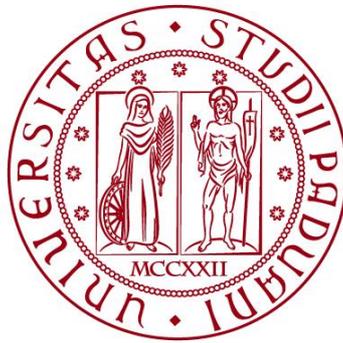


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**IL RUOLO DELLA SINTESI PROTEICA LOCALE NELLA  
RIGENERAZIONE NERVOSA PERIFERICA**

**Tutor: Prof.ssa Michela Rigoni  
Dipartimento di Scienze Biomediche**

**Laureando:  
Francesco Ceccato**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**

## INDICE

1. ABSTRACT	2
2. INTRODUZIONE	3
3. ANALISI RESEARCH ARTICLE 1	8
4. ANALISI RESEARCH ARTICLE 2	15
5. CONCLUSIONI	23
6. BIBLIOGRAFIA	25

## 1. ABSTRACT

La tesi ha l'obiettivo di illustrare i meccanismi alla base della rigenerazione nervosa periferica approfondendo nello specifico il ruolo della sintesi proteica locale e le metodologie per rilevarla. La rigenerazione nervosa periferica è il processo mediante il quale i nervi periferici che hanno subito dei danni dovuti a lesioni di diversa natura sono in grado di ricrescere e di riacquisire le proprie funzioni. In questo senso la sintesi proteica locale è un meccanismo cellulare essenziale che permette la produzione di proteine specifiche a livello degli assoni, dei terminali assonici e delle sinapsi, senza che queste debbano essere trasportate dal corpo cellulare del neurone. La sintesi proteica locale permette dunque di rendere più efficace il meccanismo di rigenerazione ed è necessaria per la crescita del nuovo assone e la formazione della sinapsi, oltre che per la produzione di molecole di segnale che connettono la periferia al midollo spinale.

Lo studio e la comprensione di questo fenomeno rappresentano un'area di ricerca promettente per lo sviluppo di nuove terapie di rigenerazione nervosa per curare lesioni del sistema nervoso periferico dovute a traumi o malattie neurodegenerative.

## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 Il sistema nervoso periferico

Il sistema nervoso è un insieme complesso di cellule responsabili della regolazione, del controllo e della gestione di tutte le funzioni e attività del nostro corpo. Dal punto di vista strutturale esso si divide in due componenti principali: il sistema nervoso centrale (SNC), composto da cervello e midollo spinale, e il sistema nervoso periferico (SNP), costituito da neuroni sensoriali (afferenti) e neuroni motori (efferenti).

Il SNP collega il SNC agli altri sistemi e apparati, inclusi gli organi di senso. Il SNP trasmette i segnali sensoriali e motori inviati dal SNC, permettendo una risposta adeguata agli stimoli. Il SNP è costituito da strutture nervose periferiche specifiche, chiamate nervi, che si suddividono in nervi cranici e spinali, insieme alle loro ramificazioni. Tutti i tessuti nervosi situati al di fuori del SNC sono inclusi nel SNP.

Il tessuto nervoso è costituito da due principali tipologie di cellule: i neuroni e la neuroglia.

I neuroni ne rappresentano l'unità strutturale e funzionale e sono collegati tra loro a formare una rete neurale che si dirama in tutto il corpo e permette la comunicazione con le altre tipologie di cellule. Il neurone è costituito da un corpo centrale, detto soma o pironoforo, contenente nucleo e citoplasma e da cui partono dei prolungamenti detti assone e dendriti. L'assone origina direttamente dal corpo cellulare ed è un unico prolungamento responsabile della trasmissione dell'informazione in direzione centrifuga, ovvero verso le altre cellule circostanti. I dendriti sono invece molto più ramificati e la loro funzione è quella di ricevere i segnali in ingresso ed effettuare trasmissione centripeta, in direzione del soma.

L'altra componente fondamentale del sistema nervoso è rappresentata dalla neuroglia, o glia. Questa è composta dalle cellule gliali, che circondano il soma dei neuroni e avvolgono l'assone svolgendo numerose funzioni. Nel SNP le cellule gliali sono principalmente classificate come: cellule satelliti, che si dispongono attorno al soma dei neuroni conferendo supporto strutturale, garantendo l'isolamento elettrico e la perfusione delle sostanze nutrienti; cellule di Schwann (SC), che avvolgono gli assoni periferici e secernono mielina attorno ad essi creando uno strato protettivo bianco lucido chiamato guaina mielinica. Sono inoltre presenti minuscoli interstizi chiamati nodi di Ranvier.

Le cellule di Schwann hanno un ruolo centrale nella risposta a lesioni acute del SNP.

Per quanto riguarda l'anatomia dei neuroni periferici, i neuroni sensoriali hanno i corpi cellulari nei cosiddetti gangli mentre il soma dei neuroni motori è situato nel midollo spinale o a livello del tronco encefalico. L'assone è avvolto non solo dalla guaina mielinica, ma anche da un sottile strato di tessuto connettivo lasso chiamato endoneuvrio. Esso contiene anche una rete di capillari per il rifornimento di ossigeno e nutrienti. L'assone rivestito in questo modo rappresenta la fibra nervosa. Fasci di assoni raggruppati insieme costituiscono i fascicoli, rivestiti dal perineuvrio. Infine, il nervo può essere costituito da più fascicoli associati con tessuto connettivo ed è rivestito dall'epineuvrio.

## 2.2 La rigenerazione nervosa periferica

Il SNP può andare incontro a danni di natura diversa causati da agenti chimici, fisici o biologici.

In risposta ad una lesione a livello assonale, il SNC e il SNP si differenziano notevolmente nella capacità e nel meccanismo di rigenerazione neuronale.

Nel SNC la natura dell'ambiente neuronale, la presenza di molecole inibitorie derivanti dalla mielina e di tessuto cicatriziale gliale che si forma in seguito alla degenerazione assonale rendono sfavorevole la successiva rigenerazione. Al contrario, i nervi del SNP hanno sviluppato la capacità di rigenerare e reinnervare i loro organi bersaglio grazie all'interazione tra cellule diverse. Il processo può consentire un recupero completo o parziale a seconda dell'entità e del sito della lesione, e delle caratteristiche del soggetto. Negli anziani, ad esempio, la rigenerazione è rallentata.

Per ristabilire la connessione con i tessuti bersaglio e quindi riacquisire la propria funzione il neurone deve avviare un processo di crescita che prevede la formazione di un cono di crescita. Prima di questo, tutti i detriti derivanti dalla frammentazione della porzione distale dell'assone devono essere rimossi per lasciare spazio alla ricrescita, che richiede una riorganizzazione del citoscheletro dell'assone. In seguito ad una lesione assonale la porzione dell'assone che si trova oltre il punto di lesione, ovvero distale, va incontro a un processo chiamato "degenerazione Walleriana", durante la quale la distale dell'assone, disconnessa dal corpo cellulare, si frammenta e collassa, le SC eliminano la mielina che avvolge gli assoni via fagocitosi e producono citochine pro-infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-1 $\alpha$ . Vengono reclutati i macrofagi nel sito della lesione che contribuiscono alla fagocitosi degli assoni degenerati e dei detriti mielinici.

Le SC sopravvivono al danno e, dopo pochi giorni, disconnesse dall'assone, iniziano a proliferare differenziandosi in un fenotipo pro-rigenerativo. Queste SC si trasformano così in SC di riparo, che rilasciano fattori di crescita specifici, promuovendo la rigenerazione degli assoni e la sopravvivenza dei neuroni dopo l'assotomia (resezione dell'assone). Le SC si allineano insieme e vanno a formare le bande di Bungner, una sorta di "rotaia" che ha un ruolo chiave nella guida dell'assone e dei suoi coni di crescita, dal sito prossimale a quello distale. Il cono di crescita guida la ricrescita dell'assone e permette, una volta raggiunto il sito bersaglio, di ristabilire le sinapsi con organi e ghiandole target.

La capacità rigenerativa del SNP si basa fortemente sulla capacità delle SC di subire un passaggio fenotipico da un fenotipo mielinizzante ad uno che favorisce la rigenerazione neurale.

Per gli assoni la capacità rigenerativa dipende da vari fattori, tra cui la capacità di formare un nuovo cono di crescita dopo l'assotomia.

Nei neuroni si osserva che il Ca<sup>2+</sup> entra rapidamente negli assoni recisi e questo aumento della [Ca<sup>2+</sup>], insieme alla proteolisi dipendente dal calcio degli elementi del citoscheletro, è fondamentale per avviare la formazione di un cono di crescita. Dopo la lesione, il calcio extracellulare o quello rilasciato dai depositi intracellulari attiva diverse vie di segnalazione, tra cui la via della proteasi calpaina, responsabile del rimodellamento strutturale nel sito della lesione attraverso la scissione dell'actina e della spettina del citoscheletro. La degradazione di questi elementi strutturali accelera la fusione della membrana,

facilitando così la chiusura della rottura causata dalla lesione. È stato inoltre notato che il calcio attiva la chinasi DLK che stimola la segnalazione retrograda per attivare l'espressione dei geni responsivi alle lesioni a livello del soma nel SNC. Il calcio attiva quindi una varietà di segnali capaci di indurre la trasformazione dei segmenti assionali in coni di crescita e di iniziare un programma genico di riparo. [1]

In studi recenti è stato scoperto che due importanti geni associati alla conversione delle SC mielinizzanti in SC di riparo nei roditori, c-Jun e p75NTR, sono anche sovra-regolati nei nervi umani gravemente danneggiati. Tali osservazioni incoraggiano l'idea che modelli animali come i roditori siano rilevanti per l'apprendimento delle lesioni nervose umane e i sistemi di rigenerazione. [2]

### 2.3 La sintesi proteica locale

Numerosi studi hanno evidenziato che gli assoni, come i dendriti, hanno la capacità di sintetizzare nuove proteine in modo autonomo attraverso la traduzione di mRNA localizzati. Nei mammiferi, i neuroni conservano la capacità di indirizzare mRNA negli assoni anche in età adulta.

