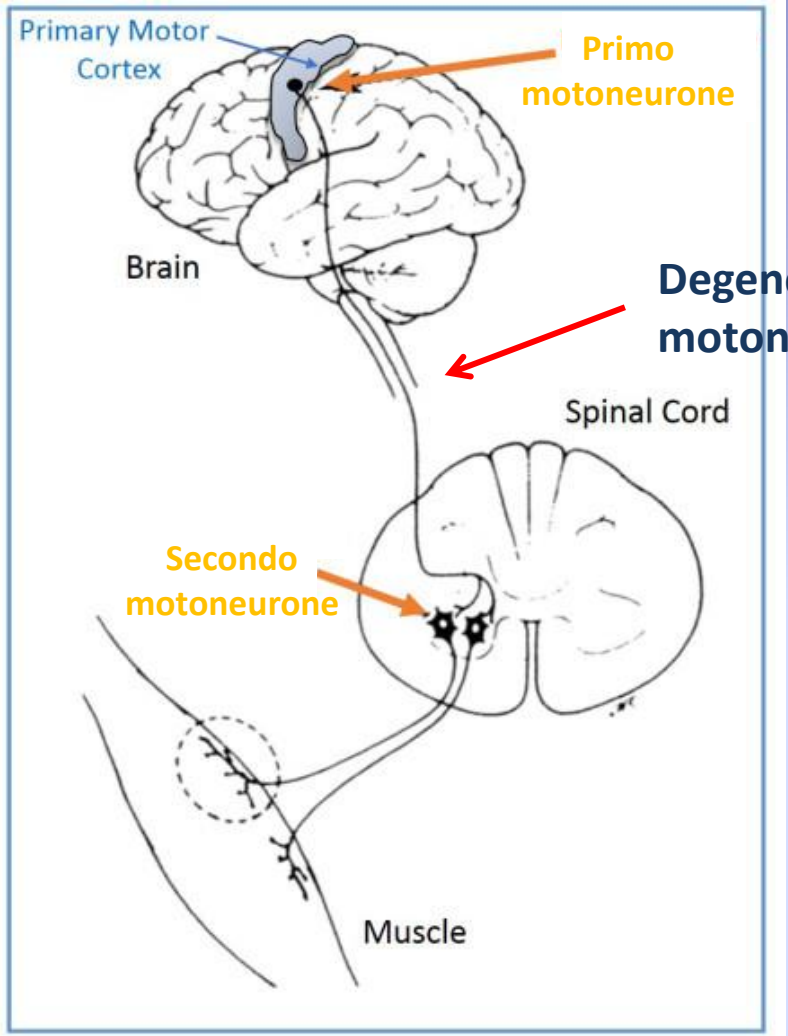
Meccanismi patogenetici nelle P.P.S.: focus sull'autofagocitosi

Dott.ssa Chiara Vantaggiato
Laboratorio di Biologia Molecolare,
IRCCS E. Medea-La Nostra Famiglia, Bosisio Parini

EUGENIO MEDEA | ASSOCIAZIONE la Nostra Famiglia

PARAPARESI SPASTICHE EREDITARIE



Un gruppo di patologie neurodegenerative molto eterogeneo dal punto di vista clinico e genetico caratterizzato da progressiva spasticità e debolezza degli arti inferiori

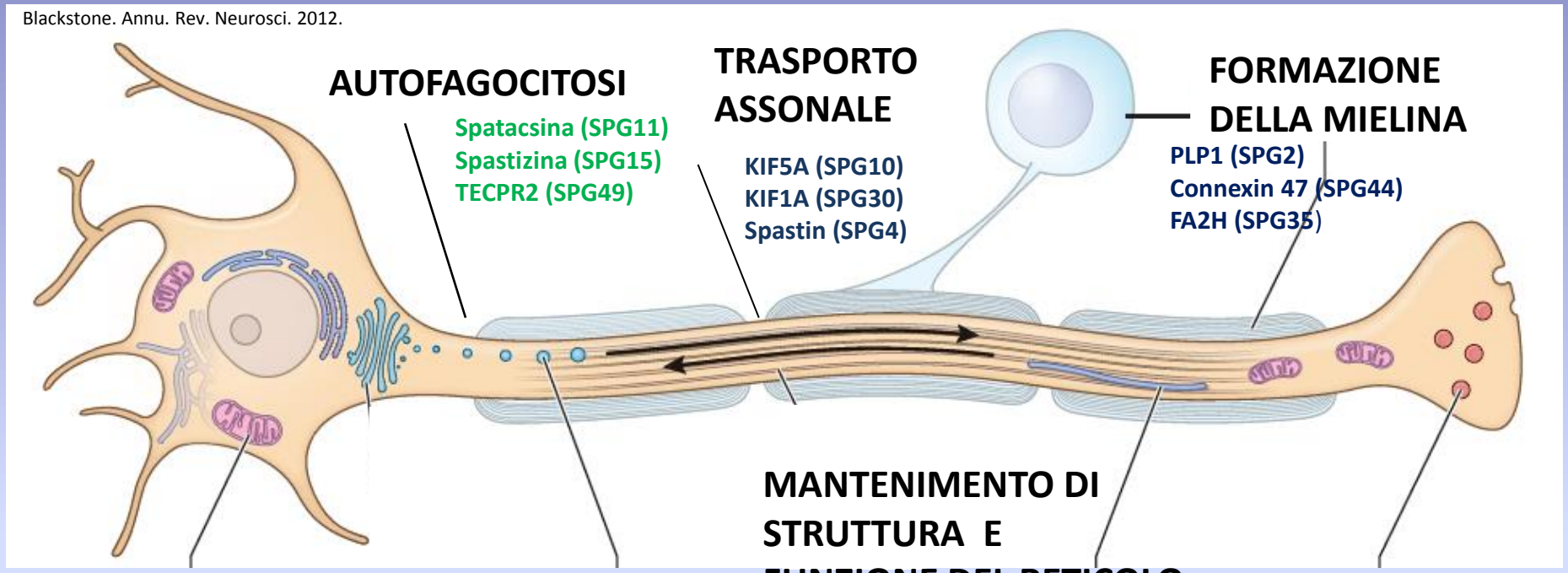
Degenerazione dell'assone del primo motoneurone nel tratto corticospinale

I motoneuroni richiedono
- **un elevato metabolismo energetico**
- **un efficiente sistema di trasporto lungo l'assone**
- **meccanismi di comunicazione altamente regolati**

sono più sensibili di altre cellule a alterazioni di questi processi

PROCESSI CELLULARI COINVOLTI NELLA PATOGENESI DELLE PPS

Blackstone. Annu. Rev. Neurosci. 2012.



AUTOFAGOCITOSI

Spatacsina (SPG11)
Spastizina (SPG15)
TECPR2 (SPG49)

TRASPORTO ASSONALE

KIF5A (SPG10)
KIF1A (SPG30)
Spastin (SPG4)

FORMAZIONE DELLA MIELINA

PLP1 (SPG2)
Connexin 47 (SPG44)
FA2H (SPG35)

FUNZIONALITA' MITOCONDRIALE

Paraplegin (SPG7)
Hsp60 (SPG13)
Spartin (SPG20)
REEP1 (SPG31)
C12orf65 (SPG55)
Opa3, mtATPase6

METABOLISMO LIPIDICO

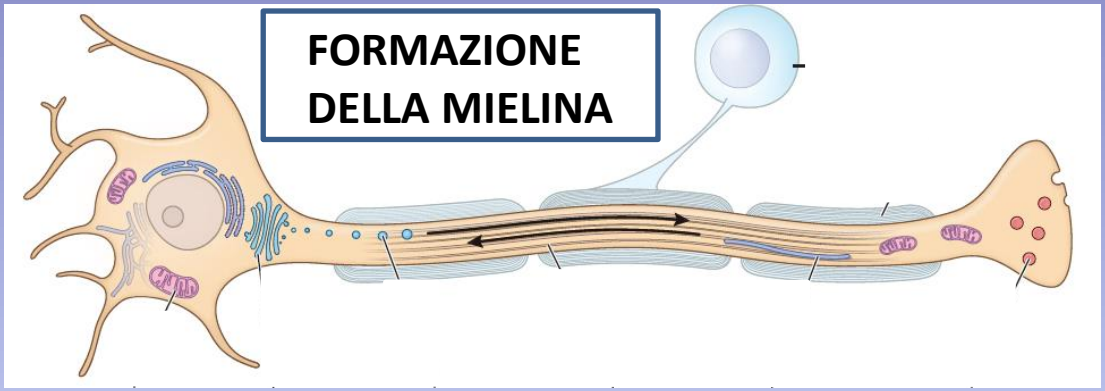
Atlastin1 (SPG3A)
Spastin (SPG4)
REEP1 (SPG31)
Erlin2 (SPG18)
Spartin (SPG20)
Seipin (SPG17)
DDHD1 (SPG28)
DDHD2 (SPG54)
NTE (SPG39)

MANTENIMENTO DI STRUTTURA E FUNZIONE DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO

Atlastin 1 (SPG3A)
Spastin (SPG4)
REEP1 (SPG31)
Reticulon 2 (SPG12)
REEP2 (SPG72)
ARL6IP1 (SPG61)
RAB3GAP2 (SPG69)
ERLIN2 (SPG18), ERLIN1 (SPG62)

TRAFFICO ENDOSOMALE

Atlastin1 (SPG3A), Spastin (SPG4), NIPA1 (SPG6), Strumpellin (SPG8), Spartin (SPG20), Maspardin (SPG21), VPS37A (SPG53), Spatacsin (SPG11), Spastizin (SPG15), AP5Z1 (SPG48), AP4B1 (SPG47), AP4M1 (SPG50), AP4E1 (SPG51), AP4S1 (SPG52)



La mielina è una guaina lipidica che viene prodotta e organizzata dalla glia, avvolge l'assone e permette la trasmissione dell'impulso nervoso.

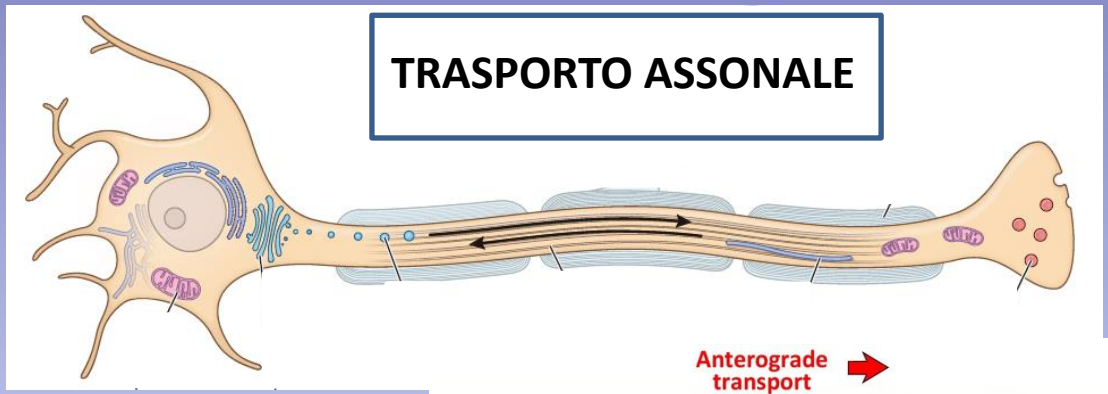
PLP1 (SPG2) Regola lo sviluppo della glia
Connexin 47 (SPG44) Formazione della mielina
MAG

FA2H (SPG35) sintesi di sfingolipidi
(precursori dei costituenti della mielina)

Science **280** (5369), 1610-1613.
DOI: 10.1126/science.280.5369.1610

Axonal Swellings and Degeneration in Mice Lacking the Major Proteolipid of Myelin

Ian Griffiths, Matthias Klugmann, Thomas Anderson, Donald Yool, Christine Thomson, Markus H. Schwab, Armin Schneider, Frank Zimmermann, Mailise McCulloch, Nancy Nadon, Klaus-Armin Nave*

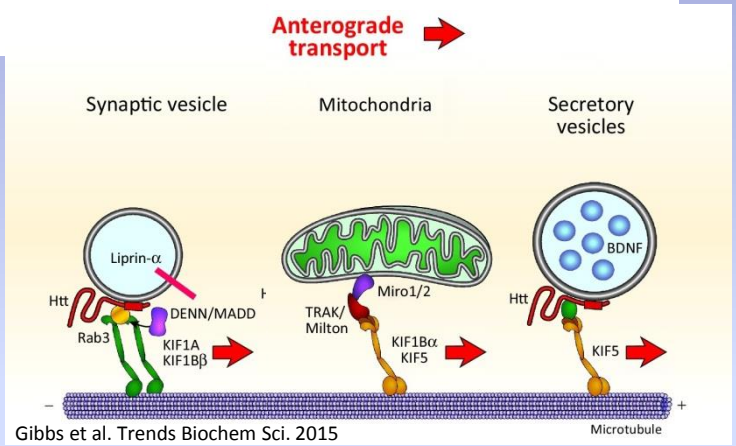


TRASPORTO ASSONALE

I MN richiedono un trasporto assonale efficiente per
-distribuire proteine, lipidi, organelli e altre molecole lungo l'assone
-localizzare gli organelli in distretti specifici della cellula

KIF5A (SPG10)
KIF1A (SPG30)

Proteine motore che mediano il trasporto anterogrado



Gibbs et al. Trends Biochem Sci. 2015

Spastin (SPG4)
proteina associata ai microtubuli

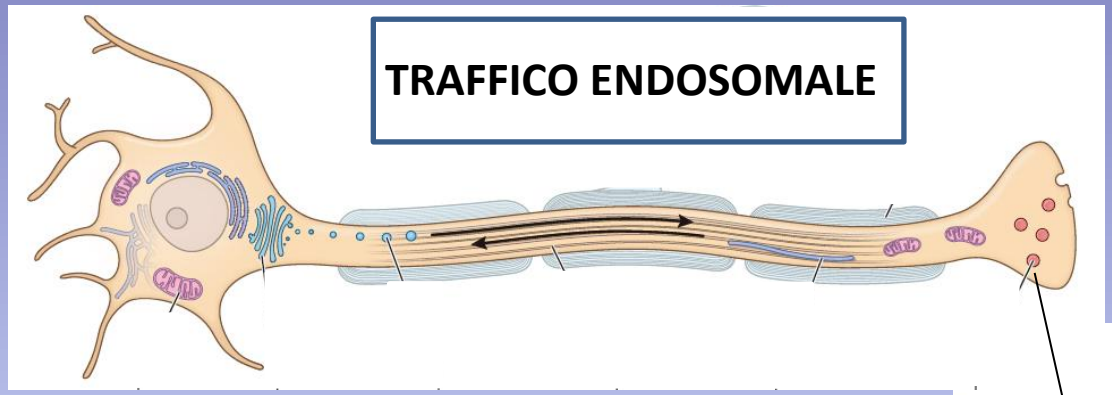
Neurogenetics (2012) 13:169–179
DOI 10.1007/s10048-012-0324-y

