

Report STMS2015- Ilaria Tonazzini

Study of the molecular mechanisms of neuronal sensing in Ubiquitin ligase E3a- Knock-Out (Ube3a-KO) neurons

Ho effettuato la mia STSM presso il laboratorio del Prof. Ype Elgersma, al Dipartimento di Neuroscienze dell'Erasmus Medical Center a Rotterdam (periodo 23 novembre-13 dicembre 2015).

L'obiettivo del mio progetto era quello di studiare le risposte del citoscheletro (e le relative vie di segnale intracellulari) dei neuroni in presenza di stimoli topografici, in condizioni fisiologiche e patologiche. Ho utilizzato substrati nanostrutturati con nanogratings (NGs) per fornire stimoli direzionali ai neuroni tramite interazione di contatto. I meccanismi di meccano-trasduzione sono stati studiati nei neuroni Ube3a-KO, un modello autistico, con l'obiettivo di studiarne eventuali deficit di guida e connettività.

Ho effettuato esperimenti su culture primarie di neuroni ippocampali e corticali, estratti da topi wild-type (WT) e Ube3a^{m-/p+} (Ube3aKO- modello della sindrome di Angelman).

Ho effettuato degli esperimenti per valutare le possibilità di **rescue** della guida di contatto neuronale, ed i meccanismi coinvolti. Lo scopo di questi esperimenti è stato di valutare se è possibile recuperare il deficit di guida dei neuroni Ube3aKO sui nanogratings (Tonazzini I. et al. *Adv Healthcare Mat*, in press) tramite due diversi approcci: **1)** agendo sulla contrattilità del citoscheletro, come mostrato da dei nostri precedenti studi su altri modelli neuronali o con altre condizioni di disturbo (Ferrari A. et al. *Biomaterials* 2010; Tonazzini I. et al. *Biomaterials* 2013); **2)** reinserendo nelle cellule la proteina Ube3a (le isoforme 2 e 3 attive come ubiquitin ligasi), tramite trasfezione di vettori Ube3a2/3-CherryTomato sviluppati nel laboratorio del Prof. Elgersma. In dettaglio:

- 1)** I neuroni ippocampali (HNs) sono stati estratti da topi WT e Ube3aKO appena nati e poi cresciuti sui NGs con geometria T2 ed esposti a farmaci che agiscono sulla contrattilità del citoscheletro, in particolare con Blebbistatina (che riduce la contrattilità delle fibre di actina) e Nocodazolo (che aumenta la contrattilità). Ho effettuato immagini in bright-field a Day1 e 2, poi i campioni sono stati fissati e processati per immunostaining per marcare selettivamente gli assoni (tramite il marker selettivo SMI-312) e i dendriti (tramite il marker MAP-2).

In parallelo ho trattato varie piastre di neuroni sia ippocampali che corticali con le varie sostanze che agiscono sulla contrattilità del citoscheletro o con condizioni di controllo (solvente DMSO allo 0.1%) e li ho poi lisati e preparati per utilizzarli in esperimenti molecolari di Western Blot (WB). Questi esperimenti serviranno per valutare la presenza e l'attivazione di varie proteine coinvolte nella via di segnale delle adesioni focali (FAs), quali B1-integrin, focal adhesion kinase (FAK), SRC e paxillin. Ho corso 4 WB, visualizzandoli con il sistema di rilevazione a fluorescenza per gli anticorpi (Licor) in dotazione al laboratorio del Prof. Elgersma. Gli altri campioni preparati mi saranno spediti a breve a Pisa dove effettuerò ulteriori esperimenti.

- 2)** I neuroni ippocampali (HNs) WT e Ube3aKO sono stati seminati sui substrati T2 e dopo 24h sono stati trasfettati con il vettore Ube3a2/3-CherryTomato o con un vettore vuoto controllo-CherryTomato, tramite lipofectamina. I campioni sono stati cresciuti per altri 2 giorni e poi fissati e

processati per immunostaining per marcare selettivamente gli assoni (tramite il marker selettivo SMI-312) e i dendriti (tramite il marker MAP-2).

Tutti i campioni degli esperimenti di immunocitochimica saranno visualizzati e studiati con microscopia confocale a Pisa nei prossimi mesi.

Ho effettuato anche alcuni esperimenti per valutare lo stato di polimerizzazione delle fibre di actina a livello dei coni di crescita nei neuroni ippocampali WT e Ube3aKO, a diversi stadi di sviluppo in vitro (day3 e 12). I neuroni sono stati cresciuti e processati per immunostaining con phalloidina-647 e B3Tubulin, per marcare il citoscheletro. Effettuerò misure al microscopio confocale di questi campioni per misurare l'intensità delle fibre di actina nei diversi campioni.

I neuroni ippocampali WT e Ube3aKO sono stati anche trasfettati con il vettore **FAK-RFP** o con un vettore vuoto controllo-RFP, tramite lipofectamina. Purtroppo questo esperimento non ha funzionato al meglio a causa del vettore non ottimizzato per i neuroni primari.