Negli ultimi vent'anni la rigenerazione nervosa è diventato un tema di ricerca di interesse globale e da diversi studi è emerso che le proteine sintetizzate localmente favoriscono la rigenerazione. Dopo una lesione assonale infatti, la traduzione locale è necessaria per la formazione del cono di crescita, contribuendo al mantenimento strutturale dell'assone durante questa fase e per generare rapidamente un segnale di lesione che arriva al corpo cellulare tramite trasporto retrogrado, con lo scopo di avviare percorsi pro-rigenerativi. La sintesi proteica locale è inoltre necessaria per generare materiale per la ricrescita, soprattutto se la lesione è localizzata molto lontano dalla sinapsi.

La regolazione della sintesi proteica assonale mediante stimoli esterni potrebbe rappresentare un metodo per migliorare la rigenerazione neuronale che normalmente, in individui adulti, risulta notevolmente compromessa. [3]

Un obiettivo della ricerca in questo campo è stato quello di costruire un catalogo completo di mRNA localizzati nell'assone. I progressi nella ricerca sul trascrittoma assonale hanno permesso di catalogare questi mRNA per capire meglio come la sintesi proteica assonale contribuisca alle funzioni cellulari. È stato scoperto che negli assoni esiste un numero molto elevato di mRNA che codificano proteine appartenenti a varie famiglie, inclusi fattori di trascrizione, che normalmente non ci si aspetterebbe di trovare in questa sede. Inoltre, il contenuto degli mRNA nell'assone cambia con l'età e in risposta a segnali esterni, e solo una piccola parte di questi mRNA viene tradotta in proteine in un dato momento. Questo suggerisce che gli assoni hanno una sorta di "riserva" di mRNA, pronti per essere tradotti solo quando necessario, ottimizzando così la risposta alle esigenze cellulari immediate. [4]

### 2.3.1 Esempi di proteine coinvolte nel meccanismo di rigenerazione

Segnali di allarme che si generano dopo danno nell'assone vengono trasportati in maniera retrograda al corpo cellulare grazie a segnali di localizzazione nucleare (NLS), ovvero corte sequenze di amminoacidi che informano il sistema di trasporto che quella proteina è destinata al nucleo.

In questo senso le importine sono proteine che mediano il trasporto delle proteine contenenti NLS nel nucleo. Esistono due tipi principali di importine:

- Importina- $\alpha$ : Si lega direttamente alla sequenza NLS delle proteine cargo, ma con bassa affinità.
- Importina- $\beta$ : Si lega all'importina- $\alpha$ , aumentando l'affinità dell'importina- $\alpha$  per la NLS, facilitando così il trasporto della proteina nel nucleo.

Poiché le importine sono coinvolte nel riconoscimento e nel trasporto delle proteine con NLS, alcuni ricercatori si sono chiesti se potessero avere un ruolo anche nel trasporto retrogrado all'interno degli assoni.

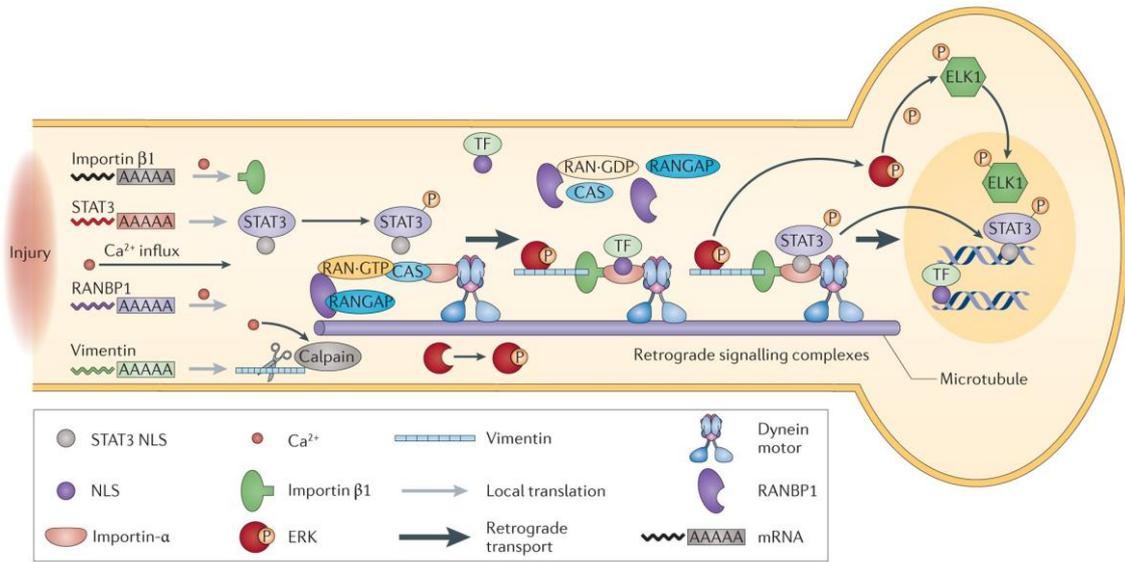
Studi iniziali hanno dimostrato che alcune isoforme di importina- $\alpha$  sono sempre associate alla dineina, un motore molecolare che trasporta molecole lungo i microtubuli degli assoni. Questo accade sia in condizioni normali sia dopo una lesione negli assoni dei nervi sciatici. È stato osservato che importina  $\beta$ 1 compare invece negli assoni solo dopo una lesione. Questa presenza è dovuta alla traduzione locale del suo mRNA, il che significa che l'assone stesso produce importina  $\beta$ 1 in risposta al danno. [5]

A seguito di una lesione periferica, l'espressione di mTOR (protein-chinasi bersaglio della rapamicina nei mammiferi) aumenta nel sito della lesione, assumendo il ruolo di regolatore chiave nell'assone. mTOR favorisce la traduzione del proprio mRNA e quella di altri trascritti essenziali, tra cui quelli per importina  $\beta$ 1, vimentina, RanBP1, STAT3 e PPAR $\gamma$ . Di conseguenza, qualsiasi alterazione della via di segnalazione di mTOR può compromettere il processo di rigenerazione nervosa nel SNP.[6] STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) è un fattore di trascrizione che viene attivato in risposta a danno e partecipa alla regolazione della risposta allo stesso.

-RANBP1 (RAN Binding Protein 1) è una proteina che si lega a RAN, una piccola GTPasi coinvolta nel trasporto nucleare.

-Vimentina è una proteina del citoscheletro che contribuisce alla struttura del neurone e può essere coinvolta nella risposta al danno.

Ran è una GTPasi che regola il trasporto nucleare e in condizioni normali si trova negli assoni in uno stato legato al GTP, impedendo alle proteine di legarsi al complesso motore importina- $\alpha$ -dineina. La lesione nervosa induce la sintesi locale della proteina attivante la GTPasi specifica per Ran, ovvero RANBP, e di importina- $\beta$ 1, che sostituisce Ran GTPasi legandosi direttamente a importina- $\alpha$ , come detto in precedenza. [7]



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 1 Tratta [7]

### 3. ANALISI RESEARCH ARTICLE 1

Titolo: Rat Sciatic Nerve Axoplasm Proteome Is Enriched with Ribosomal Proteins during Regeneration Processes

*Andres Di Paolo, Joaquina Farias, Joaquin Garat, Andrew Macklin, Vladimir Ignatchenko, Thomas Kislinger and José Sotelo Silveira*  
*Pubblicato nel J. of Proteome Research 2021*

In questo articolo viene analizzato il proteoma dell'assoplasma estratto da nervo sciatico di ratto (*Rattus norvegicus*), concentrandosi in modo particolare sulle modalità con cui le proteine ribosomiali e le componenti cellulari coinvolte nella sintesi proteica locale intervengono nella rigenerazione nervosa in risposta al danno.

Per le sue dimensioni e la facile accessibilità a manipolazioni sperimentali, il nervo sciatico rappresenta un modello ideale per la ricerca sulla rigenerazione nervosa. Lesioni a carico di questo nervo possono avere conseguenze molto gravi per la mobilità e la sensibilità degli arti inferiori, conferendogli dunque una notevole rilevanza clinica.

#### 3.1 Introduzione

Nell'articolo viene approfondita l'importanza della localizzazione delle proteine negli assoni, che risulta essenziale per l'adempimento delle funzioni neuronali, in particolare per la risposta agli stimoli esterni, sia in condizioni normali che durante i processi di rigenerazione dopo una lesione.

Come emerso da precedenti studi, quando un nervo subisce una lesione, si innesca una cascata di processi molecolari inizialmente indipendenti dall'attività nucleare e dal trasporto degli mRNA nell'assone, che culminano con un aumento della sintesi proteica locale nel sito di danno.[9] Tuttavia, la maggior parte delle conoscenze su questi processi deriva da studi in vitro, lasciando un vuoto nella comprensione dei meccanismi in vivo.

A tal proposito, questo studio si è concentrato sull'analisi dell'assoplasma del nervo sciatico di ratto (danneggiato o meno), utilizzando una tecnica di estrusione osmotica combinata ad un approccio proteomico quantitativo senza marcatura (*label-free quantitative proteomics*). Questo metodo permette di analizzare i cambiamenti proteomici che avvengono negli assoni durante le fasi iniziali della rigenerazione nervosa.