ORIGINAL ARTICLE

Axonal transport deficit in a *KIF5A*$^{-/-}$ mouse model

Kathrin N. Karle · Diana Möckel · Evan Reid · Ludger Schöls

Le mutazioni determinano
-alterazioni del trasporto assonale
-accumulo di organelli nel corpo cellulare
-il mancato apporto di neurofilamenti e organelli alle sinapsi



TRAFFICO ENDOSOMALE

Ruolo dell'endocitosi:
- internalizzare componenti e nutrienti
- regolare il signalling dei recettori

Atlastin1 (SPG3A)
Spastin (SPG4)
NIPA1 (SPG6)

Regolano il traffico e la degradazione del recettore per BMP

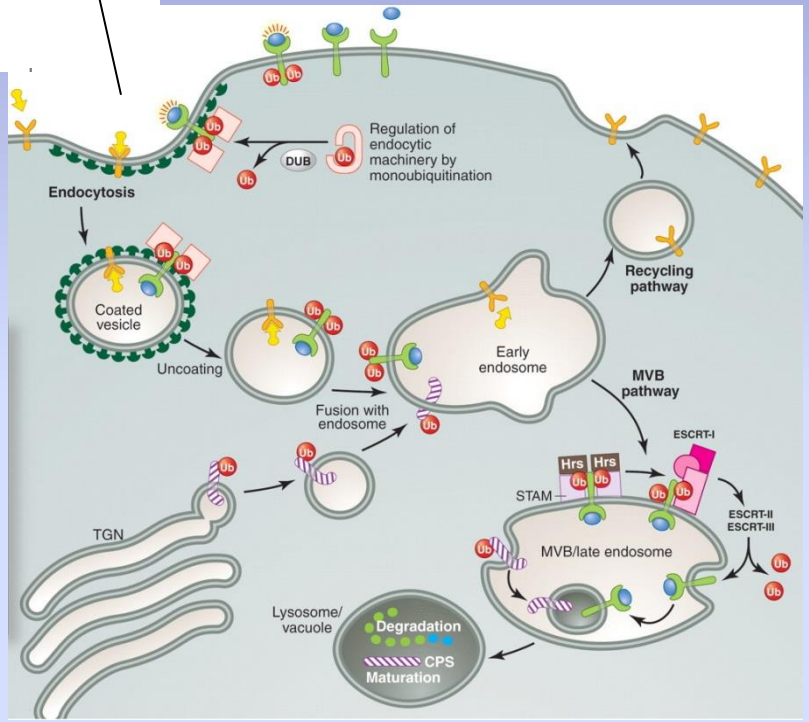
Regolano il traffico e la degradazione del recettore per EGF

VPS37A (SPG53)
Spartin (SPG20)
Spatacsin (SPG11)
Spastizin (SPG15)
AP5Z1 (SPG48)

Formazione delle vescicole

Strumpellin (SPG8)
Maspardin (SPG21)
AP4B1 (SPG47)
AP4M1 (SPG50)
AP4E1 (SPG51)
AP4S1 (SPG52)

Traffico golgi-endosomi



Mukhopadhyay and Riezman. Science 2007

Le mutazioni determinano:
-difetti nel signalling dei recettori
-accumulo di endosomi

J Neuropathol Exp Neurol
Vol. 72, No. 11
November 2013
pp. 1016–1028
Copyright © 2013 by the American Association of Neuropathologists, Inc.

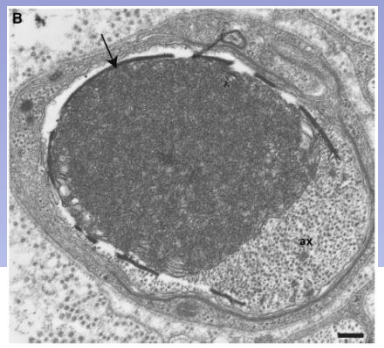
ORIGINAL ARTICLE

OPEN

Pathogenesis of Autosomal Dominant Hereditary Spastic Paraplegia (SPG6) Revealed by a Rat Model

Fumihiro Watanabe, PhD, William D. Arnold, MD, Robert E. Hammer, PhD, Odelia Ghodsizadeh, Harmeet Moti, Mackenzie Schumer, Ahmed Hashmi, Anthony Hernandez, Amita Sneh, Zarife Sahenk, MD, PhD, and Yaz Y. Kisanuki, MD

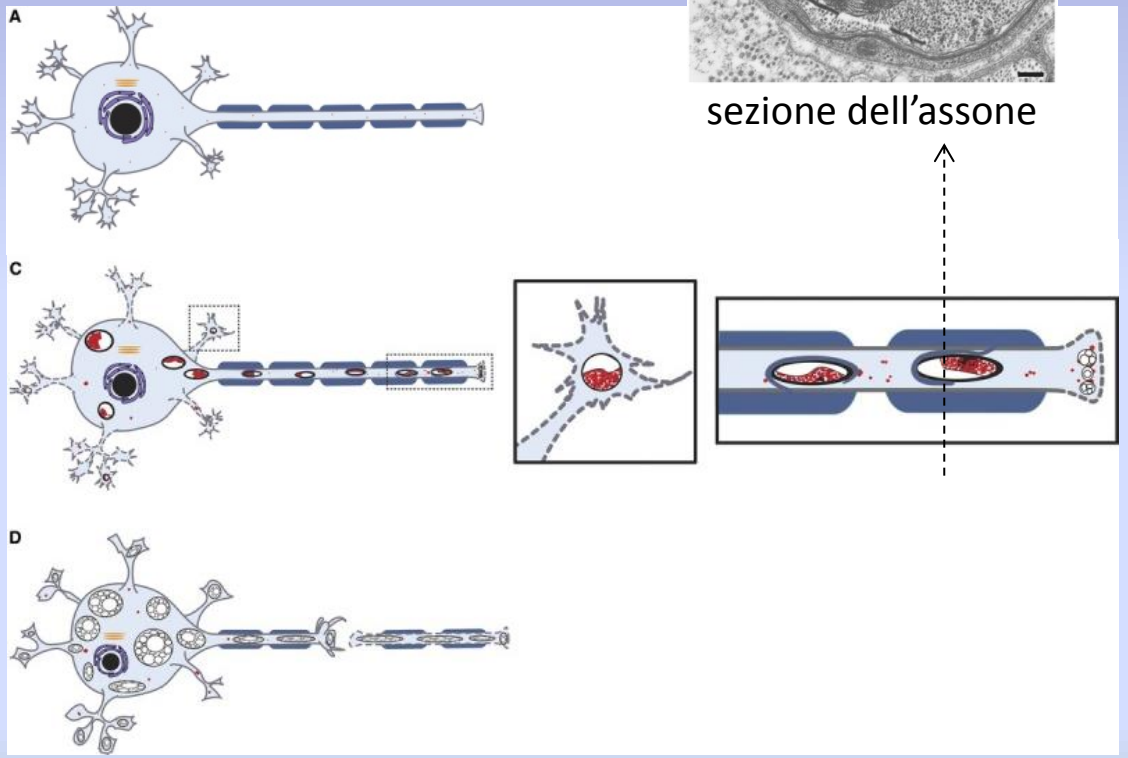
aggregati di endosomi



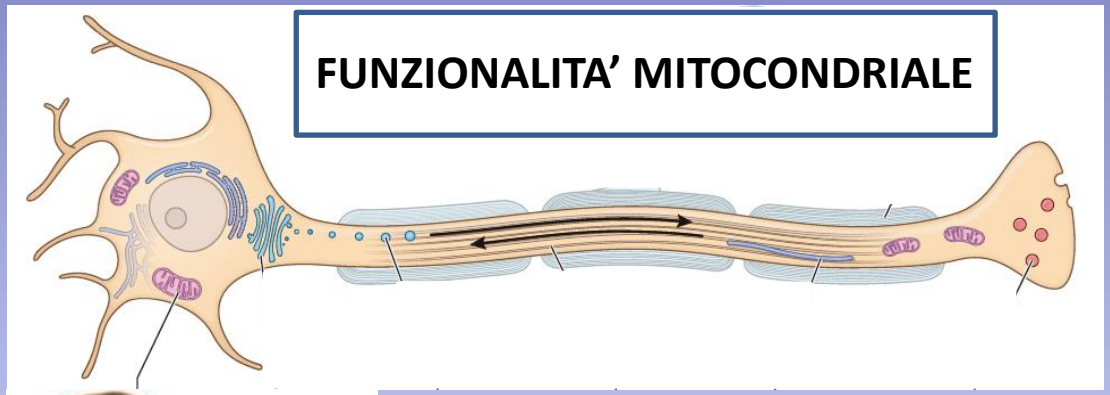
sezione dell'assone

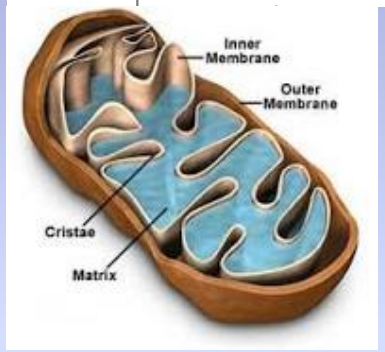
Le mutazioni di NIPA1 (SPG6) determinano l'accumulo di aggregati di endosomi nel corpo cellulare e nell'assone dei motoneuroni

ostacolano il trasporto assonale e causano degenerazione



FUNZIONALITA' MITOCONDRIALE





Organelli deputati alla
-produzione di energia (ATP)
-controllo dei livelli di calcio

I neuroni richiedono alti livelli di energia per le loro funzioni altamente specializzate e sono particolarmene sensibili a difetti nella funzionalità mitocondriale

Paraplegin (SPG7)
Hsp60 (SPG13)
Spartin (SPG20)

Formazione e turnover delle proteine mitocondriali
Rimozione di proteine mitocondriali danneggiate

REEP1 (SPG31)
C12orf65 (SPG55)
Opa3, mtATPase6

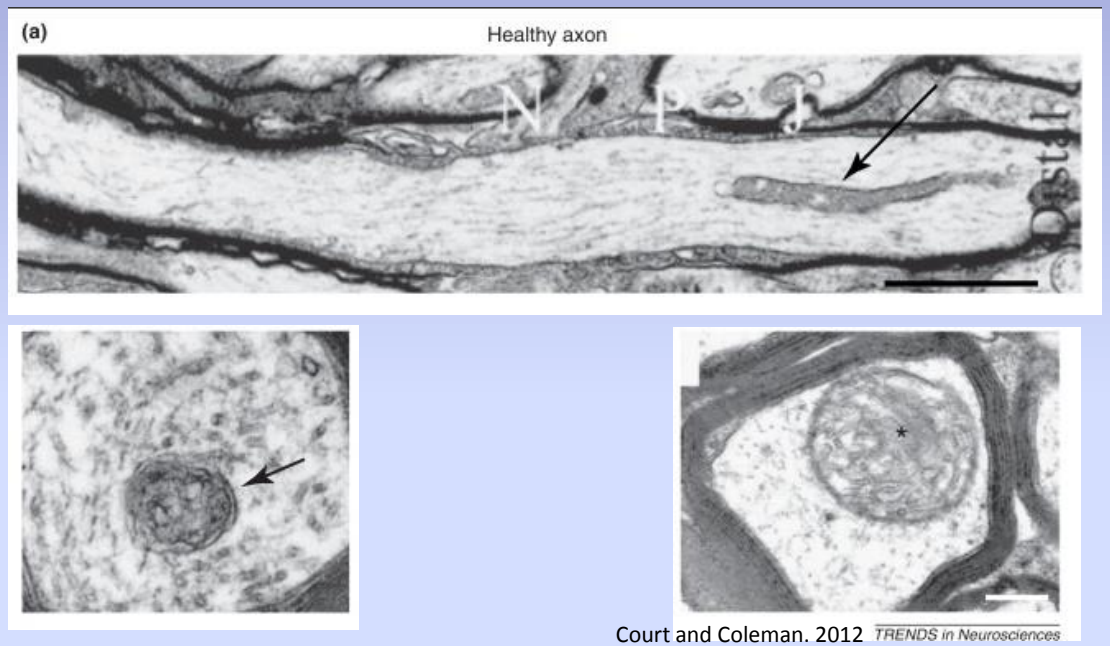
Regolano l'attività mitocondriale
Produzione di energia

Le mutazioni determinano
-alterazioni della morfologia e della funzionalità mitocondriale
-ridotta produzione di energia

J Clin Invest. 2004 Jan;113(2):231-42.

Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport.

Ferreirinha F[1], Quattrini A, Pirozzi M, Valsecchi V, Dina G, Broccoli V, Auricchio A, Piemonte F, Tozzi G, Gaeta L, Casari G, Ballabio A, Rugarli EI.

