

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**



**Dottorato di ricerca in Biologia Avanzata**

**XXVII CICLO**

**Studi molecolari dello stato della cromatina dopo  
induzione della *Spreading Depression* in cellule nervose**

**TUTOR**

**Ch. ma Prof.ssa Laura Fucci**

**DOTTORANDA**

**Denise Drongitis**

**CO-TUTOR**

**Dott. Aldo Donizetti**

# INDICE

## 1. Introduzione

- 1.1 La metilazione del DNA.....5-11
- 1.2 *Preconditioning* e *Cortical Spreading Depression (CSD)*.....12-15
- 1.3 Geni neuroprotettivi.....15-20
- 1.4 *Long Interspersed Nuclear Elements (LINEs)*.....20-25

## 2. Scopo del Lavoro.....26-30

## 3. Materiali e Metodi.....31

- 3.1 Trattamento per l'induzione della *Cortical Spreading Depression (CSD)*.....32
- 3.2 Estrazione e sonicazione del DNA genomico.....32
- 3.3 Immunoprecipitazione di DNA metilato (meDIP) e qPCR.....34-36
- 3.4 Estrazione RNA, retrotrascrizione e qPCR.....36-38
- 3.5 Allestimento di colture cellulari di neuroblastoma umano (SHSY5Y) e differenziamento.....38-39
- 3.6 *Western blotting* su cellule SHSY5Y differenziate e non differenziate.....39-41
- 3.7 Analisi di vitalità cellulare (saggio MTT).....41-42
- 3.8 Analisi statistiche.....42

## 4. Risultati.....45

- 4.1 Effetti della CSD sul livello del trascritto e sulla metilazione del DNA di sequenze retrotrasponibili.....46-52

4.2 Cambiamenti nei livelli di espressione delle DNA metiltrasferasi a tempi diversi dall'induzione della CSD.....	53-56
4.3 Effetti della CSD sui livelli di metilazione del DNA di promotori di geni neuroprotettivi.....	57-59
4.4 Messa a punto di un sistema cellulare <i>in vitro</i> per lo studio del <i>Preconditioning</i> .....	60-67
4.5 Caratterizzazione del sistema cellulare <i>in vitro</i> per lo studio del <i>Preconditioning</i> : analisi molecolari.....	68-75
4.6 Analisi preliminari: livello di espressione della di-metilazione dell'istone H3K4 e dell'istone H3K9.....	76-77
4.7 Saggi di vitalità cellulare dopo 24 ore dall'induzione del <i>Preconditioning</i> .....	78-79
<b>5. Discussione.....</b>	<b>80</b>
5.1 Discussione I.....	81-85
5.2 Discussione II.....	86-93
<b>6. Bibliografia.....</b>	<b>94-110</b>

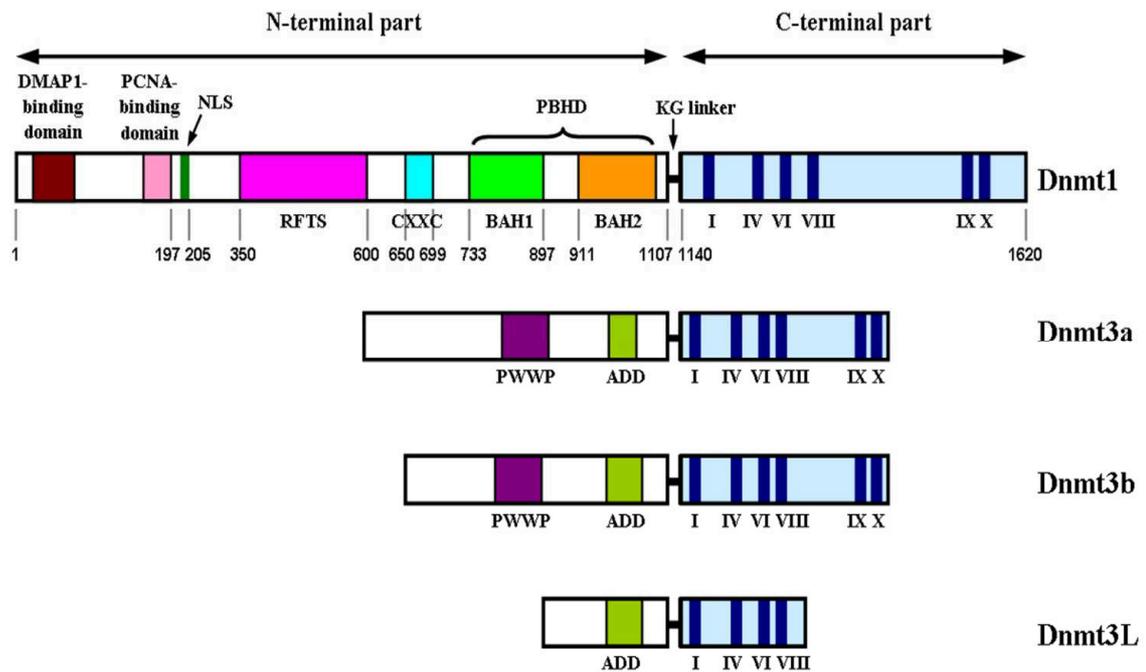
# *Introduzione*

## 1.1 La metilazione del DNA

La metilazione del DNA è sicuramente una fra le più complesse e dinamiche modifiche epigenetiche. Il meccanismo alla sua base prevede l'aggiunta di un gruppo metile (-CH<sub>3</sub>) in posizione C5, perlopiù a carico della citosina facente parte del dinucleotide CpG. All'interno del genoma esistono regioni di circa 200 coppie di basi che presentano un contenuto di C+G superiore al 50% e vengono definite "isole CpG"; solitamente queste isole si ritrovano localizzate all'interno di regioni promotrici, in prossimità del sito di inizio della trascrizione. La metilazione del DNA di tali regioni è perlopiù associata a repressione trascrizionale. Il meccanismo di repressione può agire in due modi: la metilazione del DNA può inibire la formazione del complesso di inizio della trascrizione, impedendo ad alcuni fattori di trascrizione il riconoscimento dei propri siti bersaglio sulla sequenza di DNA perché modificati dall'aggiunta dei gruppi metile; oppure la metilazione può favorire il legame alle sequenze metilate di proteine specifiche (*methyl-CpG-binding proteins*) che sono poi in grado di reclutare complessi enzimatici implicati nella repressione genica (Serman et al., 2006). Evidenze sperimentali raccolte negli ultimi anni, hanno evidenziato un ruolo molto importante anche per la metilazione intragenica del DNA nella scelta di promotori alternativi (Maunakea et al., 2012) o di forme di splicing alternativo (Sati et al., 2012). La reazione di metilazione del DNA è catalizzata da una classe di enzimi, le DNA metiltrasferasi (DNMTs), che

utilizzano il coenzima *SAM* (S-adenosilmetionina) come donatore di gruppi metili. Nei mammiferi sono state ritrovate 5 famiglie di DNA metiltrasferasi: DNMT1, DNMT2, DNMT3A e DNMT3B e DNMT3L di cui solo DNMT1 e DNMT3A e 3B presentano attività catalitica. Gli enzimi DNMT3A e DNMT3B, DNA metiltrasferasi *de novo*, hanno la funzione di metilare il DNA neosintetizzato, mentre l'enzima DNMT1, definito DNA metiltrasferasi di mantenimento, mantiene costante nel tempo il pattern di metilazione avendo come substrato il DNA emimetilato. LA DNMT1 possiede una regione catalitica posizionata nella sua parte C-terminale ed una lunga regione N-terminale in cui sono presenti numerosi domini di regolazione; tra i più importanti vi sono i domini TS e PBD (*proliferating nuclear antigen (PCNA) binding domain*) che indirizzano l'enzima verso il DNA durante la fase S, i domini DMAP1 e Rb che sono collegati invece alla funzione di repressore trascrizionale svolta da DNMT1 (Xu et al., 2011). Nella regione N-terminale sono inoltre posizionati i domini di legame a numerose *metil-CpG-binding proteins* ed istone metiltrasferasi, come Suv39H (Xu et al., 2011). Come la DNMT1, anche la DNMT3A e la DNMT3B possiedono a livello della loro porzione C-terminale il dominio deputato alla catalisi. La regione N-terminale di entrambi questi due enzimi è molto più piccola rispetto a quella della DNMT1. Le due metiltrasferasi appartenenti alla classe 3 sembrano aver omologia solo a livello di due domini specifici (ADD e PWWP), mentre per il resto della regione N-

terminale la sequenza risulta essere molto variabile (Xu et al., 2011). Il dominio ADD è coinvolto nella funzione di repressione trascrizionale di questi enzimi mentre il dominio PWWP sembra dirigere la DNMT3A e la DNMT3B verso i cromosomi in metafase (Xu et al., 2011). La metiltrasferasi 3L invece non possiede domini catalitici ma il suo ruolo sembra essere associato al trasporto delle DNMT3A e DNMT3B sui siti in cui devono catalizzare l'attacco del gruppo metile (Xu et al., 2011).



[Ryazanova et al., 2013]

Figura 1. Struttura dei domini delle DNA metiltrasferasi

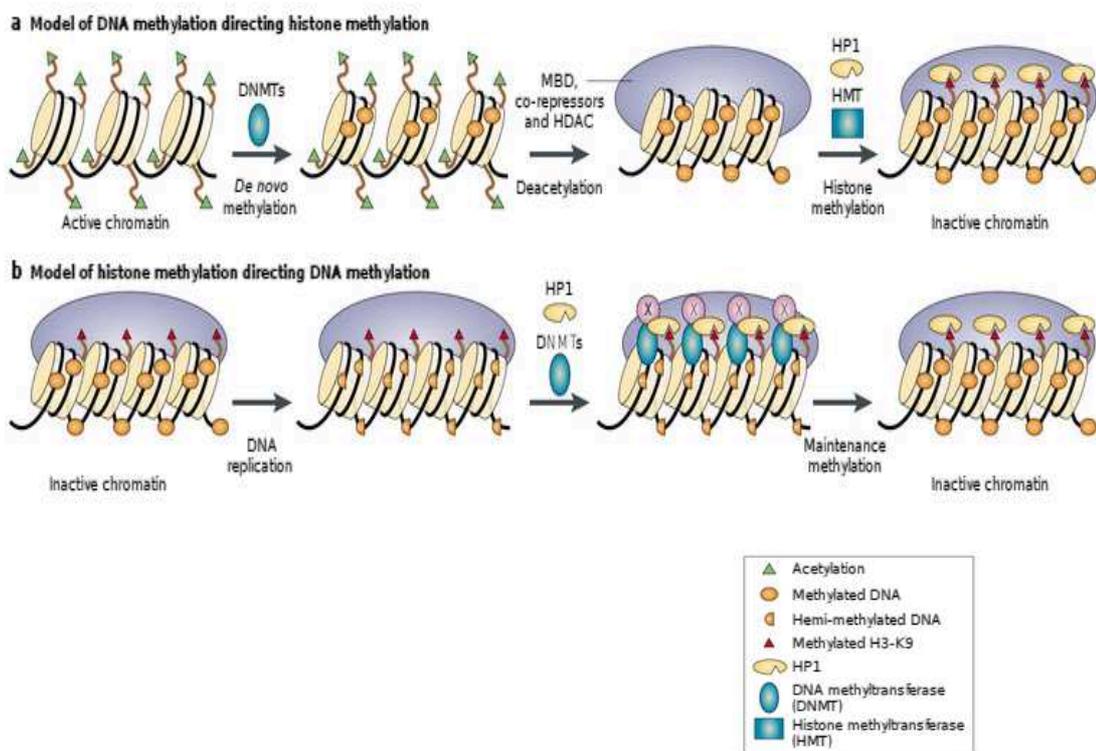
Recentemente è stata proposta una nuova e complessa ipotesi sul ruolo delle DNA metiltrasferasi nel processo di metilazione della molecola di DNA. In cellule NTCC, gli enzimi DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 ed

anche DNMT3L sono state depleti singolarmente ed in maniera combinata (Tiedemann et al., 2015). La deplezione della sola DNMT1, o combinata con la deplezione della DNMT3B, risulta in una ipometilazione globale del genoma; al contrario, la mancanza della sola DNMT3B o della sola DNMT3L si traduce invece in una ipermetilazione globale del genoma. Per quanto riguarda la deplezione della DNMT3A invece, essa causa solo una debole ipometilazione (Tiedemann et al., 2015). Lo stesso tipo di analisi è stato anche effettuato per i siti non CpG; per questi siti la deplezione singola o combinata dei quattro enzimi sopracitati porta a risultati opposti (Tiedemann et al., 2015). Per esempio, la deplezione della DNMT3B su questi siti porta ad una ipometilazione globale lungo il genoma (Tiedemann et al., 2015). Questi dati suggeriscono che la regolazione del pattern di metilazione del DNA sia più complicata di quanto si pensasse e che tenga conto sia dell'interazione tra le DNMTs che del sito specifico in cui quest'interazione ha luogo.

A livello fisiologico, alterazioni nel pattern di metilazione del DNA o nei livelli di espressione delle DNMTs sono inoltre coinvolte nell'insorgenza di numerose patologie come il cancro (Subramaniam et al., 2014; Gros et al., 2012), malattie autoimmuni (Javierre et. al., 2010) e neurodegenerative (Lu et al., 2013).

E' noto già da tempo che la metilazione del DNA risulta essere strettamente legata alla metilazione istonica; è stata infatti riscontrata una correlazione

positiva tra la metilazione del DNA e la metilazione dell'istone H3 a livello della lisina 9, ed una correlazione negativa invece con la metilazione dell'istone H3 a livello della lisina 4. In particolare, la metilazione dell'istone H3 può avere diversi effetti sulla trascrizione genica; in generale, la monometilazione dell'istone H3 sulla lisina 9 è associata ad attivazione trascrizionale, mentre la di- e la tri- metilazione sono associate a repressione trascrizionale; al contrario mono- di- e tri- metilazione dell'istone H3 a livello della lisina 4 si ritrovano associate ad attivazione trascrizionale (Akbarian and Huang, 2009).



[Li, 2002]

Figura 2. Interazione tra metilazione del DNA e metilazione istonica

Evidenze sperimentali hanno messo in luce la stretta interazione che intercorre tra DNMTs, *Metil-CpG-binding proteins* e molte H3K9

metiltrasferasi, come Suv39h1/2, per stabilire una corretta compattazione cromatinica (Lehnertz et al., 2003; Rose and Klose, 2014).

L'interazione tra metilazione del DNA e metilazione istonica, sia essa H3K4 o H3K9, è stata studiata più in dettaglio negli ultimi anni.

Studi di cristallografia hanno evidenziato per le DNA metiltrasferasi 3A, 3B e per la DNA metiltrasferasi 3L, che il dominio ADD, presente nella parte N-terminale di questi enzimi, funge da sensore per gli istoni H3K4 non modificati (H3K4me0); allo stesso modo quasi tutte le istone metiltrasferasi possiedono un dominio CxxC che invece sembrerebbe consentire il legame di questi enzimi specificamente a DNA non metilato (Hashimoto et al., 2010).