#### 3.2 Materiali e metodi

*Animali e procedure:* per effettuare gli esperimenti sono stati scelti ratti maschi Sprague-Dawley (un ceppo *outbred* che conserva una certa variabilità genetica) di età compresa tra 6 e 9 mesi, allevati presso l'Istituto di Ricerche Biologiche Clemente Estable di Montevideo. Gli animali sono stati mantenuti in un ciclo di 12 ore di luce e 12 ore di buio, fornendo cibo e acqua. Per l'analisi del proteoma dei nervi sciatici sono stati utilizzati 6 ratti: 3 sono stati sottoposti a lesione di entrambi i nervi sciatici, mentre altri 3 sono stati utilizzati come controllo. Questo approccio ha permesso di confrontare i campioni di

assoplasma di un nervo sciatico con il controlaterale intero dello stesso animale, sia in condizioni normali che di lesione, minimizzando così variabili esterne che si presenterebbero tra animali diversi.

Parallelamente a questo è stato condotto un altro esperimento in cui sono state studiate le radici ventrali (VR) e dorsali (DR) dei nervi spinali. VR e DR hanno origine dal midollo spinale, contengono rispettivamente fibre motorie e sensoriali e fanno da ponte tra SNP e SNC.

Le VR e DR sono state prelevate dalle vertebre L5 e L6 della colonna vertebrale da cui partono per formare il nervo sciatico.

Questa parte dell'esperimento è stata probabilmente progettata per fornire un quadro completo della risposta neurale alla lesione, non solo a livello del nervo sciatico ma anche a livello delle radici nervose.

Per effettuare le lesioni gli animali sono stati anestetizzati tramite iniezione intraperitoneale di ketamina (100 mg/kg) e xylazina (10 mg/kg). È stata effettuata un'incisione a metà coscia, il nervo sciatico è stato sezionato e successivamente l'incisione è stata suturata con colla a base di cianoacrilato. Dopo 18 ore di recupero, i ratti sono stati soppressi tramite decapitazione e un segmento di 2 cm di nervo sciatico, vicino al sito di lesione, è stato rimosso per l'estrazione dell'assoplasma e l'analisi proteomica.

*Estrazione e isolamento delle proteine:* una volta rimosso il segmento di nervo sciatico sono state adottate due metodologie distinte: l'isolamento dell'assoplasma e l'estrazione delle proteine dal nervo intero. L'assoplasma è stato isolato utilizzando un protocollo di estrusione osmotica, un processo sfruttato in natura per il mantenimento dell'omeostasi cellulare. Nei nervi sciatici, sia lesionati che non lesionati, è stato rimosso l'epinevrio. I fascicoli nervosi sono stati quindi aperti con pinzette e incubati in un buffer ipotonico di 250  $\mu$ L di PBS 0,2 $\times$  (Phosphate Buffered Saline) per due ore a temperatura ambiente. Successivamente, i nervi sono stati lavati 3 volte per 5 minuti in 500  $\mu$ L di PBS 0,2 $\times$  a temperatura ambiente con rotazione, incubati in 150  $\mu$ L di PBS 1 $\times$  a temperatura ambiente per 30 minuti e infine centrifugati a 10.000g per 10 minuti a 4°C. A questo punto il surnatante contenente le proteine dell'assoplasma è stato trasferito in una nuova provetta. Il controllo quantitativo è stato effettuato utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop mentre il controllo qualitativo è stato effettuato tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e colorazione con nitrato d'argento.

Per quanto riguarda l'estrazione delle proteine, queste sono state estratte dai nervi sciatici (lesionati e non), le radici ventrali e le radici dorsali. Nei nervi sciatici l'epinevrio è stato rimosso in PBS 1 $\times$  freddo.

I fascicoli nervosi vengono trasferiti in una provetta da 1,5 mL con 150  $\mu$ L di PBS 1 $\times$  in ghiaccio e vengono poi sottoposti a sonicazione con sei cicli di 8 secondi per l'estrazione.

*Protocollo BONCAT:* per identificare le proteine neosintetizzate nell'assoplasma dopo l'estrazione del nervo e la rimozione dell'epinevrio, i fascicoli nervosi vengono leggermente aperti con pinzette e incubati per 1 ora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> in un medium di coltura privo di metionina, con lo scopo di ridurre parzialmente le riserve endogene di metionina nel nervo sciatico. I fascicoli vengono trasferiti in un medium SILAC completo arricchito con 30 mg/mL di Met e 1 mM di AHA

(azidoalanoalanina), un amminoacido modificato con un gruppo azido che viene incorporato nelle proteine durante la sintesi proteica. L'incubazione prosegue per 4 ore a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Il rapporto molecolare finale tra AHA e Met è di 5:1. Questo metodo permette di incorporare l'AHA nelle proteine neosintetizzate, facilitando la loro successiva identificazione e analisi.

*Metodo di estrazione dei peptidi:* in questa parte di articolo viene descritto un metodo dettagliato per l'estrazione e la preparazione dei peptidi per l'analisi di proteomica, applicabile sia ai campioni di proteoma totale che a quelli di assoplasma. Il processo inizia con la quantificazione delle proteine estratte mediante saggio BCA, un test che si basa sulla reazione tra proteine e acido bicinconico, che produce un complesso colorato la cui intensità dipende dalla concentrazione proteica. I campioni vengono poi risospesi in una soluzione di PBS e trifluoroetanolo (TFE) al 50%. Seguono varie fasi di trattamento con l'obiettivo di denaturare le proteine, tra cui agitazione, sonicazione e incubazione a temperatura elevata. Le proteine vengono poi ridotte con ditiotreitolo (DTT) e alchilate con iodoacetamide per stabilizzare i gruppi tiolici ed evitare che si riformino i legami disolfuro. Successivamente, le proteine vengono digerite con una miscela di proteasi tripsina e LysC per 16 ore a 37°C, seguita da un'ulteriore digestione con tripsina per 2 ore. La digestione viene arrestata con acido formico all'1%. La soluzione contenente le proteine digerite viene centrifugata e il surnatante viene concentrato tramite evaporazione (usando uno SpeedVac) fino a un piccolo volume, per facilitare i passaggi successivi di purificazione e analisi.

I peptidi vengono purificati utilizzando una colonna di fase solida inversa di C18, un materiale idrofobo. Questa fase è cruciale per rimuovere i contaminanti e concentrare i peptidi. L'eluizione dei peptidi avviene con una soluzione di acetonitrile all'80% e acido formico allo 0,1%, che permette di separare e raccogliere i peptidi interessati.

Dopo l'eluizione, i peptidi sono nuovamente concentrati per evaporazione, risospesi in acqua con acido formico per stabilizzarli, vortexati e sonicati per completare la preparazione.

Per i campioni marcati con AHA, il protocollo prevede alcune modifiche, tra cui la combinazione di campioni da nervi diversi per aumentare la quantità di proteina totale. Viene poi effettuato un protocollo di arricchimento Click-iT, utilizzato per catturare e purificare le proteine che contengono l'analogo della metionina marcato. Questa fase avviene dopo il protocollo BONCAT e prima dell'estrazione dei peptidi.

*Analisi proteomica e statistica:* i peptidi estratti vengono inizialmente quantificati usando uno spettrofotometro NanoDrop. Viene poi condotta un'analisi LC-MS/MS che combina un sistema di cromatografia liquida nanoflow Easy nLC 1000, ovvero una cromatografia a nanoflusso con alta sensibilità, e uno spettrometro di massa Orbitrap Fusion per i campioni standard, mentre per i campioni marcati con AHA si utilizza un sistema Q-Exactive Orbitrap. Nella colonnina di C18 viene iniettata una aliquota costante di 2 µg di peptidi e il gradiente cromatografico dura 4 ore.

I peptidi separati dalla cromatografia liquida vengono ionizzati per creare ioni carichi che passano allo spettrometro. I dati MS1 derivano dalla prima

scansione di massa in cui gli ioni vengono separati e analizzati in base al loro rapporto massa/carica senza frammentazione e sono acquisiti ad alta risoluzione con l'Orbitrap. I dati MS2 sono selezionati dalla MS1 e vengono invece frammentati e analizzati. Questi sono ottenuti con un metodo top-20, che considera i 20 ioni più abbondanti utilizzando la tecnologia ion trap lineare, più veloce rispetto all'Orbitrap. Lo spettrometro opera in modalità data-dependent che fornisce dati dettagliati sulla struttura dei peptidi.

I dati acquisiti sono processati utilizzando un software che identifica e quantifica le proteine presenti nei campioni, confrontandole con il database UniProt per *Rattus norvegicus*. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il test t di Welch e il fold change, con una soglia di significatività di  $p \leq 0,05$  e fold change  $> 2$ . Un fold change  $> 2$  significa che la differenza nella quantità proteica tra le due condizioni (nervo lesionato e non) è di almeno il doppio, il che suggerisce una variazione piuttosto rilevante. I risultati sono stati ulteriormente analizzati per identificare differenze significative tra i gruppi sperimentali.

Infine, sono state effettuate due analisi bioinformatiche per identificare i processi biologici maggiormente rappresentati e visualizzare le sovrapposizioni proteiche tra i diversi campioni studiati.

