



**Associazione ONLUS  
Gli Amici di Valentina  
Via C.L.N. 42/A  
10095 Grugliasco (TO)  
Tel. Fax 011 4152920  
gliamici@atav.191.it**

Torino, 20/10/2005

Oggetto: presentazione progetto di ricerca anno 2005-2006

**Titolo: [Miglioramento delle tecniche diagnostiche in pazienti affetti da Atassia  
Telangiectasia e sindromi correlate.](#)**

Responsabili : *Dott. Alfredo Brusco e Dott.ssa Simona Cavalieri*

Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, via Santena 19, 10126 Torino, Tel.  
011.6334480, Fax. 011.6705668, e-mail: [alfredo.brusco@unito.it](mailto:alfredo.brusco@unito.it)

**Timbro e firma del responsabile scientifico**

***Dott. Alfredo Brusco***

*Ricercatore, Facoltà di Medicina  
Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica  
Università degli Studi di Torino*



### **Introduzione.**

L'identificazione di mutazioni nel gene ATM è fondamentale per una corretta diagnosi nei pazienti con Atassia Telangiectasia (A-T), e per un'efficace consulenza genetica alle famiglie. La loro ricerca è tuttavia resa molto complessa sia dall'estensione del gene (>9Kb), sia dall'assenza di punti preferenziali (hotspot): ad oggi sono infatti note più di 400 mutazioni diverse disperse lungo tutto il gene.

Di particolare importanza risultano le diagnosi dei pazienti cosiddetti A-T varianti, in cui i sintomi di A-T sono sfumati. Sono stati scoperti casi di A-T in cui la malattia insorge nell'adulto, ed esistono atassie simili all'A-T, dovute a mutazioni in geni diversi da ATM, chiamate aprassie oculomotorie.

### **Risultati del lavoro svolto.**

Il nostro laboratorio ha raccolto negli ultimi tre anni una casistica di 34 pazienti inviati da diversi centri Italiani. Per alcuni erano stati effettuati esami approfonditi, come la radiosensibilità, altri erano A-T presunti sui soli dati clinici.

Sulla base dei dati in letteratura, il nostro gruppo ha scelto di basarsi su due parametri per valutare se un paziente è un possibile A-T: 1) i livelli di alfafetoproteina plasmatici, valutata al momento della diagnosi clinica, è sempre elevata nei pazienti A-T, ma anche in alcune forme di Aprassia Oculomotoria (AOA); 2) l'assenza di proteina ATM nei leucociti, un marker specifico di A-T. La contemporanea presenza di livelli elevati di alfafetoproteina, e l'assenza o la ridotta quantità di proteina ATM permettono una diagnosi di "primo livello", che può essere seguita dalla ricerca di mutazioni nel gene.

A seguito dell'analisi di espressione della proteina ATM mediante Western Blot, in 18 dei nostri pazienti i livelli della proteina sono risultati paragonabili a quelli di un controllo sano e per questo non affetti da tale patologia. Alcuni di questi pazienti erano stati classificati come A-T solo sulla base della clinica.

In 11 pazienti, invece, l'analisi in Western Blot, ha dimostrato livelli ridotti o assenti della proteina ATM e quindi su di essi è stata effettuata l'analisi di mutazioni nel gene.



Lo studio è stato condotto affiancando alla tecnica del DHPLC (tecnica ad elevata processività e sensibilità), l'analisi di 4 microsatelliti, 2 interni e 2 fiancheggianti il gene ATM. L'associazione dei valori dei 4 marcatori rappresenta un "aplotipo" che caratterizza ogni individuo in quella precisa regione genomica. Recenti studi su popolazioni spagnole, polacche, russe e brasiliane hanno dimostrato che lo studio di questi aplotipi è utile per identificare mutazioni ricorrenti nel gene ATM.

L'analisi attraverso lo studio dei 4 marcatori ci ha permesso di identificare un totale di 7 mutazioni in tre individui eterozigoti e in due omozigoti ( $7/22 = 32\%$ ). Inoltre questa strategia ci ha permesso di identificare i pazienti potenzialmente omozigoti che potrebbero sfuggire ad una successiva analisi in DHPLC, tecnica che permette la ricerca di mutazioni solo in eterozigosi.

L'analisi è proseguita utilizzando appunto il DHPLC. Tale tecnica ci ha permesso di identificare altre 15 mutazioni sulle 22 attese. Otto di queste non sono mai state descritte. La combinazione delle due tecniche applicate ha portato all'individuazione di 20 mutazioni ( $20/22 = 90\%$ ). Nei due individui nei quali una sola mutazione è stata identificata si è proceduto ad una più accurata analisi attraverso lo studio del cDNA. Il trascritto primario del gene ATM è stato retrotrascritto in cDNA e suddiviso in 8 regioni, tra loro parzialmente sovrapposte, che sono state amplificate mediante PCR. In uno dei pazienti, l'analisi degli amplificati ha mostrato che il frammento 4 corrispondente agli esoni 31-45 di ATM, aveva una lunghezza inferiore rispetto al controllo. Il suo successivo sequenziamento ha dimostrato la delezione degli esoni 32-36.

