

Progetto per assegno di ricerca post-dottorato finanziato dalla Fondazione Vialli e Mauro, vincitore del bando dott. Giovanni De Marco

Titolo: TDP-43 in linfomonociti circolanti come possibile biomarcatore in vivo di sclerosi laterale amiotrofica (SLA)

Parole chiave: SLA, biomarcatore, genetica, linfomonociti circolanti, TDP-43

Descrizione del progetto

TransActive Response DNA binding protein 43 (TDP-43), codificata dal gene TARDBP, è il principale componente delle inclusioni ubiquitinate citoplasmatiche (Ub) riscontrabili nei motoneuroni corticale e midollari dei pazienti affetti da SLA, descritta recentemente anche nella glia; dimostrata inizialmente all'interno dei corpi di inclusione citoplasmatici (Ub), in seguito è stata trovata anche all'esterno di tali corpi. Tale reperto è stato descritto sia in pazienti affetti da SLA con mutazione del gene TARDBP (SLA/TDP+), che in forme sporadiche o associate a mutazione per tutti i geni responsabile di forme familiari (SLA/TDP-), eccetto le forme con mutazione per la SOD1. Recentemente in LMC ottenuti da prelievi di pazienti con SLA di nuova diagnosi abbiamo riscontrato, come nei motoneuroni, accumuli di TDP-43 nel citoplasma e depauperamento nel nucleo nei TDP+ ed in circa il 50% dei TDP- (De Marco G et al. Acta Neuropathol 2011). Tali risultati preliminari devono essere confermati su un numero più ampio di pazienti e confrontati con analogo numero di controlli sani e di pazienti affetti da altre patologie neurodegenerative (AD, PD, HD e MSA), utilizzando inoltre nuovi approcci sperimentali (immunocito-fluorescenza). La durata dello studio prevista è di 2 anni.

Metodi

Verranno reclutati 50 pazienti affetti da SLA, consecutivamente diagnosticati presso il Centro Regionale Esperto per la SLA (CRESLA) di Torino, sottoposti a deep phenotyping (valutazione clinica, neurofisiologica, neuropsicologica, neuroimaging esteso e analisi genetica per i geni SOD1, C9ORF72, TARDBP, FUS/TLS), 50 controlli sani e 50 pazienti affetti da altre patologie neurodegenerative (AD, PD, HD e MSA). Inoltre verranno reclutati i parenti di primo grado dei pazienti affetti da SLA/TDP+. Lo studio verrà sottoposto ad approvazione del comitato etico. Il prelievo di LMC verrà eseguito al momento della diagnosi (t-0) a 1 anno (t-1). Nella sezione di Biochimica, Dipartimento di Medicina e Oncologia Sperimentale di Torino, i LMC saranno ottenuti mediante centrifugazione su gradiente di densità, e testati per la vitalità con trypan blu, saranno divisi in due aliquote utilizzate separatamente per visualizzare TDP-43 nel citoplasma e nucleo mediante: a) SDS-PAGE-western-immuno-blotting eseguito su entrambe le frazioni, separate con un kit disponibile in commercio (De Marco G et al. Acta Neuropathol 2011), utilizzando un anticorpo anti-TDP-43 policlonale, oltre quello monoclonale già testato, e saggiando l'immunoreattività sviluppata con il sistema ECL mediante l'apparecchiatura Chemi-Box CCD gel imaging system ed il software Genesnap image acquisition (Syngene); b) cito-immunofluorescenza sviluppata nelle cellule fissate su vetrino, permeabilizzate ed incubate in parallelo con i due anticorpi anti-TDP-43, e con un anticorpo anti-ubiquitina e successivamente con anticorpi secondari legati ad addotti fluorescenti, e rivelata a definita λ di eccitamento con un il microscopio Leica DMI 4000 B ed eventualmente confocale. I dati verranno analizzati utilizzando le Student t-test, con limite di significatività statistica $<0,05$.

Risultati attesi

Se sarà confermato che nei LMC la TDP-43 di tutte le forme di SLA/TDP+ e in almeno l'80% della SLA/TDP- e nei parenti asintomatici di primo grado viene reindirizzata dal nucleo al citoplasma, il profilo di espressione di TDP-43 in LMC potrà essere considerato un indicatore affidabile e quindi un biomarcatore molecolare

utilizzabile per la diagnosi clinica, come marcatore di progressione e quindi di prognosi, come indicatore di efficacia in trial clinici, per la diagnosi differenziale con altre malattie, per predire il rischio di malattia e quindi per stimolare la progettazione di terapie preventive. Infine la disponibilità di LMC non richiede procedure invasive e costose e la visualizzazione delle immagini con immuno-citofluorescenza può essere ottenuta in un tempo relativamente breve (24/36 ore).

Obiettivi

Gli obiettivi del progetto sono: a) confermare la presenza della proteina TDP-43 nel citoplasma di linfomonociti circolanti (LMC) e la sua riduzione nel nucleo con tecnica di western-immunoblot, su un'ampia serie di pazienti SLA al momento della diagnosi e longitudinalmente; b) stabilire la specificità e la sensibilità di questa metodica; c) valutare l'efficacia dell'immuno-citofluorescenza nel dimostrare l'alterata localizzazione sub-cellulare della TDP-43.