### 3.3 Risultati e discussione

Lo studio ha rivelato una quantità di proteine maggiore rispetto a ricerche precedenti basate sull'estrazione osmotica [8]. Miglioramenti nel protocollo di estrazione rispetto a questi studi hanno permesso di aumentare l'efficienza con cui le proteine sono state estratte e preparate per l'analisi, permettendo anche di ridurre il numero di animali impiegati. Sono state rilevate in media 2087 proteine nell'assoplasma e 2099 nel nervo sciatico intero. Sorprendentemente, il numero di proteine rilevate nell'estratto del nervo intero non è quindi risultato significativamente superiore a quello dell'assoplasma. Questo potrebbe essere dovuto a limitazioni tecniche come, ad esempio, la mascheratura di proteine meno abbondanti da parte di quelle associate alla mielina, che al contrario sono altamente espresse nel nervo. Il 95% delle proteine rilevate in ogni condizione era presente in tutti i replicati biologici con una certa coerenza, e il 97% delle proteine assonali rilevate era incluso nel proteoma del nervo intero. Il clustering ha evidenziato differenze significative tra i proteomi dell'assoplasma e del nervo intero a livello di concentrazioni relative, ovvero la maggior parte delle proteine presenti nell'assoplasma si trovavano anche nel nervo intero, ma in concentrazioni diverse. Il confronto tra le condizioni prima e dopo lesione mostrava maggiori somiglianze tra loro. Ciò significa che la variazione nella composizione proteica tra uno stato di normalità e uno stato lesionato è relativamente modesta, se paragonata alle differenze molto più marcate tra i proteomi dell'assoplasma e del nervo intero. Le differenze nei profili proteici tra questi due compartimenti sono così marcate che risultano essere più significative delle differenze indotte dalla lesione stessa. Sebbene il 97% delle proteine rilevate nell'assoplasma fosse presente anche nel nervo intero, le differenze significative emergono per il modo in cui le proteine sono quantitativamente presenti in ciascun compartimento, piuttosto che per la loro presenza o assenza. Questo suggerisce che l'assoplasma ha una composizione proteica altamente specializzata che lo distingue fortemente dal

resto del nervo. Circa un terzo delle proteine rilevate mostrava punteggi Z elevati negli estratti di assoplasma, suggerendo un arricchimento di componenti assonali. Se una proteina in un campione ha un punteggio Z molto alto, significa che la sua abbondanza è molto superiore alla media e potrebbe essere biologicamente significativa. L'analisi ha anche permesso di stilare un elenco di proteine assonali e di identificare potenziali contaminanti del nervo intero negli estratti assonali. Marcatori noti di SC, tra i quali Mbp, Mpz (proteine della mielina) e Ncam (proteina di adesione), sono stati principalmente rilevati nel cluster del nervo intero e non nell'assoplasma a dimostrazione dell'efficacia della procedura di isolamento dell'assoplasma per arricchire componenti assonali.

Il fatto che proteine specifiche degli assoni, come le tre subunità dei neurofilamenti, siano risultate tra le 30 proteine più abbondanti rilevate negli estratti di assoplasma indica che il materiale raccolto dall'assoplasma è effettivamente ricco di componenti assonali. Questo è un segno che l'isolamento ha funzionato bene, concentrando le proteine specifiche dell'assoplasma e riducendo la contaminazione da altre parti del nervo.

Sfruttando il protocollo di estrazione osmotica dell'assoplasma, i ricercatori hanno esaminato il materiale estratto dal nervo sciatico, dalle radici ventrali e dorsali del midollo spinale, confrontando i profili proteici in condizioni normali e dopo lesione. L'analisi ha rivelato una notevole sovrapposizione tra i proteomi dei diversi tipi di nervi, con il 75% delle proteine più abbondanti condivise tra i tessuti nervosi interi e il 65% tra i campioni di assoplasma. Tuttavia, sono emerse anche differenze significative del profilo proteico riguardanti quantità relative o specifiche di un nervo, in particolare tra il nervo sciatico e le radici spinali, probabilmente dovute alla maggiore varietà di assoni presenti nel nervo sciatico e ad un'organizzazione tissutale diversa. Questo risultato dimostra che il protocollo osmotico può essere utilizzato per isolare e studiare l'assoplasma da vari tipi di nervi.

Da un'analisi comparativa tra i proteomi dell'assoplasma e del nervo sciatico intero è emerso che in condizioni normali nel campione da assoplasma c'è un arricchimento di proteine coinvolte in processi biologici come l'assemblaggio dei ribosomi, la regolazione della traduzione e l'organizzazione dei microtubuli, soprattutto nell'assoplasma. Questi processi coinvolgono proteine legate all'allungamento della traduzione come ad esempio, Eef1a1, Eif5a, Eef1g, subunità di tubulina alfa e beta, le tre subunità dei neurofilamenti, proteine motrici molecolari, come la miosina e la dineina, e la proteina associata ai microtubuli Map1a. Dopo la lesione, sono emerse anche proteine legate alla risposta immunitaria e alla riparazione.

Un risultato particolarmente rilevante di questa ricerca è l'aumento di proteine ribosomiali nell'assoplasma dopo una lesione (figura 2). Questa scoperta suggerisce, per queste proteine, un ruolo più centrale nella risposta rigenerativa di quanto si pensasse in precedenza. L'aumento della presenza di componenti ribosomiali potrebbe indicare a sua volta un aumento della capacità di sintesi proteica locale. Si tratterebbe di un meccanismo potenzialmente cruciale per una rigenerazione efficace.

È stata osservata una maggiore presenza di proteine ribosomiali negli assoni, con 48 proteine identificate nell'assoplasma, rispetto a sole 7 proteine ribosomiali nel nervo sciatico intero in condizioni normali. Queste proteine sono

coinvolte nella sintesi proteica locale, un processo cruciale per la rigenerazione assonale.

L'analisi degli effetti della lesione ha mostrato cambiamenti più marcati a livello assonale rispetto al nervo intero, con 143 proteine significativamente arricchite nell'assoplasma contro solo 38 nel nervo intero. Questo suggerisce che la risposta iniziale alla lesione possa avvenire principalmente a livello assonale nelle prime 18 ore post-lesione.

L'arricchimento di proteine legate alla risposta alla lesione e alla risposta immunitaria è emerso più chiaramente nelle condizioni post-lesione, ma la presenza di componenti essenziali per questi processi era già evidente nel proteoma assonale in condizioni normali.

L'arricchimento di queste proteine suggerisce che la sintesi proteica locale è particolarmente importante per la risposta rigenerativa dell'assone dopo una lesione. Questo sottolinea l'idea che l'assoplasma non sia solo un sito di trasporto ma anche di sintesi di proteine necessarie per la rigenerazione e il mantenimento dell'assone.

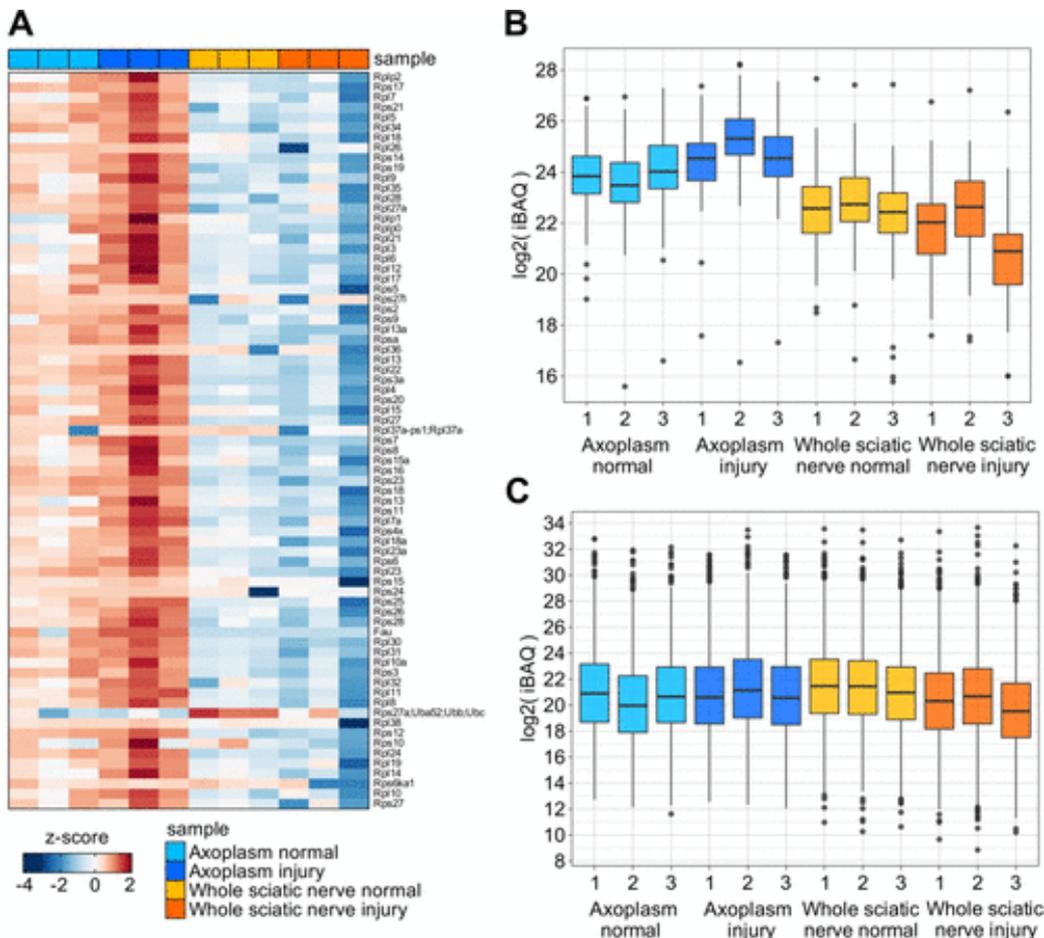


Figura 2 (A) Heatmap che mostra l'espressione delle proteine ribosomiali nei diversi campioni. Z-score rosso: indica un'espressione maggiore rispetto alla media. Blu: indica un'espressione minore rispetto alla media. Box plot per le proteine ribosomiali (B) e per tutte le proteine (C) espresse nei 4 campioni diversi.

Per un'ulteriore validazione dei dati ottenuti il proteoma dell'assoplasma del nervo sciatico di ratto adulto in vivo è stato confrontato con proteomi assonali di

altre specie di topi, ratto e xenopus ottenuti in vitro in studi precedenti. I risultati hanno rivelato una notevole sovrapposizione tra i dati raccolti:

- 356 proteine erano comuni a tutti i proteomi analizzati.
- 1706 proteine (85%) erano presenti in almeno una delle altre specie.
- Solo 294 proteine (15%) erano specifiche dell'assoplasma del nervo sciatico di ratto in vivo.

Una grande percentuale (84%) delle proteine legate al trasporto retrogrado e anterogrado rilevate in studi in vitro è stata anche identificata nel proteoma dell'assoplasma in questo studio.

