



*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

## **LA MEMORIA**

Dal punto di vista temporale abbiamo tre diversi tipi di memoria: - working memory

- memoria a breve termine
- memoria a lungo termine

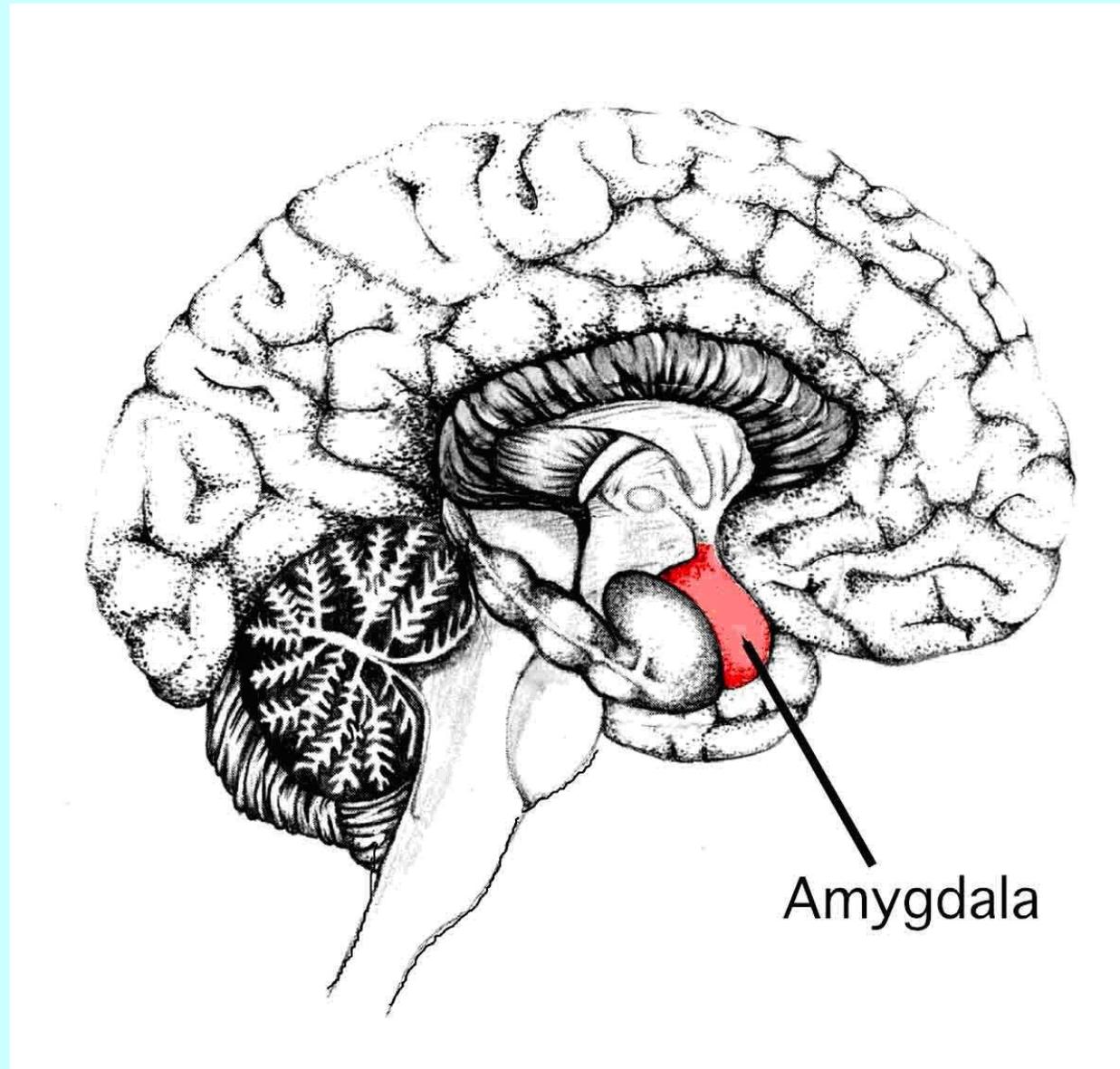
Dal punto di vista qualitativo abbiamo due tipi diversi di memoria:

