



Titolo del progetto:

Possibili approcci terapeutici nella patologia dell'Atassia Telangiectasia

Responsabili scientifici:

Dott. Alfredo Brusco e Dott.ssa Simona Cavalieri

Indirizzo:

Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, via Santena 19, 10126 Torino, Tel. 011.6706664, Fax. 011.6706582, e-mail: alfredo.brusco@unito.it

Istituto ospitante:

Dipartimento di Genetica Biologia e Biochimica Università degli Studi di Torino

Direttore: Prof. Albero Piazza



Prima parte

Le patologie neurodegenerative sono caratterizzate da una progressiva disfunzione e morte delle cellule nervose. I meccanismi alla base della neurodegenerazione sono fondamentalmente due: apoptosi e necrosi. Tra le cause che maggiormente contribuiscono alla morte delle cellule nervose ci sono fattori genetici, difetti nel trasporto e nel metabolismo del sodio e del calcio intracellulari, difetti nel funzionamento dei mitocondri, produzione di citochine infiammatorie ed endotossine e stress ossidativo causato dall'accumulo di elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS). A livello endogeno, le fonti principali di produzione dei ROS sono i processi metabolici (durante il processo di fosforilazione ossidativa mitocondriale, come prodotti intermedi durante la formazione di ATP), e processi patologici quali l'infiammazione. A livello esogeno invece sono prodotti da radiazioni ionizzanti o sostanze radiomimetiche.

I ROS sono costantemente prodotti dalle cellule e i livelli fisiologici dei ROS sono fondamentali nella regolazione di diversi "pathway" cellulari quali ad esempio la regolazione dell'espressione genica. Al contrario, un'eccessiva produzione di queste molecole porta la cellula ad un continuo stato di stress ossidativo causando un danno molecolare a livello del DNA, di proteine e lipidi che la cellula stessa non è più in grado di correggere attraverso i normali meccanismi di riparazione intracellulari.

Numerosi studi condotti negli ultimi anni evidenziano come lo stress ossidativo sia associato a diverse patologie causate da danno nei meccanismi di riparazione del DNA, tra le quali l'Atassia Telangiectasia (AT).

Nel caso dell'AT, l'inattivazione della proteina ATM che ha la funzione di trasduttore in grado di mediare la risposta al danno al DNA può portare all'accumulo nella cellula di DNA danneggiato e all'alterazione dell'equilibrio ossido-reduttasico. In cellule di pazienti AT, l'espressione basale di numerose molecole (quali p53, NFkB, eme-ossigenasi, catalasi e manganese superossido dismutasi) coinvolte nella risposta al danno ossidativi nei diversi distretti cellulari risulta costitutivamente elevata.



Ad oggi, il preciso meccanismo attraverso il quale la proteina ATM interviene nel controllo dei livelli di ROS e dello stress ossidativo non è ancora chiaro. Tuttavia si pensa che possa agire sia in modo diretto che indiretto. A livello indiretto, ATM potrebbe regolare l'espressione di geni che codificano per enzimi coinvolti nei processi antiossidanti (quali le catalasi) o modificarne la loro attività enzimatica attraverso processi post traduzionali. La regolazione dello stato ossido-reduttasico delle cellule avviene principalmente nel citoplasma. Mentre ATM è collocata in maggior percentuale nel nucleo delle cellule in continua divisione, a livello delle cellule già differenziate (quali quelle del sistema nervoso) essa è presente in un grossa frazione nel citoplasma. Tra le cellule del sistema nervoso maggiormente sensibili ad elevati livelli di ROS ci sono le cellule di Purkinjie del cervelletto in cui la frazione citoplasmatica di ATM è particolarmente elevata. In pazienti AT, infatti la neurodegenerazione è soprattutto a carico delle cellule del cervelletto. Inoltre è dimostrato che pazienti AT presentano anche a livello plasmatico ridotte capacità antiossidanti rispetto a controlli normali e che in topi ATM $-/-$ la regolazione dei ROS attraverso ATM è essenziale per una corretta risposta ai DSBs (danno alla doppia elica del DNA) in cellule del sistema ematopoietico.

Negli ultimi anni, gli studi si sono focalizzati sulla ricerca di possibili molecole terapeutiche mirate alla regolazione dell'omeostasi cellulare e dei sistemi ossido-reduttasici della cellula in grado di diminuire i fenomeni neurodegenerativi e di senescenza precoce che rappresentano una delle caratteristiche più gravi e complesse del fenotipo clinico. Tra le patologie studiate vi sono diverse patologie neurodegenerative, quali il morbo di Parkinson, l'Alzheimer, la corea di Huntington e l'Atassia di Friedreich,.

Ad oggi, nell'Atassia Telangiectasia non esiste una terapia in grado di arrestare la progressione dell'atassia e revertire il fenotipo patologico. L'introduzione di farmaci antiossidanti, quali vitamina E, vitamina C, N-acetilcisteina e acido alfa-lipoico nella dieta dei pazienti AT si è dimostrata solo una terapia palliativa capace di alleviare alcuni dei sintomi neurologici più gravi.



