

**Matricola: 0000282479**

*UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA  
FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN  
LAUREA DI PRIMO LIVELLO IN BIOTECNOLOGIE*

**IDENTIFICAZIONE DI ISTONI ACETILATI  
IN ESTRATTI CEREBRALI DI RATTO  
IN SEGUITO AD ESPERIMENTI  
COMPORTAMENTALI**

**Presentata da:**

Giada Ciandella

**Relatore:  
Chiar.mo Prof.**

Antonio Contestabile

**Sessione I**

**Anno Accademico 2009 - 2010**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>2</b>
1.1 La memoria e l'apprendimento .....	2
Memoria a breve e lungo termine.....	2
Memoria implicita ed esplicita .....	3
1.2 L'apprendimento di tipo associativo: il condizionamento classico.....	4
1.3. Ruolo dell'ippocampo e dell'amigdala nella memoria.....	5
1.4 I meccanismi epigenetici nel sistema nervoso centrale.....	7
1.5 I meccanismi epigenetici nella plasticità sinaptica e nella memoria.....	9
1.6 L'acido valproico.....	13
<b>SCOPO DELLA TESI .....</b>	<b>16</b>
<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>17</b>
3.1 ANIMALI.....	17
3.2 CONTEXTUAL FEAR CONDITIONING.....	17
3.3 ESTRAZIONE SELETTIVA DI PROTEINE NUCLEARI DA TESSUTI CEREBRALI DI RATTO .....	19
3.4. QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE: METODO LOWRY.....	19
3.5 <i>WESTERN BLOT</i> .....	20
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>25</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>31</b>
<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>32</b>

# INTRODUZIONE

## 1.1 La memoria e l'apprendimento

### *Memoria a breve e lungo termine*

La memoria è quella funzione cerebrale volta all'assimilazione, alla ritenzione e al richiamo di informazioni apprese durante l'esperienza. Essa si basa su un meccanismo di codifica, immagazzinamento e recupero delle informazioni apprese. Infatti, esistono tre diversi stadi della memoria: stadio di codifica, in cui si ha la traduzione dell'informazione ambientale in un'entità significativa, che viene immagazzinata; lo stadio di immagazzinamento, dove si ha il mantenimento delle informazioni immagazzinate; lo stadio di recupero, dove si ha un ripescaggio dalla memoria delle informazioni precedentemente codificate e immagazzinate.

La memoria può essere classificata in base alla sua durata, ovvero in base al periodo di tempo in cui rimane efficace. Dal punto di vista temporale esistono tre diversi tipi di memoria:

- 1) memoria immediata o "working memory": è una forma di memoria di durata temporale molto breve, dell'ordine di secondi o minuti, come per esempio quella che ci permette di memorizzare un numero di telefono letto prima di comporlo sulla tastiera.
- 2) Memoria a breve termine: è una forma di memoria in cui si possono ricordare informazioni per breve tempo, da alcune ore ad alcuni giorni. Parte delle informazioni immagazzinate entrano nella memoria a lungo termine, mentre la maggior parte di queste viene dimenticata.
- 3) Memoria a lungo termine: riguarda la capacità di immagazzinare informazioni, conservandole per giorni, settimane o per tutta la vita. Le strutture cerebrali coinvolte sono l'ippocampo e la corteccia che lo circonda.

La teoria prevalente sostiene che la memoria immediata e quella a breve termine si realizzino attraverso modifiche transitorie nella comunicazione neuronale, mentre la memoria a lungo termine, tramite modifiche più stabili nella struttura neuronale (Atkinson- Shiffrin).

### *Memoria implicita ed esplicita*

Da un punto di vista qualitativo esistono due tipi di memoria diverse per immagazzinare le informazioni: una dichiarativa o esplicita, che riguarda la conoscenza dei fatti e degli eventi, ed una procedurale o implicita, che riguarda la conoscenza dei processi percettivi e motori. Lo studio della memoria si è dunque diretto in questa direzione, affrontando due questioni principali: il problema dei sistemi della memoria, cioè dove la memoria si localizza fisicamente nel cervello, ed il problema molecolare della memoria, ovvero come la memoria si localizza nelle diverse aree cerebrali.

Mentre la memoria dichiarativa o esplicita, essa ha sede principalmente nel lobo temporale medio e nell'ippocampo, quella implicita ha molte sottocomponenti che coinvolgono diversi sistemi neurali, per esempio l'apprendimento motorio coinvolge il cervelletto, l'apprendimento della paura l'amigdala, l'apprendimento delle abitudini e il condizionamento operante coinvolgono i gangli basali. Per esempio l'elettrostimolazione dell'amigdala nell'uomo produce sensazioni di paura e apprensione, mentre danni all'amigdala in esperimenti su animali producono docilità e compromettono inoltre l'apprendimento della paura (come verrà discusso più avanti). Per quanto riguarda il cervelletto, fino al 1980 si riteneva che fosse coinvolto solo nel coordinamento dei movimenti volontari (andamento, postura, capacità di fare discorsi ecc.), ma questa idea è cambiata grazie a recenti scoperte che vedono il cervelletto implicato anche nella formazione di risposte motorie, nell'apprendimento motorio, nell'apprendimento delle parole e di risposte tattili e nella percezione degli intervalli di tempo tra stimoli successivi (Thompson et al 1998).

Nella memoria dichiarativa o esplicita, il sistema mediale temporale sembra avere solo un ruolo temporaneo, ciò significa che il lobo temporale mediano dirige un graduale processo di riorganizzazione e stabilizzazione, cambiando l'organizzazione delle rappresentazioni corticali. Dopo un periodo di tempo sufficiente, le formazioni dell'ippocampo non sono necessarie per l'immagazzinamento o il recupero della memoria dichiarativa e la memoria a lungo termine è interamente dipendente dalla neocorteccia (Alvarez and Squire, 1994; 1995).

In entrambi i sistemi della memoria (implicita/ esplicita), la memoria a lungo termine differisce da quella a breve non solo per il fluire del tempo, ma anche per i meccanismi molecolari. La memoria lungo termine, ma non quella a breve, richiede la sintesi di nuove proteine. Alcuni studi in *Drosophila melanogaster*, *Aplysia californica* e nel topo suggeriscono che cAMP, PKA e il fattore di trascrizione di risposta a cAMP, CREB,

sono coinvolti in modo critico nel consolidamento della memoria a breve termine in quella a lungo termine (Yin and Tully, 1996; Kandel, 1999). L'attivazione trascrizionale da parte di CREB, correlata all'apprendimento, sembra essere il passo limitante nella conversione della plasticità sinaptica a breve termine in quella a lungo termine ed è fondamentale nella memoria comportamentale. Risultati derivanti da studi in *Drosophila* mostrano che l'induzione della trascrizione mediata da CREB è necessaria per produrre cambiamenti di lunga durata nella potenza sinaptica, richiesta per l'archiviazione a lungo termine della memoria. I risultati in *Aplysia* suggeriscono che la funzione di switch di CREB, a livello della singola sinapsi, è quella di convertire un incremento di breve durata della forza sinaptica, prodotta da modificazioni covalenti di proteine preesistenti, in uno di lunga durata, prodotto grazie alla sintesi di nuove proteine. Comunque i risultati più importanti derivano dagli esperimenti sui topi: il topo ha una memoria per spazio e oggetti, che corrisponde alla memoria dichiarativa umana, la quale coinvolge l'ippocampo e il lobo temporale mediano. Inoltre l'ippocampo ha una forma di plasticità sinaptica, chiamata LTP che sembra essere il meccanismo candidato per il processo di archiviazione della memoria: abbiamo una fase precoce E-LTP che richiede modificazioni covalenti mediati dalla proteina chinasi II alfa  $Ca^{2+}$  calmodulina dipendente e della tirosina chinasi fyn e una fase tardiva L-LTP che richiede sintesi proteica e la chinasi PKA. Il processo di signaling mediato dalla PKA nel topo, sembra essere fondamentale per il mantenimento sia dell'E-LTP che della memoria, per un periodo di tempo prolungato (Frey et al., 1993; Luscher et al., 2000).

## **1.2 L'apprendimento di tipo associativo: il condizionamento classico.**

L'apprendimento è la modificazione del comportamento che si basa sull'esperienza e che dura nel tempo ed è il processo attraverso il quale il sistema nervoso acquisisce nuove informazioni, dunque, è un processo attivo. Il primo approccio comportamentista di studio dell'apprendimento fu il cosiddetto **apprendimento di tipo associativo** per contingenza temporale o condizionamento classico di Ivan Pavlov che per primo fece esperimenti comportamentali sul suo cane. Questo approccio studia il processo dell'apprendimento mediante l'associazione stimolo-risposta e ne rappresenta la forma più semplice, in cui uno stimolo precedentemente neutrale, in questo caso la luce, si associa con un altro stimolo quale il cibo a seguito di ripetute presentazioni abbinate. Nell'esperimento di Pavlov, dopo alcune presentazioni, il cane comincia a salivare in

risposta alla luce (risposta condizionata RC) e la luce diventa uno stimolo condizionato SC, sebbene essa fosse precedentemente uno stimolo neutro. Può comunque avvenire il fenomeno dell'estinzione, cioè l'apprendimento che lo stimolo condizionato SC non è più predittivo dello stimolo incondizionato; in questo caso, si ha la formazione di una nuova memoria SC-assenza SI che inibisce l'espressione dell'associazione SC-SI. Molto importante è la prevedibilità: affinché si verifichi il condizionamento deve esserci una maggior probabilità che si produca lo SI quando si presenta lo SC piuttosto che in sua assenza: lo SI deve essere prevedibile. Questa relazione è più importante sia della contiguità temporale sia della frequenza con cui vengono abbinati SC e SI (Pavlov, 1904).

A partire dagli esperimenti di Pavlov sono stati elaborati diversi metodi di studio dell'apprendimento attraverso test in laboratorio. Generalmente si associa uno stimolo neutro (incondizionato), come una luce o un suono, a uno stimolo biologicamente rilevante (stimolo condizionato), come una scossa ai piedi o il cibo. Il primo non causerà alcuna risposta nell'animale, mentre il secondo determinerà una risposta apprezzabile, come la salivazione o qualche movimento insolito. Il condizionamento classico è dunque il modo attraverso cui l'animale impara a prevedere le relazioni che intercorrono tra le diverse circostanze presenti nell'ambiente. Gli animali sembrano apprendere perché capaci di scoprire i rapporti di causa-effetto che intercorrono tra gli eventi ambientali. (Kupfermann, 1994; Sanders e al., 2003 ).

