



**ISTITUTO DI BIOLOGIA E PATOLOGIA
MOLECOLARI**

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

Dip.to Scienze Biochimiche "A. Rossi Fanelli"
Università "La Sapienza" – P.le A. Moro 5 – 00185 Roma

Roma, 10-2-2014

Relazione relativa al Programma STM 2013 (periodo dal 29 novembre al 20 dicembre 2013)

Fruitore STM: Nicoletta Corbi, Ricercatore livello III.

Istituto di afferenza: Istituto di Biologia e Patologia Molecolari (IBPM)

Dipartimento di afferenza: Scienze Biomediche

Istituzione ospitante: Laboratorio di Neurobiologia della Memoria diretto dal Prof. Arturo G. Romano, Dipartimento di Fisiologia, Biologia Molecolare e Cellulare, Facoltà di Scienze Naturali e Esatte, Università di Buenos Aires IFIByNE –CONICET, Buenos Aires. Argentina.

Titolo del programma:

Meccanismi di regolazione della trascrizione e della traduzione locale associati alla memoria in ippocampo. Ruolo delle proteine NF-kB e Che-1/AATF.

Il progetto in collaborazione con il gruppo di ricerca argentino è incentrato sullo studio delle basi molecolari della formazione della memoria a lungo termine e si propone in particolare di approfondire il ruolo regolativo delle proteine NF-kB e Che-1/AATF in questo contesto.

Il ruolo di NF-kB nella memoria è stato inizialmente evidenziato dal gruppo di ricerca del Prof. Romano. Inoltre negli ultimi anni è emerso che meccanismi epigenetici, come l'acetilazione degli istoni, svolgono un ruolo fondamentale in questo ambito. In particolare l'acetilazione di fattori trascrizionali come NF-kB è stata proposta come requisito per l'induzione dell'espressione genica. Questa modificazione è ad opera della proteina CBP (CREB binding protein), un coattivatore trascrizionale con attività istonacetiltransferasica (HAT). Coerentemente, l'effetto HAT è controbilanciato dall'azione delle proteine ad azione deacetilasica ed è stato dimostrato che l'inibizione di HDAC tramite utilizzo di farmaci come tricostatina A (TSA) induce una facilitazione della memoria nei topi prolungando l'attività di NF-kB. In questo ambito, dati recenti, frutto della nostra collaborazione (Federman N, de la Fuente V, Zalcman G, Corbi N, Onori A, Passananti C, Romano A.J Neurosci. 2013 Apr 24;33(17):7603-7614), hanno evidenziato il coinvolgimento dell'acetilazione dell'istone H3, dipendente da NF-kB, nella formazione di memoria persistente a livello ippocampale.

Che-1/AATF è stato identificato dal nostro gruppo di ricerca attraverso "screening di doppio ibrido" utilizzando come esca la subunità 11 dell'RNA polimerasi II. Che-1 interagisce con la proteina oncosoppressore Retinoblastoma (Rb), allontanando la deacetilasi HDAC1 dal complesso Rb/E2F1 e promuovendo così la trascrizione dei geni ciclo-relati. Di assoluto rilievo per questo progetto è la

dimostrazione che in seguito a danno genotossico, la fosforilazione di Che-1 provoca oltre alla sua stabilizzazione anche modificazioni molecolari che inducono un legame diretto di Che-1 con la subunità p65 del complesso NF-kB, contribuendo così all'attività trascrizionale di questo fattore.

E' pertanto razionale proporre che l'alterazione dei livelli della proteina Che-1 (e/o sue modificazioni) e la sua associazione con NF-kB possano essere alla base di uno dei meccanismi epigenetici coinvolti nella formazione della memoria.

Per lo svolgimento del progetto italo-argentino, sono utilizzati due diversi modelli di memoria nel topo: "Fear Conditioning" (FC) e "Novel Object Recognition" (NOR). Il gruppo di ricerca del Prof. Romano ha accumulato grande esperienza con entrambi questi modelli. Il nostro gruppo di ricerca fornisce la propria esperienza nelle metodologie molecolari, in particolare relativamente alla metodologia della immunoprecipitazione della cromatina (ChIP), immunoprecipitazione di complessi proteici e mRNA/proteine (RNA-ChIP, RIP-ChIP), nonché ha messo a disposizione reagenti relativi a Che-1 e il modello murino emizigote di Che-1 per studi comportamentali della memoria.