Nel 2007, presso l'Ospedale "Johns Hopkins" di Baltimora (MA, USA) è stato condotto un trial clinico dal Dr. Lederman e collaboratori su pazienti AT adolescenti ed adulti: è stato somministrato ai pazienti acido Alfa-Lipoico e nicotinammide (ovvero un inibitore della poli-ADP riboso polimerasi). Il primo obiettivo è stato quello di valutare, a seguito del trattamento, la variazione di importanti marcatori di stress ossidativo nelle urine e nel sangue. Secondariamente sono state monitorate le funzioni neurologiche e polmonari per verificare l'assenza di tossicità delle molecole utilizzate. I 17 pazienti partecipanti al trial clinico sono stati sottoposti a 10 visite in un periodo di 9 mesi e in 14 di essi sono stati notati significativi miglioramenti per diversi marcatori cellulari di stress ossidativo oltre che di alcuni parametri neurologici (tremore, tono muscolare) e polmonari.

Accanto a questi studi, sono stati condotti trials preclinici su topi ATM $-/-$ con lo scopo di testare le capacità antiossidanti dei nitrossidi, in particolare di una sostanza nota come CTMIO. I nitrossidi agiscono con modalità affini alle Superossido dismutasi. In esperimenti condotti su topi AT, la somministrazione intraperitoneale di questo antiossidante ha determinato un aumento della sopravvivenza delle cellule neuronali del Purkinje nel cervelletto con conseguente aumento dell'attività antiossidante delle catalasi. Questi dati preliminari supportano l'idea che il CTMIO possa funzionare da molecola neuroprotettiva nei confronti del prematuro e progressivo invecchiamento cellulare.

Riassumendo, quindi, composti con proprietà antiossidanti (e neuroprotettive) potrebbero essere impiegati nel trattamento dei principali sintomi che colpiscono i pazienti AT. Per questa ragione abbiamo iniziato a lavorare su molecole note come "neurosteroidi", che diversi studi condotti a partire dai primi anni del 2000, hanno indicato come composti endogeni con proprietà neuroprotettive. I neurosteroidi potrebbero quindi risultare di particolare importanza nel trattamento di patologie in cui la neurodegenerazione è caratteristica predominante.

I neurosteroidi sono un gruppo di ormoni steroidei sintetizzati dal sistema nervoso centrale e da quello periferico sia *de novo*, da molecole di colesterolo, sia attraverso il metabolismo di precursori cellulari del sangue. Tali molecole agiscono su diversi



tipi cellulari a livello del sistema nervoso. I neurosteroidi sintetizzati a partire dal colesterolo in presenza di enzimi steroidogenici sono il pregnanolone, il progesterone e il deidroepiandrosterone e l'allopregnanolone.

Gli effetti neuroprotettivi dei neurosteroidi sono stati già dimostrati, mediante studi in vitro e su modelli murini, in diverse patologie neurodegenerative, quali l'Alzheimer, il morbo di Parkinson e la malattia di Niemann-Pick .

I dati relativi a tali studi e ad altri inerenti l'effetto neuroprotettivo dei neurosteroidi sulle cellule del sistema nervoso ed il loro potenziale terapeutico nel trattamento di alcune patologie neurodegenerative e di danni cerebrali indotti da traumi sono stati discussi in un congresso svoltosi a Torino dal 17 al 21 febbraio 2007 dal titolo "Steroids and Nervous system".

A seguito della partecipazione al congresso il nostro interesse si è focalizzato sul possibile utilizzo anche dei neurosteroidi nell'Atassia per tentare di migliorare il fenotipo patologico causato dalla neurodegenerazione delle cellule del cervelletto.

Alla luce di quanto detto precedentemente, la prima parte del nostro progetto sarà focalizzata sulla messa a punto di un sistema rapido per valutare la risposta delle cellule linfoblastoidi di pazienti AT, sia a diverse e nuove sostanze antiossidanti, sia ad alcune molecole di neurosteroidi, in particolare l'allopregnenolone.

I composti antiossidanti che ci proponiamo di testare sono ampiamente noti in letteratura ma non sono mai stati testati nel trattamento di cellule di pazienti AT. Tra questi, l'idebenone, un analogo del coenzima Q(10), già utilizzato in diversi trials clinici per il trattamento dell'Atassia di Friedreich; l'ergotioneina, un antiossidante naturale di origine vegetale presente anche in diversi tessuti animali quali il sangue, il fegato, i reni e il liquido seminale; il mitoquinone Q (Mito Q) un composto sintetico derivato dell'ubichinone, che nella sua struttura presenta dominio trifenilfosfocationico che ne facilita il suo accumulo nei mitocondri.

Gli esperimenti verranno condotti sia su linee linfoblastoidi di pazienti omozigoti per una sola mutazione nel gene ATM (mutazioni frameshift che portano alla formazione



di una proteina tronca o di mutazioni che causano *skipping* esonico) o su cellule di pazienti eterozigoti composti.

Per valutare le proprietà antiossidanti di queste molecole verrà impiegato un test *in vitro* in grado di misurare la funzionalità mitocondriale che nelle cellule dei pazienti AT risulta difettosa. Questo test biochimico consiste nella misurazione della riduzione di una molecola chiamata resazurina da parte delle diverse subunità ossidoreduttasiche che compongono la catena respiratoria mitocondriale.

La reazione biochimica consiste nella riduzione della resazurina, composto non fluorescente di colore blu, a resorufina, composto fluorescente di colore rosa. Questa fluorescenza viene successivamente misurata attraverso un fluorimetro.

