



Progetto di ricerca per lo studio molecolare dell'Atassia Telangiectasia

Titolo: Analisi di mutazioni in pazienti con Atassia Telangiectasia mediante Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC).

Responsabile: Prof. Nicola Migone

Dipartimento di Genetica Biologia e Biochimica, via Santena 19, 10126
Torino, Tel. 011 6706664, Fax. 011 6706582, e-mail: n.migone@cios.to.cnr.it



INTRODUZIONE

L'Atassia-Telangiectasia (A-T) è una rara patologia autosomica recessiva caratterizzata dall'insorgenza in età pediatrica di sintomi atassici, immunodeficienza e predisposizione alle neoplasie e tipiche dilatazioni dei capillari sulle sclere oculari e sulle guance (telangiectasie) da cui prende il nome la malattia.

Le basi genetiche dell'Atassia-Telangiectasia sono state chiarite nel 1995, quando sono state scoperte nei pazienti mutazioni a carico del gene *ATM*, sul cromosoma 11q23. Questa malattia è quindi legata all'assenza o all'alterato funzionamento della proteina ATM, coinvolta in numerosi meccanismi cellulari di risposta al danno al DNA da agenti ionizzanti. Il gene *ATM*, che si estende per quasi 10.000 basi, è uno tra i geni più grandi finora noti. Nei diversi pazienti lo spettro di mutazioni che possono colpire *ATM* è assai vario: non esistono regioni del gene più frequentemente mutate, e solo in pochi gruppi etnici ristretti si ritrovano mutazioni predominanti (effetto fondatore). La ricerca delle mutazioni responsabili dell'inattivazione della proteina ATM è perciò assai complessa e richiede la messa a punto di numerosi test da effettuare in ciascun soggetto. L'identificazione delle mutazioni responsabili della patologia è tuttavia utile sia per ragioni diagnostiche che di ricerca. Permette infatti nella maggioranza dei casi di giungere ad una diagnosi di certezza, consente di definire i portatori "sani" all'interno della famiglia, ed in alcuni casi fornisce una diagnosi prenatale. Su di un'ampia casistica consentirebbe inoltre una migliore correlazione fra i dati clinici (fenotipo) e tipo di mutazione (genotipo), per prevedere l'evoluzione della malattia nei pazienti.

ATTIVITÀ SCIENTIFICA PRECEDENTE

Il gruppo di ricerca del Dipartimento di Genetica Biologia e Biochimica, che si è occupato negli ultimi anni di A-T, ha svolto indagini molecolari per la caratterizzazione di mutazioni nel gene *ATM*. In particolare sono stati analizzati 30 pazienti con Atassia Teleangiectasia, in collaborazione con la Dott.ssa Luciana Chessa dell'Università La Sapienza di Roma. Per quest'analisi è stata messa a punto una tecnica chiamata Protein Truncation Test (PTT). In breve, il trascritto (mRNA) del gene *ATM* è suddiviso in sei frammenti sovrapposti trattati in vitro in modo da produrre la proteina corrispondente. Questa metodica utilizzata con successo su numerosi altri geni, permette di individuare mutazioni gravi che alterano la proteina eliminandone una parte (mutazioni troncanti). Nella casistica analizzata ha permesso di individuare circa il 70% delle mutazioni, ed identificare entrambe le mutazioni in circa il 50% dei pazienti. La tecnica PTT, sebbene abbia dato buoni



risultati, risulta assai costosa e difficilmente gestibile in laboratori diagnostici per la necessità di sangue fresco da cui estrarre mRNA.

SCOPO DEL LAVORO

Ci proponiamo di mettere a punto un sistema per l'analisi di mutazioni del gene *ATM* che sia rapido e basato sul DNA genomico. La nostra strategia prevede l'utilizzo di una tecnica innovativa chiamata Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC); in breve ciascun esone del gene viene amplificato mediante PCR e analizzato in un particolare strumento (Wave) che verifica la presenza di alterazioni in eterozigosi sul DNA. Una successiva analisi di sequenza può confermare la presenza di una mutazione o di un polimorfismo. Questa procedura verrà ripetuta per 66 volte in ciascun soggetto, tante quanti sono gli esoni del gene *ATM*. L'utilizzo di questa tecnologia permetterà di automatizzare il processo, e dopo una fase di messa a punto di renderlo rapido e a basso costo. La ricerca di mutazioni è tuttora l'unico sistema in grado di dare una diagnosi precisa di A-T e di differenziarla rispetto ad altre patologie simili, e viene ritenuta superiore alla ricerca della proteina ATM nelle cellule bianche del sangue. Inoltre l'identificazione delle mutazioni di *ATM* risulta importante per identificare i portatori nella famiglia ed eventualmente per valutare il loro rischio di avere figli affetti.

RISULTATI ATTESI

La tecnica DHPLC è stata utilizzata con successo per l'identificazione di mutazioni in numerosi geni malattia, con risultati sempre molto soddisfacenti ed una sensibilità vicina al 100%. Pensiamo sia importante fornire un servizio di diagnostica molecolare per l'ataxia teleangiectasia, in quanto l'analisi viene attualmente effettuata in laboratori esteri con enorme disagio per le famiglie dei pazienti. L'impostazione data alla ricerca di mutazioni dovrebbe consentire di individuare più del 90% delle mutazioni, rispetto ad un 60-70% ottenuto dalla maggior parte dei gruppi nel mondo. I tempi di analisi si dovrebbero accorciare da 10-12 mesi a 1-2 mesi.

FINANZIAMENTO RICHIESTO

Borsa di studio per un laureato in Scienze Biologiche o Tecnico di laboratorio biomedico.
Lit. 24.000.000 annui.



Fondazione Bertolini
C.so. Francia 109 - Fraz.Regina Margherita
10097 Collegno (TO)

c.a. Dott. F. Meliga

Torino, 25/01/01

In allegato alla presente viene inviato per conoscenza il progetto di ricerca per lo studio molecolare dell'Atassia Telangiectasia proposto alla fondazione "Amici di Valentina" per la raccolta fondi a favore di questa malattia. Questo progetto vuole affiancare l'impegno della Vostra azienda nel finanziare la ricerca, ed ha lo scopo di fornire una borsa di studio per un/una giovane laureato/a che voglia impegnarsi nell'analisi di mutazioni del gene ATM.

Cordiali saluti
Prof. Nicola Migone