l'induzione dell'accumulo di p53 nel nucleo sia mediante le modificazioni post-traduzionali, sia mediante una riduzione nel processo di trasporto della proteina fuori dal nucleo, forse a causa della perdita di mRNA disponibile per l'esportazione. Questo collegamento tra il macchinario della trascrizione e la risposta di p53, assicura una rapida ricognizione e risposta del danno al DNA, che ha come obiettivo finale la soppressione della tumorigenesi.

Il meccanismo mediante il quale le cellule vanno in apoptosi in seguito all'inibizione della trascrizione non è del tutto chiaro. Un meccanismo potrebbe coinvolgere la perdita di espressione di fattori di sopravvivenza ad una velocità superiore rispetto alla perdita di espressione di fattori pro-apoptotici. Ciò potrebbe portare ad uno spostamento dell'equilibrio tra sopravvivenza e morte, per cui ad un certo punto i fattori pro-apoptotici potrebbero capovolgere questo equilibrio in favore della morte. Un importante lavoro di McKay e collaboratori, ha suggerito l'idea che la trascrizione potrebbe agire come una sorta di dosimetro del danno al DNA [60]. Poiché le lesioni indotte al DNA dalla luce ultravioletta blocca in maniera efficace la trascrizione e sono introdotte

in maniera casuale nel genoma, la probabilità che un particolare gene venga inattivato da questo tipo di lesioni, dipende dalle dimensioni del gene stesso nel cromosoma. Se i geni pro-apoptotici sono più corti dei geni anti-apoptotici, la luce UV potrebbe inattivare di preferenza i geni anti-apoptotici più estesi e l'equilibrio potrebbe essere spostato in favore dell'apoptosi. E' stato anche dimostrato che molti geni pro-apoptotici sono compattati e non così estesamente colpiti dalla radiazione ultravioletta come molti geni anti-apoptotici. In questo modo, il grado di danneggiamento, le dimensioni dei geni di regolazione dell'apoptosi e l'abilità delle cellule di recuperare la sintesi dell'RNA, sono tutti eventi che contribuiscono maniera passiva a sopprimere la carcinogenesi ed eliminare le cellule altamente danneggiate [60].

Risalgono ormai alla fine degli anni '90, gli studi che per primi hanno dimostrato che le cellule derivate da pazienti Cockayne, sono più inclini ad andare in contro a morte per apoptosi in seguito al trattamento con radiazione ultravioletta, rispetto alle cellule umane normali, e che in queste cellule in seguito all'esposizione ai raggi UV si ha un accumulo della proteina p53 nel nucleo [61]. Poiché è stato proposto che il segnale per l'accumulo di p53 è rappresentato dal blocco della trascrizione da parte dell'RNA Polimerasi II sui filamenti di DNA trascrizionalmente attivi, così nelle cellule CS-B, l'aumento dei livelli apoptotici è legato al difetto di queste cellule nel processo TCR. Tuttavia, non era stato ancora considerato se questo aumento nei livelli di apoptosi fosse causato primariamente dalle mutazioni a carico del gene csb piuttosto che da altri difetti secondari che caratterizzano le cellule CS. In un lavoro del 2000, Balajee prende in considerazione la questione conducendo esperimenti sia su cellule di topo (linea UV61), che su cellule di Cockayne umane, CS-B, allo scopo di studiare il ruolo della proteina CSB nella risposta apoptotica indotta dai raggi UV [62]. In particolare, Balajee ha valutato anche gli specifici domini funzionali della proteina CSB, eventualmente coinvolti nell'apoptosi indotta da raggi UV. Per determinare se l'attività ATPasica di CSB fosse importante per modulare questa risposta apoptotica, è stata creata una linea di cellule UV61 stabilmente trasfettata con un cDNA di CSB, contenente una mutazione puntiforme nel residuo di acido glutammico altamente conservato nel motivo ATPasico II. Accanto al dominio ATPasico CSB contiene anche una regione carica negativamente all'estremità ammino-terminale prima del motivo elicastico/ATPasico; circa il 60% dei residui di questo tratto di 39 amminoacidi è di natura acidica. I domini acidici sono stati trovati in un certo numero di proteine associate alla cromatina e agli istoni, suggerendo che questo dominio potrebbe essere coinvolto nel rimodellamento della cromatina o nell'attivazione della trascrizione. Per determinare l'importanza funzionale di questo dominio, è stata generata una linea cellulare in cui dieci residui acidici

consecutivi venivano deleti dalla proteina CSB. Si osservò che le cellule CSB difettive sia di topo che umane sono più predisposte all'apoptosi rispetto alle cellule normali dopo l'irradiazione con UV. La trasfezione delle cellule UV61 con il gene csb normale, ma non il mutante con l'alterazione puntiforme a livello del motivo ATPasico, è in grado di proteggere le cellule dall'apoptosi. Ciò dimostra che è necessario un prodotto CSB funzionale, con attività ATPasica intatta per modulare la risposta apoptotica ai raggi UV. Le cellule che contengono un'ampia delezione a livello del dominio acidico di CSB non mostrano nessun incremento della morte cellulare, indicando che questo dominio non è coinvolto nella regolazione dell'apoptosi. Sia le cellule umane, normali o CSB difettive che le cellule di topo sono state irradiate con raggi UV e osservate al microscopio a fluorescenza per l'identificazione delle cellule apoptotiche, necrotiche e vitali in base all'incorporazione dei coloranti fluorescenti quali Ioduro di Propidio (IP) e Fluoresceina diacetata (FDA). Per le linee umane, marcate e osservate 48 ore dopo l'irradiazione con diverse dosi di raggi UV, si ottenne una percentuale di cellule apoptotiche di circa il 40% nelle cellule CSB difettive, rispetto a quelle normali. Le linee cellulari di topo utilizzate erano tre: le linee AA8, costituita dalle cellule normali, di controllo, da cui furono derivate le cellule UV61, difettive per CSB e le cellule PT5, che costituivano la linea trasfettata con il gene csb umano. Queste tre linee vennero irradiate con una dose di 6J/m^2 di raggi UV, e marcate dopo 24 ore. I risultati mostravano una percentuale di cellule apoptotiche dell'1%, sia nelle cellule AA8 di controllo, che in quelle irradiate. Nelle cellule UV61 invece, la percentuale di apoptosi era di circa il 48%. La morte per apoptosi diminuiva sensibilmente nelle cellule PT5, dove solo il 5% risultava essere apoptotica. Questo dato suggeriva chiaramente che il gene csb normale può ristabilire la resistenza cellulare ai raggi UV. Nelle cellule UV61 mutanti con il dominio ATPasico di CSB completamente inattivato, la morte per apoptosi si osservava ad una percentuale del 65%, mentre nelle cellule contenenti la proteina CSB con un dominio acidico inattivato, il numero di cellule apoptotiche era quasi irrilevante così come per le cellule di controllo o quelle trasfettate con il gene csb normale. Gli stessi risultati furono confermati mediante l'elettroforesi su gel di agarosio del DNA delle cellule, per evidenziare il caratteristico pattern di frammentazione del DNA tipico delle cellule apoptotiche. Pertanto, sia nelle cellule CS-B umane, che nelle corrispondenti cellule di ratto, in seguito alla somministrazione di raggi UV, si ha un elevato incremento di morte per apoptosi. Al fine di esaminare se la radiazione ultravioletta induce l'attivazione di p53, è stata analizzata l'induzione della proteina, sia nelle cellule umane che in quelle di topo, in funzione della dose di raggi UV. Nelle cellule CS-B umane si osservava una notevole differenza nell'intensità dei livelli di p53, rispetto al controllo,

dopo somministrazione di una dose di 10J/m^2 di raggi UV. Nelle analisi di western blotting invece, nelle cellule normali la proteina p53 non veniva rilevata a dosi inferiori a 5J/m^2 , mentre in quelle CSB difettive, la proteina era già rilevata alla dose di 3J/m^2 . Questi dati dimostravano che nelle cellule CSB si ha una rapida induzione della proteina p53 a dosi di raggi UV più basse, rispetto alle cellule normali. Tale induzione risulta tre volte maggiore rispetto ai fibroblasti umani normali, 24 ore dopo l'irradiazione con UV e il livello di p53 si mantiene elevato fino a 72 ore dopo l'irradiazione. Nelle cellule normali, invece, 24 ore dopo l'irradiazione si osserva un incremento di p53 meno rilevante, e il livello diminuisce gradualmente dopo 48 e 72 ore dall'irradiazione. Nelle cellule di topo invece, i livelli di p53 sono costitutivamente più alti rispetto alle cellule umane e non sembrano variare significativamente tra cellule normali e cellule irradiate, dimostrando che l'induzione dell'apoptosi nelle cellule di topo segue una via p53-indipendente [62]. Questo studio dimostrava quindi che, la proteina CSB coinvolta nel processo TCR, svolge un ruolo importante nel mediare la risposta apoptotica indotta dai raggi UV, sia nelle cellule umane che in quelle di topo, indipendentemente dal loro stato di espressione di p53, e che il dominio ATPasico della proteina CSB ha un'importanza cruciale per la sua funzione anti-apoptotica. Inoltre, sia le cellule umane che quelle murine difettive per CSB sono incapaci di riparare i dimeri di pirimidina presenti sul filamento trascritto dei geni attivi, mentre la riparazione del genoma globale è attiva dal momento che il numero di siti danneggiati che rimangono in un dato momento, dopo l'irradiazione, è lo stesso sia nelle cellule normali che in quelle CS-B. Le cellule CS-B sono estremamente sensibili all'effetto dei raggi UV e sono incapaci di recuperare la trascrizione dopo il danneggiamento del DNA. La completa compensazione sia della elevata sensibilità ai raggi UV che dell'inibizione della trascrizione, osservata nelle cellule CSB difettive di topo, da parte del gene csb normale, dimostra chiaramente la sua importanza nel processo TCR e nella sopravvivenza cellulare. Questo studio definisce l'esistenza di una buona correlazione tra la perdita della riparazione preferenziale del danno sul filamento trascritto di DNA e l'induzione dell'apoptosi nelle cellule CS-B, suggerendo che la mancanza di un processo TCR efficiente costituisce l'innescò primario del processo apoptotico. Per quanto riguarda le lesioni indotte dai raggi UV, l'efficienza del processo di riparazione mediante TCR e l'efficienza nel recupero della trascrizione sembrano essere interdipendenti tra loro e il gene csb risulta fondamentale per entrambi questi processi. Il gene csb infatti, sembra di cruciale importanza nel recupero della trascrizione delle cellule danneggiate con l'agente chimico NA-AAF, che crea lesioni che non mostrano nessuna predilezione per il filamento trascritto dei geni attivi. La perdita di recupero della sintesi dell'RNA dopo il trattamento con l'NA-AAF nelle

cellule CSB difettive, definisce il ruolo aggiuntivo del gene *csb* nella ripresa della trascrizione, che è indipendente dal suo ruolo nella rimozione del danno attraverso il TCR. Perciò il soppressore tumorale p53 risulta indotto a dosi più basse di raggi UV nelle cellule mutate per CSB, rispetto ai fibroblasti umani normali, con la sua induzione che persiste più a lungo e conduce più facilmente le cellule all'apoptosi, promossa anche dal persistere del danno al DNA non riparato a causa di un processo TCR compromesso [62].

Riprendendo la stessa linea di ricerca, in un lavoro del 2003, Luca Proietti De Santis e i suoi collaboratori, hanno condotto esperimenti per determinare se anche i geni di risposta a p53 venissero indotti in seguito alla somministrazione di raggi UV, ed hanno preso in considerazione l'espressione delle proteine Bax e p21 sia nelle cellule normali che in quelle CSB difettive umane [63]. L'induzione di queste proteine sembrava correlare con quella di p53 tranne che a dosi di raggi UV elevate, in cui si osservava un declino dell'induzione di questi geni. Sebbene, infatti, p53 mostrasse un incremento dose-dipendente al di sopra dei 20J/m^2 , nelle cellule CS, l'induzione di p21 e Bax diminuiva a dosi di raggi UV superiori di 10J/m^2 . Al contrario di quanto osservato per le cellule CS, nelle cellule normali l'induzione di p21 e Bax correlava bene con l'espressione di p53. La perdita di induzione delle proteine p21 e Bax a dosi elevate di raggi UV, nelle cellule CSB, difettive per il processo TCR, si ritenne dovuto al severo blocco della trascrizione causato dalla persistenza dei dimeri di pirimidina. Per verificare ulteriormente se la risposta apoptotica indotta dai raggi UV fosse o meno indipendente dal potenziale di attivazione della trascrizione di specifici geni bersaglio di p53, i ricercatori hanno utilizzato la pifitrina α , PFT α , per bloccare l'attivazione di questi geni. La PFT α è in grado di bloccare reversibilmente l'attivazione della trascrizione p53-dipendente e l'apoptosi. In assenza della PFT α , l'induzione di p53 è risultata essere dose-dipendente, sia nelle cellule normali che in quelle CSB mutate. Alle dosi di raggi UV più alte utilizzate, le cellule normali mostravano un incremento dell'induzione di p53 di 7 volte, mentre nelle cellule CSB l'induzione era di 12 volte. Sia nelle cellule normali che in quelle CSB mutate, in caso di trattamento con PFT α , l'induzione di p53 scendeva, con un incremento di sole tre volte rispetto al controllo non trattato. Inoltre, l'induzione era la stessa a tutte le dosi di raggi UV utilizzate. Anche l'espressione di p21 e Bax subiva un declino sostanziale nelle cellule normali e CSB mutate, trattate con PFT α , rispetto alle cellule non trattate con l'inibitore. L'inibizione dell'induzione di queste proteine suggeriva che la PFT α effettivamente bloccava il potenziale di p53 sull'attivazione genica. Seguendo la distribuzione intracellulare di p53 nelle cellule CS-B, si osservò che nelle cellule trattate con raggi UV ma non con la PFT α , p53 era principalmente

localizzata nei nuclei, mentre la distribuzione risultava prevalentemente citoplasmatica quando le cellule erano trattate con PFT α . Tale dato indicava che questo agente inibiva la delocalizzazione di p53 dal citoplasma verso il nucleo e ciò poteva essere il motivo della perdita del potenziale di attivazione della trascrizione di determinati geni, da parte di p53. Pertanto, se il potenziale di attivazione della trascrizione genica di p53 risulta di importanza cruciale per l'apoptosi indotta dai raggi UV, ci si poteva aspettare una risposta apoptotica ridotta o alterata nelle cellule trattate con l'inibitore. Invece, sia le cellule normali che le cellule CSB irradiate con UV in presenza di PFT α , non mostravano alcuna alterazione nella frequenza di apoptosi indicando che la via p53-dipendente nelle cellule CS-B non contribuisce molto all'apoptosi indotta dai raggi UV, cioè avviene secondo una via p53-indipendente. In aggiunta, è significativo il fatto che la PFT α , non sembra abolire l'apoptosi delle cellule normali trattate con l'inibitore dell'RNA polimerasi, α -amanitina, e questo supporta il concetto secondo cui l'abolizione del processo TCR e conseguentemente il mancato recupero della trascrizione legati alla perdita del gene csb, probabilmente rappresentano gli eventi davvero cruciali per l'induzione dell'apoptosi in risposta ai raggi UV, rispetto all'induzione di p53. In conclusione, il blocco del potenziale di attivazione, nello specifico dei geni p21 e Bax da parte di p53, non era sufficiente ad inibire l'apoptosi delle cellule CS-B in risposta alla radiazione UV. Inoltre, l'inibizione dell'inizio della trascrizione dovuta all'incapacità delle cellule di rimuovere le lesioni a carico del filamento trascrizionalmente attivo, costituisce l'innescò primario per l'apoptosi, indipendentemente dallo stato di p53, sia nelle cellule umane che in quelle murine. Sebbene da questi ed altri studi, p53 non sembri importante per indurre l'apoptosi in seguito ai raggi UV, il meccanismo molecolare preciso per l'apoptosi dipendente da CSB non è chiaro. In alcuni studi, in cellule di topo $Csb^{-/-}$, $p53^{-/-}$, in seguito ai raggi UV si osservava un aumento dei livelli di apoptosi rispetto ai topi $p53^{-/-}$. Ciò dimostra che la perdita del solo gene csb potenzia il processo di apoptosi in un modo che resta ancora poco chiaro [63].

In un lavoro del 2011, sempre il gruppo guidato da Proietti De Santis ha dimostrato che gli elevati e persistenti livelli di p53 che si trovano al centro delle risposte alterate nelle cellule CS, sono dovute alla perdita di un adeguato processo di ubiquitinazione della proteina p53 e del ruolo svolto dalle proteine CSA e CSB in questo processo di regolazione di p53 [64]. E' stato dimostrato che le proteine CSA e CSB si trovano in un complesso con p53 e Mdm2, e la loro presenza stimola l'ubiquitinazione di p53, sia in vivo che in vitro, in maniera Mdm2-dipendente.

Un'analisi dell'accumulo di p53 nel tempo, in seguito all'irradiazione con raggi UV, ha mostrato una chiara differenza tra i fibroblasti primari CS e quelli normali. Mentre in due linee di fibroblasti

normali in un periodo compreso tra 3 e 6 ore dopo l'irradiazione, l'accumulo di p53 manifesta un picco transiente, relativo ad un' induzione di 7 volte rispetto al livello basale e in 12 ore viene recuperato il livello base, nei fibroblasti CS, derivati da pazienti appartenenti ai due gruppi di complementazione CS-A e CS-B, si osservava un persistente aumento della proteina p53, relativo ad un'induzione di 25-30 volte rispetto al livello base. Tuttavia, le cellule CS mostrano un livello base di p53 più alto e inoltre, il trattamento con l'inibitore della sintesi proteica, la cicloexamide, dimostrava che la vita media della proteina p53 è più estesa sia nelle cellule CS-A che CS-B, rispetto sia alle cellule normali che rispetto alle cellule CS-B, restituite al fenotipo normale mediante la sovraespressione della proteina CSB normale. Nelle cellule normali, il quantitativo di p53 viene mantenuto a livelli bassi, appena rilevabili, mediante la continua degradazione proteolitica che si attua attraverso l'ubiquitinazione della proteina e l'avvio ai proteosomi. Pertanto venne analizzato il pattern di ubiquitinazione di p53 prima e dopo la somministrazione di raggi UV, per valutare se i livelli più elevati di p53 delle cellule CS dipendessero da un difetto nel processo di ubiquitinazione. Si osservò che nelle cellule normali, l'aumento dei livelli di p53 coincideva con l'accumulo della forma ubiquitinata di p53, che mostrava un picco a 6 ore dall'irradiazione e diminuiva in accordo con l'andamento dei livelli complessivi di p53. Al contrario le cellule CS-B mostravano una forte riduzione nell'ubiquitinazione di p53 sia nelle cellule irradiate che in quelle non irradiate. Anche nelle cellule CS-A veniva riconfermata l'incapacità di eseguire l'appropriata ubiquitinazione di p53. Venne provato inoltre, che il problema dell'ubiquitinazione, non è un problema diffuso e generale delle cellule CS, dal momento che le cellule normali e quelle CS mostrano schemi di ubiquitinazione delle proteine totali molto simili; pertanto il difetto nel processo di ubiquitinazione sembra essere specifico per p53. Tale difetto, inoltre, non si può considerare legato al processo di riparazione del DNA perché i fibroblasti primari derivati da pazienti affetti da Xeroderma Pigmentoso del gruppo di complementazione A, in cui è mutato il gene XP-A coinvolto nel NER, non mostrano alcun difetto di ubiquitinazione di p53, pur mostrando un accumulo della proteina molto simile a quello delle cellule CS.

E' ben noto ormai il fatto che p53 è regolato dalla E3 ubiquitina ligasi Mdm2, un mediatore chiave della degradazione di p53, i cui livelli sono regolati attraverso un circuito a feedback di interazione tra le due proteine. Lavori precedenti avevano suggerito che i livelli più elevati di p53 nelle cellule CS potrebbero essere dovuti a una regolazione alterata del gene Mdm2. I ricercatori, hanno quindi indotto l'abbassamento dei livelli di espressione di Mdm2 mediante la tecnica dell'*RNA interference*, RNAi, e osservando che il silenziamento di Mdm2 elimina completamente

l'ubiquitinazione di p53, hanno confermato ulteriormente che Mdm2 è il principale enzima E3 ubiquitina ligasi di p53. La co-immunoprecipitazione di p53 e Mdm2, dimostrava che, l'ipotesi secondo cui modificazioni post-traduzionali della proteina Mdm2 potessero abolire l'interazione tra Mdm2 e p53, non era valida e che nelle cellule CS questa interazione viene mantenuta. Al fine di chiarire il ruolo delle proteine CSA e CSB nell'ubiquitinazione di p53 e verificare se le proteine fossero presenti nello stesso complesso con p53 e Mdm2, venne progettata una serie di immunoprecipitazioni reciproche. Risultò che le quattro proteine, CSA, CSB, p53 e Mdm2, erano effettivamente comprese tutte nel medesimo immunocomplesso, e si rilevava inoltre la presenza di altre proteine come DDB1 e Cul4, che sono note far parte del complesso ubiquitina ligasi CRL (complesso Cullin-RING). E' interessante considerare le differenze nei rapporti stechiometrici tra le proteine: nei due immunocomplessi, quelli isolati con gli anticorpi per CSB e Mdm2, si trovano quantità simili di CSA e CSB, ma si trovano quantità superiori di p53 ed Mdm2 negli immunoprecipitati di Mdm2 suggerendo che un maggiore quantitativo di p53 interagisce con Mdm2, ma solo una frazione di questi complessi contiene le proteine CSA e CSB.

Mdm2 è una cosiddetta proteina ad anello (*ring protein*), capace di interagire sia con la ligasi E2 che con il substrato bersaglio dell'ubiquitinazione. E' possibile che in certe circostanze Mdm2 sia richiesto come parte di un complesso multiproteico con funzione di ubiquitina ligasi, contenente la proteina Cullina, un adattatore e una proteina F-box; questo complesso è ritenuto più efficiente nel trasferire l'ubiquitina alla proteina p53, sia in generale che a livello di specifici residui di lisina. E' possibile pertanto, che la proteina F-box CSA, che è nota far parte di un complesso CUL4/DDB1, potrebbe far parte del complesso CRL, contenente anche la proteina ad anello Mdm2 [64] (Figura 8). Questo lavoro è stato il primo a dimostrare l'esistenza di una interazione tra p53 e CSA. P53 precipita insieme a CSA e CSB – questa sia in forma estesa che come isoforma tronca CSB-PGBDR – ma CSA non precipita insieme con p53 nelle cellule CS-B che non esprimono la forma estesa della proteina CSB. L'immunoprecipitazione condotta su una linea di cellule CS-A, mostrava che CSB è in grado di legare p53 anche in assenza di CSA. Pertanto, questi dati dimostrano che CSA non interagisce direttamente con p53, anzi, la loro interazione è mediata dalla proteina CSB intera, o almeno ne è richiesta la presenza. Il fatto che l'isoforma tronca CSB-PGBD3, la cui espressione viene mantenuta nelle cellule CS8PV (che sono cellule CSB difettive), è in grado di interagire con p53, indica che la regione N-terminale della proteina CSB è quella coinvolta nell'interazione con p53; al contrario, la regione C-terminale è importante per l'interazione tra CSA e CSB, dato che CSB-PGBD3 non coprecipita con CSA. In aggiunta, questo lavoro ha dimostrato che l'espressione

della proteina CSB è regolata da p53. Diverse proteine implicate nella degradazione di p53 fanno parte di un meccanismo a feedback in cui p53 è l'attivatore trascrizionale di un fattore che guida la regolazione negativa di p53 stesso. Si è visto che nelle cellule HeLa l'espressione della proteina CSB era indotta dall'aumento di espressione di p53 in assenza di danno al DNA. Inoltre, utilizzando un software disponibile in rete (58epletiv) per la ricerca di specifici elementi di risposta a fattori trascrizionali nella sequenza di un gene di interesse, venne identificato uno dei peculiari elementi di risposta a p53 nella regione promotrice del gene *csb*, a monte del sito di inizio della trascrizione. Attraverso esperimenti di *Chromatin immunoprecipitation* (ChIP) si vide che l'occupazione di questo sito, da parte di p53, aumentava significativamente, in accordo con l'aumento dell'espressione di p53, e che aumentavano anche l'occupazione del promotore di CSB da parte della RNA Polimerasi II e l'acetilazione degli istoni H4, tutti segnali dell'attivazione trascrizionale. Quindi, p53 si lega al promotore del gene *csb* e ne controlla l'espressione a livello trascrizionale [64].

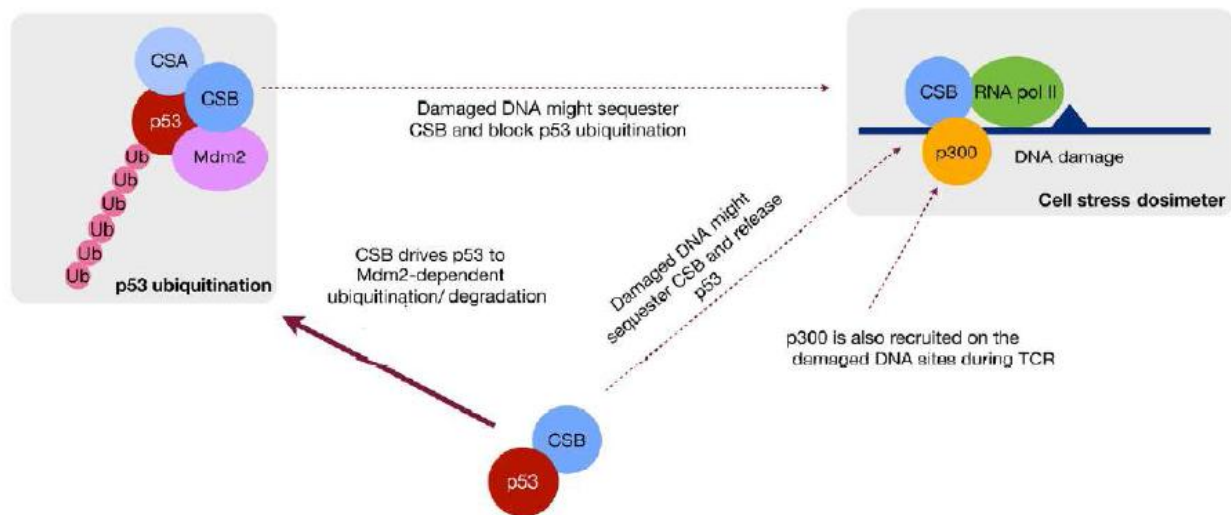


Fig. 8: CSB prende parte, insieme a Mdm2 e CSA, a un complesso di ubiquitinazione in grado di indirizzare p53 alla degradazione. Un elevato danno al DNA potrebbe sequestrare la proteina CSB, contribuendo all'attivazione di p53 in seguito a stress cellulare e portando la cellula all'apoptosi qualora il danno si riveli eccessivo. Tale meccanismo di ubiquitinazione è probabilmente alla base dell'up-regolazione di p53 osservata in cellule mutate per CSB (riadattata da *Frontini and Proietti de Santis, 2012*)

Per riconsiderare il ruolo di CSB nel contesto del processo di trascrizione in cellule esposte a radiazione UV, in relazione anche alla risposta di p53, è importante considerare un lavoro

pubblicato nel 2006 da Proietti De Santis sulla regolazione dei programmi trascrizionali da parte delle proteina CSB in risposta ai raggi UV [65]. Come prima cosa in questo studio veniva riconfermato il fatto, già osservato da Balajee nel 1997, che l'inibizione della sintesi di RNA nelle cellule CSB in seguito all'irradiazione con raggi UV non era dovuta esclusivamente a un difetto nel processo di riparazione del DNA, ma molto più verosimilmente deriva da un difetto nel processo di trascrizione. La proteina CSB quindi, è richiesta per l'inizio della trascrizione dopo l'irradiazione. Venne riconfermato il dato per cui l'irradiazione con raggi ultravioletti delle cellule CSB difettive, impedisce il recupero della trascrizione non soltanto perché i geni non sono riparati dalle lesioni indotte, ma piuttosto, perché c'è un difetto nel re-inizio o nel mantenimento del processo trascrizionale. Si osservava infatti, che le cellule CSB non erano in grado di sostenere la trascrizione anche dei geni non danneggiati. Invece, la trascrizione di alcuni geni *housekeeping*, come DHFR o GAPDH, in queste cellule veniva inibita dopo l'irradiazione; si osservava che il reclutamento di TBP, ritenuto necessario per l'inizio della trascrizione su questi promotori, era fortemente ridotto e TFIIB era pressoché assente. Di conseguenza non poteva sorprendere il fatto che l'RNA polimerasi II non riuscisse ad agganciare i complessi di inizio della trascrizione a questi promotori, dopo la somministrazione di raggi UV. Inoltre, l'acetilazione dell'istone H4 non avveniva adeguatamente, evidenziando l'esistenza di un difetto nelle fasi precoci del processo di trascrizione.

Sulla base di queste osservazioni, si sarebbe potuto concludere che nelle cellule CSB irradiate, c'è un difetto in uno dei componenti richiesti per organizzare il macchinario della trascrizione, il prerequisito per iniziare la trascrizione. Tuttavia ciò si è dimostrato improbabile in quanto, i risultati mostravano che nelle cellule CSB, i geni di risposta a p53 vengono trascritti, il che vuol dire che i loro promotori sono in grado di reclutare i componenti basali del macchinario della trascrizione. Sapendo che i geni di risposta a p53 vengono attivati in seguito all'irradiazione, i ricercatori hanno voluto determinare se anche CSB potesse essere richiesta per il reclutamento del macchinario della trascrizione sui promotori dei geni target di p53 come MDM2 o GADD45. Esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina, ChIP, fatti a diversi tempi dall'irradiazione hanno mostrato un significativo aumento del reclutamento dell'RNA Polimerasi II, TBP e TFIIB sui promotori di entrambi questi geni, nelle cellule CSB, quasi identico a quello delle cellule normali. Ciò corrispondeva anche ad un aumento dell'occupazione da parte dell'RNA Polimerasi II di allungamento, di una regione distale, vicina all'esone 4 di entrambi i geni, e all'aumento della sintesi dell'mRNA di GADD45 e MDM2 che si rifletteva nell'accumulo dei relativi prodotti genici. Ciò si ritenne dovuto ad un progressivo aumento del reclutamento del fattore p53,

indipendentemente dalla natura delle cellule. In effetti, l'aumento del livello delle due proteine GADD45 e MDM2 corrisponde alla rapida induzione della proteina p53 nelle cellule CSB dopo l'irradiazione. In contrasto con quanto osservato per il gene DHFR, si notò che la proteina CSB non sembra essere reclutata sul promotore del gene GADD4, sia prima che dopo l'irradiazione, nonostante CSB venga espressa nelle cellule normali. Mediante esperimenti basati sulla trasfezione delle cellule normali e CSB-difettive, con vettori di espressione per p53 e CSB, insieme con vettori reporter contenente il gene della luciferasi sotto il controllo dei promotori di MDM2 e DHFR, si osservò che la sovraespressione di CSB, induceva in maniera selettiva un aumento dell'attività del promotore di DHFR sia nelle cellule normali che nelle cellule CSB. Al contrario, non aveva effetti sulla regolazione del promotore di MDM2. Fu interessante notare, che la sovraespressione di p53, aumentava selettivamente ed esclusivamente l'espressione del promotore di MDM2. Nel complesso questa serie di dati evidenzia il ruolo di CSB nella regolazione di specifici geni, e dimostra chiaramente che i geni di risposta a p53 sono CSB-indipendenti, poiché essi possono essere trascritti in assenza di CSB, che non si trova nella regione dei loro promotori. L'incapacità delle cellule CSB di trascrivere i geni, in seguito agli attacchi genotossici, solleva interrogativi circa il ruolo della proteina CSB in generale e nella sua relazione con p53. Da questi risultati sembra che il recupero della sintesi di RNA, si verifichi in seguito ad almeno due distinte vie trascrizionali. La prima, diretta da p53, riguarda solo i geni bersaglio di p53 e non richiede il coinvolgimento di CSB. La seconda, invece è quella mediata da CSB. Nelle cellule CSB irradiate con raggi UV, i geni di risposta a p53 sono attivati, ma il recupero della trascrizione dei geni *housekeeping*, è compromessa. Nello stesso lavoro, i ricercatori si chiesero se altri attivatori inducibili potessero, almeno in parte, contrastare il difetto trascrizionale dovuto alle mutazioni nel gene *csb*, in modo simile a quanto osservato per p53, e presero in considerazione la stimolazione operata dalla vitamina D sul promotore del gene CYP24, bersaglio di un recettore della vitamina D, VDR. Il risultato degli esperimenti fu che nelle cellule CSB difettive, irradiate o meno con raggi UV, non si osservava il legame dell'RNA Polimerasi II, né di VDR a livello del promotore del gene CYP24, né l'acetilazione dell'istone H4, in confronto alle cellule normali. Quindi, le mutazioni a carico di CSB inibiscono le fasi iniziali della risposta trascrizionale dei geni bersaglio di VDR, indipendentemente dal fatto che le cellule CSB vengano irradiate o meno. Risultava così che, altri attivatori, come ad esempio il recettore nucleare VDR, non sono in grado di contrastare l'effetto dannoso delle mutazioni a carico del gene *csb*, fatta eccezione che per la proteina p53. La spiegazione più semplice per giustificare queste osservazioni, per i ricercatori era che l'attivatore

p53 possiede, in aggiunta alla sua proprietà di legarsi al DNA, alcune funzioni aggiuntive esibite da CSB. CSB svolge un ruolo importante come rimodellatore della cromatina, che potrebbe facilitare l'accesso successivo del macchinario generale della trascrizione su certi geni, come i geni *housekeeping*. Pertanto i ricercatori hanno suggerito che p53 possa reclutare specifici fattori di rimodellamento della cromatina, per stimolare l'inizio della trascrizione dei suoi geni bersaglio. Ciò potrebbe spiegare perché i geni di risposta a p53 fanno a meno di CSB, assumendo che CSB agisca nel convertire la conformazione del promotore in una struttura accessibile. Attraverso la serie di esperimenti fatti in questo lavoro i ricercatori hanno offerto ulteriori dimostrazioni del coinvolgimento della proteina CSB, oltre che nel processo di riparazione TCR, anche nella fase iniziale della trascrizione, che indicano l'esistenza di funzioni della proteina, condivise da entrambi i processi. In entrambi i casi CSB ha a che fare con l'RNA Pol II, sia quando questa si associa con il promotore dei geni, sia quando si blocca di fronte alle lesioni del DNA. I saggi di ChIP condotti in questi esperimenti dimostrano che CSB opera nella fase iniziale della trascrizione per facilitare il reclutamento dell'RNA Pol II e dei relativi fattori di trascrizione su un sottogruppo di geni, in seguito all'irradiazione con raggi UV. Nelle cellule normali, dopo la somministrazione di raggi UV, l'aumento nel reclutamento del macchinario trascrizionale è collegato con l'aumento dell'acetilazione dell'istone H4. Di conseguenza è stata elaborata un'interpretazione per comprendere come si leghino l'attività della proteina CSB e le modificazioni della cromatina osservate dopo somministrazione di raggi UV, con i processi di trascrizione e riparazione del DNA. La proteina CSB esibisce attività ATPasica e possiede motivi elicasi. Per di più, CSB appartiene alla famiglia SWI2/SNF2 di fattori di rimodellamento della cromatina. Si ritiene che ci sia un'attività di rimodellamento della cromatina mediata da CSB attraverso il reclutamento di un enzima acetiltransferasi come p300 durante la trascrizione e la riparazione del DNA. Perciò la presenza di CSB a livello del promotore potrebbe avviare eventi di rimodellamento della cromatina, un prerequisito che faciliterebbe, non solo il reclutamento del macchinario trascrizionale, ma anche dei fattori NER, giustificando così la riparazione preferenziale delle sequenze situate nelle vicinanze dei promotori. Infatti, in alcuni studi è stato osservato un maggior grado di acetilazione degli istoni H3 e H4 e il rimodellamento della cromatina in concomitanza con la riparazione per escissione di nucleotidi e la riparazione delle rotture a doppio filamento. Interagendo con l'RNA Pol II bloccata di fronte a una lesione, CSB potrebbe favorire localmente il rimodellamento della cromatina come pre-requisito per l'arrivo dei fattori di riparazione del DNA. Si delinea perciò, uno scenario in cui CSB, in seguito a radiazione ultravioletta, potrebbe agire come fattore di trascrizione

fondamentale e non ridondante, per consentire all'RNA Pol II di iniziare la sintesi dell'RNA per specifici programmi trascrizionali e nel caso di danni sul filamento trascritto, CSB potrebbe aiutare l'RNA Pol II a compiere la trascrizione favorendo la riparazione delle lesioni. Quando CSB è mutata, entrambe le sue funzioni nella trascrizione e nella riparazione risultano compromesse [65].