Gli esperimenti verranno condotti utilizzando oltre alle cellule dei pazienti anche quelle di controlli sani. Il protocollo sperimentale che verrà seguito è stato descritto in un recente articolo pubblicato da Gatti et al. sulla rivista *Human Molecular Genetics*. Brevemente, cellule di controlli sani e pazienti AT vengono piastrate ad una data concentrazione e incubate a 37 °C con una dose nota di resazurina (3-6 μ M). L'intensità di fluorescenza ottenuta dalla reazione di riduzione del composto viene misurata a intervalli di 60 minuti per una durata complessiva di 3 ore.

Preliminari esperimenti pubblicati nell'articolo di Gatti e collaboratori, hanno dimostrato una diminuita capacità delle cellule AT di ridurre la resazurina, a confronto delle cellule di controlli sani.

Lo scopo del nostro lavoro sarà quello di testare le proprietà antiossidanti delle molecole di nostro interesse attraverso la loro capacità di ripristinare la funzionalità della catena respiratoria mitocondriale e quindi, a livello sperimentale di aumentare la capacità delle cellule AT di ridurre la resazurina, portando tali valori a livelli simili a quelli dei controlli sani. Per ogni molecola antiossidante presa in esame verranno testate diverse concentrazioni (basandosi su dati di letteratura) e diversi tempi di incubazione sia sulle cellule dei pazienti AT che sui controlli per verificare che la somministrazione di tali molecole non causi effetti collaterali.

Gli stessi esperimenti condotti utilizzando le molecole antiossidanti, saranno eseguiti anche per i neurosteroidi.



In prospettiva futura, qualora l'esito dei preliminari esperimenti *in vitro* risultasse positivo, ci proporremo di trasferire questo tipo di ricerca in vivo, testando le capacità antiossidanti e neuroprotettive dei composti presi in esame su modelli murini con livelli ridotti o assenti di proteina ATM.

Seconda parte

Accanto agli studi sulle molecole antiossidanti, un altro filone di ricerca con possibili risvolti terapeutici applicabili all'Atassia Telangiectasia, riguarderebbe la possibilità di potere ripristinare anche solo una piccola percentuale di proteina ATM funzionante. Dai dati in letteratura, è noto che anche solo un 10% di proteina ATM normale, sarebbe in grado di garantire un corretto svolgimento delle normali funzioni fisiologiche all'interno della cellula. Questo permetterebbe se non una reversione completa del fenotipo patologico, almeno un miglioramento dello stesso, soprattutto per quanto riguarda i fenomeni più ingravescenti quali la neurodegenerazione.

I pazienti affetti da Atassia Telangiectasia, com'è noto, sono nella maggior parte dei casi eterozigoti composti e le mutazioni più frequenti sono mutazioni nonsense o frameshift (con sfasamento della cornice di lettura) che portano alla formazione di una proteina tronca e per questo non funzionante.

A livello cellulare esiste un meccanismo, noto come "Nonsense Mediated Decay" (NMD), che porta all'eliminazione di quei trascritti (mRNAs) caratterizzati da codini di stop prematuri che codificano per proteine non funzionanti o comunque potenzialmente dannose per la cellula stessa. Ciò nonostante ci sono molti casi in cui il fenomeno del NMD porta alla diminuzione o all'eliminazione di proteine mutate, che hanno però una residua attività funzionante. Questa attività residua potrebbe essere sufficiente alla cellula.

Numerosi studi hanno dimostrato che diverse proteine intervengono nel meccanismo del NMD; tra esse SMG-1 e Upf-1. La fosforilazione da parte di SMG-1 di specifici siti di Upf-1 rende quest'ultima capace di legarsi alle molecole di RNA mature. La



formazione di questo complesso permette di discriminare gli mRNA contenenti i codoni di stop prematuri da quelli normali.

Un recente studio, pubblicato nel 2006 sulla rivista scientifica *Molecular Therapy* ha dimostrato come l'inibizione selettiva del NMD potrebbe portare al recupero di proteine mutate ma in parte ancora funzionanti e quindi creare nuove strategie terapeutiche per diverse patologie genetiche. In questo articolo gli autori fanno riferimento alla sindrome di Ullrich, una malattia genetica autosomica recessiva, come l'Atassia Telangiectasia, che colpisce i muscoli. Essa è causata da mutazioni nel gene COL α 2VI, che codifica per la componente α 2 del collagene VI che permette le interazioni tra la cellula e la matrice extracellulare. Mutazioni non-senso a carico del gene determinano la prematura eliminazione dell'mRNA attraverso il NMD e quindi la mancata formazione del complesso del collagene VI nei fibroblasti del muscolo scheletrico.

In questo studio gli autori dimostrano che la down-regolazione di SMG-1 e Upf-1 e quindi la specifica inibizione del meccanismo di NMD portano al recupero della proteina COL α 2 VI mutata permettendo la formazione del complesso a tripla elica del collagene e quindi ripristinando l'interazione cellula-matrice extracellulare.