L'analisi ha rivelato che almeno il 10% delle proteine rilevate nell'assoplasma sono proteine leganti l'RNA (RBPs), con una percentuale che va dal 30% pre-lesione al 36% post-lesione. Tra queste RBPs, un numero significativo era costituito da proteine ribosomiali, con 22 rilevate in condizioni normali e 28 in condizioni lesionate. Questo sottolinea l'importanza delle RBPs nella funzione e rigenerazione assonale.

Nell'articolo sono infine descritti i risultati della tecnica BONCAT combinata con la proteomica per individuare le proteine neosintetizzate (NSPs) nell'assoplasma del nervo sciatico non lesionato in vivo. Sono state identificate 42 NSPs e nonostante il numero di proteine rilevate sia inferiore rispetto a studi in vitro, il risultato è importante poiché rappresenta una delle prime rilevazioni di NSPs in assoni maturi in vivo con approcci proteomici. Tra le proteine identificate, vi sono le subunità leggere e medie dei neurofilamenti (NEFL e NEFM), che confermano i dati precedenti sulla sintesi locale di queste proteine negli assoni. A livelli inferiori rispetto al proteoma del nervo intero sono state identificate anche proteine tipiche delle cellule gliali, come MBP e MPZ, probabilmente a causa della loro collocazione in aree di contatto tra l'assone e la mielina. Questo suggerisce che una piccola parte di materiale gliale possa aver contaminato il campione di assoplasma. È stato quindi dimostrato che gli assoni maturi hanno la capacità di sintetizzare proteine localmente, non solo in risposta a un danno ma anche in condizioni normali.

La scelta di condurre queste analisi delle NSPs su un nervo in condizioni normali e non su uno lesionato è dovuta probabilmente al fatto di avere un riferimento su quali proteine vengono normalmente sintetizzate negli assoni in condizioni fisiologiche, per poter poi confrontare con precisione come la sintesi proteica cambi in risposta a una lesione. Inoltre, analizzando un nervo sano, si evita di avere "contaminazioni" dovute a processi cellulari che coinvolgono altri tipi cellulari in risposta al danno.

Questo studio ha permesso di comprendere il ruolo del proteoma assonale in vivo, rivelando un aumento di proteine legate al citoscheletro e alla traduzione, in particolare dopo lesioni al nervo sciatico. L'aumento delle proteine ribosomiali negli assoni durante le prime fasi di rigenerazione sottolinea il ruolo cruciale della sintesi proteica locale nel processo di riparazione del danno. Inoltre, sfruttando la tecnica BONCAT è stato possibile identificare proteine di nuova sintesi negli assoni, confermando il ruolo chiave della sintesi proteica locale nella rigenerazione nervosa. Questa ricerca evidenzia l'importanza di studiare questi processi in contesti il più possibile vicini alle condizioni fisiologiche. I risultati ottenuti offrono nuove prospettive sul ruolo della sintesi proteica locale nella risposta rigenerativa degli assoni e aprono la strada a future ricerche in ambito neurologico.

## 4. ANALISI RESEARCH ARTICLE 2

Titolo: Locally translated mTOR controls axonal local translation in nerve injury  
*Marco Terenzio, Sandip Koley, Nitzan Samra, Ida Rishal, Qian Zhao, Pabitra K. Sahoo, Anatoly Urisman, Letizia Marvaldi, Juan A. Oses-Prieto, Craig Forester, Cynthia Gomes, Ashley L. Kalinski, Agostina Di Pizio, Ella Doron-Mandel, Rotem Ben-Tov Perry, Indrek Koppel, Jeffery L. Twiss, Alma L. Burlingame, Mike Fainzilber. Pubblicato su Science 359,1416-1421(2018).*

L'articolo evidenzia l'importanza della traduzione locale nei neuroni. La proteina mTOR emerge come un regolatore chiave in questo processo, coinvolta sia nella sintesi proteica basale che nella rigenerazione nervosa. Lo studio esplora come mTOR venga sintetizzata, attivata e regolata localmente in seguito a danni al nervo sciatico e nei gangli della radice dorsale.

L'articolo esplora quindi in modo dettagliato le modalità con cui la traduzione locale controllata da mTOR supporti la risposta neuronale evidenziando l'importanza di comprendere questi processi per migliorare le strategie di rigenerazione nervosa.

### 4.1 Introduzione

La regolazione locale della sintesi proteica negli assoni è un processo fondamentale per la risposta neuronale alle lesioni e la rigenerazione assonale. Nonostante l'importanza di questo meccanismo sia stata ampiamente riconosciuta, i processi molecolari che lo regolano, specialmente negli assoni, rimangono in gran parte sconosciuti. Il complesso molecolare che include mTOR è noto come regolatore centrale della traduzione e della rigenerazione neuronale, ma il suo ruolo specifico nella sintesi proteica assonale locale non era stato completamente chiarito.

In questo studio, è stato esplorato il ruolo di mTOR nella regolazione della traduzione locale negli assoni dopo una lesione nervosa, utilizzando nello specifico assoni sensoriali provenienti dalle radici dorsali. I ricercatori utilizzano un approccio multidisciplinare che combina tecniche di imaging, genetiche, di inibizione farmacologica e di marcatura di proteine neosintetizzate. In particolare, esaminano l'attivazione e l'espressione di mTOR e delle molecole da esso regolate negli assoni lesionati, studiano la localizzazione dell'mRNA di mTOR negli assoni e i meccanismi del suo trasporto. Analizzano inoltre gli effetti della delezione della regione 3'UTR dell'mRNA di mTOR sulla sua localizzazione assonale e sulla sintesi proteica locale. I numerosi esperimenti descritti in questo articolo forniscono informazioni complementari che aiutano a delineare un quadro più completo della rigenerazione assonale.

### 4.2 Materiali e metodi

*Modelli animali, colture e reagenti:* Lo studio è stato condotto su vari ceppi di topo e su ratti Wistar e Sprague Dawley con l'approvazione del Comitato Etico del Weizmann Institute of Science. Le colture di neuroni dei gangli della radice dorsale (DRG) sono state preparate secondo protocolli consolidati in studi precedenti sfruttando la colorazione della catena pesante del neurofilamento

(NFH) come marcatore per i neuroni propriocettivi. Per l'imaging in vivo della crescita neuronale, è stata utilizzata una linea transgenica che esprime la proteina fluorescente YFP nei neuroni sensoriali. Questa linea transgenica è particolarmente utile per lo studio della crescita e della rigenerazione degli assoni, poiché la YFP, essendo una proteina fluorescente, permette di visualizzare direttamente e in tempo reale le strutture neuronali sotto un microscopio.

I ricercatori hanno svolto numerosi esperimenti utilizzando una vasta gamma di reagenti, tra cui mezzi di coltura, sieri e vari farmaci. Hanno anche utilizzato la proteina mTOR ricombinante purificata. Gli anticorpi primari utilizzati avevano diverse proteine target, tra cui NFH, mTOR, nucleolina, Kif5A e Importina  $\beta$ 1. Gli anticorpi secondari includevano varianti coniugate con Alexa Fluor, un colorante utilizzato per le tecniche di immunofluorescenza, e anticorpi coniugati con HRP, per gli immunoblot.

*Colture di DRG, preparazioni e trattamenti:* Per studiare le caratteristiche e le risposte biologiche dei DRG e del nervo sciatico sono stati adottati due approcci sperimentali: in vitro, per studiare i processi neuronali in condizioni controllate, e in vivo, per osservare come i neuroni rispondono a stimoli esterni in un organismo vivente, dove l'interazione con altri tipi di cellule gioca un ruolo importante.

Per gli esperimenti mirati a studiare la risposta alle lesioni, sono stati impiegati topi che esprimono la proteina fluorescente YFP sotto il promotore Thy-1. Questi topi sono stati trattati con un'iniezione di torin-1 o veicolo direttamente nel nervo sciatico, seguita da una lesione del nervo mediante schiacciamento. Torin-1 è un inibitore specifico di mTOR mentre per veicolo si intende la soluzione in cui il torin-1 è stato diluito per essere somministrato nei topi. In questo caso, si intende una soluzione di controllo che contiene tutti i componenti della preparazione tranne il torin-1. Dopo un periodo di 7 giorni, i DRG associati al nervo sciatico sono stati raccolti e coltivati con i metodi descritti precedentemente per ulteriori analisi.

Generazione di Topi Knockout mTOR 3'UTR: I topi knockout per la regione 3'UTR di mTOR sono stati ottenuti grazie alla CRISPR-Cas9.

Sono stati progettati 2 sgRNA, mirati specificamente alla regione 3'UTR dell'mRNA di mTOR. Queste sgRNA sono state scelte con cura per massimizzare l'efficacia del taglio da parte di Cas9 nei siti desiderati, minimizzando al contempo il rischio di modifiche indesiderate in altre parti del genoma. Una volta progettate, le sgRNA sono state preparate attraverso una serie di passaggi tecnici. Sono state clonate in un plasmide specifico, amplificate tramite PCR e infine trascritte in vitro. Prima di procedere con la modifica degli embrioni, l'efficacia delle sgRNA è stata verificata in vitro, assicurandosi che fossero in grado di guidare correttamente la proteina Cas9 verso i siti target nel DNA.

Parallelamente, è stato preparato l'mRNA della proteina Cas9, attraverso un processo di trascrizione in vitro a partire da un plasmide appositamente preparato. L'mRNA di Cas9 e le sgRNA sono stati poi iniettati negli ovociti di topi donatori. Una volta nati i cuccioli, è iniziata la fase di genotipizzazione.

Questo processo ha portato alla creazione di una linea di topi con una delezione specifica nella regione 3'UTR di mTOR usati per investigare il ruolo della regolazione traduzionale assonale di mTOR nella risposta alle lesioni nervose.