1.1.9 CSB come mediatore della risposta all'ipossia

I pazienti affetti da sindrome di Cockayne di tipo I mostrano una crescita cerebrale e somatica intrauterina normale, ma lo sviluppo inizia a diventare critico tra il primo e il secondo anno di vita. Ciò ha portato ad ipotizzare l'esistenza di un meccanismo coordinato che è funzionale nel feto, cioè nell'utero, ma difettoso nel neonato. La respirazione inadeguata e l'omeostasi dell'ossigeno rappresentano alcuni dei principali problemi dei pazienti CS durante la vita extrauterina, quando il bimbo non è più sostenuto dalla placenta materna per quanto riguarda i fattori di crescita angiogenici e l'ossigeno gassoso. In effetti, tra i tessuti che degenerano in Cockayne, alcuni sembrano essere molto sensibili ai livelli di ossigeno, incluse le cellule del Purkinije e gli oligodendrociti. L'ipossia, cioè lo stato di insufficienza di ossigeno, si verifica quando il rifornimento di ossigeno attraverso il sistema cardiovascolare non soddisfa la richiesta da parte delle cellule, e può avvenire sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Lo stress dovuto all'ipossia, esercita il suo effetto tramite la stabilizzazione della proteina p53, principalmente attraverso le modificazioni post-traduzionali della proteina. Come conseguenza, p53 diviene attiva e può avviare la morte cellulare, non solo promuovendo la trascrizione di geni di regolazione del ciclo cellulare come p21 ma anche dei geni coinvolti negli eventi apoptotici come bax. In alternativa, altri eventi molecolari possono prevenire la morte cellulare inducendo risposte adattative che a loro volta, facilitano la proliferazione cellulare e la sopravvivenza. La regolazione della maggior parte delle proteine che sono richieste per l'adattamento all'ipossia, avviene a livello genetico e implica l'induzione della trascrizione attraverso il legame del fattore inducibile dall'ipossia 1, HIF1 (*Hipoxia-Inducible-Factor 1*) all'elemento di risposta all'ipossia, HRE, presente nel promotore dei geni regolati. HIF1 è un eterodimero che consiste in una subunità α inducibile e una subunità β costitutivamente espressa. Per attivare la trascrizione, HIF1 deve reclutare il cofattore trascrizionale, la proteina con attività di istone acetil-transferasi p300, sui promotori dei geni bersaglio. In un lavoro del 2008 Luca Proietti De Santis e suoi collaboratori hanno mostrato che le cellule CSB mutate non sono in grado di rispondere adeguatamente all'ipossia [66].

Nonostante il reclutamento di HIF1 sui promotori dei geni coinvolti nella risposta all'ipossia, come VEGF e GAPDH, avvenga correttamente, gli eventi successivi, come il reclutamento dell'RNA Polimerasi II, di TFIIH e di p300 non si realizzano efficacemente per consentire la trascrizione, portando così ad una risposta inadeguata all'ipossia in queste cellule.

Mediante analisi di sequenza è stato possibile rintracciare nel promotore del gene *csb* umano due potenziali elementi HRE coincidenti con la sequenza consenso di legame di HIF1, BACGTSSK (B=G/C/T, S=G/C e K/G/T) e usando la ChIP è stata esaminata la cinetica di occupazione da parte di HIF1, di questa sequenza sul promotore di CSB, nei fibroblasti umani normali, sia dopo privazione di ossigeno sia dopo il trattamento con un agente chimico ipossia-mimetico. Si vide che in queste cellule, la presenza di HIF1 a livello del promotore di CSB, aumenta progressivamente in condizioni di concentrazioni di ossigeno intorno all'1% e a questo aumento del legame di HIF1, corrispondeva l'aumento della sintesi dell'mRNA di CSB [66]. CSB, pertanto, è un bersaglio diretto di HIF1 in risposta all'ipossia. Usando linee di fibroblasti umani derivate da pazienti Cockayne, in cui la proteina CSB era completamente assente o tronca e di fatto non funzionale, si osservò che in condizioni di ipossia, l'espressione di uno dei principali geni bersaglio di HIF1, VEGF, risultava consistentemente ridotta rispetto alle cellule normali. Lo stesso si osservava nelle cellule normali in cui l'espressione di CSB era stata silenziata mediante la tecnica di RNAi, dimostrando così il ruolo essenziale della proteina CSB nella via di risposta all'ipossia. Inoltre, gli insulti genotossici, tra cui il danno ossidativo (sperimentalmente procurato con il potassio bromato KBrO_3), esasperavano i difetti presenti nelle cellule CSB. Questo aspetto è molto interessante dal momento che è ben noto che l'ipossia compromette la catena respiratoria mitocondriale, portando ad una sovrapproduzione di specie reattive all'ossigeno, ROS. Ciò potrebbe poi iniziare una pericolosa catena di eventi in cui l'ipossia aumenta il danno, e il danno a sua volta induce l'ipossia portando alla morte cellulare. Analizzando lo stato di acetilazione degli istoni intorno alla regione promotrice del gene VEGF, per valutare il grado di alterazione delle cromatina in seguito all'attivazione in risposta all'ipossia, si rilevò un notevole difetto nell'acetilazione dell'istone H4 del promotore, nelle cellule CSB, rispetto alle cellule normali. Questo ridotto livello di acetilazione, era correlato con un reclutamento inefficiente dell'istone-acetiltransferasi p300, sul promotore del gene. Lo stesso trend si osservava per il gene *housekeeping* GAPDH, noto per essere indotto dal fattore HIF1: nelle cellule normali, ma non in quelle CSB difettive, si aveva l'aumento dei livelli di mRNA del gene; in assenza di CSB, nonostante il legame efficiente di HIF1, si aveva il mancato reclutamento dell'RNA Pol II a livello del promotore di GAPDH, e un difetto nell'acetilazione dell'istone H4 e del

reclutamento di p300 nelle sequenze limitrofe. Perciò, nonostante il reclutamento normale di HIF1 sull'elemento di risposta HRE, a causa del mancato reclutamento di p300, la cromatina circostante la regione promotrice risulta scarsamente acetilata e di conseguenza il complesso di pre-inizio della trascrizione non riesce ad assemblarsi su questi siti. Questi aspetti risultano direttamente collegati con il livello della proteina p53, che è eccezionalmente elevato nelle cellule CSB in condizione di ipossia. Lo stress ipossico è in grado di indurre la sovra-regolazione di p53, e l'attivazione dei suoi geni bersaglio. Si è visto infatti che nelle cellule CSB mutate, due dei principali geni di risposta a p53, il gene p21, regolatore del ciclo cellulare e il gene Bax, mediatore dell'apoptosi, in condizione di ipossia vengono attivati, con conseguente aumento dell'espressione dell' mRNA e della sintesi delle proteine. La sovra-regolazione di p53, nelle cellule CS, porta ad un consistente blocco del ciclo cellulare nella fase di transizione G1/S; al tempo stesso, lo studio morfologico dell'apoptosi, mostra un drammatico aumento della morte nelle cellule CSB rispetto a quelle normali. Questi dati dimostravano che nelle cellule CSB mutate, la risposta all'ipossia mediata da p53 è predominante rispetto a quella mediata da HIF1 e porta alla perdita cellulare, promuovendo l'arresto del ciclo e l'apoptosi.

Diversi studi hanno suggerito l'esistenza di un'interazione competitiva tra p53 e HIF1 per il co-attivatore trascrizionale p300, presente in quantità limitate. In quest'ottica i ricercatori si sono chiesti se la forte attivazione di p53 osservata nelle cellule CSB, potesse esercitare un effetto inibitorio sull'attivazione dei geni bersaglio di HIF1, mediante la deprivazione di p300 a livello dei promotori di risposta ad HIF1, e quale fosse il ruolo della proteina CSB in questo processo. Di fatto, quando p53 veniva attivata, essa attenuava la risposta adattativa controllata da HIF1. Quando si induceva la sovraespressione di p300, veniva meno l'inibizione dell'attività controllata da HIF1, causata dagli elevati livelli di p53. Un risultato simile si otteneva con la sovraespressione di CSB. Si vide che nelle cellule normali, CSB non si lega al promotore del gene VEGF, non esercita un'azione in cis su questo promotore, ma la funzione indispensabile che pare avere CSB per la corretta attivazione del meccanismo HRE/HIF1, suggerisce un ruolo aggiuntivo di CSB durante il processo di inizio della trascrizione, prospettando l'ipotesi di un'azione di CSB in trans sul promotore. Analizzando le interazioni proteiche mediante esperimenti di immunoprecipitazione con peptidi ricombinanti, è stato mostrato il legame competitivo di CSB e p300 a p53. Come risultato dell'espressione di CSB, l'interazione tra p53 e p300, così come l'attività di trans-attivazione di p53, per la quale tale interazione è fondamentale, era significativamente ridotta. La sovra-regolazione di CSB durante l'ipossia, potrebbe indicare un ruolo di CSB come parte di un

meccanismo a feedback negativo atto a diminuire la concentrazione della proteina p53, e la sua attività. E' probabile che la proteina CSB, modulando l'attività di p53 dopo un stress cellulare, possa riequilibrare la risposta fisiologica in direzione della proliferazione cellulare e della sopravvivenza invece che verso il blocco del ciclo e la morte cellulare. Al contrario, in assenza di CSB, l'aumentato legame tra p53 e p300 causa la stabilizzazione di p53 e l'attivazione dei suoi geni bersaglio, inclusi quelli coinvolti nell'attuazione del programma apoptotico. L'importanza del ruolo di p300 è sottolineata dal fatto che esso regola l'espressione di una serie di geni e viene dimostrato in questo lavoro, che una pronunciata risposta p53-mediata può risultare tossica perché questa proteina sottrae fattori di trascrizione essenziali come p300, che sono richiesti anche per la risposta trascrizionale anti-apoptotica. In questo senso, CSB avrebbe una funzione importante, nell'interagire con p53 e perciò consentendo il rilascio del fattore p300 da parte di p53 (Figura 9).

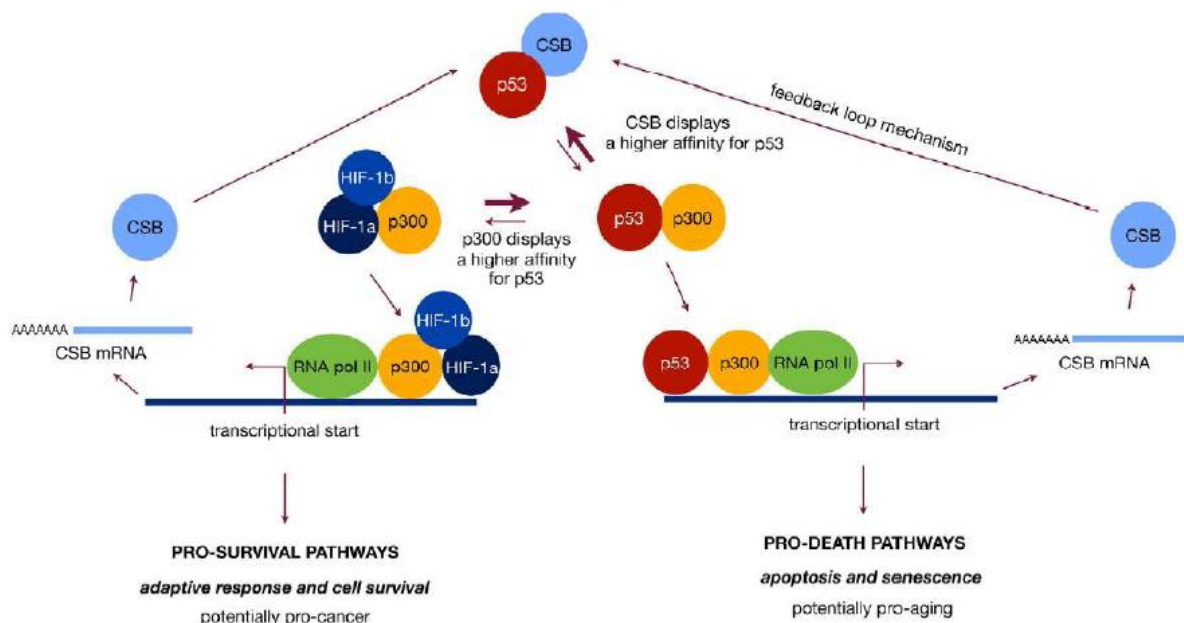


Fig. 9: CSB assume un ruolo chiave nella determinazione del destino cellulare, permettendo l'attivazione di pathway pro-sopravvivenza, come quello mediato da HIF-1, grazie al suo legame a p53, che permette il rilascio di fattori come p300. In tal modo CSB modula/limita un'eccessiva risposta pro-apoptotica (riadattata da Frontini and Proietti de Santis, 2012)

Questa ipotesi spiegherebbe anche perché nelle cellule CSB difettive, l'induzione di p53 risulta aumentata sia in durata che in intensità. Pertanto i ricercatori hanno proposto che CSB, accanto al

suo ruolo durante la riparazione e la trascrizione del DNA, funzioni come principale fattore discriminante che può influenzare selettivamente la trascrizione di una serie di geni, in seguito al danneggiamento del DNA o ad altri insulti cui è sottoposta la cellula, attraverso la modulazione delle funzioni di p53. Questi dati forniscono importanti informazioni per la comprensione del fenotipo neurodegenerativo osservato in Cockayne. Tra i geni che non vengono adeguatamente attivati nelle cellule CSB mutanti, vi sono i geni VEGF e GAPDH, che hanno un ruolo fondamentale nell'angiogenesi e nel metabolismo del glucosio rispettivamente. L'integrità funzionale e strutturale del cervello, dipende profondamente dal regolare rifornimento di glucosio ed ossigeno. Dal momento che l'ossigeno può anche essere dannoso, poiché tossico, esistono meccanismi che consentono al cervello di lavorare in condizioni di basse concentrazioni di ossigeno. La risposta adattativa all'ipossia coinvolge processi metabolici e vascolari che sono mediati da HIF1, e comporta l'induzione di enzimi e fattori di crescita che inducono il processo di angiogenesi e glicolisi anaerobica. Perciò, la generale inibizione dell'espressione dei geni controllati dal fattore HIF1, come osservato nelle cellule CSB mutate, potrebbe essere alla base del fenotipo neurodegenerativo osservato nei pazienti Cockayne. Parallelamente, l'elevata espressione di p53, ha una parte importante nell'invecchiamento precoce che anche caratterizza il fenotipo Cockayne, come già mostrato per altre malattie come il morbo di Parkinson, il morbo di Alzheimer e la malattia di Huntington. Nonostante alcune ipotesi, il motivo della ridotta predisposizione al cancro nei pazienti CS, malgrado il difetto nel processo di riparazione del DNA, non è ancora chiaro. Diversi studi hanno associato le funzioni di HIF1 con la progressione tumorale nell'uomo. L'ipossia, infatti si verifica nelle fasi precoci dello sviluppo tumorale, prima delle metastasi, quando la massa tumorale diventa più estesa di 2 mm e non viene più sostenuta dalla vascolarizzazione pre-esistente. La capacità di sopravvivere in condizioni di ipossia rappresenta una delle fondamentali differenze tra cellule tumorali e cellule normali. I geni indotti dall'ipossia regolano diversi processi biologici che comprendono la proliferazione cellulare, l'angiogenesi, il metabolismo, l'apoptosi, la migrazione e l'immortalizzazione, che coincidono con quelli richiesti dalle cellule cancerose. Poiché molte delle azioni controllate da HIF1 promuovono la sopravvivenza cellulare, è stata sollevata la questione se HIF1 possa essere considerato un fattore anti-apoptotico. In diversi studi è stato riportato che molti geni di sopravvivenza, come ad esempio quello per la nucleofosmina, sono indotti dall'ipossia in maniera HIF1-dipendente, supportando così, l'idea che HIF1 possa proteggere i tessuti o le cellule interessate da una condizione di scarsità di ossigeno, inibendo l'attivazione di p53 e mantenendo la sopravvivenza cellulare. A tal proposito, i dati descritti

indicano che anche CSB è un gene di risposta al fattore HIF1. Un'ipotesi plausibile è quindi che l'incapacità delle cellule CS di rispondere adeguatamente all'ipossia, prevenga lo sviluppo del cancro nei pazienti Cockayne [66].

1.2 DNA E DISTURBI NEUROLOGICI

Risulta ragionevole supporre che la principale manifestazione clinica dovuta alle mutazioni a carico dei geni preposti alla riparazione del DNA sia l'aumento della predisposizione al cancro. Di fatto, un elevato rischio di sviluppare diversi tipi di cancro è associato a differenti sindromi con difetti nella riparazione del DNA, come si osserva nei pazienti affetti da anemia di Fanconi e Xeroderma Pigmentoso. Tuttavia, sta cominciando a diventare sempre più chiaro che un'altra manifestazione clinica comune delle mutazioni nei geni preposti alla riparazione del DNA è il difetto neurologico. Sono state descritte almeno 16 malattie ereditarie dovute a difetti nella riparazione del DNA in cui le anomalie neurologiche rappresentano il principale e in alcuni casi l'unico effetto delle mutazioni a carico di questi geni.

Il modello classico per il disturbo neurologico sostiene che l'accumulo del danno al DNA provoca la morte neuronale. Tuttavia, nella tricotiodistrofia (TTD) e nella sindrome di Cockayne, il più importante aspetto della neuropatologia non è la neurodegenerazione (morte neuronale), ma piuttosto il difetto nel deposito della mielina.

1.2.1 Modello classico: accumulo di danno al DNA e morte neuronale

Questo meccanismo è stato proposto originariamente da Robbins e collaboratori nel tentativo di spiegare la neurodegenerazione osservata nei pazienti XP. Secondo questo modello, negli individui normali il danno endogeno al DNA viene prodotto costantemente, ma al tempo stesso riparato, portando ad un livello base di danneggiamento che risulta compatibile con le normali funzioni cellulari. Nei pazienti con un difetto nella riparazione del DNA, il danno endogeno non viene riparato e si accumula nel tempo, portando infine alla morte neuronale come conseguenza di una trascrizione compromessa [67].

L'applicabilità di questo modello venne valutata nell'Ataxia Telangiectasia (TA) – come paradigma di una malattia dovuta alle mutazioni a carico di un gene coinvolto nell'individuazione del danno al DNA – dove un dato inizialmente poco favorevole per il modello è l'osservazione che la proteina

ATM, che nella maggior parte delle cellule localizza all'interno del nucleo, nelle cellule del Purkinje, sia nell'uomo che nel topo, sembra essere localizzata a livello del citoplasma. La degenerazione dei neuroni del Purkinje costituisce l'aspetto fondamentale di questa malattia. La localizzazione citoplasmatica della proteina ATM in queste cellule, poteva quindi indicare un ruolo diverso per la proteina rispetto a quello di segnalazione del danno al DNA, e provare l'esistenza di un meccanismo patologico diverso da quello collegato al difetto nelle vie di riparazione. Tuttavia, studi condotti su cellule nervose umane, mostrarono che la proteina ATM è localizzata primariamente nel nucleo e risponde al danno al DNA così come fa in altri tipi cellulari. Anche nei neuroni cerebellari dei topi, inclusi i neuroni del Purkinje, la proteina ATM risulta localizzata nel nucleo e può venire fosforilata su un residuo equivalente alla ser1981 della corrispondente proteina umana. Questi ulteriori dati sulla localizzazione della proteina di riparazione ATM, sono quindi coerenti con l'ipotesi che almeno una delle funzioni della proteina ATM nei neuroni del Purkinje è l'individuazione del danno al DNA. Inoltre, per quel che riguarda lo stadio di sviluppo dei neuroni del Purkinje in cui la proteina ATM funziona, studi condotti su topi knockout per ATM, *Atm*^{-/-}, hanno mostrato che la proteina agisce ad uno stadio immediatamente successivo al differenziamento terminale per guidare l'apoptosi dei neuroni che hanno subito un eccessivo danno al DNA durante lo sviluppo cerebrale. In accordo con questo modello, in assenza di ATM, questi neuroni sopravvivono e vanno a popolare lo strato del Purkinje, solo per poi degenerare come risultato dell'eccessivo accumulo di danno subito nelle fasi di sviluppo. Quindi, la proteina ATM potrebbe svolgere entrambe le funzioni, quella pro-apoptotica subito dopo il differenziamento neuronale terminale e quella di segnalazione del danno al DNA, così che il fenotipo dei pazienti AT si possa considerare dovuto alla perdita di entrambe queste funzioni, convalidando comunque il modello della neurodegenerazione dovuta all'accumulo del danno [67].

1.2.2 Modello del fallimento trascrizionale

La scoperta che le proteine XPB e XPD fanno parte del fattore di trascrizione TFIIH ha portato alla comprensione del duplice ruolo che TFIIH svolge sia nella trascrizione che nella riparazione del DNA. Ciò ha portato alla definizione del concetto di sindrome trascrizionale, secondo cui alcune delle manifestazioni cliniche osservate nei pazienti CS e TTD che presentano mutazioni a carico di questi due geni, possano essere dovute a difetti trascrizionali piuttosto che a difetti nella riparazione del DNA. Durante il NER e la trascrizione, il fattore TFIIH funziona come un'elicasi,

aprendo il DNA durante la riparazione o in prossimità del promotore genico per consentire l'inizio della trascrizione. Accanto al ruolo nell'apertura del DNA, TFIIH possiede un altro ruolo meccanicamente distinto nella regolazione della trascrizione, che è legato alla sua funzione di protein chinasi che fosforila i recettori nucleari degli ormoni. Nello specifico, è risultato che TFIIH può agire come co-attivatore per la regolazione del gene dipendente dall'ormone tiroideo e la perdita di questa funzione è responsabile della maggior parte delle anomalie neurologiche osservate nei pazienti TTD. In quest'ottica, Compe e collaboratori hanno studiato il corrispettivo murino della malattia TTD umana, mostrando per primi che il peso totale del cervello dei topi TTD, 20 giorni dopo la nascita, era inferiore rispetto a quello dei topi normali, e presentavano chiaramente una mielinizzazione diffusamente ridotta [68]. Considerando che diversi aspetti neurologici nei pazienti TTD, compresa la demielinizzazione, erano simili a quelli osservati nei disturbi dovuti a carenze nell'ormone tiroideo, i ricercatori hanno analizzato l'espressione dei geni dipendenti dall'ormone tiroideo nel cervello dei topi TTD, inclusi quelli coinvolti nella sintesi della mielina. In generale, sono stati osservati livelli di espressione ridotti per questi geni in molte regioni del cervello; in aggiunta, le analisi morfologiche del cervello mostravano un elevato numero di assoni demielinizzati, indicando chiaramente l'esistenza di un difetto funzionale nel processo di mielinizzazione. I ricercatori osservarono inoltre che, nei tessuti e nelle cellule TTD, il reclutamento del recettore tiroideo ormone dipendente sugli elementi di risposta nei promotori era compromesso, riflettendo l'instabilità dell'interazione tra il recettore tiroideo e l'elemento di risposta sul DNA. Questa ridotta stabilizzazione del recettore tiroideo non era dovuta alla diminuzione nei livelli di fosforilazione del recettore tiroideo da parte di TFIIH, ma d'altra parte la diminuzione nei livelli di TFIIH mediante il silenziamento di XPD, riduceva la trans-attivazione del gene dipendente dal recettore tiroideo. Nel complesso questi dati hanno contribuito ad indicare che TFIIH può agire come co-attivatore per la trascrizione ormone tiroideo dipendente nel topo e nelle cellule umane, e supportano l'ipotesi secondo cui le mutazioni a carico del gene XPD possono portare a difetti di mielinizzazione per la perdita dell'azione di co-attivatore trascrizionale da parte del fattore TFIIH [67].

1.2.3 Modello infiammatorio

In alcuni studi incentrati sull'analisi del profilo di espressione genica mediante la tecnologia dei microarray, su fibroblasti umani derivati da pazienti Cockayne (linea CS1AN), è stato possibile individuare alcuni schemi di espressione dei geni controllati da CSB che indicano l'esistenza di pathway trascrizionali di natura infiammatoria sovra-regolate in Cockayne [69]. Si osservò, per prima cosa, che l'espressione dei geni regolati dalle vie di p53/p21, TGF β e TNF α /JNK risultano alterate dalla perdita di CSB nelle cellule CS. Oltretutto, quando venne utilizzato un software per la predizione della quantità di siti di legame per specifici fattori di trascrizione, nei promotori dei geni regolati da CSB, si osservò che c'era una sovrabbondanza di siti correlati al fattore di trascrizione pro-infiammatorio NF- κ B, nei geni sovra-regolati dalla perdita di CSB. Secondo, CSB aumenta il livello di trascrizione di molti geni che sono sovra-regolati anche dai farmaci anti-infiammatori. Infine, molti dei geni attivati da CSB si sovrappongono con quelli associati con le cellule cancerose altamente proliferanti, e con le risposte ai fattori di crescita VEGF ed EGF. Diversi geni sovra-regolati in modo più consistente da CSB, sono coinvolti nella risposta immunitaria, risultando associati con l'induzione degli interferoni, o con la risposta all'infezione virale. Nel complesso, stando a questi dati, le cellule CSB mutate sembrano trovarsi in una condizione di stress infiammatorio. Pertanto, la perdita di CSB favorisce l'instaurarsi di un profilo di espressione genica di tipo pro-apoptotico e infiammatorio, che potrebbe costituire il legame tra la funzione di CSB e il fenotipo CS.

Questi studi indicano inoltre, che il pattern di deregolazione genica riscontrato nelle cellule mutate per CSB ricalca quello indotto da alcuni agenti che interferiscono con i complessi di modificazione della cromatina. Dal momento che CSB appartiene alla famiglia dei rimodellatori della cromatina SWI2/SNF2, è stato proposto che questa sua funzione possa avere un ruolo importante nella regolazione di geni specifici, rendendoli più o meno accessibili al macchinario trascrizionale.

Secondo questo modello quindi la perdita di CSB avrebbe come risultato, un generale difetto nel mantenimento e rimodellamento della cromatina su geni chiave pro-sopravvivenza, iniziando un circolo vizioso in cui la cellula è incapace di rispondere in modo appropriato a vari tipi di stress, che inducono un profilo d'espressione tipico di una risposta infiammatoria pro-apoptotica, i cui geni risulterebbero impossibili da spegnere proprio a causa della perdita di funzione di CSB. Nel complesso le cellule mutanti per CSB sembrano mostrare i tipici sintomi di uno stress infiammatorio cronico. Ciò potrebbe essere all'origine del carattere neurodegenerativo della

sindrome di Cockayne, sia per quanto riguarda la perdita neuronale che la demielinizzazione e la calcificazione. Tuttavia ciò non esclude il ruolo del difetto nei meccanismi di riparazione al DNA in cui è coinvolta CSB, nella determinazione del fenotipo Cockayne. La perdita di meccanismi fondamentali come il TCR e il BER (quest'ultimo per quanto riguarda la riparazione di almeno alcuni danni ossidativi), promuoverebbe infatti la morte cellulare e l'incapacità di portare avanti la trascrizione anche su geni fondamentali, contribuendo agli stress cui la cellula è sottoposta. Tutto ciò porterebbe a una condizione in cui stress di vario tipo, da quello ipossico a quello ossidativo, innescerebbero un'inflammatione cronica e priva di un'efficiente regolazione, a cui si accompagnerebbe un'estesa morte neuronale causata dall'accumularsi del danno al DNA e dall'impossibilità di recuperare una corretta attività trascrizionale [69].

SCOPO DEL LAVORO

2 RUOLO DI CSB NELLA NEUROPATIA IN COCKAYNE

2.1 DIFETTI NEUROLOGICI

Nonostante la sindrome di Cockayne appartenga al gruppo delle malattie dovute a un difetto nel processo di riparazione dei danni indotti al DNA, in particolare quelli prodotti dalla radiazione ultravioletta, come i dimeri di pirimidina, i piccoli pazienti affetti presentano gravi anomalie neurologiche. La sindrome di Cockayne si caratterizza per disordini del sistema nervoso, quali morte neuronale, demielinizzazione non uniforme e calcificazione, che nel complesso sfociano in una progressiva sindrome neurodegenerativa. Questa, insieme agli altri sintomi non neurologici, determina morte prematura già nella pre-adolescenza. I pazienti affetti dalla malattia, associata a difetti nei sistemi di riparazione e trascrizione del DNA, nella maggior parte dei casi presentano mutazioni sul gene ERCC6 codificante la proteina CSB. Il fatto che queste anomalie insorgano precocemente, alla nascita fino alla prima infanzia, per poi acuirsi con andamento progressivo compromettendo drammaticamente le capacità sensoriali e cognitive dei malati Cockayne, ha indotto ad ipotizzare che la proteina CSB possa avere un ruolo importante in processi come la plasticità neuronale e il mantenimento dell'omeostasi del sistema nervoso. Allo scopo di approfondire più nello specifico le manifestazioni neuropatologiche osservate per avere un quadro completo dei disturbi neurologici, può essere utile considerare i risultati raccolti dalle osservazioni di alcuni casi clinici.

2.1.1 Aspetti macroscopici

Il peso dell'encefalo rapportato all'età del paziente è generalmente molto inferiore rispetto al normale. In alcuni individui tale peso è inferiore al peso normale dell'encefalo di un neonato. Questo volume encefalico ridotto probabilmente deriva dalla combinazione tra una crescita inadeguata nella fase precoce dello sviluppo, con conseguente microcefalia e una progressiva neurodegenerazione postnatale. Lo schema delle anse encefaliche è normale, ma spesso si ha l'allargamento dei solchi. L'atrofia della sostanza bianca è tipicamente molto severa e sproporzionata rispetto all'atrofia della corteccia cerebrale. Il corpo calloso è generalmente

assottigliato; i ventricoli sono allargati. Il tronco encefalico mostra la pigmentazione da neuromelanina nella sostanza nera, il sito ceruleo appropriato per l'età, mentre si osserva una scoloritura rosso-marrone nella sostanza nera. Il cervelletto risulta atrofico [70].

2.1.2 Aspetti microscopici

Corteccia cerebrale

Nella maggior parte dei casi, la corteccia non presenta grosse malformazioni o segni di disordini nell'architettura. Un bimbo di 5 mesi con la sindrome COFS presentava microanse parietali con una corteccia a quattro strati associata con agenesi del corpo calloso posteriore, difetti nella migrazione neuronale nel cervello e nella sostanza bianca del cervelletto. Malformazioni come queste costituiscono comunque delle eccezioni. I cordoni corticali in molti casi sono sottili ma senza segni di disorganizzazioni cellulari. Si ritiene molto più probabile che vi sia una progressiva perdita neuronale piuttosto che un inadeguato corredo di neuroni corticali poiché l'assottigliamento della corteccia non è stato trovato in tre casi di bimbi malati di COFS di 6 mesi o meno di vita, ma compariva in quattro bambini tra 4 e 7 anni di età in cui la perdita neuronale appariva diffusa. In alcuni casi gli osservatori hanno riportato che i neuroni grandi erano preservati e mantenuti e i neuroni piccoli selettivamente persi. In altri casi la perdita neuronale risultava predominante in profondità nei solchi, dove i neuroni restanti presentavano depositi di minerali come ferro e calcio (tipico dei neuroni in fase di morte), così da assumere l'aspetto detto di neuroni ferruginosi, suggerendo la presenza di danno ipossico-ischemico. In altri casi, in cui veniva riportata perdita neuronale, essa sembrava predominare nell'ippocampo, che è una regione vulnerabile e spesso soggetta al danno ipossico. Alcuni neuroni residui erano descritti come picnotici e in alcuni casi si aveva astrogliosi reattiva associata alla microgliosi [71].

