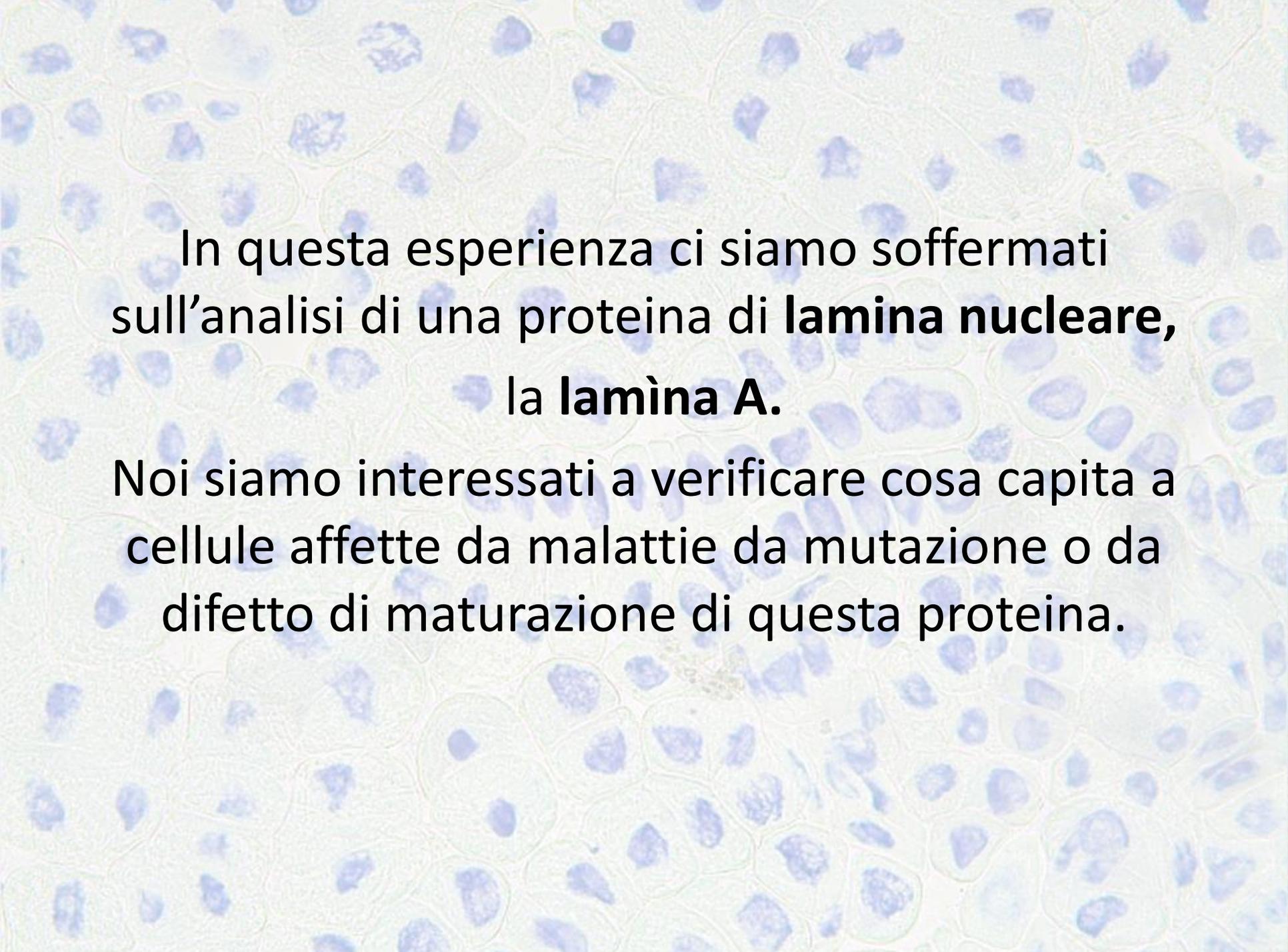
A microscopic image showing several plant cells, likely from a leaf or stem, stained with a purple dye. The cells are roughly circular or oval in shape and are arranged in a somewhat regular pattern. The purple staining highlights the cell walls and internal structures, including what appears to be the nucleus and other organelles. The overall appearance is that of a cross-section of plant tissue under a light microscope.

Analisi della Lamina A e Danno al DNA

A microscopic image of a tissue section, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image shows numerous cells with prominent, dark blue nuclei and lighter, pinkish cytoplasm and extracellular matrix. The cells are arranged in a somewhat organized pattern, possibly representing a specific tissue type or a cell culture. The background is a light, pale color, and the overall appearance is that of a histological slide.