- memoria implicita
- memoria esplicita

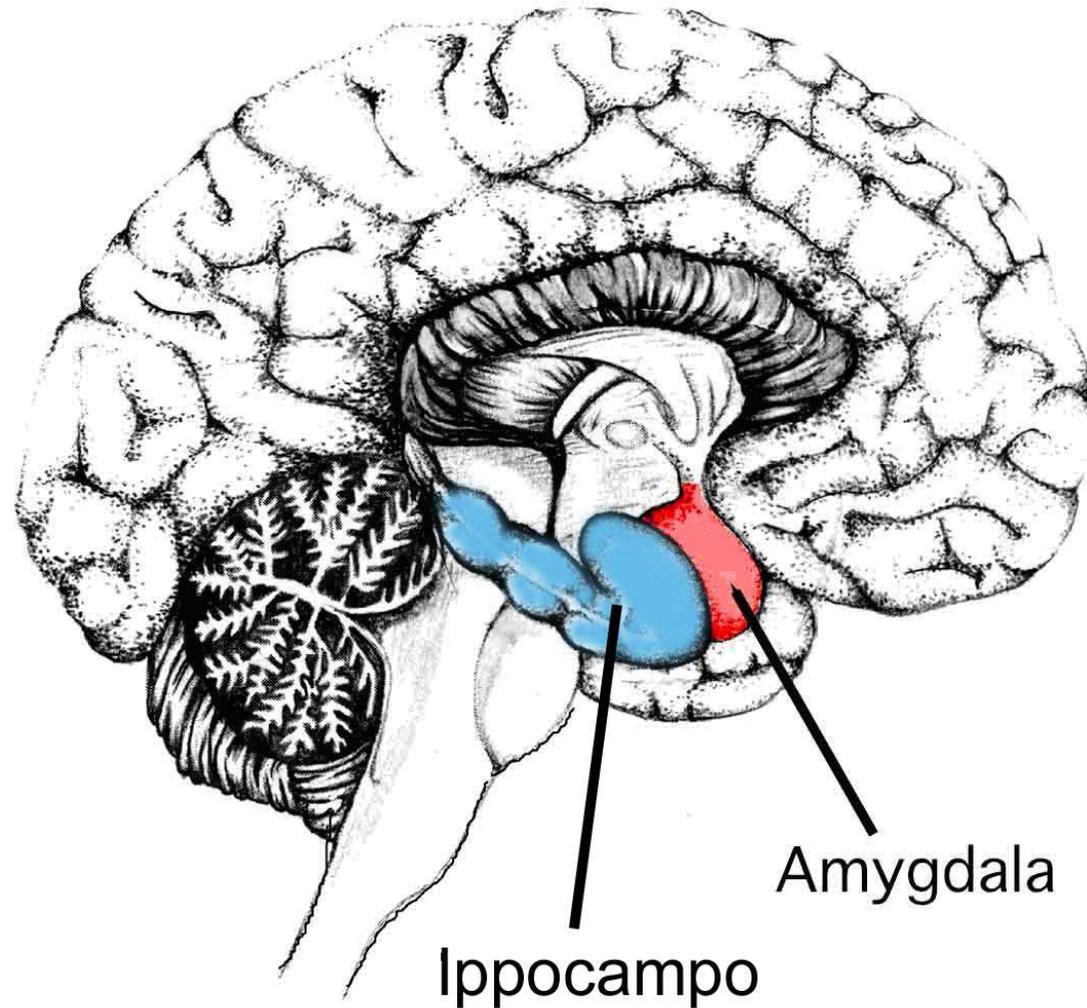
## **L'APPRENDIMENTO DI TIPO ASSOCIATIVO**

-il primo esperimento per verificare l'apprendimento associativo deriva da Ivan Pavlov il quale dimostrò che un animale poteva essere addestrato ad associare uno stimolo incondizionato (come una luce o un suono) a uno condizionato (come il cibo o una scossa ai piedi), dopo ripetute presentazioni. Da questo tipo di training, oggi sono stati sviluppati esperimenti di questo tipo per verificare l'apprendimento di tipo associativo di un animale, come il CONTEXTUAL FEAR CONDITIONING.