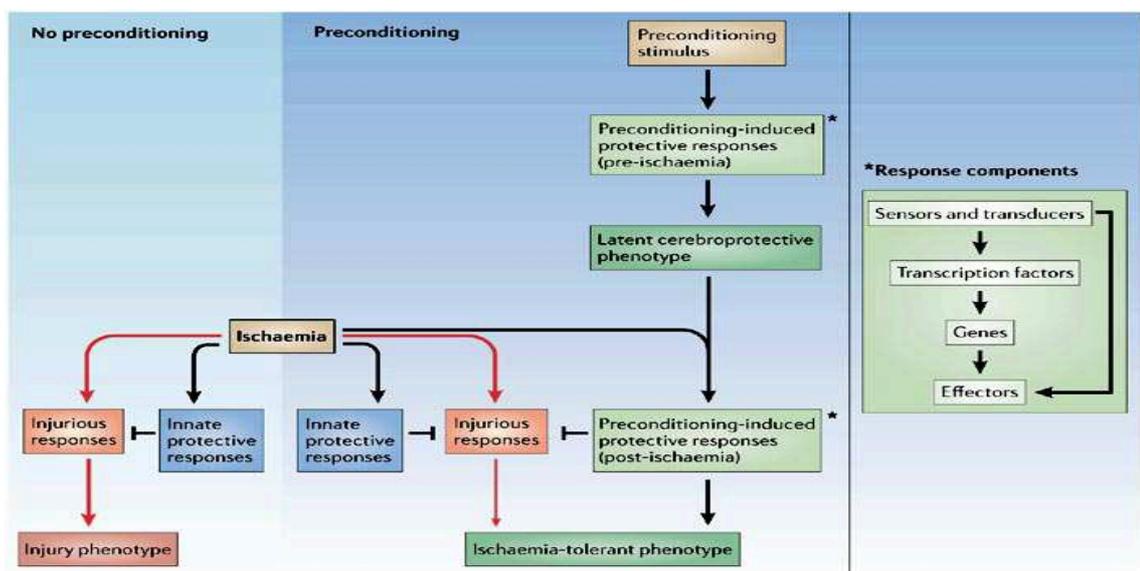
Poiché il pattern di metilazione del DNA viene generalmente stabilito durante lo sviluppo embrionale, il profilo di espressione delle DNMTs nei tessuti adulti sembra essere limitato. Il cervello è però un'eccezione; è stato infatti osservato che nel cervello il meccanismo di metilazione del DNA gioca un ruolo chiave sia durante lo sviluppo neurale, sia nel mantenimento della plasticità sinaptica, nell'apprendimento e nello sviluppo della memoria. La mancanza delle DNMT1 e DNMT3A nei neuroni postmitotici, e quindi un alterato profilo di metilazione, causa infatti difetti nel mantenimento della plasticità sinaptica, dell'apprendimento e della memoria (Feng et al., 2010). Sempre in neuroni postmitotici, si sono ottenute informazioni circa il ruolo della metilazione in siti non CpG. In

regioni genomiche povere in CpG la metilazione del DNA può infatti avvenire a carico di sequenze CpH, dove per H si intende una delle altre tre basi azotate. È stato dimostrato che anche la metilazione in CpH, come quella in CpG, ha un ruolo di repressione trascrizionale attraverso il reclutamento della *Metil-CpG-binding protein 2* (MeCP2) (Guo et al., 2014). Il rapporto tra siti metilati in CpG e siti metilati in CpH sembrerebbe guidare inoltre il differenziamento cellulare verso un sottotipo neuronale o gliale (Kozlenkov et al., 2013; Lister et al., 2013).

Studi recenti hanno dimostrato che la 5-metilcitosina può essere ossidata a 5-idrossimetilcitosina dalla famiglia delle proteine TET. Questo tipo di modifica è molto abbondante nel cervello soprattutto a livello dell'ipotalamo (Wen and Tang, 2014). A differenza della metilazione del DNA, l'idrossimetilazione agisce probabilmente reclutando MeCP2, ma in questo caso portando ad una conformazione cromatinica aperta (Mellen et al., 2012). Nei neuroni, metilazione e idrossimetilazione del DNA mostrano un pattern opposto ma complementare (Guo et al., 2015); probabilmente la fine regolazione di queste due modifiche è il meccanismo chiave che sottende una corretta espressione genica e quindi un corretto sviluppo cerebrale.

## 1.2 Preconditioning e Cortical Spreading Depression (CSD)

Negli ultimi anni, è stato proposto un ruolo per il rimodellamento cromatinico durante il processo di neuroprotezione. Le modifiche epigenetiche potrebbero essere infatti alla base della capacità del cervello di proteggersi contro un insulto andando a guidare una corretta espressione genica. Nel sistema nervoso, uno stimolo sub-letale può indurre le cellule ad acquisire una certa tolleranza contro un successivo insulto letale; questo tipo di risposta da parte della cellula viene chiamato *Preconditioning* (Dirnagl et al., 2003). Il fenomeno del *Preconditioning* si basa sull'azione combinata di numerosi sensori e trasduttori di segnale che, cooperando, inducono modifiche post-traduzionali di proteine pre-esistenti o attivano fattori trascrizionali *ex novo* (Gidday, 2006; Liu et al., 2009).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Neuroscience

[Gidday, 2006]

Figura 3. Schematizzazione dell'azione del Preconditioning

Questa tolleranza può indurre una risposta rapida, che si attiva in pochi minuti, o una risposta più lenta che può avvenire e protrarsi poi per ore o giorni (Dirnagl et al., 2003). In particolare, una risposta più lenta è di solito collegata a cambiamenti di lunga durata nell'espressione genica. Tali cambiamenti di lunga durata dopo l'induzione del *Preconditioning* sono stati correlati a modifiche nel profilo di metilazione del DNA e degli istoni. Questi meccanismi collaborando sembrano creare una sorta di memoria molecolare epigenetica che manterrebbe il genoma cellulare in uno stato che ne permetterebbe una più rapida risposta qualora stimolato da un agente nocivo (Sailaja et al., 2012; Hartley et al., 2013; Rana et al., 2012; Passaro et al., 2010).

Stimoli di diversa natura possono indurre il fenomeno del *Preconditioning*: ischemia, ipossia, ipotermia, ipertermia, esercizio fisico, oltre che agenti farmacologici (Stetler et al., 2014). Un particolare tipo di stimolo che può indurre *Preconditioning*, da ascrivere alla categoria degli insulti sub-ischemici, è la *Cortical Spreading Depression* (CSD) (Stetler et al., 2014). La CSD è un'onda di depolarizzazione neuronale associata ad una depressione spontanea dell'attività bioelettrica neurale che permane per parecchi minuti (Leao, 1944). Vi è una prima fase, della durata di pochi secondi, in cui i dendriti apicali sono quasi completamente depolarizzati mentre il soma è solo parzialmente depolarizzato; questa fase iniziale è seguita da una fase in cui tutta la membrana somatodendritica è

completamente depolarizzata (fase principale della durata di 15-20 secondi). Alla fase principale segue poi una fase tardiva in cui solo una ristretta fascia di dendriti apicali rimane completamente depolarizzata mentre il soma è parzialmente ripolarizzato. Queste caratteristiche indicherebbero che la depolarizzazione indotta da CSD sia avviata dalla attivazione di canali ionici situati nei dendriti apicali dei neuroni piramidali (fase iniziale) con successiva attivazione di altri canali ionici lungo la membrana somatodendritica (fase principale). A ciò fa seguito la chiusura dei canali ionici posti nella zona somatobasale, limitando l'influsso di corrente nella fase tardiva ad una ristretta fascia di dendriti (Pietrobon and Moskowitz, 2014).

A livello fisiologico il massiccio arresto dell'attività neurale è indotto dall'efflusso di  $K^+$  dai neuroni, mediato inizialmente dall'apertura di canali  $K^+$  voltaggio-dipendenti e successivamente da canali  $K^+$  ATP-dipendente, con una conseguente iperpolarizzazione transiente della membrana plasmatica. Pochi minuti dopo, si assiste ad una drammatica redistribuzione di ioni attraverso la membrana, associata con la depolarizzazione della membrana stessa (efflusso di  $K^+$  e afflusso di  $Na^+$ ,  $Cl^-$ , e  $Ca^{2+}$ ). Questa depolarizzazione ha come effetto l'eccessivo rilascio di neurotrasmettitori, in particolare del glutammato, che promuove l'ulteriore propagazione a territori adiacenti dell'onda di depolarizzazione cellulare. L'accumulo di glutammato extracellulare stimola i recettori NMDA, AMPA,

promuovendo l'afflusso di Na<sup>+</sup> e l'efflusso di K<sup>+</sup> attraverso i canali di membrana del glutammato. I canali ionici NMDA sono inoltre molto permeabili al Ca<sup>2+</sup> e mediano l'influsso di Ca<sup>2+</sup> nei neuroni (Moo Lee et al., 2000; Pietrobon and Moskowitz, 2014).

La CSD può essere indotta in vario modo; alcuni dei metodi più utilizzati sono il trattamento, breve o prolungato, con cloruro di potassio, la deprivazione da ossigeno e glucosio (OGD), la stimolazione elettrica o l'utilizzo di specifici agenti farmacologici.

A livello molecolare è stato ipotizzato che il *Preconditioning* indotto da CSD, come meccanismo di neuroprotezione, induca l'attivazione di specifici geni, definiti appunto neuroprotettivi (Urbach et al., 2006).

### **1.3 Geni neuroprotettivi**

Tra i geni neuroprotettivi maggiormente studiati vi sono: NF-κB, CREB, HIF1α (*Hypoxia inducible factor 1α*), c-FOS, BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*), iNOS (*inducible oxide nitric synthase*).

I primi geni ad essere attivati dopo *Preconditioning* indotto da CSD sono i fattori trascrizionali NFκB, c-Fos e CREB. Questi geni codificando per fattori trascrizionali coinvolti in numerosi processi di regolazione, vanno a stimolare quella che si può definire come risposta primaria all'insulto.

### **NF- $\kappa$ B**

Il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B è una proteina eterodimerica composta da due subunità: una di 50-kDa ed una di 65 kDa; esso risiede nel citosol nel suo stato inattivo, complessato con la proteina inibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ . Dopo l'attivazione, I $\kappa$ B $\alpha$  va incontro a fosforilazione e degradazione, liberando così l'eterodimero p50/p65 che trasloca nel nucleo dove innesca la trascrizione di vari geni. E' stato ipotizzato che in seguito ad azione dell'agente nocivo staurosporina, in cellule ippocampali indotte al *Preconditioning*, si abbia una rapida attivazione di NF- $\kappa$ B che porta a sua volta all'aumento dell'enzima antiossidante superossidodismutasi 2 (SOD2) riducendo l'accumulo intracellulare di ROS (specie reattive dell'ossigeno) (Ravati et al., 2001).

### **c-Fos e CREB**

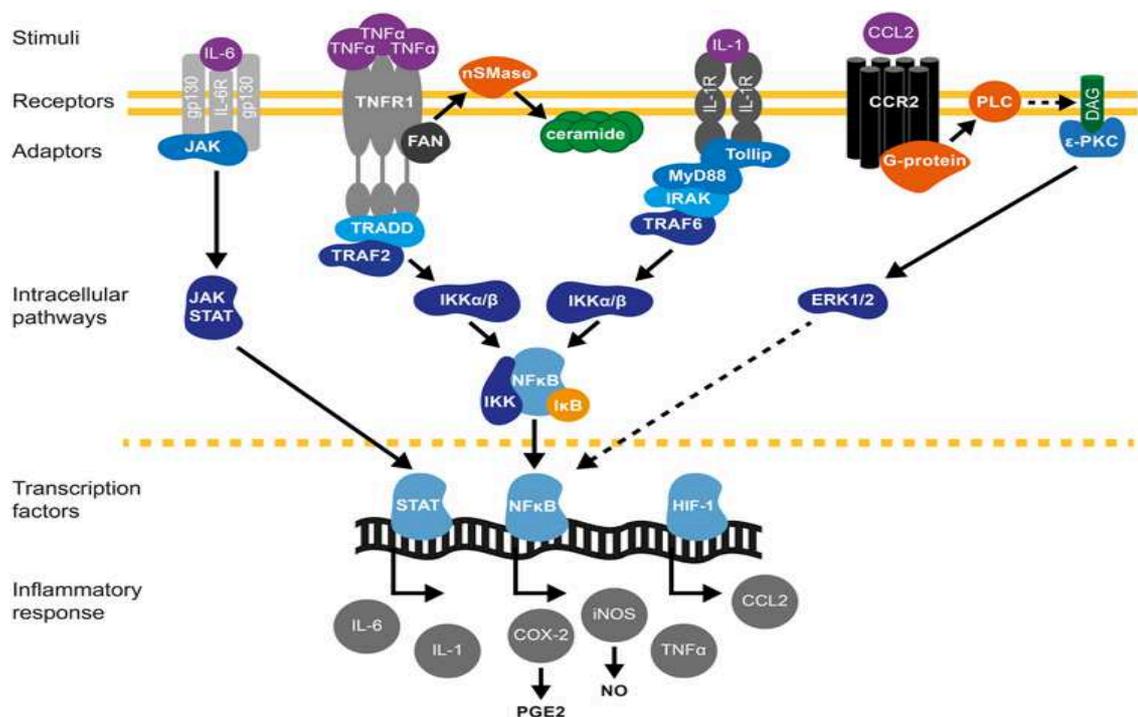
c-Fos e CREB sono stati tra i primi fattori trascrizionali riconosciuti fare parte dei *pathways* collegati alla risposta al fenomeno del *Preconditioning*.

c-Fos è un proto-oncogene che codifica per una proteina di 62 kDa, che dimerizza con il fattore c-jun formando il complesso AP-1. Tale complesso lega il DNA a livello di specifici siti promuovendo l'attivazione genica.

Il fattore trascrizionale CREB, che nella sua forma attivata è fosforilato, si lega a specifiche sequenze di DNA chiamate CRE (cAMP response element) e li aspetta il suo coattivatore CBP (CREB binding proteins). Il

complesso attivo, formato da pCREB/CBP, inizia così la trascrizione di numerosi geni a valle.

Per entrambi questi geni è stato dimostrato che dopo l'applicazione dell'agente preconditionante il livello del loro trascritto aumenta in maniera significativa (Herdegen et al. 1993; Herrera et al., 1990). In particolare, c-Fos sembra avere un profilo di espressione molto precoce, infatti il suo livello di espressione aumenta in maniera significativa già dopo pochi minuti dall'applicazione dell'agente preconditionate e permane in questa condizione per circa due ore (Karikò et al., 1998).



[Garcia-Bonilla et al., 2014]

Figura 4. Schematizzazione di alcuni tra i possibili pathways di risposta al Preconditioning

### *iNOS e HIF1 $\alpha$*

L'ossido nitrico, che a livelli fisiologici è coinvolto nella trasmissione neuronale e, in condizioni di stress, nella tossicità collegata ad ischemia cerebrale, è prodotto da tre isoforme di ossido nitrico sintetasi (NOS): la forma costitutiva (nNOS), quella inducibile (iNOS) ed infine quella endoteliale (eNOS). In particolare, il gene iNOS viene espresso nel sistema nervoso centrale in risposta ad ischemie, traumi, infezioni, autoimmunità, o in seguito ad eventi periferici come un'inflammatione dovuta alla presenza di interleuchina-1 (IL-1) o del lipopolisaccaride (LPS). Esso può essere attivato da vari fattori di trascrizione, come NF-kB e HIF-1.

HIF-1 è un fattore trascrizionale indotto dall'ipossia che comprende due sub-unità: la sub-unità HIF-1 $\alpha$  e la subunità HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\alpha$  è legata all'ubiquitina ed è soggetta a degradazione da parte del proteosoma, ma in condizioni di ipossia si assiste ad un decremento dell'ubiquitinazione, e le due subunità dimerizzano (Huang et al., 1998). L'eterodimero si lega al DNA ed induce la trascrizione di molti geni, tra cui il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), iNOS, la lattato deidrogenasi-A (LDH-A) e l'eritropoietina.

