



Associazione "Gli amici di Valentina"
via C.L.N. 42/A
10095 - Grugliasco (TO)

Gent.li famiglie dell'Associazione,

Il nostro lavoro si è sviluppato negli scorsi anni permettendo una diagnosi sempre più rapida e accurata dell'Atassia Telangiectasia per le famiglie ed i medici che ci richiedono il test.

Oltre a fornire il test diagnostico alle future famiglie, e permettere la ricerca dei portatori in quelle note, ci poniamo, per il prossimo anno, due obiettivi:

- 1) Il test che eseguiamo sul partner di soggetti portatori per stabilire il rischio di avere un figlio affetto da AT, lascia margine di incertezza.

Al momento esistono test "funzionali", che danno risultati più affidabili nello stabilire se un soggetto è o meno portatore di AT, e che vorremo sviluppare nei prossimi mesi (linea 1 del progetto).

- 2) L'uso di corticosteroidi come cura palliativa di AT ha suscitato grandi speranze, ma ha enormi limiti. Vi proponiamo uno studio pilota, per capire qualcosa in più sul meccanismo d'azione di queste molecole in AT (linea 2 del progetto).

I nostri più cordiali saluti

Alfredo Brusco e Simona Cavalieri



Titolo del progetto:

Sviluppo di nuovi test diagnostici e studio in vitro del meccanismo di azione di molecole neuroprotettive.

Responsabili scientifici:

Dott. Alfredo Brusco e Dott.ssa Simona Cavalieri

Indirizzo:

Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, via Santena 19, 10126 Torino, Tel. 011.6334480, Fax. 011.6706582, e-mail: alfredo.brusco@unito.it

Istituto ospitante:

Dipartimento di Genetica Biologia e Biochimica Università degli Studi di Torino

Direttore: Prof. Alberto Piazza



Parte prima:

In ambito diagnostico, ci proponiamo di applicare una metodica di screening per l'identificazione sia dei soggetti AT che dei portatori. Questo test rapido e altamente sensibile, può essere effettuato sia su linfociti estratti da sangue periferico (PBMC) che su linee linfoblastoidi; il risultato è disponibile in pochi giorni. Lo studio di tale metodica è stato recentemente pubblicato sulla rivista scientifica *Clinical Chemistry* dal gruppo del Prof. Gatti [Gatti et al, *Clinical Chemistry* 2009 Mar ;55(3):463-472].

Il test si basa sulla possibilità di evidenziare la fosforilazione della proteina SMC1 da parte di ATM, dopo aver irradiato le cellule dei pazienti con raggi gamma. In seguito a questo trattamento, ATM viene attivata sui siti in cui il DNA è danneggiato con rotture della doppia elica (DSB). A differenza della maggior parte dei substrati di ATM che sono fosforilati anche da altre proteine quali ATR e DNA-PK in risposta ai DSBs, la fosforilazione di SMC1 al residuo Ser996 risulta specifica da parte di ATM.

Dal punto di vista sperimentale, nei pazienti AT la fosforilazione di SMC1 è completamente assente mentre i portatori di una sola mutazione (eterozigoti AT) presentano livelli di SMC1 fosforilato che sono dimezzati rispetto a quelli dei controlli sani.

La possibilità di individuare i portatori AT risulta di particolare importanza nelle famiglie con pazienti AT: sempre più numerose sono le richieste di ricerca dello stato di portatore in familiari di pazienti AT, in quanto una coppia di portatori ha una probabilità del 25% di avere un figlio affetto; se uno solo dei due coniugi conosce il suo stato di portatore il rischio teorico di avere un figlio affetto è di circa 1/400-1/600.

Parallelamente a quanto sopra descritto l'attività di diagnostica procederà fornendo alle famiglie AT italiane la possibilità di identificare le mutazioni nei pazienti e la ricerca di mutazioni note nei famigliari. Attualmente la ricerca di mutazioni in ATM viene svolta attraverso l'impiego combinato di diverse metodiche che comprendono l'analisi di quattro marcatori microsatelliti fiancheggianti e interni al gene per lo studio degli aplotipi associati a mutazioni ricorrenti, l'analisi della porzione codificante la proteina ATM mediante DHPLC (esoni 4-65) e lo studio delle delezioni/duplicazioni



mediante la tecnica MLPA. L'utilizzo di tutte queste tecniche ci ha permesso di trovare il 97% delle mutazioni nella casistica di pazienti AT giunti fino ad oggi nel nostro laboratorio. Questa percentuale è al momento una delle più alte registrate tra tutti i laboratori nel mondo che si occupano della diagnostica dell'Atassia Telangiectasia.