La memoria e l'apprendimento richiedono meccanismi molecolari di regolazione a livello delle cellule cerebrali. Le strutture coinvolte sono l'ippocampo, l'amigdala, la corteccia prefrontale e le loro connessioni.



**AMIGDALA:** sede delle risposte comportamentali come il freezing e dell'associazione tra stimoli a livello delle sinapsi (infatti si osserva LTP, potenziamento a lungo termine) ed è il sito per l'espressione della memoria contestuale alla paura.



**IPPOCAMPO:** non è la sede dell'immagazzinamento, ma partecipa alla codifica delle informazioni che lo raggiungono dalla corteccia cerebrale. Svolge un ruolo critico nei processi di regolazione della memoria contestuale alla paura

# MECCANISMI EPIGENETICI

## Metilazione DNA Nelle isole cpG

Associata a soppressione trascrizionale e silenziamento genico per reclutamento delle HDACs

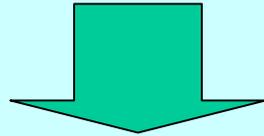
## Modificazioni Istioniche

Su coda N-term degli Istoni

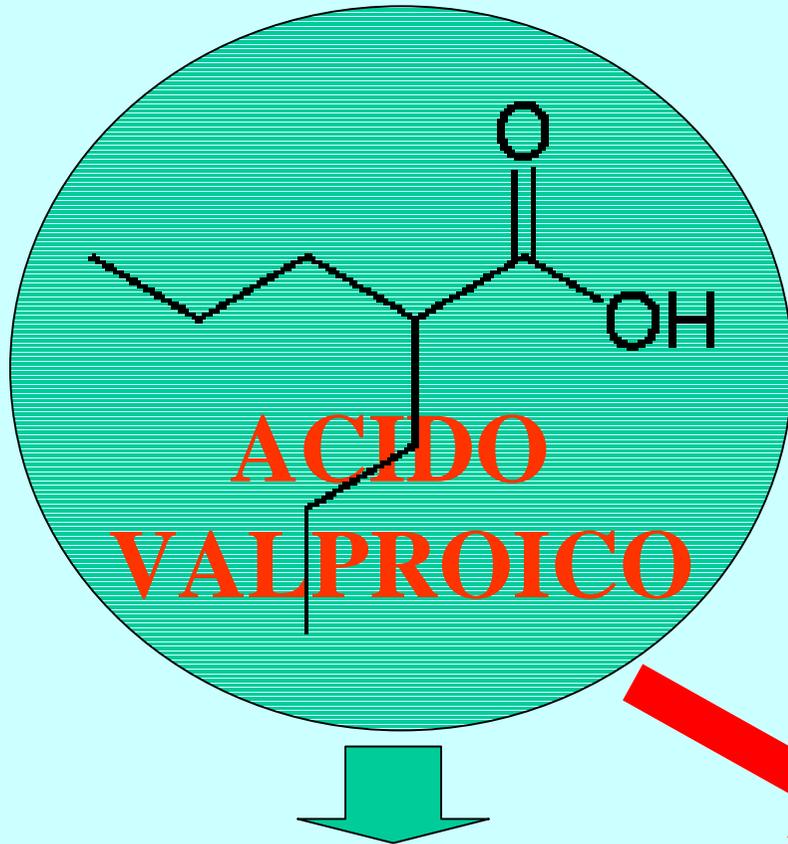
- a. **Acetilazione** attivazione trascrizionale.
- b. **Metilazione** associata sia a geni trascritti che silenziati
- c. **Fosforilazione** attivazione transizione > pathway otisign
- d. **Ubiquitazione** degradazione da proteasoma
- e. **Sumoilazione** poco conosciuta ma associata a degradazione negativa della transizione

