



**Università degli Studi di Torino  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE**

**Direttore: Prof. Franco Veglio**

---

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

Torino, 06 aprile '13

Gent.li famiglie dell'Associazione,

Per il biennio 2012-2013, la nostra attività di laboratorio procederà come negli anni passati, su due linee: la diagnostica in casi di sospetta Atassia Telangiectasia; in particolare, sentiamo l'esigenza di migliorare la capacità di identificare i soggetti portatori, soprattutto nel caso di coppie in cui un partner sia già stato identificato come portatore A-T, perché parente di un affetto.

La parte prevalente del nostro lavoro sarà la continuazione del progetto di ricerca iniziato nel 2012, basato sulla valutazione degli effetti del betametasona nelle cellule dei pazienti A-T; lo scopo del progetto è capire quali sono gli effetti cellulari, e quali le differenze con cellule di soggetti non affetti. Stiamo a questo scopo sviluppando una serie di saggi di laboratorio che possano chiarire l'effetto del betametasona ad esempio sulla vitalità cellulare, le loro capacità di produrre energia e la risposta allo stress ossidativo. Scopo ultimo è quello di capire se esistono alternative al betametasona nel trattamento sintomatico dei pazienti, ma senza i suoi effetti collaterali.

**Parte prima**

L'attività di diagnostica sarà incentrata sull'Atassia Telangiectasia (A-T) e le patologie correlate, quali Aprassia Oculomotoria tipo 1 e 2 (AOA1, AOA2). Accanto all'impiego delle convenzionali tecniche diagnostiche per la ricerca di mutazioni, pensiamo sia importante migliorare la capacità di identificare rapidamente i soggetti A-T ed i portatori. Negli ultimi anni ci siamo più volte trovati ad esaminare partner di soggetti portatori di A-T, che hanno un rischio di circa 1:100-150 di essere loro stessi portatori, essendo questa la frequenza nella popolazione. Di routine, l'analisi prevede una lunga serie di esperimenti che possono durare qualche mese, e che possono terminare con l'identificazione di una "variante di



**Università degli Studi di Torino**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE**

**Direttore: Prof. Franco Veglio**

---

incerto significato". Si tratta di una mutazione nel gene a cui non riusciamo ad attribuire un significato perché mai descritta in controlli non affetti né in pazienti.

La necessità di velocizzare le risposte (talvolta la coppia è in gravidanza), e quella di avere una risposta certa ci ha portato a considerare importante lo sviluppo di un test rapido per il quale seguiremo due linee: 1. Un test basato sulla fosforilazione di H2AX, già sviluppato dal nostro gruppo in collaborazione con la Prof. Giachino (Torino), che potrebbe diventare possibile e rapido grazie ad un nuovo strumento da poco acquisito in laboratorio (MUSE, Millipore); 2) un nuovo test diagnostico, sviluppato nel laboratorio della professoressa Soddu presso il Dipartimento di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Regina Elena di Roma (Prodosmo et al. J. Clin. Invest. 123, 2013) per la rapida individuazione degli A-T omozigoti ed eterozigoti. Questo test si basa sulla dimostrazione che la molecola p53, un proteina che all'interno della cellula è attivata da ATM, durante il processo di divisione cellulare, si localizza a livello dei centrosomi in modo ATM dipendente in risposta a segnali di rottura della doppia elica del DNA. I ricercatori del laboratorio della professoressa Soddu hanno dimostrato che nel 100% delle cellule di pazienti A-T in divisione, questa localizzazione non si verifica, mentre nei portatori A-T eterozigoti, tale evento si manifesta approssimativamente nel 50% delle cellule in attiva mitosi. A livello sperimentale, tale localizzazione viene fatta eseguendo una semplice immunofluorescenza con un anticorpo specifico per p53 e un altro specifico per i filamenti di tubulina del centrosoma e valutando il risultato tramite un microscopio a fluorescenza.

E' stato inoltre dimostrato che questo test diagnostico, oltre ad essere sensibile e rapido, può essere effettuato semplicemente sui linfociti del sangue periferico (in quantità minime, pari a 1ml) senza bisogno che venga stabilizzata la linea linfoblastoide, processo lungo e a volte difficoltoso che richiede spesso settimane di lavoro prima che tali cellule possano essere utilizzate per successivi esperimenti.

Riteniamo che la messa a punto, anche nel nostro laboratorio, di questo test, possa essere importante non solo per una rapida diagnosi iniziale dei pazienti A-T e dei portatori A-T eterozigoti, ma anche per escludere la patologia A-T in tutti quei pazienti che presentano sintomi clinici simili all'Atassia Telangiectasia e spesso vengono mandati in diagnosi differenziale con malattie A-T simili, quali l'Aprassia Oculomotoria Tipo 1 e 2, e l'ATLD.



**Università degli Studi di Torino  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE**

**Direttore: Prof. Franco Veglio**

---

## **Parte seconda**

La parte principale del nostro lavoro sarà dedicata al progetto iniziato nel 2012: lo studio di cellule di pazienti AT trattate con corticosteroidi al fine di valutarne le implicazioni a livello cellulare e molecolare.