Nel secondo paziente, l'amplificazione del frammento corrispondente agli esoni 14-30 ha dato come risultato una banda più corta rispetto al controllo sano. La sequenza dell'amplificato ha rivelato la perdita degli esoni 21-29.

In entrambi i pazienti le mutazioni trovate sono ampie delezioni genomiche, mai descritte. In letteratura sono stati riportati solo pochi casi di delezioni genomiche, in quanto il loro studio e la successiva caratterizzazione sono spesso difficili e richiedono molto tempo.

Nel nostro caso, lo studio del cDNA e l'impiego della tecnica del Southern Blot, ci hanno permesso di individuare con precisione i punti di inizio e termine delle delezioni.



---

In totale, quindi, l'impiego di diverse tecniche di analisi molecolare ha portato all'individuazione di tutte le 22 mutazioni attese nei nostri 11 pazienti A-T.

Questo lavoro, in associazione con altri recentemente pubblicati ha dimostrato l'importanza dell'utilizzo degli aplotipi come screening iniziale delle mutazioni nel gene ATM. Inoltre, l'applicazione della tecnica del DHPLC ha permesso di studiare un gene così esteso in tempi relativamente brevi (mediamente nell'arco di 3-4 mesi) e con una sensibilità prossima al 100%.

Il lavoro svolto ha portato alla stesura di un articolo sottomesso a pubblicazione, in una rivista scientifica del settore genetica medica. Inoltre lo stesso studio è stato esposto come poster al congresso internazionale della Società Americana di Genetica Umana (ASHG) che avrà luogo a Salt Lake City alla fine di ottobre 2005, ed oggetto di una relazione del Dr. Brusco presso l' "A-T satellite meeting" dello stesso congresso.

Questo lavoro è stato svolto in collaborazione con il Dipartimento di Patologia Umana del Professor Richard Gatti presso la "David Geffen School of Medicine" della Università di California, Los Angeles, USA.

### **Sintesi del programma di ricerca 2005-2006.**

Dal punto di vista diagnostico esistono diverse patologie simili all'A-T. I 2/3 dei casi che vengono inviati al nostro laboratorio per il test su ATM, non risultano in realtà A-T. Ci proponiamo quindi di migliorare il nostro protocollo di analisi dei pazienti A-T e di quelli negativi come segue:

#### **1): Diagnostica dei nuovi casi A-T.**

Per la ricerca di mutazioni nei nuovi casi A-T che sono recentemente arrivati e che arriveranno in futuro nel nostro laboratorio, affiancheremo alla iniziale analisi dell'espressione della proteina in Western Blot, l'analisi dei microsatelliti, per individuare eventuali mutazioni ricorrenti, la tecnica del DHPLC per l'analisi degli esoni e l'analisi del cDNA, per l'individuazione di eventuali anomalie di splicing.



---

Per quanto riguarda lo studio di grosse delezioni o riarrangiamenti genomici, come le due mutazioni che abbiamo recentemente caratterizzato, purtroppo non esistono metodiche semplici e rapide per la loro individuazione. La tecnica del Southern Blot infatti, da noi impiegata, è molto dispendiosa sia in termini di tempo che di materiale e utilizza isotopi radioattivi. Recentemente è stato commercializzato anche per il gene ATM, come per altri geni affetti da delezioni ricorrenti, un kit chiamato MLPA, che prevede l'utilizzo di diverse sonde, poste lungo tutto il gene, per l'individuazione di delezioni di uno o più esoni. Al momento, essendo il kit appena uscito in commercio, non esistono informazioni in letteratura riguardo l'applicazione della tecnica e i risultati ottenuti sul gene ATM. È probabile che, non appena ci saranno dati disponibili su tale tecnica, anche nel nostro laboratorio questa metodica verrà introdotta in affiancamento a quelle già in uso.

**2): Studio dei pazienti negativi per mutazioni nel gene ATM.**

Come accennato precedentemente, esistono altre patologie simili alla Atassia Telangiectasia che, per alcuni segni clinici e biochimici potrebbero essere confuse con questa malattia; tra queste l'A-T like disorder (causata da alterazioni nel gene MRE11), e altre 2 patologie di più recente scoperta, l'Aprassia Oculomotoria tipo 1 (AOA1), dovuta a mutazioni nel gene della Apratassina (APTX), e l'Aprassia Oculomotoria tipo 2 (AOA2), in cui è coinvolto il gene della Senataxina (SETX).