La conta cellulare condotta di fatto su un piccolo numero di casi e rispettivi controlli, solleva domande relative alla perdita neuronale a carattere diffuso in CS, nonostante la chiara descrizione di strati corticali più sottili. In quattro casi di bambini e adolescenti (7-19 anni) con CS, la conta dei neuroni piramidali frontali, parietali, temporali e occipitali degli strati 3 e 5 diminuiva modestamente con l'età sia nei CS che nei controlli, in contrasto con quanto osservato in cinque casi di XPA con disturbi neurologici in cui la perdita neuronale si mostra inequivocabile e progressiva. In un caso, la conta cellulare nella corteccia frontale e parietale di un paziente di 17 anni, mostrava un corredo completo di neuroni di grandezza media, mentre c'era disorganizzazione in foci localizzati, astrocitosi e scarsa laminazione del giro di Heschl, ma non

perdita neuronale [72]. I dendriti, nello specifico i dendriti basilari dei neuroni più piccoli, possedevano meno ramificazioni di ordine superiore e perdevano il normale assetto di spine. A causa dei pronunciati segni di invecchiamento precoce che caratterizzano la sindrome di Cockayne, sono state ricercate eventuali placche amiloidi, che tuttavia non sono state trovate, mentre in alcuni casi si avevano grovigli neurofibrillari e corpi di Hirano. Grovigli senza placche sono stati riportati in due bambini, in uno dei quali questi erano molto numerosi; in una donna di 35 anni sono stati osservati corpi di Marinesco intranucleari nei neuroni residui della sostanza nera.

Nuclei grigi profondi

Uno degli aspetti più appariscenti e pressoché costante nei pazienti CS osservati è la calcificazione, o più propriamente la mineralizzazione dal momento che negli accumuli calcificati si ha marcatura sia per il ferro che per il calcio [73]. La calcificazione predomina nelle pareti e negli spazi perivascolari dei grandi e piccoli vasi sanguigni nei gangli basali, specialmente nel globo pallido e nel putamen. E' riportata, anche se meno spesso e con minore severità anche nei nuclei dentati del cervelletto, nella sostanza bianca cerebrale e nelle profondità dei solchi corticali, specialmente nel lobo frontale. La calcificazione in queste aree è stata osservata in diverse condizioni tra cui le infezioni, i traumi e l'ischemia. Alcuni dei neuroni che si avviano alla morte nei gangli basali risultano incrostati con depositi minerali e si dicono ferruginosi. In alcuni casi di CS oltre che nel globo pallido, questi neuroni ferruginosi si osservano nella parte reticolata della sostanza nera, nel nucleo dentato del cervelletto e nelle cellule del Purkinje. La distrofia neuroassonale è un'altra caratteristica dei malati CS, che riguarda il globo pallido, la sostanza nera e il cervelletto [73]. Gli assoni distrofici sono stati trovati possedere immunoreattività all'ubiquitina che è anche una caratteristica della distrofia assonale associata con l'invecchiamento. Rispetto alla sindrome di Cockayne, la calcificazione non è un aspetto universale delle malattie dei gangli basali associate con una profonda perdita neuronale e con la distrofia neuroassonale, pertanto, la mineralizzazione in CS sembra avere uno specifico meccanismo patogenetico.

Sostanza bianca

La perdita di mielina, che avviene in modo non uniforme ma a zone, è una caratteristica universale e molto precoce dei malati CS, progressiva e spesso molto severa, sebbene non sia ancora chiaro se questa sia una mielinopatia dello sviluppo, degenerativa o entrambe [71]. Conduce a un assottigliamento della sostanza bianca emisferica, e interessa in misura minore anche quella cerebellare. Il fatto che gli assoni restino talvolta relativamente intatti nelle aree demielinizzate suggerirebbe che la mielinopatia colpisca prevalentemente gli oligodendrociti. I nuclei degli oligodendrociti sono spesso allargati, ipercromatici e hanno contorni irregolari nelle zone in cui la mielina è conservata. Non si hanno invece segni di infiammazione nelle zone con mielinopatia. Diversi autori hanno suggerito che la CS possa essere una patologia dismielinizzante piuttosto che demielinizzante [71]. Ciò vuol dire che la struttura o la funzione del rivestimento mielinico sono di per se alterati, per cui la perdita di mielina non sarebbe dovuta a lesioni o a perdita di mielina prima normale (demielinizzazione), ma a difetti intrinseci dovuti alla presenza di un errore metabolico geneticamente determinato che compromette la formazione e la biosintesi della mielina (dismielinizzazione). D'altra parte, non sono stati descritti nei malati CS fenomeni in accordo con difetti biochimici di mielina aberrata, come accumulo di mielina, inclusioni anormali o caratteristiche insolite relative alla marcatura della sostanza bianca. Evidenze inequivocabili hanno dimostrato che la perdita di mielina avviene in modo progressivo, come indicato da studi di *imaging* e dal carattere disomogeneo del fenomeno che si presenta a chiazze, con assoni normalmente mielinizzati situati fra zone demielinizzate. Il fatto che la demielinizzazione progredisca a zone suggerirebbe inoltre un processo di tipo multifocale piuttosto che diffuso [74]. La mielinopatia in CS colpisce sia la mielina centrale che quella periferica. Ciò significa che due tipi cellulari distinti sono coinvolti nel processo, gli oligodendrociti per la mielina centrale e le cellule di Schwann in quella periferica. Un processo TCR inefficiente che riguarda sia gli oligodendrociti che le cellule di Schwann, entrambe cellule proliferanti, potrebbe spiegare il coinvolgimento comune della mielina centrale e di quella periferica. Gli oligodendrociti sono altamente suscettibili al danno, e il citoplasma allargato e irregolare con nuclei ipercromatinici suggeriscono un accumulo di frammenti di DNA non riparati [75]. Un'ipotesi attribuisce le cause del fenomeno a una funzione deficitaria degli oligodendrociti, che produrrebbero mielina meno stabile e quindi maggiormente soggetta a degradazione precoce, il tutto probabilmente correlato alle conseguenze della mancata

o incompleta riparazione dei danni ossidativi. L'estrema atrofia della sostanza bianca porta all'allargamento dell'intero sistema ventricolare.

Cervelletto

In tutti i casi esaminati sia a livello macroscopico che microscopico si osserva un'atrofia cerebellare non uniforme, e questo aspetto è assai frequente in CS. La perdita neuronale coinvolge sia le cellule del Purkinje che quelle granulari del verme cerebellare e degli emisferi ed è associata ad una pronunciata proliferazione atipica di astrociti di Bergmann in prossimità di neuroni morenti o persi. In diversi casi è stata riportata la calcificazione dendritica delle cellule del Purkinje e segni di apoptosi delle cellule granulari. Anche la sostanza bianca cerebellare è caratterizzata da mielinopatia disomogenea come avviene per quella degli emisferi cerebrali [70].

Tronco encefalico e midollo spinale

Le strutture del tronco encefalico sono generalmente meglio conservate rispetto all'encefalo e al cervelletto, con assottigliamenti del tratto lungo, ma un meno severo coinvolgimento vascolare rispetto ai due compartimenti sopra menzionati. Il sito ceruleo e la porzione compatta della sostanza nera presentano una normale pigmentazione di neuromelanina, ma in alcuni casi si ha deposito di ferro e sferoidi assonali. In una giovane donna di 22 anni con CS, nella parte reticolata è stata riportata gliosi fibrillare con astrociti morfologicamente anomali. La perdita di neuroni non risulta evidente a livello dei nuclei dei nervi cranici, ma è stata riportata in un paziente CS di 15 anni affetto da sordità.

Nei pochi casi descritti, per il midollo spinale sono stati menzionati due aspetti patologici: demielinizzazione nei tratti lunghi e segni di perdita neuronale nella sostanza grigia [70].

Nervi periferici

Un tratto caratteristico della sindrome di Cockayne è la demielinizzazione segmentale dei nervi periferici, specialmente nelle radici anteriori. In molti casi è stata documentata una ridotta velocità

nella conduzione nervosa, che sembra peggiorare con l'età. La neuropatia in CS è dovuta alla demielinizzazione primaria con una perdita assonale secondaria che può diventare molto severa, e si ritiene che influenzi sia le funzioni motorie che quelle sensoriali [76].

Non è noto tuttavia se la degenerazione assonale sia causata da una progressiva demielinizzazione o se la perdita neuronale primaria possa contribuire a una neuropatia combinata assonale e mielinica.

Occhio e sistema visivo

Un altro segno distintivo della malattia sono occhi infossati nelle orbite a causa della mancanza di grasso orbitale, pupille poco reattive, cataratte, retinite pigmentosa e atrofia ottica [77]. L'atrofia del muscolo dilatatore dell'iride spiega la scarsa reattività delle pupille, mentre l'atrofia del nervo ottico si associa alla perdita di mielina, similmente a quanto visto per la demielinizzazione centrale. Una marcata riduzione nel numero delle cellule ganglioniche della retina si accompagna con la perdita degli assoni del nervo ottico. I fotorecettori sono fortemente danneggiati, l'epitelio pigmentato va incontro ad atrofia in modo non uniforme e ipertrofia con diffusa migrazione dei granuli pigmentati e dei macrofagi [78].

Neuroni, astrociti, oligodendrociti e microglia

I neuroni, e nello specifico i loro mitocondri, a causa della loro dipendenza dal glucosio come combustibile e la loro richiesta di ossigeno, sono altamente sensibili allo stress ossidativo. Questo stress genera un eccesso di radicali liberi tossici, responsabili del malfunzionamento e della morte delle cellule e come già detto, sia la proteina CSA che la proteina CSB sono coinvolte nella risposta al danno al DNA indotto dai radicali liberi [79]. Sporadici neuroni binucleati e astrociti multinucleati allargati suggeriscono un TCR inadeguato con conseguente blocco della mitosi in aggiunta ad una trascrizione inefficiente e le sue conseguenze metaboliche. La perdita neuronale a livello neocorticale è meno severa in CS che nell'XP; riduzione di neuroni con severità variabile viene riportata nella formazione dell'ippocampo e si ritiene che ciò possa avere un ruolo nel tratto relativo alla demenza dei malati CS. Un fattore aggiuntivo è la selettiva riduzione di neuroni nella corteccia visiva e uditiva, probabilmente correlata ad una perdita di afferenze. Questa patologia

diffusa a carico dei neuroni e ancor di più la patologia nella sostanza bianca contribuiscono al progressivo indebolimento cognitivo in CS [70].

La gliosi astrocitica è un aspetto importante in CS, ma non è chiaro se la proliferazione astrocitica è una reazione alla perdita neuronale e alla perdita di mielina, o se essa rappresenta il coinvolgimento primario degli astrociti. Gli astrociti, infatti, sono intimamente associati ai neuroni e giocano molti ruoli come il mantenimento dell'omeostasi dell'ambiente neuronale, la regolazione dei flussi ionici e del glutammato, e il mantenimento della barriera emato-encefalica. A differenza dei neuroni che sono post-mitotici, gli astrociti vanno in contro a divisione. Sono molto frequenti in CS, astrociti larghi, strani e multinucleati che rimandano ad un processo NER inadeguato che impedisce la mitosi normale e sfocia nell'accumulo di frammenti danneggiati di DNA e altri prodotti metabolici [70].

2.2 OBIETTIVI E MODELLI SPERIMENTALI

2.2.1 Obiettivo del lavoro

Sebbene siano note le basi genetiche della sindrome di Cockayne, la maggior parte dei pazienti, infatti, presenta una mutazione nel gene *csb*, gli aspetti molecolari della neuropatia ad essa associata restano ancora poco chiari. Da studi precedenti è emerso che la perdita di funzionalità della proteina CSB nei fibroblasti umani altera l'espressione delle proteine pro-apoptotiche e favorisce la morte cellulare programmata quando le cellule sono sottoposte, anche lievemente, a diversi tipi di stress, tra cui lo stress ossidativo e l'ipossia. Un'ipotesi verosimile è che la perdita di CSB si rifletta in un elevato tasso di mortalità delle cellule nervose, tale da avere ripercussioni sull'omeostasi del tessuto nervoso. In alternativa, la mancanza di CSB potrebbe influenzare i programmi trascrizionali che regolano il rinnovamento e il differenziamento delle cellule staminali neuronali adulte. Lo scopo generale del nostro studio è stato quello di comprendere se la perdita di cellule nervose, tipica del processo neurodegenerativo, sia un evento primario o conseguente alla perdita delle cellule progenitrici staminali, o delle cellule non neuronali della glia. Pertanto, con questo lavoro siamo voluti andare a studiare in che misura l'incapacità delle cellule CSB difettive di rispondere adeguatamente allo stress ossidativo e all'ipossia, influenzi lo sviluppo e la generazione di cellule nervose a partire dai progenitori indifferenziati che costituiscono il pool di

cellule multipotenti da cui dipende il differenziamento dei diversi tipi neuronali quali neuroni, astrociti, oligodendrociti. Di conseguenza, a differenza di quanto è stato fatto fino a questo momento negli approcci condotti per lo studio degli aspetti genetici e molecolari della sindrome di Cockayne, il nostro punto d'osservazione si colloca su un piano sostanzialmente diverso dai precedenti perché le indagini vengono condotte direttamente a partire dal sistema nervoso. Non è possibile infatti, estendere i risultati ottenuti dagli esperimenti condotti su fibroblasti umani, anche se derivati direttamente dai malati Cockayne, o su linee di cellule linfoblastoidi all'ambito nervoso dove le cellule hanno programmi trascrizionali e caratteristiche funzionali completamente diverse, né risulta utile indagare sugli effetti derivati dai danni indotti delle radiazioni ultraviolette in ambito neurologico dal momento che questa problematica non interessa il sistema encefalico, che non è esposto a questo tipo di lesioni. Il nostro obiettivo è stato quello di avviare primi esperimenti, mai condotti fin'ora su un modello cellulare *in vitro* di tipo nervoso, per osservare se e in che modo la perdita di una proteina CSB funzionale potesse compromettere l'integrità, la vitalità e il potenziale differenziativo di cellule staminali neuronali ed eventualmente individuare il ruolo che la proteina CSB può svolgere negli specifici programmi trascrizionali legati allo sviluppo delle cellule nervose, in virtù delle funzioni che le competono come membro della famiglia di rimodellatori della cromatina SWI2/SNF2, non solo nella riparazione del danno, ma anche nella modulazione di specifiche pathway trascrizionali.

2.2.2 Limiti di alcuni modelli e nostro nuovo modello di studio

Tutti gli studi sulla neurodegenerazione in Cockayne, fino a questo momento sono stati condotti su modelli murini coi quali, mediante il knockout genico, si è tentato di riprodurre nel topo il fenotipo neurologico corrispondente a quello umano. Tuttavia, i topi knockout per i geni *Csa* e *Csb* hanno il grosso limite di presentare un fenotipo neurologico più blando rispetto a quello osservato nella patologia umana, e molto spesso in questi studi per avere un quadro neuropatologico più simile a quello umano è stato necessario progettare incroci per creare doppi mutanti; poiché la sindrome di Cockayne condivide con lo Xeroderma Pigmentoso la stessa natura di malattia difettiva per il riparo dei danni attraverso il NER, molto spesso per studiare la neuropatia in CS attraverso questi doppi mutanti, accanto al gene *Csa* o *Csb* è stato spento un gene dei diversi gruppi di complementazione per l'XP, come *Xpc* o *Xpa*, nonostante questa malattia non sia caratterizzata da anomalie neurologiche. I topi CS contrariamente all'uomo sono predisposti al rischio di sviluppare

il cancro della pelle indotto da raggi UV-B o da agenti chimici e i topi $Csb^{-/-}$ sono sensibili ai raggi X e al danno ossidativo, anche se i topi non accumulano spontaneamente lesioni tipo 8-oxi-guanina con l'età. Si è visto che cellule mutate per Csb o per l'Ogg (8 oxiguanina DNA glicosilasi) mostrano una piccola riduzione nella riparazione globale delle lesioni 8-OH-G, mentre un'altra linea $Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}$ era completamente difettiva, dimostrando che le due pathway operano in maniera indipendente. Nell'uomo sia le cellule mutate per CSA che per CSB sono sensibili ai raggi UV e ai danni ossidativi, mentre nel topo solo le cellule Csb sono sensibili allo stress ossidativo mentre le cellule Csa sono resistenti. In generale comunque, fare delle semplici correlazioni tra la neurodegenerazione in CS con il difetto nella riparazione dei danni ossidativi, è difficile.

In una serie di esperimenti per lo studio della neurodegenerazione in CS, il gruppo di ricercatori guidato da Cleaver J.E., proprio a causa della ridotta severità del quadro neurologico dei topi $Csb^{-/-}$, ha incrociato tra loro topi $Csb^{-/-}$ con topi Xpc o $Ogg1$ per identificare anche la relativa importanza dei difetti nei processi di riparazione NER o nel BER nella patologia del sistema nervoso [80]. I risultati sono stati che, innanzi tutto, i topi $Csb^{-/-}/Xpc^{-/-}$ erano più piccoli rispetto ai controlli e ciò diventava più evidente 14 giorni dopo la nascita (P14) e drammatico al giorno 21 (P21), e sopravvivevano solo pochi giorni in più. Il ritardo progressivo della crescita e la mortalità precoce è stata osservata anche in altri modelli murini di CS: $Csb^{-/-}/Xpa^{-/-}$, $Xpg^{-/-}$, $Xpg^{-/-}/Xpa^{-/-}$. Il cervelletto contiene due principali tipi cellulari, le cellule dei granuli e le cellule del Purkinje, ed è il centro primario della coordinazione motoria nel sistema nervoso centrale CNS. Le cellule dei granuli sono le più abbondanti e forniscono gli input alle cellule del Purkinje, i cui assoni costituiscono i soli output dalla corteccia cerebellare, che a loro volta forniscono input alle molteplici cellule bersaglio. Lo sviluppo del cervelletto nell'uomo inizia nell'utero materno e continua per diversi anni dopo la nascita. Lo sviluppo prolungato espone il cervelletto per un lungo periodo al rischio di danno da parte di agenti che agiscono al momento della nascita e nel periodo postnatale precoce. Le cellule dei granuli sono vulnerabili a una certa varietà di tossine che diminuiscono i livelli di glutathione e fanno diventare le cellule più vulnerabili ai danni al DNA e ad altri danni cellulari derivati dalle specie reattive all'ossigeno. Le cellule del Purkinje sono suscettibili alla morte per ischemia a causa della loro ridotta capacità di sequestrare il glutammato e la ridotta capacità di generare energia durante l'anossia. I ricercatori hanno osservato la perdita di entrambi i tipi cellulari, cellule dei granuli e cellule del Purkinje nei topi $Csb^{-/-}/Xpc^{-/-}$. Nei topi $Csb^{-/-}/Xpa^{-/-}$, si osservano cellule del Purkinje con alberi dendritici atrofizzati, con uno spessore diminuito dello strato molecolare e dello strato dei granuli interno. Uno degli aspetti neuropatologici centrali nei

pazienti CS è l'estesa atrofia cerebellare, che include una marcata riduzione delle cellule dei granuli e la perdita delle cellule del Purkinje. Queste osservazioni indicherebbero che il cervelletto è particolarmente suscettibile al danno al DNA, e che i difetti nella riparazione hanno un effetto profondo sulla patologia del cervelletto. Sebbene la proteina CSB sembri essere espressa in modo ubiquitario nel cervello, la proteina XPC sembra essere abbondante solo nelle cellule del Purkinje, cosa questa che potrebbe spiegare perché i neuroni del Purkinje risultano particolarmente colpiti nei topi $Csb^{-/-}/Xpc^{-/-}$. Nelle cellule granulari esterne del cervelletto dei topi $Csb^{-/-}/Xpc^{-/-}$, è stato identificato un drammatico incremento dell'apoptosi, suggerendo che la perdita di entrambe i geni *Csb* e *Xpc* rende queste cellule vulnerabili alla morte. La perdita di cellule del Purkinje, nei topi $Csb^{-/-}/Xpc^{-/-}$ non è associata alla tipica colorazione positiva che si osserva con la tecnica TUNEL e che è indicativa dell'apoptosi classica. La differenza in questi due tipi cellulari, suggerisce che il meccanismo che contribuisce alla perdita delle cellule del Purkinje potrebbe essere diversa a seconda che si tratti di precursori attivi nella proliferazione o neuroni postmitotici. In accordo con questo, si è visto che le cellule del Purkinje dei topi $Csb^{-/-}/Xpc^{-/-}$ risultano fortemente marcate quando viene usato un anticorpo diretto contro la proteina p53 totale, suggerendo che queste cellule si trovano sotto stress e seguono una pathway di morte alternativa. La morte cellulare, nello strato del Purkinje, potrebbe essere dovuta all'attivazione endogena della proteina p53, o alla perdita dei segnali di mantenimento, come le citochine attraverso le fibre orizzontali.

La riduzione della capacità ripartiva mediante l'incrocio con topi $Xpa^{-/-}$ che sono difettivi per il NER, può aumentare la severità del fenotipo neurodegenerativo. Questi incroci includono: topi $Csb^{-/-}$ incrociati con topi $Xpa^{-/-}$, topi TTD incrociati con $Xpa^{-/-}$, topi $Xpg^{-/-}$ incrociati con $Xpa^{-/-}$. L'incrocio di topi $Xpc^{-/-}$ con topi $Xpa^{-/-}$ non ha portato, invece, ad un aumento della suscettibilità al cancro o allo sviluppo della sintomatologia neurodegenerativa. Altre linee di tipo difettive per la riparazione, mostrano un aumento della morte cellulare e/o un aumento della marcatura per p53 nel cervello. Nei topi $Csb^{-/-}/Xpc^{-/-}$ la marcatura TUNEL risultava aumentata nello strato dei granuli esterno al giorno 8 dopo la nascita (P8). Lo stress ossidativo è stato identificato come meccanismo per la perdita di cellule del Purkinje nei topi *Atm* difettivi per la riparazione. Le cellule del Purkinje sono risultate in grado di morire per apoptosi in risposta al danno al DNA in alcune circostanze. In fette di cervelletto di topo, la bleomicina, che danneggia il DNA attraverso l'induzione di stress ossidativo, ha portato ad un aumento del numero di neuroni p53-positivi al TUNEL, nello strato granulare interno e nello strato delle cellule del Purkinje. Queste risposte non sono state osservate

nei topi p53^{-/-}, dimostrando che p53 è richiesta per l'apoptosi sia nello strato delle cellule dei granuli che in quello delle cellule del Purkinje [80].

La più comune fonte di danno endogeno al DNA nel cervello, sarebbe rappresentata dall'elevato livello di metabolismo ossidativo, associato con la relativa mancanza di meccanismi antiossidanti protettivi, che aumenta in molti casi di neurodegenerazione. Le lesioni al DNA sono riparate molto più lentamente nei neuroni rispetto alle cellule in divisione, suggerendo che essi possano accumularsi nel tempo. Di conseguenza, le risposte al danneggiamento del DNA e le vie di riparazione hanno probabilmente un ruolo rilevante in un certo numero di malattie neurodegenerative, anche se esse non derivano direttamente da mutazioni a carico di enzimi della riparazione. Mutazioni a carico della componente XPD del fattore di trascrizione TFIIH, con cui le proteine CS interagiscono, portano a molti difetti trascrizionali, che includono ridotta risposta ai recettori nucleari, cattiva regolazione dei geni di risposta ai recettori della vitamina D, geni di risposta all'ormone tiroideo portando all'ipomielinizzazione. I ricercatori hanno osservato che la sensibilità ai raggi UV, nei fibroblasti embrionali di topo aumenta secondo l'ordine: Csb^{+/-}/Xpc^{+/-}, Xpc^{-/-}, Csb^{-/-}, Csb^{-/-}/Xpc^{-/-}. Fatta eccezione per i doppi eterozigoti che sono fenotipicamente variabili, questo ordine si approssima all'ordine di severità patologica. Poiché la sensibilità agli UV è una misura della capacità di eseguire il processo NER, queste osservazioni dovrebbero essere in accordo con il ruolo del NER nel fenotipo clinico. Pertanto, il NER potrebbe essere molto più importante nella riparazione del danno ossidativo di quanto si è pensato fin'ora, sebbene il preciso meccanismo nei neuroni terminalmente differenziati potrebbe essere sostanzialmente diverso da quello delle cellule in divisione. I ricercatori ipotizzano uno scenario secondo cui il processo TCR (mediato da CSB), ripara continuamente le lesioni ossidative che creano ingombro sterico nel DNA, nei neuroni differenziati e l'incapacità di eseguire questo processo porta alla neurodegenerazione.

Cellule staminali neuronali adulte

Dopo il crollo, negli anni 60', del dogma relativo alla fissità del tessuto nervoso, secondo cui l'architettura cerebrale, dopo il completamento dello sviluppo embrionale, rimane costante, le connessioni nervose restano fisse, le cellule nervose perdute non possono essere rigenerate, le cellule staminali neuronali vennero isolate e descritte per la prima volta nel cervello di ratto da Reynolds e Weis nel 1992 [81], e sette anni dopo, venne pubblicato il lavoro relativo all'isolamento di cellule staminali neuronali umane dal gruppo di ricercatori diretto da Vescovi [82]. A partire da

qui, è stato possibile manipolare *in vitro* linee di progenitori neuronali per esperimenti dedicati alla comprensione dei meccanismi alla base delle malattie neurologiche umane.

Da queste linee cellulari generate inizialmente da Vescovi, derivano le cellule staminali neuronali umane che sono state usate per gli esperimenti di questa tesi di dottorato.

In quasi tutti i tessuti, le cellule specializzate si originano a partire da un piccolo pool di cellule altamente indifferenziate, unità capaci di autorinnovamento, che possono persistere durante la vita adulta e sono chiamate cellule staminali. Durante lo sviluppo le cellule staminali danno origine a progenitori intermedi il cui potenziale proliferativo e differenziativo va a restringersi progressivamente, fino a che si completa la generazione di cellule specializzate mature. Pertanto, i tessuti embrionali sono caratterizzati dalla presenza di un corredo eterogeneo di cellule indifferenziate, mitoticamente attive, che possiedono potenziali di sviluppo differenti e caratteristiche di crescita alternative [82]. Il sistema nervoso centrale non fa eccezione a questo fenomeno, e l'identificazione inequivocabile dei precursori come cellule staminali di tipo neuronale, all'inizio, in assenza di marcatori noti, era effettuata su basi funzionali, dovute alla manifestazione di proprietà staminali critiche come: natura indifferenziata (osservata come mancanza di marker di differenziamento), capacità di autorinnovamento, pluripotenza e capacità di rigenerare il tessuto o parte di esso. Come quelle isolate da Vescovi, le cellule da noi utilizzate come sistema cellulare di partenza, *in vitro*, sono cellule isolate e propagate a partire dalla regione mesencefalica ventrale del cervello di un feto umano alla decima settimana di gestazione. Una delle prime più importanti caratteristiche di queste cellule è che mostrano un'estesa, intrinseca capacità di autorinnovamento, che in specifiche condizioni, basate cioè sull'utilizzo di terreni di coltura chimicamente ben definiti rispetto alla presenza di uno o due fattori di crescita, permette la loro prolungata proliferazione nel tempo, e la propagazione in coltura. Questi precursori possiedono la capacità di generare un'ampia progenie cellulare, e questa capacità è condizionata alla presenza di un appropriato pattern di stimolazione mitogena mediata dai due fattori di crescita, EGF (*Epidermal Growth Factor*) ed FGF2 (*Basal Fibroblast Growth Factor*). Inizialmente si è visto che quando i fattori di crescita sono usati ciascuno da solo, anche se in concentrazioni massime, nelle colture di cellule staminali neuronali umane embrionali, la divisione cellulare veniva indotta solo transitoriamente, con la proliferazione che terminava dopo circa 5-6 settimane dal piastramento. E così, sono state monitorate le concentrazioni appropriate per la proliferazione in presenza di entrambe i fattori simultaneamente, e sono state stabilite che le concentrazioni ottimali alle quali le cellule staminali embrionali possono essere coltivate per un periodo superiore

a due anni, portando ad un' amplificazione del numero totale di cellule di più di 10^5 volte erano 20 ng/ml di EGF e 10 ng/ml di FGF2 [82]. In presenza di entrambi i fattori, le cellule proliferano attivamente e formano cluster di forma sferica, noti come neurosfere, costituiti da precursori neuronali indifferenziati, come dimostrato dall'assenza di qualsiasi specifica morfologia, dall'assenza di antigeni di superficie neuronali o gliali, e dall'espressione del marcatore delle cellule staminali neuronali, nestina. La dimostrazione della staminalità di questi precursori si basa sull'osservazione, che queste cellule sono in grado di autorinnovamento, definito come la capacità di ogni cellula di dare origine ad almeno una cellula figlia identica a se stessa, ad ogni ciclo di divisione cellulare asimmetrica, ma anche di andare in contro a cicli di divisioni simmetriche in cui entrambe le cellule figlie sono cellule staminali. La stretta dipendenza delle cellule staminali neuronali embrionali, dalla presenza simultanea e sinergica dei fattori di crescita, è un aspetto molto importante delle colture primarie, poiché indica in modo inequivocabile la natura non trasformata delle cellule, e tiene sotto controllo il processo di differenziamento. Infatti, il processo differenziativo in base al quale i progenitori danno origine alle cellule dei tre tipi neuronali, neuroni, astrociti e oligodendrociti, in virtù della loro multipotenza (o si potrebbe dire, tripotenza), inizia solo quando si procede alla sottrazione dei fattori di crescita dal terreno di coltura, pertanto, l'attivazione dei progenitori verso il differenziamento o il mantenimento della staminalità sono eventi regolabili epigeneticamente [82]. Tuttavia, la cinetica di crescita, relativamente lenta di queste cellule, limita fortemente il loro impiego nella sperimentazione di laboratorio e nelle applicazioni biotecnologiche, che richiedono una rapida produzione di una gran quantità di cellule che conservino la stabilità genotipica e fenotipica in coltura. Di conseguenza, le linee cellulari prodotte, sono state immortalizzate con la tecnologia *myc*. L'immortalizzazione, non associata alla trasformazione, dei progenitori neuronali umani, mediata dall'oncogene *myc* si è mostrata molto efficace per aggirare i limiti e le problematiche suddette, consentendo la generazione di linee a crescita rapida; tra i geni che portano la capacità di indurre immortalizzazione, *v-myc* è quello che si è mostrato più adatto, mentre *Tag*, *bcl-XL* e *c-myc* sono risultati inefficaci [83]. Generalmente considerato come proto-oncogene, *Myc* viene considerato ora come gene di staminalità, in particolare dopo l'entusiasmante scoperta fatta da Takahaschi e Yamanaka in cui si è dimostrato che una cellula come un fibroblasto può essere riportato allo stato indifferenziato di cellula staminale iniettando in essa appena 4 geni quali: *c-Myc*, *Oct4*, *Klf4* e *Sox2*. Nelle cellule staminali neuronali trasdotte col gene *myc* è stata osservata una sovraregolazione dell'attività telomerasica, che determina stabilità genotipica in coltura. Infatti, cellule staminali neuronali umane non

modificate geneticamente, coltivate *in vitro*, hanno una ridotta attività telomerasica che porta all'instabilità genetica. Le cellule vengono infettate con il retrovirus TEFLY-A che porta il transgene v-myc insieme ad un marker per la selezione con l'antibiotico G418. Le cellule si espandono tre, quattro volte più velocemente rispetto alla loro linea parentale, con un tempo di duplicazione di circa 24 ore; presentano stabilità cromosomica e la linea viene selezionata dopo un saggio *in vitro* per valutare la stabilità del cariotipo, la proliferazione e il differenziamento in senso neuronale mediante l'espressione di specifici marcatori [84].

Ad oggi non si conoscono studi che esaminino il ruolo della proteina CSB in cellule staminali e progenitori neurali umani e nel differenziamento di neuroni e cellule gliali. La necessità di avvalersi di un modello cellulare appropriato ci ha portati quindi alla scelta dei progenitori neurali immortalizzati, che ci hanno permesso di studiare il ruolo di CSB nella neurogenesi adulta e le conseguenze di una sua deplezione. Per prima cosa ci siamo preposti di verificare se il *knockdown* stabile di CSB avesse effetti sulla vitalità e sul tasso di crescita dei progenitori neurali, ponendo particolare attenzione anche ad eventuali differenze morfologiche causate dal silenziamento stesso. Mutazioni su geni importanti nella risposta al danno al DNA o nel mantenimento di un corretto programma trascrizionale, come appunto CSB, potrebbero infatti colpire l'integrità delle cellule staminali adulte e dei progenitori neurali, influenzandone negativamente la sopravvivenza e compromettendo l'omeostasi del tessuto nervoso. Abbiamo poi studiato gli effetti della deplezione di CSB sul differenziamento dei progenitori neurali, in particolare soffermandoci sulla generazione dei neuroni. Tali studi sono stati condotti non solo da un punto di vista morfologico e della proliferazione e morte cellulare, ma anche osservando eventuali alterazioni nell'espressione di marker specifici.

Considerando inoltre il ruolo di CSB nella risposta cellulare all'ipossia, come regolatore negativo della via pro-apoptotica p53-dipendente e promotore della risposta pro sopravvivenza mediata da geni quali HIF-1, abbiamo esaminato la crescita e la proliferazione cellulare dei progenitori neurali ad una minore concentrazione di ossigeno, al fine di simulare lo stato di ipossia in cui possono incorrere tali cellule in condizioni fisio-patologiche e riscontrare eventuali differenze dovute alla mancanza di CSB. Con tale studio abbiamo quindi voluto esaminare le conseguenze della deplezione di CSB sulla crescita e sul differenziamento di progenitori neuronali fetali, per indagare il possibile meccanismo alla base della neuropatologia Cockayne.