Per un modello di lesione in vitro del nervo sciatico questo è stato sottoposto ad un protocollo standard. I nervi sciatici di topo lesionati in vivo sono stati prelevati, tagliati in piccoli frammenti di 3-4 mm e incubati in un mezzo di coltura contenente DMEM, 10% di siero fetale bovino (FBS) e antibiotici, per un arco di tempo variabile in base allo scopo dell'esperimento. L'assoplasma è stato estratto per analisi biochimiche, mentre per l'immunofluorescenza i frammenti sono stati fissati, sezionati a temperature molto basse e colorati. Per verificare la traduzione locale dell'mRNA di mTOR, i frammenti di nervo sciatico sono stati incubati nel mezzo di coltura con l'aggiunta di cicloesimide o un veicolo di controllo. La cicloesimide è un inibitore della sintesi proteica che impedisce la traduzione dell'mRNA bloccando la traslocazione del ribosoma lungo l'mRNA. Se mTOR o altre proteine vengono sintetizzate localmente in risposta alla lesione, l'uso dell'inibitore impedirà questa sintesi. L'incubazione avviene per tempi specifici: 1, 2 e 4 ore.

Dopo l'incubazione, i frammenti sono stati trattati come nel primo protocollo (fissati, criosezionati) e poi sono stati sottoposti a una colorazione immunofluorescente specifica per mTOR e NFH. Le immagini sono state poi acquisite con un microscopio confocale ad alta risoluzione.

Uno degli esperimenti condotti ha coinvolto colture DRG trattate con AS1411, un oligonucleotide che si lega alla nucleolina, ovvero una proteina funzionale al trasporto degli mRNA e nella regolazione della sintesi proteica locale.

AS1411 è stato utilizzato per modulare la funzione della nucleolina nei neuroni DRG. Lo scopo era studiare come la nucleolina legata a AS1411 potesse influenzare la localizzazione e la traduzione dell'mRNA di mTOR.

Sfruttando queste colture, è stata effettuata una quantificazione dell'mRNA di mTOR. L'RNA è stato estratto separatamente da assoni e soma, retrotrascritto e analizzato mediante RT-QPCR per quantificare l'mRNA di mTOR e 18S con primer specifici. Il 18S viene utilizzato come controllo.

*Marcatura con puomicina:* Per identificare e quantificare la sintesi di nuove proteine in corso sia in sezioni di nervo sciatico che in colture di DRG sono state utilizzate diverse tecniche. Uno dei protocolli si basa sulla marcatura con puomicina. Per quanto riguarda il nervo sciatico, esso è stato tagliato in frammenti e incubato con torin-1 (inibitore di mTOR) o anisomicina, inibitore della sintesi proteica che blocca l'allungamento delle catene polipeptidiche, particolarmente utile per esperimenti in cui si vuole interrompere la sintesi proteica in corso. Successivamente è stata aggiunta la puomicina per marcare i polipeptidi nascenti. La puomicina è una molecola che imita la struttura della parte finale di un tRNA e entra nel sito A del ribosoma, viene attaccata alla catena polipeptidica nascente e causa il distacco prematuro della catena polipeptidica dal ribosoma. L'analisi è stata effettuata sull'assoplasma estratto con una soluzione tampone, tramite metodi biochimici o immunofluorescenza. Il

protocollo per neuroni DRG prevedeva che le cellule venissero pre-incubate con anisomicina, seguita da puromicina.

Dopo il trattamento, le cellule sono state fissate e colorate per puromicina e NFH (marker neuronale). L'analisi è stata focalizzata sulle punte assonali e sui corpi cellulari. In entrambi i casi, le immagini sono state acquisite con microscopia confocale ad alta risoluzione e analizzate per quantificare i livelli di marcatura con puromicina (Figura 4).

Un'altra tecnica sfruttata prevede l'utilizzo di O-propargyl-puromicina (OPP), la quale a differenza della puromicina tradizionale contiene un gruppo propargilico, che permette una successiva reazione di "click chemistry" per l'etichettatura specifica.

*Approcci Proteomici e di Imaging Molecolare:* per quantificare la marcatura con puromicina viene utilizzato un sistema di elettroforesi capillare automatizzato che esegue la separazione delle proteine mediante elettroforesi capillare e successivamente rileva e quantifica le proteine target utilizzando anticorpi specifici.

La concentrazione delle proteine nei campioni di assoplasma è stata stimata utilizzando il metodo di Bradford, un test biochimico comunemente usato per misurare la concentrazione totale di proteine in un campione. Nel sistema di elettroforesi capillare è stata caricata una quantità uguale di proteine per ogni campione.

Per analizzare come le specifiche interazioni proteina-RNA nell'assone facilitino il processo di sintesi proteica locale, è stata adottata una tecnica di immunoprecipitazione dell'assoplasma seguita da analisi dell'RNA e delle proteine. L'assoplasma è stato estratto dal nervo sciatico di topo e incubato con anticorpi anti-Nucleolina/Kif5A o con un controllo IgG di coniglio per 4 ore. Successivamente, aggiungendo delle biglie magnetiche accoppiate a proteina G con affinità per gli anticorpi sono stati catturati i complessi anticorpo-proteina. Questa strategia ha permesso di isolare e analizzare le proteine target (nucleolina e Kif5A) e qualsiasi RNA o proteina associata a loro.

Per visualizzare la traduzione locale di proteine nei DRG è stato utilizzato il Proximity Ligation Assay (PLA). Dopo la coltura per 48 ore, i neuroni sono stati trattati con anisomicina o torin-1 seguiti da puromicina. Successivamente, le cellule sono state fissate e immuno-marcate con anticorpi contro puromicina e mTOR, seguiti dal protocollo PLA. Le immagini sono state acquisite mediante microscopia confocale e analizzate con ImageJ per quantificare il segnale PLA negli assoni. Il PLA prevede che anticorpi primari riconoscano e si leghino alle proteine di interesse. Vengono poi aggiunti due anticorpi secondari coniugati a delle sonde, chiamate sonde PLA, che si legano agli anticorpi primari. Queste sonde sono progettate per interagire tra loro quando sono molto vicine (entro circa 40 nm). In tal caso si verifica un'ibridazione delle loro estremità che emettono molti segnali fluorescenti.

Analisi di spettrometria di massa per analizzare le proteine neosintetizzate sono state effettuate su campioni di assoplasma marcato con OPP. I nervi sciatici sono stati inizialmente trattati e incubati secondo il protocollo di marcatura con puromicina. Al nervo sciatico sono stati aggiunti 100 µg/ml di OPP o veicolo ed è stato incubato per 1 ora. L'assoplasma è stato estratto; per il monitoraggio con elettroforesi una parte dell'assoplasma è stata coniugata con TAMRA, un

fluoroforo, mediante click chemistry. Le proteine sono state estratte e analizzate utilizzando tecniche avanzate come la LC-MS/MS.

L'assoplasma marcato con OPP è stato utilizzato anche per un'analisi in immunoblot: le proteine dell'assoplasma estratto marcate con OPP sono state coniugate con biotina mediante click chemistry. Queste proteine sono state poi isolate e analizzate tramite immunoblotting, concentrandosi in particolare su mTOR e Importina  $\beta$ 1.

Con l'obiettivo di esplorare vari aspetti della sintesi proteica e della regolazione dell'mRNA nei DRG sono state condotte numerose analisi su topi wild-type e topi geneticamente modificati con una delezione nella regione 3'UTR dell'mRNA di mTOR. In uno degli esperimenti è stata esaminata la sintesi proteica nei DRG di entrambi i topi. Per bloccare la sintesi proteica e per marcare le proteine sono state utilizzate rispettivamente la cicloesimide e la puromicina. Attraverso l'immunoblotting, si è potuto visualizzare e quantificare le differenze nella sintesi proteica tra i neuroni dei due campioni, concentrandosi in particolare su mTOR e utilizzando la  $\beta$ -III tubulina come controllo. La  $\beta$ -III tubulina è abbondantemente presente nei neuroni e dovrebbe rimanere costante tra i campioni.

Per comprendere meglio la regolazione dell'mRNA di mTOR, sono stati confrontati neuroni DRG prelevati da topi wild-type e da topi modificati. I neuroni sono stati trattati con triptolide, un composto che blocca la trascrizione, per osservare come questo influenzasse la stabilità degli mRNA di mTOR, importina  $\beta$ 1 e c-fos. Utilizzando la PCR in tempo reale, è stato possibile quantificare i livelli di questi mRNA nel tempo, ottenendo informazioni sulla loro stabilità in presenza o assenza della regione 3'UTR di mTOR.

Per visualizzare direttamente l'mRNA di mTOR nei neuroni, è stata adottata la tecnica dell'ibridazione in situ fluorescente (FISH). I ricercatori hanno creato un costrutto genetico che includeva la regione 3'UTR di mTOR legata a EGFP (versione più luminosa di GFP), introducendolo poi nei neuroni DRG. Grazie a sonde fluorescenti specifiche, è stato possibile osservare la localizzazione dell'mRNA di mTOR all'interno dei neuroni e degli assoni. Questo ha permesso di quantificare la presenza dell'mRNA in diverse parti della cellula e di studiare la sua colocalizzazione con la proteina mTOR (Figura 5C).

Nell'articolo è poi descritto un esperimento di quantificazione dei DRG dopo lesione del nervo sciatico. In questo test sono stati coinvolti topi wild-type e topi knockout per la regione 3'UTR di mTOR trattati con torin-1 o con veicolo e con una lesione ai danni del nervo sciatico. Per l'esperimento di rescue i topi sono stati iniettati con 350 ng di mTOR purificata o veicolo appena prima della lesione. Dopo una settimana, i DRG L4 connessi al nervo lesionato e il loro omologo controlaterale sono stati prelevati, fissati, sezionati a 20  $\mu$ m e infine colorati per NFH. I neuroni positivi per NFH sono stati contati manualmente in cieco.