## E NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE ?

**Nelle cellule neuronali abbiamo meccanismi epigenetici che regolano sia le sinapsi che il consolidamento della memoria**



- A livello della plasticità sinaptica: **—————>** **(LTPLDP)**
- A livello della memoria: **—————>** **CODICE ISTONICO**



## UTILIZZI

- Antiepilettico
- Disturbi umore
- Emicrania
- Antitumorale

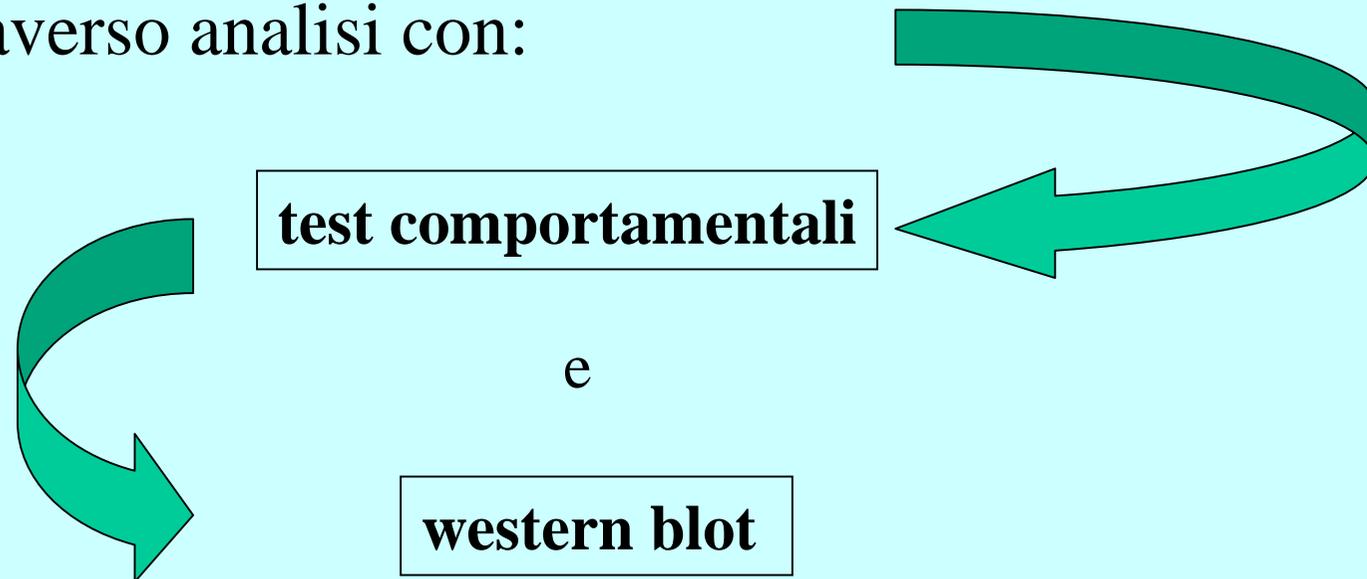
## POSSIBILI EFFETTI DANNOSI

Studi sui topi wt e epilettici  
Mostrano danneggiamento  
MEMORIA