### **1.3. Ruolo dell'ippocampo e dell'amigdala nella memoria**

Il contextual fear conditioning o condizionamento contestuale alla paura negli animali è un eccellente modello per lo studio della memoria. Recenti studi hanno dimostrato un ruolo fondamentale dell'ippocampo nel controllo di questa forma di apprendimento. Hirsh (1974) propose che l'ippocampo fosse critico per il recupero della memoria contestuale e che fosse coinvolto nel consolidare le rappresentazioni del contesto. Tramite esperimenti con lesioni nell'ippocampo in animali, è stato dimostrato che l'ippocampo non è la sede dell'immagazzinamento, ma partecipa alla codifica delle informazioni che lo raggiungono dalla corteccia cerebrale. In particolare, è emerso che la memoria della paura contestuale coinvolge interazioni tra ippocampo, amigdala e corteccia prefrontale. L'amigdala è il sito per l'espressione della memoria contestuale alla paura e la corteccia prefrontale potrebbe regolarla tramite segnali inibitori

all'amigdala. Poiché l'ippocampo ha una grande reciprocità di collegamenti con la corteccia prefrontale e l'amigdala, è ancora poco chiaro quali di queste connessioni sia importante, ma non c'è dubbio che l'ippocampo giochi un ruolo centrale nei processi di regolazione della memoria contestuale alla paura. (Hirsh,1980; Ross et al, 1984; Kim and Fanselow, 1992; Philips and LeDoux, 1992).

Esperimenti di John Downer (1950) dimostrarono l'importanza dell'amigdala nel comportamento aggressivo attraverso lo studio su modelli animali, inizialmente con scimmie poi con ratti e topi. A partire da questi studi venne formulata l'ipotesi che l'amigdala potesse essere la sede dove vengono appresi gli stimoli di paura. Joseph LeDoux e i suoi colleghi addestrarono ratti ad associare un suono a uno stimolo moderatamente doloroso. Per misurare la risposta dei ratti misuravano la pressione sanguigna e il tempo di freezing, dove gli animali stavano rannicchiati e immobili. Prima dell'addestramento i ratti non reagivano al suono, dopo l'addestramento, invece la presentazione del suono provocava un aumento della pressione sanguigna e periodi prolungati di freezing. Con questi esperimenti, LeDoux e colleghi individuarono i circuiti nervosi responsabili dell'associazione tra stimolo sonoro e reazione di paura. Dimostrarono in primo luogo che il *nucleo genicolato mediale* è necessario per lo sviluppo della paura condizionata. Inoltre, essi dimostrarono che queste risposte comportamentali potevano ancora manifestarsi se si recidevano le connessioni tra nucleo genicolato mediale e corteccia uditiva, lasciando intatta solo la proiezione diretta tra genicolato mediale e il gruppo laterale e mediale dei nuclei dell'amigdala; in più se si recideva la porzione del genicolato mediale che proietta all'amigdala, le risposte di paura potevano essere abolite. Altri studi permisero di stabilire che le proiezioni centrali dell'amigdala alla formazione reticolare del mesencefalo svolgono un ruolo chiave nella manifestazione del comportamento di freezing. Questi esperimenti dimostrano l'ipotesi iniziale che l'amigdala è la sede dell'apprendimento degli stimoli condizionati, e i suoi rapporti con le strutture limitrofe del cervello mediano i processi sempre correlato a questo tipo di apprendimento. Inoltre l'amigdala partecipa a stabilire le associazioni tra stimoli sensoriali neutri e altri stimoli, che hanno un qualche valore di rinforzo rilevante. La scoperta che nell'amigdala avviene un potenziamento a lungo termine LTP conferma ulteriormente questa ipotesi: infatti la risposta di paura di paura condizionata nei ratti è bloccata dall'iniezione di antagonisti NMDA nell'amigdala (trattamento che impedisce l'induzione dell'LTP), (LeDoux, 1950).

#### **1.4 I meccanismi epigenetici nel sistema nervoso centrale**

Il termine epigenetica è stato coniato da Waddington e descrive il meccanismo che è “sopra” il livello della codifica genica delle sequenze di DNA che controllano la lettura del DNA. Questi processi sono definiti meccanismi epigenetici, ovvero caratteristiche che vengono trasmesse alla progenie ma non dipendono dalla sequenza genomica. Nel sistema nervoso dove prevalentemente si hanno cellule differenziate e non più in divisione, i meccanismi epigenetici giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dell’espressione genica in risposta a segnali ambientali, sostanze d’abuso e all’esperienza. Inoltre questi meccanismi sembrano contribuire a disordini psichiatrici e neurologici. (Waddington, 1957). Recenti scoperte dimostrano che la regolazione esperienza-dipendente dei meccanismi molecolari ed epigenetici partecipano al controllo della trascrizione genica che è alla base della formazione della memoria a lungo termine. Nei mammiferi, i meccanismi epigenetici sono stati collegati al condizionamento associativo paura, all’estinzione della paura appresa ed alla formazione della memoria spaziale ippocampo-dipendente (Levenson et al. 2004; Philips and LeDoux, 1992; Kim et al. 1993).

Ci sono principalmente due meccanismi epigenetici: la regolazione della struttura della cromatina attraverso modificazioni istoniche post-traduzionali e la metilazione del DNA. La metilazione del DNA è una modificazione chimica diretta della catena laterale della citosina alla quale è aggiunto un gruppo metile CH<sub>3</sub> attraverso legami covalenti. Ciò è catalizzato da una classe di enzimi chiamati DNA metiltransferasi (DNMTs) (Okano et al.,1998). Non tutte le citosine possono essere metilate; generalmente la citosina è seguita da una guanina affinché possa essere metilata. Questi dinucleotidi sono ampiamente sottorappresentativi del genoma e si trovano raggruppati in cluster e prendono il nome di isole CpG (Garden and Frommer, 1987). Comunque circa il 70% dei dinucleotidi CpG presenta metilazione.(Cooper and Krawczak, 1989). Nella maggior parte dei casi studiati, la metilazione del DNA è associata alla soppressione della trascrizione genica e frequentemente porta al silenziamento genico. Essenzialmente, la metilazione della citosina nel dinucleotide CpG recluta proteine che legano il DNA metilato (methyl DNA binding proteins), che a loro volta reclutano proteine adattatrici, le quali reclutano le istoni deacetilasi (HDACs) al sito. Le deacetilasi modificano la struttura della cromatina attraverso la rimozione di gruppi acetili dalle proteine istoniche e ciò si traduce nel compattamento della cromatina e soprattutto nella soppressione della trascrizione.

Gli istoni sono proteine basiche la cui funzione principale è quella di organizzare il DNA all'interno di nuclei dove il DNA è impaccato, formando dei complessi insieme agli istoni e ad altre proteine regolatorie. Le interazioni tra gli istoni che formano il core di questa particolare struttura cromatinica e il DNA sono mediate in parte dalla coda N-terminale degli istoni. Possiamo immaginare la cromatina come un core di otto proteine istoniche (istoni H2A, H2B, H3 e H4, con due copie di ogni molecola) con il DNA arrotolato intorno. Studi strutturali indicano che la coda N-terminale degli istoni protrude al di là del DNA ed è disponibile per modificazioni post tradizionali (Luger et al., 1997). Esistono varie modificazioni post-traduzionali per gli istoni, quali l'acetilazione, la metilazione, l'ubiquitinazione e la fosforilazione. Tutte queste modificazioni sono tag epigenetici.(Strahl and Allis, 2000). L'acetilazione degli istoni avviene a livello di residui di lisina, soprattutto a livello della catena laterale del gruppo amminico. L'istone-acetiltransferasi (HATs) catalizza il diretto trasferimento di un gruppo acetile dall'acetil-coA ai gruppi NH<sup>+</sup> dei residui di lisina all'interno di un istone. L'acetilazione degli istoni è un processo reversibile e l'enzima che catalizza la reazione inversa appartiene alle HDACs. Questi enzimi catalizzano la rimozione del gruppo acetile dai residui di lisina attraverso un sistema dipendente dallo Zn<sup>2+</sup>.(Tanner et al., 1999; 2000). Gli inibitori delle HDAC sono molto studiati nell'industria farmaceutica per la loro applicabilità nei trattamenti contro il cancro e nel trattamento di disordini psichici e neurologici. I principali inibitori sono: Tricostatina TSA , il valproato, l'acido butirrico ecc.

Le modificazioni posttraduzionali della coda degli istoni giocano un ruolo critico nella regolazione della trascrizione genica. In genere, l'acetilazione è associata con l'attivazione trascrizionale. Essa risulta nella neutralizzazione della carica positiva del gruppo ε-amminico dei residui di lisina K nelle code istoniche. Questo fa diminuire l'affinità tra la coda della proteina e il DNA e quindi si ha il rilassamento della struttura cromatinica.(Brownell and Allis, 1996). Al contrario, la metilazione ha due impatti sull'attività trascrizionale ed è associata sia a geni trascritti che a geni silenziati. La metilazione degli istoni avviene in diverse forme, infatti si può avere la mono-,di-,tri-metilazione dei residui di lisina. I gruppi metili possono anche essere aggiunti a residui di arginina R nelle forme mono o dimetilata, ma l'impatto sull'organizzazione della cromatina è ancora poco compreso (Klose and Zhang, 2007; Peters and Schubeler, 2005). La fosforilazione degli istoni, analogamente all'acetilazione, è generalmente associata all'attivazione della trascrizione perché si crea una forza repulsiva tra le

cariche negative dei fosfo-istoni e il DNA. Queste forze repulsive fanno sì che la cromatina si decondensi e queste fanno aumentare la sua accessibilità all'apparato di trascrizione. La fosforilazione è la più interessante modificazione in quanto va a svolgere un ruolo di collegamento tra il rimodellamento della cromatina e i percorsi di signaling intracellulare, che coinvolgono proteine chinasi e fosfatasi (Levenson and Sweatt, 2005). L'ubiquitinazione è generalmente associata alla degradazione da parte del proteasoma, ma, quando essa coinvolge le code istoniche, consiste nell'attacco di peptidi di ubiquitina (76 aminoacidi), comportando sia attivazione trascrizionale sia l'allentamento del nucleosoma, e questo meccanismo è un prerequisito per la successiva metilazione istonica (Shilatifard, 2006). Infine la sumoilazione degli istoni agisce a livello di tutti gli istoni del core, regolando negativamente la trascrizione, probabilmente interferendo con l'acetilazione e l'ubiquitinazione degli istoni. Nei mammiferi il suo ruolo non è ancora chiaro (Nathan et al., 2006).

Le modificazioni del DNA e degli istoni sono controllate da specifici enzimi che includono la DNA-metiltransferasi (DNMTs), le istoni acetiltransferasi (HAT) e deacetilasi (HDACs), le istoni metiltransferasi e demetilasi (HMTs e HDMs), proteine chinasi PK, fosfatasi PP e infine enzimi associati a SUMO e all'ubiquitina. Questi enzimi operano sia indipendentemente sia in sinergia stabilendo un "codice istonico". (Jenuwein and Allis, 2001).