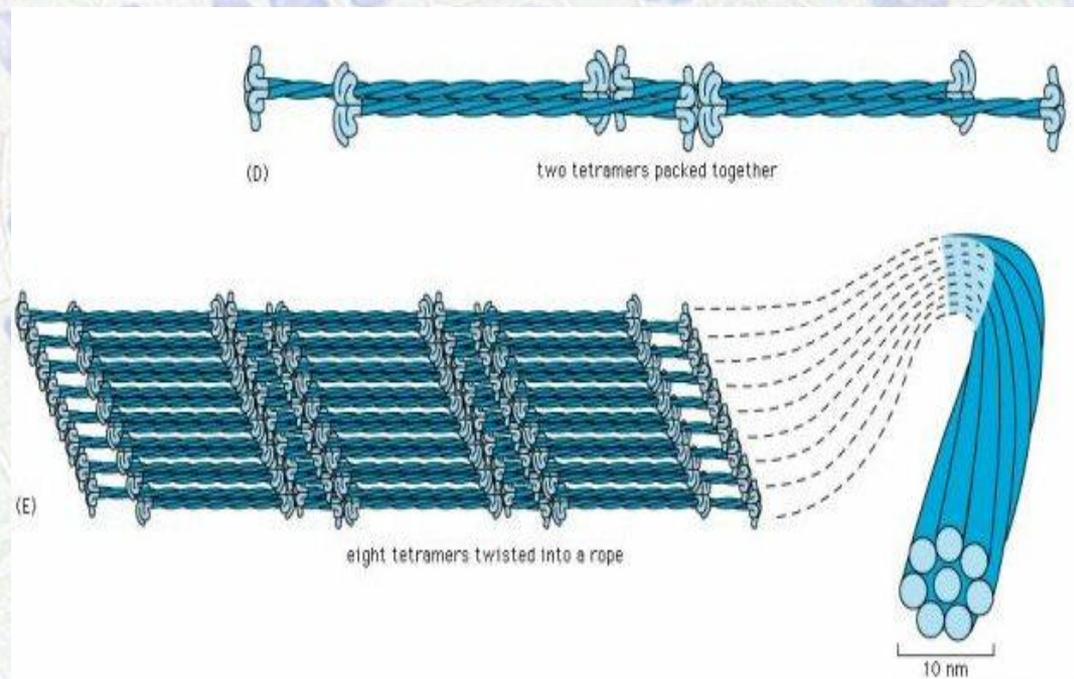
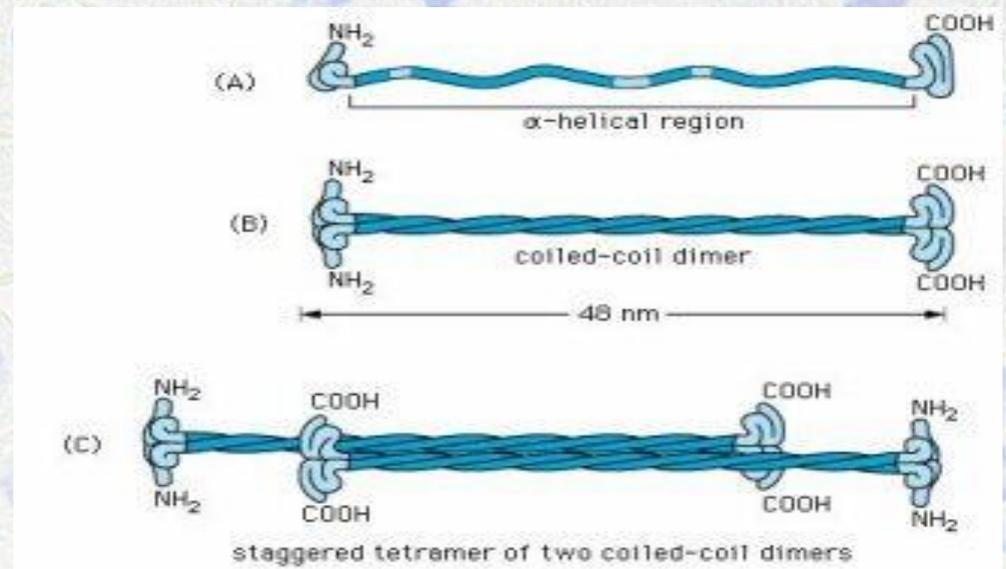
In questa esperienza ci siamo soffermati
sull'analisi di una proteina di **lamina nucleare**,
la **lamina A**.