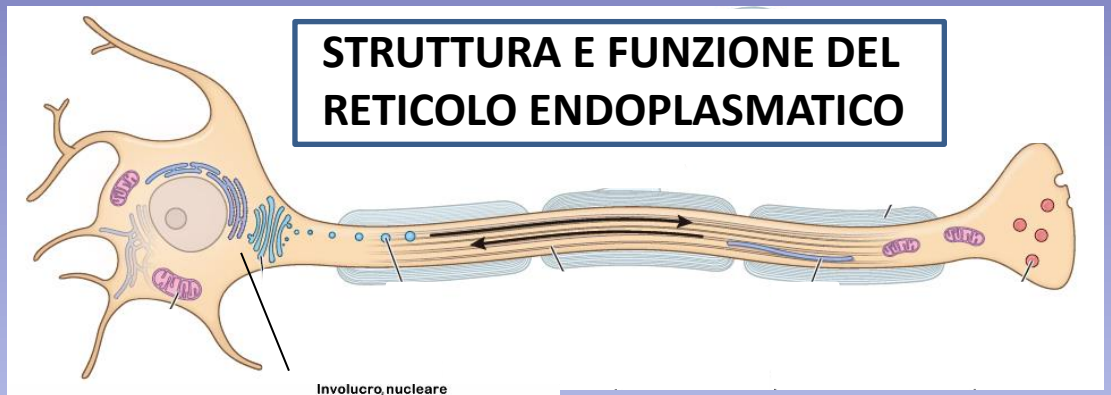


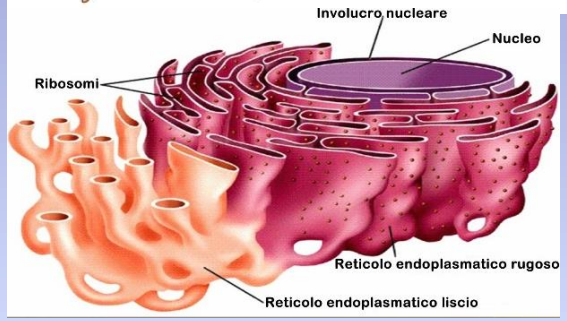
Court and Coleman. 2012 TRENDS in Neurosciences

L'assenza di Paraplegina (SPG7) determina la formazione di mitocondri anomali e non funzionali, che si accumulano negli assoni insieme ai neurofilamenti

ostacolano il trasporto assonale e causano degenerazione

STRUTTURA E FUNZIONE DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO





Ruolo nella formazione e nel mantenimento della struttura del RE

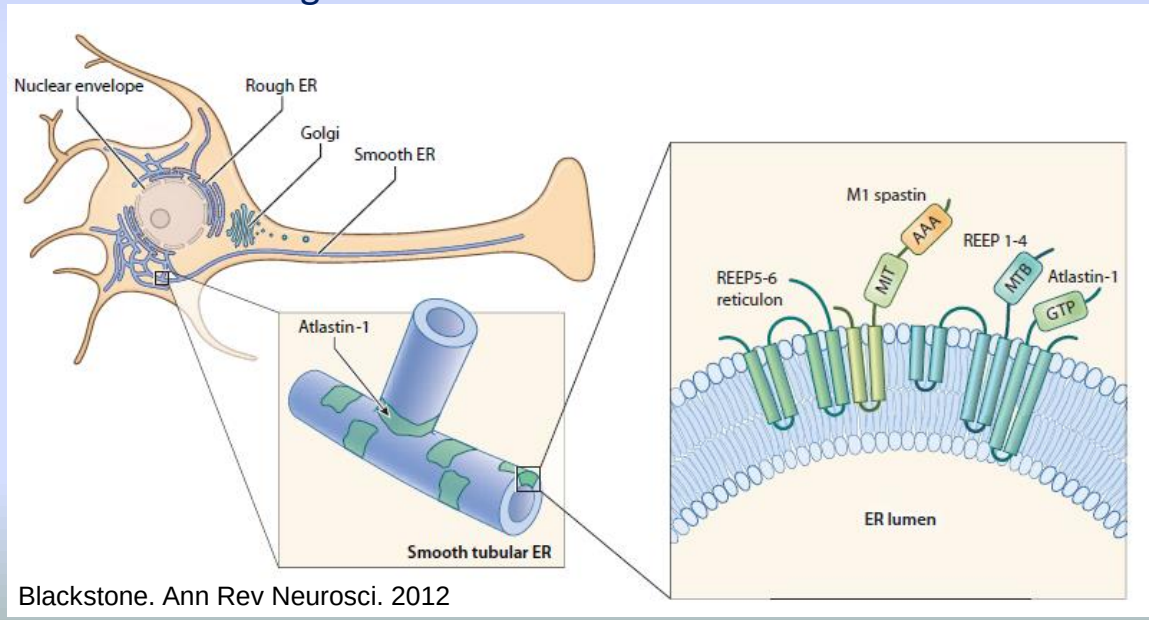
Atlastin 1 (SPG3A)
Spastin (SPG4)
REEP1 (SPG31)
Reticulon 2 (SPG12)
REEP2 (SPG72)
ARL6IP1 (SPG61)
RAB3GAP2 (SPG69)

Atlastina 1, Spastina, REEP1 e Reticulon 2 si localizzano sul RE tubulare e ne regolano la forma e l'interazione con i microtubuli.

Funzioni:
-sintesi delle proteine
-regolazione dei livelli di calcio
-sintesi dei lipidi

ERLIN2 (SPG18), ERLIN1 (SPG62)

Pathway di degradazione delle proteine associato al RE



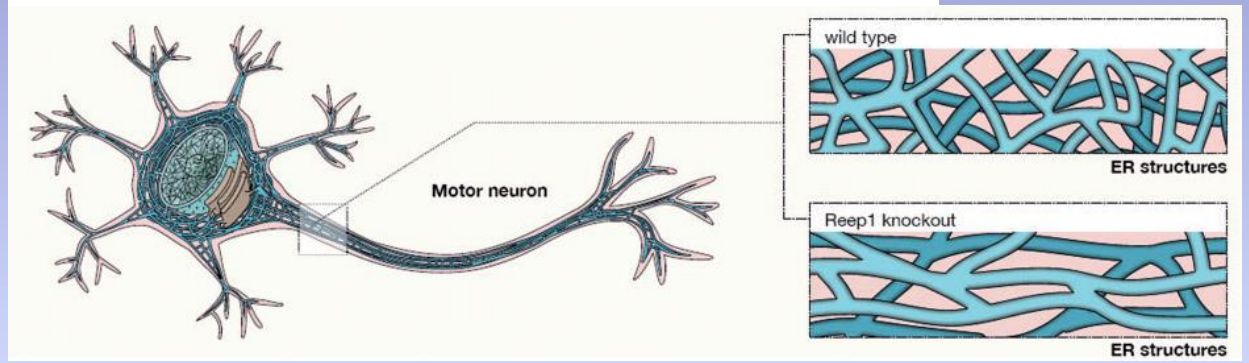
Blackstone. Ann Rev Neurosci. 2012

La regolazione della morfologia del RE tubulare è importante per la formazione e il mantenimento degli assoni

Related Commentary, page 4134 Research article

A spastic paraplegia mouse model reveals REEP1-dependent ER shaping

Christian Beetz,[1] Nicole Koch,[2] Mukhran Khundadze,[3] Geraldine Zimmer,[3] Sandor Nietzsche,[4] Nicole Hertel,[5] Antje-Kathrin Huebner,[3] Rizwan Mumtaz,[3] Michaela Schweizer,[6] Elisabeth Dirren,[7] Kathrin N. Karle,[8] Andrey Irintchev,[9] Victoria Alvarez,[10] Christoph Redies,[5] Martin Westermann,[4] Ingo Kurth,[3] Thomas Deufel,[1] Michael M. Kessels,[2] Britta Qualmann,[2] and Christian A. Hübner[3]

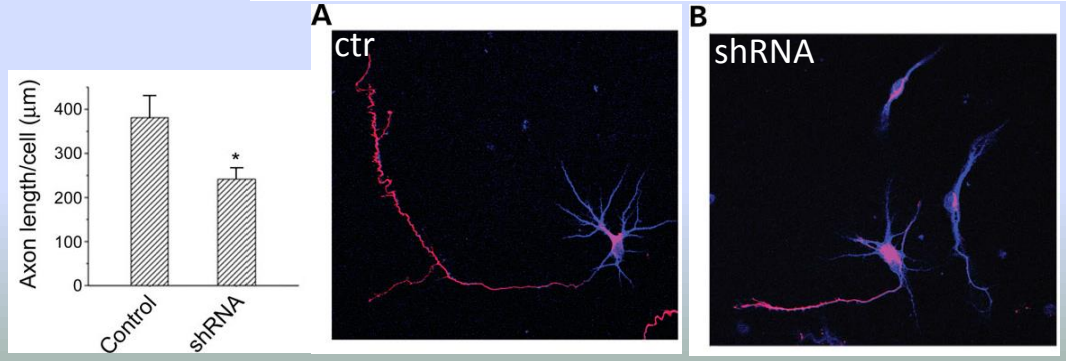


REEP1 (SPG31) regola la curvatura del RE
La sua assenza determina una riduzione della complessità del RE e la riduzione della lunghezza dell'assone

Human Molecular Genetics, 2006, Vol. 15, No. 8 **1343–1353**
doi:10.1093/hmg/ddl054
Advance Access published on March 14, 2006

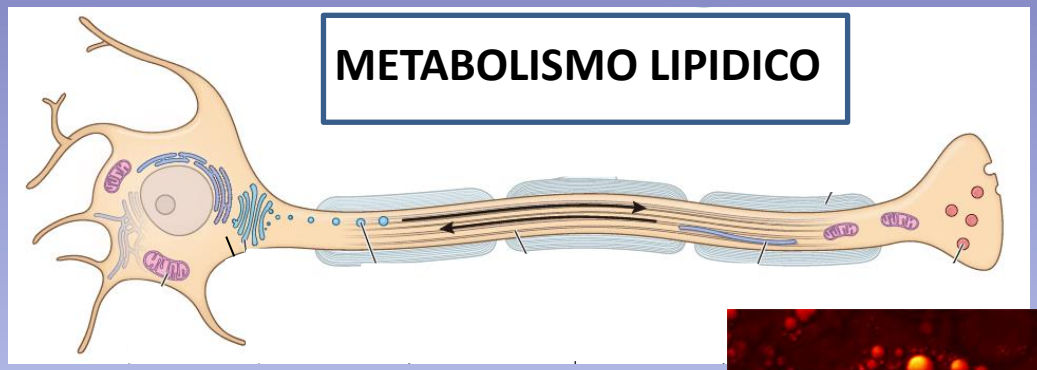
SPG3A protein atlastin-1 is enriched in growth cones and promotes axon elongation during neuronal development

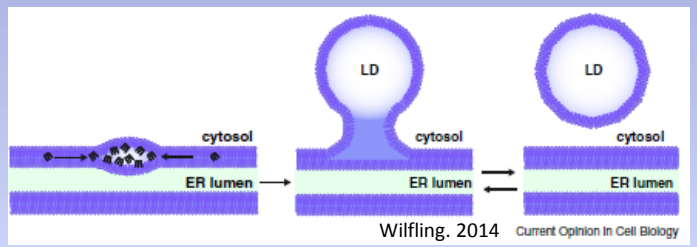
Peng-Peng Zhu[1], Cynthia Soderblom[1], Jung-Hwa Tao-Cheng[2], Julia Stadler[1] and Craig Blackstone[1,*]



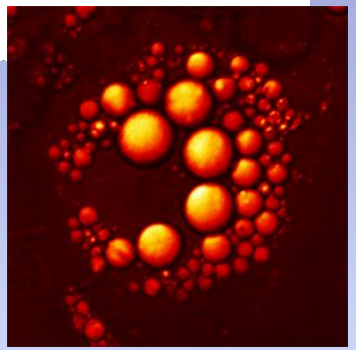
Atlastin1 (SPG3A) regola la fusione dei tubuli del RE e promuove la formazione dell'assone
La sua assenza riduce la lunghezza dell'assone

METABOLISMO LIPIDICO





Wilfling. 2014 Current Opinion in Cell Biology


Paar et al. J Biol Chem. 2012

Atlastin1 (SPG3A)
Spastin (SPG4)
REEP1 (SPG31)
Erlin2 (SPG18)
Spartin (SPG20)
Seipin (SPG17)

Regolano la formazione e le dimensioni delle LD

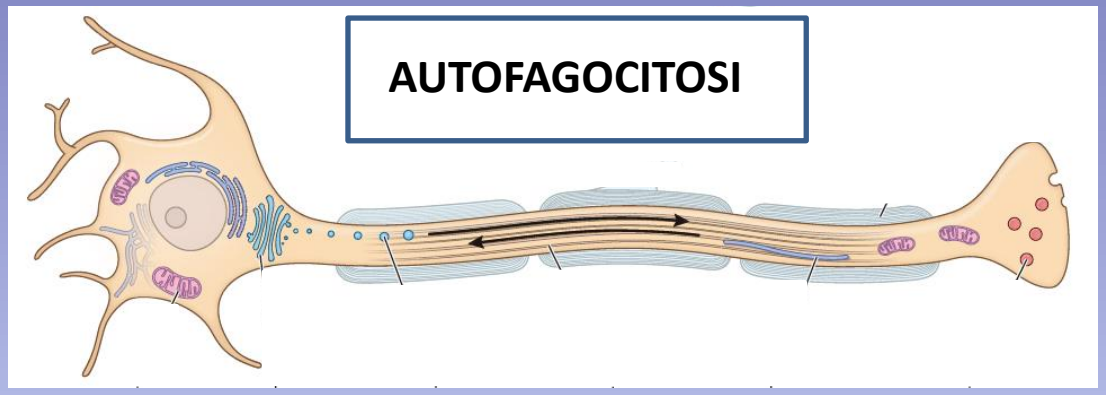
DDHD1 (SPG28)
DDHD2 (SPG54)
NTE (SPG39)

Metabolismo dei fosfolipidi

Il RE ha un ruolo importante nella formazione delle LD

CYP2U1 (SPG56) Metabolismo degli acidi grassi
CYP7B1 (SPG5A) Metabolismo del colesterolo

Le mutazioni determinano
-alterazioni nel numero, nelle dimensioni e nella costituzione delle LD
-alterazioni nella distribuzione dei lipidi, nella formazione degli organelli e nel signalling
-accumulo delle LD nel corpo cellulare e nell'assone

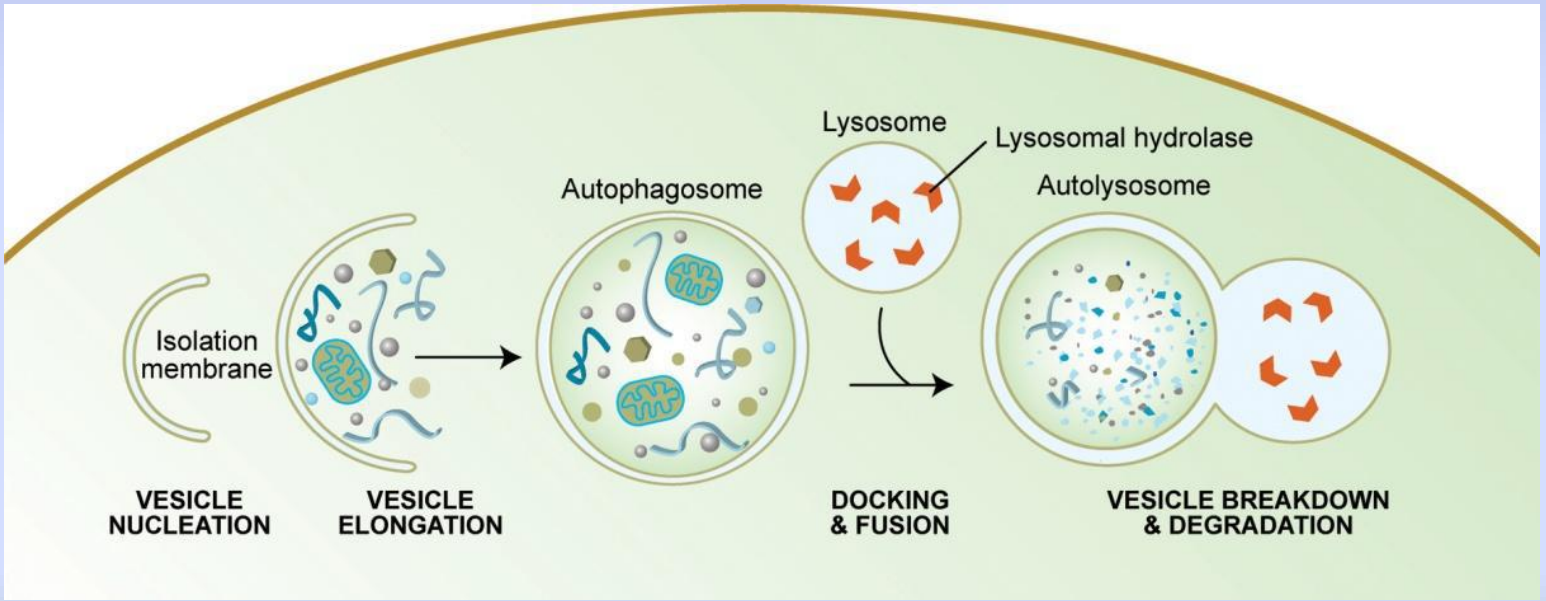


AUTOFAGOCITOSI

TECPR2 (SPG49)