In particolare nel periodo lavorativo svolto presso il laboratorio del Prof Romano ho effettuato esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina ChIP, a partire da estratti da estratti di ippocampo provenienti da topi sottoposti a "training" ("allenamento della memoria") associato al riconoscimento di un nuovo oggetto e al ricordo di uno visto in precedenza (test modello "Novel object recognition"), confrontati con topi di controllo trattati solo con il contesto. Esperimenti preliminari di PCR hanno messo in evidenza il legame memoria dipendente della proteina NF-kB al promotore del gene Zif-268. Seguirà l'analisi di una batteria di altri promotori di geni cruciali nella formazione della memoria.

Una linea di ricerca parallela indaga, in collaborazione con il Prof. Arturo Romano e con il Prof. Ramiro Freudenthal, sul ruolo nella memoria a lungo termine di NF-kB e di Che-1, in qualità di proteine leganti l'RNA, sulla base di dati *in vitro* presenti in letteratura per NF-kB e nostri dati ancora non pubblicati per Che-1. A tale scopo abbiamo utilizzato la metodologia della co-immunoprecipitazione di mRNA "RNA-ChIP" precedentemente messa da noi a punto su linee cellulari di mammifero. Abbiamo condotto diversi esperimenti di RNA-ChIP a partire da ippocampo e cortex di topi, immunoprecipitando complessi RNA-proteine da frazione frazione sinaptosomale, utilizzando in un set l'anticorpo anti-Che-1 policlonale (da noi prodotto in coniglio), in un secondo set l'anticorpo anti NF-kB commerciale (S. Cruz). Particolarmente interessante e promettente è l'identificazione di 2 possibili messaggeri legati da NF-kB, corrispondenti ai geni: Spock1 (NM_009262.2) e Scn3B (NM_001083917.1). Questi due geni sono espressi specificamente nelle aree del cervello cortex e ippocampo e svolgono la loro funzione a livello delle sinapsi. Nel corso del mio programma STM un ulteriore esperimento di RNA-ChIP é stato effettuato utilizzando la frazione di membrane sinaptosomali, dove e' stata recentemente rilevata una elevata presenza della proteina NF-kB (oggetto

di una nostra prossima pubblicazione). L'mRNA immunoprecipitato in associazione alla proteina NF-Kb, e' stato convertito in cDNA, clonato e verrà sequenziato. Contiamo di proseguire l'analisi dei messaggeri isolati in questo e nei prossimi esperimenti di RNA-ChIP (effettuati su topi sottoposti a "training", allenamento della memoria), tramite sequenziamento in piccola e grande scala (RNA-ChIP-SEQ "Illumina"). Parallelamente, con l'intento di isolare nuove proteine associate NF-kB nella frazione sinaptica arricchita in membrane e contenuto sinaptico, è stato effettuato un esperimento in grande scala di immunoprecipitazione di proteine a partire da cervello di topo, utilizzando l'anticorpo commerciale S. Cruz anti-p65-NF-kB covalentemente legato a biglie di agarosio. I campioni sono stati opportunamente trattati per essere poi sottoposti ad analisi per spettrometria di massa. Le proteine identificate tramite spettrometria verranno ulteriormente caratterizzate, indagando anche su un loro possibile ruolo nel controllo del metabolismo dell'mRNA. Considerata l'importanza del trasporto di specifici mRNA e di traduzione locale "regolata" a livello delle sinapsi, i nostri dati potrebbero portare alla delucidazione di nuovi meccanismi molecolari alla base della formazione/consolidamento della memoria.

Inoltre, nel laboratorio argentino, sono attualmente in corso studi comportamentali relativi alla memoria (test "NOR" e "Fear Conditioning") sul modello murino emizigote per Che-1, da noi fornito. I primi dati sembrano mostrare una formazione della memoria nei topi Che1 +/- alterata rispetto ai topi di controllo.



Dr. Nicoletta Corbi