### **1.5 I meccanismi epigenetici nella plasticità sinaptica e nella memoria**

I meccanismi epigenetici svolgono un ruolo fondamentale nelle funzioni delle cellule nervose e sul sistema nervoso. Essi contribuiscono ai processi di sviluppo e di differenziamento e influenzano la comunicazione e i segnali nelle interazioni tra neuroni. (Levenson and Sweatt, 2006) ed hanno anche un ruolo centrale nella regolazione della plasticità sinaptica (l'abilità delle cellule neuronali di rafforzare o indebolire le loro connessioni, conseguendo l'attivazione neuronale). Questo meccanismo è correlato all'apprendimento e alla memoria in diverse specie, dall'*Aplysia californica* ai mammiferi (Pittenger and Kandel, 2003).

In *Aplysia* ci sono due forme di plasticità sinaptica a lungo termine a livello delle sinapsi senso-motorie: facilitazione a lungo termine (LTF) e depressione a lungo termine (LDT), che rappresentano rispettivamente un persistente incremento e decremento nella trasmissione sinaptica. Entrambe queste forme sono espresse a livello

delle stesse sinapsi, questo implica che le risposte sinaptiche sono modulate da cambiamenti molecolari reversibili e bidirezionali. In studi condotti su *Aplysia* usando colture cellulari di neuroni senso-motori è stato dimostrato che gli istoni acetilati costituiscono tale cambiamento molecolare. LTF è accompagnato da un incremento del legame dell'attività di HAT della CBP, che determina l'acetilazione della lisina 14 sull'istone 3 H3K14 e della lisina 8 sull'istone 4 H4K8. Al contrario nella LTD si ha un effetto opposto in parte mediato dal reclutamento di HDAC5. Infatti la somministrazione della deacetilasi istonica tricostatina A (TSA) risulta in un cambiamento della facilitazione da breve a lungo termine dopo stimolazione, suggerendo che un cambiamento globale nell'acetilazione può modificare la plasticità sinaptica negli invertebrati (Kandel, 2001; Guan et al. 2002).

Nei mammiferi, le forme di plasticità sinaptica sono il potenziamento a lungo termine (o LTP) e la depressione a lungo termine (o LTD). Queste forme rispecchiano rispettivamente un aumento e un decremento nell'efficienza della trasmissione sinaptica e sono state molto studiate nell'ippocampo, un'area cerebrale richiesta per la memoria e l'apprendimento. I meccanismi di plasticità sinaptica impegnano processi di signalling glutamatergici, dopaminergici e colinergici. Questi differenti meccanismi di neurotrasmissione sono coinvolti nella regolazione post-traduzionale degli istoni, nonché nella metilazione del DNA (Bliss and Collingridge, 1993; Bartolotto and Collingridge, 1993).

Studi recenti dimostrano che la formazione della memoria a lungo termine è un processo complesso che richiede molti meccanismi molecolari e la regolazione dell'espressione di numerosi geni. Nel condizionamento contestuale della paura la fosforilazione dell'istone H3 a livello dell'ippocampo aumenta significativamente dopo che un animale è addestrato. La formazione di una memoria a lungo termine di paura contestuale richiede una trasmissione sinaptica mediata da recettori NMDA e la cascata del segnale di ERK e MAPK nell'ippocampo, e l'inibizione di entrambi questi cruciali processi cellulari, blocca l'aumento della fosforilazione di H3 associato alla formazione di ricordi (Fanselow et al. 1994). La fosforilazione degli istoni costituisce un altro importante processo epigenetico implicato nella memoria spaziale. In particolare, la fosforilazione dell'istone H3 funge da integratore molecolare nel processo di signaling intracellulare e negli eventi a livello del nucleo, ed è stato dimostrato essere critico per la trascrizione genica associata alla memoria (Cheung and Allis, 2000). I processi di signaling a cascata, attivati nelle cellule neuronali, coinvolgono molte proteine chinasi e

fosfatasi, il cui equilibrio tra loro controlla la plasticità sinaptica e la memoria. Recenti studi hanno dimostrato che le proteine chinasi della famiglia delle MAPK contribuiscono alla regolazione della fosforilazione istonica. Per esempio, la proteina chinasi ERK è attivata durante il condizionamento alla paura contestuale ed è associata a un incremento transiente della fosforilazione di H3S10 e dell'acetilazione di H3K14 nell'ippocampo di ratto (Chwang et al. 2006). Questo incremento è bloccato da un inibitore di MEK (MAP kinase/ERK).

In altri studi è stata trovata una forma diversa di memoria a lungo termine associata a variazioni dell'acetilazione dell'istone H4. L'aggiunta di gruppi acetili ai residui di lisina all'interno delle proteine istoniche è compiuta dall'azione delle HATs; se l'acetilazione è funzionalmente importante per il consolidamento della memoria a lungo termine, la distruzione dell'attività delle HATs potrebbe rivelarsi interferire con la formazione della memoria a lungo termine. La proteina che lega CREB, CBP, è un coattivatore trascrizionale, che contiene attività di HAT endogena (Kalkhoven, 2004). Sono stati fatti molti studi sulla formazione della memoria a lungo termine in topi manipolati geneticamente con la funzionalità di CBP compromessa. Questi topi esibivano significanti deficit in varie forme della memoria a lungo termine come il riconoscimento di nuovi oggetti e l'apprendimento della paura condizionata. Questi risultati suggeriscono proprio un ruolo dell'acetilazione degli istoni CBP-mediata nella formazione della memoria e che fattori come CREB reclutano l'attività di HAT di CBP durante l'archiviazione della memoria a lungo termine (Wood et al. 2006).

Molti studi hanno dimostrato l'importanza dell'acetilazione degli istoni nel riconoscimento degli oggetti, nella memoria spaziale e contestuale. Korzus et al. (2003) espressero una forma inducibile, dominante negativa di CBP nel cervello di topo e dimostrarono che la deficienza di HAT ostacolava la formazione della memoria a lungo termine nel riconoscimento di nuovi oggetti; il deficit poteva essere revertito dalla TSA, confermando la sua associazione con l'acetilazione. In altri esperimenti Alarcon et al. Mostrarono che l'insufficienza nei topi di CBP (topi privi di un allele di CBP) avevano deficit nella memoria a lungo termine sia nel riconoscimento di oggetti nuovi sia nel condizionamento alla paura contestuale e che questo poteva essere invertito dall'inibitore delle HDAC SAHA. In entrambi gli studi la trascrizione indipendente della memoria a breve termine non era intaccata, dimostrando che i meccanismi epigenetici sono principalmente adottati per la formazione della memoria dipendente dalla trascrizione.

Il ruolo dell'acetilazione degli istoni nella memoria emozionale è stata esaminata nell'ippocampo usando un test di paura condizionata associata a un suono. Nell'ippocampo, la paura condizionata associata a un cue sembrava essere indipendente dall'acetilazione degli istoni, poiché la somministrazione di inibitori delle deacetilasi istoniche non migliorava questa forma di memoria. Per esempio in topi transgenici con una forma inducibile dominante negativa di CBP, in topi aplo-insufficienti per CBP o in animali wild type, questi inibitori non avevano effetti (Vecsey et al. 2007).

Al contrario nella corteccia, l'acetilazione degli istoni è in associazione con la memoria emozionale. In questa struttura cerebrale, l'estinzione della paura condizionata, è accompagnata da un significativo aumento dell'acetilazione dell'istone 4 e della trascrizione degli esoni I e IV del gene BDNF (Bredy et al. 2007). Questo effetto è specifico per H4, dato che l'acetilazione di H3K9 e H3K14 non è influenzata. Infatti la somministrazione sistemica dell'inibitore delle deacetilasi istoniche, acido valproico aumenta l'acetilazione di H4 ma non di H3. inoltre, l'acido valproico e il butirato di sodio migliorano la memoria emozionale nei topi wild type ma non la tricostatina A TSA (Vecsey et al. 2007). Questi studi dimostrano che gli inibitori delle HDAC differiscono nel loro modo d'azione e nella loro abilità di indurre cambiamenti nell'acetilazione degli istoni.

In altri studi è stato esaminato il contributo di un altro tipo di modificazione istonica, la metilazione, nella formazione della memoria nell'ippocampo adulto. È stato scoperto che la trimetilazione di H3 sulla lisina 4 (H3K4), come pure la metilazione di H3 sulla lisina 9 (H3K9), solitamente associati a silenziamento trascrizionale, aumentano rapidamente nell'ippocampo dopo condizionamento contestuale alla paura. E' stato inoltre trovato che topi mancanti della istone metiltransferasi H3K4-specifica (Mll) mostrano deficit nel condizionamento a paura contestuale. Questi risultati suggeriscono che la metilazione istonica è necessaria per un corretto consolidamento a lungo termine di ricordi di paura contestuale (Berger, 2007; Sims et al. 2003; Margueron et al. 2005; Marthin and Zhang, 2005; Vermeulen et al. 2007). Infine la metilazione del DNA è implicata nella formazione della memoria spaziale e contestuale (Zhao et al. 2003)

In conclusione questi risultati supportano l'ipotesi che uno specifico codice istonico è associato con i diversi tipi di memoria nei diversi distretti delle strutture cerebrali. Inoltre, recentemente è stato ipotizzato che meccanismi epigenetici siano coinvolti nei disturbi cognitivi umani come nella malattia di Alzheimer, di Huntington, nei disturbi psichiatrici come la schizofrenia, la depressione, l'epilessia ecc.

## 1.6 L'acido valproico

L'acido valproico VPA (acido 2- propilpentanoico) è un breve acido grasso a catena ramificata ed era stato inizialmente sintetizzato come un analogo dell'acido valerico estratto da *Valeriana Officinalis* ed è stato utilizzato sottoforma di sodio valproato come farmaco antiepilettico per ridurre le convulsioni e per la terapia di crisi bipolari. Le basi farmacologiche dell'azione antiepilettica dell'acido valproico sono correlate ai suoi molteplici effetti che contribuiscono alla riduzione dell'eccitabilità neuronale. Questi includono l'aumento dell'attività GABA energica, una regolazione negativa dei recettori mediati dall'attività eccitatoria glutamatergica per l'NMDA, e la limitazione della frequenza del potenziale d'azione attraverso la regolazione negativa dell'apertura di canali per il sodio. (McLean and MacDonald, 1986).

L'acido valproico è utilizzato per il trattamento di alcuni disturbi dell'umore, come sindromi depressive bipolari per le quali il farmaco è particolarmente efficace verso i sintomi maniacali, mentre mostra solo effetti marginali anti-depressivi. Trattamenti con VPA si sono dimostrati efficaci verso l'agitazione dovuta alla depressione e verso i comportamenti aggressivi nei pazienti con disturbi della personalità o con ritardo mentale e anche nei pazienti la cui aggressività è dovuta alla demenza. Possiede inoltre altri effetti biochimici cellulari come la diminuzione dell'efficienza del signalling dell'inositolo (in analogia con il litio) che potrebbe spiegare la sua efficacia nei trattamenti delle crisi bipolari.