Anche HIF1 $\alpha$  ed iNOS si attivano precocemente dopo induzione della CSD. HIF1 $\alpha$  presenta un picco di espressione a 6 ore dall'induzione della CSD, per poi tornare a livelli di espressione basale 24 ore dopo (Viggiano et al., 2008). iNOS invece sembra aumentare il suo livello di espressione

già a 15 minuti dall'induzione della CSD, mantenendosi costante fino a 4 ore, per poi tornare ad un livello di espressione basale a 24 ore (Viggiano et al., 2008). Questi dati dimostrano l'attivazione di entrambi i geni in seguito a CSD, ed inoltre che iNOS potrebbe anche essere soggetto ad un meccanismo di regolazione HIF1 $\alpha$  indipendente (Viggiano et al., 2008).

Il ruolo neuroprotettivo di HIF1 $\alpha$  riguarda il mantenimento dell'omeostasi dell'ossigeno in condizioni di ipossia; uno dei meccanismi con cui tale gene favorirebbe la neuroprotezione coinvolgerebbe infatti la trascrizione del gene EPO, promuovendo l'accumulo di ossigeno a livello degli eritrociti (Sharp et al., 2004; Manalo et al., 2005).

Per quanto riguarda iNOS invece, è stato proposto un suo ruolo neuroprotettivo nell'iniziare una via di segnalazione che ha come risultato un aumento della resistenza mitocondriale agli ioni Ca<sup>+</sup>, strettamente legati al fenomeno del *Preconditioning* indotto da CSD (Cho et al., 2005).

### **BDNF**

Il gene BDNF, che fa parte della famiglia delle neurotrofine, è strettamente collegato alla maturazione, al differenziamento ed alla sopravvivenza del sistema nervoso centrale.

Nell'uomo, il suo locus genico è formato da sette esoni non codificanti e da un unico esone codificante che danno vita a 17 isoforme di splicing; ogni esone è preceduto da un promotore specifico (Pruunsild et al., 2007). Da

tutti questi trascritti viene prodotta un'unica variante proteica (Greenberg et al., 2009).

La proteina BDNF può ritrovarsi sia come precursore immaturo, pro-BDNF di circa 32 kDa, che come proteina matura di circa 14 kDa.

Se non tagliata, pro-BDNF lega ad alta selettività il recettore p75 inducendo così l'attivazione di vie di segnalazione pro-apoptotiche (Teng et al., 2005); BDNF maturo invece lega con maggior affinità il recettore TRkB. Questo complesso viene internalizzato e trasferito al nucleo dove attiva una serie di geni anti-apoptotici a valle insieme al fattore Erk1/2 (Massa et al., 2010). Ratti depleti per il gene BDNF, in seguito a *Preconditioning* con CSD, non mostrano un aumento della sopravvivenza rispetto a ratti controllo (Yanamoto et al., 2004). E' stato inoltre suggerito un ruolo per il trascritto antisenso di BDNF nella sua regolazione durante il fenomeno della CSD (Lipovich et al., 2012).

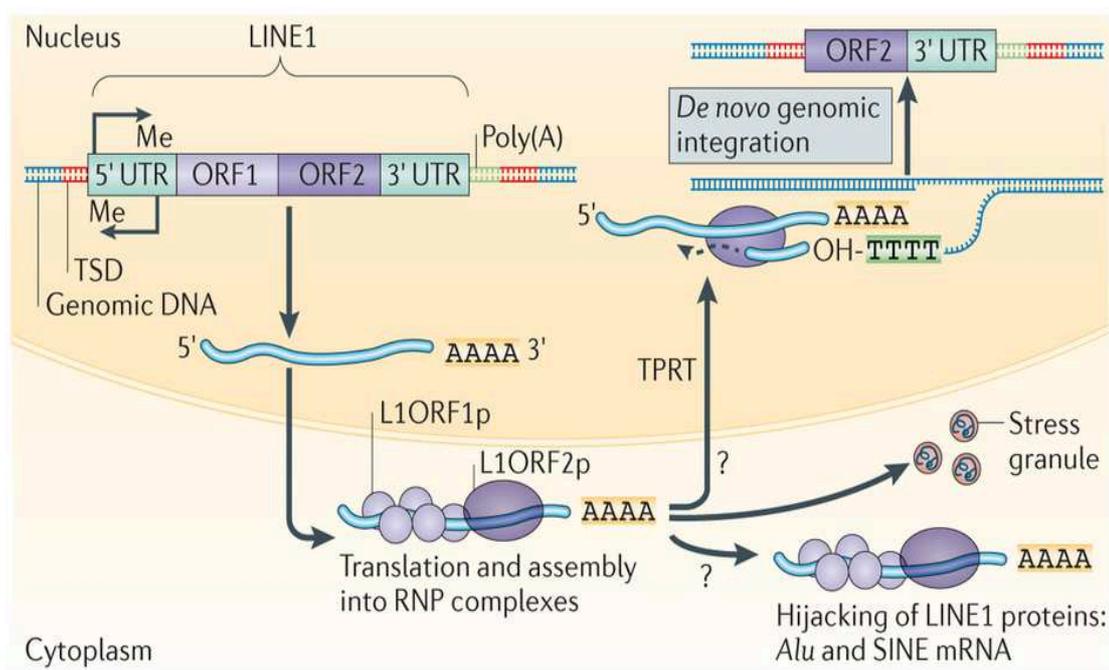
#### **1.4 Long Interspersed Nuclear Elements (LINEs)**

Rana et al. (2012) hanno proposto che il *Preconditioning* potesse modificare lo stato di dimetilazione dell'istone H3K4 e H3K9 a livello di lunghe sequenze ripetute ed intersperse all'interno del genoma (LINEs), producendo cambiamenti epigenetici di lunga durata di tali sequenze, in modo tale da prevenire la loro mobilizzazione. La mobilità delle LINEs, particolarmente presenti all'interno del genoma eucariotico, è infatti

coinvolta nella destabilizzazione del genoma. Il silenziamento di queste sequenze, regolato dal *Preconditioning* indotto da CSD, può quindi essere visto come un meccanismo molecolare di neuroprotezione (Rana et al., 2012).

Circa il 50% del genoma umano è formato da sequenze retrotrasponibili. Di questa famiglia fanno parte i trasposoni a DNA, i trasposoni LTR e i retrotrasposoni non-LTR. Le sequenze ripetute LINEs fanno parte della famiglia dei retrotrasposoni non-LTR e rappresentano una delle classi di sequenze retrotrasponibili più abbondanti all'interno del genoma di mammifero. In media il genoma umano sembra contenere circa il 17% di tali sequenze, mentre il genoma murino ne conterrebbe circa il 19%. Il genoma con la più alta percentuale di sequenze retrotrasponibili non-LTR è quello del ratto che ne contiene circa il 23%. Una sequenza LINE completa consta di circa 6000 coppie di basi ripartite in una 5' UTR, due *open reading frames* ed una 3' UTR (Beck et al., 2010). Le due *open reading frames* codificano rispettivamente per una proteina chiamata ORF1p, che lega sequenze di RNA, ed un'altra proteina definita ORF2p, con funzione sia di trascrittasi inversa che di endonucleasi. Queste due proteine cooperano per permettere la mobilizzazione di queste sequenze con un meccanismo definito "*copy and paste*", in cui viene sintetizzata una copia del retrotrasposone che poi va ad inserirsi in una nuova regione del genoma riconoscendo specifici siti bersaglio. Solo una ristretta parte di sequenze

retrotrasponibili possiede però ancora la capacità di spostarsi nel genoma; molte LINEs infatti hanno perduto tale capacità o perchè non più integre al 5', o per la presenza di mutazioni puntiformi che cadono nella ORF causando perdita di funzione delle proteine ORF1p ed ORF2p (Beck et al., 2010).



Nature Reviews | Neuroscience

[Erwin et al., 2014]

Figura 3. Meccanismo di trasposizione dei retrotrasposoni LINEs

La diversità generata dal meccanismo “*copy and paste*”, con cui le LINEs si muovono all’interno del genoma, insieme alla pressione selettiva hanno portato nel corso dell’evoluzione alla formazione di numerose sottofamiglie di sequenze LINEs, come per esempio la sottofamiglia di sequenze L1 (Smit et al., 1995).

Lo spostamento improprio delle LINEs può portare ad una serie di alterazioni, tra cui: riarrangamenti cromosomici a lungo raggio, disregolazioni di sequenze geniche se il sito di inserzione si trova in regioni codificanti, ed infine, a splicing non corretti o ad una prematura poliadenilazione se le inserzioni cadono a livello di regioni introniche.

Uno dei meccanismi più importanti sottesi alla repressione della mobilizzazione delle sequenze LINEs è la metilazione del DNA: sequenze retrotrasponibili silenziate si presentano, a livello delle loro sequenze di regolazione al 5', ipermetilate (Walsh et al., 1998).

Nei mammiferi, i retrotrasposoni sono particolarmente attivi nella linea germinale e negli stadi precoci dell'embriogenesi mentre subiscono una forte repressione nei tessuti somatici pienamente differenziati (Branciforte and Martin, 1994; Zamudio and Burc'his, 2010).

Durante la spermatogenesi, il pattern di metilazione del DNA subisce modificazioni dinamiche: viene perso durante le prime fasi del processo di spermatogonia, favorendo così la mobilizzazione di numerose classi di retrotrasposoni tra i quali spiccano le LINEs e i retrotrasposoni LTR IAP, per poi essere riacquisito grazie all'azione delle DNA metiltraferasi *de novo*, DNMT3A a DNMT3B, particolarmente attive durante i primi stadi dello sviluppo embrionale, e della DNMT3L (Kato et al., 2007).

Recenti studi hanno inoltre messo in evidenza una possibile regolazione del livello di metilazione del DNA di sequenze retrotrasponibili da parte di

piRNA; la mancanza dei piRNA MIWI2 e MILI in cellule della linea germinale maschile porta infatti ad un alterato stato di metilazione del DNA sia di sequenze LINEs che di retrotrasposoni IAP (Kuramochi-Miyagawa et al. 2008).

E' stato recentemente scoperto che la metilazione dell'istone H3 sulla lisina 9 abbia la capacità di coadiuvare l'azione della metilazione del DNA nella repressione delle sequenze retrotrasponibili (Pezic et al., 2014). In cellule germinali murine, infatti, le sequenze LINEs sono mantenute represses dalla presenza della trimetilazione dell'istone H3 sulla lisina 9, noto marcatore di repressione genica; la trimetilazione in H3K9 sembra marcare specificamente solo le sequenze LINEs complete, ossia quelle ancora dotate di un promotore interno funzionale nella regione 5'. Questo meccanismo sembra essere mediato dalla presenza massiva in queste cellule del piRNA *MIWI2* (Pezic et al., 2014).

Nei tessuti adulti, la ri-mobilizzazione di tali sequenze può portare all'insorgenza di numerose patologie; una delle patologie maggiormente studiate legata alla mobilità delle sequenze retrotrasponibili in tessuti adulti è il cancro (Iskow et al., 2010; Solyom et al., 2012; Shukla et al., 2013). La grande maggioranza dei tumori analizzati mostra una deregolazione del pattern di metilazione del DNA, precisamente una ipometilazione a livello del promotore (Levin and Moran, 2011).

Evidenze sperimentali hanno indicato un possibile ruolo per i retrotrasposoni durante la neurogenesi nel contribuire all'acquisizione di una diversità genomica individuale (Singer et al., 2010).

Nei neuroni adulti invece le capacità di queste sequenze di trasporre deve essere tenuta sotto controllo. Come nella linea germinale, anche nei tessuti adulti le sequenze LINEs sono di norma trascrizionalmente represses grazie alla metilazione del DNA. E' stata dimostrata infatti una stretta associazione fra la metil-CpG-binding protein 2 e il promotore della sequenza L1, che avrebbe come effetto la repressione di tali sequenze (Muotri et al., 2010; Yu et al., 2001). Quando la possibilità di muoversi all'interno del genoma di queste sequenze non è tenuta sotto controllo possono insorgere numerose patologie neurologiche quali la schizofrenia o l'ischemia (Wang and Kelly 2013; Bundo et al., 2014).

## *Scopo del lavoro*

Scopo principale del mio lavoro di dottorato, svolto nel laboratorio della Prof.ssa Fucci, è stato l'analisi delle possibili modifiche epigenetiche che potrebbero essere alla base del fenomeno del *Preconditioning* dopo induzione della *Cortical Spreading Depression* (CSD).

Per effettuare tali studi sono stati utilizzati due sistemi: il primo *in vivo*, costituito da ratti trattati e sacrificati a diversi tempi dall'induzione per la CSD; il secondo *in vitro*, dove è stata utilizzata una linea cellulare tumorale umana indotta al differenziamento, come sistema modello per lo studio del *Preconditioning*.

Il gruppo della Prof.ssa Fucci aveva già ottenuto indicazioni di alterazioni globali della cromatina in cervelli di ratto sacrificati dopo 24 ore dall'induzione della CSD (Passaro et al., 2010). Infatti, esperimenti di Western blotting avevano dimostrato un'alterazione dei livelli globali di metilazione istonica, sia in H3K4 che in H3K9, in emisferi cerebrali di ratto sottoposti a trattamento per la CSD rispetto ad emisferi controllo. In particolare, negli emisferi trattati è stata riscontrata una significativa diminuzione dei livelli di mono- e di-metilazione in H3K4 e un significativo aumento di di-metilazione in H3K9. Tali dati suggeriscono una tendenza della cromatina a formare strutture meno accessibili agli apparati trascrizionali. La prima ipotesi formulata è stata quella di un possibile legame tra le alterazioni globali della metilazione istonica indotte da CSD e lo stato di sequenze molto ripetute all'interno del genoma. Per

validare tale ipotesi sono stati effettuati esperimenti di ChIP su due diverse sequenze ripetute retrotrasponibili, nello specifico LINE1 e LINE3 (Rana et al., 2012). Come atteso, è stata riscontrata una diminuzione della di-metilazione in H3K4 ed un aumento di di-metilazione in H3K9 in corrispondenza delle sequenze ripetute negli emisferi cerebrali a 24 ore dall'induzione della CSD. Questi risultati suggeriscono che, inibendo la trascrizione e quindi la mobilità delle sequenze retrotrasponibili, si registri un aumento della stabilità genomica durante il processo di *Preconditioning*. Per verificare tale ipotesi nel mio lavoro di tesi si è andati ad analizzare i livelli di espressione, attraverso qPCR, di due sequenze retrotrasponibili molto abbondanti nel genoma, le sequenze LINE1 e L1. L'esperimento è stato condotto su campioni prelevati a 15 minuti, 6 ore e 24 ore dall'induzione della CSD.

E' ben noto che la metilazione del DNA mostra una correlazione inversa con la metilazione in H3K4 e una correlazione positiva con quella in H3K9, per cui nel lavoro di tesi sono stati valutati anche i livelli di metilazione del DNA a carico di queste due sequenze ripetute retrotrasponibili, in cervelli di ratto 24 ore dopo il trattamento per la CSD. Poiché la metilazione del DNA dipende dall'attività delle DNA metiltransferasi, si è deciso di analizzare anche i livelli di espressione di questi enzimi e specificamente di DNMT1, DNMT3a e DNMT3b

attraverso esperimenti di qPCR. Gli esperimenti sono stati condotti su campioni prelevati a 15 minuti, 6 ore e 24 ore dall'induzione della CSD.

Precedentemente erano stati condotti esperimenti sul livello di metilazione istonica in H3K4 e H3K9, anche a livello di due specifici geni definiti neuroprotettivi, *Hif1 $\alpha$*  e *iNos* (Rana et al., 2012). Per entrambi i geni, gli esperimenti di ChIP, condotti a livello della CDS e della 3'UTR, mostravano un aumento del livello di di-metilazione in H3K4 ed una diminuzione del livello di di-metilazione in H3K9, indicando per questi due loci un'apertura cromatinica a seguito dell'induzione per la CSD. Nel lavoro di tesi si è quindi andati a valutare il livello di metilazione del DNA anche per questi due geni in cervelli di ratto sacrificati dopo 24 ore dall'induzione per la CSD, a livello del promotore e non delle sequenze trascritte studiate in precedenza.