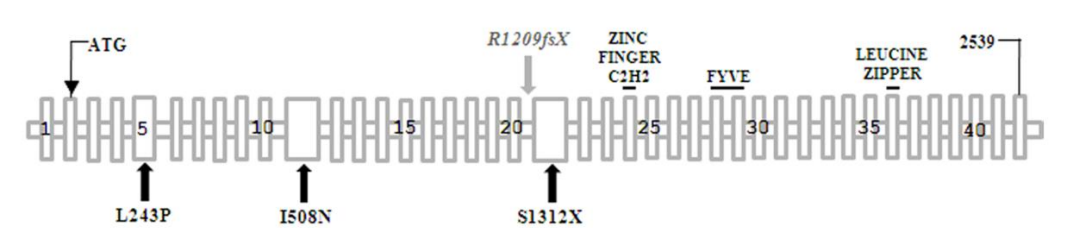
Spastizin (SPG15)
Spatacsin (SPG11)

Processo tramite cui la cellula elimina materiale e organelli invecchiati o danneggiati

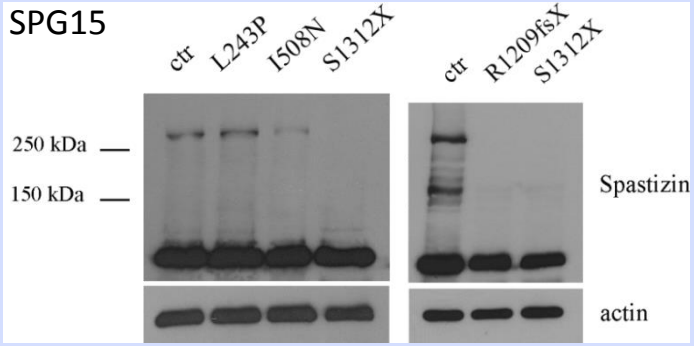


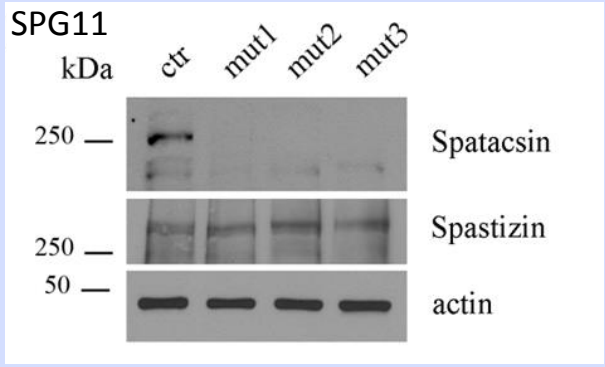
SPG11 (Spatacsina)
SPG15 (Spastizina)

- forme recessive complicate di paraparesi spastica con assottigliamento del corpo calloso
- molto simili dal punto di vista clinico
- caratterizzate da progressiva spasticità e disabilità intellettiva con atassia cereberellare, neuropatia ed anomalie retiniche
-insorgenza nella prima e seconda decade di vita



Spastizina





Livelli di Spastizina e Spatacsina nelle linee cellulari ottenute da pazienti affetti da SPG15 e SPG11

doi:10.1093/brain/awt227 Brain 2013: 136; 3119–3139 | 3119

BRAIN
A JOURNAL OF NEUROLOGY

Defective autophagy in spastizin mutated patients with hereditary spastic paraparesis type 15

Chiara Vantaggiato,[1] Claudia Crimella,[1] Giovanni Airoldi,[1] Roman Polishchuk,[2] Sara Bonato,[3,*] Erika Brighina,[3] Marina Scarlato,[4] Olimpia Musumeci,[5] Antonio Toscano,[5] Andrea Martinuzzi,[6] Filippo Maria Santorelli,[7] Andrea Ballabio,[2,8,9,10] Nereo Bresolin,[1,11] Emilio Clementi[1,12] and Maria Teresa Bassi[1]

Autophagy 10:2, 374–375; February 2014; © 2014 Landes Bioscience

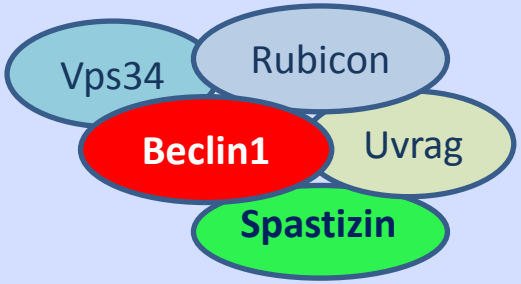
ZFYVE26/SPASTIZIN

A close link between complicated hereditary spastic paraparesis and autophagy

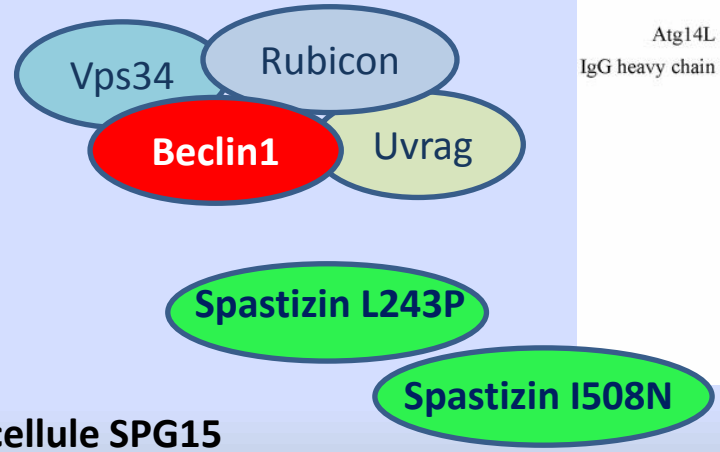
Chiara Vantaggiato,[1] Emilio Clementi,[2] and Maria Teresa Bassi[1,*]
[1]Scientific Institute IRCCS E. Medea; Laboratory of Molecular Biology; Lecco, Italy; [2]Unit of Clinical Pharmacology; Department of Biomedical and Clinical Sciences; University Hospital "Luigi Sacco"; Università di Milano; Milan, Italy

Spastizina interagisce con Beclin1, una proteina chiave dell'autofagocitosi, che regola la formazione e la maturazione degli autofagosomi

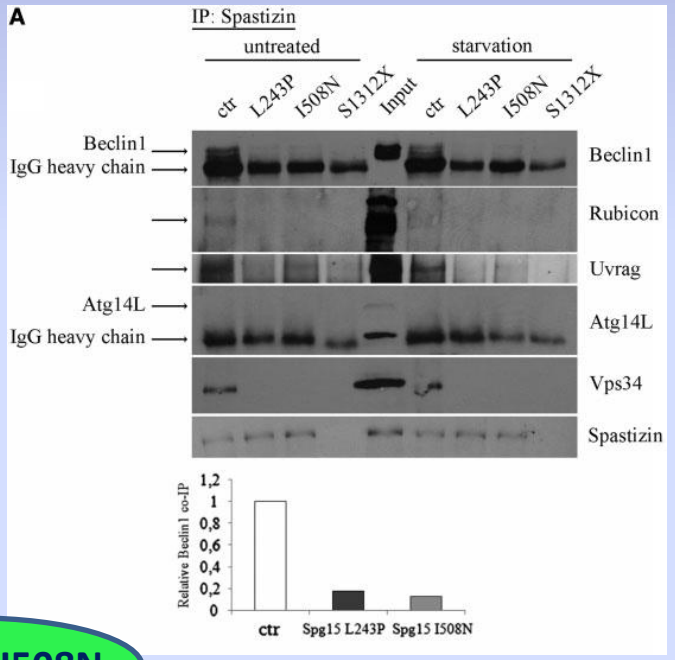
Spastizina interagisce con Beclin1 e i suoi partner



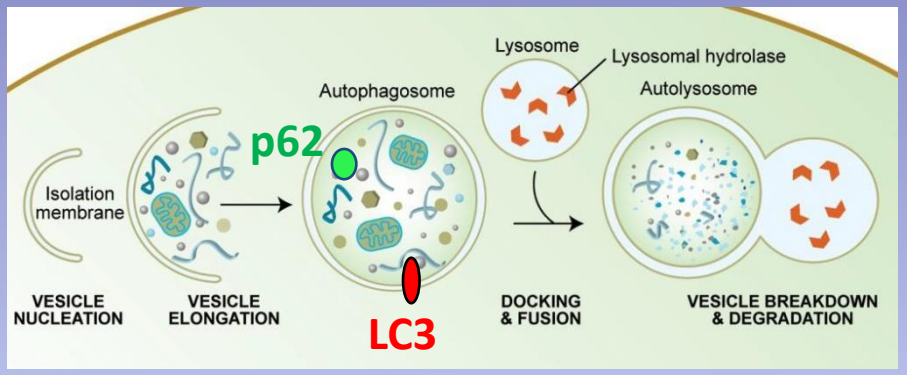
Le mutazioni di Spastizina alterano le interazioni con Beclin1

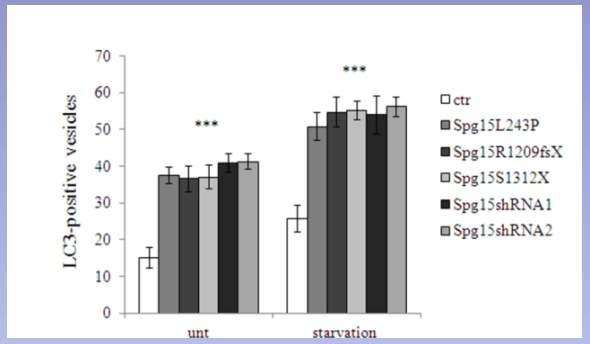


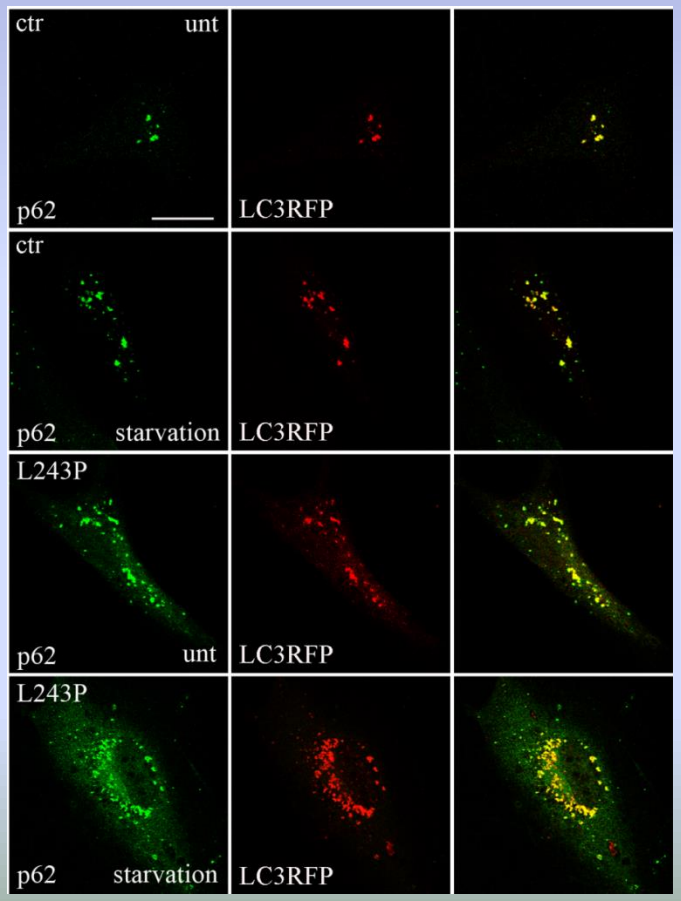
cellule controllo | **cellule SPG15**

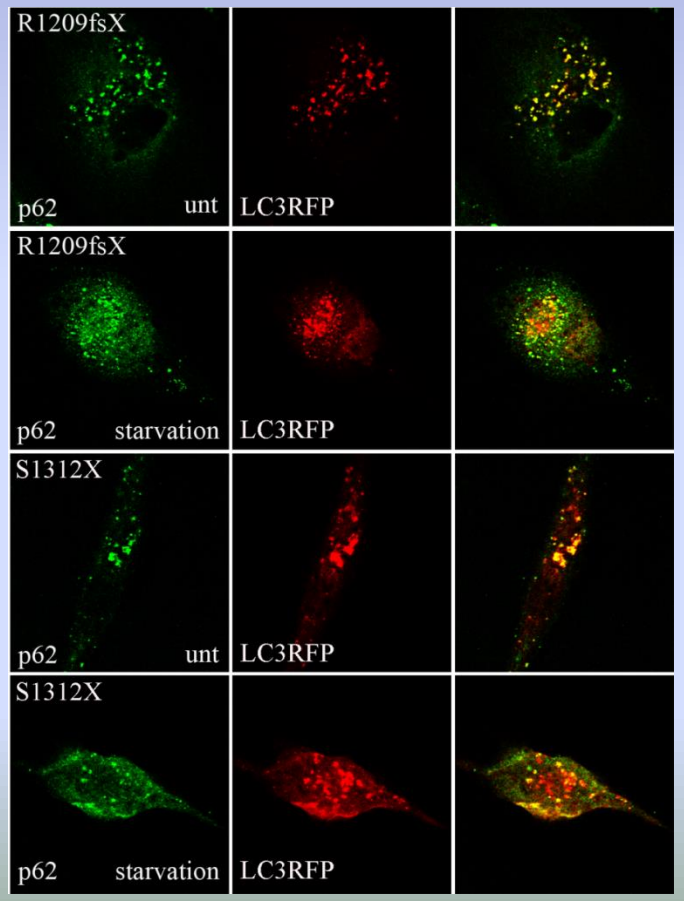


Le cellule SPG15 presentano un numero maggiore di autofagosomi rispetto al controllo