Gli studi condotti e i risultati ottenuti in questo articolo ci hanno portato a pensare che questa tecnica potrebbe essere applicata con successo anche nell'Atassia Telangiectasia. In realtà già qualche anno fa, Gatti e collaboratori avevano dimostrato come il trattamento con alcune molecole, gli aminoglicosidi, fosse in grado in qualche modo di nascondere i prematuri codoni di stop presenti a livello del mRNA mutato, permettendo almeno in parte il recupero della proteina ATM. L'utilizzo di composti esogeni, però è sempre e comunque limitato dalla loro eventuale tossicità per la cellula stessa. Per questo motivo il nostro interesse si è rivolto verso questo nuovo tipo approccio terapeutico.

Per questi studi verranno utilizzate esclusivamente linee cellulari linfoblastoidi di pazienti AT caratterizzate da mutazioni troncanti o frameshift che portano alla formazione di codoni di stop prematuri.



Dal punto di vista sperimentale, il silenziamento genico e quindi la down-regolazione di SMG-1 o del suo substrato Upf-1 avviene attraverso l'impiego dei siRNA ovvero di piccole molecole di RNA silenziatore, in grado di legarsi a specifiche sequenze presenti a livello dell'mRNA dei due geni, impedendone la trascrizione e la successiva sintesi proteica. Le molecole di siRNA vengono veicolate all'interno della cellula attraverso vettori virali o mediante trasfezione transiente. La prima analisi da effettuare consiste nel verificare l'inibizione della sintesi proteica di SMG-1 o Upf1. Questa viene valutata mediante analisi in Western Blots dei lisati proteici di cellule di pazienti AT trasfettate con i rispettivi siRNA. Successivamente, sulle stesse cellule AT verranno analizzati i livelli della proteina ATM, che, a seguito dell'inibizione specifica del NMD dovrebbero risultare aumentati. Infine, scopo del lavoro, sarà quello di dimostrare la funzionalità della proteina ATM mutata che è stata recuperata. Tale analisi verrà condotta valutando ad esempio la capacità da parte di ATM di fosforilare substrati a valle (p53 e H₂AX) o quella di ridurre i livelli delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Conclusioni

Ci proponiamo di verificare la possibilità che due diversi approcci abbiano un effetto sull'fenotipo cellulare di pazienti AT: 1) la correzione del difetto mitocondriale presente nelle cellule dei pazienti AT attraverso diversi tipi di antiossidanti/neurosteroidi; 2) l'aumento della proteina ATM disponibile, con sistemi di inibizione del NMD (silenziamento genico mediante siRNA). Il successo di uno di questi approcci, permetterà di passare il test ai modelli animali, prima di una eventuale sperimentazione nell'uomo.



Pubblicazioni e Presentazioni a Congresso del gruppo proponente nel campo delle atassie ereditarie:

Articoli

1. Saviozzi S, Saluto A, Piane M, Prudente S, Migone N, DeMarchi M, Chessa L, **Brusco A**. Six novel ATM mutations in Italian Patients with classical Ataxia-Telangiectasia. *Hum Mutation* 21,450, 2004 (nel 2001, I.F. 6.134).
2. **Brusco A**, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, Fetoni V, Mariotti C, Migone N, Di Donato S, Taroni F. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of SCA genes and CAG/CTG repeat expansion detection (RED) in 225 italian families. In press *Archives of Neurology* 2004 (nel 2002 I.F. 4.336, 9/138 Clinical Neurology).
3. Cagnoli C, Michielotto C, Matsuura T, Ashizawa T, Margolis RL, Holmes SE, Gellera C, Migone N, **Brusco A**. Detection of large pathogenic expansions in FRDA1, SCA10 and SCA12 genes using a simple fluorescent repeat-primed PCR assay. In press *J Mol Diagn* 2004 (2002 I.F. 4.404, 5/64 Pathology).

Congressi

1. Gellera C, **Brusco A**, Saluto A, Cagnoli C, Castucci A, Michielotto C, Mariotti C, Fetoni V, Migone N, Di Donato S, Taroni F. SCA genes analysis and CAG/CTG repeat expansion detection (RED) in 225 Italian families with hereditary spinocerebellar ataxia. Congresso E.N.S. 2003
2. **Brusco A**, Gellera C, Saluto A, Cagnoli C, Castucci A, Michielotto C, Fetoni V, Mariotti C, Migone N, Di Donato S, Taroni F. Mutation analysis of sca genes and cag/ctg repeat expansion detection (red) in 225 italian families with hereditary spinocerebellar ataxia. "Molecular Mechanisms of Neurodegeneration" Milan, May 2-4, 2003.
3. Cavalieri S, **Brusco A**, Michielotto C, Pignata C, Ruggirei M, Migone N. Caratterizzazione aplotipica ed individuazione di nuove mutazioni ATM in pazienti italiani con Atassia-Telangiectasia. VI Congresso nazionale SIGU, Verona 24-27 Settembre 2003.
4. Cagnoli C, Saluto A, Michielotto C, Orsi L, Franco A, Migone N, **Brusco A**. Analisi di mutazioni dei geni *FGF14* e *PRKCG* in un campione di 25 famiglie italiane con atassia spinocerebellare. VI Congresso nazionale SIGU, Verona 24-27 Settembre 2003.
5. Cagnoli C, Gellera C, Mariotti C, Castucci A, Michielotto C, Di Donato S, Taroni F, Migone N, **Brusco A**. Analisi di linkage ai loci SCA noti in una famiglia italiana con Atassia Spinocerebellare autosomica dominante VI Congresso nazionale SIGU, Verona 24-27 Settembre 2003.
6. Cagnoli C, Gellera C, Mariotti C, Castucci A, Michielotto C, Di Donato S, Taroni F, Migone N, **Brusco A**. Analysis of mapped SCA loci in an Italian family with autosomal dominant Spinocerebellar ataxia. *American Journal of Human Genetics*, 73, abstract 1746. 53th American Society of Human Genetics 2003 meeting, Los Angeles (USA) 4-8 November 2003.