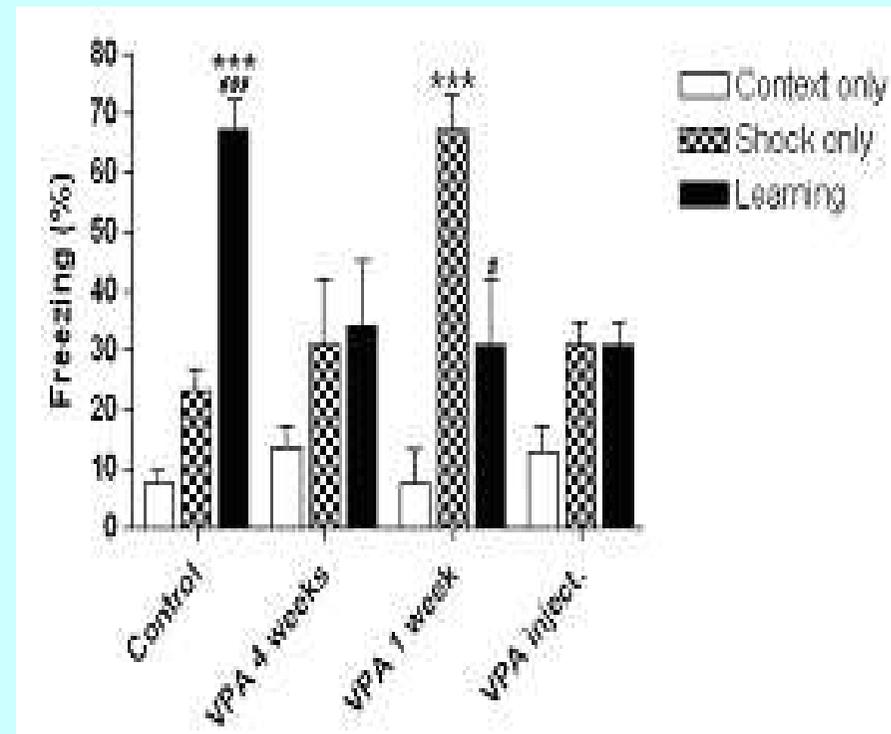
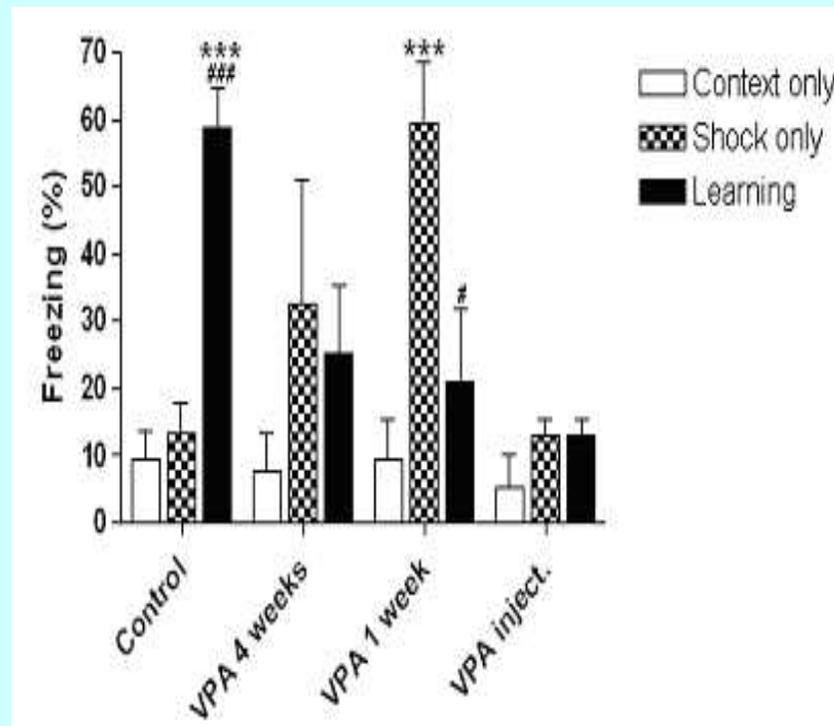
## REGOLA MOLTI MECCANISMI CELLULARI

Neurotrasmettitori cerebrali  
(Potenzia attività GABAnergica)  
(Influenza neurotrasmissione  
glutammato)  
Pathwaychinasi  
Regola espressione generica  
-AP-1 E NFKB  
- HDACc

Nel nostro lavoro abbiamo analizzato gli effetti dell' **acido valproico** sulle modificazioni istoniche posttraduzionali, che sono coinvolte nel consolidamento della memoria a lungo termine e nell'apprendimento di tipo associativo, attraverso analisi con:



