

## **Ruolo protettivo della proteina HSPB8 nelle malattie del motoneurone (MMNs)**

**Giovani Ricercatori 2011**

**Responsabile della ricerca: VALERIA CRIPPA**

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e l'Atrofia Muscolare Spinale e Bulbare (SBMA) sono due malattie del motoneurone (MMNs), fatali, attualmente non curabili, caratterizzate da elevati costi per la società e le famiglie dei malati. La patogenesi di queste malattie è poco nota. Sono associate a morte dei motoneuroni e sono legate alla presenza di proteine che assumono una conformazione errata (*misfolded*) e formano aggregati proteici capaci di alterare diversi meccanismi intracellulari con effetti neurotossici. Gli aggregati derivano da una non efficiente rimozione delle proteine che hanno una conformazione errata (*misfolded*) e contengono le proteine associate alla malattia (ad es. le forme mutate del recettore degli androgeni, associato alla SBMA, e delle proteine SOD1, TDP-43 e FUS, associate alla SLA), componenti del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) e proteine chaperones, suggerendo l'esistenza di alterazioni nel sistema di controllo qualità delle proteine (*protein quality control*: PQC). Le proteine chaperones riconoscono e legano le proteine *misfolded*, proteggendo i motoneuroni dalla neurotossicità legata alla presenza degli aggregati proteici. Anche alterazioni nel metabolismo del RNA contribuiscono alle MMNs e le forme mutate di TDP-43 e FUS si localizzano erroneamente, sotto forma di aggregati, a livello dei granuli da stress (SG), siti di metabolismo del mRNA nel citoplasma. Questo suggerisce che l'aggregazione proteica e l'alterazione del metabolismo del RNA potrebbero essere correlati e che la modulazione di tali eventi potrebbe risultare protettiva nelle MMNs.

La proteina chaperone HSPB8 potrebbe essere un buon candidato. Infatti, in topi SOD1-SLA è stato dimostrato che i motoneuroni che sopravvivono mostrano una sovra-espressione di HSPB8, in modo analogo a quanto osservato in pazienti SLA. E' stato dimostrato che HSPB8, insieme alla proteina BAG3, previene l'aggregazione delle forme mutate di SOD1 e TDP-43 e ne aumenta la degradazione via autofagia. Inoltre, HSPB8 interagisce con le proteine che legano il RNA ed è reclutata negli SG. Quindi, HSPB8 potrebbe aiutare a ristabilire/mantenere sia il PQC sia il metabolismo del RNA, favorendo dunque la sopravvivenza dei motoneuroni.

Questo progetto ha l'obiettivo di identificare se e come HSPB8 possa esercitare un ruolo protettivo nella SLA e nella SBMA.

Il rationale del progetto si basa sull'osservazione che, nei motoneuroni, l'attivazione dell'autofagia e la sovra-espressione di HSPB8 sono risposte cellulari protettive per eliminare le proteine con conformazione errata, che sfuggono alla degradazione da parte dell'UPS. Inoltre, dati preliminari indicano che HSPB8 sia coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi di RNA e proteine. Una caratterizzazione dettagliata del meccanismo di azione di HSPB8 potrebbe quindi aprire nuove strade per il disegno di composti per il trattamento delle MMNs.

Obiettivi:

*1. Caratterizzazione del ruolo protettivo di HSPB8 nella rimozione via autofagia delle proteine misfolded responsabili della SLA e della SBMA.*

In questo obiettivo sarà effettuata un'analisi dettagliata di come HSPB8 (insieme ai suoi partners BAG3, CHIP e Hsc70) faciliti l'autofagia e/o indirizzi in modo selettivo le proteine *misfolded* alla degradazione.