Il mio lavoro di dottorato ha inoltre previsto la messa a punto di un sistema cellulare *in vitro* per lo studio del *Preconditioning*. L'utilizzo di linee cellulari immortalizzate ci permette di lavorare su linee cellulari pure e di poter usufruire di una maggiore quantità di campione biologico di partenza. A tale scopo sono state utilizzate cellule di neuroblastoma umano, SHSY5Y, indotte a differenziare tramite l'utilizzo di uno specifico morfogeno, l'acido retinoico. Dopo aver messo a punto il protocollo di differenziamento cellulare, sono stati effettuati saggi di vitalità per valutare l'effetto del *Preconditioning* in seguito a danno molecolare. Infine, si è

andati ad analizzare in questo sistema, attraverso qPCR, il livello di espressione di specifici geni neuro protettivi: HIF1 $\alpha$ , BDNF, BDNF-AS e c-Fos. Tutti i geni sono stati analizzati a diversi tempi sia dal trattamento con l'agente preconditionante che dall'esposizione al danno.

## *Materiali e Metodi*

Per le tecniche di base di biologia molecolare si fa riferimento ai protocolli descritti dal manuale “Molecular Cloning: a laboratory manual” (Sambrook et al, 2012)

### 3.1 TRATTAMENTO PER L’INDUZIONE DELLA *Cortical Spreading Depression* (CSD)

Gli acidi nucleici (DNA e RNA) utilizzati nella fase sperimentale derivano da cortecce cerebrali di ratto sottoposte al trattamento per l’induzione della *Cortical Spreading Depression* (CSD). Tale trattamento è stato eseguito presso il laboratorio del prof. B. De Luca della Seconda Università degli studi di Napoli. Dopo la rimozione della dura madre, un filtro di carta imbevuto di KCl 1M viene posizionato per 15 minuti sull’emisfero destro del cervello per indurre l’onda di depolarizzazione neuronale associata alla *Spreading Depression*. Sull’altra corteccia, che funge da controllo, il filtro utilizzato è imbevuto con soluzione fisiologica di NaCl 0,9%. Dopo 15 minuti, 6 ore e 24 ore si procede al prelievo degli emisferi.

### 3.2 ESTRAZIONE E SONICAZIONE DEL DNA GENOMICO

200 mg di ogni corteccia cerebrale di ratto sono stati omogeneizzati usando 1,5 volumi di tampone di lisi (20 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM EDTA pH 8, 1% SDS) e trattati due volte con proteinasi K (Promega). L’enzima è stato dapprima aggiunto alla concentrazione finale di 0,24

mg/mL e lasciato ad incubare per 1 ora a 37°C, ed in seguito alla concentrazione finale di 0,12 mg/mL per tutta la notte a 37°C. Per la purificazione del DNA è stata effettuata un'estrazione con fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1); in seguito il DNA è stato precipitato con 0,1 volumi di Sodio Acetato 3M pH 7 e 2,5 volumi di etanolo al 96% per 1 ora a -20°C. Dopo centrifugazione (15.000 g per 20 minuti a 4°C), il pellet di DNA è stato dapprima lavato con etanolo al 70% e poi è stato risospeso in 100 µL di tampone TE 1X (10 mM Tris, 1 mM EDTA). 100 µg di DNA sono stati incubati con 30 µg/mL di RNasi DNasi-Free (Roche) per 2 ore a 37 °C. L'RNasi è stata rimossa eseguendo su ogni campione una purificazione con fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1). 50 µg di DNA sono stati sonicati (sonicatore ad ultrasuoni XL, Misonix), con un una potenza del 10% per circa un minuto totale, al fine di generare frammenti di circa 300-900 coppie di basi, come è stato poi controllato mediante elettroforesi su gel di agarosio. Il DNA frammentato è stato precipitato per 1 ora a -80 °C in presenza di 20 mg/mL di glicogeno, NaCl 400 mM e 3 volumi di etanolo al 100%; dopo centrifugazione a 20.000 g per 15 minuti a 4°C, il pellet è stato lavato con una soluzione di etanolo al 70% e poi risospeso in 100 µL di tampone TE 1X. Il DNA risospeso in TE 1X è stato quantificato mediante utilizzo dello spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

### 3.3 IMMUNOPRECIPITAZIONE DI DNA METILATO (meDIP) e qPCR

4 µg di DNA sonicato della corteccia trattata e controllo sono stati prima denaturati per 10 minuti a 95°C, posti in ghiaccio per ulteriori 10 minuti, ed infine immunoprecipitati per tutta la notte a 4°C con 10 µg di anticorpo monoclonale contro la 5-metilcitosina (Eurogentec) in un volume finale di 500 µL di tampone IP (10 mM sodio-fosfato pH 7; 140 mM NaCl, 0,05% Triton X-100). Altri 4 µg di DNA sonicato sono stati invece soltanto sottoposti a denaturazione termica e poi utilizzati come DNA INPUT. Gli immunocomplessi formati da DNA e anticorpo sono stati recuperati utilizzando la resina Proteina A sepharose (GE Healthcare). In particolare, 100 mg di resina sono stati reidratati in H<sub>2</sub>O per 30 minuti a 4°C ed in seguito equilibrati con PBS 1X (2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); 100 µL di resina sono stati saturati con una soluzione di PBS 1X – BSA 0,1% per 1 ora a 4°C, sotto agitazione. Dopo centrifugazione (1.000 rpm per 5 minuti a 4°C), la resina è stata risospesa in tampone IP. 40 µL di resina sono stati infine incubati con la miscela di DNA - anticorpo per 2 ore a 4°C sotto blanda agitazione. Dopo centrifugazione (5.000 rpm per 5 minuti a 4°C) il risultante pellet è stato lavato con tampone IP a 4°C; si è poi passati all'eluizione del DNA dalla resina aggiungendo 250 µL di tampone di

eluizione (1% SDS; 0,1 M NaCO<sub>3</sub>), per 20 minuti e poi centrifugando per 5 minuti a 3.000 rpm in centrifuga Eppendorf. In seguito il DNA è stato incubato con 70 µg di Proteinasi K in 25 µL di tampone PK (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA pH 8) per 3 ore a 55° C, estratto con fenolo:cloroformio:alcool isoamilico (25:24:1), e precipitato per tutta la notte a -20° C in presenza di 20 mg/ml di glicogeno, NaCl 400 mM e tre volumi di etanolo 100%. La miscela è stata centrifugata a 4° C ed il pellet è stato lavato con una soluzione di etanolo al 70%; infine il pellet di DNA è stato risospeso in H<sub>2</sub>O e quantificato al NanoDrop. Per analizzare i risultati derivanti dagli esperimenti di meDIP, sono state effettuate Real-Time PCR in duplicato tecnico utilizzando la metodica del SYBR Green in un sistema Real-Time PCR 7500 HT dell'Applied Biosystems. La miscela di reazione conteneva SYBR Green PCR Master Mix 1x (Applied Biosystems), 2 ng di DNA stampo per ogni gene analizzato e 4 pmol/µl di *primer forward e reverse* in un volume finale di 25 µl. I parametri termici sono stati i seguenti: 10 minuti a 95° C seguiti da 40 cicli di 95° C per 15 secondi e 60° C per 1 minuto. E' stato inoltre eseguito un ulteriore ciclo, definito ciclo di dissociazione, per determinare la specificità di ogni amplicone analizzato. Il *Fold increase* è stato calcolato utilizzando la seguente formula :

$$[E_{(\text{reference})}^{\text{Ct (IP)}} / E_{(\text{target})}^{\text{Ct (IP)}}]$$

---

$$[E_{(\text{reference})}^{\text{Ct (INPUT)}} / E_{(\text{target})}^{\text{Ct (INPUT)}}].$$

L'efficienza (E) dei *primers* è stata valutata per ogni reazione tramite l'algoritmo del *software* Miner (Zhao and Fernald, 2005). È stata utilizzata una regione non metilata del cromosoma 13 (CHR 13) come sequenza di riferimento (reference). Le sequenze dei *primers* utilizzati sono riportate nella tabella A.

### 3.4 ESTRAZIONE DI RNA, RETROTRASCRIZIONE E qPCR

L'estrazione di RNA totale da corteccia cerebrale di ratto è stata effettuata utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen) come da protocollo della casa produttrice. La concentrazione dell'RNA estratto viene determinata con l'ausilio dello spettrofotometro NanoDrop 1000. L'esattezza di tale concentrazione e l'integrità dell'RNA è verificata mediante elettroforesi dell'RNA su gel di agarosio in condizioni denaturanti. Per rimuovere efficacemente possibili contaminazioni di DNA, è stato effettuato un trattamento con DNAsi (DNAsi RNAsi-free, Ambion), utilizzando 2U di enzima per  $\mu\text{g}$  di RNA per 30 minuti a 37°C. L'RNA è stato poi quantificato nuovamente al Nanodrop e la sua integrità controllata tramite elettroforesi su gel di agarosio in condizioni denaturanti. 2  $\mu\text{g}$  di RNA

(per l'analisi dei trascritti delle DNA metiltransferasi) o 1 µg (per l'analisi dei trascritti dei retrotrasposoni) sono stati retrotrascritti in cDNA utilizzando 200 U di trascrittasi inversa SuperScript III (Invitrogen) in un volume finale di 20 µL di reazione. Le amplificazioni mediante qPCR sono state eseguite in duplicato tecnico con SYBR green Master Mix (Applied Biosystems) in un sistema di Real-Time PCR 7500HT (Applied Biosystems). La miscela di reazione per le DNA metiltransferasi conteneva 100 ng di cDNA e 4 pmol/µL di ogni *primer forward e reverse* in un volume finale di 25 µL, mentre per le sequenze retrotrasponibili sono stati utilizzati 50 ng di cDNA in un volume finale di 15 µL. Per tutti gli esperimenti, i parametri termici di amplificazione sono stati i seguenti: 10 minuti a 95° C, seguiti da 40 cicli di 95° C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto. E' stato effettuato inoltre un ciclo di dissociazione per valutare la specificità di ogni amplicone saggiato. I dati sono stati analizzati utilizzando la seguente formula:  $E_{(\text{target gene})}^{-Ct} / E_{(\text{reference gene})}^{-Ct}$ . L'efficienza (E) delle coppie di *primers* di ogni reazione è stata calcolata tramite l'algoritmo del *software* Miner (Zhao and Fernald, 2005). Il gene HPRT1 è stato utilizzato come normalizzatore (reference gene). Il protocollo appena descritto è stato inoltre utilizzato per l'estrazione di RNA totale da cellule di neuroblastoma umano (SHSY5Y). Il profilo di espressione dei geni neuroprotettivi è stato analizzato in cellule SHSY5Y differenziate sia in seguito alla sola induzione del *Preconditioning*, che in seguito a

*Preconditioning* e danno molecolare indotto da perossido di idrogeno. Per ogni punto sperimentale sono state piastrate 120.000 cellule; i vari campioni sono stati prelevati a diversi tempi dall'induzione. 1 µg di RNA totale, estratto utilizzando il protocollo che prevede l'utilizzo del reagente TRIzol precedentemente descritto, è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando 50 U di trascrittasi inversa "MultiScribe" (Applied Biosystems) in un volume finale di 20 µL. I cDNA così ottenuti sono stati analizzati mediante qPCR, attraverso la metodica del SYBR green (Applied Biosystems) in un sistema di Real-Time PCR 7500HT (Applied Biosystems). Per ogni gene analizzato, la miscela di reazione conteneva 50 ng di cDNA e 4 pmol/µL di ogni *primer forward* e *reverse* in un volume finale di 15 µL, solo per il gene BDNF è stata utilizzata 1pmol/µL di ogni *primer forward* e *reverse*. Per tutti gli esperimenti, i parametri termici di amplificazione sono stati i seguenti: 10 minuti a 95° C, seguiti da 40 cicli di 95° C per 15 secondi e 60° C per 1 minuto. È stato effettuato un ciclo di dissociazione per valutare la specificità di ogni amplicone saggiato. I dati sono stati analizzati utilizzando la formula del  $2^{e-\Delta\Delta Ct}$ . Il gene HPRT1 è stato utilizzato come normalizzatore. Le sequenze dei *primers* sono riportate in Tabella A.

### 3.5 ALLESTIMENTO DELLE COLTURE CELLULARI DI NEUROBLASTOMA UMANO (SH-SY5Y) E DIFFERENZIAMENTO.

La linea cellulare di neuroblastoma umano (SHSY5Y) è stata cresciuta in un terreno di coltura *Dulbecco Modified Eagle's Medium* (DMEM) complementato con il 15% di Siero Fetale Bovino (FBS), l'1% di penicillina, l'1% di streptomicina e l'1% di L-Glutamina, in un incubatore sterile ad una temperatura di 37°C ed una concentrazione stabile di CO<sub>2</sub> del 5%. Durante il processo di differenziamento le cellule di neuroblastoma umano sono state mantenute in un terreno di coltura DMEM , complementato con il 2% di Siero Fetale Bovino (FBS), in presenza di antibiotici e glutamina. Per favorire la comparsa di un fenotipo cellulare neuronale maturo, alle cellule è stato inoltre somministrato acido retinoico in concentrazione finale di 10 µM. Il trattamento è stato effettuato per la durata di cinque giorni, e l'acido retinoico è stato sostituito ogni due giorni. Attraverso l'utilizzo di un microscopio ottico sono stati controllati i possibili cambiamenti morfologici avvenuti a carico delle cellule SHSY5Y in seguito al trattamento con acido retinoico.

### 3.6 WESTERN BLOTTING SU CELLULE SHSY5Y DIFFERENZIATE E NON DIFFERENZIATE

Per l'estrazione di proteine istoniche, il pellet cellulare è stato risospeso in un tampone di lisi (Inibitori di proteasi 1X (Roche), PMSF 1,5 mM, Hepes 10 mM, DTT0, 5 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM) a cui viene aggiunto HCl ad una concentrazione finale di 200 mM. Il lisato viene

incubato per 30 minuti in ghiaccio e poi centrifugato a 1.200 rpm per 20 minuti a 4°C (Eppendorf 5415D). Il pellet cellulare utilizzato per l'estrazione di proteine totali è stato invece risospeso in tampone di lisi, RIPA Buffer (Inibitori di proteasi 1X (Roche), o Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton 1%) la soluzione è stata incubata in ghiaccio per 10 minuti, ed in seguito è stata effettuata una centrifugazione a 3.000 g per 10 minuti a 4°C (Eppendorf 5415D). E' stato prelevato il supernatante, contenente le proteine di interesse, ed è stata determinata la concentrazione proteica mediante il kit "Protein Assay" commercializzato dalla BioRad. I campioni proteici estratti sono stati analizzati mediante elettroforesi in condizioni denaturanti su di un gel di poliacrilammide al 10% (6,5 cm X 8,5 cm) [Acrilammide-Bisacrilammide 10% (15: 0,5)], preparato come da manuale (Sambrook et al., 1989). Per i lisati acidi vengono caricati 15 µg di proteine in ogni pozzetto, mentre per gli altri lisati vengono caricati 30 µg di proteine. Al termine della corsa le proteine sono state trasferite su di un filtro di nitrocellulosa (Wathman, 0,22 micron). La procedura di trasferimento su filtro avviene a 100 V costanti a 4°C per 2 ore, in presenza di uno specifico tampone composto da Tris-Glicina 1X (Tris 0,025 M; Glicina pH 8,3 0,192 M) e metanolo 20 % e SDS 0,1%. I siti non specifici presenti sul filtro vengono bloccati con 10 mL di una soluzione di *blocking* per 1 ora, come riportato in Tabella B. Le diluzioni degli

anticorpi primari e secondari utilizzati sono riportate nella Tabella B. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, effettuata per tutta la notte a 4° C in 5 mL di una soluzione di PBS 1X o TBS 1X e Milk (Tabella B), si procede poi all'incubazione, per 1 ora a temperatura ambiente, in un volume di 5 mL con l'anticorpo secondario (Pierce). Si procede infine alla rivelazione del segnale mediante un kit con il substrato della perossidasi di rafano, il luminolo (Perkin Elmer). Il filtro viene ricoperto con le due soluzioni contenute nel kit in un rapporto 1:1. Una delle due soluzioni contiene il luminolo, l'altra invece contiene un agente ossidante. La soluzione viene lasciata interagire per 5 minuti a temperatura ambiente, in modo che avvenga la reazione di chemiluminescenza. Il filtro è posizionato in uno strumento della Biorad in grado di rilevare la chemiluminescenza, il Chemidoc.