È stato anche approvato dalla FDA (food and drug administration) l'impiego di VPA nel trattamento dell'emicrania e sono dunque stati prodotti molti farmaci a base di VPA utilizzati per questo scopo.

Recentemente, sono state inoltre dimostrate capacità antitumorali visto che il farmaco è in grado di inibire la crescita di diversi tipi di cellule tumorali e di promuovere la loro differenziazione. L'azione del VPA in questo caso è correlata all'induzione dell'apoptosi indotta o meno dalle caspasi. Un'ulteriore azione antitumorale di VPA è legata alla sua capacità di inibire l'angiogenesi nella zona cancerosa (Henry, 2003).

Visti i numerosi effetti di questo farmaco su varie malattie e disturbi, appare evidente che l'acido valproico vada ad interferire con molti meccanismi di regolazione cellulare.

Tra i meccanismi d'azione del VPA uno dei meglio caratterizzati, per quanto riguarda la regolazione dell'umore, è la regolazione della neurotrasmissione eccitatoria del

glutammato e della neurotrasmissione inibitoria del GABA. Infatti, il farmaco aumenta l'attività inibitoria GABAergica sia aumentando la disponibilità sinaptica di GABA, sia migliorando le risposte post- sinaptiche al GABA. La trasmissione glutammatergica è uno dei maggiori target del VPA, che diminuisce i livelli cerebrali di glutammato e aspartato. Nel loro insieme, però, gli effetti del VPA sui due principali neurotrasmettitori cerebrali giustificano solo parzialmente le sue funzioni neuro protettive e antiepilettiche. Mentre VPA potenzia decisamente l'attività GABA energica, svolgendo così un ruolo protettivo verso una pericolosa eccitazione neuronale eccessiva, il suo ruolo nella trasmissione glutamaenergica è meno chiaro, in quanto può causare una down-regolazione, ma anche una up-regolazione della trasmissione eccitatoria.

L'acido valproico ha anche effetti sui pathway delle chinasi. Infatti va ad attivare le proteine chinasi di sopravvivenza, come la proteina chinasi B (PKB/AKT), le proteine chinasi di attivazione mitogena (MAPKs), la fosfatidilinositolo 3- chinasi (PI3K), la quale inibisce la glicogeno sintetasi chinasi 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (Gurvich and Klein, 2002)

Un altro importante effetto del VPA è la regolazione dell'espressione genica e questo può avvenire mediante due meccanismi:

1. effetti sui fattori di trascrizione. Il fatto che il VPA clinicamente richieda una fase di latenza per l'insorgenza dei suoi effetti e che tali effetti non sono immediatamente invertiti con l'interruzione del trattamento suggerisce che agisce a livello dell'espressione genica, regolando l'attività di fattori trascrizionali chiave. Tra questi c'è il fattore di trascrizione Activator Protein-1 (AP-1), il quale consiste di dimeri formati dai membri delle proteine della famiglia Jun e Fos ed ha molti effetti su funzioni cerebrali, come lo sviluppo, la plasticità e la neuro degenerazione. (Raivich and Behrens, 2006). Un altro fattore di trascrizione regolato dal VPA è NF-kB ed ha anche effetti su CREB, un fattore di trascrizione bZIP che è attivato attraverso fosforilazione ed è coinvolto in una vasta gamma di processi cerebrali incluso lo sviluppo, la plasticità sinaptica e la memoria. (Lonze and Ginty, 2002).
2. Effetti sulle deacetilasi istoniche. Il VPA può regolare l'espressione genica anche attraverso regolazione epigenetica della trascrizione. Esso, infatti, inibisce in modo efficace le HDACs (regolatori negativi della trascrizione) a livelli terapeuticamente rilevanti. Inoltre, altera la struttura cromatinica attraverso la regolazione negativa delle proteine associate alla cromatina, come alcuni membri delle proteine di mantenimento della cromatina SMC, DNA metiltransferasi e proteine eterocromatiniche. La down-regolazione di queste proteine è associata alla de

condensazione della cromatina e correlata con la sensibilità del DNA alle nucleasi. La modulazione delle proteine eterocromatiniche non è diretto, ma agisce a valle sull'acetilazione degli istoni. VPA inibisce le deacetilasi istoniche probabilmente legandosi nel centro catalitico di questi enzimi. VPA inibisce selettivamente l'attività catalitica delle HDACs di classe 1, inducendo la degradazione da proteasoma di HDAC2 (Kramer et al. 2003).

Il fatto che VPA regoli geni coinvolti nella sopravvivenza/morte dei neuroni attraverso la sua attività inibitoria delle HDACs è stata dimostrata sia in vivo che in vitro. Per esempio VPA allevia l'infiammazione cerebrale e la morte cellulare dopo emorragia intracerebrale attraverso diversi meccanismi mediati dall'attivazione della trascrizione, seguita dall'inibizione delle deacetilasi. Un altro esempio sulla regolazione dell'espressione genica svolta da VPA attraverso l'acetilazione degli istoni deriva da analisi svolte su pazienti schizofrenici e bipolari, nei quali i livelli di H3 e H4 acetilati (estratti da proteine nucleari dei linfociti) risultano incrementati dal trattamento con VPA. Questi sono solo pochi esempi dei meccanismi epigenetici di VPA che è appunto in grado di regolare finemente l'espressione genica attraverso l'inibizione delle deacetilasi istoniche.

Sempre grazie a questi meccanismi VPA è coinvolto in molti altri processi come la neurogenesi, la differenziazione dei neuroni e la loro sopravvivenza. È stato inoltre testato ed utilizzato per combattere la neuro degenerazione e in questo caso svolge un ruolo neuro protettivo come per esempio nella malattia di Alzheimer ed è inoltre in fase di sperimentazione clinica per il trattamento di atrofia muscolare spinale (SMA), una malattia dei motoneuroni causata dall'insufficiente espressione delle proteine SMN (survival motor neuron) (Hahnem et al, 2006; Weihl et al., 2006).

Dai molti studi svolti su questo farmaco emerge il fatto che in modelli animali si hanno dei risultati molto promettenti ma gli studi clinici sono meno incoraggianti. Questo è normale quando si passa dalla sperimentazione sugli animali al trattamento su pazienti. Nel caso del VPA, alcuni dei risultati negativi possono essere legati alla necessità di usare alti dosaggi del farmaco e per lunghi periodi di tempo. Inoltre, analisi svolte su ratti epilettici e ratti sani, indicano che un trattamento con acido valproico comporta sia benefici che effetti dannosi sulle funzioni ippocampali, dimostrando che, anche se un trattamento precoce con VPA riduce le crisi epilettiche, la mortalità e protegge il potenziamento a lungo termine ippocampale nei ratti epilettici, provoca anche anomalie morfologiche dei dendriti e disfunzioni della memoria e della plasticità

sinaptica in animali normali. Questi risultati potrebbero spiegare gli effetti negativi della terapia antiepilettica sui soggetti umani. (Calabresi P et al, 2007).

Ad ogni modo quest'unico farmaco da solo svolge moltissimi ruoli nei processi cellulari e molecolari: una singola molecola le cui attività biologiche vanno dalle interazioni con canali e recettori per la regolazione di molte reazioni catalitiche, alla modulazione di processi cellulari che regolano l'espressione genica. È dunque evidente l'interesse clinico e farmaceutico di questo farmaco, ma è altrettanto necessario svolgere ulteriori ricerche per valutare gli effetti collaterali indesiderati del VPA e le eventuali interazioni con altri farmaci.

## **SCOPO DELLA TESI**

Il condizionamento contestuale alla paura è senza dubbio un sistema di apprendimento molto semplice, che può dare molte informazioni su cosa accade, durante l'apprendimento, a livello delle strutture cerebrali. Costituisce quindi un buon modello per studiare le modificazioni delle proteine coinvolte nel consolidamento della memoria e sull'apprendimento associativo. In questo studio abbiamo utilizzato ratti per vedere l'effetto dell'Acido valproico (VPA), un inibitore delle deacetilasi istoniche, sull'apprendimento e la memoria, con particolare riferimento all'acetilazione degli istoni. I ratti sono stati trattati con VPA mediante trattamento cronico nel cibo, per 4 settimane prima del training e durante lo stesso, e mediante due tipi di trattamento acuto, uno con la somministrazione del VPA nel cibo cinque giorni prima e due giorni durante il training, mentre l'altro è stato effettuato con iniezioni intraperitoneali di VPA, due volte al giorno per due giorni prima del training e otto ore dopo il training. Dopo aver testato la ritenzione della memoria a 24h dal training col contextual fear conditiong, sugli estratti preoteici nucleari dell'ippocampo e della corteccia dei ratti, abbiamo analizzato, mediante western blot, le modificazioni istoniche posttraduzionali, che sono coinvolte nell'apprendimento della paura contestuale. In particolare abbiamo testato diverse:

- modificazioni dell' istone H3: fosforilazione e acetilazione;
- modificazioni dell'istone H4: acetilazione

# MATERIALI E METODI

## 3.1 ANIMALI

Abbiamo utilizzato ratti maschi adulti Wistar, forniti dalla ditta Harlan (Italia). Gli animali sono stati trattati con il VPA (Sigma-Aldrich-2% w/w - 10gr/500gr food) cronico nel cibo per 4 settimane prima e 2 giorni durante il training, per il trattamento cronico, e per 5 giorni prima e 2 giorni durante il training, per il trattamento acuto; un secondo trattamento acuto è stato effettuato mediante iniezioni intraperitoneali di VPA (500mg/Kg/day) 2 volte al giorno per 2 giorni prima del training e 8h dopo il training.