Noi siamo interessati a verificare cosa capita a
cellule affette da malattie da mutazione o da
difetto di maturazione di questa proteina.

Premettiamo alcune informazioni generali sulla **lamina nucleare**: essa è un sottile strato di filamenti intermedi costituiti da polimeri di lamine A, C e B, situata sul lato interno della membrana nucleare.

Essa fornisce ancoraggio alla cromatina e funge da sostegno meccanico per il nucleo.

Inoltre fa da ponte tra quest'ultimo e il citoscheletro attraverso le proteine integrali di membrana nucleare.

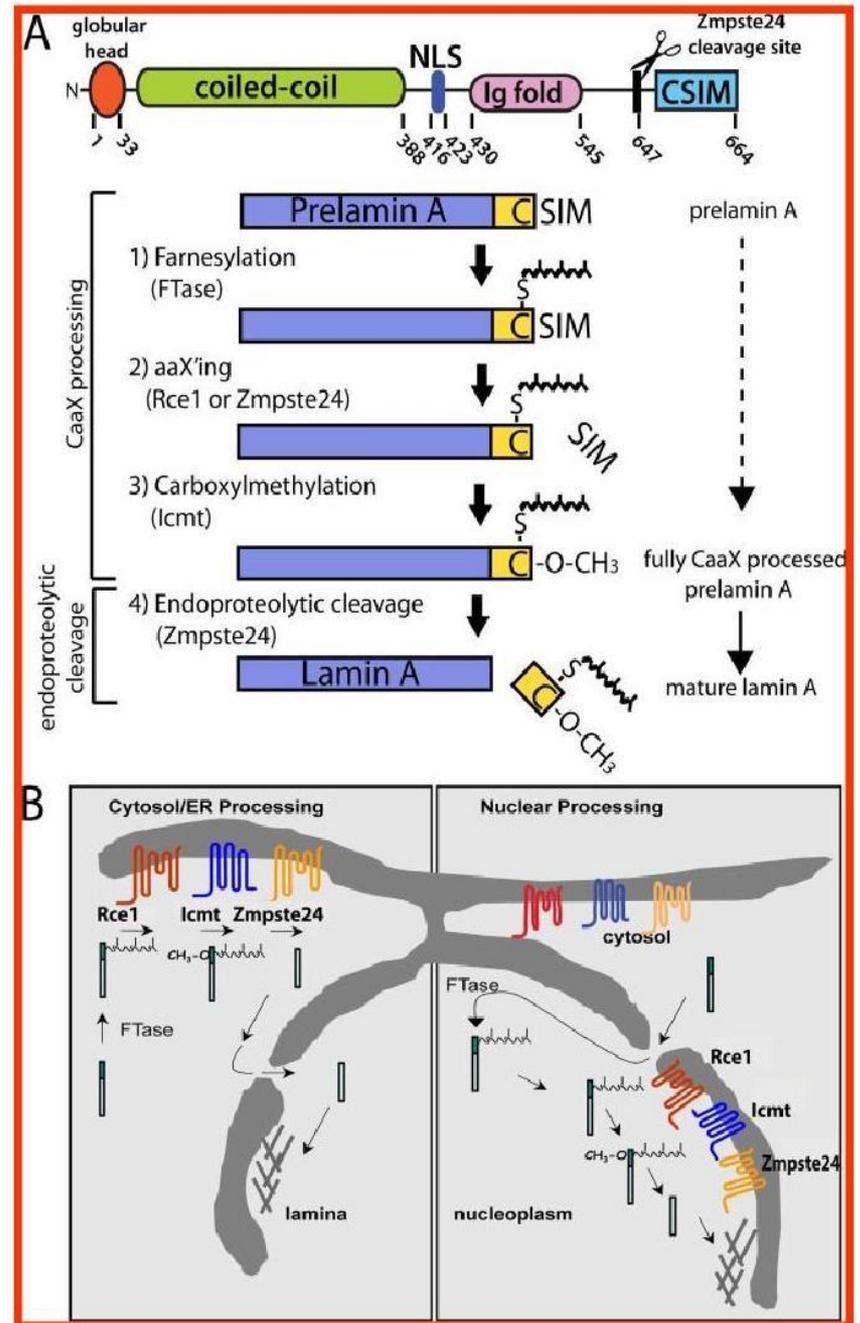


Qual è la corretta maturazione della lamina A ?