### 3.7 ANALISI DI VITALITA' CELLULARE (SAGGIO MTT)

Il saggio di vitalità cellulare MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività degli enzimi che riducono l'MTT a formazano. L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi è attivo soltanto nelle cellule vive. Per effettuare tale saggio, sono state utilizzate 120.000 cellule per punto sperimentale ed ogni punto è stato eseguito in triplicato tecnico. Le cellule sono state prima preconditionate con l'aggiunta al terreno di coltura di KCl 100 mM e poste in incubatore a 37° C per 10 minuti. In

seguito, il terreno con KCl è stato eliminato ed al suo posto è stato reintrodotta del terreno DMEM senza KCl. Dopo otto ore dall'induzione del *Preconditioning*, alle cellule è stato aggiunto perossido di idrogeno. E' stata aggiunta la soluzione contenente MTT ad una concentrazione finale di 0,25 mg/mL circa 24 ore dopo l'induzione del danno. Dopo circa 3 ore, le cellule vengono lisate con isopropanolo-HCl 0,04 M e l'assorbanza viene letta allo spettrofotometro. I valori ottenuti vengono espressi in percentuale, rispetto alle cellule non trattate con il perossido di idrogeno.

### 3.8 ANALISI STATISTICHE

Le analisi statistiche per gli esperimenti di meDIP e per i profili di espressione dei retrotrasposoni e delle DNA metiltrasferasi sono state effettuate con un test T-Student, considerando come valore significativo un p-value inferiore o uguale a 0,05. Lo stesso metodo è stato applicato per i saggi di vitalità cellulare. Le analisi statistiche sui profili di espressione dei geni neuroprotettivi sono state invece effettuate utilizzando il metodo di Willems (Willems, 2008). Secondo questo metodo, la significativà statistica è definita calcolando il 95% dell'intervallo di confidenza per tre esperimenti indipendenti; i livelli di espressione sono prima trasformati in logaritmo e in seguito standardizzati.

TABELLA A

<b>NOME</b>	<b>SEQUENZE 5'→3'</b>	<b>LUNGHEZZA PRODOTTO IN BP</b>
<b>L1_forward</b> <b>L1_reverse</b>	CAGTCTGCAATCCCACCAAC ACAACCCTGAGATTTCCACC	126
<b>LINE1_forward</b> <b>LINE1_reverse</b>	GTGAAGGCTCGATGCCCCAGT CCTTCTCTCCCTGCTTCTATGAG	100
<b>HIF1<math>\alpha</math>Prom_forward</b> <b>HIF1<math>\alpha</math>Prom_reverse</b>	GCTTAGCATCCCCTTGCTC TTCAATGGAAAGCTGCGTCT	60
<b>iNOSProm_forward</b> <b>iNOSProm_reverse</b>	CCCTTTGGGAACAGTGACTT AGCTGTGGCCCTGACAGTAG	88
<b>CHR13_forward</b> <b>CHR13_reverse</b>	GAATCTGGTTTTGGGCCTGG CCACACATGCTTCCACTGAG	103
<b>DNMT3a_forward</b> <b>DNMT3a_reverse</b>	GGTGCAGAACAAGCAGATGA ACCTCATAACGAGCCGTTT	249
<b>DNMT3b_forward</b> <b>DNMT3b_reverse</b>	GTCCGGAAAATCACCAAGAA CCAGAAGAATGGACGGTTGT	201
<b>DNMT1_forward</b> <b>DNMT1_reverse</b>	CCACCACCAAGCTGGTCTAT TACGGCCAAGTTAGGACACC	233
<b>HPRT1_forward</b> <b>HPRT1_reverse</b>	AGCAGTACAGCCCCAAAATG TCAAATCCCTGAAGTGCTCA	155
<b>HPRT1 human_forward</b> <b>HPRT1 human_reverse</b>	CAGACTTTGCTTTCCTTGGTCA TGGTTATATCCAACACTTGT	100
<b>HIF1<math>\alpha</math> human_forward</b> <b>HIF1<math>\alpha</math> human_reverse</b>	ATCCATGTGACCATGAGGAAATG TCGGCTAGTTAGGGTACTTTC	85
<b>c-Fos human_forward</b> <b>c-Fos human_reverse</b>	GCGGAGACAGACCAACTAGA GAGCTGCCAGGATGAACTCT	90
<b>BDNF human_forward</b> <b>BDNF human_reverse</b>	ACACAAAAGAAGGCTGCAGG TGCTATCCATGGTAAGGGCC	96
<b>BDNF-AS human_forward</b> <b>BDNF-AS human_reverse</b>	TGGCTAATCTTACAACAGCACAA TGTACACGTCCAGGGTGATG	100

TABELLA B

<b>ANTICORPO</b>	<b>DILUIZIONE</b>	<b>BLOCKING</b>	<b>SOLUZIONE INCUBAZIONE ANTICORPI</b>
<b>ANTI-NFH (SIGMA)</b>	<b>1:1000</b>	<b>PBS 1X MILK 5%</b>	<b>PBS 1X MILK 1%</b>
<b>ANTI- <math>\alpha</math>-TUBULINA (SIGMA)</b>	<b>1:1000</b>	<b>PBS 1X MILK 5%</b>	<b>PBS 1X MILK 1%</b>
<b>ANTI-CREB (SANTACRUZ)</b>	<b>1:100</b>	<b>PBS 1X MILK 5%</b>	<b>PBS 1X MILK 1%</b>
<b>ANTI-pCREB (SANTACRUZ)</b>	<b>1:1000</b>	<b>PBS 1X MILK 5%</b>	<b>PBS 1X MILK 1%</b>
<b>ANTI-H3K9me2 (UPSTATE)</b>	<b>1:500</b>	<b>TBS 1X MILK 5%</b>	<b>TBS 1X MILK 3%</b>
<b>ANTI-H3K4me2 (UPSTATE)</b>	<b>1:10.000</b>	<b>PBS 1X MILK 3%</b>	<b>PBS 1X MILK 3%</b>
<b>ANTI-H3 TOTALE (ABCAM)</b>	<b>1:1000</b>	<b>PBS 1X MILK 3%</b>	<b>PBS 1X MILK 3%</b>
<b>II° ANTI-RABBIT (SIGMA)</b>	<b>1:5000</b>		<b>*PBS/TBS 1X MILK 1%</b>
<b>II° ANTI-MOUSE (PIERCE)</b>	<b>1:5000</b>		<b>PBS 1X MILK 1%</b>

\* Viene utilizzato PBS o TBS per l'incubazione dell'anticorpo secondario a seconda del tipo di buffer utilizzato durante l'incubazione dell'anticorpo primario

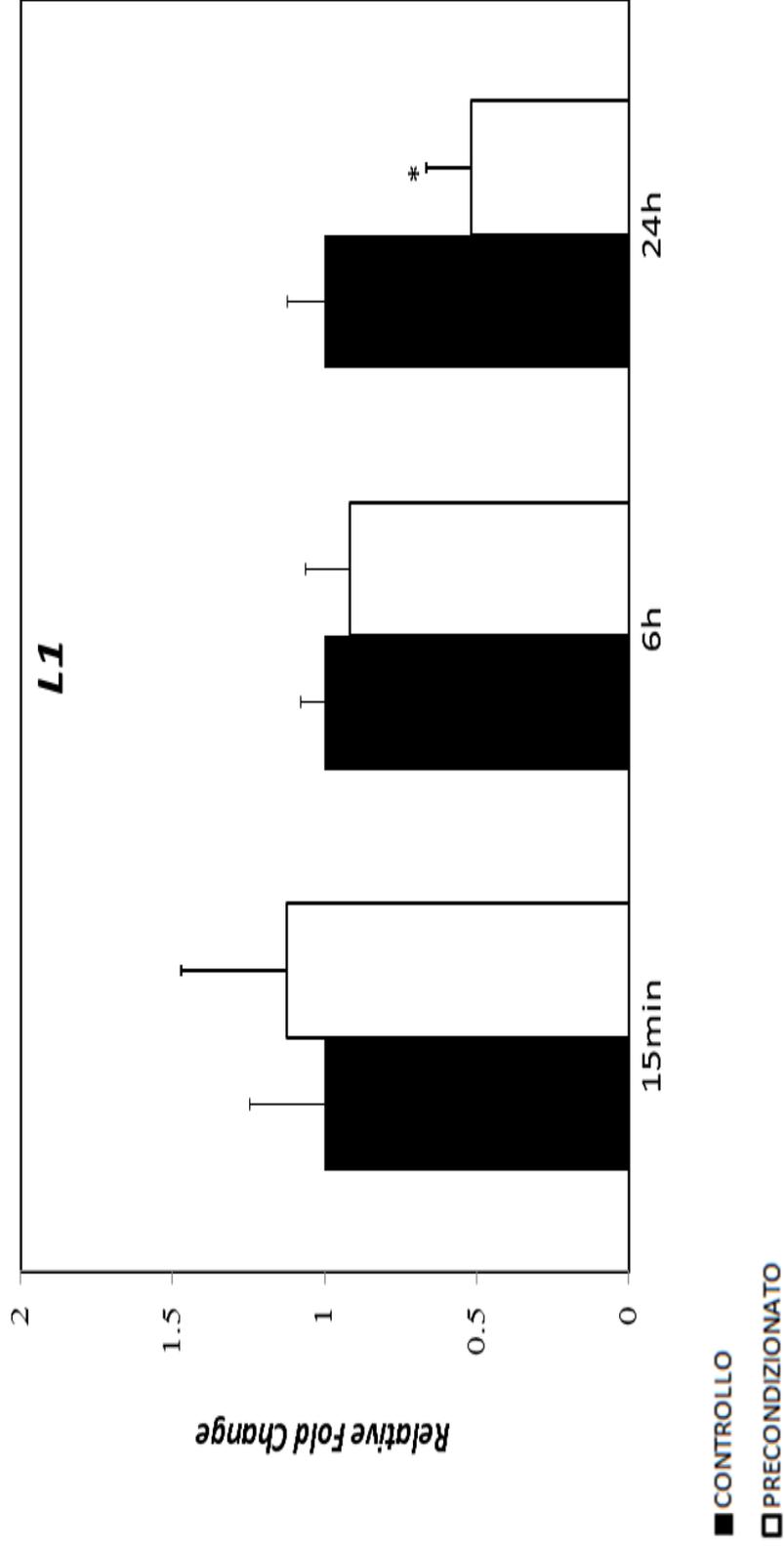
## *Risultati*

#### **4.1 Effetti della CSD sul livello del trascritto e sulla metilazione del DNA di sequenze retrotrasponibili**

Dati ottenuti nel laboratorio della Prof.ssa Fucci avevano mostrato una correlazione tra il fenomeno biologico della CSD e le modifiche istoniche. In particolare, era stato osservato un decremento dei livelli di dimetilazione dell'istone H3 sulla lisina 4 insieme ad un aumento dei livelli di dimetilazione dell'istone H3 sulla lisina 9 a carico di alcune sequenze retrotrasponibili (LINEs), in cervelli di ratto dopo 24 ore dall'induzione della CSD. Questi dati indicavano una possibile chiusura del genoma, suggerendo una tendenza della cromatina a formare strutture meno accessibili agli apparati trascrizionali. E' quindi stato proposto che un possibile meccanismo di neuroprotezione indotto da CSD potesse portare ad un aumento della stabilità genomica in quanto si neutralizzavano i retrotrasposoni (Rana et al., 2012). Per supportare questa ipotesi, si è quindi deciso di analizzare il livello del trascritto di una sottofamiglia di retrotrasposoni, LINE1, su cui già si erano effettuate analisi per le modifiche istoniche; per implementare la validità dell'analisi, sono stati analizzati inoltre retrotrasposoni appartenenti alla sottofamiglia L1. I livelli di trascritti sono stati analizzati attraverso saggi di qPCR; per ogni campione sono stati utilizzati 50 ng di cDNA stampo, retrotrascritti a partire da un microgrammo di RNA. L'esperimento è stato

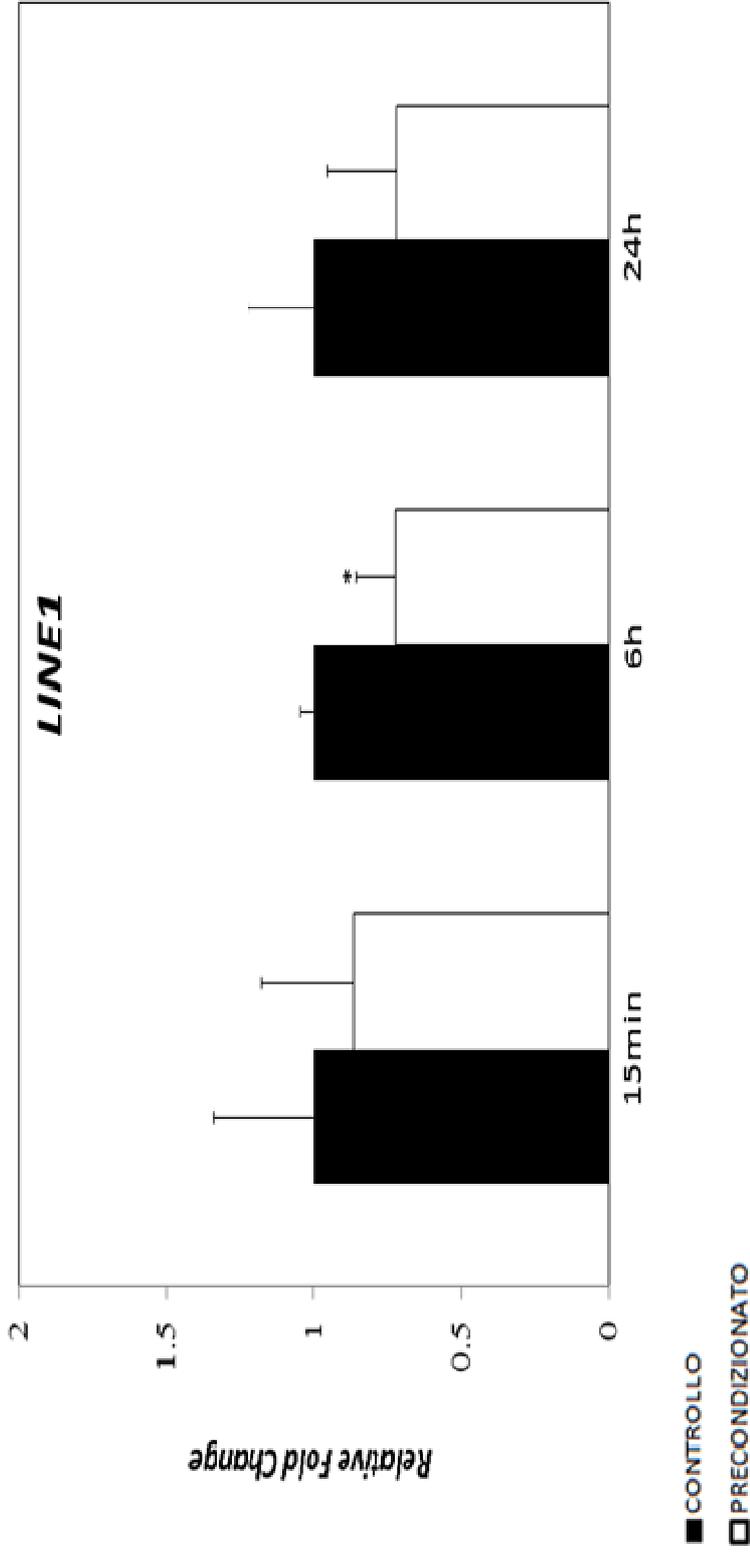
condotto inoltre utilizzando RNA estratto da emisferi cerebrali a diversi tempi dall'induzione della CSD, precisamente ad un tempo precoce (15 minuti), intermedio (6 ore), e più tardivo (24 ore). Nella Figura 1 si può osservare che per la sequenza L1 non ci sono variazioni del trascritto sia a 15 minuti che a 6h, mentre a 24h si osserva un decremento significativo di circa la metà del trascritto nell'emisfero preconditionato rispetto a quello di controllo. Per la sequenza LINE1 (Figura 2) invece non è visibile alcuna variazione a 15 minuti, mentre diventa osservabile una diminuzione significativa del trascritto a 6h nel campione preconditionato rispetto al controllo, che sembra permanere anche a 24h.

