

Report STM 2016- Ilaria Tonazzini

Rescue strategies for impaired neuronal contact guidance in Ubiquitin ligase E3a (Ube3a)-deficient neurons

Ho effettuato la mia borsa STM presso il laboratorio del Prof. Ype Elgersma, al Dipartimento di Neuroscienze dell'Erasmus Medical Center a Rotterdam (periodo 13 novembre-2 dicembre 2016).

L'obiettivo del mio progetto era quello di continuare lo studio delle possibilità di **rescue** della guida di contatto neuronale in un modello patologico di autismo cioè nei neuroni Ube3a-deficient (modello della sindrome di Angelman, OMIM #105830). Ho utilizzato culture primarie di neuroni ippocampali estratti da topi wild-type (WT) e Ube3a-deficient (Ube3a^{m-/p+}) insieme a substrati nanostrutturati con nanogratings (NGs) di periodo 2 micrometri, per fornire stimoli direzionali ai neuroni tramite interazione da contatto.

Lo scopo di questi esperimenti è stato di valutare se è possibile recuperare il deficit di guida dei neuroni *Ube3a-deficient* sui nanogratings (Tonazzini I. et al. *Adv Healthcare Mat*, 2016) tramite due diversi approcci: 1) agendo sulla contrattilità del citoscheletro (Tonazzini I et al. *Biomaterials* 2013): I neuroni ippocampali (HNs) WT e Ube3a^{m-/p+} sono stati coltivati sui NGs ed esposti a farmaci che agiscono sulla contrattilità del citoscheletro, in particolare Blebbistatina (che riduce la contrattilità delle fibre di actina) e Nocodazolo (che aumenta la contrattilità). 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 preparato dei campioni per misurare l'attività di alcune proteine coinvolte nella contrattilità del citoscheletro.

2) reinserendo nelle cellule la protein UBE3A, tramite trasfezione di un vettore plasmidico Ube3a2/3-CherryTomato sviluppato nel laboratorio del Prof. Elgersma. I neuroni ippocampali WT e Ube3a^{m-/p+} sono stati seminati sui substrati T2 e 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).

Sono stati effettuati anche esperimenti controllo su questi campioni per quantificare la quantità di proteina UBE3A effettivamente reinserita all'interno delle cellule.

Tutti i campioni degli esperimenti di immunocitochimica saranno visualizzati e studiati con microscopia confocale a Pisa nei prossimi mesi. Insieme a esperimenti precedentemente effettuati, gli esperimenti effettuati durante questo STM mi permetteranno di avere un buon numero di replicati per ogni condizione e quindi una buona statistica.

Ho infine effettuato anche alcuni esperimenti per valutare lo stato di funzionamento dell'autofagia e della via di segnale di mTOR nei neuroni Ube3a-deficient, misurando in particolare i livelli delle proteine LC3 e AKT. mTOR è infatti una via intracellulare implicata nella regolazione del citoscheletro e particolarmente rilevante in vari deficit neurocognitivi.