Nel nucleo viene codificato il gene della lamina A, nel citoplasma viene tradotta la proteina che subisce questi passaggi di maturazione.

Nel primo entra in gioco l'enzima **farnesiltransferasi**, che attacca un gruppo farnesile al residuo di cisteina; nel secondo una **proteasi** che elimina il gruppo AAX, nel terzo una **carbossiltransferasi** che metila la coda COOH.

Infine, nel quarto, la proteasi **Zmpste24** taglia nel residuo corrispondente al 15° aminoacido a monte della cisteina



Nel caso in cui la lamina A non subisca tutti questi passaggi a causa di una mutazione sul gene o per il malfunzionamento di uno degli enzimi che partecipa alla sua maturazione, si forma una lamina A immatura, ***prelamina***.

Le malattie conseguenti ad un difetto della lamina A, sono comprese nelle Laminopatie. In alcune di esse si verifica un accumulo di prelamina, tra queste ricordiamo:

- HGPS: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome
- RD: Restrictive Dermopathy
- MAD: Mandibuloacral Dysplasia

L'incidenza di queste malattie è scarsa, infatti sono classificate come "*RARE*":

- HGPS: incidenza di 5 persone su 100 000 000
- RD: in Europa sono stati documentati 30 casi
- MAD: in Europa sono stati documentati 37 casi

HGPS (Progeria)

Si manifesta in seguito a mutazione puntiforme del gene della lamina A in posizione 1824C. Per questo motivo, durante il processo di maturazione della proteina, l'enzima Zmpste24 non effettua il taglio degli ultimi 15 aminoacidi più il gruppo farnesile.

La prelamina che si accumula è farnesilata carbossimetilata.

Il paziente presenta invecchiamento precoce, visibile assottigliamento della pelle, difetto di crescita, osteoporosi, aterosclerosi avanzata, cardiopatia e va incontro a morte nei primi vent'anni di vita.

RD

La Dermopatia Restrittiva è causata da una mutazione dell'enzima ZMPSTE24 che lo rende inattivo, anche in questo caso il taglio finale dei 15 aminoacidi più il gruppo farnesile non avviene e la prelamina che si accumula è farnesilata carbossimetilata.

La mutazione di questo enzima può essere accompagnata da quella sul gene della lamina A.

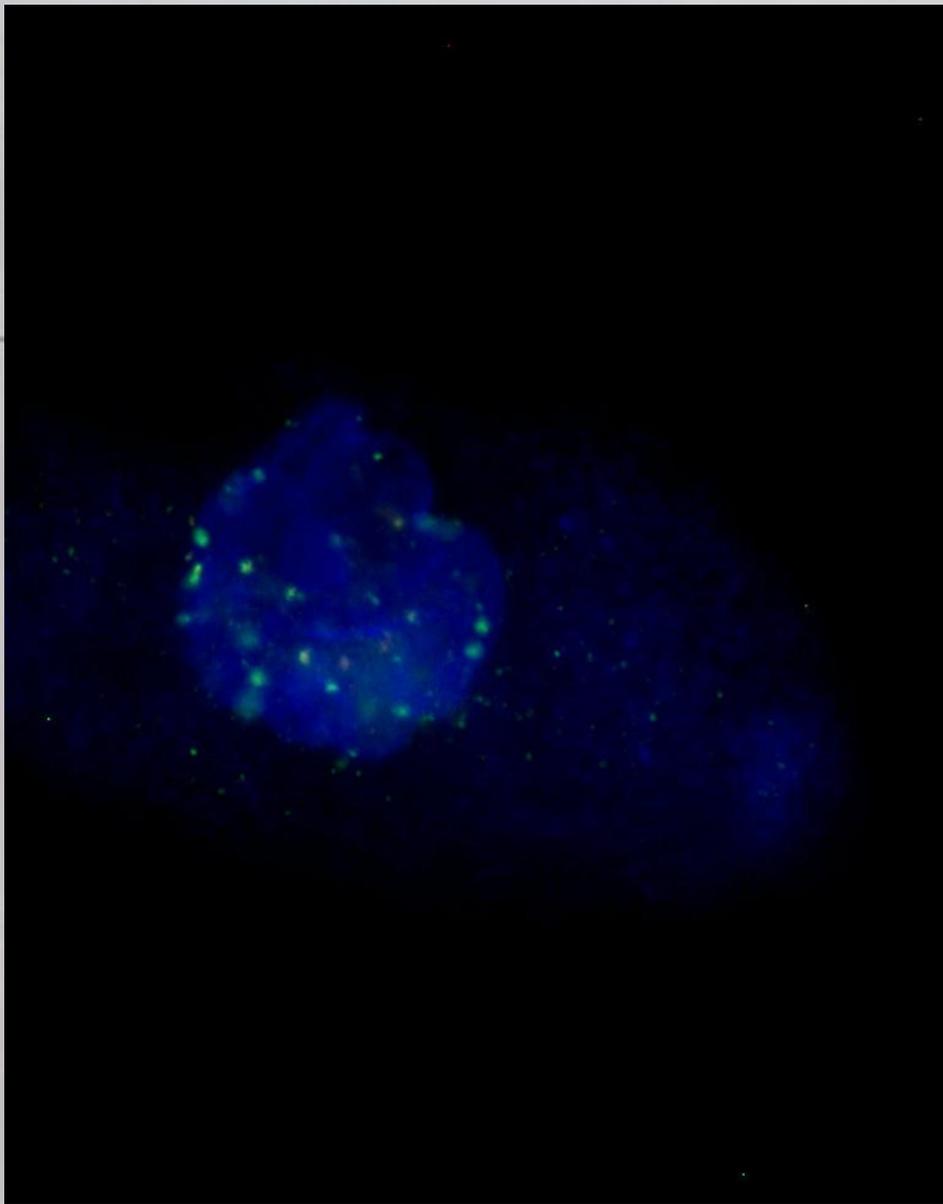
Il paziente presenta una patologia simile, ma più grave rispetto alla progeria, infatti muore nel primo anno di vita.



