PROGETTO DI RICERCA

Il progetto è incentrato sulla caratterizzazione biochimica dei prodotti proteici codificati da varianti splicing del gene ATM. Oltre alla precedente variante di splicing denominata ATMdexa1 (miniATM), già caratterizzata, è stato possibile individuare in campioni biologici di pazienti AT, altri 2 messaggeri denominati 3-52 e 4-53. Inoltre verrà creata una variante chiamata "sintetica" contenente alcuni domini funzionali di ATM.

La prima parte del progetto è incentrata nel clonaggio molecolare, in opportuni vettori, delle molecole precedentemente discusse, da poter essere poi utilizzati nella produzione di vettori virali, di terza generazione, al fine di trasdurre linee cellulari AT umane. I potenziali prodotti proteici "ATM variants" saranno monitorati tramite western blots e microscopia a fluorescenza. Possibilmente, le potenziali proteine generate in cellule di mammifero saranno anche prodotte in sistemi di espressione batterica, es. sistema pET BL21DE3 o pGEX BL21, e/o in sistemi di espressione di lievito, tramite vettori pYES2 o pFL61 e ceppi INVsc1, al fine di purificare le proteine in forma ricombinante, da poter essere successivamente utilizzate per test *funzionali in vitro o ex-vivo*.

Gli effetti biochimici e biomolecolari saranno svolti confrontando linee cellulari umane WT con linee AT trasdotte o meno. Un primo test di funzionalità sarà l'attivazione di γH2AX in seguito a danno al DNA indotto da fattori chimici o da radiazione elettromagnetica/ionizzante. Sarà in questa fase possibile valutare anche l'attivazione di P53, e l'eventuale auto fosforilazione di ATM endogena (mutata ma presente) da parte delle "ATM variants" esogene.

Altri studi funzionali potranno essere svolti tramite le proteine ricombinanti prodotte. *In vitro* sarà valutata la capacità chinasica delle "ATM variants" tramite l'utilizzo di ATP marcato ^{32}P su substrato PHAS. L'attività chinasica ex-vivo sarà svolta analizzando l'attivazione sia di γH2AX, che CHK1 e 2, P53 e ATM endogena. Studi di complementazione funzionale in lievito, tramite opportuni ceppi (KSC1368 single mutant for the ATM yeast homolog, tel1) e KSC1402 (double mutant for homologues of ATM and ATR, mec1-81, tel1) permetteranno ulteriormente di saggiare l'attività funzionale delle varianti in oggetto di studio.

La seconda parte dello studio sarà incentrata sulla possibilità di svolgere un delivery selettivo degli acidi nucleici selezionati (DNA o and mRNA) tramite nanoparticelle fosfolipidiche opportunamente modificate con proteine di membrana, da poter essere indirizzate su adeguate cellule target, come ad esempio, cellule neuronali derivanti da iPS AT che saranno probabilmente disponibili entro 12-15 mesi. Non si esclude il possibile utilizzo di modelli murini se gli studi cellulari avranno esito positivo.

Settore Ricerca e Terza Missione
Ufficio Ricerca e Relazioni Internazionali
Via Valerio, 9 – 61029 Urbino (PU)
Tel. +39 0722 30 5330 – 4403 - 4404
ricerca@uniurb.it