## 3.2 CONTEXTUAL FEAR CONDITIONING

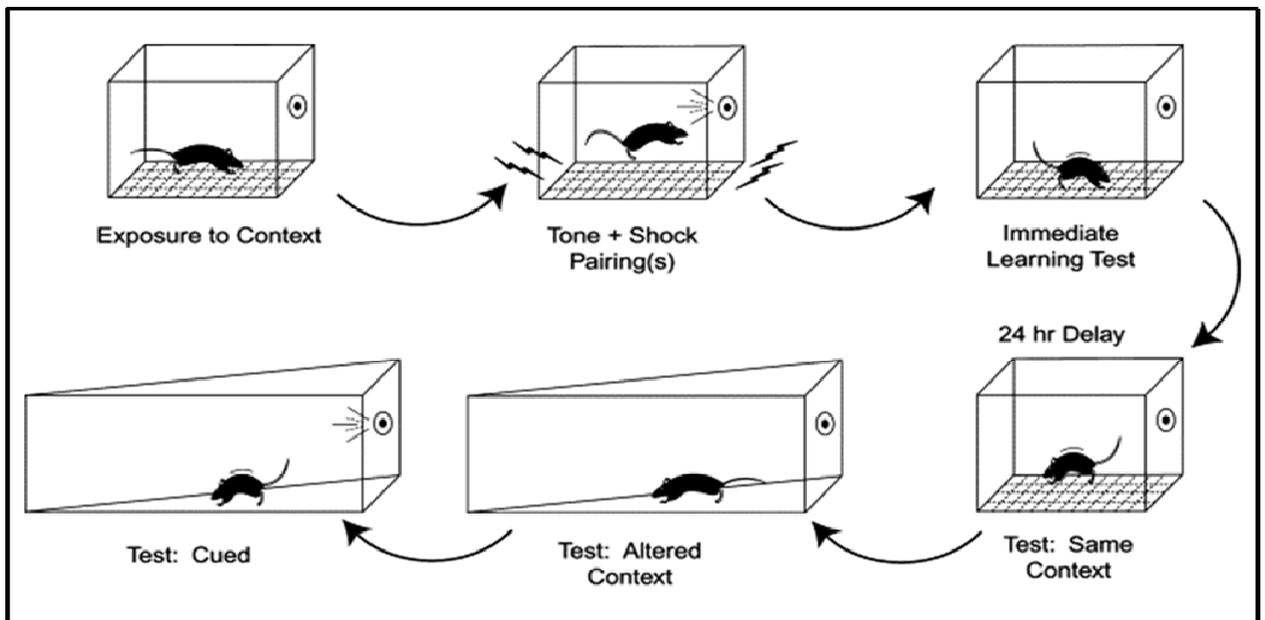
La gabbia per il condizionamento (Ugo Basile, Comerio (VA), Italia) consiste di un'unità controllata da microprocessore di dimensioni 28x21x21cm con 20 barre d'acciaio inossidabile che formano il pavimento, collegate ad un generatore di corrente elettrica. Il soffitto è trasparente per permettere l'osservazione del ratto. Sulla sommità della gabbia si trova un apparecchio in grado di generare uno stimolo acustico/visivo. I parametri dello stimolo visivo e acustico sono 70dB, 670Hz, 2 secondi (stimolo incondizionato), senza intervallo tra gli stimoli visivo/acustico e la scossa. La scossa ai piedi (footshock), di intensità pari a 0.7mA, dura 2 secondi (stimolo condizionato). Gli animali, sia i controlli che quelli trattati con VPA secondo i diversi protocolli, sono stati divisi in tre gruppi:

- Gruppo solo contesto (contest-no shock): animali esposti al contesto+stimolo non condizionato, senza lo shock.
- Gruppo solo shock (shock only): animali esposti allo stimolo condizionato+shock, senza esplorazione del contesto.
- Gruppo learning (contest + shock): animali esposti agli stimoli incondizionato e condizionato dopo esplorazione del contesto.

Inoltre abbiamo un ulteriore gruppo di controllo che non è stato trattato con il VPA. Questi ratti, trattati o non trattati con il VPA saranno sottoposti allo stesso training.

I ratti del gruppo "solo contesto" sono stati messi nella gabbia e lasciati 4 minuti ad esplorare l'ambiente, poi sono stati esposti allo stimolo acustico- luminoso e lasciati altri 4 minuti nella gabbia. Quelli del gruppo "solo shock" sono stati esposti allo shock

subito dopo essere posti nella gabbia senza alcun momento di esplorazione. Gli animali del gruppo “learning” sono stati posti nella gabbia per 4 min poi esposti allo stimolo acustico- luminoso e subito dopo alla scossa e infine lasciati nella gabbia altri 4 minuti. La ritenzione è stata testata dopo 24 h dal training mediante la misura del freezing (freezing score in % = assenza di movimenti esclusa la respirazione, misurata ogni 10 sec per 2 min).



**Figura 2.1.** Schema per il training ed il testing del contextual e il cue learning.

Le condizioni per testare la ritenzione sono:

- condizionamento al solo contesto: è una forma di memoria ippocampo-dipendente, che si valuta esponendo l’animale allo stesso contesto senza presentazione dello stimolo (1 minuto di adattamento + 2 minuti per il freezing);
- condizionamento al solo stimolo in contesto diverso: è una forma di memoria amigdala-dipendente, che si valuta esponendo l’animale ad un diverso contesto (nel nostro caso inseriamo un contenitore cilindrico di metallo nella gabbia di training perché cambia colore e materiale) dopo presentazione dello stimolo luminoso-sonoro (1 minuto di adattamento + stimolo (luce + suono) + 2 minuti per il freezing).

Dopo il test comportamentale, i ratti sono stati sacrificati e sono stati prelevati l'ippocampo e la corteccia per estrarre le proteine nucleari, su cui sono state analizzate le diverse modificazioni post-traduzionali degli istoni mediante analisi in western blot.

### **3.3 ESTRAZIONE SELETTIVA DI PROTEINE NUCLEARI DA TESSUTI CEREBRALI DI RATTO**

L'estrazione delle proteine nucleari è necessaria per lo studio delle modificazione post-traduzionali degli istoni e viene effettuata da tessuti "freschi", per evitare che il congelamento danneggi i nuclei, secondo il metodo descritto da Caruccio e Banerjee (1999). Per separare la frazione nucleare, omogeneizziamo i tessuti nei potter utilizzando un Buffer A (cell lysis buffer) contenente Hepes 20mM, NaCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, EDTA 0.2mM, DTT 10mM, NP-40 0.1%, glicerolo 10%, mix di inibitori di proteasi e fosfatasi (Sigma-Aldrich). Dopo l'omogenizzazione, lasciamo lisare i tessuti in ghiaccio per 15 minuti e li raccogliamo in una eppendorf. Pellettiamo i nuclei centrifugando a 5000 rpm per 5 minuti a 4°C, trasferendo il surnatante contenente la frazione citosolica in un'altra eppendorf. Per gli estratti nucleari, laviamo per 2/3 volte i nuclei con 200µl di buffer B, contenente Hepes 20mM, EDTA 0.2mM, DTT 10mM, glicerolo 20%, mix di inibitori di proteasi e fosfatasi per eliminare l' NP-40 (detergente) e centrifughiamo ogni volta a 5000 rpm per 5 minuti a 4°. Risospendiamo i nuclei pellettati in Buffer C contenente Hepes 20mM, NaCl 400mM, EDTA 0.2mM, DTT 10mM, glicerolo 20% mix di inibitori di proteasi e fosfatasi e li lasciamo a lisarsi in ghiaccio per 45 minuti mescolando periodicamente per inversione per estrarre le proteine nucleari. Infine sonichiamo i campioni, aggiungiamo SDS 1% e li congeliamo a -80°C. Al fine dell'analisi in western blot, si procede a misurare il contenuto di proteine totali secondo il metodo di Lowry.

### **3.4. QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE: METODO LOWRY**

Questa tecnica ci permette di stabilire quante proteine sono presenti nei nostri campioni per il successivo caricamento su gel in modo da avere campioni omogenei. Questo è reso possibile grazie alla curva di taratura effettuata mediante una proteina standard, nel nostro caso la BSA, albumina di siero bovino, in quantità note; infatti, una volta determinati i valori di assorbanza dei nostri campioni, possiamo trovare la loro concentrazione incognita attraverso l'interpolazione del loro valore di assorbanza

sull'equazione della retta. Ogni misura viene eseguita in doppio e si usa il bianco per eliminare il colore aspecifico di base. Eseguiamo dunque la curva di taratura con la BSA (la stock solution di BSA è di 1,5 mg/ml – Sigma-Aldrich). Nel nostro caso utilizziamo questi volumi di BSA (3,75 µg; 7,50 µg; 11,25 µg; 15,00 µg; 22,50 µg; 30,00 µg; 45,00 µg; 60,00 µg) per la curva di taratura e li portiamo ad egual volumi (200µl finali) con H<sub>2</sub>O bd. Facciamo lo stesso per i campioni, mettendo con la micro pipetta 5 o 10µl di ogni campione (a seconda della presunta concentrazione).

Poi, prepariamo in quantità proporzionale al numero di campioni la soluzione I, considerando che ne va aggiunta 1 ml per ogni campione, così composta:

A [NaCO <sub>3</sub> in NaOH 0,1 N]	98%
B [CuSO <sub>4</sub> 0,5%]	1%
C [K(Na) tartrato 1%]	1%

Aggiungiamo dunque 1 ml della soluzione I in ogni provetta e attendiamo 10 minuti.

Prepariamo poi in quantità proporzionale al numero di campioni la soluzione II considerando che ne va aggiunta 100µl per ogni campione, così composta:

50% reattivo di FOLIN
50% di H <sub>2</sub> O bidistillata

Dunque aggiungiamo 100µl della soluzione II e vortexiamo immediatamente

Attendiamo 30 minuti prima di leggere allo spettrofotometro (Beckman) alla lunghezza d'onda di 700nm. In questo modo, si trovano le concentrazioni dei campioni incogniti mediante interpolazione del loro valore di assorbanza sull'equazione della retta.

### **3.5 WESTERN BLOT**

Questa tecnica permette l'identificazione di una proteina d'interesse in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di specifici anticorpi e sfrutta prima una elettroforesi denaturante (SDS-PAGE) per far separare le varie proteine in funzione della massa, annullando le cariche degli amminoacidi che influenzerebbero la migrazione. Questa è una tecnica dove si ha una separazione in funzione del peso molecolare della proteina, sfruttando la migrazione di questa all'interno di un gel di poliacrilammide sottoposto ad un campo elettrico. In questo caso, abbiamo valutato alcune modificazioni post-traduzionali a carico degli istoni H3 e H4, quali:

- Istone H3 fosforilato sulla serina 10 [(P-ser10)H3]

- Istone H3 acetilato sulle lisine 9/14 [(Ac-lys9/14)H3], 18 [(Ac-lys18)H3] e 23 [(Ac-lys23)H3].
- L'istone H4 acetilato sulla lisina 5 [(Ac-lys5)H4] o 12 [(Ac-lys12)H4].

Abbiamo poi valutato l'espressione degli istoni H3 e H4 totali, cioè indipendentemente dalle loro modificazioni post-traduzionali, negli stessi campioni per la normalizzazione. A tale scopo, sono stati utilizzati campioni contenenti la porzione nucleare dei tessuti estratti dai ratti secondo il procedimento precedentemente descritto. Quindi, prima di procedere con l'elettroforesi su gel per proteine e il blotting, è stato quantificato nei campioni il contenuto di proteine totali, secondo il metodo Lowry, in modo da caricare la stessa quantità di proteine per ogni campione. Per ogni campione carichiamo 30µg di proteine totali in 20µl, dopo averli diluiti con il loading buffer 1X, partendo da LB 4X composto da Tris HCl ph 7.0 200mM, SDS 8%, Glicerolo 40%, Blu di Bromofenolo 0.4%, con l'aggiunta al momento di DTT 1:5 (100µl di DTT 1M + 400µl di loading Buffer), sonicati e bolliti per 10 minuti, per denaturare completamente le proteine.