LAVORO SPERIMENTALE

3. SISTEMA CELLULARE E DIFFERENZIAMENTO

3.1 Silenziamento genico e generazione di due linee di progenitori neuronali

Per i nostri studi, e quindi per l'allestimento di tutti i nostri esperimenti *in vitro*, abbiamo utilizzato la linea cellulare denominata **ReNcell VM**; si tratta di una linea di cellule staminali neuronali umane adulte derivate dalla regione mesencefalica ventrale del cervello di un feto alla decima settimana di gestazione, immortalizzate per trasduzione retrovirale con l'oncogene *v-myc*. Come dimostrano i pochi studi che hanno analizzato le caratteristiche di questa linea, le cellule possiedono capacità di *self-renewal* (autorinnovamento) e multipotenza, possono cioè, sia replicarsi indefinitamente mantenendo carattere di staminalità andando incontro a divisioni simmetriche, sia essere avviate al differenziamento per generare neuroni, oligodendrociti e astrociti [85]. Per ottenere in modo efficace la crescita e il differenziamento, le cellule vengono coltivate in monostrato aderente ad una matrice extracellulare costituita da **poly-L-ornitina** e **laminina** che viene lasciata depositare sul fondo delle normali piastre e fiasche per colture cellulari (*coating*). E' molto diffusa la tecnica di coltivazione dei progenitori neuronali come aggregati sferici natanti in sospensione nel terreno, detti neurosfere, ma numerosi studi hanno dimostrato che queste strutture possono risultare meno efficienti nel garantire la propagazione dei progenitori nello stato indifferenziato; infatti, col progressivo accrescimento delle neurosfere dovuto alla proliferazione delle cellule che formano l'aggregato, la diffusione dei fattori di crescita presenti nel terreno, verso il core interno della massa cellulare, può essere difficoltosa, lasciando sostanzialmente privi di fattori i progenitori localizzati nella regione più profonda dell'aggregato cellulare, che perciò tendono a differenziarsi. Di conseguenza, con l'uso delle neurosfere, viene meno la regolazione epigenetica e il controllo del passaggio dallo stato indifferenziato all'inizio del differenziamento.

Una volta acquisita una linea cellulare di partenza come questa, particolarmente adatta alle finalità generali del lavoro, uno dei nostri obiettivi specifici è stato quello di ridurre il più possibile, il livello di espressione della proteina CSB, per avvicinare il fenotipo cellulare alla condizione di deplezione di CSB che presentano i pazienti affetti dalla Sindrome di Cockayne. Lo abbiamo fatto

inducendo il knockdown della proteina CSB mediante il silenziamento del gene ERCC6 con la tecnica dell' *RNA interference* (RNAi). Abbiamo cioè effettuato l'infezione di una sottopopolazione di progenitori neuronali con particelle lentivirali, contenenti una porzione di DNA che si integra stabilmente nel genoma delle cellule ospiti e codifica per uno *short hairpin* RNA (shRNA), che una volta espresso è diretto contro l'mRNA messaggero di CSB portandolo alla degradazione. Data l'integrazione del DNA lentivirale nel genoma ospite, il silenziamento risulta permanente e stabile nel tempo. Poiché il vettore usato presenta anche un gene che conferisce resistenza all'antibiotico puromicina, la popolazione di cellule trasfettate, è stata poi sottoposta alla selezione per la resistenza alla puromicina, inizialmente aggiunta al terreno a varie concentrazioni (2µg/ml, 5 µg/ml, e 10 µg/ml), per eliminare tutte le cellule che non hanno integrato il vettore lentivirale. La selezione è stata poi mantenuta costantemente ad una concentrazione stabilita intorno a 5 µg/ml, durante il mantenimento e l'espansione delle cellule e durante i vari esperimenti eseguiti.

Nello specifico, la trasfezione è stata effettuata in due sottopopolazioni di cellule, perché in una di esse al momento della trasfezione è stato usato un vettore lentivirale codificante per un cosiddetto *scrambled* shRNA, contenente cioè, una sequenza casuale e quindi non funzionale ai fini dell' RNAi. Anche questa sottopopolazione è stata sottoposta a selezione per la resistenza alla puromicina nello stesso modo. Essa esprime livelli normali di CSB, ed è stata usata come linea di controllo per poter studiare con i vari esperimenti, l'influenza e il ruolo della proteina CSB, eliminando allo stesso tempo le differenze che potrebbero essere dovute a perturbazioni date dal processo stesso di trasfezione con il vettore lentivirale e selezione con puromicina, differenze che si sarebbero potute rivelare importanti se si fossero confrontate tra loro semplicemente una linea cellulare silenziata per CSB, con una non silenziata/trasfettata in alcun modo.

Con questa strategia siamo arrivati alla generazione di due linee ReNVM, di cellule staminali neuronali adulte:

- **Linea 1 o shK:** linea di controllo in cui, data la trasfezione di un vettore lentivirale non attivo nel processo di interferenza, l'mRNA di CSB non viene degradato e la proteina viene espressa a livelli normali
- **Linea 2 o shCSB:** linea stabilmente silenziata, in cui l'mRNA di CSB viene degradato attivamente e il livello di espressione della proteina è ridotto in maniera significativa rispetto al controllo.

3.2 Differenziamento

Gli esperimenti di differenziamento hanno costituito la parte preponderante del nostro lavoro sperimentale, quella su cui ci siamo concentrati in modo particolare, per cui sono state impiegate la maggior parte delle risorse e che ci ha impegnato estesamente. Il differenziamento è un processo molto complesso e delicato, che è la risultante di una serie combinata di eventi che si realizzano a vari livelli, genetico, biochimico e cito-morfologico. Abbiamo, perciò impiegato tecniche di analisi specifiche per osservare il processo a ciascuno di questi livelli.

Il protocollo di differenziamento usato, in minima parte riadattato al nostro sistema cellulare a partire da quello elaborato dal gruppo di Delia [86], prevede la progressiva sottrazione dei due fattori di crescita EGF ed FGF dal terreno in cui vengono costantemente mantenute le cellule progenitrici, a cui segue con una tempistica predittiva, l'arricchimento sequenziale di neuroni, oligodendrociti e astrociti nella popolazione di cellule indifferenziate.

All'inizio le cellule vengono seminate in un terreno di crescita completo, contenente i fattori di crescita EGF e FGF. Dopo circa tre giorni, per ottenere la sottrazione del primo fattore, il terreno viene sostituito con uno della stessa composizione, ma completamente privo di EGF, e questo giorno viene indicato come *day 0* (D0). Dopo altri tre giorni il terreno di crescita viene nuovamente sostituito, stavolta con uno mancante sia di EGF che di FGF (*day 3*, D3). Da questo momento in poi il terreno resta sempre lo stesso, ma viene cambiato ogni tre giorni circa, con terreno fresco sempre privo dei due fattori di crescita, per somministrare i nutrienti alle cellule. Tale protocollo di differenziamento, della durata di 24 giorni complessivi, permette la generazione sequenziale di neuroni, oligodendrociti e astrociti, rispettivamente nei giorni D10, D17 e D24 che nella maggior parte dei nostri esperimenti hanno rappresentato i giorni di raccolta delle cellule per le analisi (Figura 10).

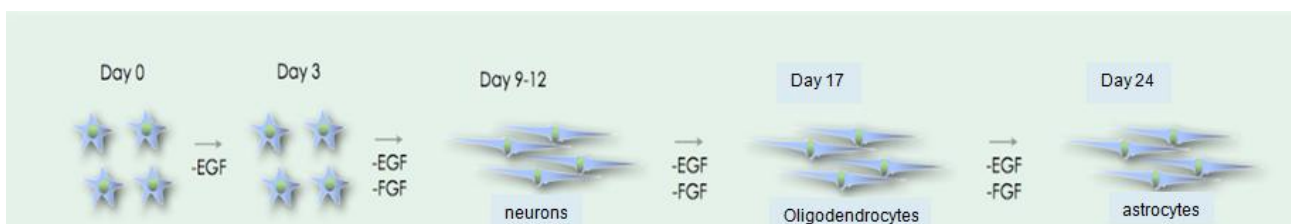


Fig.10: Schema del protocollo di differenziamento per le cellule ReNVM. Seminate le cellule per avviare il differenziamento il terreno completo viene sostituito con uno privo di EGF. Dopo 3 giorni viene sottratto anche l'FGF, e circa due volte a settimana viene cambiato il terreno privo di fattori di crescita, promuovendo l'arricchimento di neuroni, oligodendrociti e astrociti nei giorni 10, 17 e 24, rispettivamente (riadattata da Carlessi *et al.*, 2009)

4. RISULTATI

4.1 Livelli di espressione del gene csb e tasso di proliferazione cellulare.

Mediante RT-PCR (*Real Time- PCR*), abbiamo misurato il livello di espressione dell'mRNA di CSB sia sulla linea 1, (shK), che sulla linea 2, (shCSB), usando un cDNA retrotrascritto a partire dall'RNA totale estratto dalle cellule staminali indifferenziate, circa un paio di passaggi dopo aver effettuato la trasfezione con i vettori lentivirali. Calibrando l'espressione del gene csb sul livello di produzione dell'mRNA nella linea 1, le cellule della linea 2 hanno mostrato un livello di espressione residua del gene csb compreso tra il 17% e il 25% rispetto al controllo; pertanto siamo stati in grado di ottenere un silenziamento dei progenitori neuronali che si attesta intorno all'80% (Figura 11).

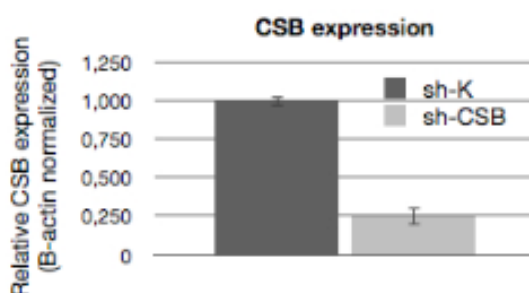


Fig. 11: Istogramma relativo all'espressione di CSB nella linea1, shK e nella linea2, shCSB misurata con RT-PCR. Il livello di espressione dell'mRNA di CSB, normalizzato per la β -actina, è di circa il 20% nella linea 2 rispetto alla linea di controllo.

Sempre mediante RT-PCR, abbiamo misurato l'espressione di tre geni importanti come ki67, nestina e Sox2. **Ki67** è un marcatore tipico della proliferazione delle cellule umane, espresso in tutte le fasi del ciclo cellulare (G1, S, G2 e mitosi), non rintracciabile nelle cellule quiescenti, in fase G0, che quindi può essere usato come marcatore per quantificare in una popolazione la frazione proliferante o avere informazioni circa il tasso di proliferazione di due popolazioni a confronto come in questo caso [87]. Come si vede dagli istogrammi riportati in Figura 12, i risultati mostrano che entrambe le linee di cellule staminali neuronali esprimono livelli più elevati del trascritto di Ki67 rispetto ad esempio, ai fibroblasti, indicando la presenza di un tasso di proliferazione più alto dovuto proprio al carattere di staminalità dei progenitori neurali; tuttavia, le cellule della linea 2,

silenziate per CSB, mostrano un livello di espressione del marcatore più basso, pari a circa il 65% rispetto alla linea 1. **Nestina** e **Sox2** sono due marcatori specifici della staminalità neurale, che vengono espressi a livelli elevati solo nei progenitori neurali nello stato indifferenziato e poi down-regolati nelle cellule loro discendenti differenziate [88]. Come atteso, il livello di espressione dei due marcatori è molto elevato in entrambe le popolazioni di cellule staminali rispetto ai fibroblasti, sostenendo la natura neuronale di queste cellule e dimostrando che le cellule sono in grado di proliferare mantenendosi nel loro stato indifferenziato.

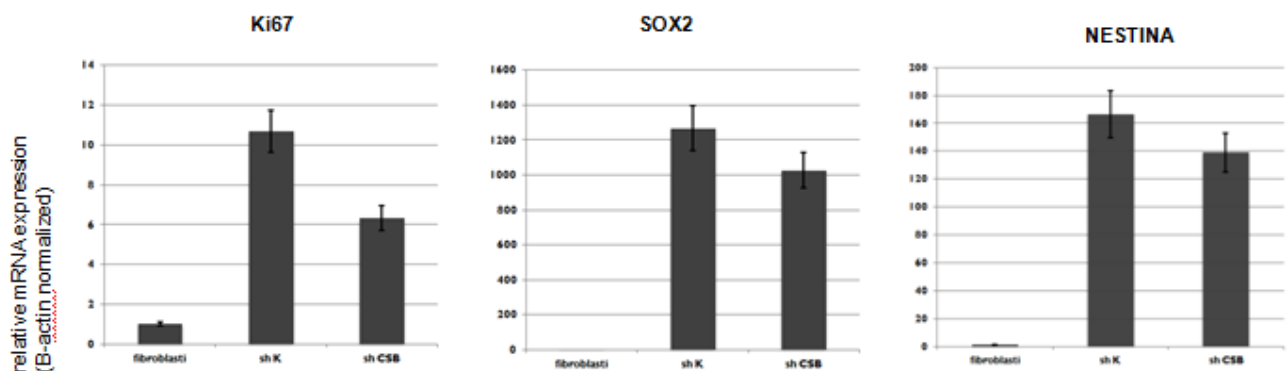


Fig.12: Istogrammi relativi all'espressione dei geni Ki67, Sox2 e Nestina misurati con RT-PCR nelle cellule shK, shCSB e nei fibroblasti. Il livello di espressione dei tre marcatori nei fibroblasti è usato come riferimento per valutare il livello di espressione nelle due linee di progenitori neurali. L'elevato livello di espressione di Ki67 è indice dell'elevato tasso di proliferazione nelle cellule neurali rispetto ai fibroblasti, e nella linea difettiva per CSB questo tasso è più basso rispetto alla linea shK. Entrambi i geni Sox2 e Nestina, specifici delle linee neurali sono espressi a livelli notevolmente maggiori nelle due linee di cellule staminali neurali rispetto ai fibroblasti.

Abbiamo poi, effettuato un saggio di proliferazione basato sulla semplice conta cellulare, in condizioni di crescita normali, per confrontare l'andamento nel tempo della proliferazione tra cellule staminali di controllo e cellule silenziate per CSB, il quale, in accordo con il risultato relativo all'espressione di Ki67 con RT-PCR, ha fornito un'ulteriore conferma del ridotto tasso di proliferazione della linea 2, rispetto alla linea 1 (Figura 13). In partenza è stato seminato lo stesso numero di cellule per ciascuna delle due linee, circa 2×10^5 cellule, e la crescita è stata portata avanti per un periodo di tempo complessivo limitato a 72 ore circa. In corrispondenza di specifici *time point*, le cellule di entrambe le linee sono state staccate dal fondo della piastra e contate, e i risultati ottenuti sono stati riportati nel grafico sottostante. Come si vede, le staminali silenziate per CSB presentano un livello di proliferazione più basso rispetto ai controlli. Col passare dei

giorni, la linea 1 di controllo arriva a formare un tappeto cellulare uniformemente distribuito sulla superficie della fiasca da coltura, giungendo presto alla confluenza cellulare, mentre ciò non avviene nello stesso intervallo di tempo per la linea 2, che cresce più lentamente. La differenza tra le due popolazioni, inoltre, non è dovuta a differenze nel tasso di morte cellulare la quale si attesta per entrambe a livelli paragonabili, supportando la maggiore capacità proliferativa della linea di controllo rispetto a quella CSB silenziata.

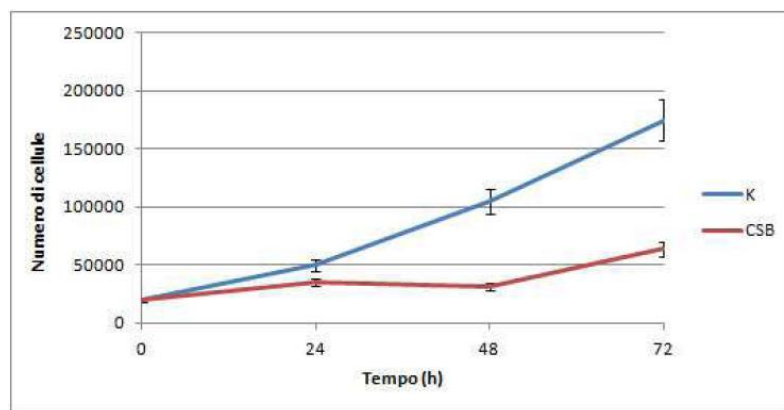


Fig. 13: Grafico relativo all'andamento nel tempo della proliferazione cellulare per la linea di controllo K (tratto blu) e la linea silenziata per CSB (tratto rosso). A partire dallo stesso numero di cellule iniziali per entrambe le linee, si vede come il numero dei cellule shK tenda ad aumentare progressivamente di circa 8-9 volte in un arco di tempo di 72 ore, mentre nello stesso periodo l'incremento nel numero di cellule shCSB è notevolmente minore.

4.2 Validità del modello

Una volta ottenuto il knockdown stabile del gene *csb*, siamo andati a valutare il processo di induzione della proteina p53 come risposta al trattamento con radiazione ultravioletta. Nonostante nel contesto della neuropatologia in Cockayne, il danno al DNA dovuto ai raggi UV non possa essere tenuto in considerazione come fattore eziologico della neurodegenerazione, verificare la risposta dell'espressione di p53 in seguito ad irradiazione con raggi UV è stato necessario per poter provare e di fatto affermare, di aver riprodotto per questo sistema cellulare, lo stesso fenotipo riscontrato nei fibroblasti CSB difettivi. Nei fibroblasti infatti, è stato dimostrato che il trattamento con i raggi UV, porta all' induzione dell'espressione del gene p53 sia nei fibroblasti normali, che nei fibroblasti della linea CS1AN derivata direttamente da pazienti Cockayne, quindi CSB difettivi; tuttavia, mentre nei fibroblasti di controllo l'espressione di p53

ritorna a livelli basali dopo poche ore dal trattamento, nei fibroblasti CSB mutati, livelli elevati di espressione della proteina p53 persistono per un periodo di tempo più lungo dopo i raggi UV [89]. Come si vede dal risultato del Western Blotting e dal grafico corrispondente, lo stesso andamento si osserva nel trattamento dei progenitori neuronali nello stato indifferenziato con raggi UV. Nelle cellule staminali neurali, infatti, si vede come il livello di espressione della proteina p53 aumenta progressivamente col passare delle ore, raggiungendo un picco massimo dopo 3 ore dall'irradiazione, ma, mentre nelle staminali di controllo i livelli tornano ad abbassarsi già dopo 6 ore, nelle cellule staminali silenziate per CSB l'espressione di p53 aumenta toccando un picco massimo anche in questo caso dopo 3 ore, e a differenza delle cellule di controllo, si mantiene a livelli elevati per più tempo come si vede dall'elevata intensità del segnale delle bande relative alla proteina p53 ancora 24 ore dopo l'irradiazione (Figura 14). Questo risultato è stato molto importante; la sua valenza non rientra tanto nell'obiettivo generale dello studio della neuropatia in Cockayne, quanto nella dimostrazione della validità del sistema cellulare in nostro possesso per quegli scopi, e quindi, collocandosi come verifica preliminare a tutta la progettazione successiva degli esperimenti, insieme al buon livello di silenziamento ottenuto nella linea shCSB, ci ha dato la sicurezza di avere a che fare con un sistema sperimentale pertinente e innovativo.

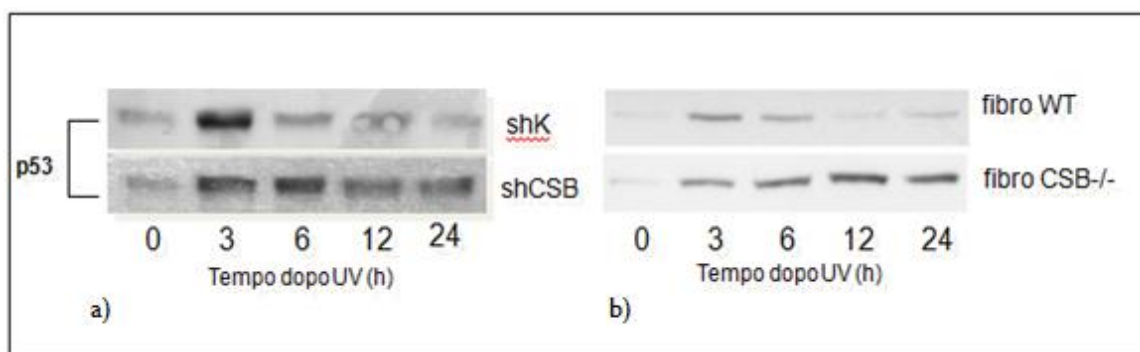


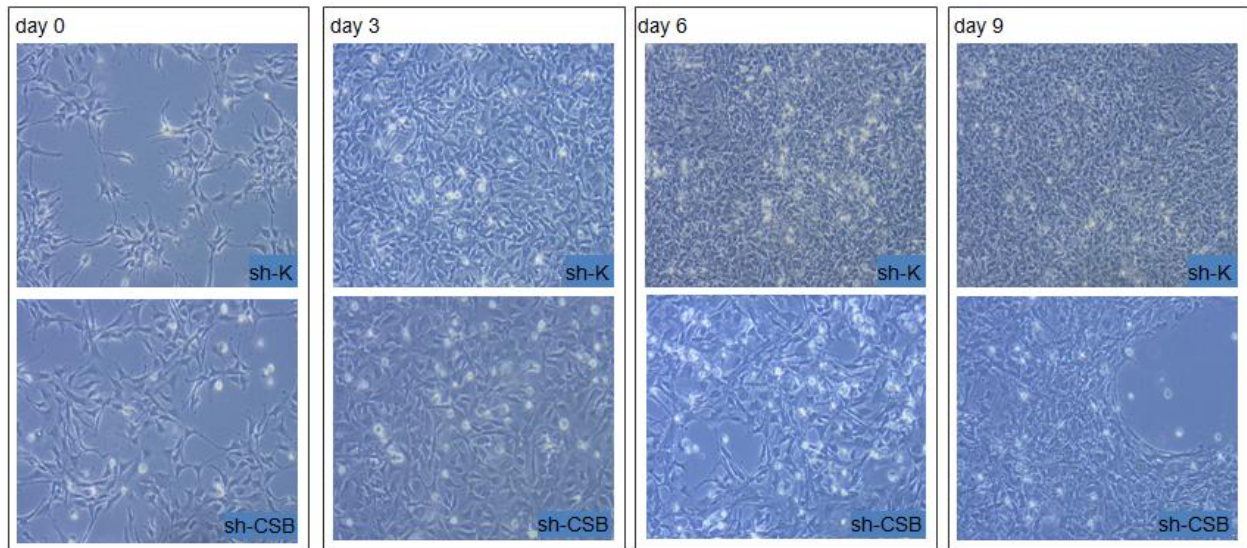
Fig. 14: Immagini relative allo sviluppo dei Western Blotting per l'espressione della proteina p53 durante le 24 ore successive alla somministrazione di una dose di circa 4J/m^2 di raggi UV. L'immagine a sinistra (**a**) si riferisce alle due linee di progenitori neuronali, rispettivamente la linea 1 sopra e la linea 2 sotto, in cui si vede che nelle cellule staminali neuronali difettive per CSB l'espressione di p53 persiste nel tempo mentre nelle cellule di controllo torna rapidamente a livelli basali già 6 ore dopo l'irradiazione. L'immagine a destra (**b**), si riferisce ai fibroblasti umani, rispettivamente, normali in alto e CSB difettivi sotto, in cui è mostrato il persistere dell'induzione di p53, nei fibroblasti CSB mutati rispetto a quelli normali.

4.3 Differenziamento – osservazioni morfologiche

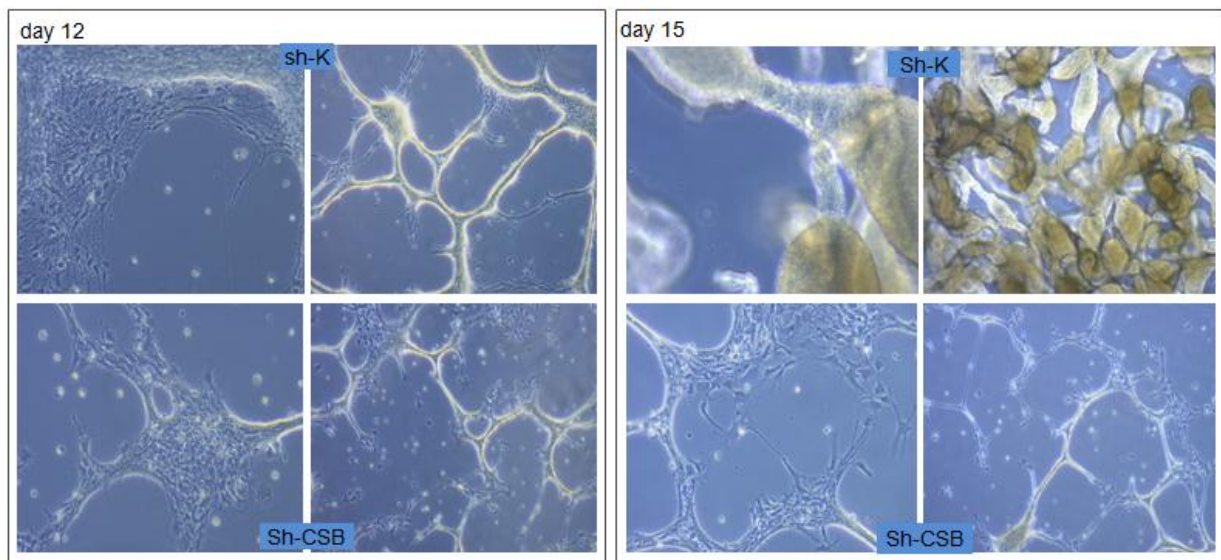
I profondi e complicati cambiamenti cui vanno in contro le cellule staminali neuronali durante il differenziamento interessano molteplici aspetti della biologia cellulare e possono essere studiati a vari livelli, tra cui il primo è senz'altro quello morfologico.

Riportiamo una serie di immagini delle cellule staminali neuronali in coltura avviate al differenziamento secondo il protocollo già descritto, che si riferiscono a fotografie scattate con una fotocamera digitale collegata al microscopio ottico a contrasto di fase. Il differenziamento è stato fotografato a intervalli di tempo regolari, cioè ogni tre giorni. Le cellule sono adese in monostrato ad una matrice di laminina e ornitina stratificata sul fondo della fiasca da coltura. Come si vede dalle fotografie del pannello **a)** della Figura 15, la popolazione inizialmente è composta da cellule in fase oscura, bipolari, con processi citoplasmatici di una certa estensione e cellule pleiomorfiche visibilmente aderenti al substrato; cellule singole a fase chiara, che sono invece debolmente attaccate al substrato o del tutto staccate come si presentano di solito le cellule morte galleggianti situate su un piano focale diverso da quello del monostrato. Al giorno 0 le due popolazioni cellulari, shK ed shCSB, hanno un aspetto pressoché simile: le cellule di queste linee di progenitori neuronali presentano una tipica morfologia stellata pure nello stato ancora indifferenziato e immaturo; le cellule shCSB mostrano una polarizzazione lievemente minore rispetto alle cellule k. Dal 3° giorno in poi, quando ormai entrambi i fattori di crescita sono stati sottratti, si può vedere che la densità cellulare è molto aumentata perché le cellule continuano a proliferare essendo ancora capaci di *self-renewal*, ma con un tasso di proliferazione visibilmente più basso per la linea shCSB rispetto a quella di controllo. Al 9° giorno, nelle cellule shCSB questo rallentamento del tasso di proliferazione si associa anche ad un incremento della morte cellulare rispetto alle cellule K, come si evince dalle aree svuotate e dalle cellule in sospensione. Dal 12° giorno in poi, sono riportate le immagini prese con obbiettivi a due diversi ingrandimenti per ogni giorno; la foto di sinistra è presa con l'obiettivo 10X e quella di destra con quello 4X, perché da questo momento in poi l'organizzazione delle cellule in coltura è tale da rendere necessaria l'osservazione almeno su due livelli diversi per poter considerare il processo nella sua interezza pannelli **b)** e **c)** della Figura 15. Le cellule di controllo sono molte più numerose rispetto alle cellule silenziate e mostrano una caratteristica morfologia neuronale, altamente polarizzata per la

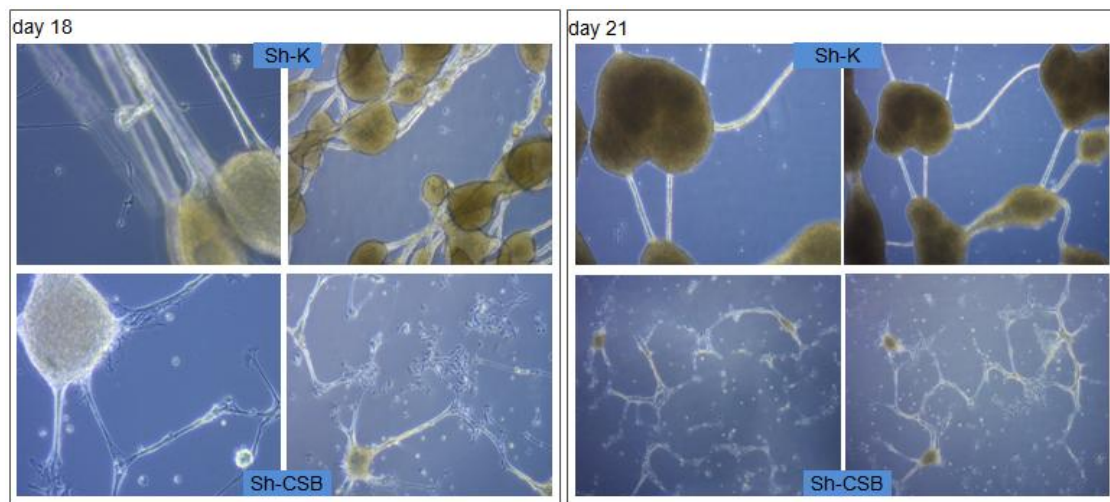
presenza di lunghi prolungamenti neuritici che formano una fitta rete interconnessa, con tendenza alla formazione di fasci molto più pronunciata rispetto alle cellule shCSB, dove pure si osserva ma è minore.



a) primi 9 giorni di differenziamento: con la sottrazione del primo fattore di crescita al giorno 0 (day 0), le cellule sono avviate al differenziamento, ma per diversi giorni la modulazione indotta con la sottrazione anche del secondo fattore nel day 3, non si riflette a livello morfologico; le cellule non sono trasformate visibilmente. La proliferazione procede perché le cellule mantengono ancora la capacità di *self-renewal* e si osserva l'aumento della densità cellulare. Nella linea 2, shCSB, la proliferazione è rallentata e c'è morte cellulare.



b) giorni 12-15 del differenziamento: Nella linea di controllo il differenziamento procede con la formazione di lunghi prolungamenti neuritici che si interconnettono tra cellule adiacenti e vanno a formare grosse fascicolazioni non più adese alla matrice distribuita sul fondo della fiasca. Nella linea silenziata il processo è profondamente arretrato



c) giorni 18-21 del differenziamento : le strutture fascicolari e gli aggregati di corpi cellulari hanno raggiunto dimensioni tali da poter essere visibili anche ad occhio nudo, come corpi fluttuanti nel terreno di crescita all'interno della fiasca

Fig. 15: Serie di fotografie prese ogni tre giorni con fotocamera digitale collegata al microscopio ottico a contrasto di fase, durante un esperimento di differenziamento in vitro protratto per circa 20 giorni.

Infatti, le aggregazioni in fasci sono più ridotte in lunghezza e spessore e ci sono molte più cellule che conservano ancora un aspetto di cellule singolarmente adese al substrato e assai meno polarizzate. Dal 15° giorno in poi la situazione delle cellule silenziate è ancora principalmente di adesione al substrato e fascicolazione disorganizzata e inconsistente se confrontata con quella delle cellule della linea 1, dove ormai si sono formati lunghi e spessi aggregati di prolungamenti neuritici raccolti in fasci che si diramano da grossi agglomerati di corpi cellulari ormai non più distinguibili singolarmente. Tutte queste strutture risultano anche visibili ad occhio nudo come formazioni fluttuanti nel mezzo di crescita. Al contrario di quanto osservato per il *self-renewal* appare rilevante anche il processo di morte cellulare, che risulta maggiormente presente nella linea 2 rispetto alla linea 1 e progressivamente sempre più visibile col procedere del differenziamento. Ciò risulta evidente già dall'osservazione al microscopio ottico, con cui si vede chiaramente la presenza di cellule morte in sospensione soprattutto col procedere del protocollo differenziativo. In una certa misura la morte cellulare è riscontrabile anche per le cellule K, e ed è considerata essere parte del processo fisiologico di differenziamento neuronale [90] [91], ma le cellule silenziate per CSB mostrano un tasso di morte molto più pronunciato, fornendo

un'ulteriore indicazione, oltre a quella morfologica, di un ruolo importante della proteina nella formazione dei neuroni.

Abbiamo tentato di quantificare tale osservazione attraverso l'utilizzo di colorazioni specifiche per la stima della morte cellulare, sia sfruttando la marcatura con Trypan Blue che quella a fluorescenza con PI-FDA-Ho (ioduro di propidio, fluoresceina diacetato e Hoechst 33342). Tuttavia problemi di natura tecnica ci hanno impedito di portare a buon fine tale quantificazione, dal momento che le stime apparentemente sembrerebbero indicare che la morte cellulare per le due linee si attesti su livelli simili, nonostante la palese differenza osservabile invece al microscopio ottico. Tale discrepanza è probabilmente dovuta al fatto che col procedere del differenziamento, e con la formazione e l'ispessimento dei lunghi fasci visibili per la linea 1, la risospensione delle cellule necessaria ai fini delle procedure di conta si fa sempre più difficoltosa, necessitando per la separazione delle singole cellule di vigorose sollecitazioni meccaniche che rischiano di danneggiare le lunghe estensioni cellulari formatesi. Dal momento che le stime di morte cellulare basate su entrambe le colorazioni citate si basano sulla permeabilizzazione delle cellule una volta che queste sono morte, è ovvio che qualsiasi danno che rischi di compromettere la permeabilità cellulare determina una stima falsata.