Parte seconda:

Com'è noto, ad oggi, non esiste, una terapia efficace per l'Atassia Telangiectasia. Alcuni recenti dati suggeriscono che, sebbene con molti limiti legati alla durata incerta dell'effetto terapeutico e alla comparsa di effetti collaterali, i pazienti con Atassia Telangiectasia possano essere trattati con il glucocorticoide Betametasona. In alcuni casi i risultati sembrano sorprendenti, poiché si è osservata una completa reversione del fenotipo atassico con conseguente miglioramento delle funzioni neurologiche, anche se alla sospensione del trattamento la malattia è ritornata allo stadio pre-trattamento (Buoni, Zannolli et al. 2006; Gatti and Perlman 2009; Russo, Cosentino et al. 2009). L'interesse per questi risultati ha suggerito una migliore valutazione delle conseguenze che la terapia con glucocorticoidi potrebbe avere a lungo termine sui pazienti, e la determinazione del dosaggio ottimale e delle possibili variazioni nella dose terapeutica.

Quali possono essere a livello cellulare i meccanismi attraverso i quali queste molecole agiscono? Al momento non esistono studi in proposito che permettano di capire meglio come funzionano i corticosteroidi. Valutare le azioni a livello cellulare e molecolare dell'effetto dei corticosteroidi sulle cellule AT, sarà la seconda parte del nostro progetto.

Abbiamo pensato di studiare l'effetto dei corticosteroidi sul comportamento *in vitro* di cellule AT, sia di derivazione neuronale che linfocitaria. I primi sono neuroblasti ottenuti silenziando (cioè spegnendo) artificialmente il gene *ATM*, mentre i secondi sono cellule stabilizzate (cioè rese capaci di moltiplicarsi all'infinito) ottenute dal sangue periferico. Ci proponiamo di trattare queste cellule con dosi crescenti di betametasona (usato nei trial clinici pubblicati sino ad oggi) ed altre molecole della



stessa classe con le medesime proprietà antinfiammatorie e neuroprotettive, quali ad esempio i neurosteroidi (allopregnanolone). Valuteremo sulle cellule trattate la capacità antiossidante e quella antiapoptotica.

La possibilità che il betametasonone abbia anche un'effetto sulle capacità antiossidanti delle cellule AT, è stato di recente suggerito in un lavoro pubblicato sulla rivista *European Journal of Neurology* da Russo e coll. (Russo, Cosentino et al. 2009). Gli autori misurano i livelli intracellulari di glutatione, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), e la perossidazione lipidica in 6 pazienti AT trattati con betametasonone per 10 giorni. Una riduzione marcata nei livelli ROS è stata osservata in uno dei pazienti, suggerendo che meccanismi antiossidanti possono giocare un ruolo nel miglioramento delle funzioni cerebellari. Comunque, come in precedenti studi in cui sono stati somministrati i glucocorticoidi per un tempo limitato, dopo 7 giorni dall'interruzione del betametasonone, i ROS ritornano a livelli patologici.

Questo studio suggerisce quindi che i livelli di ROS possono essere utilizzati come riferimento nell'indicare quali pazienti rispondono in maniera positiva al trattamento con betametasonone. Altri marcatori da considerare potrebbero essere:

- 1) I livelli dell'attività cinasica di ATM nel sangue periferico dei pazienti AT.
- 2) I livelli di SMC1 fosforilato da parte di ATM a seguito dell'induzione del danno al DNA dopo irraggiamento o trattamento con il radiomimetico bleomicina.