Dato che una delle strategie cellulari utilizzate per contrastare la mobilitazione delle sequenze retrotrasponibili coinvolge la metilazione del DNA, si è deciso di saggiare la presenza di possibili variazioni nel livello di metilazione del DNA a carico di queste sequenze ripetute in emisferi cerebrali a 24 ore dall'induzione per la CSD. Le analisi delle variazioni del livello di metilazione del DNA delle sequenze LINEs sono state effettuate attraverso esperimenti di immunoprecipitazione del DNA metilato (meDIP). Per ogni campione 4 µg di DNA genomico frammentato sono stati immunoprecipitati con 10 µg di anticorpo anti-metil-citosina. Due nanogrammi per ogni campione immunoprecipitato sono stati poi analizzati per qPCR. I risultati ottenuti mostrano una ipermetilazione per entrambe le sequenze retrotrasponibili analizzate



**Figura 1**

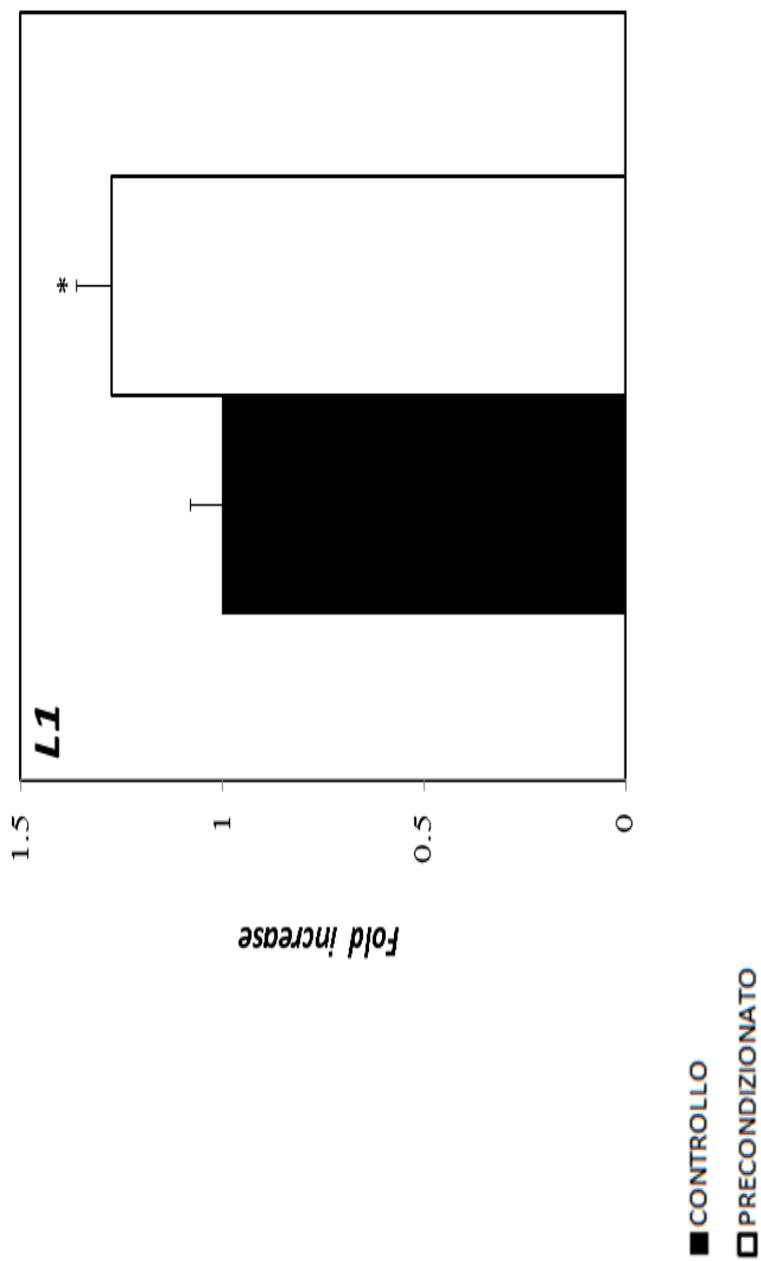
Esperimenti di qPCR per la valutazione del livello del trascritto delle sequenze retrotrasponibili L1 in cervelli di ratto a 15 minuti, 6h, e 24h dopo l'induzione della CSD. L1 mostra una diminuzione significativa della quantità di trascritto a 24h negli emisferi precondizionati.



**Figura 2**

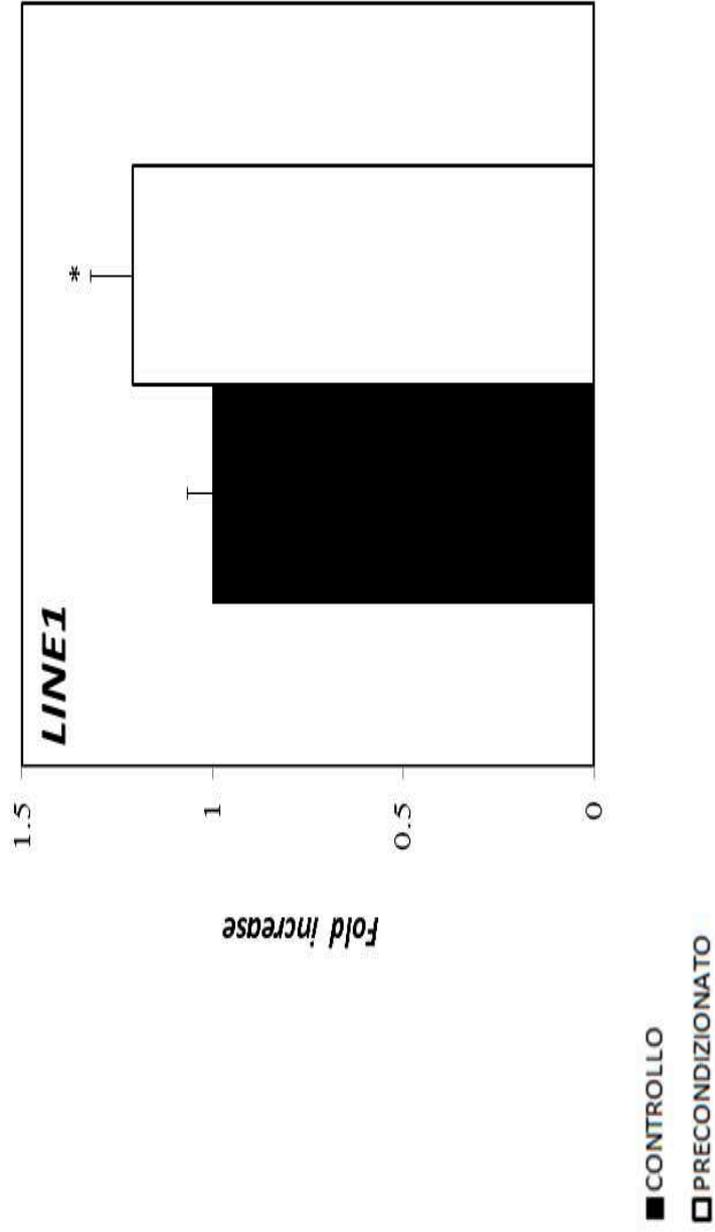
Esperimenti di qPCR per la valutazione del livello del trascritto delle sequenze retrotrasponibili LINE1 in cervelli di ratto a 15 minuti, 6h, e 24h dopo l'induzione della CSD. LINE1 mostra un decremento del livello di trascritto già a 6h, che sembra permanere anche a 24h dopo l'induzione della CSD.

negli emisferi precondizionati, come riportato nelle Figure 3 e 4.



**Figura 3**

Esperimenti di meDIP su DNA estratto da cervelli di ratto preconditionati a 24h dall'induzione della CSD; le analisi sono state condotte a livello delle sequenze retrotrasponibili L1. I livelli di metilazione del DNA di tali sequenze sembrano aumentare negli emisferi preconditionati paragonati al controllo.



**Figura 4**

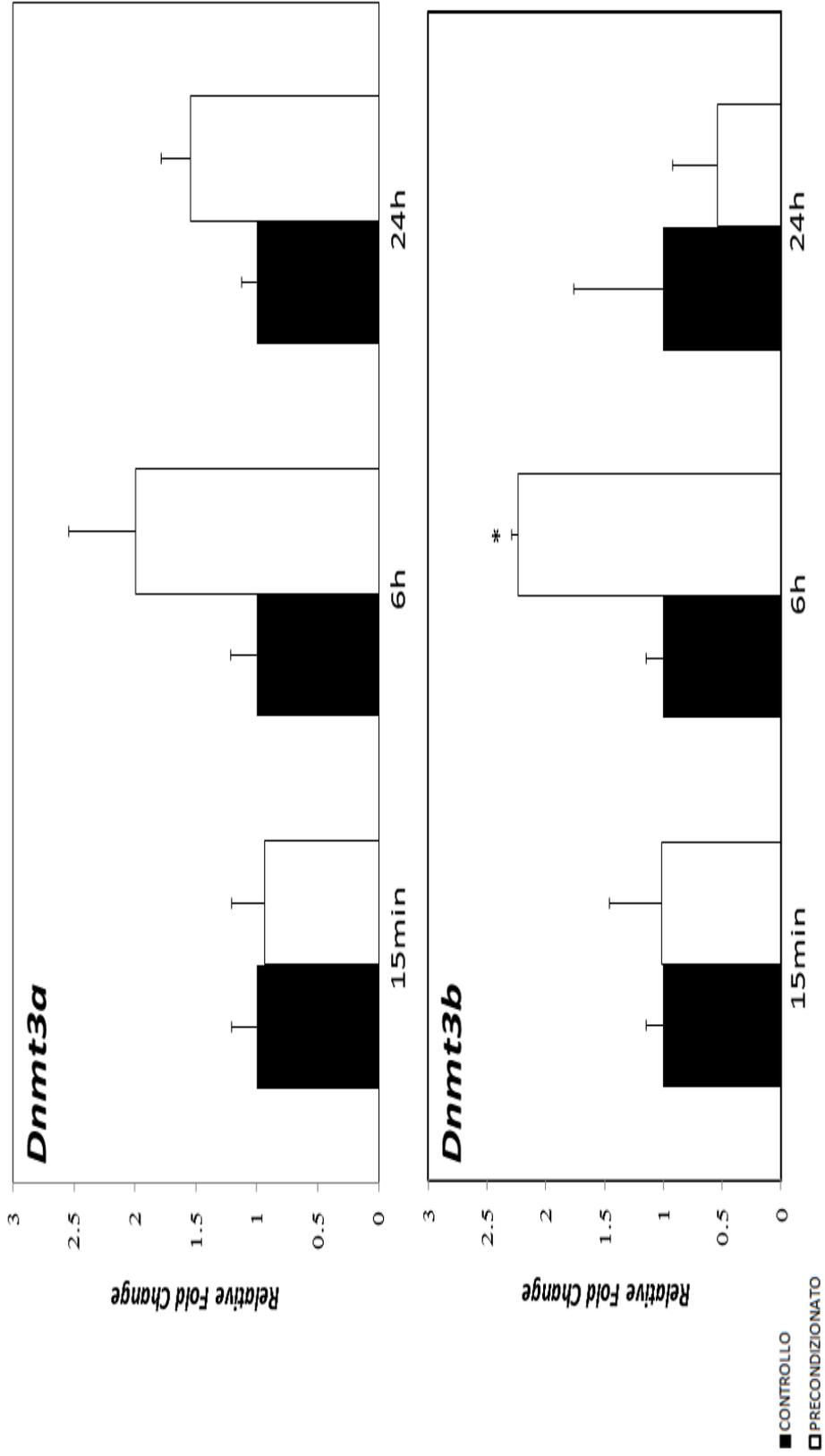
Esperimenti di meDIP su DNA estratto da cervelli di ratto precondizionati a 24h dall'induzione della CSD; le analisi sono state condotte a livello delle sequenze retrotrasponibili LINE1. I livelli di metilazione del DNA di tali sequenze sembrano aumentare negli emisferi precondizionati paragonati al controllo.

## 4.2 Cambiamenti nei livelli di espressione delle DNA metiltrasferasi a tempi diversi dall'induzione della CSD

Poichè il livello di metilazione del DNA è strettamente dipendente dall'attività delle DNA metiltrasferasi (DNMTs), si è andati a valutare attraverso esperimenti di qPCR possibili cambiamenti nel livello di espressione di questi enzimi dopo induzione della CSD. Nello specifico si è analizzata l'espressione delle due DNA metiltrasferasi *de novo* (*Dnmt3a*, *Dnmt3b*) e della DNA metiltrasferasi di mantenimento (*Dnmt1*). Per i saggi di qPCR sono stati utilizzati 100 ng di cDNA stampo, derivanti da due microgrammi di RNA estratto a vari tempi dall'induzione della CSD, precisamente 15 minuti, 6h e 24h dopo l'induzione.