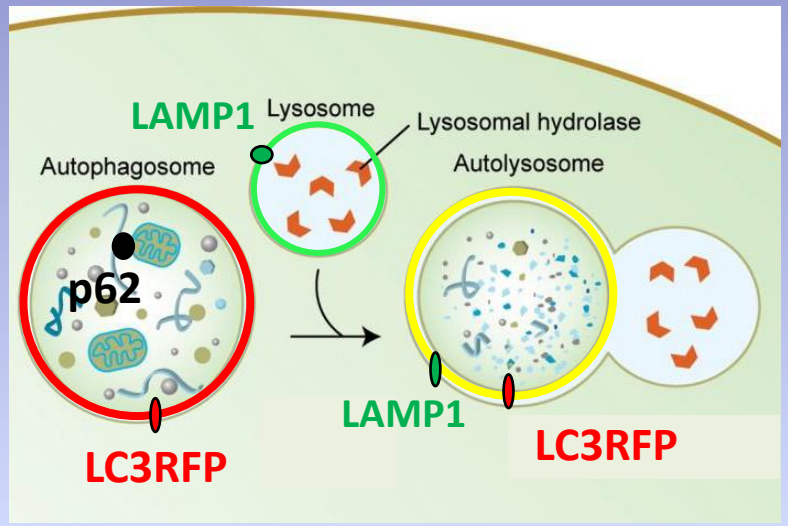


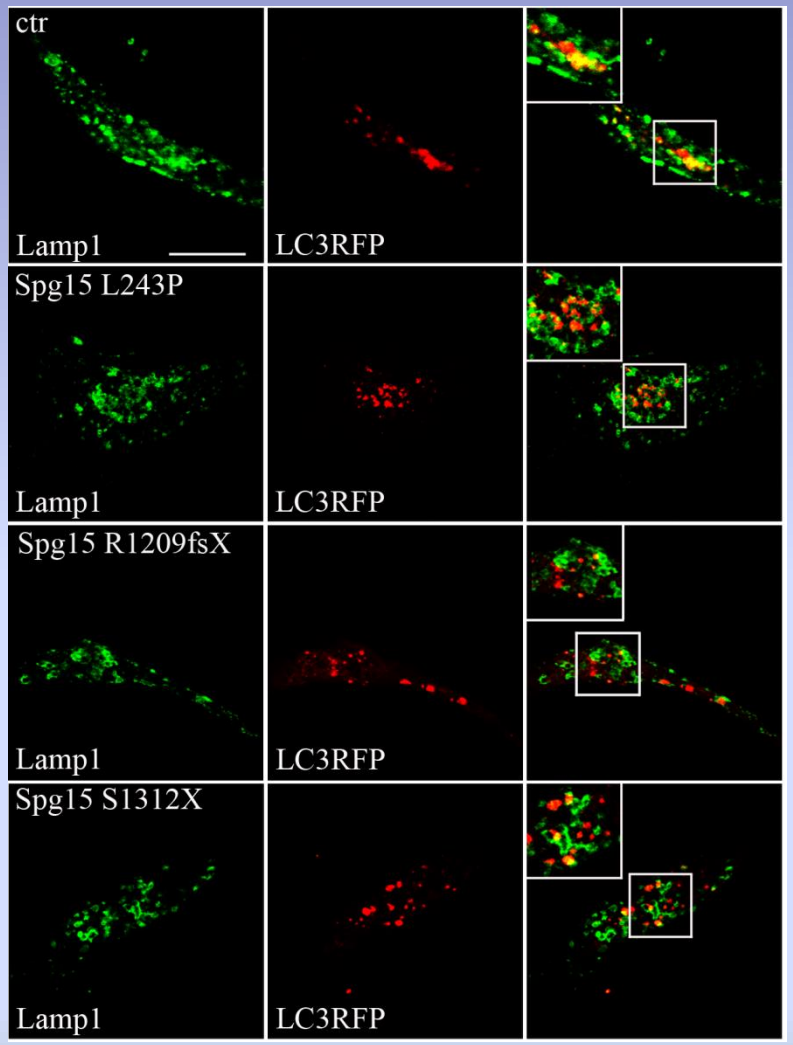


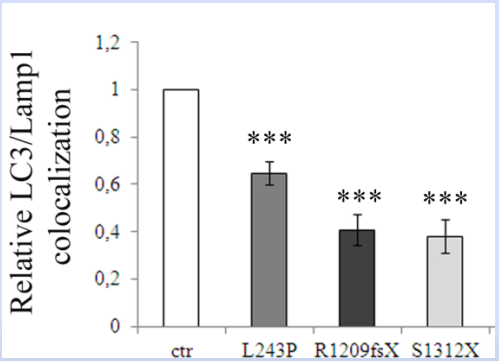


Vantaggiato et al. Brain. 2013

In cellule SPG15 gli autofagosomi non si fondono con i lisosomi e non vengono degradati





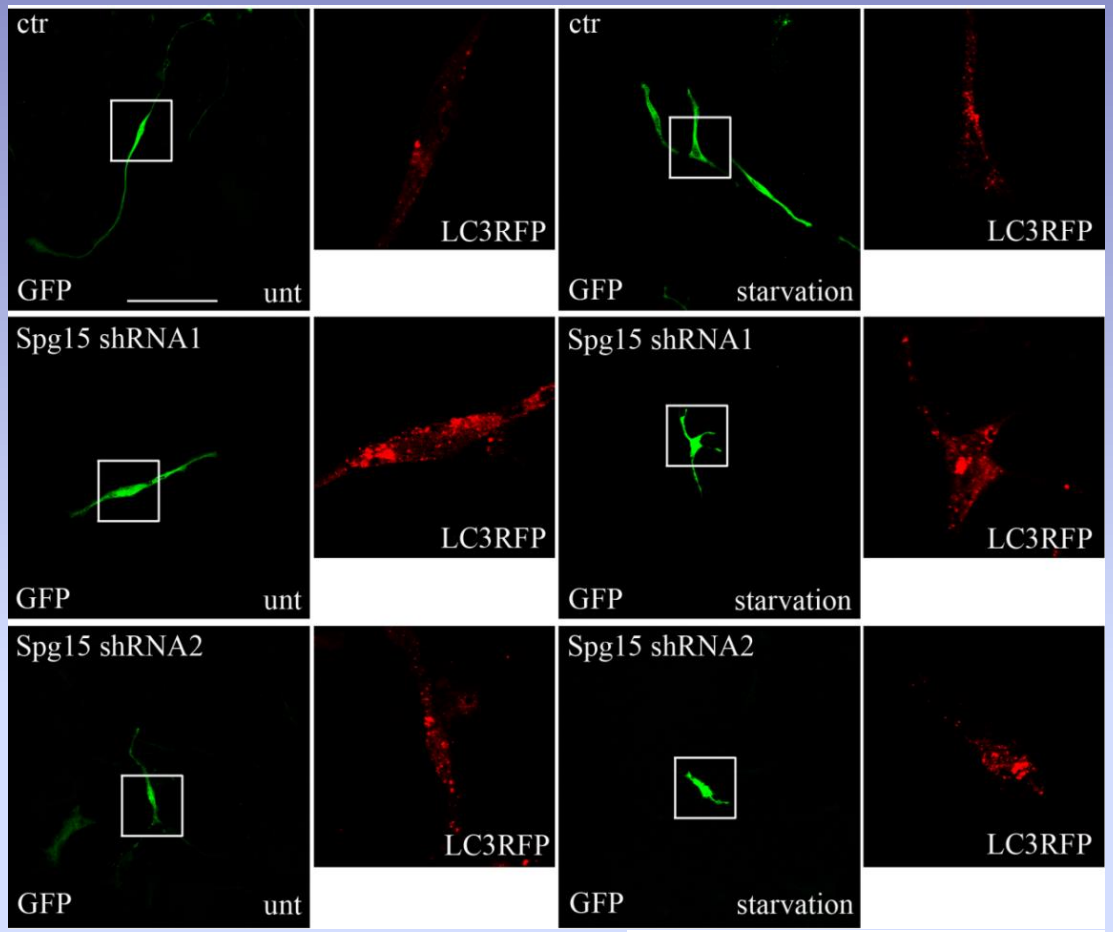


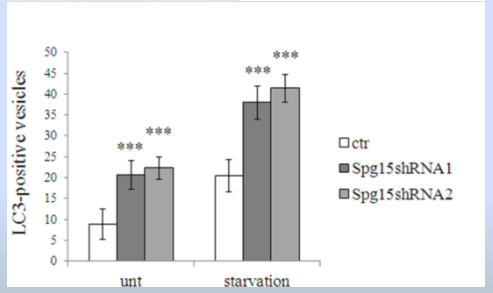
Vantaggiato et al. Brain. 2013

L'assenza di Spastizina induce l'accumulo di autofagosomi nei neuroni

I neuroni sono particolarmente sensibili all'accumulo di materiale di scarto e di organelli danneggiati all'interno della cellula

L'accumulo di autofagosomi nel corpo cellulare e nell'assone determina degenerazione





Vantaggiato et al. Brain. 2013

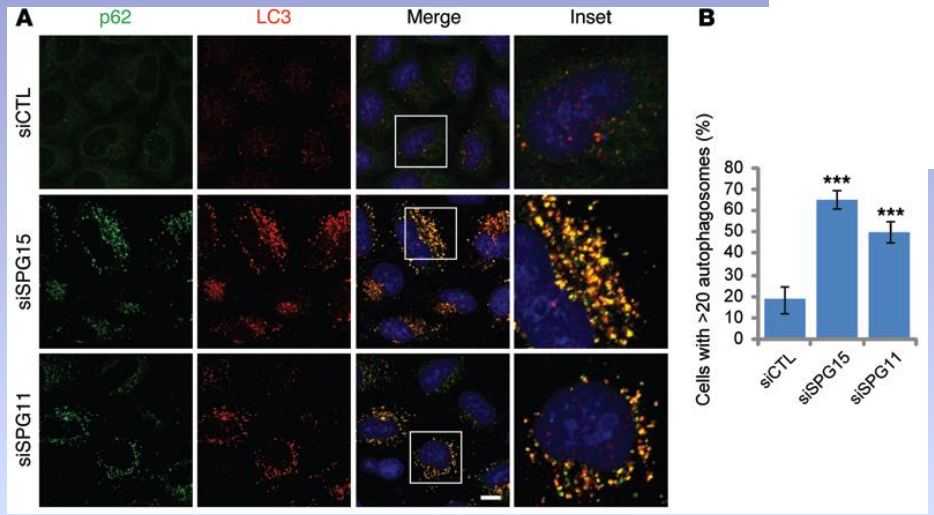
Difetti di autofagocitosi e presenza di accumuli di autofagosomi anche in cellule SPG11

PLOS | GENETICS

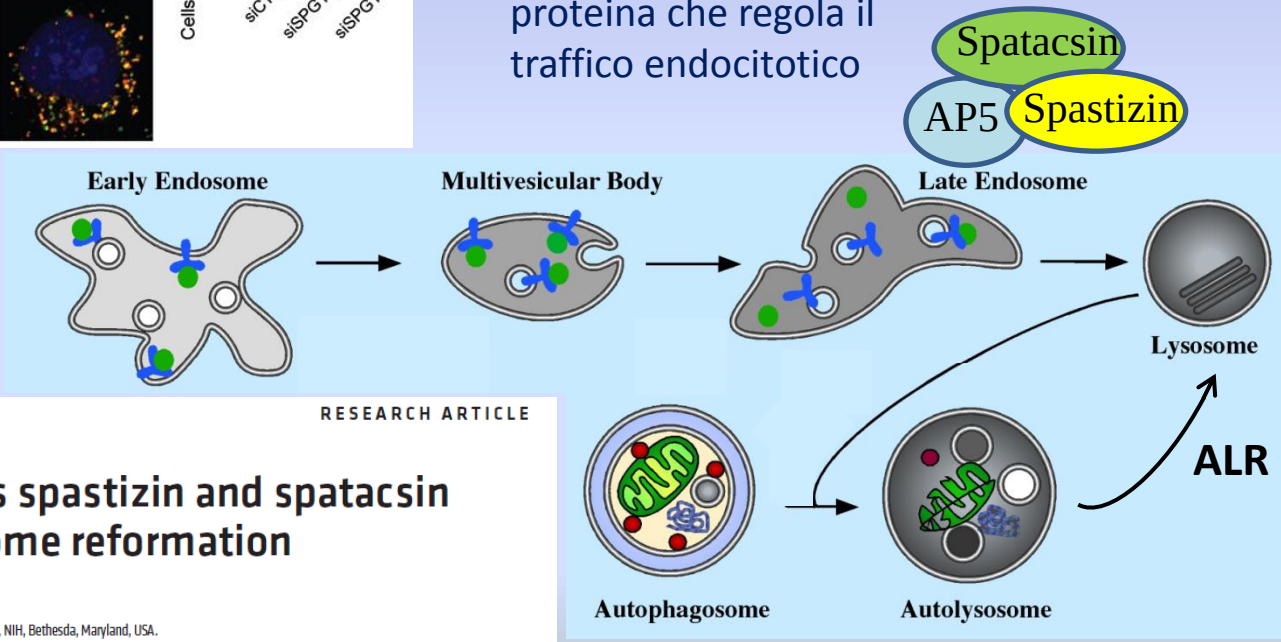
RESEARCH ARTICLE

In Vivo Evidence for Lysosome Depletion and Impaired Autophagic Clearance in Hereditary Spastic Paraplegia Type SPG11

Rita-Eva Varga[1,2‡], Mukhran Khundadze[1‡], Markus Damme[3], Sandor Nietzsche[4], Birgit Hoffmann[5], Tobias Stauber[6¤], Nicole Koch[7], J. Christopher Hennings[1], Patricia Franzka[1], Antje K. Huebner[1], Michael M. Kessels[7], Christoph Biskup[5], Thomas J. Jentsch[6], Britta Qualmann[7], Thomas Braulke[8], Ingo Kurth[1], Christian Beetz[2], Christian A. Hübner[1]*



Spastizina e Spatacsina interagiscono con AP5 una proteina che regola il traffico endocitotico