Saranno eseguiti una serie di esperimenti per identificare difetti nel flusso autofagico in modelli motoneuronali (cellule NSC34) di SLA e SBMA, che esprimono le varie forme mutate di AR, SOD1, TDP-43 e

FUS/TLS. Per identificare le diverse specie aggregate saranno utilizzate una serie di tecniche differenti (ad esempio, SDSPAGE in condizioni riducenti e non e Filter Retardation Assay (FTA), capaci di discriminare le proprietà biochimiche delle specie proteiche ad alto peso molecolare). L'immunocitochimica (ICC), la microscopia confocale ed elettronica (EM) saranno utilizzate per individuare la sede intracellulare di formazione degli aggregati e se questi colocalizzano con o sono adiacenti a marcatori autofagici, e se colocalizzano con HSPB8 e i suoi partners. Nei modelli di MMNs, il processo autofagico sarà studiato valutando l'espressione e la distribuzione della proteina p62/sequestosoma 1 (SQSTM1), che oligomerizza e forma i *p62 bodies* quando il flusso autofagico è bloccato, e l'espressione e la lipidazione della *microtubule associated protein 1 light chain 3* (LC3). A tale scopo, saranno utilizzate tecniche di Real-Time PCR, Western Blotting e ICC. Questi studi permetteranno di chiarire come l'autofagia sia affetta dalla presenza delle proteine *misfolded*, con tendenza ad aggregare, associate alla SLA e alla SBMA.

Una conoscenza dettagliata delle alterazioni nel processo autofagico nei modelli SLA e SBMA sarà la base per la caratterizzazione dell'attività di HSPB8 e di come, nello specifico, HSPB8 eserciti la sua azione protettiva (attivazione o ripristino del flusso autofagico, specifico indirizzamento dei cargo da degradare ai vacuoli autofagici). Nei modelli MMNs saranno valutati gli effetti della sovra-espressione di HSPB8 (e dei suoi partners) e, in parallelo, del silenziamento dell'espressione di HSPB8 e dei suoi partners, sulle forme mutate di AR, SOD1, TDP-43, e FUS/TLS e sul flusso autofagico.

### *2. Studio del ruolo protettivo di HSPB8 in modelli cellulari e di Drosophila (Dm) di SLA, caratterizzati dalla formazione di aberranti granuli da stress (SG).*

Si valuterà come la sovra-espressione o il silenziamento di HSPB8 influisca sulla mislocalizzazione nucleo/citoplasma, sull'aggregazione e sul reclutamento negli SG delle forme mutate di TDP-43 e FUS. Le dinamiche di assemblaggio/disassemblaggio degli SG saranno quindi studiate.

La presenza di forme mutate di TDP-43 e FUS è associata a una riduzione della traduzione di specifici mRNA, essenziali per la funzionalità e la vitalità dei motoneuroni (es. NFL, HDAC6 e G3BP). Si valuteranno i livelli di espressione di questi mRNA e l'effetto della sovra-espressione e del silenziamento di HSPB8 sulla loro stabilità e sui livelli totali.

Infine, l'effetto protettivo *in vivo* di HSPB8 sarà valutato utilizzando modelli disponibili di Drosophila (Dm) di SLA e SBMA e mosche che esprimono o hanno silenziato la HSPB8 endogena. L'espressione di queste proteine sarà indirizzata in vari tipi cellulari (ad es. negli occhi, nei motoneuroni) e l'effetto protettivo di HSPB8 sarà valutato analizzando diversi parametri, come ad esempio la degenerazione oculare, il comportamento motorio, la sopravvivenza, la morfologia e il numero dei motoneuroni.

### *3. Identificazione di composti capaci di indurre l'espressione di HSPB8 nei motoneuroni.*

Induttori chimici dell'espressione di HSPB8 in motoneuroni saranno screenati tra una libreria commerciale di composti. Tali composti saranno testati su una linea cellulare motoneuronale murina (NSC34) e su una linea neuronale umana (SH-SY5Y), stabilmente trasfettate con un costrutto reporter che contiene la luciferasi di lucciola sotto il controllo del promotore umano di HSPB8. I composti attivi saranno, in primo luogo, testati per la loro capacità di indurre l'espressione di HSPB8 endogena nei modelli SLA e SBMA. In seguito, saranno testati per tossicità, IC50 e la loro azione protettiva, utilizzando le tecniche descritte negli obiettivi 1 e 2. I composti attivi, non tossici, saranno testati per la loro capacità di indurre l'espressione dell'omologo funzionale di Dm di HSPB8. I composti capaci di indurre l'espressione di Dm-HSPB8 (se ne sarà identificato qualcuno) saranno ulteriormente valutati per la loro capacità di modulare la severità e la progressione di SLA e SBMA, *in vivo*, trattando le Dm SLA e SBMA.