In particolare, quest'ultima patologia condivide con l'Atassia Teleangiectasia non solo segni clinici quali l'atassia cerebellare, le teleangiectasie, la disartria, il nistagmo, la neuropatia periferica, ma anche elevati livelli di alfa-feto proteina, uno dei marcatori biochimici che differenziano l'A-T dalle altre atassie cerebellari recessive.

Per questo motivo in molti casi diventa difficile discriminare dal punto di vista diagnostico le due malattie e nel caso di pazienti negativi per A-T, ma con alfa-fetoproteina elevata, potrebbe risultare utile indagare sulla AOA2.

Dal momento che il gene della SETX è composto da 24 esoni e quindi sarebbe piuttosto lungo eseguire un'analisi del gene per tutti i soggetti A-T negativi, lo studio dell'espressione della proteina Senataxina in Western Blot potrebbe essere un valido metodo di screening iniziale.



Poichè non esistono in commercio anticorpi anti-senataxina , il nostro progetto prevederà la sintesi in laboratorio dell'anticorpo, la sua validazione in estratti cellulari di controlli sani e affetti da AOA2, e la sua seguente applicazione nell' analisi della proteina in soggetti A-T negativi.

Dal punto di vista molecolare, la preparazione dell'anticorpo consiste principalmente di due fasi:

- 1) Produzione del peptide antigenico, ovvero del segmento proteico della senataxina che sarà riconosciuta dall'anticorpo che intendiamo produrre.

Questo primo risultato si otterrà attraverso l'amplificazione mediante PCR del frammento di DNA codificante per il peptide antigenico, il suo inserimento in un vettore plasmidico e la sua espressione in batteri di ceppo E.Coli.

- 2) Produzione degli anticorpi monoclonali attraverso l'iniezione dell'antigene in topi di laboratorio.

Il peptide antigenico, una volta purificato mediante tecniche di cromatografia, viene iniettato in topi di laboratorio, i quali sono indotti a produrre linfociti B che secernono anticorpi contro questo peptide . A questo punto, i linfociti così prodotti vengono messi a contatto con cellule di mieloma (cellule tumorali del sangue), provenienti da un altro topo. Dalla fusione di ogni linfocita con una cellula di mieloma si avrà la produzione di un ibridoma, ovvero un linfocita in grado di replicarsi infinitamente (caratteristica delle cellule tumorali) e di produrre anticorpi diretti contro l'antigene inizialmente iniettato nel topo. Gli anticorpi così prodotti saranno in grado di riconoscere la precisa regione della senataxina (scelta inizialmente) e utilizzati in Western Blot per il rilevamento dei livelli della proteina stessa.



### Riassunto, risultati attesi e prospettive.

I dati presentati confermano che l'impiego e il miglioramento di diverse metodiche per l'analisi delle mutazioni nel gene ATM ha permesso non solo di identificare nuove mutazioni, ma anche di caratterizzare grosse delezioni genomiche nel gene stesso, fino ad ora poco descritte proprio perchè difficili da individuare.

Il miglioramento delle tecniche diagnostiche comprenderà anche lo studio dei pazienti A-T negativi, con particolare riferimento ad una patologia di recente scoperta, come la Aprassia Oculomotoria di tipo 2 (AOA2). Tale malattia presenta infatti diverse caratteristiche non solo cliniche ma anche biochimiche che rendono spesso difficile la diagnosi differenziale dei pazienti affetti da questi due tipi di atassie cerebellari.

### Pubblicazioni e Presentazioni a Congresso del gruppo proponente nel 2004-2005 nel campo delle atassie ereditarie:

#### Articoli

1. Cagnoli C, Michielotto C, Matsuura T, Ashizawa T, Margolis RL, Holmes SE, Gellera C, Migone N, **Brusco A**. Detection of large pathogenic expansions in FRDA1, SCA10 and SCA12 genes using a simple fluorescent repeat-primed PCR assay. *J Mol Diagn* 6, 96-100, 2004 (2002 I.F. 4.404, 5/64 Pathology).
2. **Brusco A**, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, Fetoni V, Mariotti C, Migone N, Di Donato S, Taroni F. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of SCA genes and CAG/CTG repeat expansion detection (RED) in 225 italian families. *Arch. Neurol* 61:727-733, 2004 (nel 2002 I.F. 4.336, 9/138 Clinical Neurology).
3. Brussino A, Gellera C, Saluto A, Mariotti C, Arduino C, Castellotti B, Camerlingo M, De Angelis V, Orsi L, Tosca P, Migone N, Taroni F, **Brusco A**. *FMR1* gene premutation is a frequent genetic cause of late-onset sporadic cerebellar ataxia. *Neurology* 64:145-147, 2005 (nel 2003 I.F. 5.678, 3/135 Clinical Neurology).
4. Cutinho G, Xie J, Du L, **Brusco A**, Krainer AR, Gatti RA. Functional significance of a deep intronic mutation in *ATM* gene and evidence for a newly identified exon 28a. *Hum Mutat* 25:118-124, 2005 (genetics & heredity I.F. 6.328 14/115, nel 2003).
5. Saluto A, Brussino A, Tassone F, Arduino C, Cagnoli C, Pappi P, Hagerman P, Migone N, **Brusco A**. An enhanced PCR assay to detect pre- and full mutation alleles of the *FMR1* gene. *J Mol Diagn* in press