The Journal of Clinical Investigation

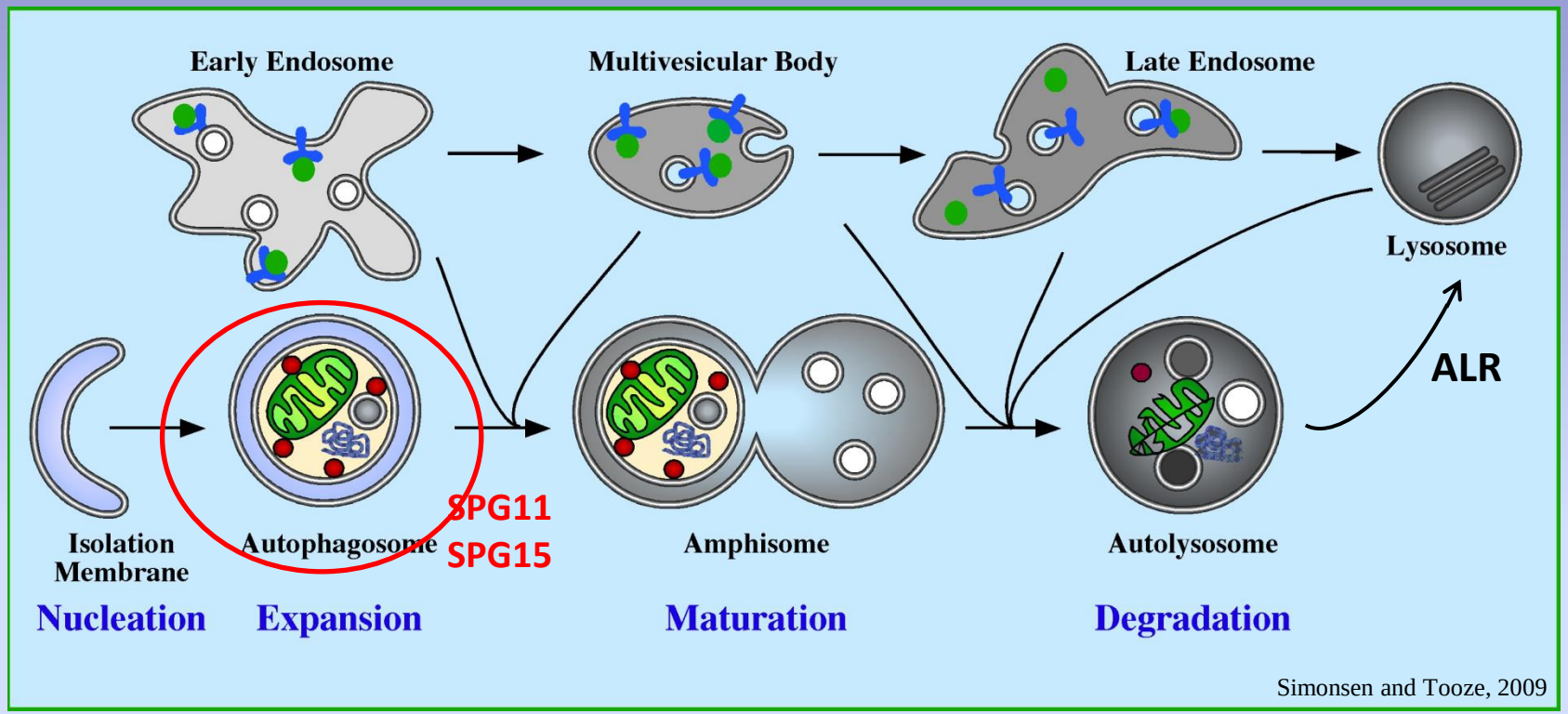
RESEARCH ARTICLE

Spastic paraplegia proteins spastizin and spatacsin mediate autophagic lysosome reformation

Jaerak Chang, Seongju Lee, and Craig Blackstone

Cell Biology Section, Neurogenetics Branch, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH, Bethesda, Maryland, USA.

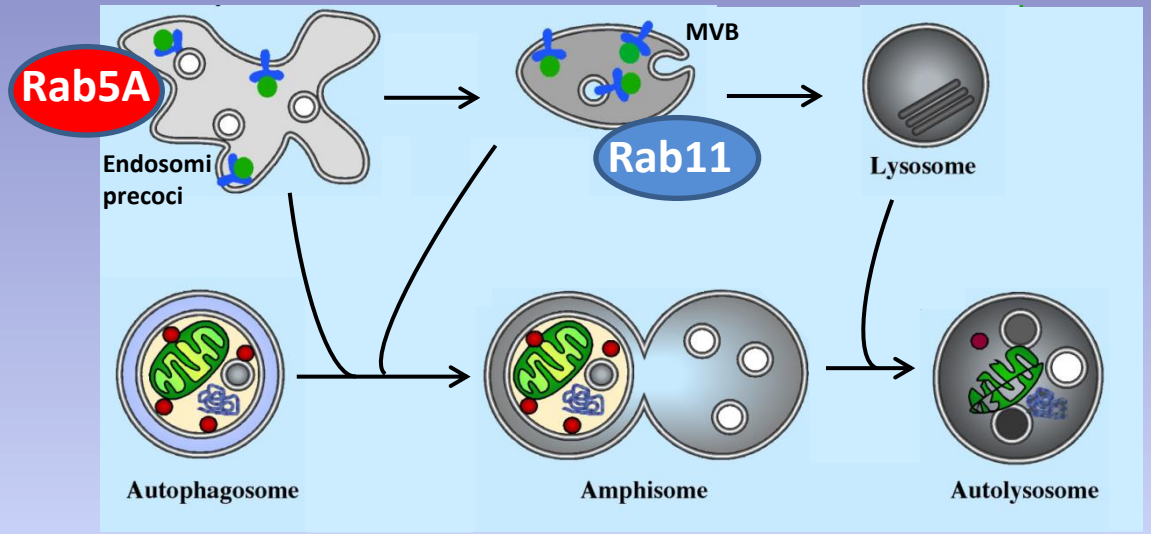
Autofagocitosi ed endocitosi sono strettamente correlate

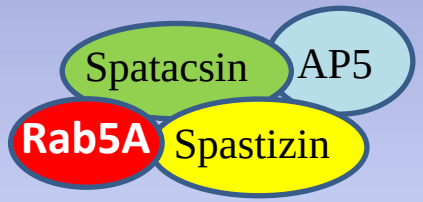


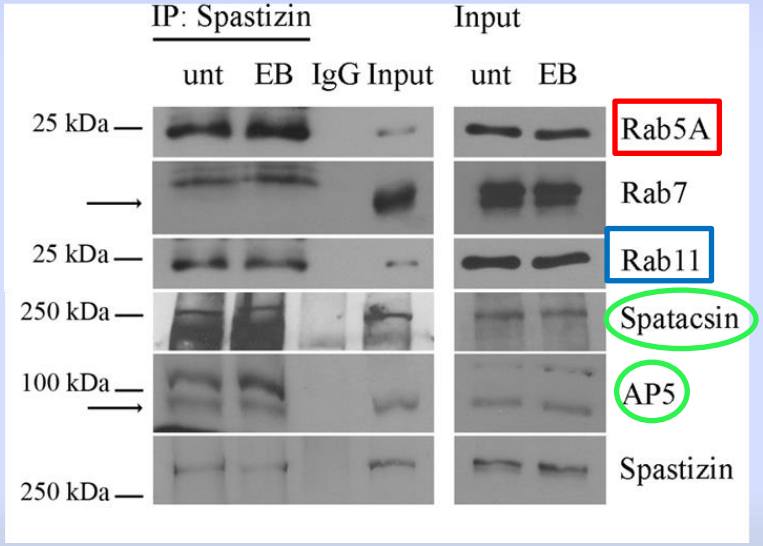
Gli autofagosomi per essere degradati devono fondersi con gli endosomi

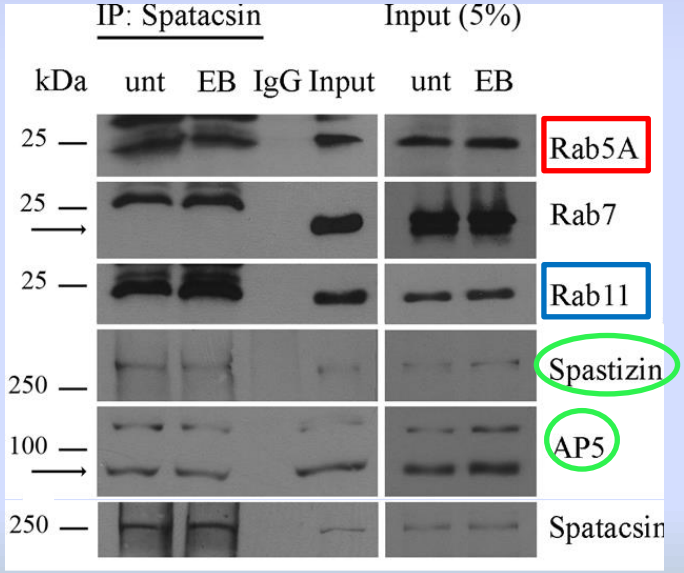
Difetti nel processo di fusione ostacolano la maturazione degli autofagosomi e ne causano l'accumulo

Spastizina e Spatacsina interagiscono con Rab5 e Rab11

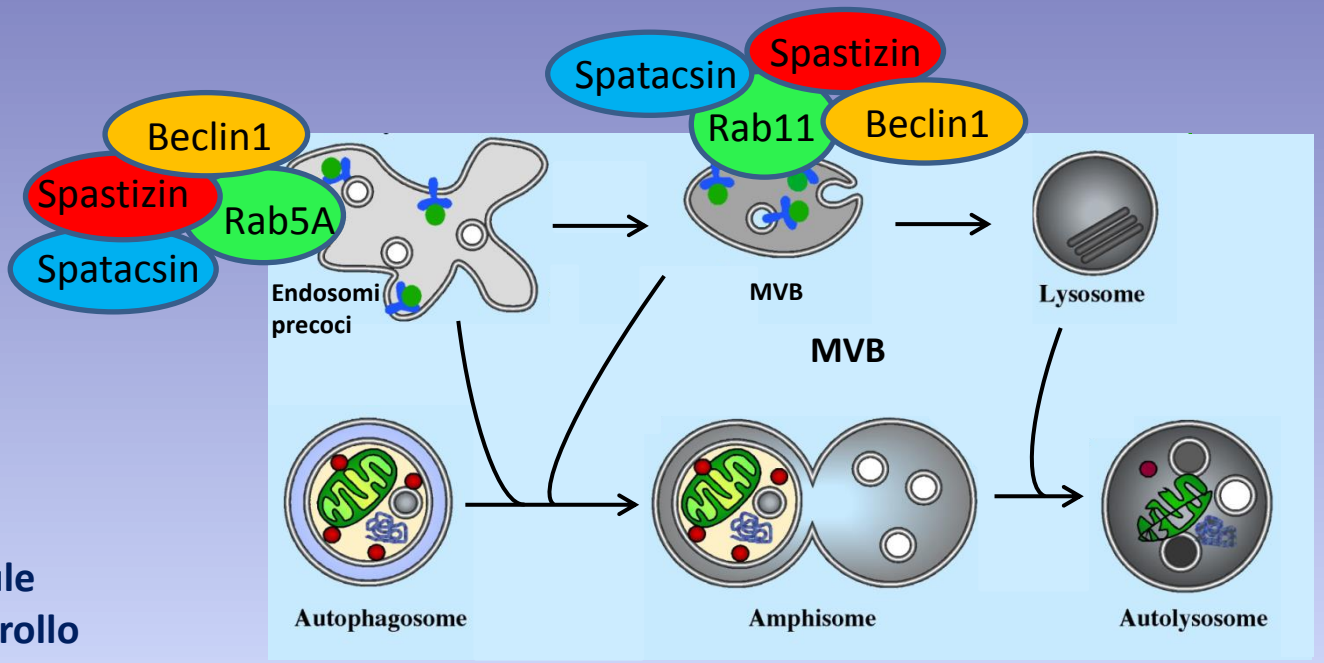






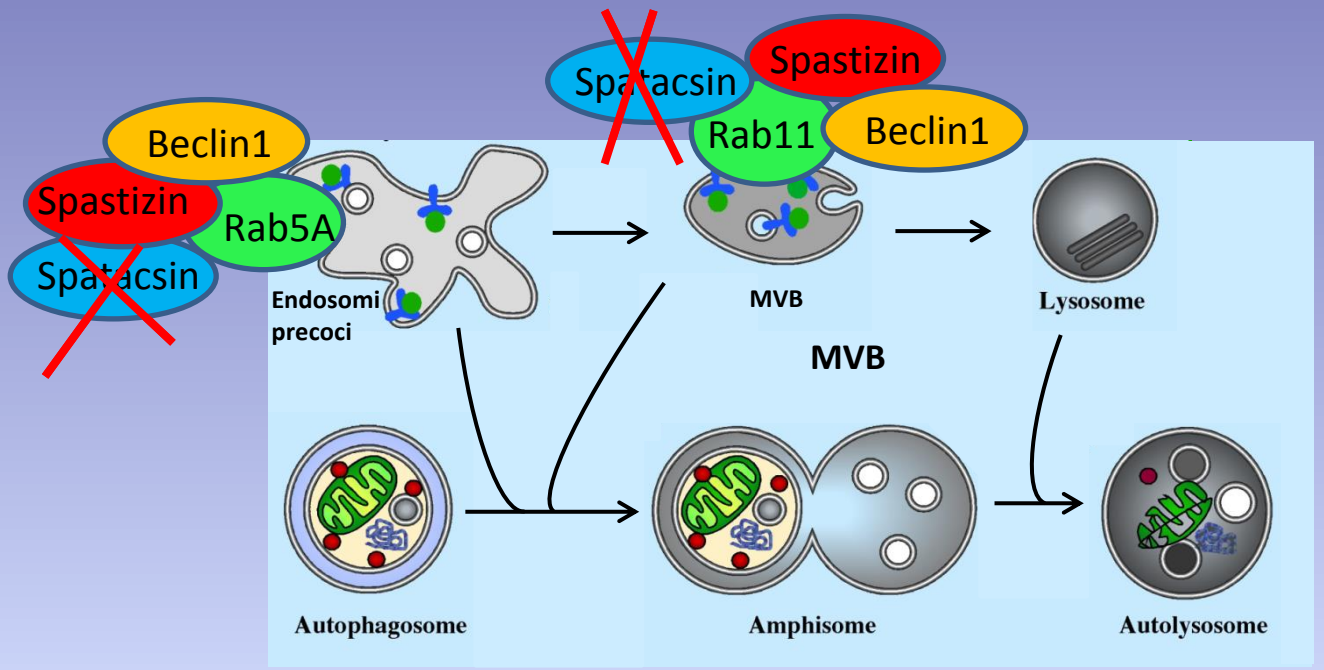


Vantaggiato et al. Autophagy. 2018



cellule controllo

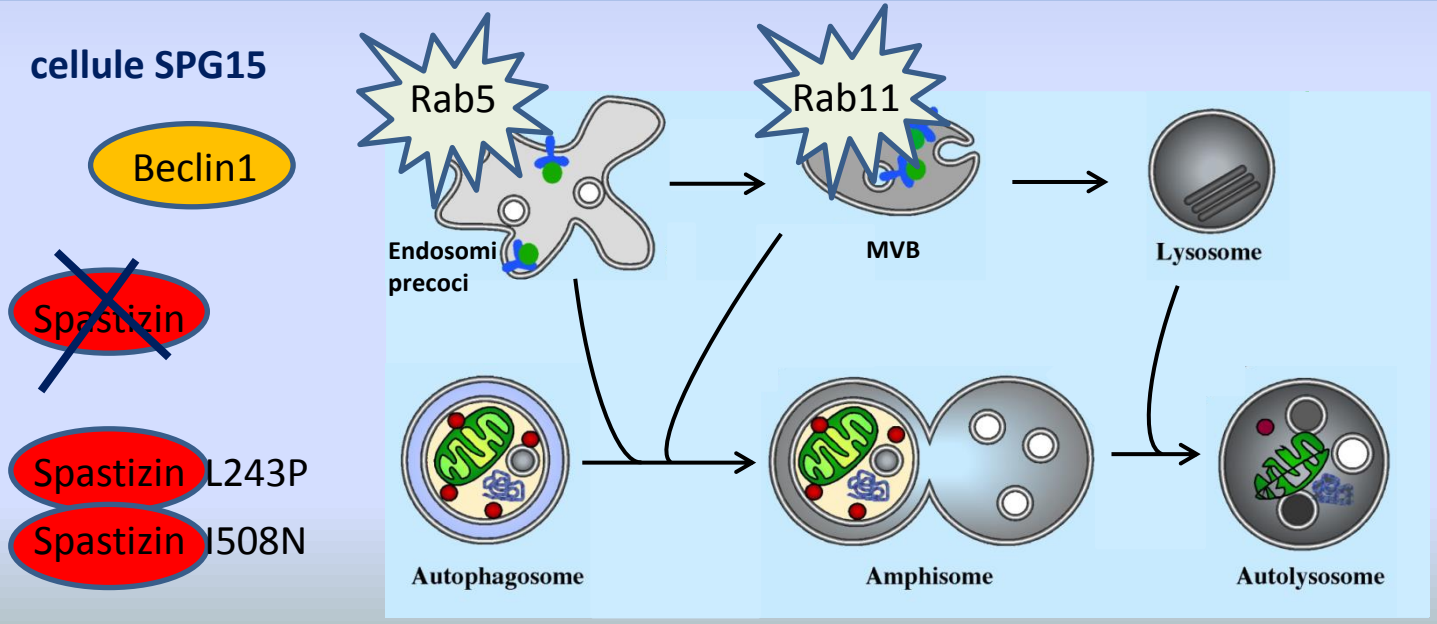
-si localizzano sugli endosomi precoci e sui MVB
-Spastizina recluta Beclin1 sugli endosomi



