

**DIPARTIMENTO DI GENETICA
BIOLOGIA E BIOCHIMICA
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI TORINO**



Sezione di Genetica

via Santena, 19 - 10126 Torino - Italy

Tel: +39 011 6334480 Fax: +39 011 6706582

**Associazione
Un Vero Sorriso Onlus**
via Morghen, 5
10143 – Torino

Torino, 21/02/2011

Progetto di ricerca:

**Utilizzo di oligonucleotidi antisenso per correggere l'effetto di
mutazioni di splicing in pazienti affetti da Atassia Telangiectasia**

Responsabili:

Dott. Alfredo Brusco,

Dott.ssa Simona Cavalieri,

Università di Torino, Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica,
via Santena 19, 10126 Torino

Tel. 011.6334480, Fax. 011.6706582, e-mail: alfredo.brusco@unito.it



Introduzione

L'Atassia Telangiectasia (A-T) è una rarissima malattia genetica che colpisce un bambino ogni 100.000, e che, a partire dai 3-4 anni, porta ad una progressiva perdita della capacità di coordinare i movimenti di braccia e gambe (atassia); sono spesso visibili caratteristiche dilatazioni dei vasi sanguigni negli occhi (telangiectasie). I pazienti affetti da tale malattia incorrono spesso in infezioni importanti e ricorrenti delle vie respiratorie (es. bronchiti ricorrenti) ed hanno un'aumentata predisposizione a linfomi e leucemie (circa 100 volte i soggetti di pari età). Dal 1995 è noto che la causa di questa patologia è l'assenza della proteina ATM, a sua volta dovuta a mutazioni a carico del suo gene sul DNA dei pazienti. Essendo la malattia a trasmissione autosomica recessiva, i genitori dei pazienti sono portatori, anche se non hanno sintomi. Non esiste una terapia in grado di fermare la progressione della malattia nè tanto meno di curarla definitivamente. Sulla base degli studi eseguiti negli ultimi anni, sono state suggerite terapie sperimentali con l'uso di molecole antiossidanti, quali vitamina E, vitamina C, N-acetilcisteina e acido alfa-lipoico aggiunte alla dieta dei pazienti. L'efficacia non è tuttavia dimostrata, ed al momento non sono in grado di alleviare nessuno dei sintomi neurologici più gravi; l'effetto di queste sostanze potrebbe essere visto a lungo termine, ritardando il progredire della patologia.

Nei pazienti affetti da A-T la maggior parte delle mutazioni a carico del gene *ATM* porta ad una completa perdita di funzione della proteina. Le mutazioni più diffuse sono *nonsense* (con produzione di una proteina tronca), *missense* (sostituzione di un singolo aminoacido), piccole delezioni e inserzioni nucleotidiche all'interno della sequenza codificante che portano allo sfasamento della normale cornice di lettura. Esistono inoltre mutazioni molto più rare (1% dei casi) che rappresentano delezioni o duplicazioni di grosse porzioni genomiche. Il nostro gruppo ha contribuito negli anni a definire lo spettro di mutazioni a carico del gene.



Di recente ci siamo focalizzati su un gruppo di pazienti in cui le tecniche tradizionali non sono in grado di individuare una o entrambe le mutazioni nel gene. Questo perché tali mutazioni si trovano probabilmente all'interno di estese porzioni introniche che non vengono normalmente analizzate tramite la tecniche tradizionali.

Lo studio in particolare di un paziente ha permesso di identificare una mutazione intronica che genera uno splicing anomalo tra gli esoni 11 e 12 del gene.

L'interesse per questa mutazione deriva dalla possibilità di alterare l'effetto patologico usando specifici oligonucleotidi antisenso descritti in dettaglio più avanti.

Scopo del progetto sarà quindi sviluppare l'uso di oligonucleotidi antisenso per correggere mutazioni di splicing in pazienti A-T.



Step 1.

Verifica dell'effetto della mutazione IVS12-405C>T.

Nella paziente AT-34-TO è stata identificata una mutazione tra l'esone 11 e l'esone 12, chiamata IVS12-405C>T.