**DIPARTIMENTO DI GENETICA
BIOLOGIA E BIOCHIMICA
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI**



Sezione di Genetica

via Santena, 19 - 10126 Torino - Italy

Tel: +39 011 6334480 Fax: +39 011 6706582



Personale coinvolto nel progetto:

1) Dott. Alfredo Brusco

Curriculum del responsabile scientifico

ISTRUZIONE

1987: Diploma di maturità scientifica, Liceo Scientifico "A.Avogadro" Biella (50/60).

1991: Diploma di laurea in Scienze Biologiche, Università degli Studi di Torino, (110/110 lode, dignità di stampa).

1994: Abilitazione alla professione di "Biologo".

1997: Dottore di Ricerca in Genetica Umana, Università degli Studi di Torino.

ESPERIENZE PROFESSIONALI

1989-1991: Studente Interno e Tirocinio pratico presso il laboratorio di Genetica medica del Dipartimento di Genetica Biologia e Biochimica, Università di Torino (referente: Prof. A.O.Carbonara); Tesi sperimentale dal titolo: "Evoluzione delle IgG in alcune specie di primati".

1992-1996: Dottorando presso il laboratorio di Genetica medica del Dipartimento di Genetica Biologia e Biochimica, Università di Torino (referente: Prof. A.O.Carbonara, Prof. M. De Marchi)

1993-96. Brevi viaggi studio presso l'Istituto per Immunologie di Basilea dove è stata appresa la tecnica "single cell PCR" ed il Guy's Hospital di Londra per apprendere la tecnica di analisi di mutazioni "Protein Truncation Test" (PTT) (referente Prof. R. Roberts).

1994: "7th Course of the European School of Medical Genetics", organizzato dalla Scuola Internazionale di Scienze Pediatriche di Genova e dalla Fondazione Internazionale Menarini.

1996: "GASLINI-IARC Course in Cancer Genetics" organizzato dalla Scuola Internazionale di Scienze Pediatriche di Genova e dall'International Agency for Research on Cancer di Lione.

1996: Borsa di studio presso l'azienda Ospedaliera San Giovanni Battista di Torino, con il progetto finalizzato: "Messa a punto di tecniche per l'analisi di mutazioni del gene della distrofina in donne portatrici della sindrome di Duchenne-Becker".

1/12/1997-1/1/2000: Funzionario tecnico VIII livello (D2) presso il laboratorio di Genetica Medica, Dipartimento di Genetica Biologia e Biochimica, Università di Torino.

POSIZIONE ATTUALE

2/1/2000: Dirigente biologo (qualifica PV) in convenzione presso la S.C.D.U. Genetica Medica dell'Az. Osp. San Giovanni Battista di Torino.

2/2/2004: Ricercatore confermato (settore Genetica Medica, MED/03) presso il Dipartimento di Genetica Biologia e Biochimica, sez. Genetica, Università di Torino.



PREMI, SOCIETÀ SCIENTIFICHE ED ATTIVITÀ DI REVISORE

1997: Vincitore di una borsa di studio per i migliori contributi scientifici, XII Congresso nazionale FISME, Spoleto 12-14 Novembre.

- American Society of Human Genetics (full member dal 2002)

Revisore delle seguenti riviste: European Journal of Human Genetics; European Journal of Neurology, Human Genetics, Clinica Chimica Acta, Annals of Neurology, GeneReviews

ATTIVITÀ DIDATTICA

1997-1998. Attività didattica Integrativa, corso di "Biologia Molecolare" nell'ambito del Diploma Universitario di Tecnico Sanitario di Radiologia Medica, Azienda Ospedaliera "San Giovanni Battista", Torino.

1998-99. Attività di complemento alla didattica, corso di "Biologia Molecolare" nell'ambito del Diploma Universitario di Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, Azienda Ospedaliera "San Giovanni Battista", Torino.

2000-2001. Attività di complemento alla didattica, corso di "Biologia Molecolare" nell'ambito del Diploma Universitario di Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, Azienda Ospedaliera "San Giovanni Battista", Torino.

2002-2003: Interventi didattici presso le scuole di specialità di Genetica, Neurologia, corso di Laurea in Biotecnologie (Univ. Torino).

2004-2005. Affidamento del corso "Polimorfismi genetici" nell'ambito della disciplina "Genetica Umana", Scuola di specializzazione in Genetica Medica, Università di Torino.

2004-07. Afferenza didattica primaria presso il corso di Laurea in Biotecnologie, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Torino. Affidamento della disciplina "Genetica Medica" del corso di Laurea di II livello in Biotecnologie Mediche, Università di Torino.

Conferimento dell'insegnamento di Genetica Medica, corso integrato "Problemi di salute materno infantile V", Corso di Laurea Infermieristica, Torino.

2005-07. Affidamento della disciplina "Metodologie di Analisi Molecolare 1", Scuola di specializzazione in Genetica Medica, Università di Torino.