4.4. Differenziamento – immunofluorescenza indiretta

Accanto agli aspetti morfologici e qualitativi osservati con la microscopia ottica per avere una visione generale del processo, il differenziamento implica molteplici aspetti molecolari e di regolazione dell'espressione genica che si situano invece ad un livello di analisi di tipo quantitativo. Con l'analisi semi-quantitativa che permette la microscopia confocale è possibile compiere un primo step per passare a questo livello. Ciò è possibile analizzando la relazione tra la variazione nell'intensità di emissione di un segnale fluorescente e il livello di espressione di una proteina (marcatore) di interesse. Pertanto, abbiamo osservato l'andamento di questo processo con la microscopia confocale dopo aver trattato le cellule con l'immunofluorescenza indiretta. Abbiamo osservato i cambiamenti morfologici delle due linee cellulari seguendo nel tempo la distribuzione e l'intensità del segnale fluorescente relativo all'**Ab1° Tuj-1** diretto contro la **β -tubulina III**; questo rappresenta il marcatore neuronale generalmente usato per studiare il differenziamento neuronale, poiché la proteina è precocemente e diffusamente espressa dai neuroni nella fase

precoce dello sviluppo ed è utile in particolar modo per metterne in evidenza gli aspetti morfologici [92]. Col dapi in blu sono evidenziati i nuclei. Nella Figura 16, sono riportate le immagini del microscopio confocale prese ogni tre giorni, relative al differenziamento delle cellule ShK dal giorno 0 fino al 24°. Anche in queste immagini il differenziamento si delinea come un processo di progressiva polarizzazione; le singole cellule visibili al giorno 0, dopo circa 6-9 giorni progressivamente emettono lunghi processi citoplasmatici, neurofilamenti connessi tra loro che vanno a formare una fitta rete intricata, ma non disorganizzata e confusa, ma piuttosto, visibilmente orientata secondo specifiche direzioni.

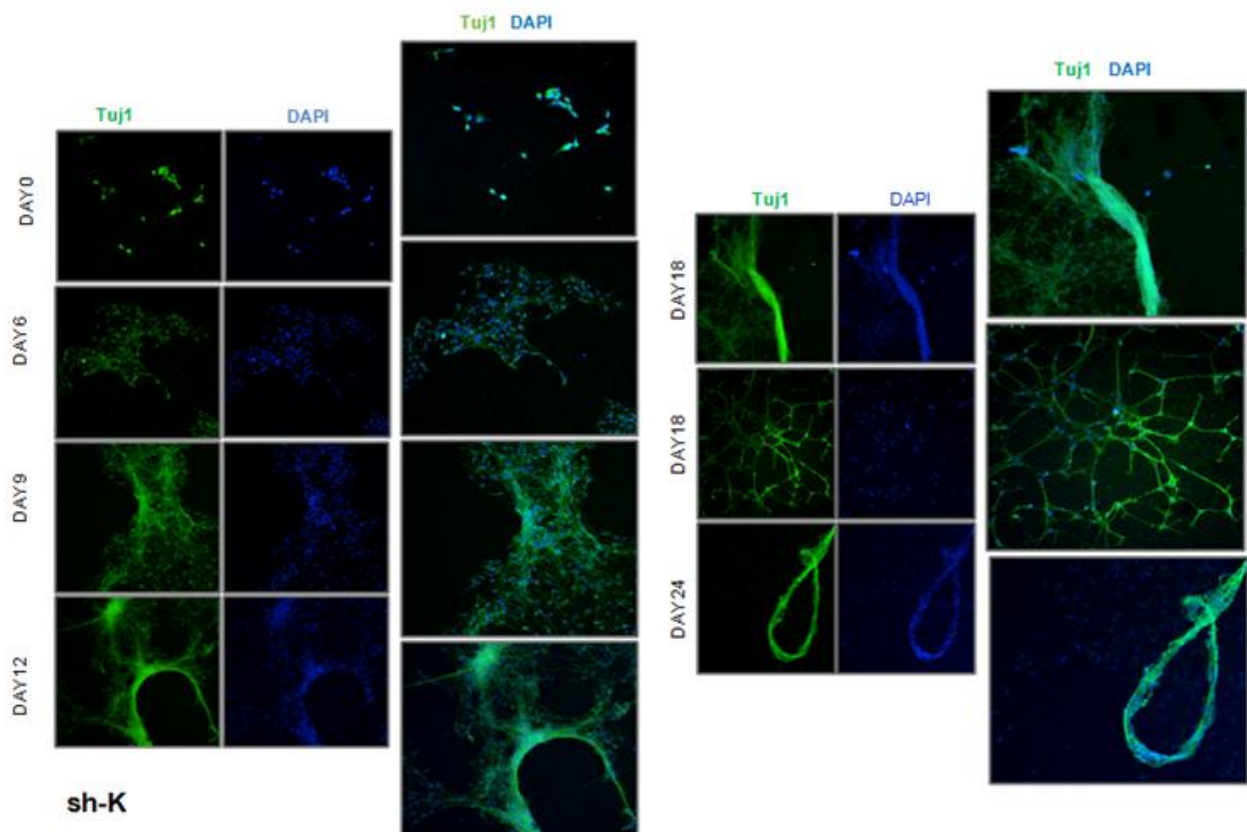


Fig. 16: Immagini al microscopio confocale: le cellule shK sono state marcate con l'Ab 1° Tuj1 diretto contro la β -tubulina III e poi con un Ab2° coniugato al fluorocromo Alexa 488 che emette nel verde. Questo segnale è localizzato solo nella porzione citoplasmatica delle cellule; con il DAPI, visibile in segnale azzurro, sono marcati i nuclei delle cellule. Le cellule vanno in contro ad un progressivo mutamento morfologico e organizzativo non casuale e danno origine a lunghi processi neuritici.

Dal 18° al 24° giorno del differenziamento, l'organizzazione delle cellule è quasi più vicina a quella tissutale che cellulare talmente consistenti sono diventate le interazioni tra i prolungamenti cellulari, le giunzioni e l'architettura generale delle fascicolazioni. Al giorno 24°, accanto a quei fasci, è visibile anche una sottopopolazione di cellule che sono ancora adese al substrato e in una fase un po' meno estremizzata del differenziamento che potrebbe essere considerata come il pool di cellule staminali allo stato indifferenziato sempre presente, attive nella divisione cellulare di tipo asimmetrico che caratterizza il self-renewal.

Osservando una serie di immagini simili, relative in questo caso al differenziamento delle cellule CSB difettive, si vede come per le cellule silenziate l'intero processo sia fortemente ritardato nel tempo rispetto alle cellule di controllo (Figura 17).

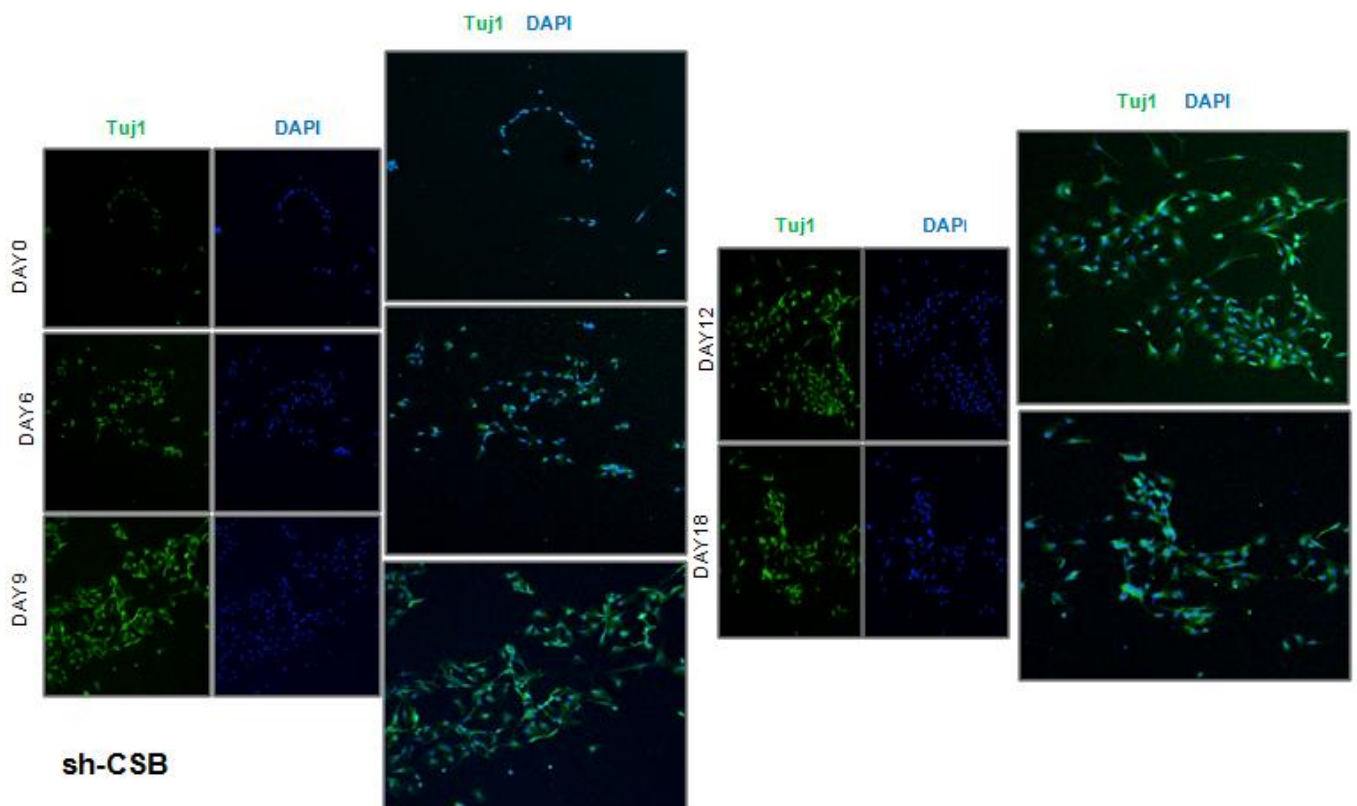


Fig. 17: Immagini al microscopio confocale: anche in questo caso le cellule sh CSB, sono state fissate ogni tre giorni durante il differenziamento e marcate con l'Ab 1° Tuj1 diretto contro la β -tubulina III e con un Ab2° coniugato al fluorocromo Alexa 488 che dà fluorescenza verde. Si vede chiaramente che le cellule anche al 12° giorno non mostrano ancora i caratteristici mutamenti morfologici tipici della formazione dei neuroni. Esse sono ancora visibili come cellule singole, scarsamente polarizzate e prive di prolungamenti neuritici.

Ciò appare particolarmente evidente se si confrontano gli stessi giorni del differenziamento, come il giorno 9 e ancor di più il giorno 18 dove in questa popolazione cellulare non si osservano affatto quei fasci simil-tissutali visti osservati per la linea 1 e le cellule sono ancora distinguibili come singole, adese e fortemente arretrate nel processo di polarizzazione. Non si osservano ancora al 12° o 18° giorno quei cambiamenti morfologici tipici del differenziamento di tipo neuronale consistenti nella protrusione di lunghi e sottili filamenti neuritici che si dirigono e vanno a contattare le altre cellule circostanti.

Nella figura successiva, vogliamo riassumere e mostrare più da vicino le significative differenze che abbiamo potuto osservare nel processo di differenziamento tra le cellule di controllo e le cellule silenziate per CSB. L'importanza di questo dato va sottolineata perché dimostra che le cellule deficitarie di CSB non sono in grado di differenziare in maniera efficiente indicando che il processo di generazione dei neuroni risente fortemente dell' assenza della proteina, suggerendo che essa è coinvolta in modo ancora da chiarire, nei meccanismi che regolano tale processo (Figura 18).

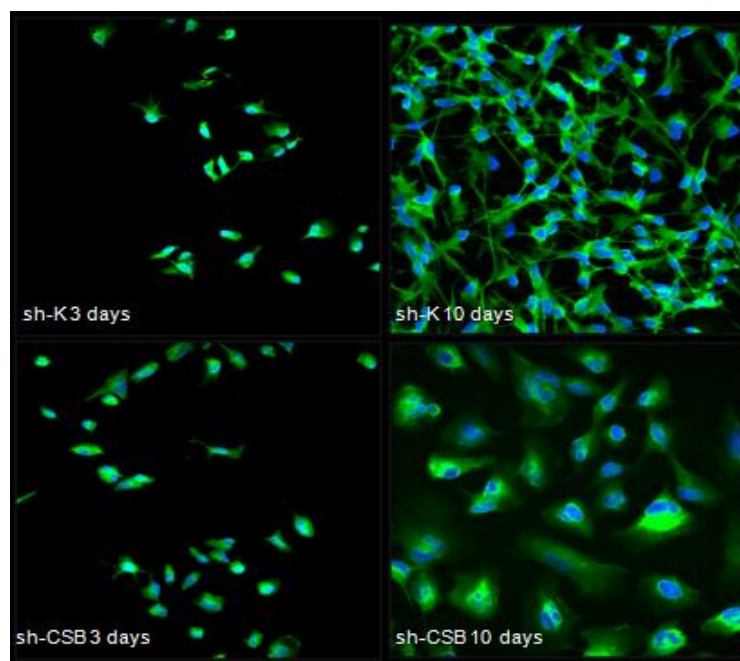


Fig. 18: Confronto tra il processo di differenziamento nelle cellule shK e in quelle shCSB: Il segnale fluorescente verde si riferisce all'Ab 1° Tuj1 diretto contro la β -tubulina III con cui si evidenzia la porzione citoplasmatica, mentre quello in azzurro è relativo al DAPI con cui sono marcati i nuclei delle cellule. Al giorno 3 del differenziamento, dopo che sono stati sottratti entrambi i fattori di crescita dal terreno, la morfologia cellulare nelle due popolazioni è ancora pressoché simile. Al 10° giorno nella linea shK le cellule si trasformano profondamente emettendo lunghi prolungamenti neuritici e assumendo una tipica morfologia bipolare. Le cellule della linea shCSB invece non sono in grado di polarizzare. Il citoplasma, in verde, si allarga senza riuscire ad organizzarsi e senza formare il caratteristico neurite anche in una fase avanzata del differenziamento.

Nel nostro studio del differenziamento mediante la tecnica dell' immunofluorescenza, abbiamo voluto seguire nel tempo l'espressione di due marcatori caratteristici della formazione dei neuroni e degli astrociti (Figure 19 e 20). La proteina MAP2 (*Proteina Associata ai Micortubuli*) è considerata un marcatore neuronale tardivo, espressa nello stato avanzato del differenziamento dei neuroni, e la funzione meglio studiata riguarda il suo ruolo nell'assemblaggio e nella stabilizzazione dei microtubuli del citoscheletro [93].

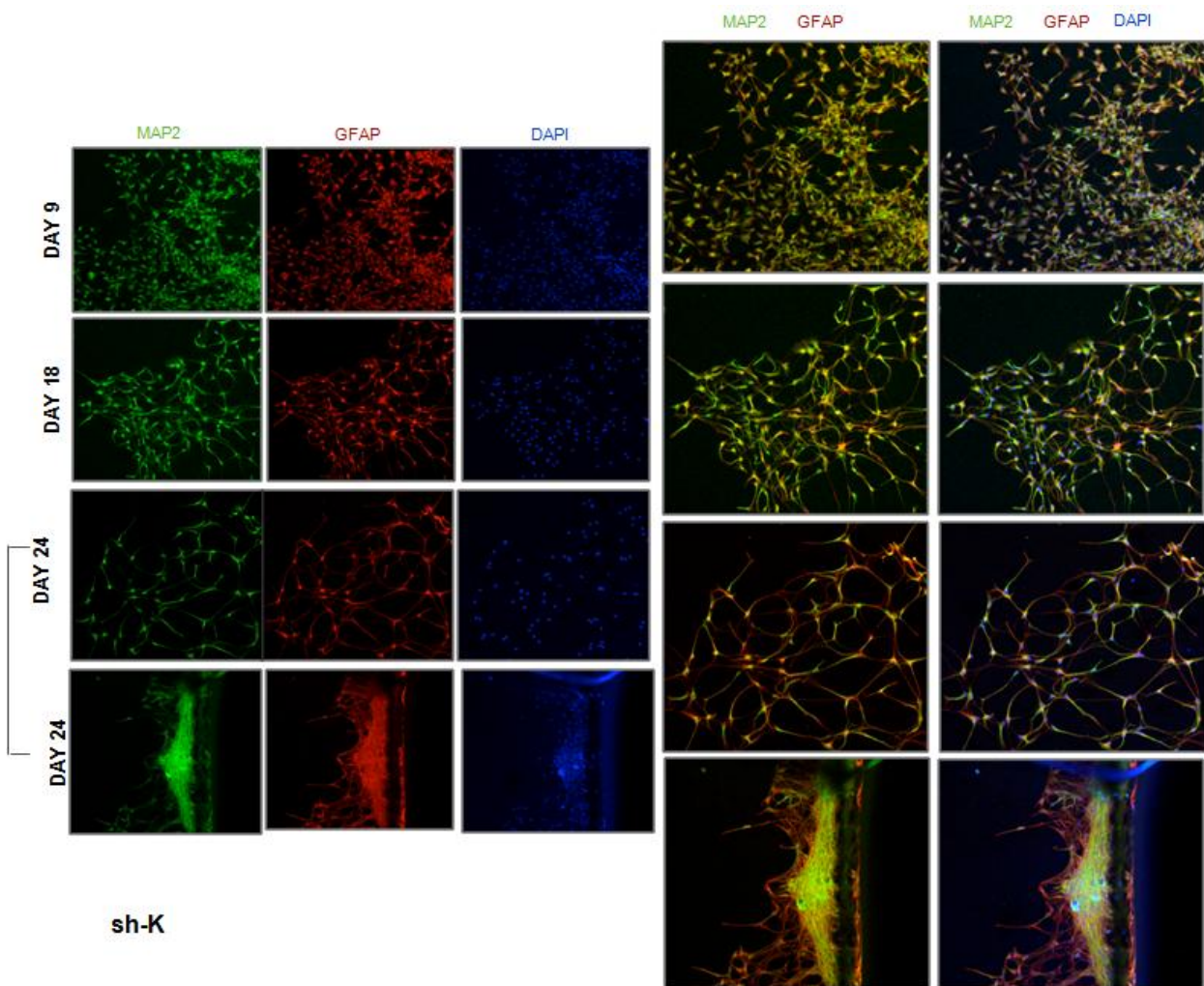


Fig. 19: Fotografie dal microscopio confocale relative al differenziamento della linea shK fino al 24° giorno. Nelle immagini relative al segnale di ogni singolo canale di emissione, si vede che la fluorescenza verde indica l'espressione della proteina MAP2, il segnale rosso si riferisce all'espressione del tipico marcatore della linea astrocitaria, GFAP, e col DAPI sono evidenziati i nuclei cellulari. Nelle immagini relative al merge delle tre fluorescenze si vede che l'espressione di MAP2 e il relativo segnale, è prevalente al giorno 9 in cui è prevista la formazione dei neuroni e tende a mantenersi nei giorni successivi; il segnale rosso relativo a GFAP è anch'esso presente ma con intensità minore rispetto a quello verde, indicando la natura primariamente neuronale delle cellule di questa popolazione. L'aspetto morfologico concorda con la formazione di neuroni poiché si vedono i lunghi prolungamenti neuritici.

GFAP (*Proteina Gliale Fibrillare Acida*) è comunemente usato come marcatore astrocitario ed è l'unità proteica di cui sono costituiti i Filamenti Intermedi di tipo III del citoscheletro degli astrociti. Nella Figura 19 vediamo le immagini relative al differenziamento delle cellule di controllo dove MAP2 è in segnale fluorescente verde e GFAP in rosso. Accanto ai cambiamenti nella morfologia cellulare caratteristici della generazione dei neuroni, a partire dal 18° giorno si evidenzia anche un incremento dei livelli di emissione del segnale rosso relativo all'espressione della proteina GFAP astrocitaria, come atteso secondo il protocollo usato che prevede un arricchimento di astrociti verso il 24° giorno;

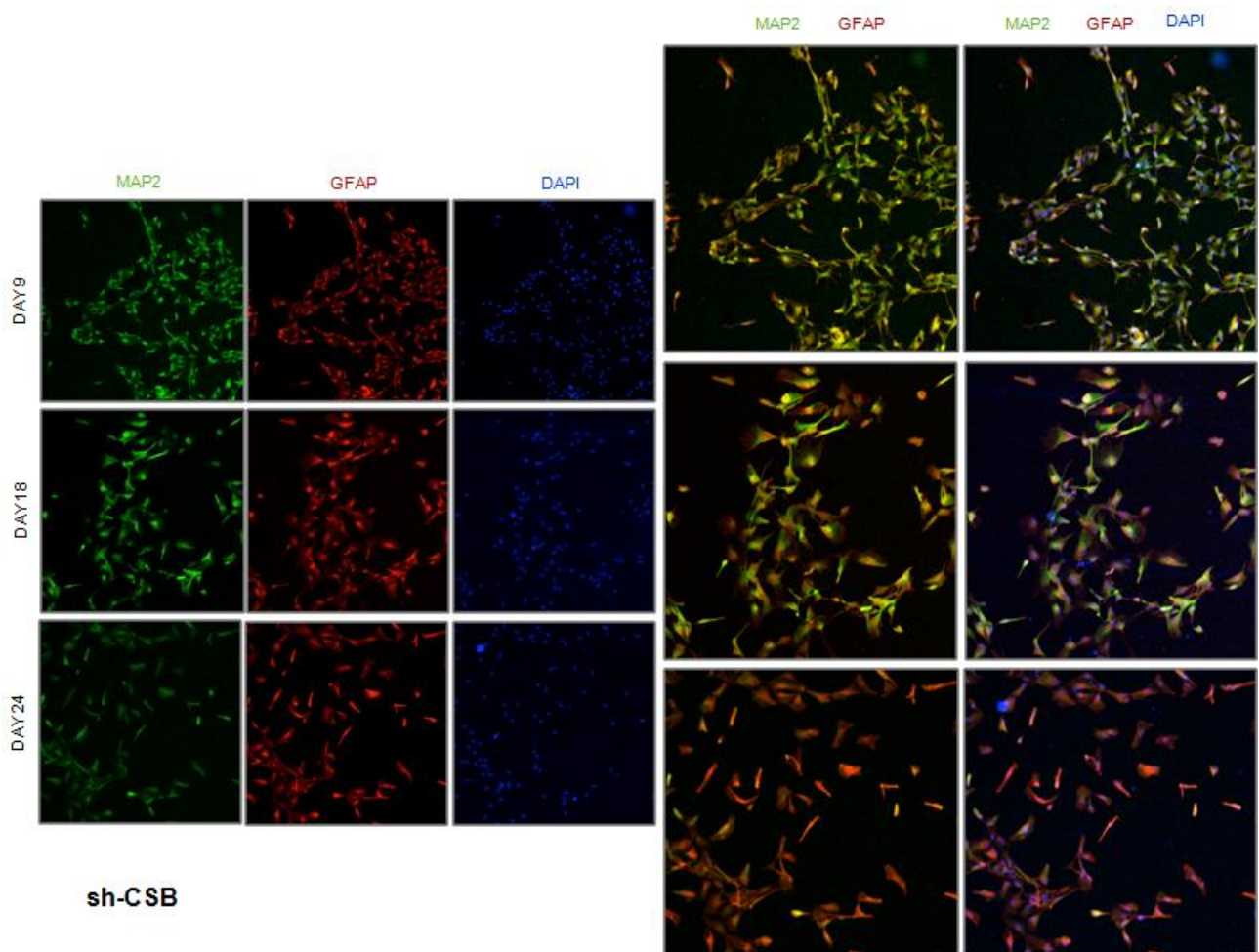


Fig. 20: Fotografie dal microscopio confocale relative al differenziamento della linea shCSB fino al 24° giorno . Dal punto di vista morfologico, in questa popolazione cellulare, ritorna la mancata estensione dei prolungamenti neuritici anche al 9 giorno del differenziamento e fino al 24°. Il segnale verde relativo all'espressione di MAP2 è presente, anche se procedendo con i giorni, aumenta fortemente l'intensità del segnale rosso relativo all'espressione del marcatore GFAP, che diventa chiaramente prevalente sul segnale verde al 24° giorno. Questo indicherebbe l'incapacità delle cellule sh CSB di dare origine a cellule di tipo neuronale anche in fase avanzata del differenziamento, dove invece la marcatura delle cellule fa pensare ad una linea astrocitaria emergente.

Nelle cellule silenziate della linea 2 invece, Figura 20, si vede che anche in questo caso, dal punto di vista morfologico, è riconfermata l'incapacità o diremo il marcato ritardo nel processo di allungamento dei neuriti e di polarizzazione cellulare che porta alla formazione dei neuroni, al contempo notiamo un progressivo aumento di espressione della proteina GFAP (segnale rosso), accanto alla proteina MAP2 a fluorescenza verde. In questa popolazione, a differenza di quanto si osserva per la linea di controllo, il segnale fluorescente è quasi esclusivamente quello rosso relativo a GFAP; ciò suggerisce che in queste cellule il differenziamento potrebbe seguire una pathway direzionata preferenzialmente in senso gliale piuttosto che neuronale, favorendo la formazione esclusiva degli astrociti a scapito dei neuroni.

Nella Figura 21, le medesime immagini relative alle due linee cellulari nei giorni 18 e 24 sono affiancate per evidenziare le differenze: al 18° giorno le cellule shK sono altamente polarizzate, con lunghi processi neuritici che somigliano ad assoni che formano una rete fittamente interconnessa e il segnale fluorescente prevalente è quello verde relativo all'espressione di MAP2, mentre le cellule silenziate per CSB hanno una forma completamente differente, con il citoplasma perinucleare chiaramente adesivo al substrato e allargato come a "ventaglio" proteso in una direzione. Nella settimana successiva, ancora le cellule silenziate non sembrano progredire nel differenziamento neuronale, mentre si accentua il segnale fluorescente rosso relativo all'espressione di GFAP, dove il segnale verde meno intenso si mantiene ancora a indicare l'identità neuronale delle cellule anche se comunque aumenta l'intensità del segnale di GFAP. Un'ipotesi che potrebbe spiegare questo maggiore numero di cellule GFAP-positive nelle cellule silenziate per CSB rispetto alle cellule ShK, potrebbe essere quella che richiama il ruolo del gene Notch1 nel dirigere il differenziamento delle staminali neuronali in cui pare che tra il destino neuronale e quello gliale dei progenitori neurali esso favorisca quello gliale e in questo contesto favorisca lo sviluppo di astrociti a scapito degli oligodendrociti.

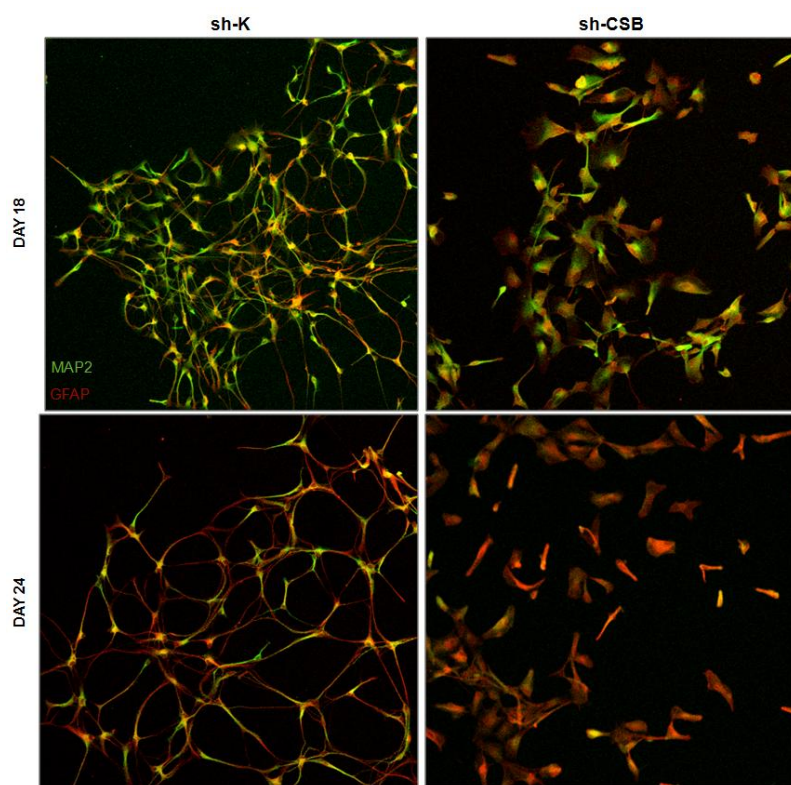


Fig.21: Fotografie al microscopio confocale relative ai giorni 18 e 24 del differenziamento di entrambe le linee. In verde, il segnale fluorescente relativo all'espressione di MAP2 è quello prevalente nella linea ShK, mentre il segnale rosso relativo all'espressione di GFAP è molto più intenso nella linea ShCSB, specie al 24° giorno, rispetto alla linea di controllo. Le cellule silenziate sono morfologicamente molto arretrate nel differenziamento neuronale rispetto alle cellule di controllo.

4.5 Differenziamento – espressione di MAP2

Dal piano visivo e semi-quantitativo dell'analisi del differenziamento, abbiamo affrontato lo studio quantitativo del processo studiando i livelli di espressione genica. Supportati dalle immagini a fluorescenza e dalle osservazioni morfologiche, siamo andati ad analizzare l'espressione di MAP2 nel corso del differenziamento, per capire se effettivamente un'alterata espressione di tale proteina potesse essere fra le possibili cause alla base delle differenze osservate tra le due linee cellulari. MAP2 infatti, non costituisce solo un marcatore neuronale utile a seguire visivamente il differenziamento, ma è stata dimostrata essere fondamentale per lo sviluppo dei neuroni. Di questa proteina sono state descritte quattro isoforme che derivano dallo stesso gene come risultato dello *splicing* alternativo: MAP2a e MAP2b, sono ad alto peso molecolare; MAP2c e

MAP2d, a basso peso molecolare (Figura 22). Tutte risultano espresse nei neuroni, anche se con tempistiche differenti [93].

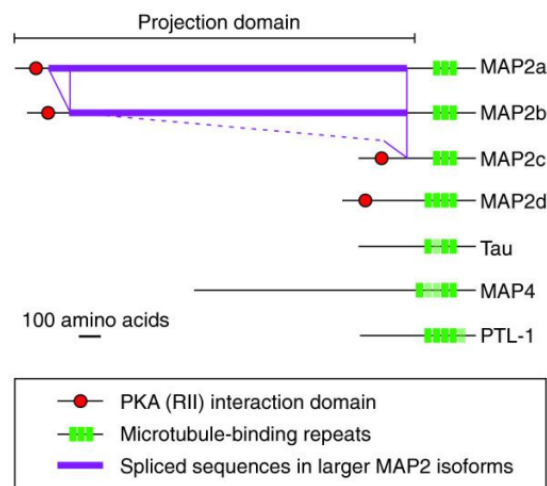


Fig. 22: Isoforme di MAP2 (Dehmelt et al., 2004).

La localizzazione di tutte le isoforme di MAP2, il cui legame ai microtubuli è regolato dalla fosforilazioni su vari siti amminoacidici (regolando in questo modo i cicli di polimerizzazione e depolimerizzazione dei microtubuli), è ristretta al corpo cellulare e ai dendriti dei neuroni, supportando l'idea del loro ruolo fondamentale nella crescita di queste estensioni.

Le due isoforme a basso peso molecolare, MAP2c e MAP2d, sembrano essere in grado di legare anche i filamenti di actina, permettendo il *crosslink* fra questi ed i microtubuli [94]. Ciò supporterebbe l'ipotesi secondo cui queste proteine sarebbero coinvolte nello sviluppo e nell'estensione dei processi cellulari che portano alla formazione dei dendriti, meccanismo in cui è fondamentale proprio l'interazione fra i microtubuli e l'actina [95].

Per prima cosa abbiamo studiato l'espressione del gene Map2 al livello della trascrizione dell'RNA messaggero mediante esperimenti di RT-PCR condotti durante il differenziamento a intervalli di tempo regolari. Ogni tre giorni, le cellule avviate al differenziamento, sono state staccate, dalla fiasca da coltura, da esse è stato estratto l'RNA totale da cui è stato retrotrascritto il cDNA usato per la reazione di PCR (Figura 23). Come si vede dal grafico a istogrammi, è molto significativo il fatto che nelle cellule della linea ShK, il livello di espressione dell'mRNA di MAP2 aumenta progressivamente col procedere dei giorni fino a raggiungere un livello massimo di espressione tra il 12° e il 18° giorno del differenziamento, mentre un simile andamento non si osserva nelle cellule

CSB difettive, in cui i livelli di espressione di MAP2 si mantengono sempre più bassi rispetto a quelli della linea ShK e non mostrano un progressivo incremento nel tempo.

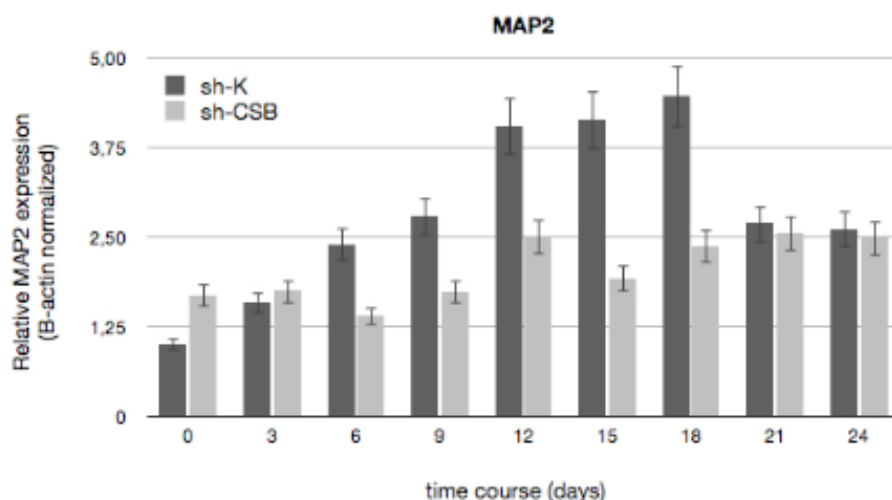


Fig.23: istogramma relativo ai livelli di espressione dell'RNA messaggero di MAP2 durante il differenziamento. Nella linea shK, l'espressione di MAP2 aumenta progressivamente col procedere dei giorni e mostra un livello massimo tra il 12 e il 18 giorno, mentre nella linea silenziata per CSB, questo andamento non si osserva e i livelli di espressione di MAP2 sono più bassi rispetto al controllo.