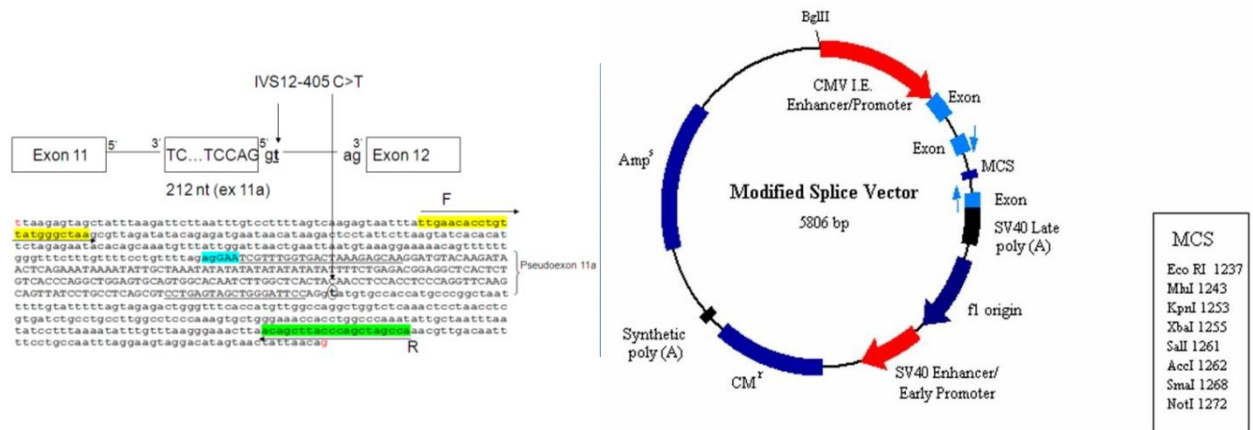


Figura 1.

La mutazione, assente in controlli sani, attiva un sito criptico donatore di splicing che introduce sul cDNA del gene *ATM* un pseudo esone di 212 bp (fig.1).

Come step iniziale è necessario verificare in un sistema in vitro chiamato "minigene", l'effetto della mutazione.

La regione dello pseudo esone e 150 bp a monte ed a valle vengono amplificate dalla paziente AT-34-TO e clonate in un vettore plasmidico attraverso una metodica TA cloning. Dopo il clonaggio la sequenza dell'inserto viene verificata: si selezionano almeno due cloni uno contenente la sequenza normale, da utilizzare come controllo ed uno con la mutazione **IVS12-405C>T**. Gli inserti vengono tagliati mediante enzimi di restrizione i cui siti di taglio sono stati inseriti nei primer utilizzati nell'amplificazione e trasferiti in un vettore pAltermax modificato (Promega), in modo da verificare l'effetto della mutazione sullo splicing. Il vettore plasmidico è transfettato in cellule HEK293 per 48 ore. Il mRNA viene estratto e viene eseguita una retrotrascrizione; usando specifici primers viene verificato l'introduzione dello pseudo esone in presenza solo della mutazione IVS12-405C>T.



Risultati attesi: la mutazione ***IVS12-405C>T*** rispetto al controllo normale deve modificare lo splicing, con l'introduzione di uno pseudo esone di 212 bp. Ci attendiamo che la mutazione abbia un effetto su almeno l'80% dei trascritti.

Tempo di esecuzione: 4 mesi

Costo dello step: 15000 €

Secondo step.

Identificazione di oligonucleotidi antisenso morfolinati (AMO) in grado di correggere la mutazione IVS12-405C>T.

Usando specifici software verranno disegnati una serie di oligonucleotidi in grado di riconoscere la mutazione IVS12-405C>T. Gli oligonucleotidi verranno sintetizzati con una particolare modificazione nota come "morfolino", in grado di stabilizzare il loro effetto. Diverse varianti verranno esaminate nel modello cellulare HEK293 generato allo step 1, per individuare quali oligonucleotidi hanno l'effetto maggiore sulla reversione dello splicing. L'oligonucleotide con effetto più pronunciato verrà utilizzato in saggi successivi sulle cellule della paziente AT-34-TO. Verrà anche valutata la possibilità di usare combinazioni di oligonucleotidi per rendere più efficiente il blocco dei siti anomali di splicing.

Risultati attesi: identificazione delle migliori sequenze di oligonucleotidi antisenso in gradi di correggere la mutazione IVS12-405C>T.

Tempo di esecuzione: 5 mesi

Costo dello step: 20000 €

Terzo step.