- **esperimenti sui ratti trattati con VPA** : contextual fear conditioning;
- **estrazione selettiva delle proteine nucleari** dai tessuti cerebrali dei ratti che hanno svolto il training;
- **quantificazione delle proteine** attraverso il metodo **LOWRY** per caricare su gel campioni significativi
- **WESTERN BLOT** per vedere le modificazioni istoniche di nostro interesse:
  1. istone H3 fosforilato sulla serina 10 [(P-ser10)H3];
  2. istone H3 acetilato sulle lisine 9/14 [(Ac-lys9/14)H3], 18 [(Ac-lys18)H3] e 23 [(Ac-lys23)H3];
  3. istone H4 acetilato sulla lisina 5 [(Ac-lys5)H4] o 12 [(Ac-lys12)H4];
  4. espressione degli istoni H3 ed H4 totali, indipendentemente dalle loro modificazioni post traduzionali.

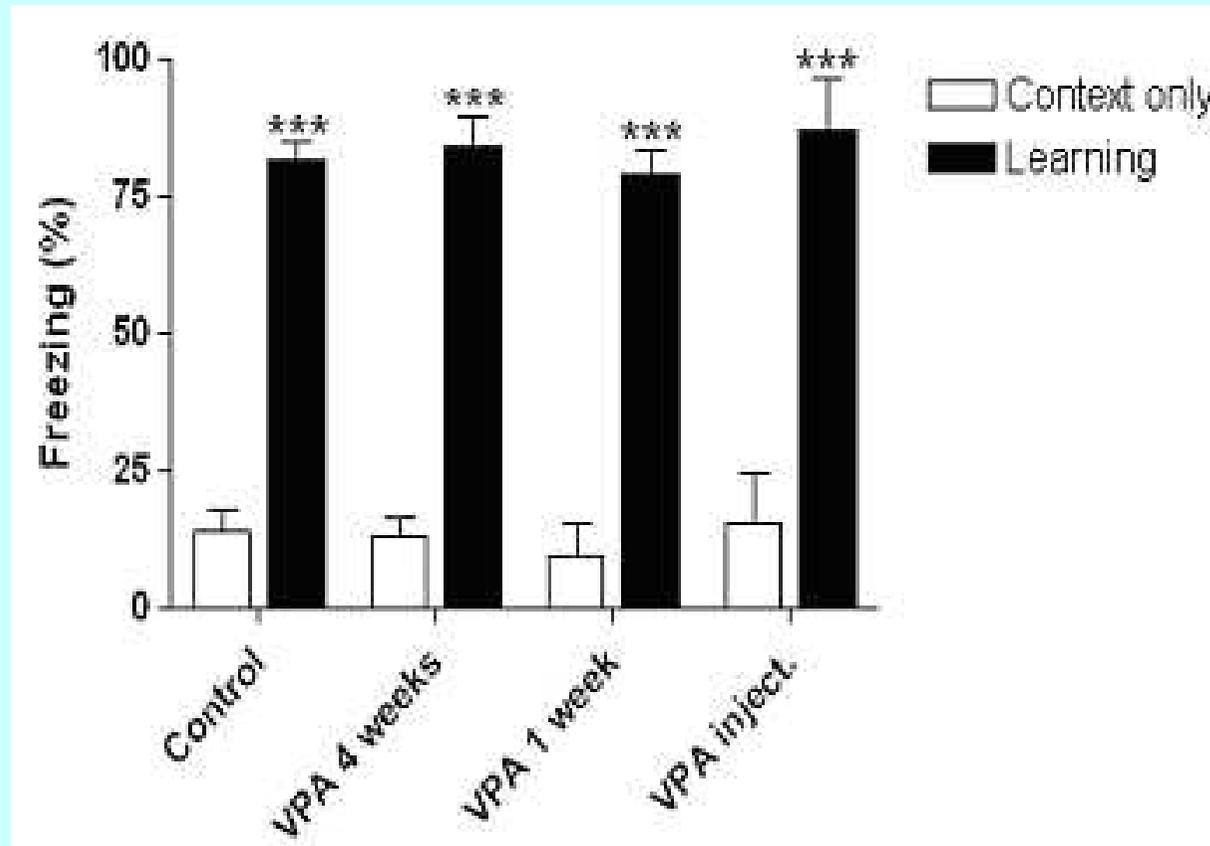


Percentuale di freezing 24 ore dopo l'esposizione al test del contextual learning (A) e del cue learning (B) nei gruppi "solo contesto" (context only), "solo shock" (shock only) e "contesto+shock" (learning), di ratti non trattati (controllo) e ratti trattati con VPA.