Nello stesso modo abbiamo osservato l'espressione della proteina MAP2 mediante il Western Blotting. Durante il processo di differenziamento portato avanti per 24 giorni, agli stessi intervalli di tempo considerati per l'RT-PCR, dai pellet cellulari ottenuti per centrifugazione delle cellule staccate, abbiamo derivato gli estratti proteici per la corsa elettroforetica e abbiamo usato un anticorpo capace di riconoscere le due isoforme di MAP2 a basso peso molecolare, MAP2c e MAP2d. Come si può vedere dalla Figura 24, abbiamo riscontrato delle significative differenze nell'espressione della proteina tra le due linee cellulari.

Abbiamo utilizzato l'actina come gene normalizzatore, dal momento che la sua espressione costante in molti diversi tipi cellulari, nella maggior parte dei casi ne giustifica l'utilizzo come punto di riferimento cui rapportare l'espressione dei geni di interesse. Sottoponendo le lastre fotografiche relative alla corsa elettroforetica delle due linee ad uno stesso tempo di esposizione per la visualizzazione del segnale relativo alle bande proteiche, si ottiene all'incirca la medesima intensità per la banda relativa all'actina dai due estratti cellulari, cosa che non si verifica invece per le bande corrispondenti alla proteina MAP2, le quali risultano molto più intense nell'estratto

proteico delle cellule ShK rispetto alle cellule silenziate per CSB; ciò indica chiaramente che l'espressione di MAP2 è maggiore nella linea 1 rispetto alla linea 2 (Figura 24b). Per migliorare il confronto e studiare l'andamento di MAP2 nel corso del differenziamento, abbiamo messo in risalto le bande corrispondenti, aumentando i tempi d'esposizione necessari per impressionare la lastra fotografica e si rivelare meglio le bande proteiche di MAP2. Utilizzando quindi tempi d'esposizione più lunghi abbiamo reso le bande MAP2 maggiormente visibili (Figura 24°). E' possibile vedere chiaramente che con il procedere del differenziamento vi è un pattern di espressione di MAP2 che non si realizza nello stesso modo nelle cellule silenziate per CSB. In accordo con i risultati dell' RT-PCR, il Western Blotting mostra che nelle cellule ShK il livello di espressione della proteina MAP2 aumenta progressivamente durante il differenziamento raggiungendo un livello massimo di espressione tra il 12° e 18° giorno, mentre ciò non si osserva nelle cellule shCSB, evidenziando quindi, una generale incapacità delle cellule difettive per CSB di sovraregolare in modo appropriato l'espressione del gene MAP2.

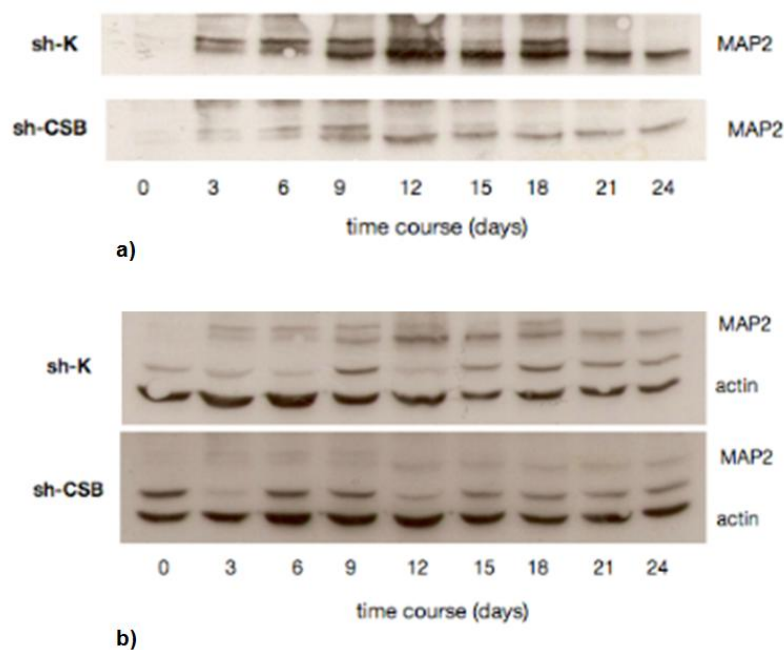


Fig. 24: Western Blotting per l'espressione della proteina MAP2. In **a)** dopo aver aumentato il tempo di esposizione della lastra fotografica, si vede bene il segnale relativo alle due bande ravvicinate di MAP2c e MAP2d (~ 72 Kda) che aumenta tra il giorno 12 e 18 del differenziamento, ed è molto più intenso nella linea ShK, rispetto al segnale delle bande corrispondenti nella linea shCSB. In **b)** è mostrata la normalizzazione con actina che è la banda di ~ 42 Kda di intensità costante.

4.6 Induzione di CSB durante il differenziamento

Abbiamo poi voluto monitorare l'andamento nei livelli di espressione del gene *csb* durante il differenziamento. Nonostante il nostro sistema cellulare sia costituito da cellule trasfettate con particelle lentivirali per ottenere il silenziamento del gene *csb* mediante RNAi in cui l'mRNA trascritto dal gene *csb* viene continuamente degradato, fino ad ottenere una riduzione dell'espressione del gene di circa il 65% nella linea 2 rispetto a quella di controllo, con una certa sorpresa abbiamo potuto osservare, mediante RT-PCR, che nelle cellule ShK si ha l'induzione del gene durante il differenziamento. Come si vede nel grafico a istogrammi di Figura 25, nelle cellule ShK l'espressione dell'mRNA di CSB aumenta progressivamente coi giorni e presenta un picco massimo tra il 12° e il 18° giorno, mentre nelle cellule silenziate questo aumento è molto meno consistente, ovviamente a causa della continua interferenza dell' shRNA che degrada il trascritto primario di CSB in questa linea.

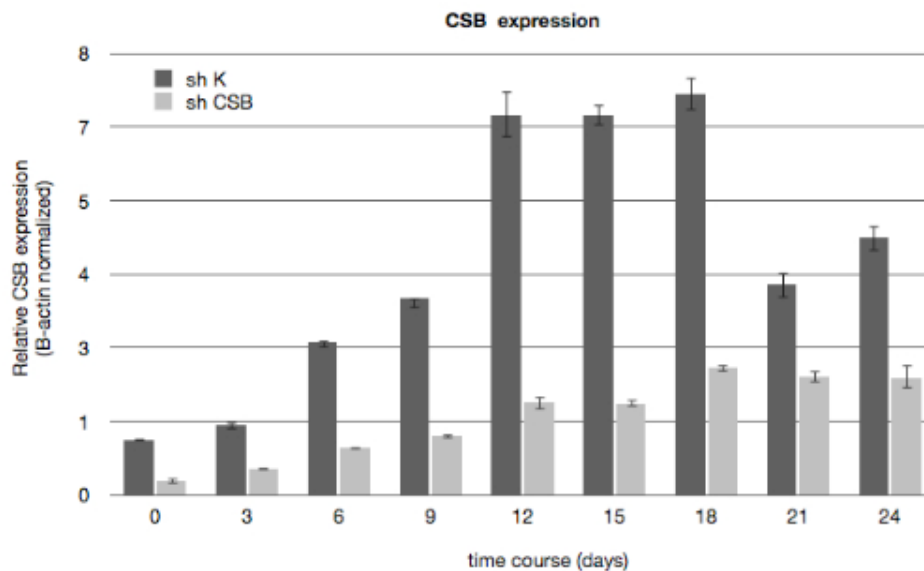


Fig. 25: Istogramma relativo ai livelli di espressione dell'RNA messaggero di CSB durante il differenziamento. Nelle cellule shK l'espressione di CSB aumenta progressivamente nei giorni fino a raggiungere un livello massimo di espressione tra il 12° e 18° giorno; nelle cellule shCSB, l' aumento non è significativo a causa dell' RNA interfering che degrada continuamente l'RNA messaggero di CSB

L'incremento nei livelli dell' mRNA di CSB, risulta notevole nelle cellule ShK, arrivando ad un livello di espressione che è più di sette volte maggiore rispetto a quello di partenza. Evidentemente l'espressione di CSB e la sua sovra-regolazione sono necessari in qualche modo ai fini del differenziamento neuronale, come dimostrano le varie anomalie già osservate nella linea difettiva per CSB durante il differenziamento.

Anche in questo caso abbiamo utilizzato la microscopia confocale per analizzare visivamente e semiquantitativamente l'espressione della proteina CSB nelle due linee cellulari. Abbiamo usato l'Ab 1° 1A11 diretto contro CSB, la cui espressione è evidenziata con il segnale fluorescente verde (Figura 26). Abbiamo scelto di mostrare il giorno 9 del differenziamento perché è quello in cui il protocollo prevede l'arricchimento di cellule neuronali nella popolazione dei progenitori e perché in questo giorno possiamo osservare le stesse differenze morfologiche nel grado di polarizzazione tra cellule shK ed shCSB e apprezzare le differenze nel grado di intensità del segnale; si vede bene come tale segnale relativo all'espressione di CSB sia più forte nelle cellule K e più debole nelle cellule CSB riflettendo la maggiore espressione della proteina nelle cellule di controllo rispetto a quelle silenziate, in accordo con i dati della *Real time* sul silenziamento di CSB.

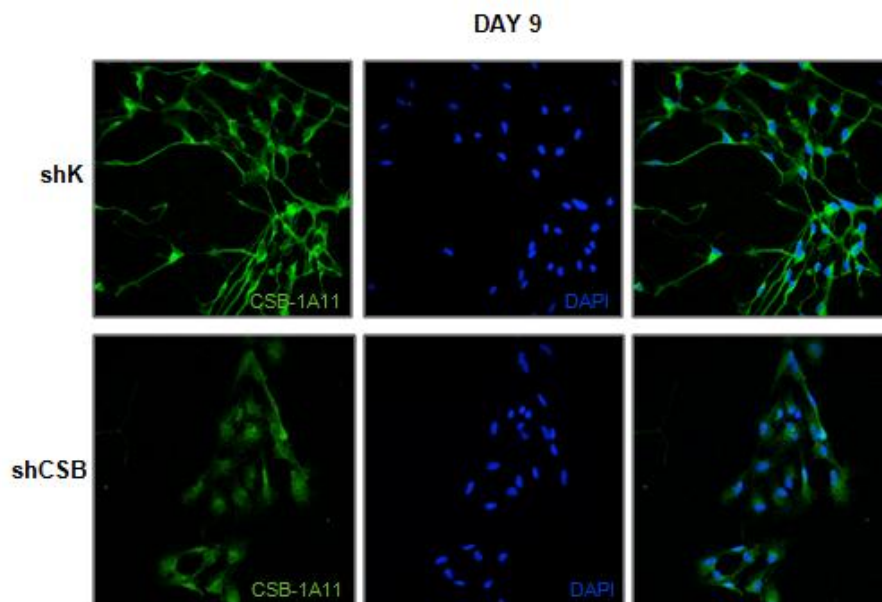


Fig. 26: Immunofluorescenza relativa all'Ab 1° 1A11 diretto contro CSB in corrispondenza del giorno 9 del differenziamento. Nella foto di sinistra il segnale verde relativo all'espressione CSB è molto più intenso nelle cellule di controllo rispetto a quelle silenziate. In blu nell'immagine centrale sono evidenziati i nuclei marcati col DAPI e nella foto a destra le due fluorescenze sono combinate insieme.

Nella Figura 27, immagini simili sono state prese a contrasto interferenziale con obiettivo a ingrandimento 63X, che insieme alla fluorescenza verde relativa a CSB consente di ricavare informazioni aggiuntive relative alla distribuzione della proteina nei vari compartimenti cellulari.

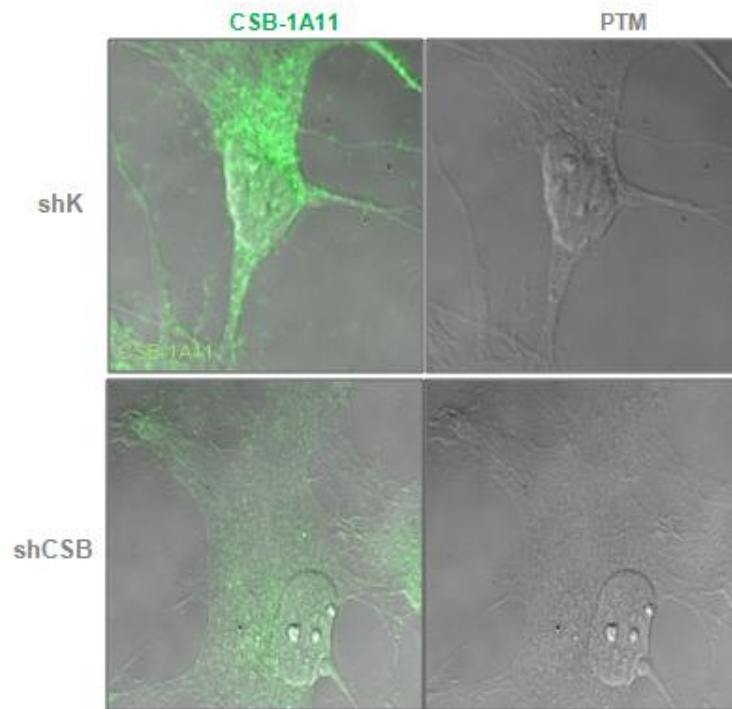


Fig. 27: Particolare ingrandito di cellule fotografate al microscopio confocale con obiettivo 63X. Nell' immagine di sinistra si evidenzia la fluorescenza verde relativa all'Ab 1A11 diretto contro CSB in cui si vede che la proteina è maggiormente espressa nelle cellule di controllo rispetto a quelle silenziate e sembra di poter dire che oltre ad essere presente nel nucleo CSB è distribuita anche nel citoplasma circostante, in zone perinucleari e nei prolungamenti citoplasmatici. Nella foto di destra l'immagine è presa in luce trasmessa per evidenziare la morfologia cellulare e confrontare con questa la distribuzione della fluorescenza verde.

Osservando le immagini si vede che il segnale fluorescente verde relativo all' Ab 1A11 diretto contro CSB è più intenso nella linea di controllo rispetto alla linea silenziate, ma la cosa interessante è la distribuzione della proteina: CSB oltre ad essere localizzata all'interno del nucleo, dove sappiamo essa svolge la sua funzione di rimodellatore della cromatina nella riparazione dei danni al DNA e nel modulare la trascrizione, si trova anche in una zona perinucleare circostante il nucleo, in quella porzione del citoplasma del corpo cellulare dei neuroni detta pericarion e lungo i prolungamenti neuritici. Ciò suggerirebbe la presenza di CSB a livello citoplasmatico o l'esistenza di un' isoforma citoplasmatica della proteina, ipotesi questa ancora al vaglio della sperimentazione. In questo ingrandimento si vede molto bene la differenza tra le morfologie cellulari, dove mentre le cellule di controllo presentano questi spessi prolungamenti neuritici-assonali che partono dal

corpo cellulare, le cellule CSB difettive non riescono a finalizzare l'organizzazione del citoscheletro per la formazione di una struttura che prepara la formazione di un assone, se non in misura minore. Nella Figura 28, sono mostrate le immagini relative alla doppia marcatura delle cellule shK con gli anticorpi, 1A11 per l'espressione di CSB in fluorescenza verde, e Tuj1 per la β -tubulina III in fluorescenza rossa. Nell'immagine più grande della figura, viene mostrata la combinazione dei due segnali fluorescenti, omettendo il segnale azzurro relativo al DAPI con cui sono marcati i nuclei; si vede che il segnale relativo all'espressione di CSB e quello relativo alla β -tubulina III sembrano colocalizzare nelle stesse regioni del citoplasma di questi neuroni al 12° giorno del differenziamento. La fluorescenza verde relativa a CSB si distribuisce oltre che nel nucleo, anche nei neuriti delle cellule e si sovrappone estesamente al segnale fluorescente rosso che è esclusivamente citoplasmatico. Questa colocalizzazione dei segnali fluorescenti relativi a CSB e alla tubulina suggerirebbe quindi, che CSB avrebbe oltre a quella nucleare anche una distribuzione citoplasmatica.

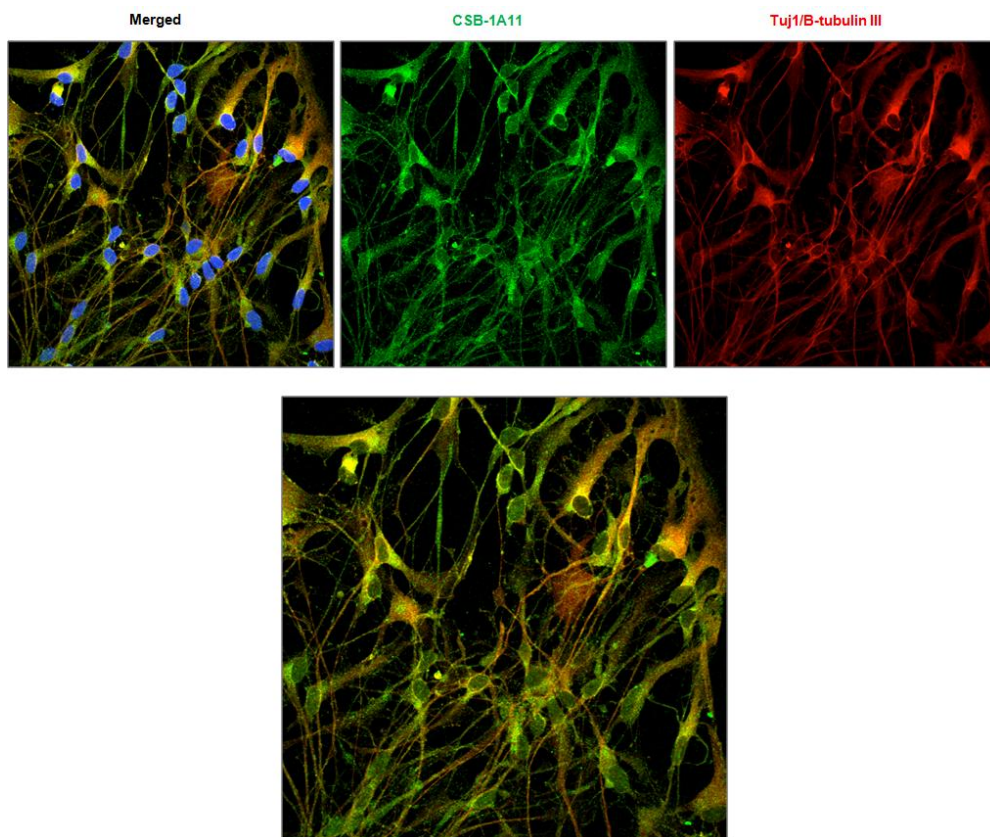


Fig. 28: Immagini al microscopio confocale relative alla doppia marcatura delle cellule ShK con gli anticorpi 1A11, diretto contro CSB (segnale verde) e Tuj1 contro la β -tubulina III (segnale rosso) intorno al 12° giorno del differenziamento. I due segnali fluorescenti sembrano colocalizzare estesamente nel citoplasma fuori del nucleo e lungo i prolungamenti neuritici suggerendo che la proteina CSB possa avere oltre a quella nucleare una distribuzione citoplasmatica.

4.7 Interattori di CSB ed esperimenti di ChIP (*Chromatin ImmunoPrecipitation*)

Il dato ottenuto con la RT-PCR, relativo all'incremento dei livelli di trascrizione del gene *csb* nelle cellule di controllo, inizialmente non era atteso. Subito dopo però abbiamo considerato alcuni dati ottenuti precedentemente. Per prima cosa un dato ottenuto da esperimenti di RT-PCR relativo al confronto dell'espressione del gene *csb* tra fibroblasti primari e progenitori neurali adulti entrambe umani, dove si era visto che già in condizioni basali di crescita *in vitro*, il livello di espressione del gene *csb* è più alto di circa il 70% nelle staminali neuronali rispetto ai fibroblasti. In secondo luogo, abbiamo riesaminato una serie di dati, ancora non pubblicati, ottenuti da esperimenti di immunoprecipitazione per doppia affinità (TAP-TAG) condotti tempo fa da altri ricercatori del nostro gruppo, che hanno consentito di identificare numerose proteine che sembrano interagire con la proteina CSB. La maggior parte delle proteine identificate si possono ascrivere a due gruppi principali: uno, quello di componenti del citoscheletro come DINEINA1, DINACTINA1, FILAMINA A, CLATRINA, e poi LAMINA A/C e MATRINA3. Queste interazioni potrebbero indicare un ruolo pleiotropico del gene *csb* e il possibile coinvolgimento della proteina in quello che, richiamando la sua funzione nota, si potrebbe indicare come una sorta di "rimodellamento del citoscheletro", riferendoci con ciò alla profonda riorganizzazione che subiscono le cellule neuronali nel loro processo di maturazione; infatti, nel differenziamento neuronale la riorganizzazione del citoscheletro cellulare è un processo che ha un significato cruciale perché non è limitato solo alla forma cellulare, ma in questo tipo cellulare ha un carattere fortemente funzionale. Infatti, l'allungamento dei neuriti che diverranno assoni, e l'organizzazione del citoscheletro per dare un cellula polarizzata in una porzione dendritica e una assonale ha a che fare con la trasmissione del segnale, con l'instaurarsi della comunicazione sinaptica e con l'attività elettrica di queste cellule. L'altro gruppo di proteine identificate è quello di subunità appartenenti ad importanti complessi di rimodellamento della cromatina specifici del differenziamento neuronale come BAF170, BAF53A, BRG1 (o SMARCA4) e BAF47 (o SMARCA1). Questi grossi complessi multiproteici cambiano il loro assetto in subunità, a mano a mano che il differenziamento procede passando dalla fase di cellula staminale embrionale totipotente, al progenitore *neural committed*, cioè avviato al differenziamento in senso neuronale non più totipotente ma pluri- o multi-potente, fino al neurone post-mitotico terminalmente differenziato; il fatto che alcune subunità di questi complessi coprecipitano con CSB, suggerisce che anche CSB

possa prender parte in qualche modo in questi complessi di rimodellamento della cromatina neuro-specifici. I nostri risultati relativi all'andamento dei livelli di espressione del gene MAP2 durante il differenziamento, in cui abbiamo trovato una progressiva sovraregolazione del gene nelle cellule della linea shK, insieme al dato relativo all'induzione nell'espressione del gene csb, ci ha suggerito la possibilità che il gene MAP2 possa essere uno dei geni target di questi complessi di rimodellamento della cromatina, in cui CSB potrebbe essere coinvolta con la sua attività di fattore rimodellatore.

In base a questa ipotesi abbiamo progettato alcuni esperimenti di ChIP, al momento sulla sola linea di controllo, per fotografare lo stato del promotore del gene MAP2 relativamente al legame dell'RNA Polimerasi II e di altri fattori che possono essere coinvolti nell'inizio della trascrizione. Riuscire a determinare la presenza o meno di questi fattori a livello del promotore genico e quindi stabilire chi si trova legato e quando in prossimità del sito di inizio della trascrizione, può fornire informazioni circa lo stato trascrizionale del gene, ossia indicare se esso si trova in uno stato silente e trascrizionalmente inattivo, oppure se è attivamente espresso. Inoltre, osservare il legame di un fattore di interesse sul promotore di un gene specifico, può fornire una prima indicazione del fatto che molto verosimilmente, quel fattore prende parte nella modulazione dell'espressione di quel gene.

In un tipico saggio di ChIP, il DNA e le proteine vengono *cross-linkate* affinché siano mantenute le associazioni tra le proteine e le loro sequenze bersaglio sul DNA. La cromatina viene poi frammentata e usata per l'immunoprecipitazione dei complessi DNA-proteine mediante l'uso di anticorpi specifici diretti contro le proteine di interesse. Il DNA immunoprecipitato viene purificato, e le sequenze associate con le proteine precipitate sono identificate mediante PCR, sequenziamento o ibridazione su *microarrays*.

Nella Figura 29 sono riportati gli istogrammi che riassumono i risultati degli esperimenti di ChIP per la regione -1000/0 (regione a monte del sito di inizio della trascrizione) del gene MAP2, sulle cellule di controllo, in due momenti chiave del differenziamento, cioè nello stato indifferenziato (-diff) e al 12° giorno circa del differenziamento (+diff).

I fattori proteici di cui abbiamo voluto studiare la cinetica di legame al promotore di MAP2 in questi esperimenti sono stati principalmente quattro: la subunità maggiore del complesso della RNA Polimerasi II (Rpb1), come complesso enzimatico primariamente coinvolto nella trascrizione e produzione dell'RNA messaggero del gene, la cui presenza a livello del promotore indica se e in che misura esso viene espresso nella cellula; CSB, in quanto proteina di nostro interesse, per

verificare l'ipotesi e il grado del suo eventuale coinvolgimento nella modulazione della trascrizione del gene MAP2; BRG1, come uno dei putativi interattori della proteina CSB da noi identificati per valutare la sua eventuale cooperazione con CSB nella regolazione di MAP2; l'enzima ad attività deacetilasica HDAC3, che prendendo parte ai cicli di acetilazione/deacetilazione dagli istoni del DNA, è coinvolto nel regolare l'accessibilità dei fattori di trascrizione sui promotori genici.

Come si vede dai due grafici in alto della Figura 29, sia per l'RNA Pol II che per la proteina CSB il legame al promotore sembra aumentare al 12° giorno del differenziamento rispetto all'inizio, cioè nella fase precedente all'avvio del differenziamento (-diff), ad indicare un progressivo arricchimento della Polimerasi II e di CSB sul promotore di MAP2. Per quanto riguarda invece BRG1, non sembra di poter osservare un cambiamento molto significativo riguardo al suo legame al promotore prima e durante il differenziamento, mentre si osserva una *depletion*, cioè una diminuzione del legame dell'enzima HDAC3 sul promotore di MAP2 al 12° giorno del differenziamento rispetto allo stato indifferenziato iniziale (grafici in basso). Questi primi dati forniscono importanti suggerimenti circa la regolazione dell'espressione genica di MAP2 durante il differenziamento dei progenitori neuronali, in cui la proteina CSB sembra di fatto avere un qualche ruolo. Il fatto che la cinetica di occupazione del promotore MAP2 da parte della proteina CSB, aumenti significativamente in corrispondenza del 12° giorno del differenziamento, indicherebbe che essa è un fattore necessario per l'up-regolazione della trascrizione di MAP2 osservata durante il differenziamento, e che le cellule silenziate, essendo deficitarie della funzione di CSB, non riescono a sostenere in maniera efficace l'incremento dei livelli della proteina MAP2, richiesto nel processo di neuritogenesi. Gli esperimenti di ChIP sulla linea shCSB di questi progenitori neurali sono ancora in corso.

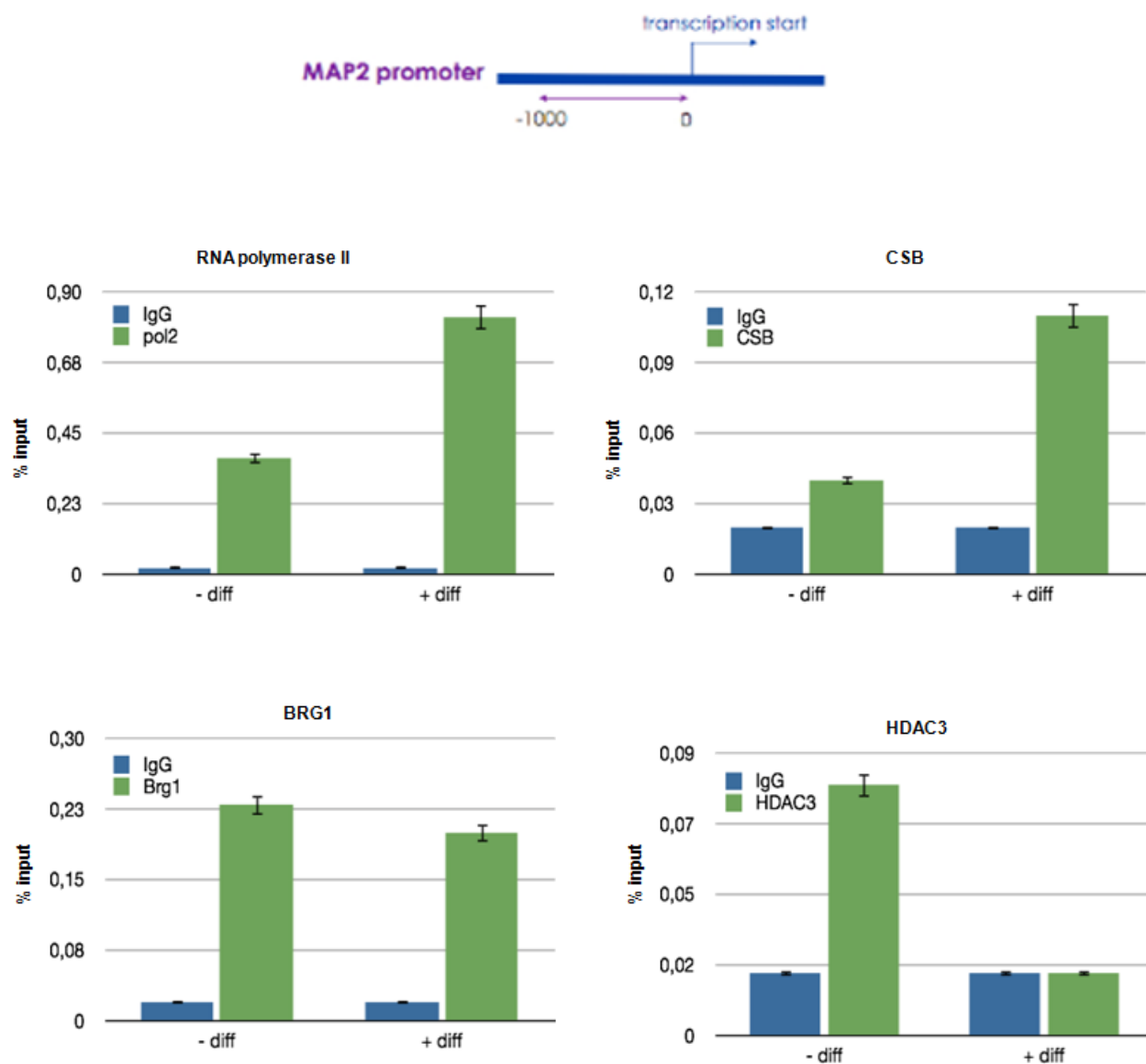


Fig. 29: La cromatina solubile è stata preparata dalle cellule della linea di controllo e sottoposta al saggio ChIP utilizzando anticorpi contro la subunità maggiore dell'RNA pol II, CSB, BRG1 e l'enzima HDAC3. LA Real-time PCR è stata eseguita utilizzando primer specifici per testare il relativo delle proteine di interesse nella regione del promotore -1000/0 situata immediatamente a monte del sito di inizio della trascrizione

4.8 Differenziamento in condizioni di ipossia

E' stato già detto che la proteina CSB svolge un ruolo importante nella risposta cellulare all'ipossia, fungendo da regolatore negativo della via pro-apoptotica mediata da p53 e favorendo l'avvio di una risposta pro-sopravvivenza dipendente da geni come HIF-1. Per tale ragione, tenendo conto dei risultati ottenuti nelle precedenti condizioni di coltura, in cui le cellule erano state cresciute ad una concentrazione di ossigeno pari a circa il 20%, corrispondente alla normale concentrazione d'ossigeno atmosferica, abbiamo iniziato prime osservazioni per seguire i processi di crescita e differenziamento dei progenitori neuronali a basse concentrazioni di ossigeno, in modo tale da riprodurre la condizione di ipossia in cui si possono venire a trovare queste cellule in condizioni fisio-patologiche. Grazie ad un apposito incubatore per colture cellulari, le cellule sono state mantenute in un ambiente contenente l'1% d'ossigeno. In tali condizioni già dopo pochi giorni è stato possibile notare, che le cellule presentano un tasso di crescita molto più rallentato rispetto a quello osservato al 20% di ossigeno. Prima di arrivare a considerare una concentrazione di ossigeno così bassa rispetto al 20% in cui vengono cresciute la maggior parte delle linee cellulari *in vitro*, abbiamo preso in considerazione concentrazioni di ossigeno intermedie usate in esperimenti noti dalla letteratura; pur avendo condotto alcuni esperimenti usando una concentrazione di ossigeno pari al 5%, riportiamo gli esperimenti condotti all'1% di ossigeno perché sono quelli che hanno dato i risultati più significativi e interessanti nel nostro sistema cellulare.

Nella Figura 30 riportiamo le fotografie scattate con fotocamera digitale collegata al microscopio ottico a contrasto di fase, prese ad intervalli regolari, ogni tre giorni del processo di differenziamento sia per la linea ShK, che per quella shCSB, condotto all'1% di ossigeno.

Come si vede, in queste condizioni, né la linea difettiva per CSB, né la linea di controllo sembrano capaci di dare origine a quelle tipiche architetture che erano visibili in concentrazioni atmosferiche di ossigeno, quali cavitazioni, prolungamenti neuritici che prima formano una rete intricata, poi si raccolgono in fascicolazioni, e agglomerati di cellule. Tuttavia, anche in questo caso è possibile notare importanti differenze fra le cellule ShK e le cellule shCSB. Le cellule della linea 1, che fino al giorno 9 del differenziamento mantengono una forma insolitamente allargata, sviluppano poi dal giorno 12 molteplici ramificazioni e sembrano voler formare dei raggruppamenti che richiamano, anche solo vagamente, i grossi agglomerati visti al 20% di ossigeno.

Al contrario invece le cellule della linea 2 acquisiscono una forma notevolmente allargata e del tutto priva di prolungamenti o ramificazioni, molto diversa rispetto a quella che si presenta alla

concentrazione atmosferica d'ossigeno. Sembra quindi che la condizione di ipossia da noi indotta causi un generale rallentamento tanto nella proliferazione quanto nel differenziamento di questi progenitori neurali, colpendo in misura molto maggiore le cellule CSB difettive rispetto a quelle di controllo.

