



**Associazione "Gli amici di Valentina"  
via C.L.N. 42/a  
10095 GRUGLIASCO (TO)**

**Torino, 16/12/2002**

**Messa a punto di test molecolari per la diagnostica delle Atassie Ereditarie a trasmissione recessiva: atassia Telangiectasia e sindromi correlate.**

*Responsabile della ricerca: Dott. Alfredo Brusco*

Dipartimento di Genetica Biologia e Biochimica, via Santena 19, 10126 Torino, Tel. 011.6706662, Fax. 011.6706582, e-mail: [alfredo.brusco@unito.it](mailto:alfredo.brusco@unito.it)

**Timbro e firma del responsabile del progetto**

**Timbro e firma del direttore del Dipartimento**



## Razionale del progetto

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 (Gatti, 2001).

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 (Savitsky et al. 1995). 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 per ciascun soggetto. L'identificazione delle mutazioni, oltre a fornire una diagnosi certa, permette di identificare i portatori all'interno di queste famiglie, che pur non avendo un rischio di sviluppare la malattia, hanno una più elevata probabilità di avere figli affetti; infine in presenza di mutazioni note è possibile fornire un test rapido per la diagnosi prenatale.

Attualmente il nostro laboratorio utilizza una tecnica d'avanguardia per la diagnostica di questa malattia, la metodica DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) seguendo protocolli messi a punto e verificati in laboratori statunitensi (Thorstenson et al 2001).

Questa tecnica è altamente sensibile: è cioè in grado di identificare 80-90% delle mutazioni puntiformi, ma è tuttavia assai costosa e ancora relativamente lunga da eseguire (3-6 mesi per completare l'analisi), per cui deve essere eseguita solo su pazienti selezionati. Non siamo inoltre in grado di diagnosticare o comunque escludere altre patologie simili all'A-T, che potrebbero essere confuse con questa malattia; tra queste l'*A-T-like disorder* (dovuta ad alterazioni nel gene *MRE11a*) e la sindrome di *Nijmegen* (gene *NBS1*). Altri geni candidati, come il gene *RAD50*, potrebbero essere inoltre coinvolti in patologie simili, e andrebbero studiati nei soggetti negativi per mutazioni nel gene *ATM*.

## Risultati preliminari

Nell'ultimo anno abbiamo raccolto 13 pazienti con diagnosi certa o sospetta di atassia telangiectasia. Le mutazioni nel gene *ATM* sono state identificate in 7 casi confermando la diagnosi clinica. Dei restanti 6 casi almeno 2 mostrano il fenomeno della radiosensibilità, una caratteristica individuata con uno speciale test, e quasi sempre indice di A-T o di una patologia "A-T simile".



E' quindi nostro interesse mettere a punto metodiche rapide e semplici da eseguire che permettano da un lato di verificare il coinvolgimento di ATM nella patologia prima di procedere con la tecnica DHPLC, dall'altro di individuare pazienti che pur con i sintomi A-T appartengono in realtà a patologie distinte.

