DIPARTIMENTO DI GENETICA BIOLOGIA E BIOCHIMICA
UNIVERSITA' DI TORINO

Sezione di Genetica
Via Santena, 19 - 10126 Torino - Italy
Tel: +39 011 6706662
Fax: +39 011 6706582

Associazione "Gli Amici di Valentina" Torino, 10/5/2002

Grugliasco (TO)

Oggetto: presentazione progetto di ricerca anno 2002

Titolo: Approcci alternativi nella diagnosi molecolare di Atassia Telangiectasia: analisi mediante Western blot della proteina ATM e ricerca di mutazioni nel gene *hMre11*.

Responsabile: Prof. *Nicola Migone, Dott. Alfredo Brusco*
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 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. 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 certa, consente di definire i portatori "sani" all'interno della famiglia, ed in alcuni casi fornisce la possibilità di una diagnosi prenatale.

Il nostro gruppo di ricerca si è occupato negli ultimi anni della diagnostica molecolare di A-T: già dal 1997 abbiamo messo a punto una tecnica, il *Protein Truncation Test,* per l'identificazione di mutazioni nel gene *ATM*, che ha consentito l'ndividuazione, in un gruppo di 29 pazienti, del 70%

DIPARTIMENTO DI GENETICA BIOLOGIA E BIOCHIMICA
UNIVERSITA' DI TORINO

Sezione di Genetica
Via Santena, 19 - 10126 Torino - Italy
Tel: +39 011 6706662
Fax: +39 011 6706582

delle mutazioni. La nostra soglia di sensibilità è stata ulteriormente migliorata nell'ultimo anno, grazie alla messa a punto di un'innovativa tecnologia, l'analisi in DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*). Questo test fornisce una sensibilità superiore al 95% nell'identificazione di mutazioni *ATM*, ed è in grado di fornire una risposta rapida ai pazienti.

Programma di ricerca. L'analisi molecolare del gene *ATM* è senz'altro la tecnica di elezione per verificare la diagnosi di A-T; in particolare il test DHPLC è rapido e sensibile, ma assai complesso e costoso, e dovrebbe essere preceduto da un test di *screening*, le cui caratteristiche siano sostanzialmente la rapidità di analisi ed il basso costo. Esistono infatti casi di Atassia non facilmente riconducibili all'A-T, per la mancanza di segni classici, come le telangiectasie, o di esami di laboratorio indicativi, come gli elevati livelli di alfa-fetoproteina. D'altra parte, esistono anche pazienti con A-T che pur possedendo mutazioni nel gene non hanno segni clinici e di laboratorio tipici, e che dovrebbero essere inseriti nella ricerca di mutazioni.
Nella pratica di laboratorio, può venire richiesta l'analisi di mutazioni *ATM* per pazienti in età pediatrica con atassia e immunodeficienza e/o livelli anomali di alfa-fetoproteina, per una diagnosi differenziale rispetto ad altri tipi di atassie.
Tra i test di screening disponibili vi è la valutazione di radiosensibilità ai raggi X (0.25-0.50 Gy su linfociti). Le cellule irradiate dei pazienti mostrano un numero maggiore (3-4 volte) di rotture cromosomiche rispetto ai controlli sani.
Un'alternativa riguarda l'analisi dei livelli di proteina ATM nelle cellule bianche del sangue. Si è dimostrato che in più del 94% dei pazienti la proteina è assente o fortemente ridotta (Becker-Catania et al. 2000).
Nel 1999 si è inoltre scoperto che alcune varianti della malattia sono dovute a mutazioni in geni diversi da *ATM*, in particolare il gene *hMRE11* (Stewart et al. 1999), coinvolto nello stesso *patway* di risposta al danno al DNA. I soggetti affetti presentano una forma di atassia variante senza telangiectasie con una frequenza di circa il 5% tra i casi A-T. La frequenza di soggetti mutati in questo gene tra i casi con atassia generica non è però nota.

Scopo del nostro lavoro sarà quindi la messa a punto di test rapidi di screening, quali il test di radiosensibilità e l'analisi in Western blot, che possano precedere e affiancare l'analisi DHPLC. Queste tecniche potrebbero permettere lo *screening* dei pazienti in arrivo, per verificare il reale coinvolgimento di *ATM* o geni coinvolti nello stesso *patway* molecolare come ad esempio *hMre11*.