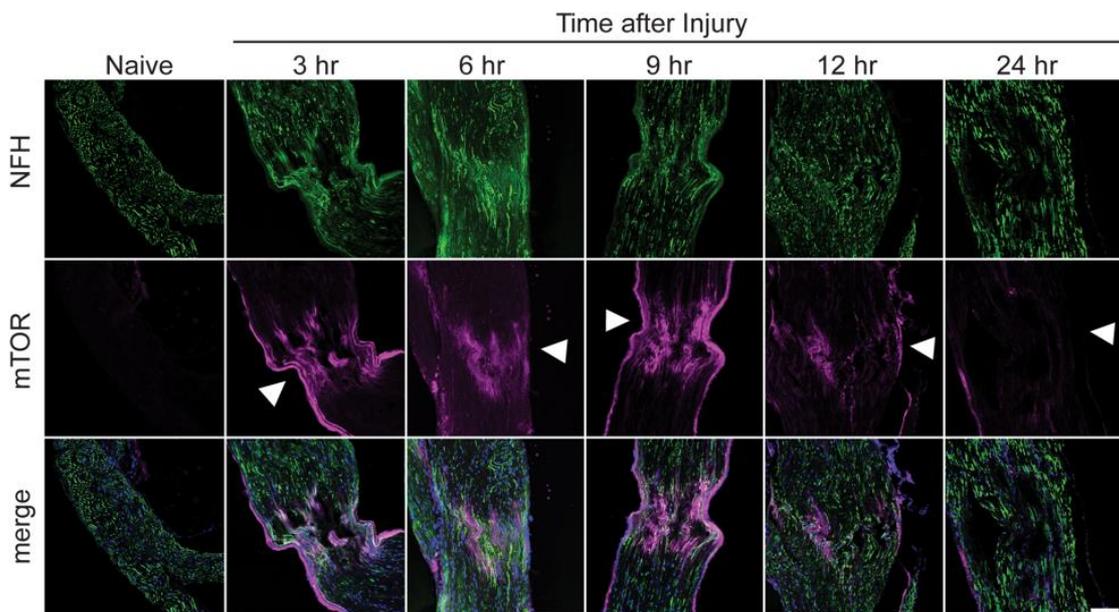
#### *Tecniche di Microscopia per l'Analisi della Localizzazione di mTOR:*

Per l'acquisizione di immagini dei corpi cellulari, dei coni di crescita e delle punte degli assoni, è stato utilizzato un sistema di illuminazione avanzato e con una telecamera con un'estrema sensibilità alla luce. Le immagini sono state catturate a ingrandimento 40x e analizzate con il software NIS-ELEMENTS. L'espressione di mTOR nei coni di crescita degli assoni e nei corpi cellulari è

stata quantificata ed espressa come rapporto tra i livelli nei neuroni wild type e quelli dei neuroni mTOR 3'UTR<sup>-/-</sup>, ovvero con la delezione in 3'UTR. Confrontare i neuroni wild type con quelli modificati geneticamente permette di capire meglio come la 3'UTR contribuisca alla distribuzione intracellulare di mTOR e, di conseguenza, alle funzioni cellulari che dipendono da questa proteina.

#### 4.3 Risultati e discussione

Gli autori hanno osservato che, negli assoni lesionati del nervo sciatico, mTOR e le proteine sotto il suo controllo si attivano rapidamente, in modo più marcato rispetto ai corpi cellulari. Questa attivazione è rilevata da un notevole aumento dei livelli di proteina mTOR, che erano inizialmente bassi negli assoni sani (Figura 3). Attraverso esperimenti di immunoblotting e immunofluorescenza è stato dimostrato che la fosforilazione di mTOR e dei suoi effettori, come p-S6, aumentava significativamente negli assoni lesionati. Questo aumento è stato ulteriormente confermato tramite immunistochemica e immunogold, che hanno evidenziato una crescita significativa dei livelli di mTOR nelle vicinanze del sito di lesione entro 9 ore dal danno.



*Figura 3* Sezioni longitudinali del nervo sciatico prelevate in diversi momenti dopo la lesione e colorate per il marcatore assonale NFH (verde) e per mTOR (magenta). Le frecce bianche indicano il sito della lesione. Scale bar 100  $\mu$ m

Attraverso esperimenti di marcatura delle proteine neosintetizzate, gli autori hanno poi dimostrato che mTOR è sintetizzato localmente negli assoni lesionati. La chiave di questo fenomeno risiede nel trasporto dell'mRNA di mTOR negli assoni, mediato da un complesso proteico che include la nucleolina e Kif5A, ovvero una proteina legante l'RNA e un motore molecolare. Questo meccanismo, dimostrato tramite esperimenti di pull-down di assoplasma

e successiva analisi qPCR, spiega come l'mRNA di mTOR si localizzi negli assoni già prima del danno, pronto per essere tradotto in risposta a lesione. L'importanza funzionale di mTOR nella sintesi proteica locale è stata ulteriormente dimostrata attraverso esperimenti di inibizione farmacologica. L'uso di torin-1 ha rivelato che mTOR controlla la sintesi locale di numerose altre proteine negli assoni lesionati, tra cui molecole per la segnalazione retrograda dell'infortunio come STAT3 e importina  $\beta$ 1. Questi risultati sono stati ottenuti tramite marcatura con puromicina delle proteine neosintetizzate, seguita da analisi tramite immunofluorescenza e spettrometria di massa.

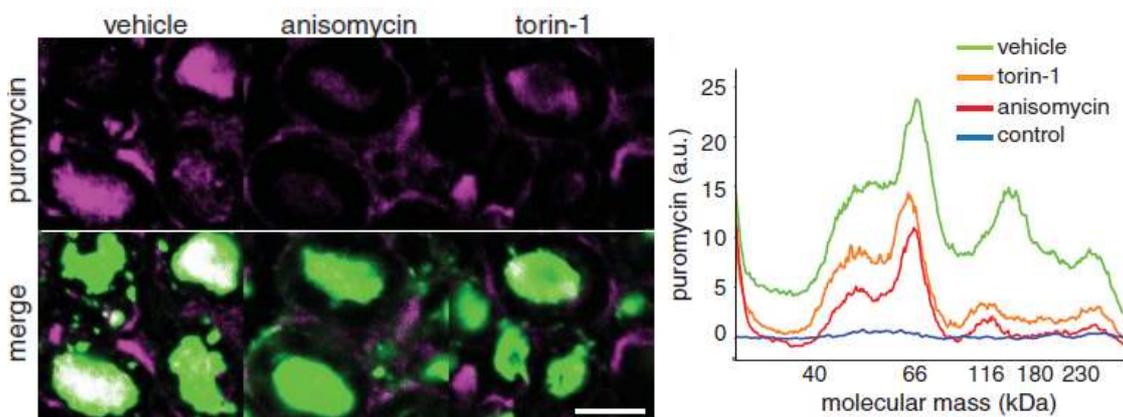


Figura 4 (A) Segmenti di SN trattati per 2 ore ex vivo con anisomicina (200 mg/ml), torin-1 (4 mM) o veicolo, seguiti da 1 ora con puromicina (100 mg/ml), sezionati e colorati per NFH (verde) e puromicina (magenta). Barra di scala: 5 mm." (B) Analisi rappresentative delle proteine puromicinilate nell'assoplasma del SN dall'esperimento descritto in (A), analizzate mediante immunoelettroforesi capillare.

Per confermare ulteriormente l'importanza della localizzazione dell'mRNA di mTOR, i ricercatori hanno generato topi knock-out con una delezione della regione 3'UTR dell'mRNA di mTOR, responsabile della sua localizzazione assonale. Questi topi hanno mostrato una presenza ridotta dell'mRNA di mTOR negli assoni, una sintesi locale di mTOR e altre proteine dopo lesione diminuita, e una ridotta sopravvivenza neuronale in seguito a lesione del nervo sciatico. Inoltre, l'iniezione di proteina mTOR ricombinante nel nervo lesionato dei topi mutanti ha ripristinato sia la sintesi proteica locale che la sopravvivenza neuronale, confermando il ruolo centrale di mTOR in questi processi. Infine, l'importanza di mTOR è stata ulteriormente sottolineata dall'osservazione che l'inibizione locale di mTOR riduce significativamente la sopravvivenza dei neuroni propriocettivi e inibisce la crescita degli assoni nei neuroni DRG. Ciò è stato dimostrato dall'iniezione di torin-1 nel nervo sciatico lesionato, seguita da coltura e quantificazione della crescita neuronale dopo 7 giorni (Figura 5A-B).

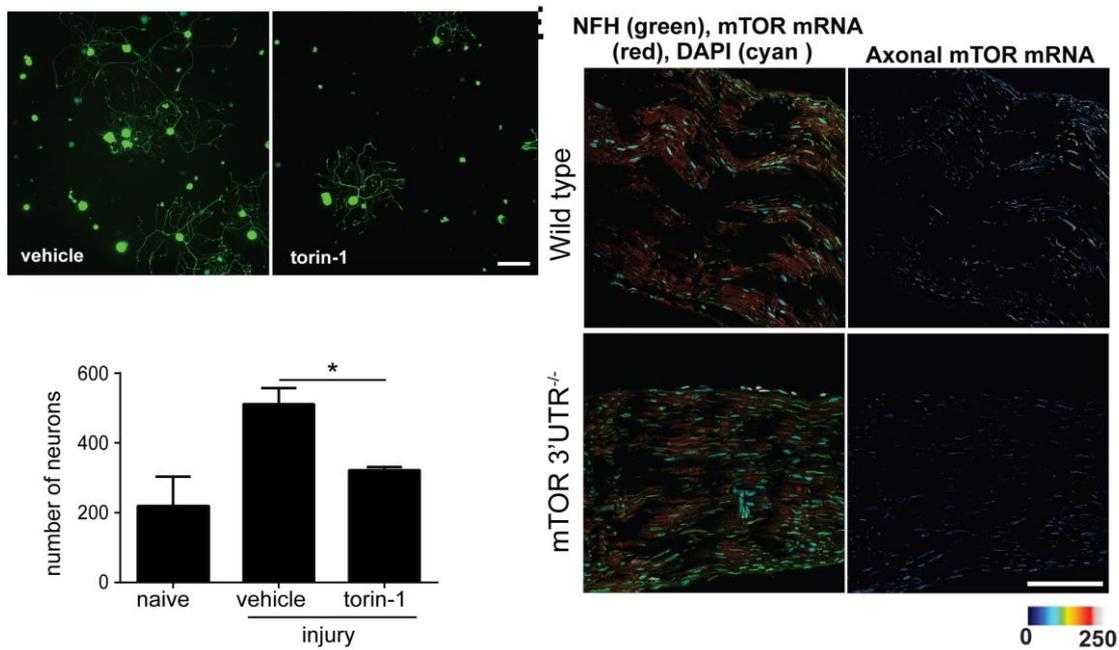


Figura 5 (A) I nervi sciatici di topi che esprimono YFP nei neuroni sensoriali sono stati iniettati con veicolo o Torin-1 prima della lesione. YFP è espresso in verde. scale bar 200  $\mu$ m. (B in basso a sinistra) quantificazione del numero di neuroni dopo una lesione, trattati con il veicolo o con l'inibitore Torin-1. (C) FISH per l'mRNA di mTOR e NFH da sezioni del nervo sciatico di topi wild-type e mTOR 3'UTR<sup>-/-</sup>. Scale bar 100  $\mu$ m.

