

Milano, 29/01/2008

Fondazione Giuseppe Tomasello ONLUS

Oggetto: risultati dell'analisi mutazionale eseguita con LightScanner

Gentili signori Tomasello,

in data 22/01/08 ci è stato consegnato lo strumento "LightScanner" (Idaho Technology Inc.) per effettuare prove di valutazione sulla efficienza e sensibilità della macchina.

Il LightScanner è uno strumento di nuova generazione, di semplice utilizzo, che consente di analizzare 96 campioni di DNA in 5 minuti.

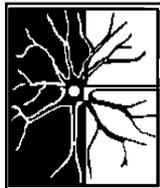
Il principio di funzionamento si basa sull'analisi delle curve di dissociazione di frammenti di DNA contenenti appaiamenti errati a causa della presenza di mutazioni. Le curve di dissociazione vengono valutate mediante l'utilizzo di prodotti di PCR fluorescenti utilizzando l'assorbanza nell'ultravioletto. All'interno dello strumento i frammenti subiscono una denaturazione termica (da 20°C e 95°C) che produce una curva di fluorescenza che varia dal 100% (campione non denaturato) allo 0% (campione completamente denaturato).

Poiché ogni frammento di DNA ha una curva di denaturazione specifica, in presenza di una sostituzione nucleotidica (mutazione) il profilo della curva di denaturazione si modifica. Caricando nello strumento campioni ignoti è possibile confrontare i profili delle curve di denaturazione ottenute con quelli di campioni noti.

Si effettua quindi un raggruppamento dei campioni in base alla somiglianza dei profili di denaturazione e una classificazione in "profili normali" o "profili alterati" che richiedono ulteriori analisi.

Abbiamo utilizzato il LightScanner per l'analisi degli esoni 15 e 16 del gene NDUFS1, in cui sono state riscontrate le mutazioni del piccolo Giuseppe.

Lo strumento è stato in grado di classificare come alterati i profili di denaturazione ottenuti dall'analisi degli esoni 15 e 16 in cui erano presenti le mutazioni. I grafici allegati mostrano chiaramente le differenze nei profili di dissociazione. Abbiamo inoltre effettuato altre prove su diversi geni di cui abbiamo a disposizione prodotti di PCR da soggetti normali e pazienti portatori di mutazioni specifiche. Si tratta dei geni codificanti parkina, responsabile di una forma di malattia di Parkinson ereditaria, POLG1, responsabile di numerose malattie



mitocondriali ad eredità autosomica recessiva o dominante, e alcuni geni del complesso distrofia-sarcoglicani, responsabili di forme di distrofia muscolare progressiva (malattia di Duchenne of distrofie dei cingoli). In tutti i casi i riscontri sono stati positivi, e l'analisi ha permesso di differenziare ed identificare inequivocabilmente il campione mutato da quello normale.

Le prove da noi effettuate confermano pertanto che il LightScanner è uno strumento strategico per l'implementazione tecnologica ad alta efficienza e a basso costo nella diagnostica molecolare delle patologie ereditarie, comprese le malattie mitocondriali (segnatamente i difetti molecolari del complesso I).

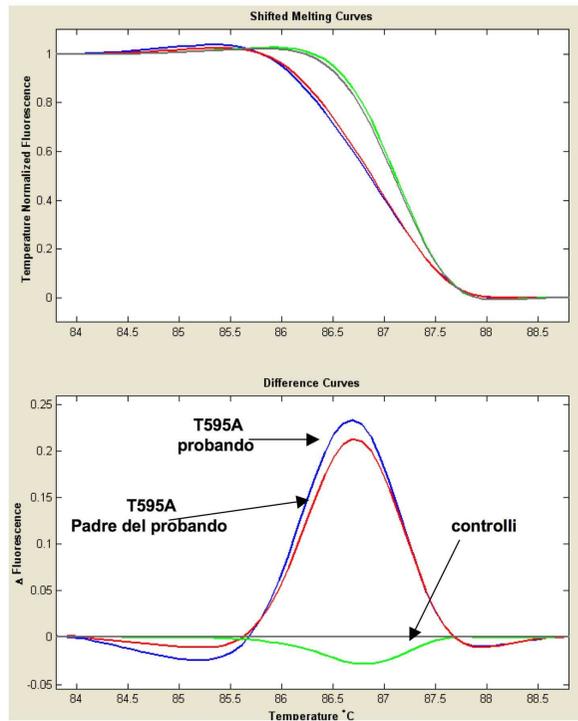
Il suo utilizzo continuo e costante ci consentirà di delineare l'alterazione genetico-molecolare in un numero sempre maggiore di pazienti con difetto biochimico definito.

Distinti saluti

Dott. Massimo Zeviani  
Direttore Unità Operativa



### Esone 16: ricerca T595A



### Esone 15: ricerca R557X