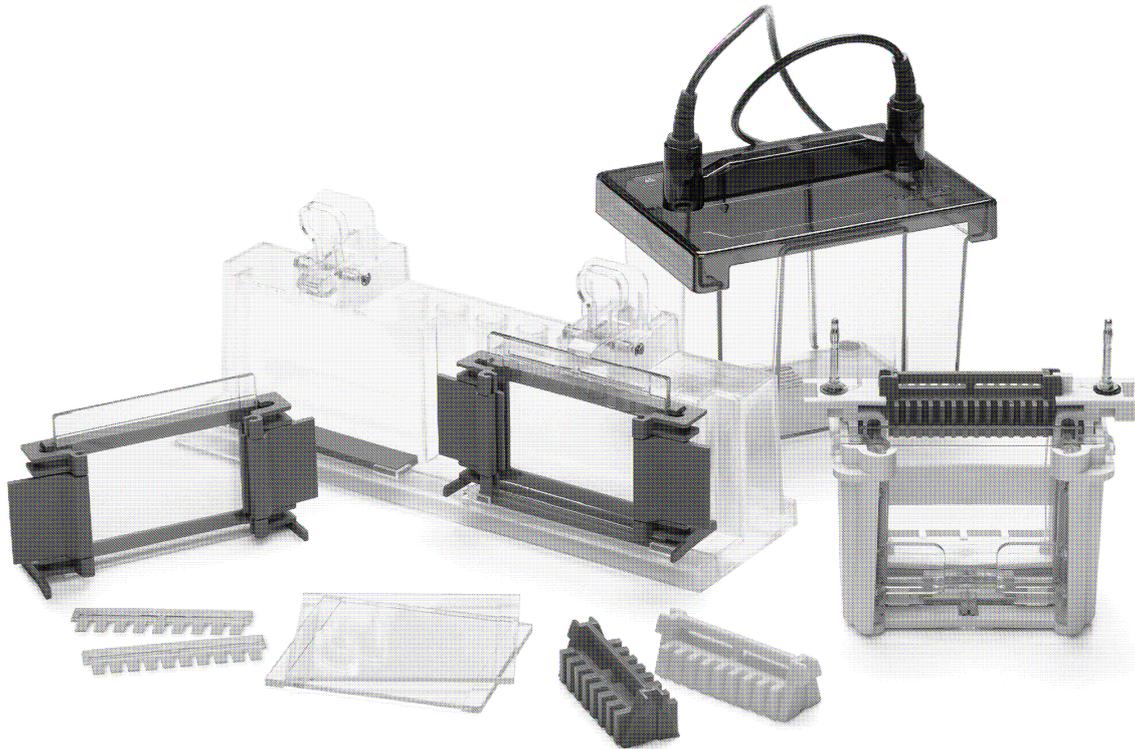
A questo punto possiamo procedere con l'elettroforesi su gel per proteine.

In particolar modo abbiamo utilizzato un gel di tipo discontinuo, formato cioè da due porzioni:

- STACKING GEL: che permette di concentrare le proteina in una stretta banda;
- SEPARATING o RUNNING GEL: che permette la separazione delle diverse specie proteiche, in singole bande.

Una volta separate, le proteine vengono fatte migrare su una specifica membrana di nitrocellulosa, mediante la tecnica del blotting, e la proteina di interesse viene poi visualizzata attraverso anticorpi specifici: l'anticorpo primario, riferito e diretto alla proteina di interesse, mentre quello secondario si lega a quello primario ed è a sua volta legato ad un enzima, quale la perossidasi di rafano, che permette di sviluppare una reazione colorimetrica che può impressionare una lastra fotografica, permettendo l'identificazione e la quantificazione della banda di interesse.

Abbiamo utilizzato GEL DI SEPARAZIONE con acrilamide (Bio-Rad) al 10%, mentre per lo STACKING GEL al 4%. Dopo aver denaturato i campioni preparati come precedentemente descritto a 100° C per 10 minuti, assembliamo la cella elettroforetica e riempiamo gli appositi spazi con il RUNNING BUFFER contenente Tris base 25 mM, Glicina 192 mM ed SDS 0,1 % (Sigma-Aldrich). Carichiamo dunque i campioni sul gel negli appositi spazi creati dal pettine, compreso i marker (Bio-Rad) per il peso molecolare.

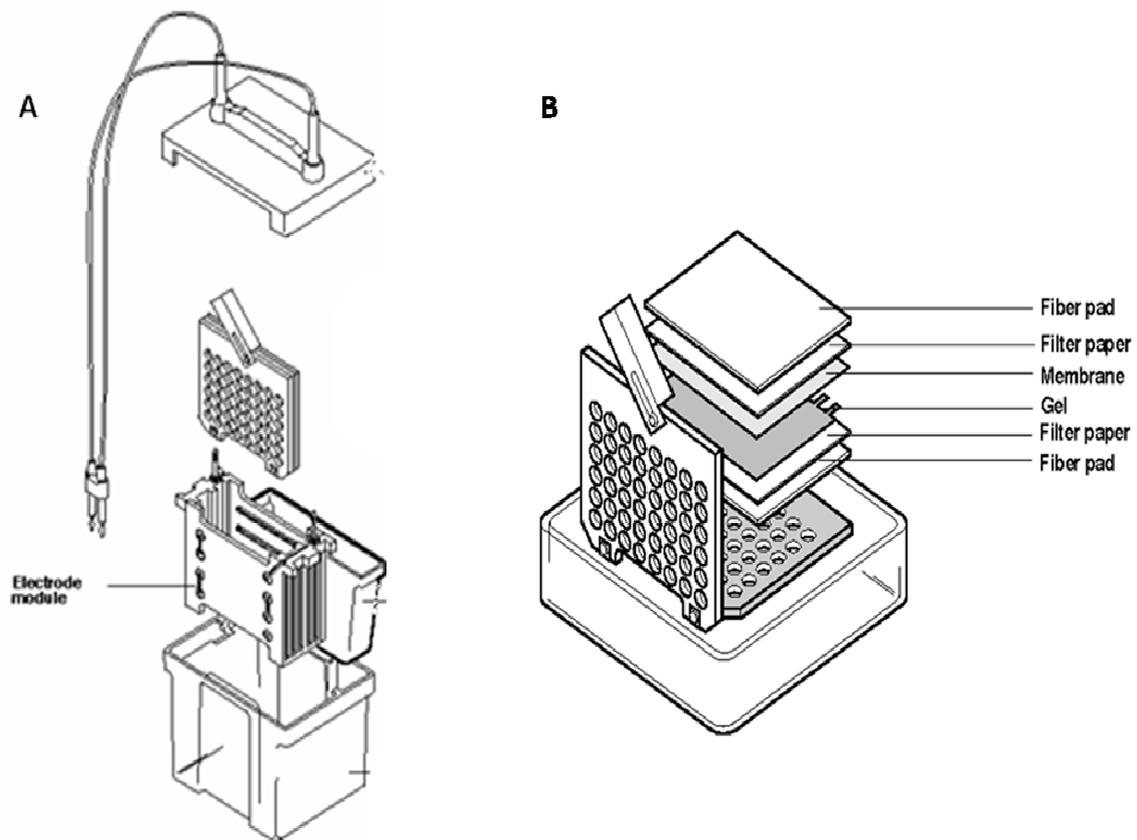


**Figura 2.2.** Mini-PROTEAN 3 system components (Bio-Rad).

Chiudiamo la cella (Bio-Rad) e colleghiamo gli elettrodi e applichiamo 120V costanti (120 mA) per 45-60 minuti tramite l'alimentatore (Bio-Rad). Dopo la corsa spegniamo, disconnettiamo gli elettrodi e smontiamo la celletta. Rimuoviamo dunque il gel dal supporto e procediamo con il blotting.

Per il BLOTTING, equilibriamo la nitrocellulosa (GE Healthcare) per 20 minuti nel tampone di trasferimento così composto: Tris base 50 mM, glicina 200 mM, Metanolo al 20% (Sigma-Aldrich).

Poi laviamo il gel da trasferire nello stesso tampone, saturiamo la carta da filtro pretagliata e le spugnette col tampone di trasferimento. Installiamo il Mini Trans-blot (BIO-RAD) nella tanichetta riempita con il tampone e manteniamo in agitazione con un magnetino e aggiungiamo il ghiaccio per non far riscaldare la soluzione. Apriamo il supporto tenendo presente che il lato chiaro è l'anodo, quello scuro il catodo.



**Figura 2.3.** A: Mini-Trans Blot cell (Bio-Rad); B: sistema di trasferimento.

Sistemiamo la spugnetta imbevuta di tampone di trasferimento sul lato chiaro del supporto e poi la carta da filtro, la nitrocellulosa e il gel; completiamo il “panino” con carta da filtro e spugnetta, chiudiamo il tutto e lo inseriamo nell’apposita cella. Effettuiamo il trasferimento per 1 ora e 30 minuti o 2 ore a 100 V costanti (400 mA max).

Dopo il blotting, smontiamo il panino e mettiamo le membrane di nitrocellulosa in tubi falcon. Saturiamo con PBS-Tween 0.1% (Sigma) +latte 5% (BioRad) con un lavaggio da 1 ora a temperatura ambiente in agitazione, per il bloccaggio dei siti aspecifici sulla membrana di nitrocellulosa. Nel frattempo diluiamo l’anticorpo primario in PBS-Tween 0.1%. Facciamo un altro lavaggio con PBS-Tween 0.1% per 5 minuti, mettiamo la soluzione contenente l’anticorpo primario e incubiamo agitando in camera fredda per tutta la notte.

Il giorno dopo, facciamo 3 lavaggi con PBS-Tween 0.1% di 15 minuti ciascuno, diluendo nel frattempo l’anticorpo secondario in PBS-Tween 0.1% ed incubiamo con

l'anticorpo secondario per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente in agitazione. Dopo laviamo il filtro con 3 lavaggi con PBS-Tween 0.1% per 15 minuti ciascuno e un ultimo breve lavaggio con PBS. Trasferiamo tutto in PBS. Dopodiché possiamo andare in camera oscura per procedere con la rivelazione.