Questi risultati complessivi forniscono una nuova comprensione del ruolo critico di mTOR nella risposta neuronale alle lesioni, evidenziando come la regolazione spaziale e temporale della sintesi proteica sia fondamentale per la sopravvivenza e la rigenerazione neuronale.

L'ampia gamma di esperimenti consente di confermare e validare i risultati attraverso approcci diversi.

La presenza di mRNA di mTOR negli assoni permette una rapida up-regolazione della sintesi proteica in risposta alla lesione, consentendo un controllo spaziotemporale preciso dell'attività di mTOR. Questa scoperta non solo chiarisce aspetti fondamentali della risposta neuronale al danno, ma apre anche nuove prospettive per la comprensione della regolazione subcellulare delle vie di mTOR in vari processi fisiologici neuronali.

## 5. CONCLUSIONI

Questa tesi ha approfondito i meccanismi molecolari alla base della rigenerazione nervosa periferica, focalizzandosi in particolare sul ruolo della sintesi proteica locale e sulla sua regolazione. Attraverso l'analisi di due articoli scientifici, sono stati evidenziati i progressi compiuti negli ultimi anni nella comprensione delle modalità con cui gli assoni sono in grado di sintetizzare proteine localmente, un processo essenziale per rispondere in modo rapido ed efficace a lesioni nervose.

Nel primo articolo un'analisi proteomica condotta sull'assoplasma del nervo sciatico di ratto ha rivelato un significativo arricchimento di proteine ribosomiali e altre componenti essenziali per la sintesi proteica locale dopo danno assonale. Questa scoperta suggerisce che gli assoni non solo riescono a trasportare proteine dal soma ai terminali sinaptici, ma sono anche capaci di produrle autonomamente in risposta a lesioni. Gli assoni sono in grado di localizzare specifici mRNA lungo la loro lunghezza sfruttando proteine come la nucleolina e Kif5A, il cui ruolo emerge dagli studi del secondo paper analizzato. Questo trasporto assicura che gli mRNA necessari siano disponibili direttamente nel sito della lesione.

L'aumento della capacità di sintesi proteica negli assoni danneggiati risulta un meccanismo fondamentale per facilitare la rigenerazione nervosa.

Il secondo articolo esamina nello specifico il ruolo della proteina mTOR, un regolatore chiave della sintesi proteica durante la rigenerazione assonale. È stato dimostrato che mTOR viene attivato localmente negli assoni in seguito a una lesione e che la sua traduzione locale è essenziale per la rigenerazione. Questo studio ha rivelato che la presenza di mRNA di mTOR negli assoni permette una risposta rapida e specifica alla lesione, facilitando la produzione di proteine essenziali per la riparazione del nervo. Tra queste proteine ci sono Importina  $\beta$ 1, STAT3, proteine del citoscheletro, Vimentina e mTOR stesso. La delezione della regione 3'UTR dell'mRNA di mTOR, responsabile della localizzazione dell'mRNA negli assoni, ha portato ad una riduzione della rigenerazione e della sopravvivenza neuronale, dimostrando l'importanza della regolazione localizzata della sintesi proteica.

Le scoperte descritte in questa tesi possono avere implicazioni terapeutiche importanti per il trattamento delle lesioni del sistema nervoso periferico. Modulare la sintesi proteica locale o intervenire sulle vie di regolazione come quella di mTOR potrebbero portare allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per migliorare la rigenerazione nervosa, contribuendo al recupero funzionale in modo più rapido e completo. In questo senso, nel secondo articolo è descritto un esperimento di "rescue" che ha dimostrato che è possibile ripristinare la sintesi proteica locale e migliorare la sopravvivenza neuronale con un'iniezione di mTOR ricombinante nei topi knockout per la 3'UTR, suggerendo un potenziale approccio terapeutico. Tuttavia, un punto critico di questo approccio potrebbe essere rappresentato da un'eccessiva presenza di mTOR nell'assone. Un'attivazione prolungata o incontrollata di mTOR potrebbe portare a un consumo eccessivo di risorse cellulari dovuto ad una sovrapproduzione di proteine, alterare quindi l'omeostasi proteica e potenzialmente compromettere i processi rigenerativi e avere un effetto contrario a quello desiderato.

Lo studio della sintesi proteica locale e quindi dei meccanismi di rigenerazione nervosa nel SNP può aiutare a sviluppare interventi che migliorino il recupero funzionale anche in altre parti del sistema nervoso.

Queste scoperte potrebbero infatti avere implicazioni nella prevenzione e nel trattamento di malattie neurodegenerative come la SLA, il morbo di Parkinson o l'Alzheimer, dove la rigenerazione del tessuto nervoso è compromessa. Sebbene il ruolo della sintesi proteica locale nel sistema nervoso centrale non sia ancora del tutto chiaro, terapie mirate a favorire la rigenerazione potrebbero consentire interventi tempestivi, prima che i danni diventino irreversibili. Possibili approcci terapeutici potrebbero prevedere la manipolazione genetica di geni codificanti per proteine con funzioni note nella rigenerazione. Sfruttando la tecnologia CRISPR-cas9, ad esempio, si potrebbero up-regolare o effettuare knockout di geni pro-rigenerativi o inibitori con un'alta sensibilità.

Nonostante i progressi significativi della ricerca in questo campo, di cui i due articoli riportati ne sono un esempio, rimane ancora molto da scoprire. L'analisi proteomica del primo paper, seppur realizzata con tecniche avanzate, potrebbe non essere rappresentativa della complessità e la varietà del proteoma assonale presente in condizioni fisiologiche in vivo. Entrambi gli studi sono stati condotti utilizzando dei modelli animali e i risultati potrebbero non essere direttamente applicabili agli esseri umani. La regolazione della sintesi proteica è infatti un processo complesso e dinamico che coinvolge diverse vie di segnalazione, e la comprensione di queste interazioni sarà fondamentale per sviluppare terapie mirate.

La complessità dei processi che portano alla degenerazione nervosa rappresenta un ostacolo per la comprensione dei meccanismi molecolari e delle vie di regolazione coinvolte in questo processo. Tuttavia, questo può rappresentare anche un'opportunità e un vantaggio per lo sviluppo di molteplici alternative terapeutiche con target diversi che si possono adottare per limitare la perdita di funzionalità neurologica e favorire la rigenerazione nervosa. Le terapie possono essere mirate a diverse fasi del processo patologico e lo studio della sintesi proteica locale e del suo ruolo nella rigenerazione nervosa può rappresentare un punto di svolta nella medicina rigenerativa. La sfida cruciale che si prospetta è quella di passare dalla ricerca di base alle applicazioni cliniche concrete. L'obiettivo primario di questo passaggio è di apportare benefici tangibili ai soggetti che soffrono di danni al sistema nervoso migliorando la loro qualità di vita.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1[Translating regeneration: Local protein synthesis in the neuronal injury response Sandip Koley, Meir Rozenbaum, Mike Fainzilber, Marco Terenzio, Department of Biomolecular Sciences, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel, Elsevier 2018]

2[Published: 17 April 2020 Characterising cellular and molecular features of human peripheral nerve degeneration Matthew B. Wilcox, Simão G Laranjeira, Tuula M. Eriksson, Kristjan R. Jessen, Rhona Mirsky, Tom J. Quick & James B. Phillips]

3[The evolving roles of axonally synthesized proteins in Regeneration Dianna E Willis<sup>1</sup> and Jeffery L Twiss, Elsevier 2005]

4[Kim, E. and Jung, H. (2015) "Local protein synthesis in neuronal axons: why and how we study," *BMB Reports*. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology - BMB Reports. doi: 10.5483/bmbrep.2015.48.3.010.]

5[Review Article Published: 11 December 2013 Axon–soma communication in neuronal injury Ida Rishal & Mike Fainzilber]

6[Review Signals Orchestrating Peripheral Nerve Repair Michela Rigoni 1,2, and Samuele Negro 1 1 Department of Biomedical Sciences, University of Padua, 35131 Padua, Italy; Published: 24 July 2020]

7[Review Article Published: 13 April 2012 Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair Hosung Jung, Byung C. Yoon & Christine E. Holt]

8[Rishal, I.; Michaelevski, I.; Rozenbaum, M.; Shinder, V.; Medzihradsky, K. F.; Burlingame, A. L.; Fainzilber, M. Axoplasm Isolation from Peripheral Nerve. *Dev. Neurobiol.* 2010, 70 (2), 126–133.]

9[Hanz, S.; Fainzilber, M. Retrograde Signaling in Injured Nerve Axon Reaction Revisited. *J. Neurochem.* 2006, 99 (1), 13–19]