-si localizzano sugli endosomi precoci e sui MVB
-Spastizina recluta Beclin1 sugli endosomi

cellule SPG11

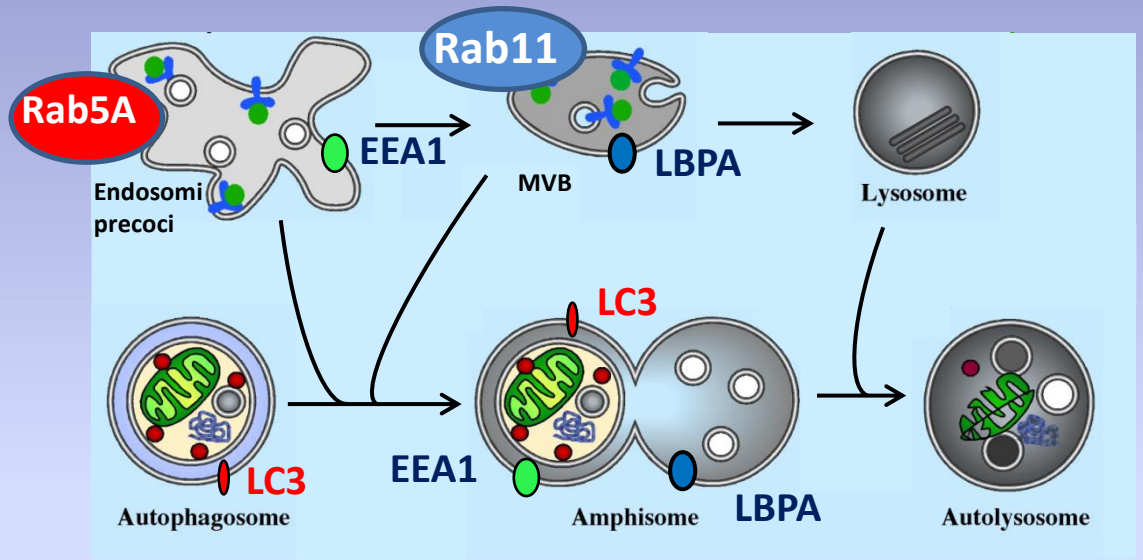
cellule SPG15



Le mutazioni associate a SPG15 causano la perdita di funzione di Rab5 e Rab11

Vantaggiato et al. Autophagy. 2018

Rab5 e Rab11 regolano la fusione degli endosomi precoci e dei MVB con gli autofagosomi

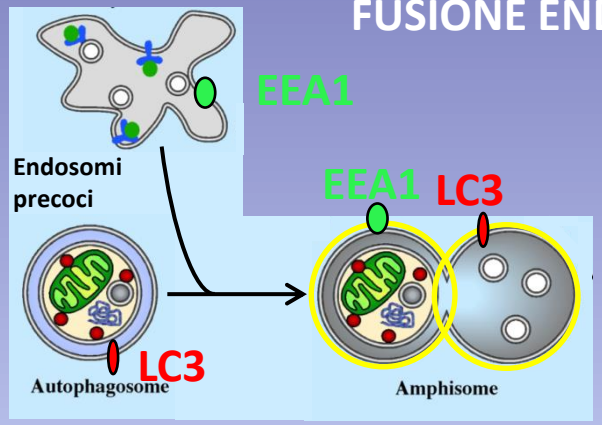


La perdita di funzione di Rab5 e Rab11 in cellule SPG15 provoca difetti nella fusione tra gli endosomi e gli autofagosomi

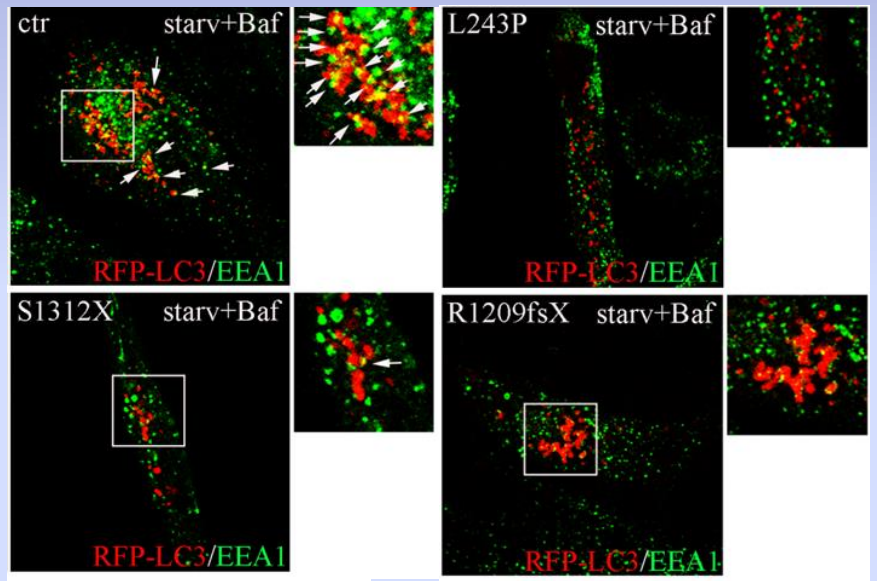
Vantaggiato et al. Autophagy. 2018

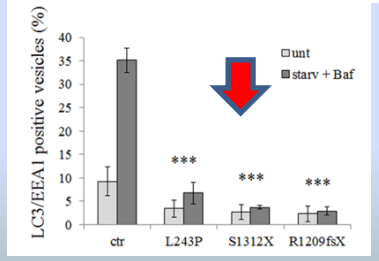
FUSIONE ENDOSOMI-AUTOFAGOSOMI

cellule SPG15

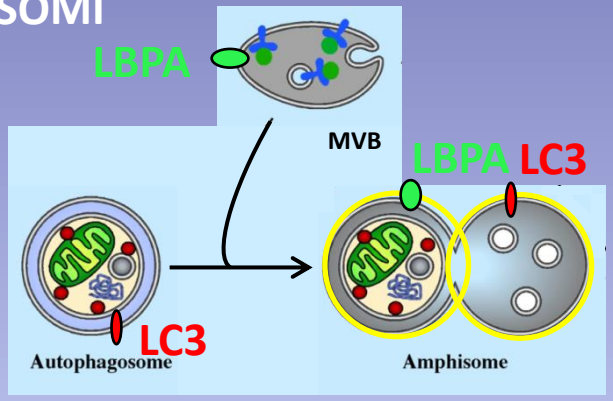


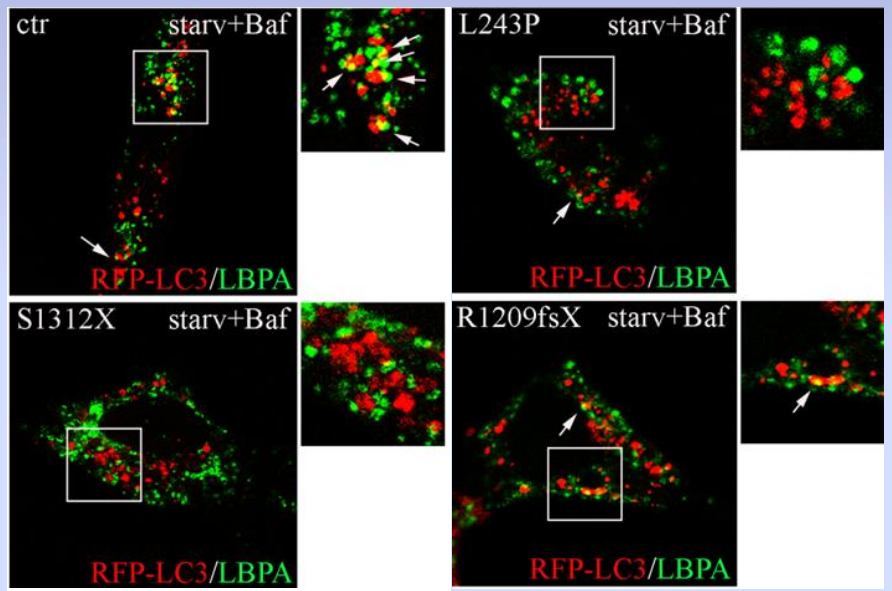
ENDOSOMI PRECOCI

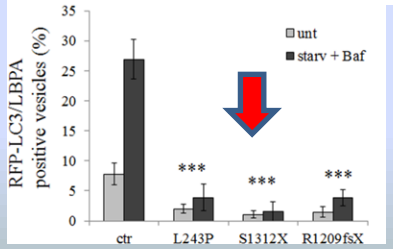




MVB



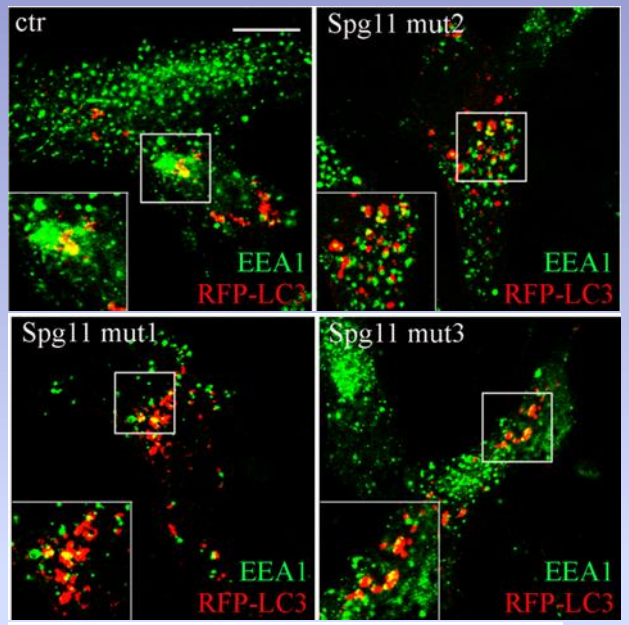


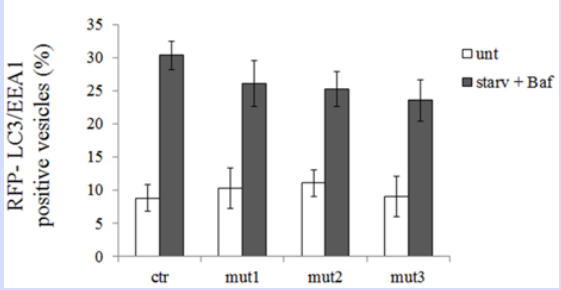


Vantaggiato et al. Autophagy. 2018

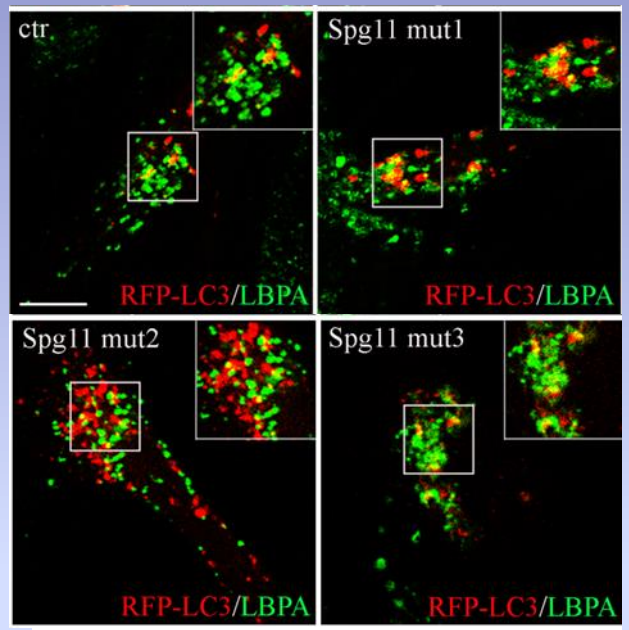
In cellule SPG11 non vi sono alterazioni nella fusione endosomi-autofagosomi