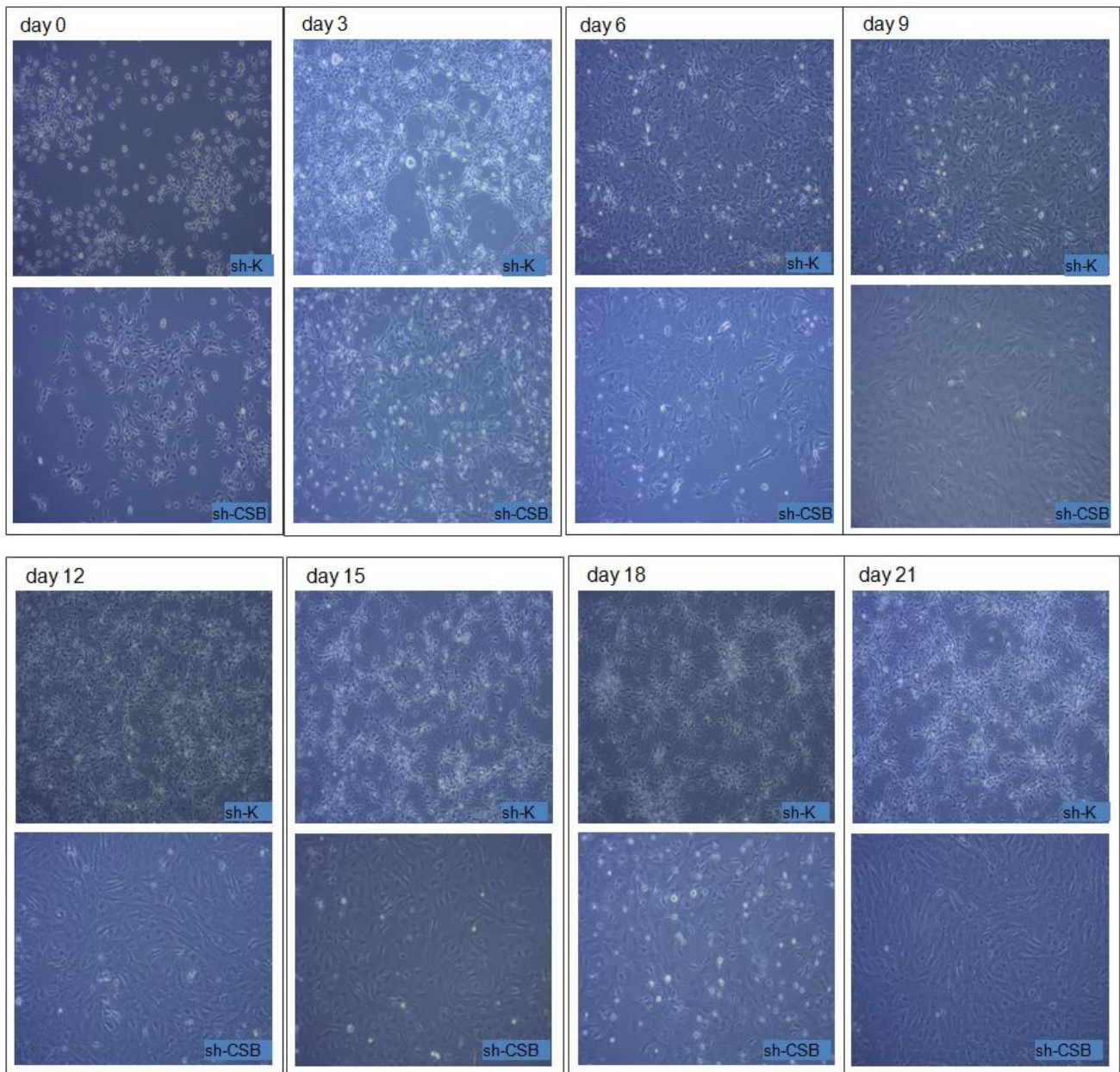


Fig.30: Serie di fotografie prese con fotocamera digitale collegata al microscopio ottico a contrasto di fase ogni tre giorni, durante il differenziamento *in vitro* in ambiente all'1% di ossigeno. La proliferazione cellulare appare generalmente rallentata in entrambe le linee cellulari e nessuna delle due popolazioni mostra le caratteristiche trasformazioni che avvengono durante la neurogenesi osservate al 20% di ossigeno. Le cellule di entrambe le linee presentano una morfologia allargata fin dall'inizio del differenziamento, ma successivamente le cellule ShK tendono a raggrupparsi e ad assumere un forma almeno stellata senza però emettere prolungamenti neuritici fino al 21° giorno. Le cellule shCSB, invece, anche nelle fasi avanzate del processo tendono a formare un tappeto di cellule notevolmente allargate, stipate le une accanto alle altre.

Nella Figura 31 riportiamo immagini affiancate, ciascuna relativa ad una delle due linee cellulari, per mettere in evidenza le notevoli differenze che si producono in condizioni di ipossia in fasi medio-avanzate del differenziamento sia nella morfologia cellulare che nell'organizzazione complessiva della popolazione.

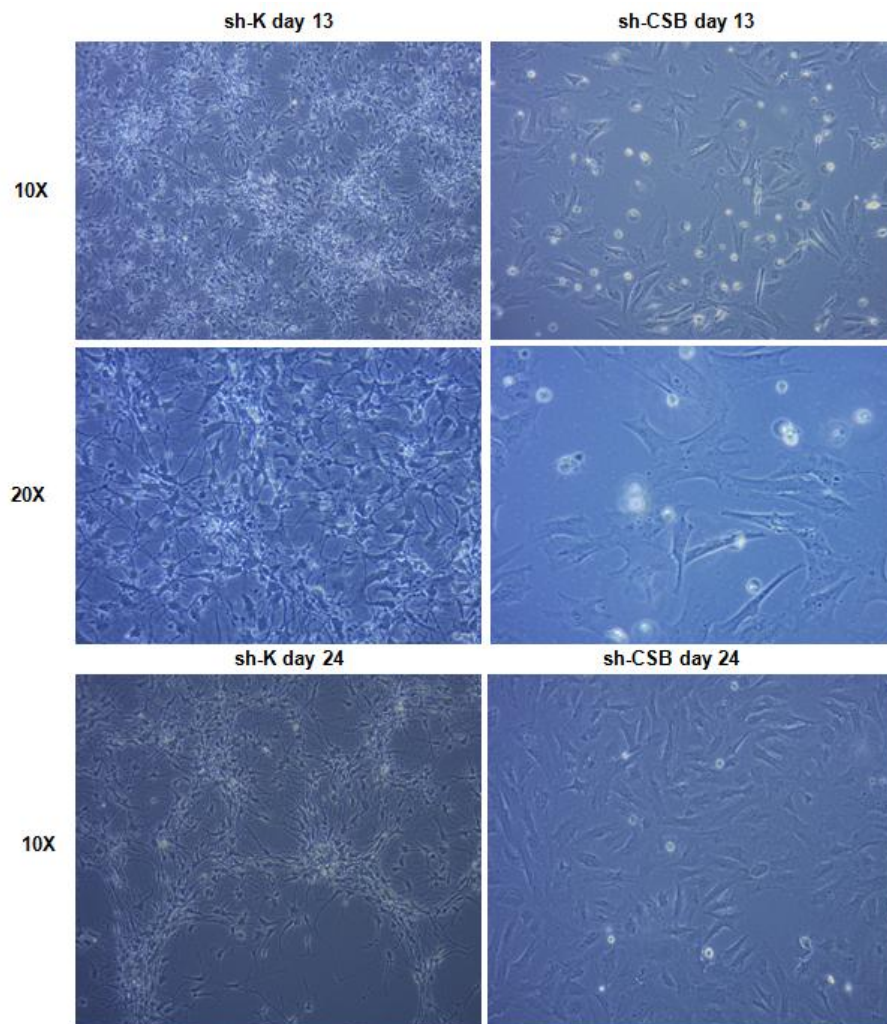


Fig.31: Immagini prese al microscopio ottico a contrasto di fase con obiettivi 10X e 20X in due momenti critici del differenziamento condotto all'1% di ossigeno. Relativamente al giorno 13 sono riportate le immagine a due diversi ingrandimenti per meglio evidenziare le differenze morfologiche a livello cellulare e la diversa organizzazione della popolazione nel complesso. La popolazione CSB difettiva mostra un tasso di proliferazione profondamente ridotto rispetto alla popolazione di controllo come si deduce dalla densità cellulare e le cellule silenziate presentano un citoplasma insolitamente slargato, come si vede bene con l'obiettivo a maggior ingrandimento. Al giorno 24 anche le cellule di controllo non presentano un elevato grado di differenziamento come ci si attenderebbe in questa fase avanzata del processo, pure se sembrano darsi una sorta di organizzazione spaziale; le cellule silenziate invece mantengono ancora la loro forma allargata senza segni benché minimi di polarizzazione o riorganizzazione spaziale le une rispetto alle altre.

Intorno al 13° giorno del differenziamento, come si può dedurre osservando la densità cellulare, le cellule della linea CSB difettiva presentano un tasso di proliferazione notevolmente ridotto rispetto alla linea di controllo, e mentre le cellule di questa linea, pur essendo fortemente rallentate nel processo di formazione dei neuriti e di maturazione dei neuroni sembrano assumere una forma se non polarizzata, almeno stellata, le cellule shCSB mostrano una forma insolitamente allargata, particolarmente evidente nell'immagine a ingrandimento maggiore. Al 24° giorno, le cellule di controllo non sembrano avanzare significativamente nel processo di differenziamento neuronale, ma complessivamente, la popolazione sembra almeno rispondere a qualche segnale che probabilmente sta dirigendo e segnalando in merito all'organizzazione e la distribuzione spaziale delle cellule. Al contrario, le cellule CSB difettive sembrano più statiche, mantenendosi sostanzialmente fisse nella loro forma particolare, così fortemente allargata e nella loro organizzazione spaziale complessiva. Accanto alle osservazioni di tipo morfologico, siamo andati a misurare l'andamento dei livelli di produzione della proteina MAP2 con il Western Blotting, durante il differenziamento, sempre in condizioni di ipossia (Figura 32).

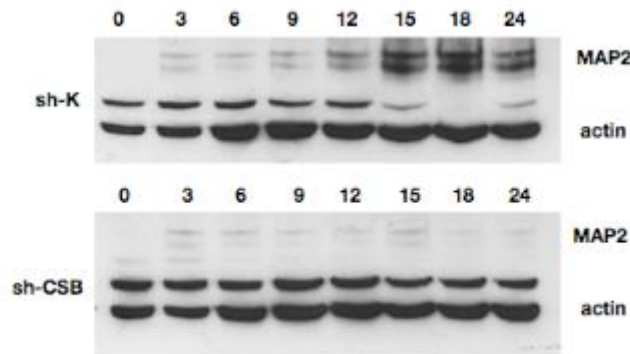


Fig. 32: Western Blotting relativo all'espressione della proteina MAP2 durante il differenziamento della linea ShK ed shCSB in condizioni di ipossia (1% di ossigeno). Nelle cellule di controllo le bande relative a MAP2 cominciano a comparire con una intensità non molto elevata (rispetto al segnale relativo alla banda dell'actina usata come proteina di riferimento) solo nelle fasi avanzate del differenziamento, mentre nelle cellule silenziate per CSB non si osservano le bande relative alla proteina MAP2 nonostante l'intenso segnale relativo all'actina.

Come si vede, nelle cellule della linea di controllo, le bande relative alla proteina MAP2 compaiono in una fase avanzata, verso il 15°-18° giorno del differenziamento, con una intensità molto più bassa rispetto alle bande relative all'actina usata come proteina di riferimento. Nelle cellule CSB difettive, invece, nessuna banda di intensità significativa rispetto all'actina, compare fino al 24° giorno considerato.

5. DISCUSSIONE

La sindrome di Cockayne (CS) è una malattia genetica rara trasmessa con modalità autosomica recessiva che provoca mortalità infantile; è una sindrome da invecchiamento precoce che colpisce i bambini in fase neonatale e nella prima infanzia per la quale si distinguono solitamente tre forme che sono: la forma classica e più frequente (CS di tipo I) in cui i primi sintomi compaiono entro la fine del primo anno di vita e il decesso sopraggiunge intorno ai 12-14 anni di vita, una forma detta congenita, CS II, caratterizzata da insorgenza alla nascita e progressione rapida della sintomatologia con aspettativa di vita notevolmente abbassata e una forma ad insorgenza tardiva, CS III, con sopravvivenza prolungata. Sebbene siano note le basi genetiche della malattia, la maggior parte dei pazienti infatti presenta una mutazione nel gene ERCC6 che codifica per la proteina CSB, gli aspetti molecolari della neuropatia ad essa associata restano ancora poco chiari. L'osservazione che le gravi disfunzioni neurologiche possono manifestarsi sia alla nascita che durante l'infanzia, suggerisce che proteina CSB potrebbe avere un ruolo chiave nella plasticità neuronale e nel mantenimento dell'omeostasi del sistema nervoso. Il complesso quadro clinico neuropatologico e multisistemico comprende difetti nello sviluppo e nel mantenimento del sistema nervoso, riassumibili in tre caratteristiche principali: (1) morte neuronale, (2) demielinizzazione non uniforme e (3) calcificazione. Ciò risulta in un'estesa neurodegenerazione che in breve tempo compromette fortemente lo sviluppo cognitivo, le capacità visive e uditive, e lo sviluppo motorio, portando, insieme agli altri sintomi non neurologici, alla morte prematura del paziente solitamente in età pre-adolescenziale. Fino a questo momento, lo studio degli aspetti genetici e molecolari della malattia è stato condotto *in vivo* su modelli murini che però presentano la grave limitazione di sviluppare in seguito alle mutazioni geniche indotte, un fenotipo neurodegenerativo più blando e poco rappresentativo di quello umano. In questi modelli infatti, per avere un quadro neuropatologico più severo, simile a quello umano, è necessario generare doppi mutanti in cui accoppiare alle mutazioni a carico del gene *csb* anche mutazioni a carico di altri geni coinvolti nei processi di riparazione dei danni al DNA, come quelli che definiscono i gruppi di complementazione dello Xeroderma Pigmentoso, *Xpc* o *Xpg*. In vitro gli studi sono stati fatti su fibroblasti e cellule linfoblastoidi poco indicate per lo studio dell'aspetto neurologico della malattia. Per i nostri obiettivi, che sono lo studio della plasticità neuronale e dell'aspetto neurodegenerativo della malattia, era quindi necessario disporre di un sistema cellulare più

appropriato, che consentisse di analizzare il ruolo della proteina CSB nel processo di neurogenesi. Abbiamo quindi usato un sistema basato su CELLULE STAMINALI NEURONALI UMANE MULTIPOTENTI definite adulte, in quanto derivate da un feto alla decima settimana di gestazione, capaci di *self-renewal* – il processo di autorinnovamento con cui vengono generate costantemente ad ogni ciclo di divisione una o due cellule figlie anch'esse staminali indifferenziate – di differenziamento nei tre sottotipi neuronali e immortalizzate mediante la tecnologia basata sull'oncogene *v-myc*. Le cellule sono dipendenti dalla presenza dei fattori di crescita EGF ed FGF nel terreno di crescita per la propagazione *in vitro* nello stato indifferenziato, ma possono essere avviate al differenziamento mediante la sottrazione progressiva di entrambi i fattori di crescita in due step sequenziali, che prevede con una tempistica prestabilita l'arricchimento di neuroni, astrociti e oligodendrociti nella popolazione costituita dal pool di cellule staminali. Allo scopo di riprodurre il fenotipo Cockayne, abbiamo indotto il knockdown della proteina CSB mediante il silenziamento del gene con la tecnica dell' RNAi . Mediante l'infezione con particelle lentivirali, il cui DNA si integra stabilmente nel genoma della cellula ospite, per poi esprimere uno *short hairpin* RNA, shRNA, diretto contro l'mRNA messaggero di CSB siamo giunti alla generazione di due linee cellulari, una di controllo ShK, CSB-competenti e l'altra, shCSB, in cui l'espressione residua del gene *csb* è di circa il 20% rispetto alle cellule di controllo. Abbiamo poi verificato la validità del modello cellulare creato considerando la risposta di p53 fino a 24 ore dopo il trattamento con raggi UV. Abbiamo visto che proprio come accade nei fibroblasti derivati dai pazienti CS, l'espressione di p53 nelle cellule CSB-difettive si mantiene alta per molte ore dopo il trattamento rispetto alle cellule normali in cui invece raggiunto un picco massimo di espressione, i livelli della proteina tornano bassi nelle ore immediatamente successive. Una volta verificata la validità del nostro modello siamo stati in grado di esaminare come una deplezione della proteina CSB influenzi la capacità di *self-renewal* e il differenziamento neuronale, nel tentativo di dare prime indicazioni per quel che riguarda la sua funzione nel processo di neurogenesi. Dai nostri studi emerge chiaramente come innanzitutto il silenziamento del gene *csb* influenzi il tasso di proliferazione dei progenitori neurali, che risulta significativamente ridotto come risulta sia dalle osservazioni morfologiche, che dalle analisi quantitative basate sulla conta cellulare e sulla quantificazione dallo specifico marker di proliferazione, Ki67. Questo aspetto si accentua particolarmente quando si avvia il differenziamento neuronale delle cellule *in vitro*, e si associa con un aumentato tasso di morte cellulare nella popolazione silenziata rispetto al controllo, almeno da quanto risulta ad una prima osservazione in microscopia ottica. Sarà necessario, però mettere a punto metodiche più

appropriate che consentano l'efficiente quantificazione dei livelli di morte di questo tipo cellulare nel corso del differenziamento.

Nei numerosi esperimenti di differenziamento effettuati, abbiamo visto che le cellule di controllo sono in grado di andare in contro a profonde trasformazioni morfologiche che si situano sul piano dell'organizzazione citoplasmatica delle singole cellule, ma che interessano anche la distribuzione spaziale del gruppo complessivo di cellule che coesistono entro i confini di una stessa area, le quali ridefiniscono progressivamente le loro reciproche distanze e i contatti delle une con le altre attraverso l'estensione dei loro prolungamenti citoplasmatici. Pertanto, i mutamenti che si realizzano a livello di ogni singola cellula che va in contro al processo di polarizzazione, va a riflettersi sul piano organizzativo dell'intera popolazione cellulare nella misura in cui le cellule sembrano rispondere a delle segnalazioni che ne determinano migrazioni, e spostamenti non del tutto casuali. Queste trasformazioni progressive, definitive una volta avviate mediante la semplice rimozione dei fattori di crescita, concorrono alla generazione di cellule neuronali tendenzialmente bipolari, in cui si osserva chiaramente la bipartizione del citoplasma in una porzione contenente il nucleo cellulare più allargata, e una porzione distale, in accrescimento; secondo il processo di neuritogenesi, questa porzione si forma all'inizio come piccola protrusione, la quale progressivamente si estende seguendo la direzione di avanzamento del cono di crescita per lasciare dietro di sé lunghi e sottili neuriti. Un assone che si allunga in coltura si presenta appiattito alla sua estremità distale in una struttura sottile a forma di ventaglio pieghettato. Questa estremità distale è chiamata cono di crescita ed è formata da piccoli filopodi sottili; il loro interno è stipato di mitocondri che rendono disponibile una considerevole quantità di energia necessaria per il costante movimento del cono di crescita in avanzamento. La struttura esterna del cono di crescita dipende dalla disposizione di varie strutture citoscheletriche interne. Le più importanti strutture fibrillari all'interno dell'assone in estensione sono l'actina che forma i microfilamenti, i microtubuli e i neurofilamenti. Nei filopodi del cono di crescita è presente un'elevata densità di filamenti di actina polimerizzata, ossia actina fibrillare, F-actina. La continua polimerizzazione dell'actina monomerica in polimeri di F-actina nel margine avanzante del cono di crescita e la depolarizzazione altrove ad una velocità uguale costituisce il meccanismo intrinseco di avanzamento del cono di crescita su substrati adesivi permissivi [96]. I coni di crescita si spingono in avanti mentre modellano gli assoni che li seguono e il loro avanzamento è controllato da fattori presenti nell'ambiente esterno. Nelle cellule staminali neuronali di controllo durante il differenziamento vengono emessi numerosi prolungamenti neuritici che si associano tra loro

formando grosse fascicolazioni estese, che si dipartono da grossi agglomerati in cui sono concentrati i corpi cellulari. Trasformazioni di questa entità e strutture come queste non sembrano formarsi nella popolazione di cellule silenziate per CSB. Tutti i cambiamenti che riguardano il processo differenziativo in queste cellule risultano fortemente ritardati nel tempo, e appaiono generalmente meno pronunciati. Le cellule che assumono una morfologia polarizzata dovuta all'emissione dei prolungamenti citoplasmatici, lo fanno in una fase più tardiva del processo e in maniera meno efficiente rispetto alle cellule di controllo. Le cellule CSB difettive anche dopo molti giorni dall'avvio del differenziamento, presentano un citoplasma fortemente adesivo al substrato e slargato a ventaglio proteso da una parte, ma non sembrano in grado di organizzare efficacemente il citoscheletro interno per emettere un prolungamento neuritico, mentre nello stesso momento le cellule CSB competenti hanno già dato forma ad una fitta rete intricata di lunghi e sottili neuriti. Le analisi relative all'espressione della proteina MAP2, effettuate con il Western Blotting, hanno mostrato che nelle cellule silenziate c'è un'espressione appena rilevabile della proteina e non si ha l'aumento progressivo dei livelli citoplasmatici della proteina col procedere del differenziamento, come invece avviene per le cellule di controllo. Tramite l'RT-PCR abbiamo potuto determinare che le differenze d'espressione proteica viste con il Western Blotting sono dovute a variazioni nell'induzione genica e non a meccanismi di regolazione post-traduzionale dal momento che durante tutto il periodo di differenziamento, i livelli di mRNA di MAP2 si mantengono significativamente inferiori nelle cellule CSB difettive rispetto ai controlli. Questo ci induce a ritenere che la proteina CSB sia in una certa misura fondamentale per la corretta trascrizione del gene MAP2, necessaria per lo sviluppo della morfologia neuronale e probabilmente anche per l'acquisizione di un opportuno profilo funzionale del neurone in via di formazione. Allo stesso modo CSB potrebbe essere fondamentale anche per l'attivazione di altri geni importanti coinvolti nella sopravvivenza e nel differenziamento dei progenitori neuronali e una simile ipotesi spiegherebbe i risultati ottenuti con l'RT-PCR, secondo i quali lo stesso gene *csb* viene notevolmente indotto nel corso del differenziamento. E' possibile, quindi, che la proteina CSB svolga un ruolo importante durante il differenziamento neuronale, promuovendo, da una parte la sopravvivenza cellulare, e dall'altra contribuendo alla regolazione dell'espressione di geni importanti per la neurogenesi come MAP2.

Risultati non ancora pubblicati, ottenuti dal nostro gruppo di laboratorio tramite procedure di *Tandem Affinity Purification* e spettrometria di massa hanno consentito l'identificazione di diverse proteine che inaspettatamente coprecipitano con CSB. La maggior parte di queste si possono far

rientrare in due gruppi principali. Uno è quello di componenti del citoscheletro in cui sono state trovate Dineina¹, Dinactina, Vimentina, Lamina A, Filamina A e Clatrina. La complessa specializzazione morfologica dei neuroni dipende dal citoscheletro. Entrambi i tipi di processi citoplasmatici che caratterizzano questo tipo cellulare, dendriti e assoni, chiamati collettivamente neuriti, sono pieni di fasci di microtubuli, microfilamenti e filamenti intermedi. Il neuroplasma dell'assone, del corpo cellulare e dei dendriti delle cellule nervose, contiene strutture microtubulari dette neurotubuli, che nell'assone sono disposti longitudinalmente, tutti orientati nella stessa direzione, con le estremità meno puntate verso il corpo cellulare e le loro estremità più che puntano verso i terminali degli assoni. Poiché gli assoni possono essere spesso molto lunghi e sottili, è evidentemente richiesta un'impalcatura interna di sostegno; la funzione più importante di queste strutture citoscheletriche sembra però quella di presiedere al movimento di costituenti citoplasmatici e di membrana. Il corpo cellulare del neurone tiene sotto la propria dipendenza metabolica tutti i prolungamenti ma specialmente l'assone che è privo dell'apparato per la sintesi proteica. Questa dipendenza metabolica si manifesta con un continuo movimento, detto flusso o trasporto assonale di proteine ed enzimi solubili, trasmettitori chimici, vescicole sinaptiche, subunità monometriche dei neurofilamenti e dei neurotubuli, ed è correlato soprattutto con i meccanismi di trasmissione sinaptica e neurosecrezione, cioè con la necessità di rifornire continuamente le sinapsi di mediatori chimici, nonché con il continuo ricambio di costituenti di membrana. Il trasporto assonale avviene sia in direzione anterograda, cioè dal corpo cellulare verso l'estremità distale dell'assone, che in direzione opposta, per cui si parla di trasporto assonale retrogrado, che conduce al corpo cellulare materiale probabilmente destinato ad essere riciclato o degradato. La serie di binari perfettamente allineati di neurotubuli costituiscono delle piste su cui vengono trasportate molte proteine specifiche e su cui scorrono le vescicole contenenti le proteine. Queste strutture citoscheletriche comunque si limitano solo a guidare il movimento, non essendo di per sé in grado di fornire la forza motrice in quanto prive di proprietà contrattili e di attività ATPasica. Il trasporto si basa infatti sull'attività di motori molecolari mecano-chimici appartenenti almeno a due tipi, uno per il trasporto anterogrado e uno per quello retrogrado. La dineina citoplasmatica e la dinactina sono implicate nel flusso assonico retrogrado. La vimentina e la lamina sono le unità proteiche che costituiscono i filamenti intermedi rispettivamente di tipo 3, (IFIII), e di tipo 5, (IFV), in particolare quelli fatti di vimentina si trovano nel citoscheletro dei fibroblasti, mentre la lamina è associata al rivestimento esterno del nucleo. La clatrina costituisce la tipica struttura detta *trischelion* del rivestimento esterno di alcune vescicole

endoplasmatiche, e la filamina è stata trovata abbondante nei neuroni come ponte tra due filamenti di actina adiacenti. L'interazione di CSB con queste proteine darebbe ragione di alcune nostre osservazioni ottenute tramite immunofluorescenza, le quali indicherebbero la presenza della proteina CSB tanto nel nucleo quanto nel citoplasma cellulare. Infatti, osservando al microscopio confocale, in particolare le cellule della linea 1, marcate con l'Ab 1A11 diretto contro la proteina CSB, ci è sembrato di poter dire che la proteina, oltre ad essere localizzata nel nucleo dove è noto essa svolge la sua funzione come rimodellatore della cromatina nella riparazione dei danni al DNA, è distribuita anche in zona perinucleare, in quella porzione citoplasmatica del corpo cellulare dei neuroni chiamata pericarion e lungo i prolungamenti neuritici. E negli esperimenti di doppia marcatura per la proteina CSB e la β -tubulina III, l'estesa colocalizzazione dei due segnali fluorescenti nelle zone del citoplasma dei neuriti costituisce un'importante evidenza a sostegno della distribuzione non solo nucleare, ma anche citoplasmatica di CSB. Un'ipotesi plausibile è quindi che inaspettatamente CSB possa avere una funzione sia nucleare che citoplasmatica, quest'ultima esercitata nell'interazione con proteine citoscheletriche e contribuire quindi in qualche modo alla riorganizzazione del citoscheletro di cellule progenitrici neuronali in fase di differenziamento. Per quanto riguarda queste interazioni sono in preparazione nuovi esperimenti per avere una conferma definitiva.

L'altro gruppo di interattori di CSB identificati è costituito da subunità che fanno parte di importanti complessi di rimodellamento della cromatina neuro-specifici, in particolare BAF53A, BAF170, BAF47 e BRG1. I complessi BAF (*Brahma-Associated Factor*) appartengono alla famiglia SWI/SNF, funzionano sia come attivatori che come repressori trascrizionali e possono passare da una modalità d'azione all'altra sul medesimo gene. I complessi BAF tessuto-specifici possono interagire con una grande varietà di fattori di trascrizione in diversi tipi cellulari, così da assumere funzioni che dipendono dal contesto e dai partner dell'interazione. Nei mammiferi, questi complessi vanno incontro a progressivi cambiamenti nella composizione in subunità durante la transizione da cellule staminali pluripotenti a progenitori neuronali multipotenti fino allo stato di neurone post-mitotico. Le subunità che appartengono a famiglie di geni omologhe si escludono a vicenda nel prender parte ad uno stesso complesso, favorendo l'assemblaggio combinatorio di complessi di rimodellamento di funzionalità diverse costituiti da subunità simili [97]. La subunità ad attività ATPasica di questi complessi SWI/SNF è codificata dal gene *Brg1*. La proteina BRG1 è necessaria per il self-renewal dei progenitori neuronali e per il normale differenziamento dei neuroni a partire da questi progenitori [98]. I complessi BAF che hanno un ruolo cruciale nel

mantenimento del self-renewal e della pluripotenza delle cellule staminali embrionali, detti esBAF in questo caso includono tra le altre, le subunità BRG1, BAF155, BAF53A. Quando le cellule staminali embrionali si differenziano in progenitori neuronali il complesso esBAF va incontro alla sostituzione di diverse subunità, incorpora BAF170, BRM e BAF60C ed esclude BAF60B. Quando i progenitori neuronali lasciano le loro nicchie neurogeniche della zona sotto-ventricolare del cervello (la zona che conserva il pool di cellule staminali e in cui si mantiene attiva la neurogenesi adulta) ed escono definitivamente dal ciclo cellulare diventando neuroni post-mitotici, essi esprimono BAF45B e BAF53B che rimpiazzano BAF45A e BAF53A dei complessi npBAF, specifici dei progenitori neurali, per formare il complesso BAF specifico del neurone nBAF (Figura 33). I complessi nBAF promuovono la crescita dendritica mediante l'interazione con il regolatore CREST regolando direttamente i geni essenziali per l'accrescimento dendritico [99]. Il fatto che la proteina CSB sembra interagire con alcune delle subunità BAF suggerisce che questa proteina possa prender parte a questi complessi di rimodellamento della cromatina neurone specifici e contribuire alla modulazione dell'espressione dei loro geni bersaglio.

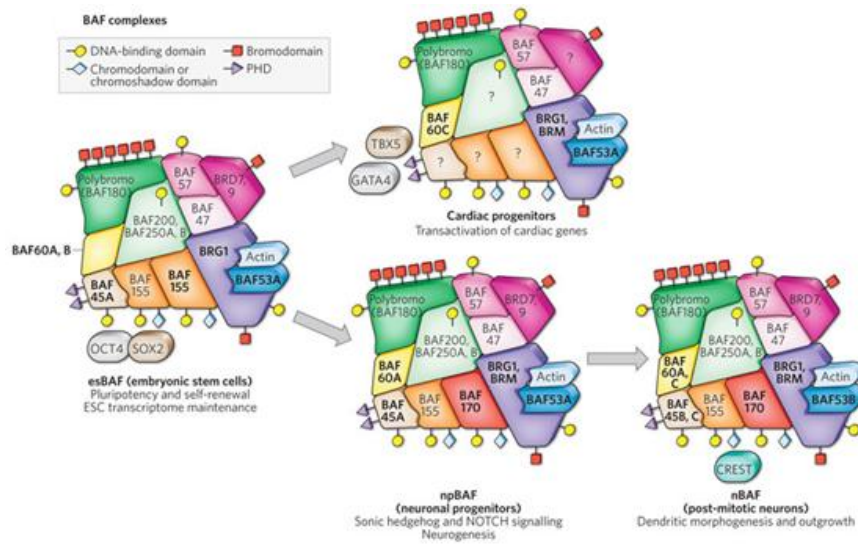


Fig. 33: Assemblaggi tessuto-specifici e tipo cellulare-specifici dei complessi BAF che hanno funzioni diverse. Le subunità che contraddistinguono i complessi sono evidenziati in grassetto (*Crabtree G.R. et al 2010*)

Per questo abbiamo fatto una serie di esperimenti di ChIP per verificare se il promotore del gene MAP2 potesse essere un promotore-bersaglio di questi complessi di rimodellamento, o almeno di

qualcuna delle loro subunità, in associazione con la proteina CSB. In tal caso, considerando che l'andamento nel tempo, relativo all'incremento dell'espressione dei due geni CSB e MAP2, sono risultati del tutto simili tramite RT-PCR, con livelli massimi di espressione tra il 12° e 18° giorno in entrambi i casi, la notevole induzione del gene *csb* osservata nella linea ShK durante il differenziamento, potrebbe essere messa in relazione con la parallela induzione del gene MAP2, nell'ottica del meccanismo di neuritogenesi. Pertanto, nelle cellule silenziate, la mancanza di CSB potrebbe essere responsabile della ridotta attivazione del promotore del gene MAP2.

I risultati della ChIP sulle cellule staminali neuronali di controllo hanno mostrato che sia la quantità di RNA Polimerasi II che la quantità di proteina CSB legate al promotore MAP2, aumenta col differenziamento indicando un aumento della cinetica di legame in corrispondenza della regione immediatamente a monte del sito di inizio della trascrizione; la cinetica di legame della proteina BRG1 invece non sembra variare in maniera molto evidente col procedere del differenziamento mentre è risultata una diminuzione della quantità di enzima HDAC3 legato.

Sulla base di questi importanti risultati e tenendo conto di alcuni dati noti dalla letteratura sulla regolazione trascrizione di geni come *c-Jun* e *c-Fos*, abbiamo elaborato un ipotetico, semplice modello per spiegare il meccanismo molecolare dell'attivazione del gene MAP2 durante il differenziamento in cui potrebbe essere coinvolta la proteina CSB. Riguardo al gene *c-Fos* è stato riportato un meccanismo di regolazione secondo cui nei neuroni non stimolati dal calcio, la trascrizione del gene sarebbe repressa a causa del legame di un complesso HDAC in corrispondenza del promotore mediato dall'interazione con BRG1 che fa da ponte tra l'enzima ad attività deacetilasica e un sito Sp1 del promotore; quando il neurone è stimolato con il calcio, l'allontanamento del complesso HDAC rende accessibile il promotore da parte dell'RNA Polimerasi II e dei fattori di trascrizione per cui il gene passa ad uno stato trascrizionalmente attivo e viene espresso (Figura 34) [100]. Come si vede dalla schematizzazione, BRG1 non sembra perdere il suo legame con il promotore tra lo stato represso e quello attivo del gene, in accordo con il nostro dato della ChIP relativo alla cinetica di legame di BRG1 al promotore di MAP2, e sono coinvolti anche i complessi BAF.