DIPARTIMENTO DI GENETICA BIOLOGIA E BIOCHIMICA
UNIVERSITA' DI TORINO

Sezione di Genetica
Via Santena, 19 - 10126 Torino - Italy
Tel: +39 011 6706662
Fax: +39 011 6706582

Ci proponiamo anche di mettere a punto l'analisi di mutazioni di quest'ultimo gene mediante sequenziamento diretto del cDNA.

L'analisi di radiosensibilità ed il Western blot sono di grande importanza anche per quei pazienti in cui non vengono individuate mutazioni nel gene *ATM*. Come visto, la prima dimostra la presenza di un'alterazione nei processi cellulari in cui è coinvolta ATM o le proteine correlate. Il successivo Western blot permetterebbe di valutare la presenza della proteina ATM nelle cellule (in futuro anche hMRE11, RAD50, NBS1), indirizzando la ricerca di mutazioni su uno specifico gene. Infatti è importante ricordare che non tutte le mutazioni di *ATM* vengono identificate dal DHPLC, e che in caso di assenza della proteina ATM si potrebbe procedere con altre metodiche per verificare la presenza di mutazioni nel gene.
Nel complesso si avrebbe una procedura più completa, in grado di fornire una risposta più precisa a quei pazienti in cui non vengono identificate alterazioni nel gene *ATM* mediante DHPLC.

FINANZIAMENTO RICHIESTO

13.000 euro per l'acquisto reagenti e apparecchi per bilogia molecolare.

DIPARTIMENTO DI GENETICA BIOLOGIA E BIOCHIMICA
UNIVERSITA' DI TORINO

Sezione di Genetica
Via Santena, 19 - 10126 Torino - Italy
Tel: +39 011 6706662
Fax: +39 011 6706582

Riassunto dell'attività di ricerca 2001.

Nello scorso anno il nostro gruppo si è impegnato per rendere operativa l'analisi di mutazioni del gene *ATM* mediante DHPLC.
In una prima fase è stata messa a punto la tecnica secondo protocolli pubblicati (Thorstenson et al. 2001); l'efficienza della metodica è stata controllata rianalizzando un gruppo di 20 diverse mutazioni, identificate in precedenza nel nostro laboratorio. Il DHPLC ha individuato tutte le varianti, mostrando una sensibilità che, come riportato dai primi autori, probabilmente si avvicina al 100%. La metodica non è tuttavia in grado di individuare mutazioni in omozigosi (cioè uguali sui cromosomi materno e paterno), e perciò viene preceduta da uno *screening* di tre marcatori polimorfici vicino al gene, in grado di individuare lo stato di omozigosi. Se questo si verifica (ci attendiamo nella popolazione italiana 1 caso ogni 5), è sufficiente mescolare il DNA del probando con quello di un soggetto sano (o eventualmente analizzare i genitori), prima di procedere all'analisi DHPLC.
Verificata l'efficacia della tecnica abbiamo predisposto un protocollo di analisi, da seguire nel caso in cui venga richiesta l'analisi molecolare, che prevede oltre alla parte tecnica, la compilazione di moduli predisposti per valutare lo stato di malattia. Questa raccolta dati sarà in un futuro utile per correlare i sintomi con le mutazioni identificate (correlazione genotipo/fenotipo).
Dal dicembre 2001 al maggio 2002 sono arrivati al nostro centro i prelievi di otto famiglie, cinque delle quali hanno terminato il test. Abbiamo identificato entrambe le mutazioni in due casi, clinicamente definiti come A-T certi. Per gli altri tre, inviati come sospetti A-T, non sono state identificate mutazioni, probabilmente poiché si tratta di una patologia diversa dall'Atassia Telangiectasia.
Nella maggior parte dei casi abbiamo terminato l'analisi in non più di quattro mesi comunicando l'esito anche nel caso in cui il test non abbia individuato mutazioni. La risposta viene inviata al medico curante, a meno che la famiglia non desideri diversamente.
L'identificazione delle mutazioni, oltre a fornire una diagnosi certa, potrà permettere di identificare i portatori all'interno di queste famiglie ed eventualmente consentirà di fornire un test rapido per la diagnosi prenatale.