Gli anticorpi primari usati sono:

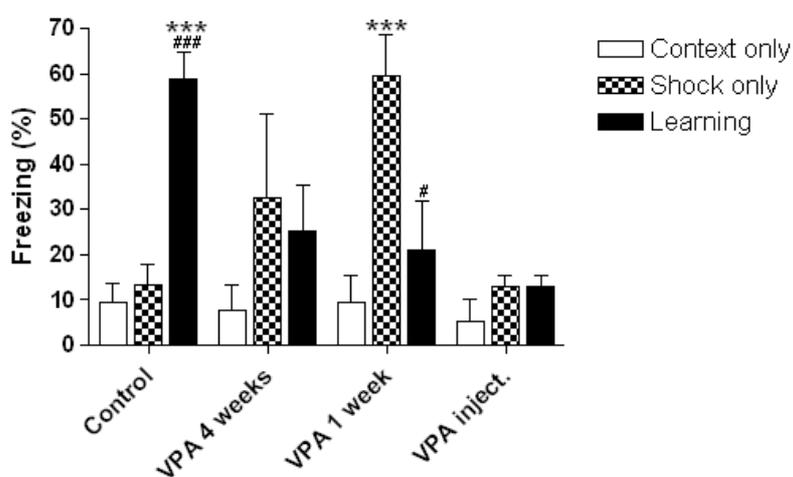
- Istone H3 fosforilato sulla serina 10 [(P-ser10)H3] (Santa Cruz Biotechnology);
- Istone H3 acetilato sulle lisine 9/14 [(Ac-lys9/14)H3] (Santa Cruz Biotechnology);
- Istone H3 acetilato sulle lisine 18 [(Ac-lys18)H3] (Cell Signaling Technology);
- Istone H3 acetilato sulle lisine 23 [(Ac-lys23)H3] (Cell Signaling Technology);
- Istone H4 acetilato sulla lisina 5 [(Ac-lys5)H4] (Santa Cruz Biotechnology);
- Istone H4 acetilato sulla lisina 12 [(Ac-lys12)H4] (Cell Signaling Technology);
- Istone H3 totale (Santa Cruz Biotechnology);
- Istone H4 totale (Cell Signaling Technology).

Per rilevare le proteine studiate è necessario legare all'anticorpo primario un anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano (HPR). Gli anticorpi secondari utilizzati in questo studio sono: anti rabbit-HPR e anti mouse-HPR (Santa Cruz). L'anticorpo II coniugato con la perossidasi di rafano, una volta aggiunto il substrato luminolo, viene rivelato mediante un segnale chemio luminescente con l'ECL (Santa Cruz Biotechnology). La mix dell'ECL viene preparata a momento (50% di soluzione A, 50% di soluzione B le quali contengono una la perossidasi e l'altra il luminolo) e viene fatta avvenire la reazione per un minuto. La reazione avvenuta viene visualizzata impressionando una lastra autoradiografica (GE Healthcare), che viene poi sviluppata passandola prima nel liquido di SVILUPPO, poi in quello di FISSAGGIO (Sigma-Aldrich). Le bande comparse nelle lastre vengono poi quantificate mediante il software NIH Image.

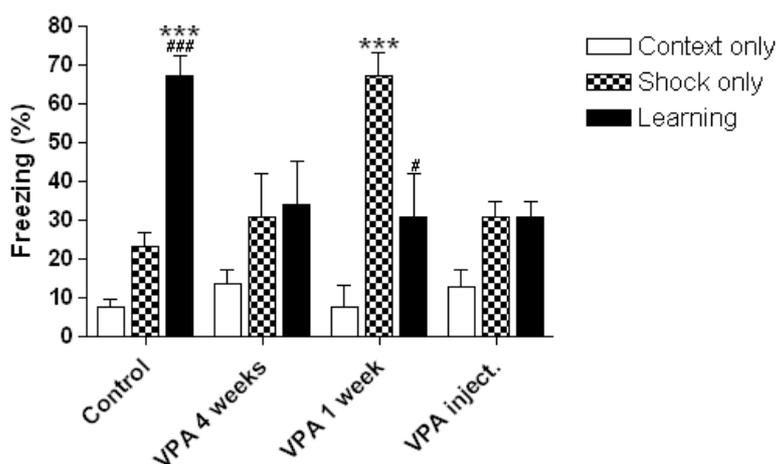
## RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi dei dati sul comportamento evidenzia che i ratti del gruppo "learning" di controllo 24h dopo il training esibiscono un livello più alto di freezing, indice dell'apprendimento, rispetto ai controlli "solo contesto" e "solo shock", sia rispetto al contesto che dopo riesposizione al cue (Fig. 3.1).

A



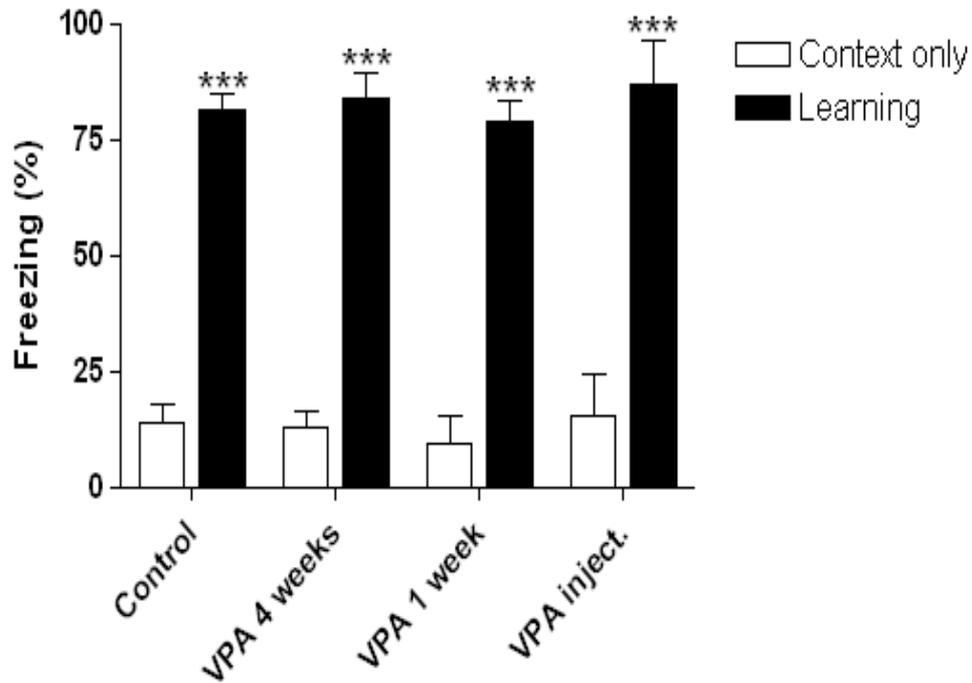
B



**Fig.3.1.** Percentuale di freezing 24 ore dopo l'esposizione al test del contextual learning (A) e del cue learning (B) nei gruppi "solo contesto" (context only), "solo shock" (shock only) e "contesto+shock" (learning), di ratti non trattati (controllo) e ratti trattati con VPA. Ogni barra rappresenta la media  $\pm$  SEM di 3-12 animali. \*\*\*  $p < 0.001$  rispetto al controllo 1 di ogni gruppo e ###  $p < 0.001$  e #  $p < 0.05$  rispetto al controllo 2 di ciascun gruppo, dopo analisi statistica dei dati con test t di Student.

Il trattamento con VPA mostra effetti quantomeno inaspettati nel comportamento degli animali. In generale, tutti i metodi di somministrazione non sembrano migliorare l'apprendimento sia del contesto che del cue. In particolare, è riscontrabile una diminuzione del freezing nel gruppo "learning" nei ratti esposti a questi trattamenti, se confrontati con i ratti non trattati. Questa osservazione può sembrare sorprendente considerando che per molto tempo è stato considerato un farmaco "memory-enhancer", in quanto si era visto che stimolava la memoria in ratti vecchi (Murphy et al., 2001) ed in modelli murini di Alzheimer (Quing et al., 2009). Però, più recentemente si è osservato che il VPA riduce la memoria spaziale (Umka et al., 2010) e varie forme di memoria ippocampo-dipendente (Sgobio et al., 2010). Una spiegazione a tali risultati potrebbe essere ricercata nell'effetto inibitorio dell'acido valproico sulla GSK-3 $\beta$ , importante nel consolidamento della memoria (Kimura et al., 2008). Particolarmente interessante è la risposta condizionata sia verso il contesto sia verso il cue dei ratti trattati con VPA nel cibo per una settimana ed esposti al "solo shock". Essi infatti mostrano una percentuale di freezing comparabile a quella dei ratti di controllo dopo learning, mentre gli animali trattati con il VPA (sia con trattamento cronico che con trattamento acuto) mostrano evidenti deficit nella memoria sia del contesto che del cue rispetto agli animali di controllo (figura 3.1).

Considerando il fatto che il VPA è un anti-epilettico e stabilizzante dell'umore che agisce anche sul sistema GABAergico, come descritto nell'Introduzione, si può pensare che questo effetto sul comportamento, cioè l'impairment cognitivo che determina a seguito di tutti i tipi di trattamenti qui saggiati, sia da imputare ad una minor sensibilità degli animali trattati con VPA agli stimoli, incluso lo shock elettrico che viene utilizzato nel fear conditioning. Se ciò fosse vero, anche il freezing immediatamente dopo il training, indice dell'avvenuto apprendimento, dovrebbe essere ridotto, cosa che invece non accade, come si può vedere dalla figura 3.2. Questo indica che l'effetto del VPA è a livello non dell'apprendimento, ma della memoria.



**Fig.3.2.** Percentuale di freezing immediatamente dopo l’esposizione al training nei gruppi “solo contesto” (context only) e “contesto+shock” (learning), di ratti non trattati (controllo) e ratti trattati con VPA. Manca il gruppo “shock only” in quanto questi animali vengono tolti dall’apparato immediatamente dopo il training. Ogni barra rappresenta la media  $\pm$  SEM di 3-9 animali. \*\*\*  $p < 0.001$  rispetto al controllo 1 di ogni gruppo, dopo analisi statistica dei dati con test t di Student.