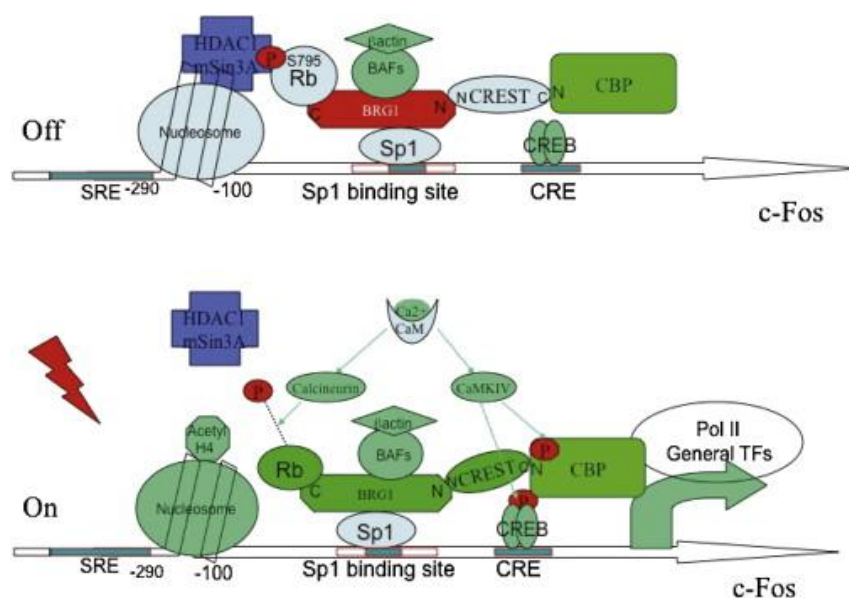


Fig. 34: Rappresentazione schematica del meccanismo di regolazione del gene c-Fos in cui sono coinvolti l'enzima HDAC1, i complessi BAF e BRG1 nella regolazione della trascrizione (Qiu Z. and Ghosh A. 2008)

L'ipotetico meccanismo di regolazione della trascrizione del gene MAP2 nei progenitori neurali avviati al differenziamento, si basa sui risultati da noi ottenuti negli esperimenti di ChIP ed è schematizzato in Figura 35.

Nei progenitori neuronali allo stato indifferenziato, che corrisponde a condizioni di crescita *in vitro* in cui sono presenti entrambi i fattori EGF ed FGF, il legame dell'enzima HDAC3 ad attività deacetilasi favorisce una conformazione chiusa della cromatina al livello del promotore del gene MAP2, contribuendo a reprimere la trascrizione del gene; nella regione a monte del sito di inizio della trascrizione del gene, potrebbe essere legato un complesso di rimodellamento della cromatina npBAF di cui, tra le altre subunità, farebbe parte BRG1, che dai risultati della ChIP risulta legato al promotore anche quando questo è trascrizionalmente inattivo.

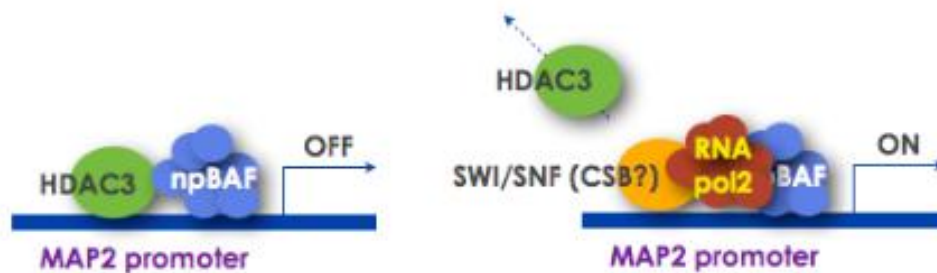


Fig. 35:Schematizzazione dell'ipotetico meccanismo molecolare di regolazione dell'espressione del gene MAP2 nei progenitori neuronali CSB competenti avviati al differenziamento, elaborato tenendo conto dei nostri risultati della ChIP.

Quando le cellule vengono avviate al differenziamento, la conformazione della cromatina al livello del promotore di MAP2 subisce una transizione verso uno stato aperto, grazie all'allontanamento dell'enzima HDAC3, e al legame di ulteriori fattori di rimodellamento della cromatina della famiglia SWI/SNF2, che in base ai nostri risultati della ChIP, potrebbe essere proprio la proteina CSB. Inoltre, il riassetto nella composizione in subunità del complesso BAF legato al promotore, secondo il procedere del differenziamento neuronale, contribuisce ulteriormente alla definitiva apertura della cromatina per cui il gene passa ad uno stato trascrizionalmente attivo. La regione a monte del inizio della trascrizione perciò diviene accessibile al complesso della RNA Polimerasi II e dei fattori di trascrizione per cui il gene viene attivamente espresso.

Quel che si può dedurre dai nostri risultati è che la notevole induzione di CSB durante il differenziamento e le evidenti conseguenze deleterie della sua deplezione sembrano indicare che la proteina CSB ha una funzione essenziale nel mantenimento dei progenitori neurali e nel processo di differenziamento neuronale.

6. MATERIALI E METODI

6.1 COLTURE CELLULARI

6.1.1 Matrice extracellulare (*coating*)

Per la crescita e il differenziamento in vitro dei progenitori neurali della linea ReNcell VM, come dimostrato aderente, è necessario depositare sul fondo delle normali fiasche e piastre da coltura, una matrice costituita da Poly-L-Ornitina e Laminina. Le due sostanze si presentano allo stato liquido e dopo essere state opportunamente diluite vengono lasciate a depositare sul fondo delle fiasche nell'incubatore a 37°C, per tempi che vanno da una a massimo 24 ore, prima una e dopo l'altra.

Procedura:

- 1) Utilizzare acqua sterile per diluire la poly-L-ornitina fino ad avere una concentrazione finale di 20 µg/ml
- 2) Applicare una quantità di poly-L-ornitina tale che il liquido ricopra in modo omogeneo tutta la superficie su cui si vogliono seminare e far crescere le cellule
- 3) Lasciare la superficie ricoperta di poly-L-ornitina in incubazione a 37 °C per circa 1 ora
- 4) Aspirare la poly-L-ornitina e lavare la superficie con acqua sterile
- 5) Utilizzare acqua sterile per diluire la laminina fino ad avere una concentrazione finale di 4 µg/ml
- 6) Applicare una quantità di laminina tale che il liquido ricopra in modo omogeneo tutta la superficie su cui si vogliono seminare e far crescere le cellule
- 7) Lasciare la superficie ricoperta di laminina in incubazione a 37 °C per 2 ore
- 8) Aspirare la laminina e lavare la superficie con acqua sterile

La superficie è ora pronta per la semina delle cellule

6.1.2. Terreno di crescita

Quantità per 500 ml di terreno

Reagente	Concentrazioni Stock	Volume	Concentrazione Finale
DMEM:F12 1:1 w/o L-Glutamine, pyridoxine	1x	482 ml	1x
GLUTAMAX I (100x)	200 mM	5 ml	2 mM
Eparina	5000 U/ml	1 ml	10 U/ml
B27 Supplement	50x	10 ml	1x
Gentamicina	50 mg/ml	0,5 ml	50 µg/ml
EGF	10µg/ml	1ml	20ng/ml
Beta FGF	10µg/ml	1 ml	20ng/ml

Al terreno viene aggiunta, al momento dell'utilizzo, l'antibiotico puromicina ad una concentrazione finale di 5 µg/ml, al fine di selezionare le cellule trasfettate con il vettore codificante l' shRNA, e mantenere così il silenziamento.

Per gli esperimenti di differenziamento, il protocollo prevede che tale terreno venga sostituito, al giorno 0, con uno mancante di EGF, e al giorno 3 con uno mancante sia di EGF che di FGF. In entrambi i casi la composizione del terreno è la stessa, mentre il volume del fattore di crescita sottratto viene sostituito con DMEM:F12.

6.2 Silenziamento genico mediante RNA interfering.

Per la generazione di una linea di progenitori silenziata per CSB e di una linea di controllo, due sottopopolazioni di cellule vengono trattate per la trasduzione con particelle lentivirali di due tipi: **a)** CSB shRNA Lentiviral Particles che portano al knockdown del gene CSB e **b)** Control shRNA Lentiviral Particles, che non portano alla degradazione di nessun mRNA cellulare noto; entrambe della Santa Cruz Biotechnology. La stessa procedura viene usata per entrambe le sottopopolazioni di cellule.

Procedura

- 1) Seminare in terreno di crescita completo, circa $1,5 \times 10^5$ cellule per ogni pozzetto di una piastra 6-well precedentemente trattata per il coating
- 2) Lasciare crescere le cellule fino a che venga raggiunta una densità cellulare di circa il 50% della superficie disponibile
- 3) Rimuovere il terreno dal pozzetto
- 4) Aggiungere circa 2 ml di terreno completo a cui è stata aggiunta la soluzione di Polybrene alla concentrazione finale di 5µg/ml
- 5) Prendere le criovials conservate a -80°C e scongelare le particelle lentivirali in esse contenute
- 6) Trasferire la soluzione di particelle lentivirali nel pozzetto contenente le cellule da infettare usando un po' del terreno in esso contenuto
- 7) Lasciare ad incubare le cellule overnight
- 8) Il giorno successivo rimuovere il terreno e sostituirlo con il normale terreno di crescita completo
- 9) Quando le cellule hanno raggiunto la confluenza si possono passare iniziando la selezione con l'antibiotico puromicina aggiunto nel terreno di crescita alla concentrazione desiderata.

6.3 Procedura di fissaggio per l'immunofluorescenza

Le cellule vengono seminate su vetrini copriorgetto inseriti ciascuno in un pozzetto di piastre 6-well, dopo essere stati sterilizzati con etanolo e su cui è stato fatto il coating di ornitina e laminina con la consueta procedura. Per i pozzetti di una 6-well il volume utilizzato per i vari passaggi è di 2 ml. Vengono seminate circa 2×10^5 cellule per pozzetto. Al momento dei fissaggi si procede seguendo la procedura riportata e si può lavorare sotto una normale cappa chimica.

- 1) Rimuovere il terreno dai pozzetti
- 2) 1 lavaggio in PBS (5 minuti in agitazione)
- 3) Fissaggio a temperatura ambiente in PBS/FORMALDEIDE 3% (10 minuti in agitazione)
- 4) 2 lavaggi in PBS (5 minuti in agitazione)
- 5) Permeabilizzazione con PBS/TRITON 0,5% (7 minuti in agitazione)
- 6) 2 lavaggi in PBS/TWEEN 0,5% (5 minuti in agitazione)
- 7) Controllare che le cellule siano ancora attaccate osservando al microscopio
- 8) Bloccaggio dei siti aspecifici con PBS/FBS 10% (1 hr in agitazione)
- 9) 2 lavaggi in PBS/TWEEN 0,5% (5 minuti in agitazione)
- 10) Diluire l'Ab 1° in PBS/FBS 10% in base alla concentrazione necessaria
- 11) Incubare 100uL di Ab 1° per vetrino a temperatura ambiente (1hr e 30 minuti). (Ciascun vetrino deve essere coperto da un pezzetto di parafilm appoggiato sopra delicatamente. Posizionare la piastra 6-well non completamente coperta col proprio coperchio in una cameretta umidificata per evitare l'essiccamento dei campioni).
- 12) 3 lavaggi in PBS/TWEEN 0,5% (5 minuti in agitazione)
- 13) Incubare 100uL di Ab 2° (1:400), diluito in PBS/FBS 10% (2 hr)
- 14) 4 lavaggi in PBS/TWEEN 0,5% (5 minuti in agitazione)
- 15) Deidratazione in agitazione
 - a. Etanolo 70% (3')
 - b. Etanolo 90% (3')
 - c. Etanolo 100% (3')
- 16) Rimuovere l'etanolo e far asciugare completamente i vetrini lasciando i pozzetti aperti sotto cappa
- 17) Preparare il DAPI (in Vectashild): a partire dallo stock alla concentrazione di 1mg/mL arrivare alla concentrazione di utilizzo di 0,2ug/mL facendo una diluizione intermedia (50X).
- 18) Lavare vetrini portaoggetto con etanolo 70% e asciugarli
- 19) Prelevare delicatamente dal pozzetto della 6-well, i vetrini coprioggetto con le cellule fissate, usando una pinzetta
- 20) Posizionare una goccia di DAPI/Vectashild (15-20 uL) al centro di uno dei vetrini portaoggetto lavati e far aderire il vetrino coprioggetto con le cellule. Durante la fase di montaggio dei vetrini aver cura di tenere i campioni al buio per preservare i fluorocromi.
- 21) Osservare al microscopio a fluorescenza

6.4 Western Blotting

Estrazione delle proteine totali con TPA buffer

Dopo aver scartato il terreno e aver staccato le cellule dalla superficie di coltura utilizzando il reagente Accutasi (una soluzione contenente enzimi proteolitici e collagenolitici), si centrifugano le cellule e si scarta il soprannatante per ottenere un pellet contenente le cellule intatte. Per l'estrazione delle proteine cellulari viene utilizzato il TPA Buffer 500 mM.

Reagente	Volumi per TPA 500 mM
HEPES 0.5 M	2 ml
GLICEROLO 100%	10 ml
NaCl 5M	5 ml
MgCl ₂ 1M	75µl
EDTA 0.25 M	20 µl
DTT 100 mM	500 µl
NP40 10%	500 µl
Pasticche PIC*	5
H ₂ O	31.5 ml
TOTALE	50 ml

* Proteinase Inhibitor Cocktail (Roche)

Procedura di estrazione delle proteine

- 1) Risospendere il pellet di cellule con un quantitativo di TPA Buffer (preparato fresco) proporzionale alla quantità di pellet ottenuto
- 2) Lasciare in incubazione in ghiaccio per 20 minuti per lasciar avvenire la lisi delle cellule
- 3) Centrifugare a 4 °C , a 11000 rpm per 15 minuti in centrifuga refrigerata
- 4) Prelevare il sopranatante, in cui si trovano le proteine estratte, e scartare il pellet (contenente i detriti cellulari)

Separazione delle proteine e analisi Western Blotting

Lisate le cellule con TPA buffer e misurate la concentrazione proteica con un kit che si avvale del saggio Bradford (BioRad), 50 µg di proteine vengono separate per elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE). Tramite elettroblotting le proteine vengono trasferite ad una membrana in PVDF (polivinilidenfluoruro) seguendo il protocollo standard. La membrana viene quindi incubata con PBS/Tween + latte in polvere, per il bloccaggio dei siti aspecifici, e successivamente viene messa ad incubare prima con l'anticorpo primario overnight e poi con quello secondario, quest'ultimo coniugato a HRP (horseradish peroxidase), per circa un ora. Fra le due incubazioni vengono eseguiti dei lavaggi con PBS/Tween. Il segnale viene rivelato grazie all'utilizzo di due reagenti in presenza dei quali la HRP emette chemiluminescenza, in grado di impressionare una lastra fotografica e mostrare su di essa le bande proteiche separate per elettroforesi, il tutto secondo il protocollo del produttore (Amersham).

6.5. RT-PCR

Scartato il terreno e staccate le cellule utilizzando accutasi, si centrifuga e si scarta il surnatante per ottenere un pellet contenente le cellule intatte.

A questo punto si estrae l'RNA totale, seguendo il protocollo del kit apposito (Qiagen). L'estratto di RNA totale è utilizzato per la sintesi del cDNA, corrispondente all'mRNA cellulare e ottenuto utilizzando oligo(dT), come da protocollo (Fermentas). Si prepara quindi la reazione per la RT-PCR, unendo i seguenti componenti:

- 1) Master Mix (12,5 µl)
- 2) Forward Primer (1 µl)
- 3) Reverse Primer (1 µl)
- 4) H₂O (5,5 µl)

A questa mix di reazione si aggiungono infine 5 µl di cDNA, direttamente nel pozzetto di reazione. L'analisi RT-PCR opera misurando la fluorescenza generata dall'interazione di DNA a doppia elica di nuova sintesi con il colorante SYBR Green. Per l'analisi si utilizza lo strumento Agilent 3500 P (Stratagene).

6.6 Chromatin Immuno Precipitation ChIP

Le cellule vengono *cross-linkate* con una soluzione di formaldeide all'1% per 10 minuti a temperatura ambiente. La reazione di *cross-linking* viene bloccata con l'aggiunta di glicina alla concentrazione finale di 125 mM. I campioni vengono sonicati per generare frammenti di DNA di lunghezza inferiore a 500 bp. Per le immunoprecipitazioni, 1 mg di estratto proteico viene pre-incubato per 2 ore con 50 µl di una sospensione al 50%, 50:50 tra proteine e biglie di sefarosio A / G, prima dell'aggiunta degli anticorpi indicati. Poi, 2 µg di anticorpo vengono aggiunti alla mix di reazione e lasciati incubare per una notte a 4 ° C in presenza di 50 µl di biglie A / G. Dopo una serie di lavaggi, gli immunocomplessi vengono eluiti due volte per 10 min a 65 ° C e il *cross-linking* viene contrastato con la soluzione a 200 mM di NaCl e 5 h di incubazione a 65 ° C. L'ulteriore digestione con la proteinasi K viene condotta per 2 ore a 42 ° C. Il DNA viene purificato usando colonne Qiagen (QIAquick kit di purificazione PCR). Il DNA immunoprecipitato viene quantificato *real time* PCR quantitativa. Le sequenze dei primer sono disponibili su richiesta

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Nance M.A. and Berry S.A. 1992. Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet.* 42, 68-84
- [2] Licht, C.L., Stevnsner, T., Bohr, V.A., 2003. Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 1217-12392.
- [3] Andrews A.D., Barrett S.F., et al. 1978 Cockayne's syndrome fibroblasts have increased sensitivity to ultraviolet light but normal rates of unscheduled DNA synthesis. *J. of Investigative Dermatology* 70, 237-239
- [4] van Hoffen A., Natarajan A.T., et al. 1993 Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. *Nucl Acids Res* 25; 21(25): 5890–5895
- [5] Lehmann A.R., Kirk-Belle S., Mayne L. 1979 Abnormal kinetics of DNA synthesis in ultraviolet light-irradiated cells from patients with Cockayne's syndrome. *Cancer Res* 39, 4237-4241
- [6] Mayne L.V. and Lehmann A.R. 1982 Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: an early defect in cells from individuals with Cockayne's syndrome and Xeroderma Pigmentosum. *Cancer Res* 42, 1473-1478
- [7] Stevnsner, T., Muftuoglu, M., Aamann M., D., et al. 2008. The role of Cockayne Syndrome group B (CSB) protein in base excision repair and aging. *Mech. Ageing Dev.* 129, 441-448
- [8] Weidenheim, K.M., Dickson, D.W., Rapin, I. 2009. Neuropathology of Cockayne syndrome: evidence for impaired development, premature aging and neurodegeneration. *Mech. Ageing Dev.* 130, 619-636.
- [9] Rapin I., Lindenbaum Y., Dickson D.W., et al.. 2000. Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum. *Neurology* 55, 1442-1449.
- [10] Troelstra C., van Gool A., de Wit J., et al., 1992. ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 71, 939-953
- [11] Christiansen M., Thorslund T., Jochimsen B., et al., 2005. The Cockayne syndrome group B protein is a functional dimer. *FEBS J.* 272, 4306-4314.
- [12] Lewis R., Durr H., Hopfner K.P., et al., 2008. Conformational changes of a Swi2/Snf2 ATPase during its mechano-chemical cycle. *Nucleic Acids Res.* 36, 1881-1890
- [13] Citterio E., Rademakers S., van der Horst G.T.J. et al 1998. Biochemical and biological characterization of wild-type and ATPase-deficient Cockayne syndrome B repair protein. *J. Biol. Chem.* 273, 11844–11851
- [14] Christiansen M., Stevnsner T, Modin C., et al. 2003. Functional consequences of mutations in the conserved SF2 motifs and post-translational phosphorylation of the CSB protein. *Nucleic Acids Res* 31, 963- 973
- [15] Tantin D., Kansal A., Carey M. 1997. Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol* 17, 6803-6814

- [16] van Gool AJ, van der Horst GT, Citterio E, et al 1997a. Cockayne syndrome: defective repair of transcription? *Embo J.* 16, 4155-4162
- [17] Bradsher J., Auriol J., Proietti de Santis L., (2002). CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol Cell* 10:819–829
- [18] Laugel V., Dalloz C., Durand M., et al. 2010. Mutation Update for the CSB/ERCC6 and CSA/ERCC8 genes involved in Cockayne Syndrome. *Human Mutation* 2, 113-126
- [19] Horibata K., Iwamoto Y., Kuraoka I., et al. 2004. Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product give rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 15410-15415
- [20] Lainé J.P. and Egly J.M. 2006. When transcription and repair meet: a complex system. *Trends Genet* 22, 430-436
- [21] Svejstrup J.Q. 2002. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 21-29
- [22] Foustieri M. and Mullenders L.H.F. 2008. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Research* 18, 73-84
- [23] Mellon I., et al. 1985. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* 51,241-249
- [24] Selby C.P., Witkin E.M., Sancar A. 1991. Escherichia Coli mfd mutant deficient in “mutation frequency decline” lacks strand-specific repair: in vitro complementation with purified coupling factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 11574-11578
- [25] van Gool A.J. et al. 1994. Rad26, the functional S.cerevisiae homolog of the Cockayne syndrome B gene ERCC6. *EMBO J.* 13, 5361-5369
- [26] Woudstra E.C., et al. 2002. A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNAPol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature* 415, 929-933
- [27] Svejstrup J.Q. 2002. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 21-29
- [28] Tu Y., Tornaletti S., and Pfeifer G.P. 1996 DNA repair domains within a human gene: selective repair of sequences near the transcription initiation site. *EMBO J.* 15, 675-683
- [29] Tu Y., Bates S., Pfeifer G.P. 1997. Sequence specific and domain-specific DNA repair in Xeroderma Pigmentosum and Cockayne syndrome cells. *J. Biol Chem* 15, 20747-20755.
- [30] McKay B.C., Chen F., Clarke S.T., et al. 2001. UV light-induced degradation of RNA polymerase II is dependent on the Cockayne’s syndrome A and B proteins but not p53 or MLH1. *Mutat Res* 485, 93-105
- [31] Ratner J.N., Balasubramanian B., Corden J., et al. 1998. Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem.* 273, 5184-5189.
- [32] Balajee A.S., May A., Dianov G.L., et al 1997. Reduced RNA Polymerase II transcription in intact and permeabilized Cockayne syndrome group B cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 4306-4311.
- [33] Selby C.P. and Sancar A. Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 11205-11209.

- [34] Rockx D.A.P., Mason R., van Hoffen A., et al. 2000. UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA polymerase II. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 10503-10508.
- [35] Vichi P., Coin F., Renaud J.P., et al. 1997. Cisplatin and UV-damaged DNA lure the basal transcription factor TFIID/TBP. *EMBO J.* 16, 7444-7456.
- [36] van Oosterwijk M.F., Versteeg A., Filon R., et al. 1996. The sensitivity of Cockayne's syndrome cells to DNA damaging agents is not due to defective transcription-coupled repair of active genes. *Mol. Cell Biol* 16, 4436-4444.
- [37] Balajee A.S., Dianova I., Bohr V.A., 1999. Oxidative damage-induced PCNA complex formation is efficient in xeroderma pigmentosum group A but reduced in Cockayne syndrome group B cells. *Nucleic. Acids Res* 27, 4476-4482
- [38] Stevnsner T., Muftuoglu M., Aamann M.D., et al. 2008. The role of Cockayne syndrome group B protein in base excision repair and aging. *Mech. Age. Dev.* 129, 441-448
- [39] Dianov G., Bischoff C., Sunesen M., et al., 1999. Repair of 8-oxoguanine in DNA is deficient in Cockayne syndrome group B cells. *Nucleic Acids Res* 27, 1365-1368
- [40] Tuo J., Jaruga P., Rodriguez H., et al. 2002b. The Cockayne syndrome group B gene product is involved in cellular repair of 8-hydroxyadenine in DNA. *J. Biol. Chem.* 277, 30832-30837
- [41] Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. 1995. Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1271, 165-170
- [42] Stevnsner T., Nyaga S., de Souza-Pinto N.C., et al. 2002. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. *Oncogene* 21, 8675-8682
- [43] Tuo J., Chen C., Zeng X., et al., 2002a. Functional crosstalk between hOgg1 and helicase domain of Cockayne syndrome group B protein. *DNA Repair* 1, 913-927
- [44] Thorslund T., von Kobbe C., Harrigan J.A., et al. 2005. Cooperation of the Cockayne syndrome group B protein and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in the response to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 25, 76625-7636
- [45] Wong H.K., Muftuoglu M., Beck G., et al. 2007. Cockayne syndrome B protein stimulates apurinic endonuclease 1 activity and protects against agents that introduce base excision repair intermediates. *Nucleic Acids Res.* 35, 4103-4113
- [46] Kathe S.D., Shen G.P., Wallace S.S., 2004. Single-stranded breaks in DNA but not oxidative DNA base damages block transcription elongation by RNA polymerase II in HeLa cell nuclear extracts. *J. Biol. Chem.* 279, 18511-18520
- [47] Kuraoka I., Endou M., Yamaguchi Y., et al. 2003. Effects of endogenous DNA base lesions on transcription elongation by mammalian RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair and transcriptional mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 7294-7299
- [48] Henning KA, Li L, Iyer N, et al., 1995. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF. *Cell* 82:555-564
- [49] Kamiuchi S, Saijo M, Citterio E, et al., 2002. Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 201-206

- [50] Bradsher J, Auriol J, Proietti de Santis L, 2002. CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol Cell* 10:819–829
- [51] van Gool AJ, Citterio E, Rademakers S, 1997a. The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. *Embo J* 16:5955–5965
- [52] Ljungman M. and Lane D.P. 2004. Transcription – guarding the genome by sensing DNA damage. *Nature Rev. Cancer* 4, 727-737
- [53] McKay, B. C., Ljungman, M. & Rainbow, A. J. 1998. Persistent DNA damage induced by ultraviolet light inhibits p21wAF1 and bax expression: implications for DNA repair, UV sensitivity and the induction of apoptosis. *Oncogene* 17, 545–555
- [54] de Boer, J. *et al.* 2002. Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science* 296, 1276–1279
- [55] O'Hagan, H. M. & Ljungman, M. 2004. Phosphorylation and nuclear accumulation are distinct events contributing to the activation of p53. *Mutat. Res.* 546, 7–15
- [56] Conforti, G., Nardo, T., D'Incalci, M. *et al.* 2000. Proneness to UV-induced apoptosis in human fibroblasts defective in transcription coupled repair is associated with the lack of Mdm2 transactivation. *Oncogene* 19, 2714–2720
- [57] Rubbi, C. P. & Milner, J. 2003. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J.* 22, 6068–6077
- [58] Stommel, J. M. *et al.* 1999. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* 18, 1660–1672
- [59] Zhang, Y. P. & Xiong, Y. 2001. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 292, 1910–1915
- [60] McKay B.C., Stubbert J.L., Fowler C.C., *et al.* 2004 Regulation of ultraviolet light-induced gene expression by gene size. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 6582-6586.
- [61] Ljungman M. and Zhang F. 1996 Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for UV light induced apoptosis. *Oncogene* 13, 823-831.
- [62] Balajee A.S., Proietti De Santis L., Brosh R.M., *et al.* 2000 Role of the ATPase domain of the Cockayne syndrome group B protein in UV induced apoptosis. *Oncogene* 19, 477-489
- [63] Proietti De Santis L., Balajee A.S., Lorenti garcia C., *et al.* 2003 Inhibition of p53, p21 and Bax by pifithrin- α does not affect UV induced apoptotic response in CS-B cells. *DNA Repair* 2, 891-900.
- [64] Latini P., Frontini M., Caputo M., *et al.* 2011. CSA and CSB proteins interact with p53 and regulate its Mdm2-dependent ubiquitination. *Cell Cycle* 21, 3719-3730
- [65] Proietti De Santis L., Dranè P. and Egly J.M. 2006. Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. *EMBO J.* 25, 1915-1923
- [66] Filippi S., Latini P., Frontini M., *et al.* 2008. CSB protein is (a direct target of HIF-1 and) a critical mediator of the hypoxic response. *EMBO J.* 27, 2545-2556
- [67] Brooks P.J., Tsu-Fan Cheng, Cooper L. 2008. Do all the neurologic diseases in patients with DNA repair gene mutations results from the accumulation of DNA damage? *DNA Repair* 7, 834-848

- [68] Compe E., Malerba M., Soler L., et al. 2007. Neurological defects in TTD reveal a coactivator function of TFIIH. *Nat. Neurosci.* 10, 1414-1422
- [69] Newman J.C., Bailey A.D. and Weiner A.M. 2006. Cockayne syndrome group B protein (CSB) plays a general role in chromatin maintenance and remodeling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 9613-9618
- [70] Weidenheim K.M., Dickson D.W. and Rapin I. 2009. Neuropathology of Cockayne syndrome: evidence for impaired development, premature aging, and neurodegeneration. *Mech. Age. and Dev.* 130,619–636
- [71] Del Bigio, M.R., Greenberg, C.R., Rorke, L.B. et al. 1997. Neuropathological findings in eight children with cerebroculo-facio-skeletal COFS syndrome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 1147–1157.
- [72] Itoh, M., Hayashi, M., Shioda, K. et al. 1999. Neurodegeneration in hereditary nucleotide repair disorders. *Brain Dev.* 21, 326–333.
- [73] Rapin, I., Weidenheim, K., Lindenbaum, Y., et al. 2006. Cockayne syndrome in adults: review with clinical and pathologic study of a new case. *J. Child Neurol.* 21, 991–1006.
- [74] Hayashi, M., Araki, S., Kohyama, J., et al. 2005. Oxidative nucleotide damage and superoxide dismutase expression in the brains of xeroderma pigmentosum group A and Cockayne syndrome. *Brain Dev.* 27, 34–38.
- [75] Benarroch, E.E., 2009. Oligodendrocytes: susceptibility to injury and involvement in neurologic disease. *Neurology* 72, 1779–1785.
- [76] Smits, M.G., Gabreels, F.J., Renier, W.O., et al. 1982. Peripheral and central myelinopathy in Cockayne's syndrome. Report of 3 siblings. *Neuropediatrics* 13, 161–167.
- [77] Pasquier, L., Laugel, V., Lazaro, L., et al. 2006. Wide clinical variability among 13 new Cockayne syndrome cases confirmed by biochemical assays. *Arch. Dis. Child.* 91, 178– 182.
- [78] Levin, P.S., Green, W.R., Victor, D.I. et al 1983. Histopathology of the eye in Cockayne's syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 101, 1093–1097.
- [79] Hayashi, M., 2009. Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology* 29, 1–8.
- [80] Laposa R.R., Huang E.J., Cleaver J.E. 2007. Increased apoptosis, p53 up-regulation, and cerebellar neuronal degeneration in repair-deficient Cockayne syndrome mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 1389-1394
- [81] Reynolds BA, Weiss S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255, 1707-1710.
- [82] Vescovi A.L., Parati E.A., Gritti A., et al. 1999. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol*, 156, 71-83.
- [83] De Filippis L., Lamorte G., Snyder E.Y., et al. 2007. A novel, immortal and multipotent human neural stem cell line generating functional neurons and oligodendrocytes. *Stem Cell* 25, 2312-2321.

- [84] Hoffrogge R., Mikkat S., Scharf C., et al. 2006. 2-DE proteome analysis of a proliferating and differentiating human neuronal stem cell line (ReNcell VM). *Proteom.* 6, 1833-1847
- [85] Donato R., Miljan E. A., Hines S.J., et al. 2007. Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC Neuosc.* 8:36
- [86] Carlessi I., De Filippis L., Lecis D., et al. 2009. DNA-damage response, survival and differentiation *in vitro* of human neural stem cell line in relation to ATM expression. *Cell Death and Diff.* 16, 795-806
- [87] Scholzen, T. and Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol.* 182, 311-22.
- [88] Xue X.J. and Yuan X. 2010. Nestin is essential for mitogen stimulated proliferation of neural progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosc.* 45, 26-36.
- [89] Frontini M and Proietti De Santis L. 2012. Interaction between the Cockayne syndrome B and p53 proteins: implication for aging. *Aging.* 4, 89-97
- [90] Catsicas, S., Thanos, S., Clarke, P.G., et al. 1987. Major role for neuronal death during brain development: refinement of topographical connections. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84, 8165–8168.
- [91] Nicotera P., 2002. Development and death of neurons: sealed by a common fate? *Cell Death Differ.* 12, 1277-8.
- [92] Katsetos, C.D., Legido, A., Perentes, E., et al. 2003. Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J. Child Neurol.* 18, 851-66.
- [93] Dehmelt. L., Halpain, S., 2004. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 6, 204.
- [94] Roger, B., Al-Bassam, J., Dehmelt, et al. 2004. MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. *Curr Biol.* 14, 363-71.
- [95] Shafit-Zagardo, B., Kalcheva, N., 1998. Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron. *Mol Neurobiol.* 16, 149-62.
- [96] Condeelis J., 1993. Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9, 411-444
- [97] Riccio A. 2010. Dynamic epigenetic regulation in neurons: enzymes, stimuli and signaling pathways. *Nat. Neurosci.* 13, 1330-1337
- [98] Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A., et al. 2007. An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron* 55,201-215.
- [99] Lena H. and Crabtree G.R. 2010. Chromatin remodeling during development. *Nature.* 463, 474-484
- [100] Qiu Z. and Ghosh A. 2008. A Calcium-dependent switch in a CREST-BRG1 complex regulates activity-dependent gene expression. *Neuron* 60, 775-787.