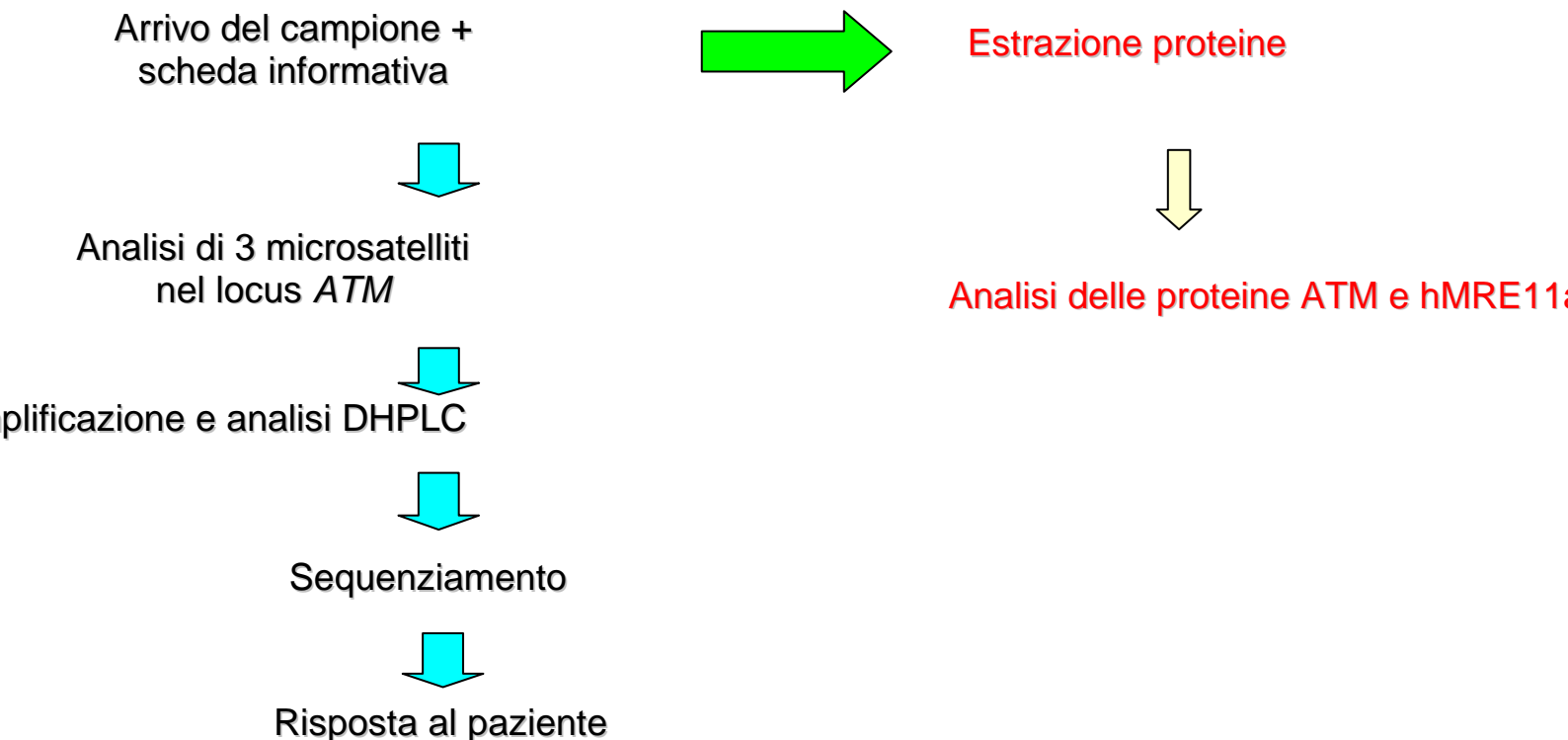
### Obiettivo della ricerca

Ci proponiamo di migliorare il nostro protocollo diagnostico per i pazienti A-T secondo lo schema in fig.1. In particolare:

- prevediamo di valutare nei pazienti la presenza delle proteine ATM, NBS1 e MRE11a mediante Western blot. Dati di letteratura indicano che la proteina ATM è assente o fortemente ridotta in circa il 95% dei casi con Atassia Telangiectasia.

L'analisi delle proteine MRE11a e NBS1 ci permetterà di estendere l'analisi a sindromi AT-simili, come l'*AT-like disorder* o la sindrome di *Nijmegen*. Anche in questi casi infatti, l'assenza della proteina è diagnostico e permette di procedere alla ricerca della mutazione sul gene.

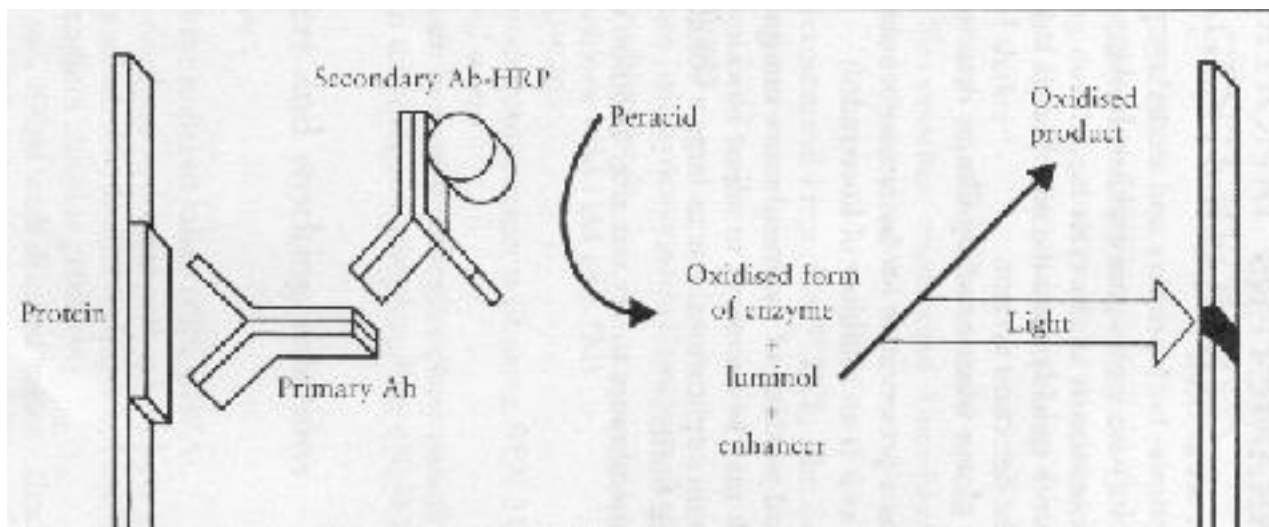
Sulla sinistra è rappresentato lo schema attuale per l'analisi di mutazioni di un campione con Atassia Telangiectasia. Sulla destra la nostra proposta per migliorare l'analisi.