Anni 2006-2007. Affidamento del corso di "Metodologie di Analisi Molecolare 2", Scuola di specializzazione in Genetica Medica, Università di Torino.

Dal 2005 docente della Scuola di Dottorato di ricerca in Genetica ed Oncologia Umana, indirizzo Genetica Umana, Università degli Studi di Torino.

ATTIVITÀ SCIENTIFICA

La ricerca svolta negli anni di dottorato ha avuto come tema l'instabilità genetica del locus IGHC. Nel corso degli anni di dottorato sono state approfondite le conoscenze di biologia molecolare anche partecipando a numerosi congressi e corsi.



1997-98. L'ambito di ricerca ha riguardato l'analisi di mutazioni in diverse malattie genetiche, quali Sclerosi Tuberosa, Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens (CBAVD), Atassia Teleangiectasia, deficit di Dihydropteridina Reduttasi (DHPR), lo studio molecolare di allotipi immunoglobulinici, l'analisi di breakpoint di ricombinazione all'interno del locus IGHC.

1999-02. L'attività di ricerca si è concentrata sulla caratterizzazione di mutazioni in malattie genetiche da espansione di triplette quali le "Atassie Spinocerebellari" autosomiche dominanti (SCA) e Atassia Telangiectasia.

2003-oggi. Sono coinvolto in numerosi progetti di ricerca, in collaborazione con diversi Istituti Italiani e stranieri. In particolare seguo direttamente i progetti: Identificazione di nuovi loci coinvolti in forme di Atassia Spinocerebellare Dominante (in collaborazione con Prof. DiDonato, Dott.ri Taroni Gellera, Divisione Biochimica e Genetica, Istituto C.Besta-Milano)

Caratterizzazione di mutazioni del gene ATM in pazienti italiani con Atassia Telangiectasia (in collaborazione con Prof. R. Gatti, UCLA Los Angeles, USA).

Identificazione del gene responsabile di una nuova forma di leucodistrofia autosomica dominante.

PROGETTI DI RICERCA APPROVATI

Sono ricercatore principale di un progetto Telethon biennale dal titolo: "Identification of the gene responsible for a novel form of autosomal dominant spinocerebellar ataxia".

ATTIVITÀ DIAGNOSTICA.

Ho eseguito attività diagnostica nel campo della genetica medica dal gennaio 2000. Attualmente sono Dirigente Biologo in convenzione con l'Azienda Ospedaliera "San Giovanni Battista" di Torino. Ho sviluppato negli ultimi anni nuovi metodi di diagnosi molecolare per l'Atassia di Friedreich, la SCA10 e la SCA12. Recentemente (2004-2005) mi sono dedicato allo sviluppo di nuove tecniche per evidenziare grandi espansioni nei geni SCA2 e SCA7 responsabili di forme giovanili e infantili di atassia cerebellare e di una nuova metodica basata sulla PCR per la diagnosi della sindrome di Martin-Bell o FRAXA.

Negli ultimi 5 anni ho messo a punto diverse metodiche per l'analisi di mutazioni ed in particolare: 1) nell'ambito della diagnosi di Atassia Telangiectasia, analisi del gene ATM mediante DHPLC ed analisi della proteina ATM mediante Western blot. 2) Analisi della segregazione ai loci PKD1 e PKD2 nel "Rene policistico dell'adulto". Nell'ambito della convenzione con l'Ospedale San Giovanni Battista, mi occupo inoltre di seguire e refertare i test diagnostici per le seguenti patologie:

1. Atassia di Friedreich; 2. Atassia Telangiectasia; 3. Analisi di linkage nel Rene Policistico dell'adulto; 4. Atassia con Oculoaprassia tipo 1 (AOA1); 5. Atassia Spinocerebellari SCA27, SCA28;