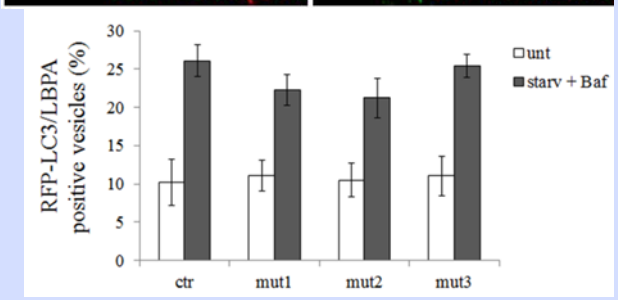
ENDOSOMI PRECOCI





MVB



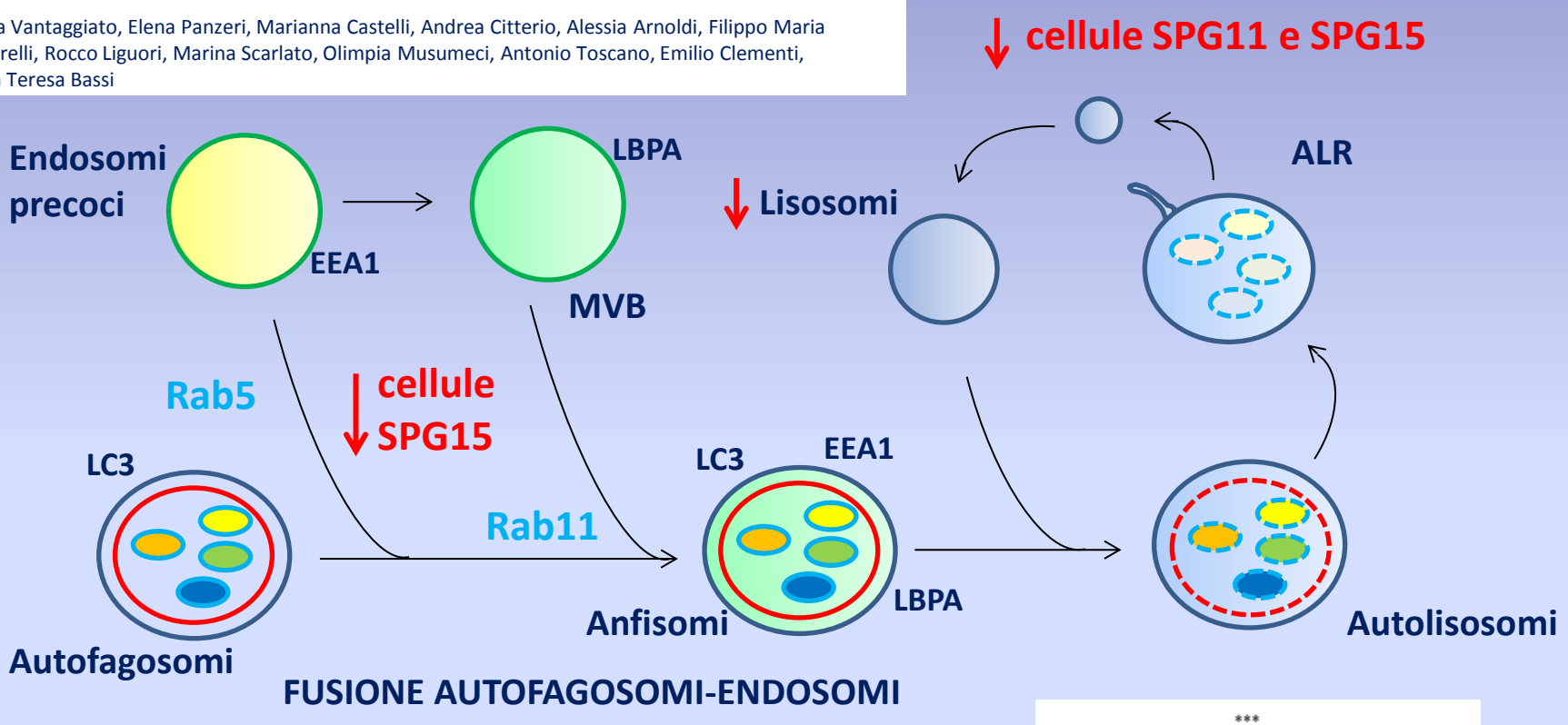


Vantaggiato et al. Autophagy. 2018

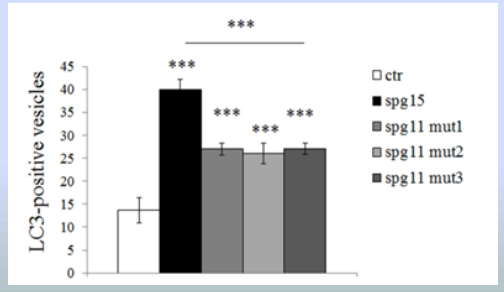
Autophagy. In press

ZFYVE26/SPASTIZIN and SPG11/SPATACSIN mutations in hereditary spastic paraplegia types SPG15 and SPG11 have different effects on autophagy and endocytosis

Chiara Vantaggiato, Elena Panzeri, Marianna Castelli, Andrea Citterio, Alessia Arnoldi, Filippo Maria Santorelli, Rocco Liguori, Marina Scarlato, Olimpia Musumeci, Antonio Toscano, Emilio Clementi, Maria Teresa Bassi



La presenza di entrambi i difetti in cellule SPG15 determina un difetto di autofagocitosi più grave rispetto a cellule SPG11 con l'accumulo di un numero maggiore di autofagosomi



difetto specifico: ACCUMULO DI AUTOFAGOSOMI

Qualsiasi sostanza che permette di ridurre l'accumulo di autofagosomi è un buon candidato per il trattamento farmacologico

Drosophila come modello animale

per confermare in vivo il ruolo delle due proteine

testare una serie di composti noti per modulare l'autofagocitosi

ottenere il rescue del fenotipo patologico

identificare uno o più candidati per il trattamento farmacologico

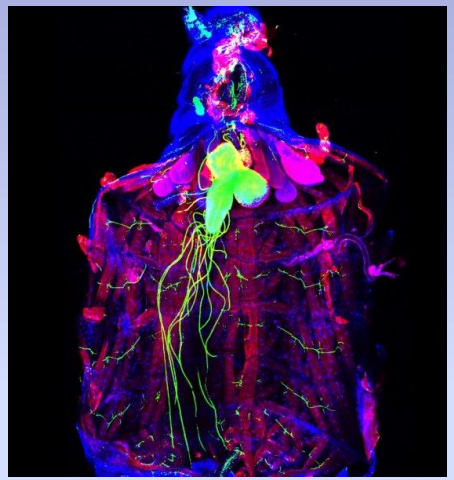
DROSOPHILA M. COME MODELLO PER LO STUDIO DI MALATTIE GENETICHE NEURODEGENERATIVE

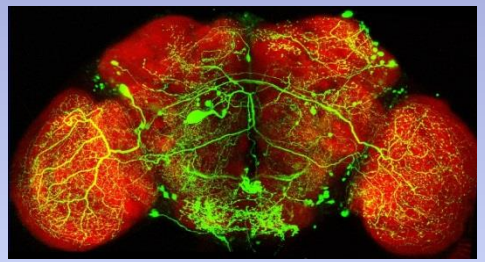
-Circa il 75% dei geni patologici umani possiede un gene omologo corrispondente in *Drosophila*

-Ciclo vitale breve
-Costi di mantenimento bassi

-Possibilità di gestire elevati numeri di individui in poco spazio, condizione favorevole per fare screening genetici e farmacologici

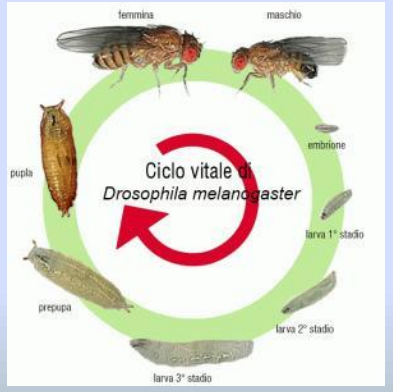
-Permette di studiare la funzione di un gene in fasi diverse dello sviluppo e in tessuti diversi

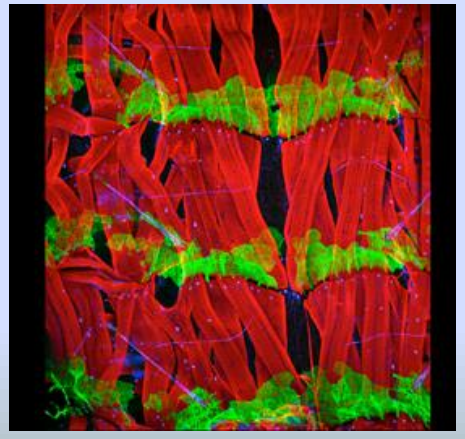


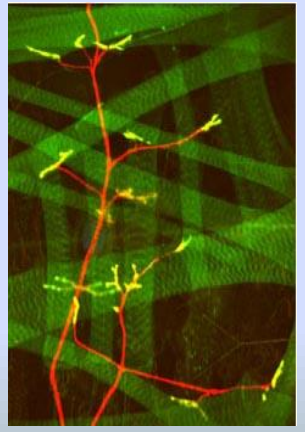


Sistema nervoso

Sistema neuro-muscolare







Curr Biol. 2004 Jul 13;14(13):1135-47.

The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function.

Trotta N[1], Orso G, Rossetto MG, Daga A, Broadie K.

La Drosophila è stata utilizzata per dimostrare il ruolo di Spastina (SPG4) nella regolazione della stabilità dei microtubuli..

Research article Related Commentary, page 2968

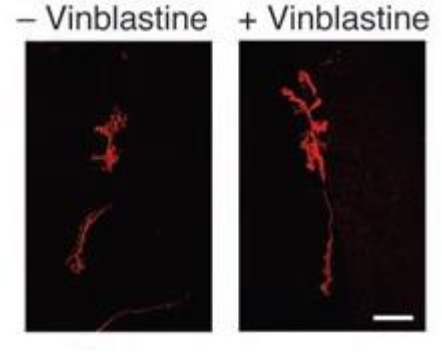
The Journal of Clinical Investigation http://www.jci.org Volume 115 Number 11 November 2005

Disease-related phenotypes in a *Drosophila* model of hereditary spastic paraplegia are ameliorated by treatment with vinblastine

Genny Orso,[1] Andrea Martinuzzi,[2] Maria Giovanna Rossetto,[1,2] Elena Sartori,[1,2] Mel Feany,[3] and Andrea Daga[1,2]

..e per testare in vivo l'efficacia del trattamento farmacologico con vinblastina

L'assenza di Spastina determina l'accumulo di microtubuli eccessivamente stabili
Il trattamento in vivo con vinblastina, che destabilizza i microtubuli, attenua il fenotipo patologico



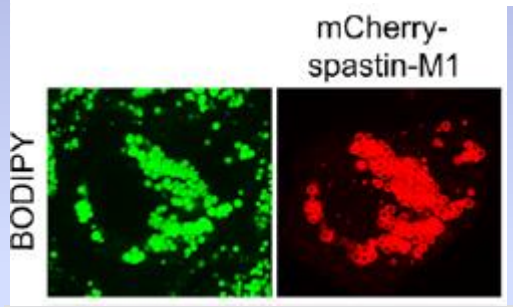
Aumento dell'area sinaptica in presenza di vinblastina

PLOS | GENETICS

RESEARCH ARTICLE

Spastin Binds to Lipid Droplets and Affects Lipid Metabolism

Chrisovalantis Papadopoulos[1,2], Genny Orso[3], Giuseppe Mancuso[1,2], Marija Herholz[2,4], Sentiljana Gumeni[3], Nimesha Tadepalle[1,2], Christian Jüngst[2], Anne Tzschichholz[5,6], Astrid Schauss[2], Stefan Höning[5,6], Aleksandra Trifunovic[2,4], Andrea Daga[3], Elena I. Rugarli[1,2,6]*



Ruolo di Spastina nel metabolismo lipidico

nature Vol 460|20 August 2009|doi:10.1038/nature08280

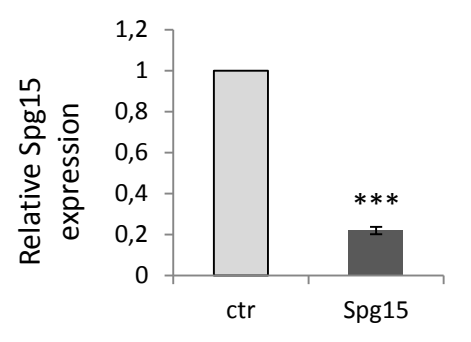
ARTICLES

Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase Atlastin

Genny Orso[1]*, Diana Pendin[1]*, Song Liu[2]*, Jessica Tosetto[1,3], Tyler J. Moss[2], Joseph E. Faust[2], Massimo Micaroni[4], Anastasia Egorova[5], Andrea Martinuzzi[1], James A. McNew[2] & Andrea Daga[1,6,7]

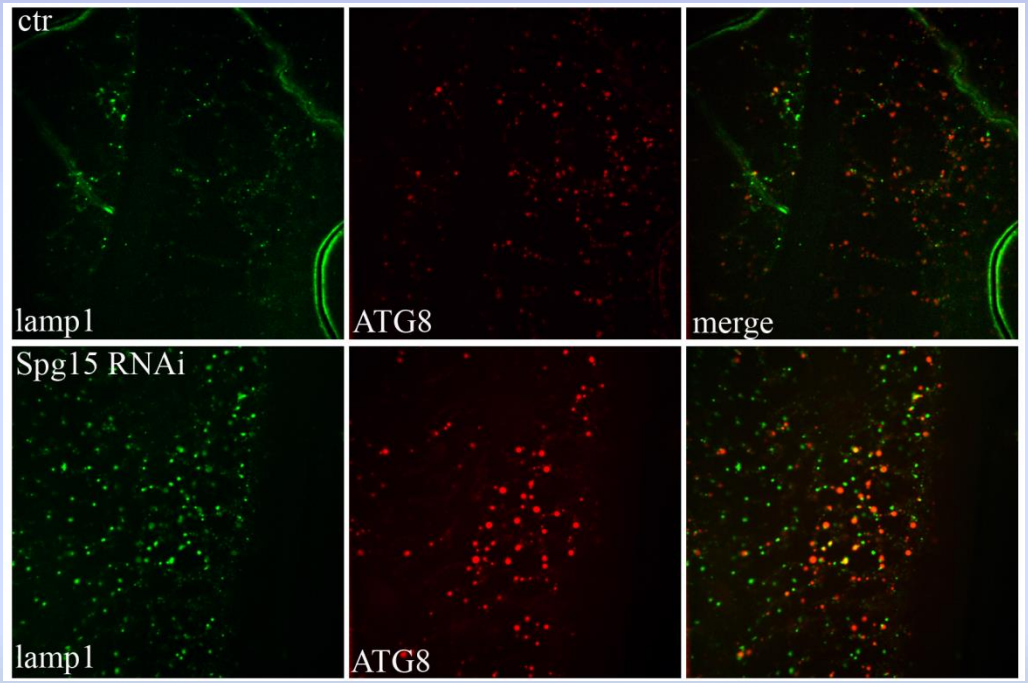
Ruolo di Atlastina nella fusione delle membrane del reticolo

Uso di linee di Drosophila in cui SPG15 è silenziato



il silenziamento determina una riduzione dell'80% nei livelli di espressione di Spg15

Il silenziamento di SPG15 determina l'accumulo di autofagosomi nei tessuti di Drosophila



Elena Panzeri
Andrea Citterio
Castelli Marianna
Alessia Arnoldi
Claudia Crimella
Andrea Daga
Genny Orso

Maria Teresa Bassi

Laboratorio di Biologia Molecolare,
IRCCS E. Medea-La Nostra Famiglia,
Bosisio Parini

Emilio Clementi
Ospedale Sacco, Università di Milano

Olimpia Musumeci
Antonio Toscano
Dipartimento di Neuroscienze, Università di Messina

Sandra Gandossini
Maria Grazia D'Angelo
Sara Bonato
Erika Brighina

Unità Neuromuscolare e di Neuroriabilitazione
IRCCS E. Medea-La Nostra Famiglia,
Bosisio Parini

Marina Scarlato
Dipartimento di Neuroscienze e INSpe,
Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Filippo Maria Santorelli
IRCCS Fondazione Stella Maris, Calambrone, Pisa

Rocco Liguori
Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Bologna