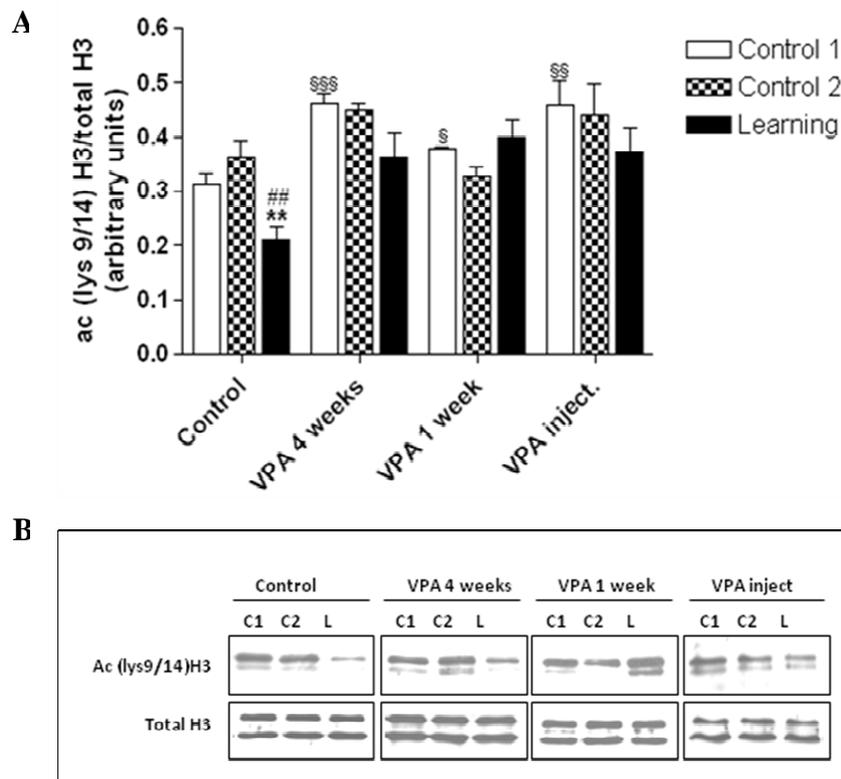
A questo punto, per chiarire il meccanismo di azione del VPA, considerando che questa molecola agisce a livello di pathway chinasici intracellulari (Monti et al., 2009) e che recentemente si è rivelato essere un inibitore delle istone-deacetilasi, enzimi chiave dell’acetilazione degli istoni (Gottlinger et al., 2001), e sapendo che le modificazione post-traduzionali degli istoni, quali l’acetilazione e la fosforilazione, sono coinvolti nella memoria (Levenson et al., 2004; 2006; Chwang et al. 2006; 2007; Bredy et al., 2007; Lusin and Sweatt, 2007; Miller et al., 2008; Peleg et al., 2010). Pertanto abbiamo effettuato analisi in western blot per vedere le modificazioni, come acetilazione e fosforilazione, degli istoni H3 e H4 in estratti nucleari dall’ippocampo di ratto trattati con VPA e i ratti di controllo 24h dopo il training nelle diverse condizioni sperimentali, come indicato precedentemente nei materiali e metodi. Come precedentemente descritto nei metodi, abbiamo valutato le seguenti modificazioni post-traduzionali a carico degli istoni H3 e H4, quali:

- Istone H3 fosforilato sulla serina 10 [(P-ser10)H3]

- Istone H3 acetilato sulle lisine 9/14 [(Ac-lys9/14)H3], 18 [(Ac-lys18)H3] e 23 [(Ac-lys23)H3].
- L'istone H4 acetilato sulla lisina 5 [(Ac-lys5)H4] o 12 [(Ac-lys12)H4].

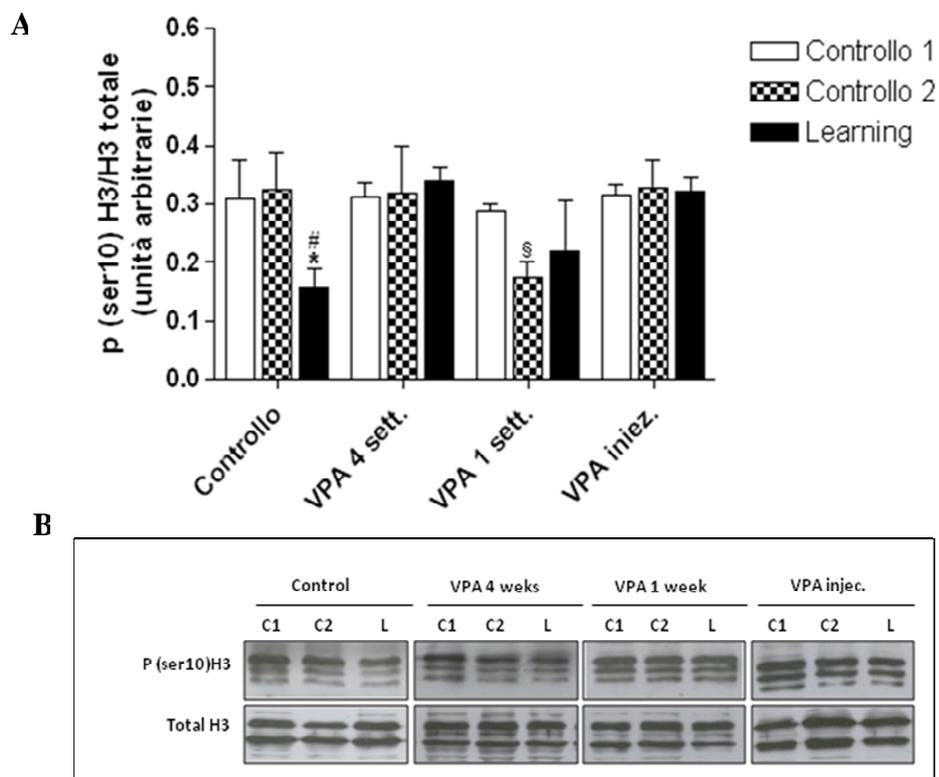
Sono state scelte queste modificazioni quanto alcune sono note per essere associate a variazioni dell'attività trascrizionale, mentre altre sono coinvolte nella memoria ed apprendimento (Levenson et al., 2004; 2006; Chwang et al. 2006; 2007; Bredy et al., 2007; Lusin and Sweatt, 2007; Miller et al., 2008; Peleg et al., 2010).

Per quanto riguarda l'istone H3, solo la fosforilazione sulla serina 10 e l'acetilazione sulle lisine 9/14 variano, mentre l'acetilazione sulle lisine 18 e 23 dello stesso, nonché le acetilazioni sulle lisine 5 e 12 dell'istone H4, non cambiano né in risposta al training, né al trattamento con VPA, per lo meno nelle nostre condizioni sperimentali.



**Figura 3.3.** Densitometrie (A) e Western Blot (B) dell'acetilazione sui residui lys9/14 dell'istone H3 e dell'istone H3 totale nell'ippocampo di ratti di controllo e ratti trattati con VPA per 4 settimane e per 1 settimana nel cibo e tramite iniezioni. Ogni barra rappresenta la media  $\pm$  SEM di 3-12 animali. \*\*  $p < 0.01$  rispetto al "context only" e ##  $p < 0.01$  rispetto allo "shock only" di ciascun gruppo di animali, mentre §  $p < 0.05$ , §§  $p < 0.01$  e §§§  $p < 0.001$  rispetto al "context only" del gruppo di animali di controllo, dopo analisi statistica dei dati con test t di Student.

Nella figura 3.3 è possibile valutare le densitometrie che esprimono i rapporti tra l'acetilazione sulle lisine 9/14 dell'istone H3 e l'istone H3 totale. Si può notare un inaspettato calo nell'acetilazione su tali residui nei ratti di controllo, dopo condizionamento, rispetto al “solo contesto” e al “solo shock”. L'acetilazione basale dei ratti VPA, che hanno subito o il trattamento lungo o il trattamento breve nel cibo, aumenta significativamente rispetto ai controlli, probabilmente per l'effetto inibitorio del farmaco sull'attività delle HDACs. Per quanto riguarda gli animali trattati, in quelli sottoposti al “learning” si osserva una diminuzione rispetto ai controlli, ma non della significativa come nei non-trattati, cosa che correla con la memoria.



**Figura 3.4.** Densitometrie (A) e Western Blot (B) della fosforilazione sulla ser10 dell'istone H3 e dell'istone H3 totale nell'ippocampo di ratti di controllo e ratti trattati con VPA per 4 settimane e per 1 settimana nel cibo e tramite iniezioni. Ogni barra rappresenta la media  $\pm$  SEM di 3-12 animali. \*\* $p < 0.05$  rispetto al “context only” e #  $p < 0.05$  rispetto allo “shock only” del gruppo di animali di controllo, mentre §  $p < 0.05$  rispetto al “context only” di ciascun gruppo di animali dopo analisi statistica dei dati con test t di Student

Per quanto riguarda la fosforilazione dell'istone H3 sulla serina 10, non abbiamo rilevato nessuna variazione basale a seguito dei diversi tipi di trattamento con il VPA, contrariamente a quanto osservato per l'acetilazione, mentre abbiamo misurato una diminuzione statisticamente significativa nel gruppo "learning" rispetto ai controlli "solo contesto" e "solo shock" dei non trattati, ma non nel gruppo "learning" dopo trattamento con VPA. E' interessante notare come, nel gruppo "solo shock" degli animali trattati con VPA nel cibo per una settimana, gruppo in cui si verifica un aumento significativo del freezing rispetto al proprio controllo "solo contesto" ed al gruppo "solo shock" non trattato (Fig. 3.1), si ha una diminuzione statisticamente significativa della fosforilazione presa in esame, che correla con l'apprendimento.

## BIBLIOGRAFIA

1. Atkinson & Hilgard **Introduzione alla Psicologia**. (2006).
2. Robert F. Weaver: **Biologia molecolare**. (2005).
3. D. Purves, G.J. Augustine, D. Fitzpatrick, W.C. Hall, A.-S. LaMantia, J.O. McNamara, L.E. White: **Neuroscienze** (2009).
4. Thomas D Albright, Eric R Kandel and Michael L Posner: **Cognitive neuroscienze**. (2003)
5. Jinzhao Ji and Stephen Maren: **Hippocampal Involvement in Contextual Modulation of Fear Extinction**. (2007).
6. J. David Sweatt: **Experience- Dpendent Epigenetic Modifications in the Central Nervous System**. (2008).
7. Johannes Graff, Isabelle M. Mansuy: **Epigenetic codes in cognitions and behaviour**. (2008).
8. Swati Gupta, Se Y. Kim, David L. Molfese, Armin Schumacher, J. David Sweatt, Richard E. Paylor and Farah D. Lubin : **Histone Methylation Regulates Memory Formation**. (2009).
9. Barbara Monti, Elisabetta Polazzi and Antonio Contestabile: **Biochemical, Molecular and Epigenetic Mechanism of Valproic Acid Neuroprotection**. (2009).
10. Carmelo Sgobio, Veronica Ghiglieri, Cinzia Costa, Vincenza Bagetta, Sabrina Siliquini, Ilaria Barone, Massimiliano Di Filippo, Ecktar D. Gundelfinger, Monica Di Luca, Barbara Picconi and Paolo Calabresi: **Hippocampal Synaptic Plasticity, Memory, and Epilepsy: Effects of Long-Term Valproic Acid Treatment**. (2009).

## **RINGRAZIAMENTI**

*Ringrazio il professor Contestabile Antonio per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro nel suo laboratorio.*

*Ringrazio la dottoressa Monti Barbara per la pazienza con cui mi ha seguito in questo lavoro.*

*Ringrazio la mia famiglia per avermi sopportata nei momenti più difficili e per avermi sostenuto in ogni momento, in particolare mio padre che mi è sempre stato vicino e mia madre che mi ha dato tanta forza.*