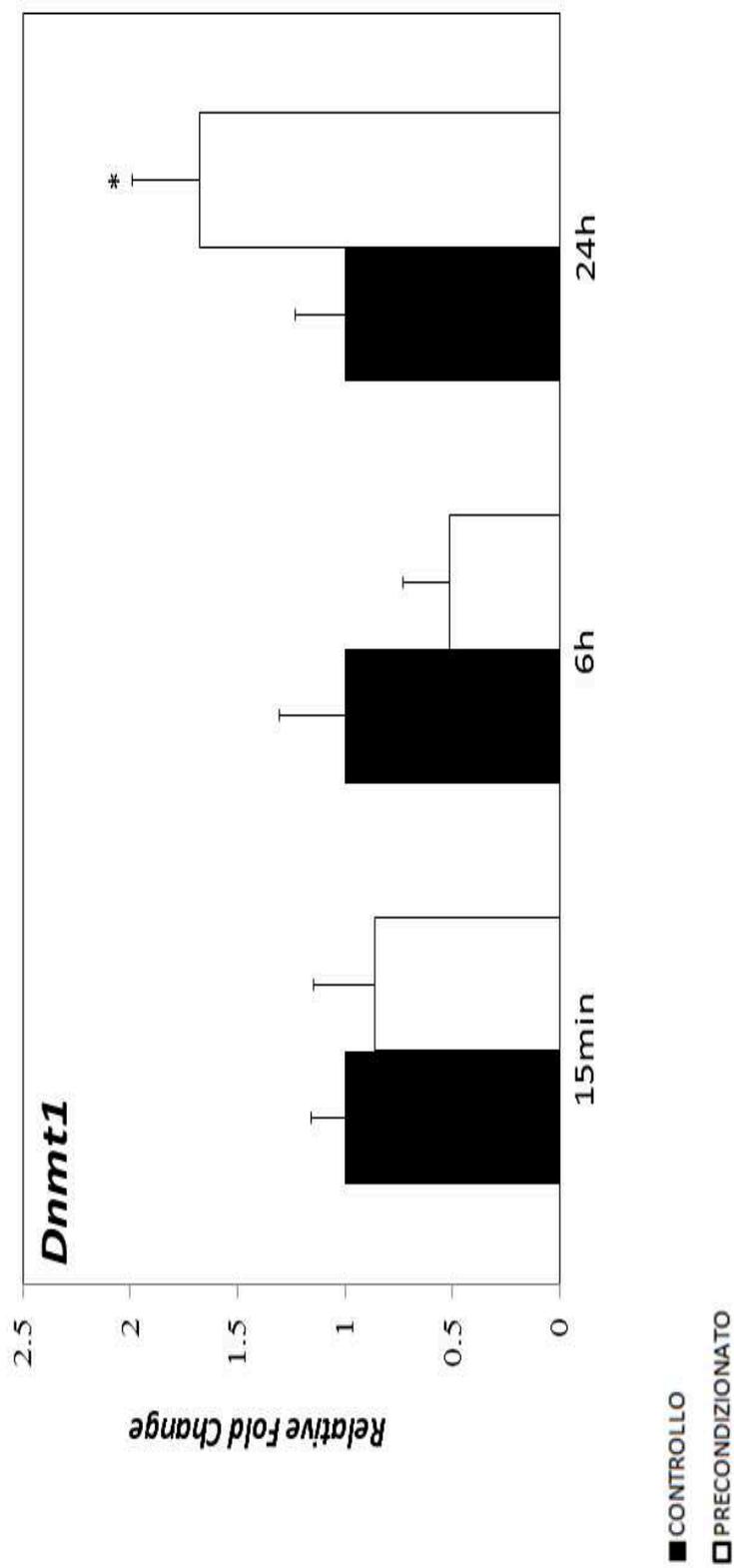
Dai grafici possiamo osservare che a tempi precoci (15 minuti) non si sono registrati significativi cambiamenti nel livello di espressione di tutti e tre i geni studiati (Figura 5-6). A 6h dall'induzione invece, è possibile osservare una variazione significativa del trascritto per la *Dnmt3b*, che si traduce in un aumento della quantità di mRNA nei campioni preconditionati rispetto ai campioni controllo (Figura 5). La *Dnmt3a* invece mostra lo stesso andamento della *Dnmt3b*, anche se non possiamo osservare significatività a nessun tempo analizzato (Figura 5). La *Dnmt1* mostra invece una variazione a 24h dall'induzione della CSD, quando la

quantità di mRNA aumenta in maniera significativa nei campioni preconditionati (Figura 6).



**Figura 5**

Esperimenti di qPCR per la valutazione del livello del trascritto delle DNA metiltrasferasi in cervelli di ratto a 15 minuti, 6h, e 24h dopo l'induzione della CSD. *Dnmt3b* mostra un aumento significativo della quantità di mRNA a 6h negli emisferi precondizionati.



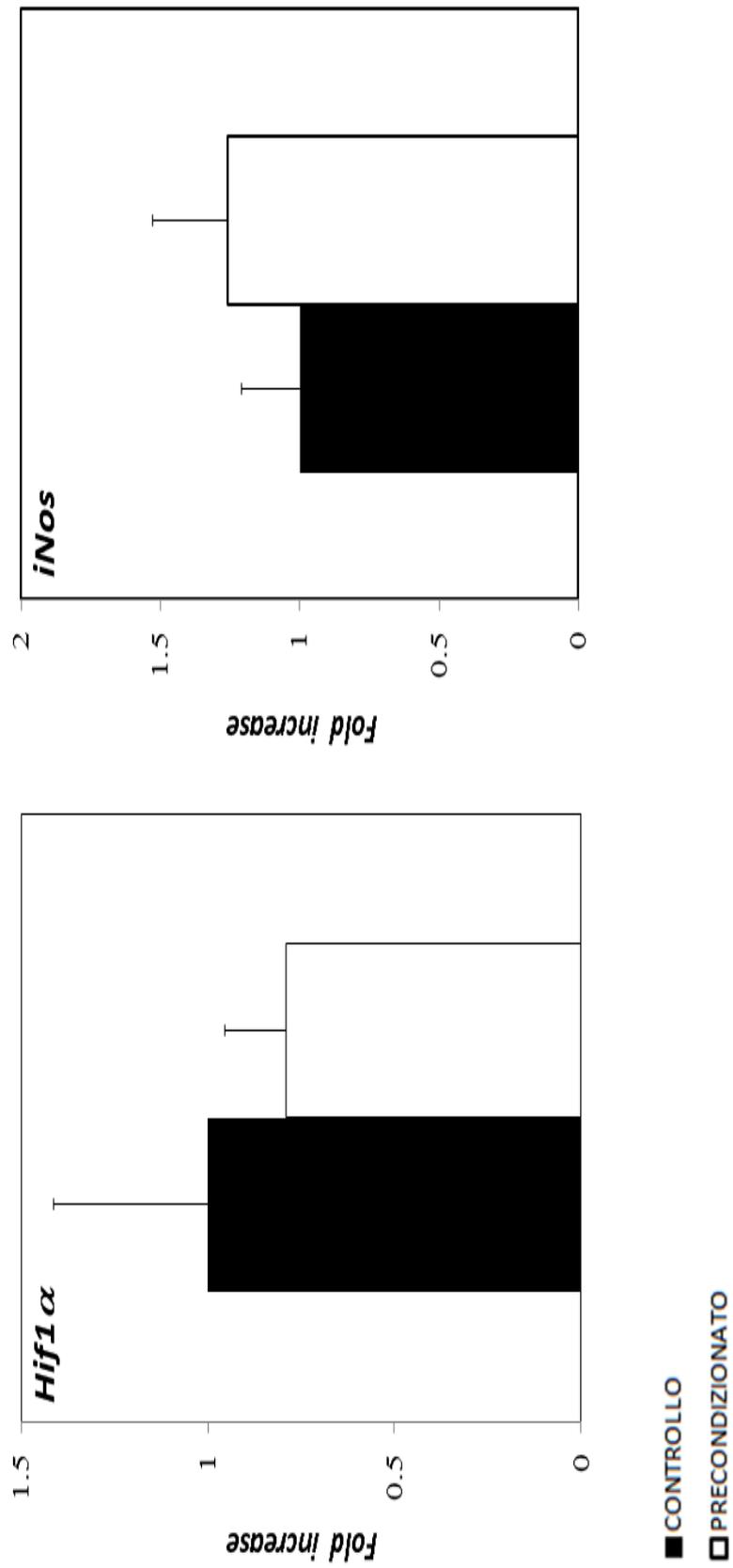
**Figura 6**

Esperimenti di qPCR per la valutazione del livello del trascritto della DNA metiltrasferasi 1 in cervelli di ratto a 15 minuti, 6h, e 24h dopo l'induzione della CSD. *Dnmt1* mostra un aumento della quantità di trascritto a 24h.

### **4.3 Effetti della CSD sui livelli di metilazione del DNA di promotori di geni neuroprotettivi**

Oltre alle sequenze retrotrasponibili, si è deciso di analizzare il livello di metilazione del DNA di due geni neuroprotettivi, *iNos* e *Hif1 $\alpha$* . Per questi geni già si era osservato un cambiamento nel livello di dimetilazione in H3K4 e H3K9 in cervelli di ratto preconditionati a 24 ore dall'induzione (Rana et al., 2012). Esperimenti di ChIP, condotti nel laboratorio della Prof.ssa Fucci, avevano infatti mostrato per ambedue i geni un aumento del livello di dimetilazione in H3K4 ed un decremento in H3K9 negli emisferi cerebrali preconditionati; tali dati suggerivano che questi loci, in seguito a CSD, si ritrovassero in una struttura cromatinica rilassata e più accessibile alla trascrizione (Rana et al., 2012). Tenendo in considerazione queste osservazioni, si è quindi deciso di andare a misurare possibili cambiamenti nel livello di metilazione del DNA di questi due geni in corrispondenza delle loro sequenze promotrici tramite saggi di meDIP. Gli esperimenti sono stati condotti su cervelli di ratto a 24h dall'induzione. Per ogni campione 4  $\mu$ g di DNA genomico frammentato sono stati immunoprecipitati con 10  $\mu$ g di anticorpo anti-metil-citosina. 2 ng di ogni campione immunoprecipitato sono stati poi analizzati per qPCR. Come si può vedere dai grafici in Figura 7, entrambi

i geni non hanno mostrato differenze significative nel pattern di metilazione del DNA tra gli emisferi precondizionati e controllo.



**Figura 7**

Esperimenti di meDIP su cervelli di ratto preconditionati a 24h dall'induzione della CSD; le analisi sono state condotte a livello delle regioni promotrici dei geni *Hif1α* e *iNos*. I livelli di metilazione del DNA di entrambe le sequenze rimangono invariati tra gli emisferi preconditionati e gli emisferi controllo.

#### **4.4 Messa a punto di un sistema cellulare *in vitro* per lo studio del**

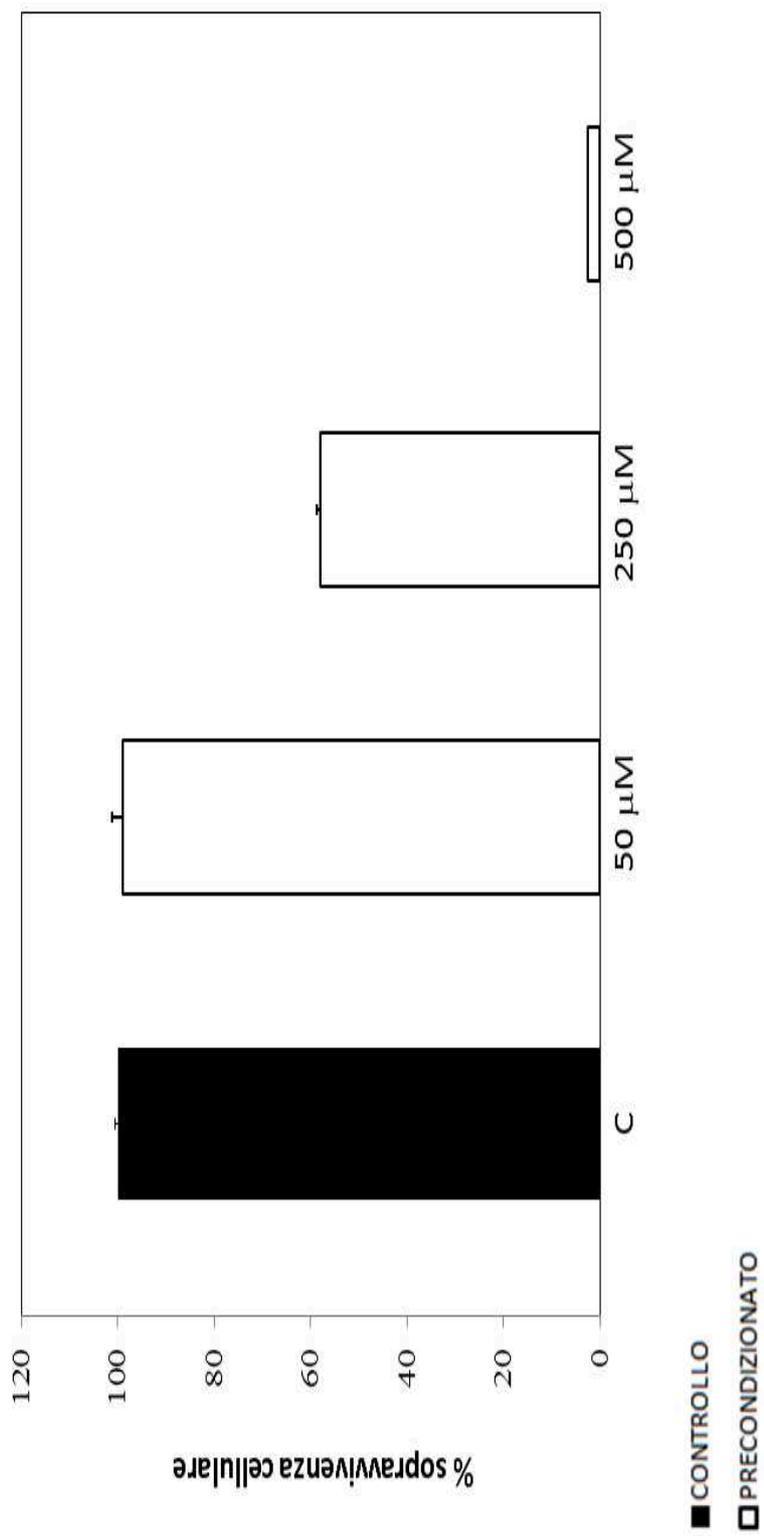
##### ***Preconditioning***

Per lo studio *in vitro* del fenomeno di *Preconditioning* sono state utilizzate cellule di neuroblastoma umano (SHSY5Y) sia non differenziate che indotte a differenziare tramite l'utilizzo di uno specifico morfogeno, l'acido retinoico.

I parametri valutati per la messa a punto del sistema sono stati: il numero di cellule da utilizzare; la quantità di KCl utile per indurre il *Preconditioning*; la durata del *Preconditioning*; la quantità di perossido di idrogeno da utilizzare per indurre il danno molecolare.

La quantità di agente preconditionante, insieme alla tempistica da utilizzare, sono state scelte sia in base a dati presenti in letteratura sia ad alcuni esperimenti pilota condotti in precedenza. Per scegliere invece la concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da utilizzare per l'induzione del danno molecolare sono state effettuate curve di vitalità tramite saggi MTT ed infine è stata scelta la quantità di insulto che diminuiva all'incirca del 50% la vitalità cellulare (Figura 8).