Sono stati fatti svariati studi su fibroblasti di paziente per approfondire le cause di queste patologie.

Si è potuto verificare che su queste cellule, proporzionalmente al numero di cicli cellulari e all'età del paziente, si accumula prelamina.

Sui fibroblasti di paziente è presente anche un evidente danno al DNA.



Foci di yH2AX (siti di danno al DNA) in fibroblasto di HGPS. ■ yH2AX ■ DNA

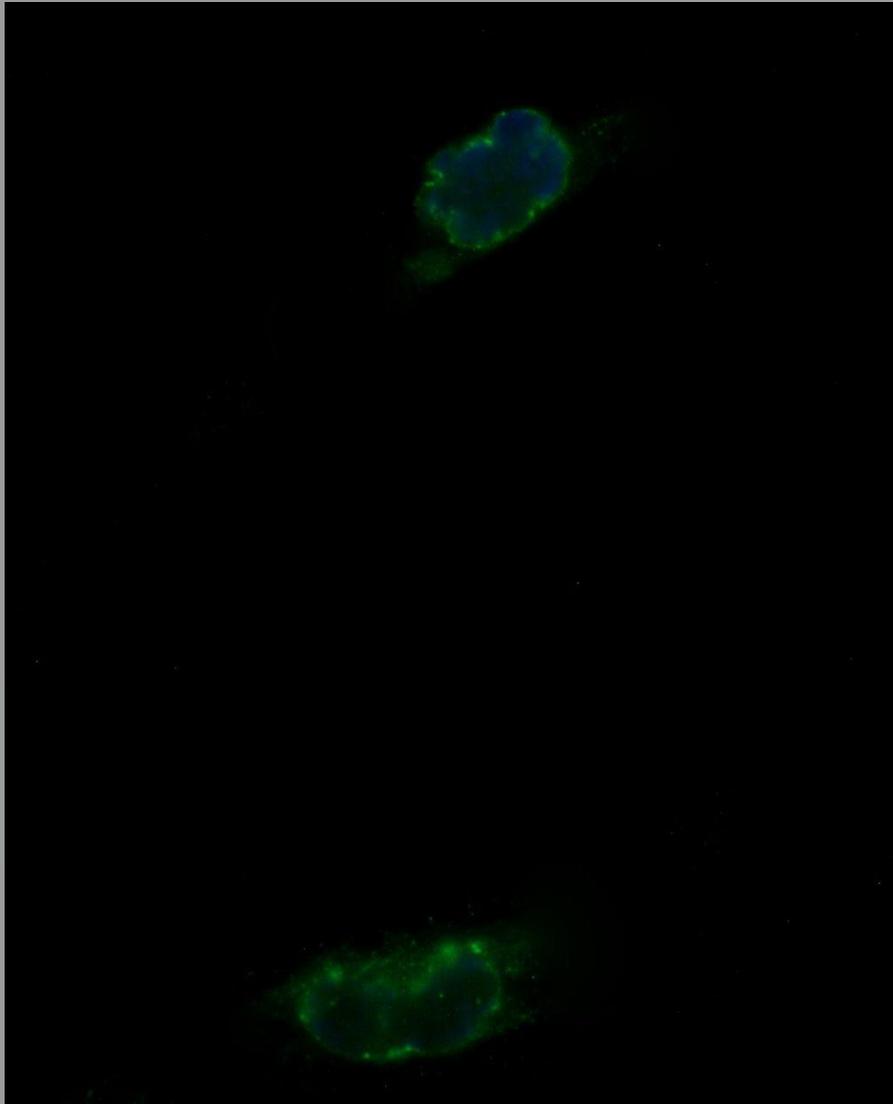
Nell'individuo sano, il danno al DNA dà una risposta di arresto del ciclo cellulare ad opera della P53, proteina oncosoppressore.