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.

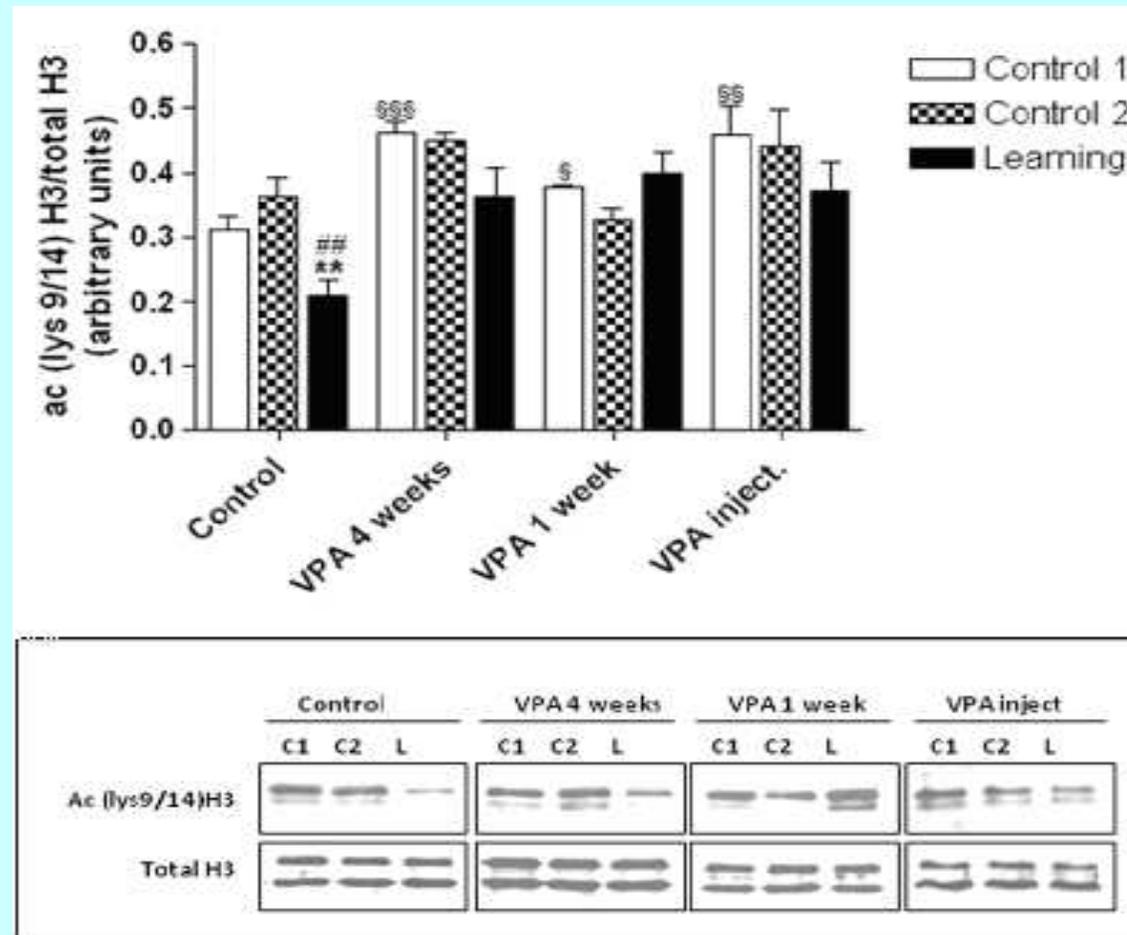


Percentuale di freezing immediatamente dopo l'esposizione al training nei gruppi "solo contesto" (context only) e "contesto+shock" (learning), di ratti non trattati (controllo) e ratti trattati con VPA.

