

**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, 01/10/2010

Oggetto: presentazione progetto di ricerca anno 2010

**Titolo: Nuovi approcci per l'identificazione di mutazioni rare
in pazienti affetti da Atassia Telangiectasia**

Responsabile: *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 e' una rarissima malattia genetica dell'infanzia 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 bronchiti ricorrenti ed hanno un'aumentata predisposizione a linfomi e leucemie. Dal 1995 e' noto che la causa di questa patologia e' l'assenza della proteina ATM, a causa di alterazioni (mutazioni) del suo gene nel DNA dei pazienti. I genitori dei pazienti sono portatori asintomatici. Non esiste una terapia che sia in grado di fermare la progressione della malattia ne' 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.

Attualmente nel nostro laboratorio la ricerca di mutazioni nel gene ATM viene svolta attraverso l'impiego combinato di diverse metodiche che comprendono l'analisi di quattro marcatori microsatelliti fiancheggianti e interni al gene per lo studio degli aplotipi associati a mutazioni ricorrenti, l'analisi della porzione codificante la proteina ATM mediante DHPLC (esoni 4-65) e lo studio delle delezioni/duplicazioni mediante la tecnica MLPA. L'utilizzo di tutte queste tecniche ci ha permesso di trovare il 97% delle mutazioni nella casistica di pazienti AT giunti fino ad oggi nel nostro laboratorio. Questa percentuale e' al momento una delle più alte registrate tra tutti i laboratori nel mondo che si occupano della diagnostica dell'Atassia Telangiectasia.

Esiste tuttavia una minor percentuale di pazienti in cui le tecniche tradizionali non sono in grado di individuare una o entrambe le mutazioni nel gene. Questo perche' tali mutazioni si trovano probabilmente all'interno di estese porzioni introni che ,quindi



non codificanti, del gene che non vengono normalmente analizzate tramite la tecnica del DHPLC, oppure in regioni regolatorie a monte del gene stesso che sono in grado di alterarne l'espressione.

Base di partenza e prima parte del progetto

In questi ultimi anni, sia in ambito diagnostico che di ricerca, 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, sono state messe a punto metodiche che permettono di isolare e quindi sequenziare solo le porzioni genomiche di interesse, rendendo così accessibili i costi di gestione anche ai laboratori di ricerca e diagnostica.

Attualmente nella nostra casistica di pazienti AT è presente un unico caso in cui una sola delle due mutazioni è stata identificata. Il paziente, giunto alla nostra attenzione nel 2005, presentava un fenotipo clinico piuttosto lieve rispetto ai casi AT classici con modesta atassia cerebellare. La conferma della diagnosi di AT è stata fatta attraverso valutazione dei livelli di proteina ATM che hanno rivelato una quantità di proteina molto bassa ma tuttavia non assente. A livello molecolare l'analisi DHPLC ha rivelato la presenza di una mutazione *nonsense* sull'allele paterno. Tuttavia l'impiego combinato delle diverse tecniche da noi utilizzata per la ricerca di mutazioni nel gene non hanno portato all'identificazione della seconda mutazione ereditata dalla madre.

Quello che ci proponiamo di fare durante il primo anno di lavoro del progetto è la messa a punto una strategia per il sequenziamento completo dell'intera regione genomica comprendente sia la porzione codificante del gene, sia le regioni trascritte e non tradotte a monte e a valle del gene e la regione del promotore. Per fare ciò la regione genomica di circa 150Kb è stata suddivisa in 32 frammenti parzialmente sovrapposti. Tali frammenti sono stati successivamente amplificati mediante PCR e quantificati in modo da ottenere una *mix* contenente quantità equimolari di ogni frammento. Il sequenziamento dei frammenti così ottenuti sarà effettuato dalla



DNAvision, una ditta belga 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.

Seconda parte

Nella seconda parte del progetto ci proponiamo di sviluppare un'altra tecnica di sequenziamento ad alta risoluzione, denominata "Microarray DNA Capture", che si basa sull'impiego di piattaforme microarray sulle quali sono depositate le sonde delle regioni genomiche di interesse e su cui viene ibridato il DNA del campione da sequenziare.

In breve il DNA genomico da analizzare viene digerito in modo da ottenere frammenti di 100-800 pb a cui vengono legate delle piccole code (cosiddetti "adapters") che serviranno per amplificare e quindi arricchire il materiale da sequenziare. Il DNA così preparato viene ibridato sull'array su cui sono presenti sonde oligonucleotidiche a RNA corrispondenti alle regioni genomiche di interesse. A seguito dei successivi lavaggi, il DNA ibridato viene eluito, amplificato e purificato per essere pronto per il sequenziamento. Queste nuove tecniche hanno aperto la possibilità di effettuare lo screening di mutazioni anche su diversi geni contemporaneamente ed è proprio su questi studi che ci proporremo di portare avanti in futuro il nostro progetto di ricerca.

Questa parte del progetto di ricerca è quindi focalizzata sull'analisi sia di quei pazienti che giungono alla nostra attenzione con una descrizione incompleta del fenotipo clinico, quindi non riconducibile ad una diagnosi certa di Atassia Telangiectasia, sia dei pazienti descritti come AT ma che risultano negativi ad una prima analisi del gene.

Conclusioni

Lo sviluppo delle tecnologie di sequenziamento ad alta risoluzione applicate alla ricerca di rare mutazioni nel gene ATM potrebbe risultare utile nell'identificazione di



regioni regolatorie in grado di alterare l'espressione del gene e quindi della proteina. Tali regioni potrebbero quindi diventare dei bersagli per terapie mirate in grado di ripristinare livelli di proteina sufficienti quantomeno per rallentare la progressione della malattia.

Contemporaneamente, la tecnica del DNA Capture Array potrebbe essere applicata per il sequenziamento mirato delle regioni genomiche contenenti, oltre al gene ATM, i geni responsabili delle patologie neurodegenerative che vanno in diagnosi differenziale con l'Atassia Telangiectasia, ovvero MRE11 (responsabile dell'ATLD, AT-Like Disease), SYNE-1 (responsabile di una nuova forma di Atassia spinocerebellare recessiva), APTX (responsabile dell'Aprassia Oculomotoria tipo1) e SETX (responsabile della Aprassia Oculomotoria tipo2).

La nostra speranza e' che l'applicazione di queste tecniche possa creare nuove strategie per l'analisi di mutazioni nei geni coinvolti nello sviluppo delle atassie cerebellari recessive.

Richiesta Fondi

Spese per reagenti di biologia cellulare e molecolare	€ 10000
Spese per personale /anno	€ 25000
Spese per sequenziamento high-throughput	€ 6000
Spese per software di lettura risultati	€ 5000
Totale richiesta	€ 46000