6. Cagnoli C, Stevanin G, Michielotto C, Gerbino Promis G, Brussino A, Pappi P, Durr A, Dragone E, Viemont M, Gellera C, Brice A, Migone N, **Brusco A**. Large pathogenic expansions in the SCA2 and SCA7 genes can be detected by fluorescent repeat-primed pcr assay. *J Mol Diagn* in press
7. Cagnoli C, Mariotti C, Taroni F, Seri M, Brussino A, Michielotto C, Grisoli M, Di Bella D, Migone N, Gellera C, DiDonato S, **Brusco A**. SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-q11.2. *Brain* in press (clinical neurology I.F. 8.201, 2/140 nel 2004)
8. Cavalieri S, Funaro A, Porcedda P, Turinetto V, Migone N, Gatti R, **Brusco A**. Mutation analysis in the ATM gene by haplotyping, dhplc and southern blot: characterization of novel genomic deletions and point mutations in italian A-T patients. Manuscript in preparation

#### Congressi

1. Brussino A, Gellera C, Saluto A, Mariotti C, Arduino C, Castellotti B, Migone N, Taroni F, **Brusco A**. *FMR1* gene premutation is a frequent genetic cause of late-onset sporadic cerebellar ataxia. American Journal of Human Genetics. 54th American Society of Human Genetics 2004 meeting, Toronto (Canada) 26-29 October 2004.
2. Cagnoli C, Gerbino Promis G, Michielotto C, Stevanin G, Viemont M, Dragone E, Gellera C, Migone N, **Brusco A**. Detection of large pathogenic SCA2 and SCA7 expansions by repeat-primed PCR assay. American Journal of Human Genetics. 54th American Society of Human Genetics 2004 meeting, Toronto (Canada) 26-29 October 2004.
3. Brussino A, Cagnoli C, Vaula G, Seri M, Leonbruni S, Panza E, Pappi P, Arduino C, Scapaticci MS, Camanini S, Giordana MT, Migone N, **Brusco A**. Analisi di linkage in una famiglia affetta da leucodistrofie autosomica dominante: esclusione dei loci noti. VII Congresso nazionale SIGU, Pisa, 13-15 Ottobre 2004.
4. Brussino A, Gellera C, Saluto A, Mariotti C, Arduino C, Castellotti B, Migone N, Taroni F, **Brusco A**. La premutazione nel gene *FMR1* è una causa frequente di atassia sporadica dell'adulto. VII Congresso nazionale SIGU, Pisa, 13-15 Ottobre 2004.
5. Cagnoli C, Gerbino-Promis G, Michielotto C, Pappi P, Stevanin G, Viemont M, Dragone E, Gellera C, Migone N, Brusco A. Identificazione di grandi espansioni SCA2 e SCA7 mediante STR-primed PCR fluorescente. VII Congresso nazionale SIGU, Pisa, 13-15 Ottobre 2004.
6. **Brusco A**, Cagnoli C, A, Mariotti C, Gellera C, Seri M, Brussino A, Michielotto C, Fancellu R, Di Bella D, Taroni F, Migone N, Di Donato S. Identification of the gene responsible for a novel form of autosomal dominant spinocerebellar ataxia. XII Convention Telethon, 6-8 marzo 2005 Salsomaggiore Terme. Abstract 184.
7. Mariotti C, **Brusco A**, Cagnoli C, A, Gellera C, Michielotto C, Fancellu R, Di Bella D, Migone N, Taroni F, Di Donato S. A novel form of dominant cerebellar ataxia





characterized by slow progression and ophthalmoparesis. XV meeting of the European Neurological Society, 18-22 June, 2005, Vienna, Austria. Published on Journal of Neurology, 252, suppl 2, 2005.

8. Saluto A, Brussino A, Tassone F, Arduino C, Cagnoli C, Hagerman P, Migone N, **Brusco A**. An enhanced PCR assay to detect pre- and full mutation alleles of the FMR1 gene. VIII Congresso nazionale SIGU, Domus de Maria (CA), 28-30 Settembre 2005.

**Fondi richiesti.** Per lo svolgimento del progetto si richiede il finanziamento di 15.000 euro che verrà utilizzato per una borsa di studio a favore di un laureato in Scienze Biologiche.