Effetto di oligonucleotidi AMO sulla produzione di trascritto ATM funzionale.

I tre migliori oligonucleotidi AMO derivati dallo step 2 saranno utilizzati su una linea di linfoblasti della paziente AT-34-TO per verificare l'effetto in vitro.

Inizialmente valuteremo l'effetto sullo splicing trattando le cellule con gli AMO e verificando dopo estrazione di mRNA e analisi RT-PCR il trascritto ATM tra gli esoni



11 e 12. Verranno usate diverse concentrazioni di AMO (0, 10, 20, 50 uM), seguendo le indicazioni del lavoro (Due et al., PNAS 104,14:6007-6012, 2007). La presenza di un trascritto corretto verrà valutata mediante sequenziamento diretto.

Per verificare un'eventuale reazione aspecifica, verranno utilizzati degli AMO di controllo, non specifici per la mutazione.

Valuteremo inoltre l'effetto nel tempo degli oligonucleotidi AMO, estraendo il mRNA dalle cellule trattate a 0, 8, 24, 72 e 84 ore. L'effetto dell'AMO sullo splicing verrà valutato mediante RT-PCR.

Risultati attesi: verifica dell'effetto degli AMO sulla linea cellulare della paziente; valutazione della dose necessaria a revertire la mutazione; misura della durata dell'effetto in vitro.

Tempo di esecuzione: 3 mesi

Costo dello step: 15000 €

Quarto step.

Analisi della proteina ATM in cellule trattate con oligonucleotidi AMO.

Per verificare se la correzione dello splicing anomalo permette la sintesi di una proteina ATM funzionale, eseguiremo un Western blot su estratto proteico da cellule linfoblasto ide trattate con AM. L'induzione della proteina ATM verrà eseguita incubando le cellule per 24 ore con AMO specifici, e la quantità di proteina ATM verrà valutata rispetto a cellule non trattate e cellule da soggetti normali e portatori di una mutazione troncante nel gene *ATM*. Valuteremo anche diversi tempi di esposizione da 24 a 84 ore. Anche in questo caso l'attività di AMO aspecifici verrà esaminata.

Risultati attesi: ci attendiamo di osservare una espressione di ATM nelle cellule della paziente vicina a quella di un controllo portatore

Tempo di esecuzione: 3 mesi

Costo dello step: 15000 €



Quinto step.

Analisi della funzione di ATM in cellule trattate con oligonucleotidi AMO.

Per verificare se la proteina prodotta è in grado di svolgere le proprie funzioni fisiologiche eseguiremo una serie di test sulle cellule linfoblasto idi della paziente dopo esposizione ad AMO:

1) analisi della auto-fosforilazione della proteina ATM al residuo Ser-1981, e della fosforilazione delle proteine SMC1 e p53 dopo esposizione a radiazioni ionizzanti (5Gy). Ci attendiamo una risposta simile a quella di un controllo normale.

2) Foci nucleari in cellule trattate con AMO: analizzeremo in immunofluorescenza i foci nucleari dopo esposizione delle cellule ad AMO e 1 Gy di radiazione ionizzante. La presenza di foci nucleari visibili con anticorpo anti Ser 1981-ATM, indicherà la correzione del fenotipo.

3) l'esposizione delle cellule di pazienti AT a radiazione ionizzanti provoco una citotossicità. Misureremo la vitalità cellulare mediante FACS a 48 ore dopo irradiazione. Le cellule incubate nelle precedenti 24 ore con AMO dovrebbero rispondere diminuendo la mortalità cellulare in seguito a radiazione.

Risultati attesi: ci attendiamo di dimostrare una reversione del fenotipo cellulare dopo esposizione ad AMO.

Tempo di esecuzione: 5 mesi

Costo dello step: 25000 €

Sesto step.

Studio di oligonucleotidi antisenso morfolinati (AMO) modificati con sequenze U7 in grado di correggere la mutazione IVS12-405C>T.

Per identificare varianti di oligo morfolinati in grado di aumentare il loro effetto sulla mutazione *IVS12-405C>T* seguiremo un recente lavoro di Goyenvalle e Davies (Muscle gene therapy: Method and Protocols, Methods in Molecular Biology, 709:179195). Scegliendo tra le sequenze AMO identificate nello step 2, modificheremo due oligonucleotidi antisenso in modo da aggiungere una coda U7-snrRNA. E' stato dimostrato che costrutti di questo tipo sono in grado di reclutare



proteine che bloccano il macchinario di splicing e rendere inefficiente i siti di legame anomali. Usando le strategie negli step 3-5 verificheremo se questi AMO modificati abbiano un'efficienza migliore.