Ultime 20 pubblicazioni



1. Saviozzi S, Saluto A, Piane M, Prudente S, Migone N, DeMarchi M, Chessa L, **Brusco A**. Six novel ATM mutations in Italian Patients with classical Ataxia-Telangiectasia. *Hum Mutation* 21,450, 2003 (genetics & heredity I.F. 6.894 14/115, nel 2002).
2. Cagnoli C, Michielotto C, Matsuura T, Ashizawa T, Margolis RL, Holmes SE, Gellera C, Migone N, **Brusco A**. Detection of large pathogenic expansions in FRDA1, SCA10 and SCA12 genes using a simple fluorescent repeat-primed PCR assay. *J Mol Diagn* 6, 96-100, 2004 (2002 I.F. 4.404, 5/64 Pathology).
3. **Brusco A**, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, Fetoni V, Mariotti C, Migone N, Di Donato S, Taroni F. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of SCA genes and CAG/CTG repeat expansion detection (RED) in 225 italian families. *Arch. Neurol* 61:727-733, 2004 (nel 2002 I.F. 4.336, 9/138 Clinical Neurology).
4. Brussino A, Gellera C, Saluto A, Mariotti C, Arduino C, Castellotti B, Camerlingo M, De Angelis V, Orsi L, Tosca P, Migone N, Taroni F, **Brusco A**. *FMR1* gene premutation is a frequent genetic cause of late-onset sporadic cerebellar ataxia. *Neurology* 64:145-147, 2005 (nel 2003 I.F. 5.678, 3/135 Clinical Neurology).
5. Cutinho G, Xie J, Du L, **Brusco A**, Krainer AR, Gatti RA. Functional significance of a deep intronic mutation in *ATM* gene and evidence for a newly identified exon 28a. *Hum Mutat* 25:118-124, 2005 (genetics & heredity I.F. 6.328 14/115, nel 2003).
6. Giordana MT, Piccinini M, Palmucci L, Buccinà B, Ramondetti C, **Brusco A**, Mongini T, Leombruni S, Vaula G, Rinaudo MT. Myelin-associated glycoprotein is altered in a familial late-onset orthochromatic leukodystrophy. *Brain Pathol* 15:116-123, 2005 (clinical neurology I.F. 3.838, 11/135 nel 2003)
7. Saluto A, Brussino A, Tassone F, Arduino C, Cagnoli C, Pappi P, Hagerman P, Migone N, **Brusco A**. An enhanced PCR assay to detect pre- and full mutation alleles of the *FMR1* gene. *J Mol Diagn* 7:605-612, 2005 (nel 2004 I.F. 2.716, 13/65 Pathology).
8. Arduino C, Salacone P, Pasini B, **Brusco A**, Salmin P, Bacillo E, Ribecchi A, Cestino L, Cirillo S, Regge D, Cappello N, Gaia E. Association of a new cationic trypsinogen gene mutation (V39A) with chronic pancreatitis in an Italian family. *GUT* 54:1663-1664, 2005 (gastroenterology & hepatology I.F. 6.601, 3/46 nel 2004)
9. Cagnoli C, Stevanin G, Michielotto C, Gerbino Promis G, Brussino A, Pappi P, Durr A, Dragone E, Viemont M, Gellera C, Brice A, Migone N, **Brusco A**. Large pathogenic expansions in the SCA2 and SCA7 genes can be detected by fluorescent repeat-primed pcr assay. *J Mol Diagn* 2006 8:128-132, 2006 (nel 2004 I.F. 2.716, 13/65 Pathology)
10. **Brusco A**, Michielotto C, Stoppia L, Foresta C, Matullo G, Zeviani M, Ferrari G, Dragone E, Gatta V, Pintor S, Rossato M, Migone N. The polymorphic polyglutamine repeat in the mitochondrial DNA polymerase γ gene (POLG1) is



- not associated with oligozoospermia. *J Endocr Invest*, 29:1-4, 2006 (nel 2004 I.F. 1.525, rank 62/82 endocrinology & metabolism).
11. Cagnoli C, Mariotti C, Taroni F, Seri M, Brussino A, Michielotto C, Grisoli M, Di Bella D, Migone N, Gellera C, DiDonato S, **Brusco A**. SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-q11.2. *Brain* 2006 129:235-42. (clinical neurology I.F. 8.201, 2/140 nel 2004)
 12. Frisaldi E, Conca R, Magistrone P, Fasano ME, Mazzola G, Patanè F, Zingarelli E, Dall'omo AM, **Brusco A**, Amoroso A. Prognostic values of soluble CD30 and CD30 gene polymorphisms in heart transplantation. *Transplantation* 27;81:1153-1156, 2006. (IF: 3.568 in 2004).
 13. Cavalieri S, Funaro A, Porcedda P, Turinetto V, Migone N, Gatti R, **Brusco A**. ATM Mutations In Italian Families With Ataxia Telangiectasia Include Two Distinct "Large Genomic Deletions". *Human Mutation* 2006 Oct;27(10): 1061 (IF: 6.845 in 2004, genetics and heredity 12/120).
 14. Cagnoli C, Brussino A, Di Gregorio E, **Brusco A**, Stevanin G, Durr A, Brice A. The (-16C>T) substitution in the PLEKHG4 gene is not present among European ADCA patients. *Movement Disorders* 2007 22(5):752-3 (I.F. 3.093 in 2004; 26/140 clinical neurology).
 15. Degan P, d'òschia M, Pallardò FV, Zatterale A, **Brusco A**, Calzone R, Cavalieri S, Kavakli K, Lloret A, Manini P, Pisanti MA, Vuttariello E, Pagano G. Glutathione levels in blood from ataxia telangiectasia patients suggest in vivo adaptive mechanisms to oxidative stress. *Clinical Biochem* 2007, 40 666–670 (I.F. 2.359 in 2005; 3/23 medical laboratory technology).
 16. Tassone F, Adams J, Berry-Kravis E, Cohen S, **Brusco A**, Leehey M, Li L, Hagerman RJ, Hagerman PJ. CGG repeat length correlates with age of onset of motor signs of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Am J Med Genet B, Neuropsychiatric Genetics* 2007 , 144B:566-569 (I.F. 2.0 in 2004; 76/120 Genetics and heredity)
 17. Cavalieri S, Funaro A, Pappi P, Migone N, Gatti RA, Brusco A. Large genomic mutations within the ATM gene detected by MLPA, including a duplication of 41 kb from exon 4 to 20. *Ann Hum Genet* 2008 **72**,10–18 (nel 2006 2.727 Genetics & heredity 59/131).
 18. Mariotti C, Brusco A, Di Bella D, Cagnoli C, Seri M, Gellera C, DiDonato S, Taroni F. Spinocerebellar ataxia type 28: A novel autosomal dominant cerebellar ataxia characterized by slow progression and ophthalmoparesis. *Cerebellum*, in press (nel 2005, 1.762 Neurosciences 132/200).
 19. Cagnoli C, Brussino A, Di Gregorio E, Caroppo P, Stola S, Dragone E, Ferrone M, Padovan S, Migone N, Orsi L, Brusco A. Mutations in the *POLG1* gene are not a relevant cause of cerebellar ataxia in Italy. *J Neurology* (in press)
 20. Cagnoli C, Brussino A, Sbaiz L, Di Gregorio E, Atzori C, Caroppo P, Orsi L, Migone N, Buffa C, Imperiale D, Brusco A. A previously undiagnosed case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease revealed by *PRNP* gene analysis in patients with adult-onset ataxia. *Movement Disorders* (in press)