Lo scorso anno gli esperimenti hanno mostrato risultati interessanti, che riguardano la funzione dei mitocondri nelle cellule A-T, migliorata dal betametassone. Nel prossimo anno verranno condotti esperimenti su fibroblasti primari di pazienti A-T e di controlli sani per valutare se il trattamento con betametassone possa essere in grado di agire direttamente sull'aumento dei livelli di proteina ATM e sul ripristino della sua funzionalità cinasica, dall'altro se lo stesso possa funzionare come molecola protettiva all'interno della cellula agendo sia sul ripristino della corretta funzionalità dei mitocondri (organelli deputati alla produzione di energia e al mantenimento del corretto scambio ossidoreduttasico) sia inibendo l'apoptosi e morte cellulare che nelle cellule dei pazienti A-T risulta aumentato in quanto la cellula non è in grado di rispondere in modo adeguato all'aumento delle specie reattive dell'ossigeno generate da un malfunzionamento della catena respiratoria dei mitocondri.

Lo studio dell'attività mitocondriale verrà condotta in fibroblasti di pazienti A-T e controlli sani trattati e non trattati con due diverse dosi di betametassone mediante:

- Valutazione della morfologia mitocondriale dopo colorazione con Mitored. Tale colorante, una volta entrato nella cellula, si localizza nei mitocondri ed emette una fluorescenza rossa. La fluorescenza dipende dal potenziale mitocondriale: colora solo i mitocondri funzionalmente attivi.
- Valutazione del potenziale mitocondriale mediante misurazione con sonda fluorescente JC-1. Nei mitocondri di cellule sane, la sonda si accumula formando aggregati che emettono una fluorescenza rossa. In cellule di pazienti AT una percentuale di cellule presenta un ridotto potenziale mitocondriale e ciò è dimostrato dal fatto che parte della sonda non esiste più come aggregato ma come monomero che emette una fluorescenza verde. Tale analisi verrà effettuata attraverso l'impiego di un citofluorimetro a flusso.
- Valutazione della variazione dei livelli delle proteine mitocondriali LC3I e LC3II i cui livelli all'interno dei mitocondri variano in risposta allo stimolo mitofagico (ovvero degradazione



**Università degli Studi di Torino  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE**

**Direttore: Prof. Franco Veglio**

---

dei mitocondri anomali). Tale analisi verrà effettuata mediante estrazione delle proteine totali e analisi in Western blot.

- Valutazione dei livelli di espressione mediante Real-Time PCR di alcune proteine quali catalasi e manganese superossido dismutasi coinvolte nella risposta all'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Come accennato nella parte iniziale del progetto, accanto all'utilizzo del betametassone (noto anche per i tossici effetti collaterali) verrà impiegata anche un altro farmaco, l'amantidina. Tale molecola è già nota in letteratura per i suoi benefici effetti sul controllo dell'irritabilità e dell'iperattività in malattie psichiatriche quali l'autismo e la schizofrenia in quanto in grado di agire sulla via di sintesi del neurotrasmettitore glutammato, bloccandone o comunque limitandone gli effetti tossici.

In realtà nel caso di malattie quali l'Atassia Telangiectasia, in cui i sintomi neurologici più marcati sono l'atassia, la discinesia e i tremori, questo farmaco, sarebbe in grado di ridurre tali sintomi al pari di quanto dimostrato dai recenti studi condotti sul betametassone (Buoni et al. Arch.Neurol.2006, Broccoletti et al. Eur.Journal of Neurology, 2010, Giardino G et al. Eur J Neurology 2012), ma senza gli effetti collaterali noti dei corticosteroidi.

## **Conclusioni**

Per quanto riguarda la parte di diagnostica, l'introduzione di un nuovo test per la offrirà la possibilità di effettuare l'identificazione rapida e accurata dei pazienti A-T e dei portatori, con la possibilità di una diagnosi precoce e di una consulenza genetica con il calcolo preciso del rischio di avere un figlio affetto.

Per quanto riguarda la parte di ricerca, lo studio dei meccanismi attraverso i quali i glucocorticoidi e molecole analoghe, agiscono a livello sia cellulare che molecolare sulle cellule dei pazienti A-T potrebbe portare ad un miglioramento delle strategie terapeutiche da attuare in successivi trial clinici, nel campo dell'Atassia Telangiectasia che di altre patologie neurodegenerative.

*Alfredo Brusco & Simona Cavalieri*

Dipartimento di Scienza Mediche, Università di Torino



**Università degli Studi di Torino  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE**

**Direttore: Prof. Franco Veglio**

---

**Stima dei costi:**

1. Borsa di studio 17.000 euro
2. Acquisto anticorpi e reagenti per lo sviluppo di test diagnostici: 2.000
3. Terreni per colture cellulari, antibiotici/antimicotici, plastiche: 3.000 euro
4. Reagenti per test in vitro, citofluorimetria, kit estrazione RNA e saggi di espressione, anticorpi per parte di ricerca 10.000