### Sintesi del programma di ricerca.

Il nostro protocollo diagnostico per l'identificazione di mutazioni nel gene *ATM* verrà implementato da sistemi di screening che ci permettano di identificare rapidamente i soggetti utili all'analisi DHPLC. I leucociti periferici ottenuti da un prelievo di sangue venoso, vengono lisati per estrarne le proteine, la cui quantità è stimata utilizzando il kit "Biorad Protein Assay dye Reagent Concentrate". Per ciascun soggetto da esaminare 100µg di proteina sono separati su un gel di poliacrilamide denaturante (5%stacking-6%separating), e trasferito su un filtro di PVDF. Questo filtro è incubato con un anticorpo specifico per ATM, e rivelato secondo una procedura di Chemiluminescenza schematizzata di seguito:



Utilizzando lo stesso filtro e le stesse procedure di rilevazione sarà possibile esaminare contemporaneamente anche le proteine MRE11a e NBS1, che serviranno da riferimento. Verrà infatti valutata, oltre all'assenza della proteina anche la diminuzione della proteina ATM rispetto alle altre, essendo anche questo un dato diagnostico di A-T. Sarà inoltre possibile evidenziare da subito la carenza delle proteine NBS1 indice di sindrome di *Nijmegen*, o MRE11a, indice di *A-T like disorder*.

Sui pazienti negativi sarà utile analizzare anche la proteina RAD50, che forma un complesso multimerico con le proteine NBS1-MRE11a, e che quindi che è possibile possa essere coinvolta in sindromi simili.

I protocolli completi sono già stati ottenuti grazie alla collaborazione del Prof. Richard A. Gatti, (UCLA School of Medicine, Department of Pathology Macdonald Research Laboratories Los Angeles, CA 90095-1732).



## Risultati attesi

Nei casi pediatrici di atassia a causa la classificazione sulla base sintomatologica è assai difficile; pochi sono gli esami a disposizione per evidenziare una malattia genetica, di cui i genitori possono essere portatori sani. Il test che proponiamo può essere utilizzato come “diagnosi differenziale” per tutti i bambini con sintomi atassici e permetterà di identificare precocemente pazienti A-T, o affetti da sindromi correlate. Questo test, come tutte le procedure di screening ha le caratteristiche di rapidità, basso costo ed è notevolmente sensibile. Il test è in grado infatti di identificare con una sensibilità superiore al 95% i casi A-T, *Nijmegen*, e *A-T like disorder*, il risultato si ottiene in 7-14 giorni, con un costo di circa 100 euro a paziente.

Ci proponiamo di estendere questo test ad altri gruppi di malati, quali ad esempio casi di microcefalia. Infatti mutazioni nel gene *NBS1*, responsabile della sindrome di *Nijmegen*, potrebbero essere legate a questa, non rarissima, malformazione.

L'identificazione di gruppi di pazienti senza alterazioni nelle proteine ATM, NBS1, MRE11a, ma con specifiche caratteristiche di laboratorio, ci permetterà di iniziare nuovi progetti di ricerca volti all'identificazione di altri geni responsabili di atassie recessive.

## Materiale e fondi richiesti

Apparato per Western blot	2000
Reagenti per Western blot	2000
Anticorpi	4000
Borsa di studio per un laureato in biologia, part time	8000
Altri reagenti di laboratorio	1000
TOTALE	17.000

## Bibliografia

Gatti R. 2001. Ataxia-telangiectasia. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: Mc Graw-Hill, p 705-732.

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jasper NGJ, Taylor AMR, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. 1995. A single Ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268:1749-1753.

Thorstenson YR, Shen P, Tusher VG, Wayne TL, Davis RW, Chu G, Oefner PJ. 2001. Global analysis of ATM polymorphism reveals significant functional constraint. *Am J Hum Genet* 69:396-412.