Curriculum Simona Cavalieri:

Studies:

Secondary School: Scientific secondary school diploma taken on 1992/93, 48/60 marks.

Degree: Degree in Biology taken on 12th november 1998, with full marks cum laude. Thesis in Tumor Immunology.

Specialization in Medical Genetics, 4th year course; I will complete the specialization on November 2004.

Scientific experience:

1999-2000: Training at the Institute for Cancer Treatment and Research in Candiolo (Turin, Italy); I worked in the field of Gene Therapy in the laboratory of Professor L. Naldini, (Associated Professor of Histology and Embryology at the School of Medicine, University of Turin).

2000-2001: One year fellowship to finish my research in the same laboratory.

2001-present: Four years Fellowship from the School of Specialization in Medical Genetics at the University of Turin, Department of Genetics, Biology and Biochemistry, in the laboratory of Professor Nicola Migone (director of the Department of Medical Genetics, Molinette Hospital, Turin). I studied the genetics of Ataxia Telangiectasia (A-T), setting up diagnostic tests for this disease such as Western blot, DHPLC and transcript analysis. My research is focusing on genotype-phenotype correlation, identification of A-T phenotypic variants, characterization of A-T missense mutations and genomic rearrangements in the ATM gene.

Learned Laboratory Techniques:

Molecular Biology: DNA, RNA and protein extraction from cells and blood samples. Southern and Western blotting, cloning techniques, PCR (Polymerase Chain Reaction), Immunohistochemistry. Nucleic acids analysis by agarose/polyacrilamide electrophoresis. Detection of genomic mutation by chromatographic assay, sequencing, cDNA analysis.

Cellular Biology: Cell-culture and culture of primary cells as fibroblasts and lymphocytes from peripheral blood and staminal cells. Lymphoblastoid cell line establishment and maintenance.

Scientific Publications

Elisa Vigna, **Simona Cavalieri**, Laurie Ailles, Massimo Geuna, Rainer Low, Hermann Bujard e Luigi Naldini (2002). Robust and Efficient Regulation of Transgene Expression in Vivo by Improved Tetracycline-Dependent Lentiviral Vectors. Molecular Therapy 3 (252-261)



Laurie Ailles, M Schmidt, Francesca Santoni de Sio, H Glimm, **Simona Cavalieri**, Stefania Bruno, Wanda Piacibello, Carle Von Kalle e Luigi Naldini (2002). Molecular evidence of lentiviral vector-mediated gene transfer into human self-renewing, multi-potent, long-term NOD/SCID repopulating hematopoietic cells. Mol. Ther. 6 (615-626).

Simona Cavalieri, Sabrina Cazzaniga Massimo Geuna, Zulma Magnani, Claudio Bordignon, Luigi Naldini e Chiara Bonini (2003). Human T lymphocytes transduced by Lentiviral Vectors in the Absence of TCR-activation Maintain an Intact Immune Repertoire. Blood 2003).

Spoken languages: Good knowledge of written and spoken English. First Certificate obtained on December 1999 with B grade.

Informatics skills: Good knowledge of the Microsoft Office package, and the most important bioinformatics databases. I currently use software dedicated to DNA sequencing analysis.

Altro personale coinvolto:

Dott.ssa Cecilia Mancini, laureanda in Biotecnologie indirizzo medico.
Dott. Alessandro Calcia, laureato in Biotecnologie, indirizzo industriale.

Collaborazioni.

Sono in corso le seguenti collaborazioni con gruppi scientifici italiani e stranieri:

1) Prof. Richard Gatti, Richard A. Gatti, MD
Rebecca Smith Distinguished Professor
UCLA School of Medicine
Department of Pathology & Laboratory Medicine
675 Charles Young Drive South Room 4-736
Macdonald Research Laboratories
Los Angeles, CA 90095-1732
1 310 825 7618 (tel/FAX)

studio delle mutazioni nel gene ATM in pazienti con Atassia Telangiectasia

2) Prof. Claudia Giachino,
Prof.ssa Claudia Giachino
Genetica Umana
Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Università degli Studi di Torino

Regione Gonzole 10

**DIPARTIMENTO DI GENETICA
BIOLOGIA E BIOCHIMICA
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI**



Sezione di Genetica

via Santena, 19 - 10126 Torino - Italy

Tel: +39 011 6334480 Fax: +39 011 6706582

10043 Orbassano (TO)

tel +39 011 6705425

fax +39 011 9038639

Sviluppo di nuove tecniche diagnostiche per l'Atassia Telangiectasia.