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.

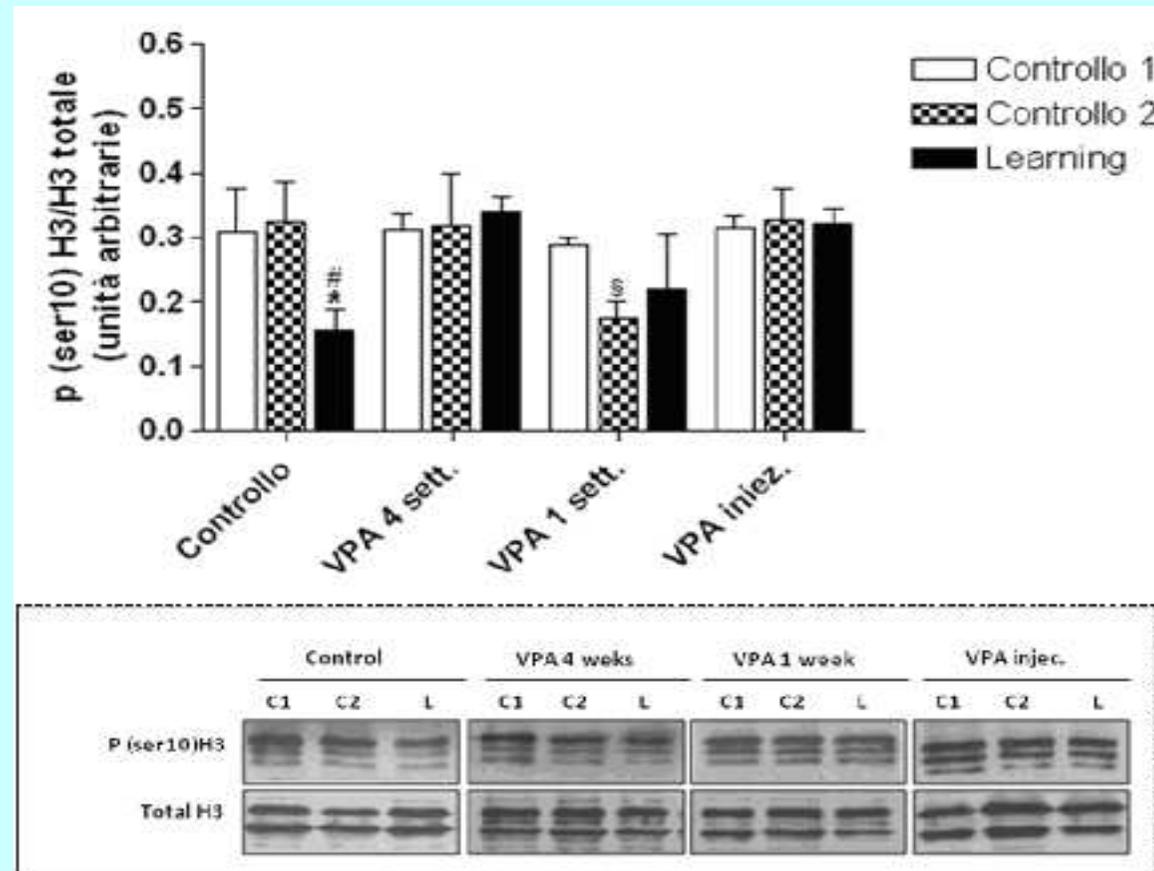
\*\*\*  $p < 0.001$  rispetto al controllo 1 di ogni gruppo, dopo analisi statistica dei dati con test t di Student.



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.



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

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

*Ringrazio la dottoressa **Barbara Monti**  
per la pazienza con cui mi ha seguita.*

*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.*