Tempo di esecuzione: 5 mesi

Costo dello step: 25000 €

Settimo step.

Effetto off-target degli oligonucleotidi antisenso da usare in terapia.

Una volta identificati gli oligonucleotidi migliori, in grado di revertire l'effetto della mutazione *IVS12-405C>T*, procederemo con un'analisi di espressione genome-wide, per verificare un possibile effetto su regioni diverse da quella target. Usando tre linee di controlli normali, e la linea della paziente (tre repliche tecniche) si confronteranno cellule trattate e non trattate con AMO mutazione specifici. Le cellule dopo 24 ore di trattamento verranno lisate, l'mRNA estratto e quantificato. Infine, verrà eseguito un genome-wide expression profile usando una piattaforma Agilent.

Risultati attesi: ci attendiamo di dimostrare che, nei controlli, gli AMO non abbiano alcuna rilevanza nel pattern di espressione. Nella paziente cambieranno una serie di ATM ed i suoi target.

Tempo di esecuzione: 7 mesi

Costo dello step: 35000 €

Ottavo step.

Identificazione di mutazioni di splicing in nuovi pazienti A-T

Le tecniche di sequenziamento di "ultima generazione", cosiddette "high throughput next generation sequencing" hanno rivoluzionato il metodo in cui l'intero genoma può essere analizzato. Sulla base di queste tecniche, abbiamo messo a punto una metodica che permettono di isolare e sequenziare l'intera regione del gene ATM. Nella nostra casistica di pazienti A-T sono presenti almeno due casi in cui una sola delle due mutazioni è stata identificata, e ci aspettiamo di ricevere almeno 5 casi dalla collaborazione con il gruppo del Prof. R. Gatti (UCLA, Los Angeles, USA).



La regione genomica contenente il gene ATM di circa 150 Kb e' stata suddivisa in 32 frammenti parzialmente sovrapposti. Tali frammenti sono stati successivamente amplificati mediante PCR e quantificati in modo da ottenere una *mix* contenente quantita' equimolari di ogni frammento. Il sequenziamento dei frammenti cosi' ottenuti sara' effettuato dalla Baseclear, una ditta olandese specializzata nel sequenziamento ad alta risoluzione, mediante la piattaforma Illumina GA2X. I risultati provenienti dal sequenziamento verranno analizzati nel nostro laboratorio tramite l'impiego di sofisticati software in grado di elaborare contemporaneamente una notevole mole di dati grezzi.. Quando possibile si sequenzierà il paziente ed almeno un genitore.

Risultati attesi: Ci attendiamo di identificare altri pazienti con mutazioni che alterano lo splicing, che potranno entrare in un trial simile a quello in sviluppo per il nostro paziente indice.

Tempo di esecuzione: 4 mesi

Costo dello step: 40000 €



Conclusioni

Lo sviluppo delle tecnologie di sequenziamento ad alta risoluzione applicate alla ricerca di rare mutazioni nel gene ATM ha permesso l'identificazione di un paziente con una particolare mutazione (*IVS12-405C>T*) legata allo splicing del gene *ATM*.

Recenti progressi nell'ambito della genetica medica mostrano che alcune tecnologie come gli oligonucleotidi antisense morfolinati (AMO) possono correggere tali mutazioni.

Scopo di questo progetto è verificare mediante studi in vitro l'uso di AMO nel caso della mutazione *IVS12-405C>T*; valuteremo l'effetto a livello di mRNA, proteina e funzione della proteina. Cercherò di identificare altri pazienti AT con mutazioni simili. Infine valuteremo l'effetto di un numero selezionato di AMO sulla trascrizione globale, indicatore della possibile tossicità.

Questo progetto avrà la collaborazione del Prof. Richard Gatti (UCLA, Los Angeles, USA), che ha già eseguito studi simili su pazienti AT.

I risultati di questo lavoro potrebbero permettere di ottenere importanti risultati nella cura di un gruppo di pazienti con Atassia Telangiectasia.