In questa fase si ha il reclutamento di proteine riparatrici del danno: ATM, ATR, 53BP1, PK, che intervengono nei siti dove il DNA è danneggiato. In questi siti (foci) avviene anche la fosforilazione della variante istonica H2AX (yH2AX).

Sappiamo che 53 Binding Protein 1 aumenta l'attività trascrizionale di P53. Sappiamo che 53BP1 ha un dominio di legame per yH2AX: infatti i due colocalizzano nei foci.

Se il danno viene riparato la cellula riprende il suo ciclo.

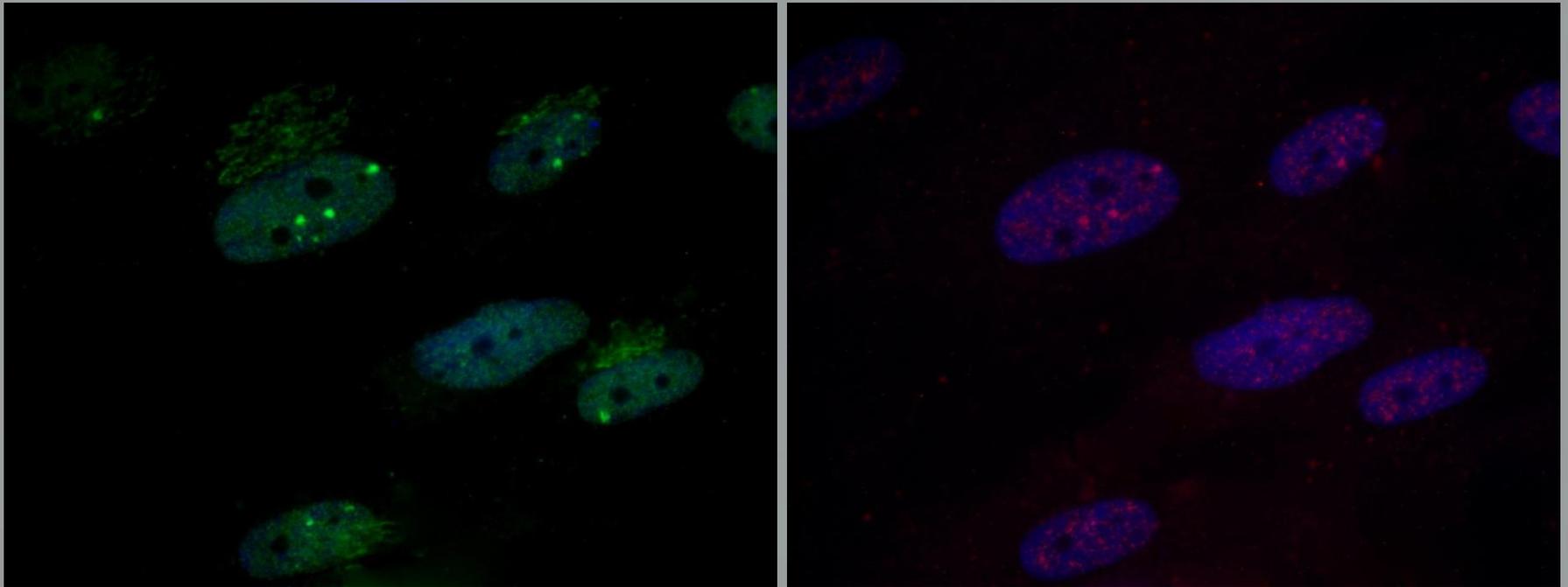
Il nostro lavoro è stato indirizzato allo studio immunocitochimico in immunofluorescenza della proteina riparatrice 53BP1 in relazione al danno del DNA, su fibroblasti cutanei di pazienti affetti da progeria (Hutchinson-Gilford progeria syndrome), che precedentemente erano stati sottoposti a vari cicli cellulari.