Questi studi *in vitro* verranno condotti in collaborazione con il laboratorio del Professor Domenico Delia dell'Istituto Tumori di Milano, che ha a disposizione linee stabili di cellule staminali neuronali che in presenza di opportuni fattori di crescita sono in grado di differenziarsi nei diversi tipi cellulari neuronali (neuroni, astrociti, oligodendrociti). Su queste cellule staminali indotte a differenziare sarà ad esempio valutato l'effetto neurogenico e gliogenico del betametasonone e dell'allopregnanolone, per poi analizzare gli effetti protettivi di tali steroidi in risposta a stress genotossico ed ossidativo.

In seguito questi stessi parametri potrebbero essere valutati sulle medesime linee cellulari silenziate per il gene ATM, mimando così l'assenza o il mal funzionamento della proteina a seguito di quelle mutazioni a carico del gene ATM che determinano



perdita di funzione della proteina.

Un ultimo esperimento che vorremmo mettere a punto è un saggio di espressione genica "genome-wide" per valutare se il trattamento con glucocorticoidi e neurosteroidi possa o meno modificare l'espressione genica di diversi pathway coinvolti nella risposta al danno del DNA, e nel controllo del ciclo cellulare e nell'apoptosi. Anche questa analisi di espressione genica verrebbe fatta su linfociti di sangue periferico e su cellule di derivazione neuronale sia staminali che differenziate a seguito di trattamento con vari fattori di crescita.

BIBLIOGRAFIA

- Buoni, S., R. Zannolli, et al. (2006). "Betamethasone and improvement of neurological symptoms in ataxia-telangiectasia." Arch Neurol **63**(10): 1479-82.
- Gatti, R. A. and S. Perlman (2009). "A proposed bailout for A-T patients?" Eur J Neurol **16**(6): 653-5.
- Russo, I., C. Cosentino, et al. (2009). "In ataxia-telangiectasia betamethasone response is inversely correlated to cerebellar atrophy and directly to antioxidative capacity." Eur J Neurol **16**(6): 755-9.

Personale coinvolto nel progetto:

- 1) Dott. Alfredo Brusco**
- 2) Dott. ssa Simona Cavalieri**

Ultime 10 pubblicazioni del gruppo

1. Degan P, d'Ischia 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.
2. 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
3. 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
4. Porcedda P, Turinetto V, **Brusco A**, Cavalieri S, Lantelme E, Ragona R, De Marchi M, Amoroso A, Gregari D, Giachino C. A rapid flow cytometry test based on histone H2AX phosphorylation for the sensitive and specific diagnosis of ataxia telangiectasia. *Cytometry part A* 2008, 73(6):508-16.



5. 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* 2008, 255(7):1079-80. doi: 10.1007/s00415-008-0772-3
6. 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* 2008, 30;23(10):1468-71.
7. Mariotti C, **Brusco A**, Di Bella D, Cagnoli C, Seri M, Gellera C, Di Donato S, Taroni F. Spinocerebellar ataxia type 28: A novel autosomal dominant cerebellar ataxia characterized by slow progression and ophthalmoparesis. *Cerebellum* 2008. doi 10.1007/s12311-008-0053-9.
8. Brussino A, Vaula G, Cagnoli C, Mauro A, Pradotto L, Daniele D, Di Gregorio E, Barberis M, Arduino C, Squadrone S, Abete MC, Migone N, Calabrese O, **Brusco A**. A novel family with Lamin B1 duplication associated with adult-onset leukoencephalopathy. *Journal of Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009 Feb;80(2):237-40.
9. Quarello P, Garelli E, **Brusco A**, Carando A, Pappi P, Barberis M, Coletti V, Campagnoli MF, Dianzani I, Ramenghi U. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) enhances molecular diagnosis of Diamond-Blackfan anemia due to RPS19 deficiency. *Haematologica*. 2008 Nov;93(11):1748-50.
10. Brussino A, D'Alfonso S, Cagnoli C, Di Gregorio E, Barberis M, Padovan S, Vaula G, Pinessi L, Squadrone S, Abete MC, Collimedaglia L, Guerini FR, Migone N, **Brusco A**. Mutations in the lamin B1 gene are not present in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2009, 16:544-546.

Collaborazioni.

Nell'ambito del progetto verranno effettuate collaborazioni con i seguenti gruppi

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)

2) Prof. Domenico Delia
Dipartimento di Oncologia Sperimentale,
Unità Operativa 1
Istituto Nazionale Tumori
Via Venezian 1, 20133 Milano