 Prelamina  DNA

Abbiamo messo in evidenza la presenza di prelamina nei fibroblasti del paziente usando un anticorpo specifico (anti-prelamina A) ottenuto in goat e ad esso abbiamo legato un secondo anticorpo (anti-goat) coniugato con un fluorocromo (isotiocianato di fluoresceina).

Successivamente siamo andati a studiare la localizzazione di 53BP1 e H2AX con anticorpi specifici, nei fibroblasti cutanei sottoposti a raggi ultravioletti

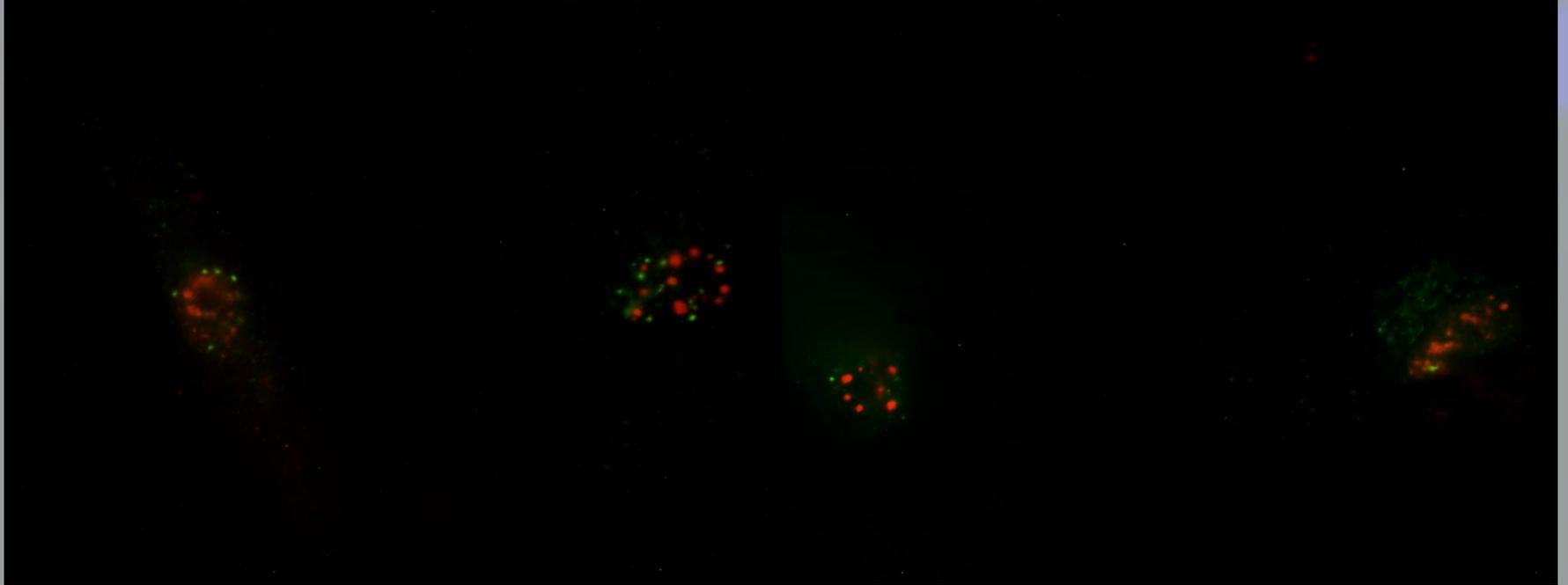


Fibroblasti di individuo sano : 53BP1 e H2AX colocalizzano

■ 53BP1

■ γ H2AX

■ DNA

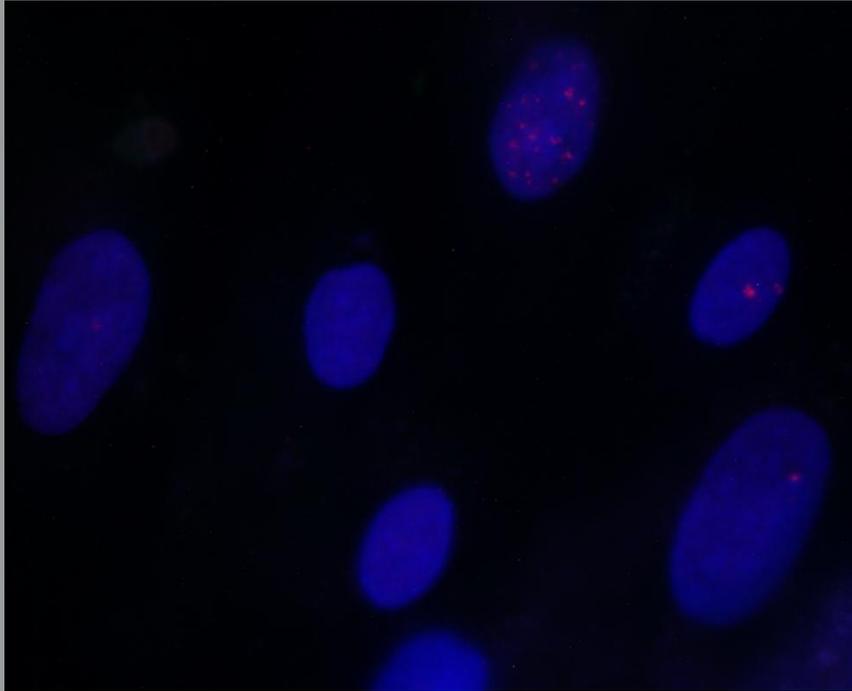


Fibroblasti di individuo affetto da progeria: 53BP1 e H2AX non colocalizzano

■ 53BP1

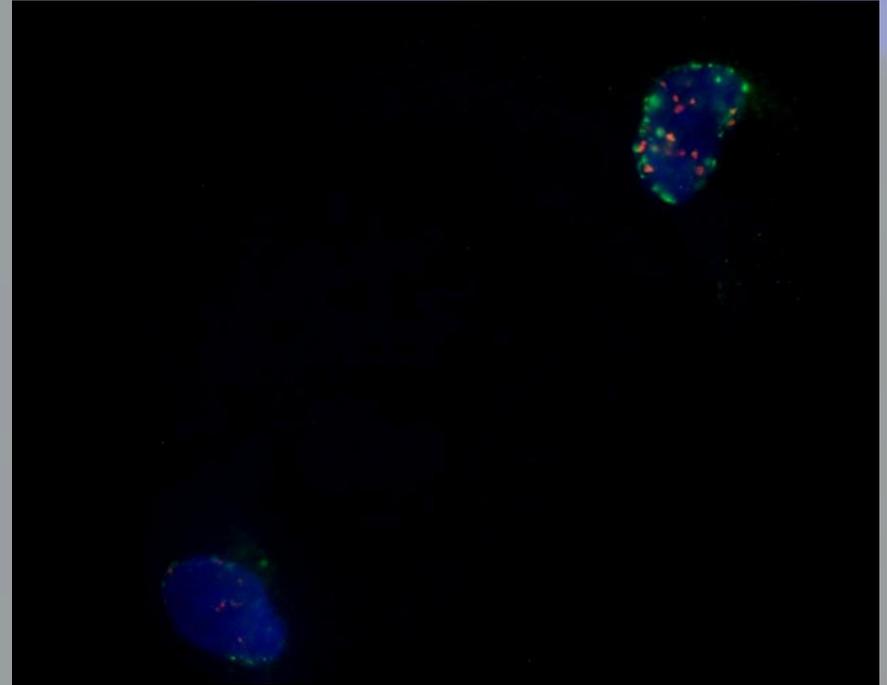
■ γ H2AX

Abbiamo anche voluto verificare la presenza di prelamina in relazione alla 53BP1 nella situazione di non esposizione al danno.



Fibroblasti sani (senza prelamina)

 Prelamina  53BP1  DNA



Fibroblasti di individuo affetto da progeria

Nelle cellule di paziente c'è un maggiore reclutamento di 53BP1 rispetto all'individuo sano. Nella maggior parte di queste cellule è presente la prelamina. Nelle stesse abbiamo già visto una delocalizzazione dei foci di γ H2AX rispetto a quelli di 53BP1.

Conclusione

Infatti queste cellule non riparano facilmente il danno al DNA e ce lo testimonia la non colocalizzazione di 53BP1 e γ H2AX.

Esse non riprendono il ciclo cellulare ed entrano in una fase di senescenza.

Ciò è in accordo con uno degli aspetti fenotipici principali del paziente, l'invecchiamento precoce.

Possiamo supporre che in presenza di prelamina, la funzione di 53BP1, una delle proteine riparatrici del danno a DNA, non sia svolta.