Per le cellule non differenziate i saggi di vitalità cellulare per la determinazione dell'efficacia del *Preconditioning* hanno quindi previsto l'utilizzo di KCl ad una concentrazione finale di 100 mM per 10 minuti e, dopo 8 ore dal trattamento, le cellule sono state sottoposte all'azione del



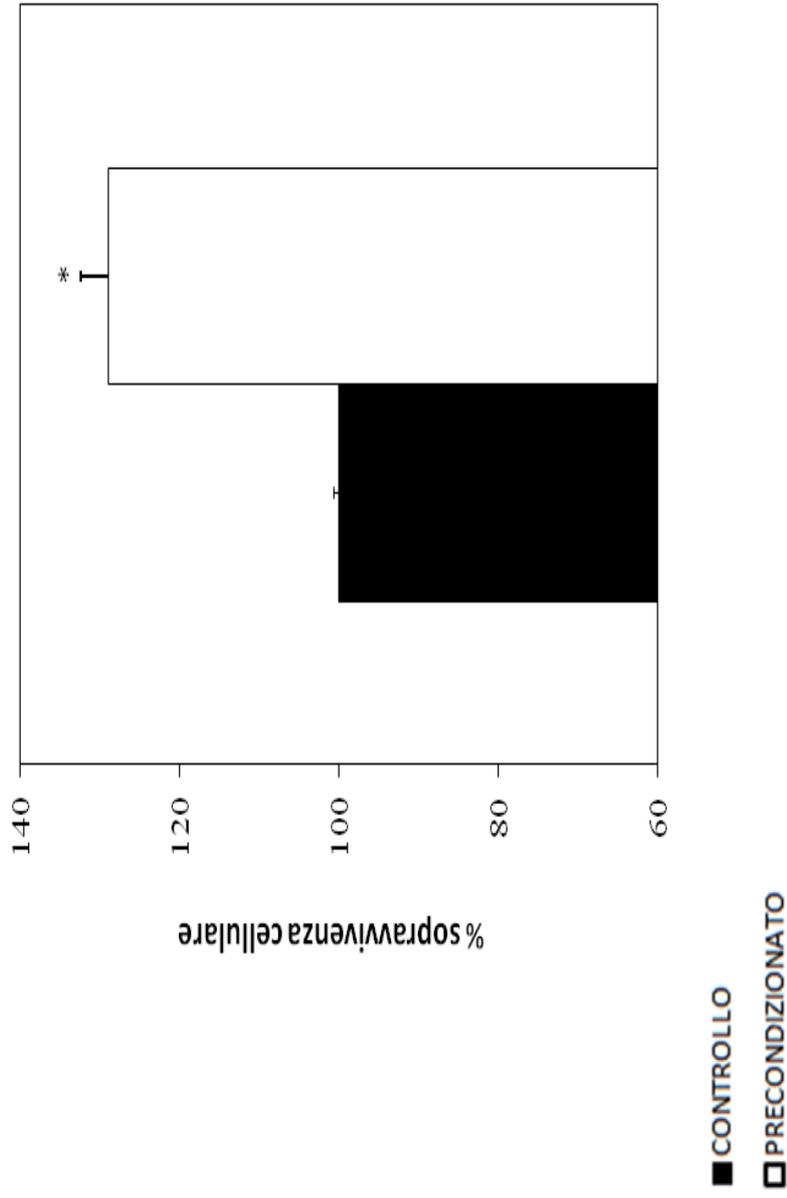
**Figura 8**

Esperimenti di vitalità cellulare effettuati per individuare la concentrazione di perossido di idrogeno tale da indurre circa il 50% di morte cellulare in cellule non differenziate.

perossido di idrogeno ad una concentrazione finale di 250  $\mu$ M. Dopo 24 ore dal maltrattamento sono state misurate quante cellule trattate con KCl e perossido di idrogeno fossero sopravvissute rispetto a quelle controllo, unicamente trattate con perossido di idrogeno. I risultati mostrano per le cellule preconditionate con KCl una percentuale di sopravvivenza di circa il 30% in più rispetto alle cellule controllo (Figura 9).

E' stata condotta la stessa tipologia di esperimenti anche su cellule differenziate. Il differenziamento delle SHSY5Y è stato controllato sia a livello morfologico che a livello molecolare, come riportato in Figura 10. Cellule completamente differenziate mostrano, a livello morfologico, un corpo allungato da cui si dipartono neuriti di diversa lunghezza (Figura 10-A). A livello molecolare si assiste all'aumento dell'espressione di specifici marcatori neurali. I marcatori saggiati sono stati: *TrKb*, in esperimenti di RT-PCR, ed *NF-H*, in saggi di *Western blotting*. Entrambi gli esperimenti hanno mostrato un aumento del livello di espressione di ambedue i marcatori saggiati in cellule differenziate rispetto a cellule non differenziate (Figura 10-B/C). Sono stati utilizzati come normalizzatori rispettivamente HPRT1, negli esperimenti di RT-PCR, e  $\alpha$ -tubulina, negli esperimenti di *Western blotting*.

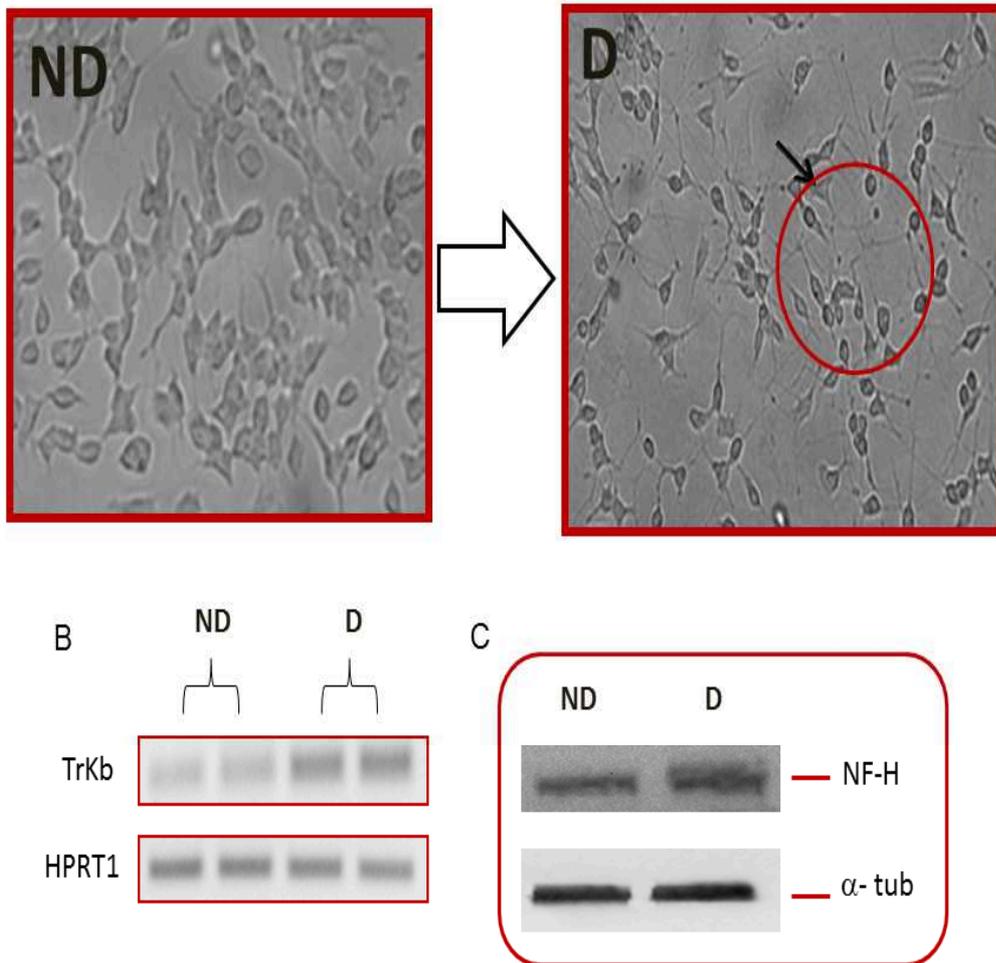
Anche per le cellule differenziate è stato utilizzato come agente preconditionante KCl ad una concentrazione finale di 100 mM per 10 minuti, dopo 8 ore le cellule sono state sottoposte all'azione del perossido



**Figura 9**

Esperimenti di vitalità cellulare su cellule non differenziate dove le cellule controllo sono state sottoposte solo ad insulto con perossido di idrogeno (250  $\mu$ M) mentre le cellule preconditionate sono state prima trattate con KCl 100 mM per 10' e poi sottoposte ad insulto con perossido di idrogeno (250  $\mu$ M).

A Neuroblastoma umano (SHSY5Y)



**Figura 10**

Validazione del protocollo di differenziamento cellulare.

A) Fotografie al microscopio ottico. B) Esperimenti di RT-PCR su cellule differenziate e non differenziate per il marcatore neuronale TrKb; si nota un aumento del livello di espressione di tale marcatore in cellule differenziate. C) Esperimenti di *Western blotting* su cellule differenziate e non differenziate per il marcatore neuronale NF-H; tale marcatore sembra aumentare, anche se di poco, il suo livello di espressione nelle cellule differenziate.

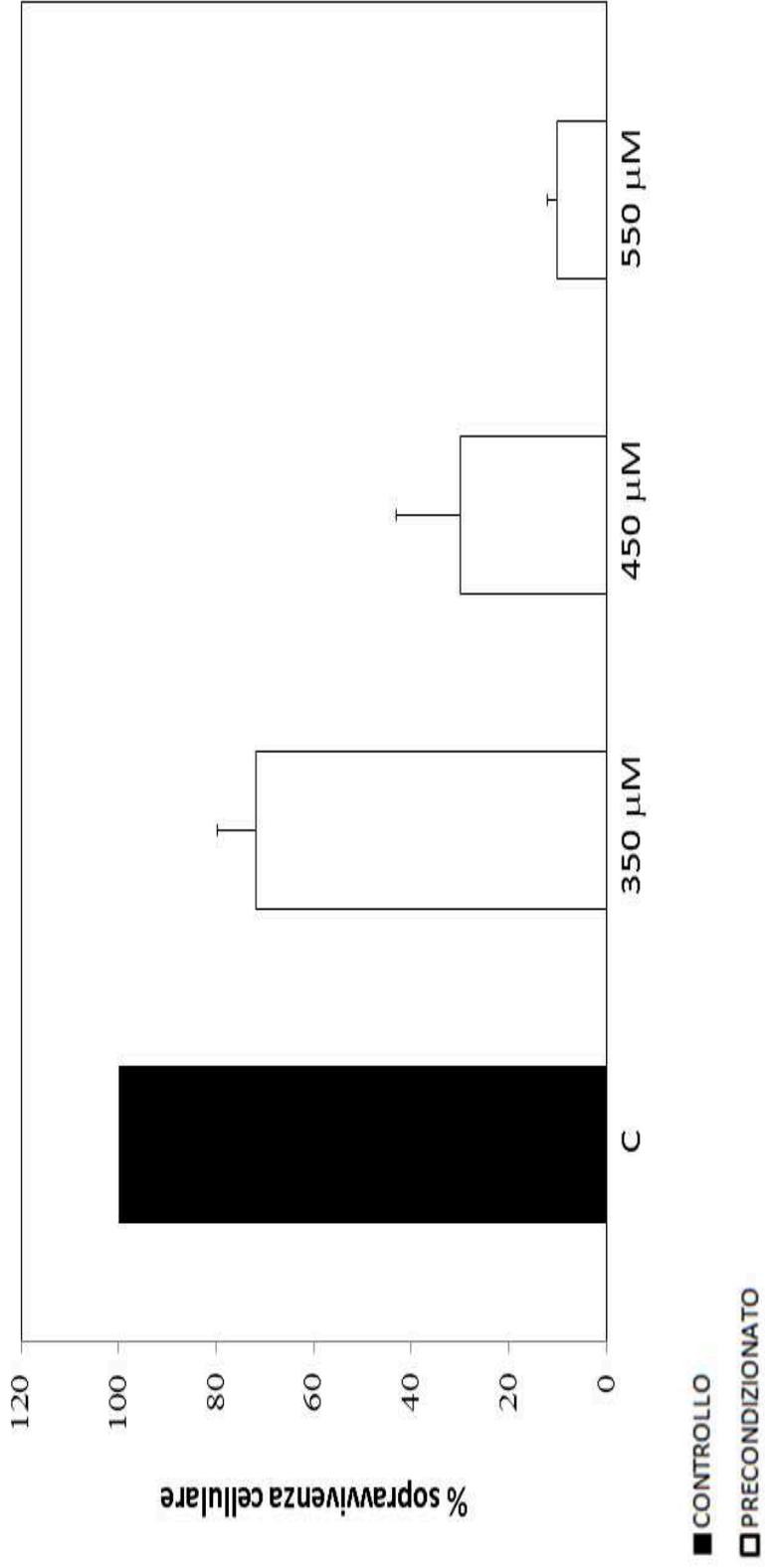
Negli esperimenti di RT-PCR è stato utilizzato come normalizzatore il gene HPRT1.

Negli esperimenti di *Western blotting* il normalizzatore utilizzato è la proteina  $\alpha$ -tubulina.

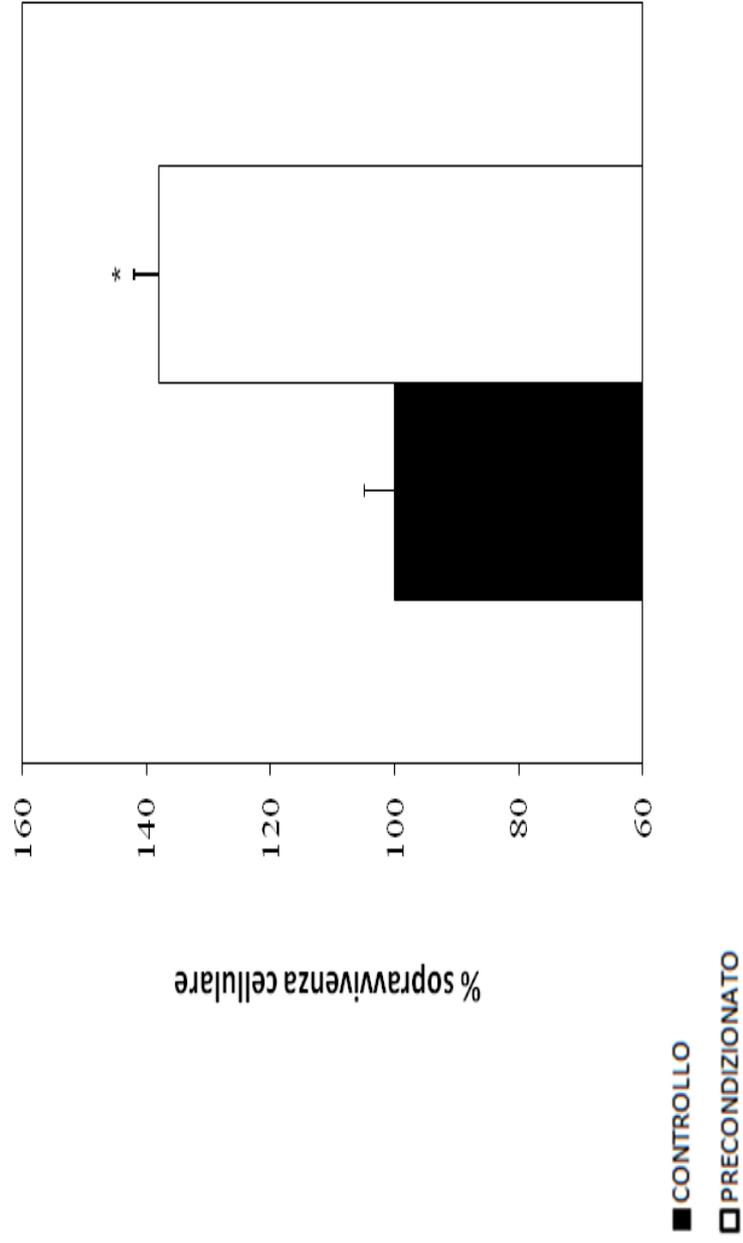
ND = CELLULE NON DIFFERENZIATE

D = CELLULE DIFFERENZIATE

d'idrogeno. Come per la cellule non differenziate, anche in questo caso sono state effettuate curve di vitalità cellulare per individuare la concentrazione di perossido di idrogeno che portasse ad una diminuzione del 50% di vitalità cellulare (Figura 11). Poichè le cellule differenziate mostrano una resistenza maggiore all'attacco del perossido di idrogeno, sono state modificate le condizioni sperimentali utilizzando una concentrazione finale di  $H_2O_2$  di 450  $\mu M$ . Dopo 24 ore è stata saggiata la vitalità cellulare tramite analisi MTT. Anche le cellule differenziate trattate con KCl e  $H_2O_2$  mostrano una percentuale di sopravvivenza di circa il 40% rispetto al controllo (Figura 12).



**Figura 11**  
 Esperimenti di vitalità cellulare effettuati per individuare la concentrazione di perossido di idrogeno tale da indurre circa il 50% di morte cellulare in cellule differenziate.



**Figura 12**

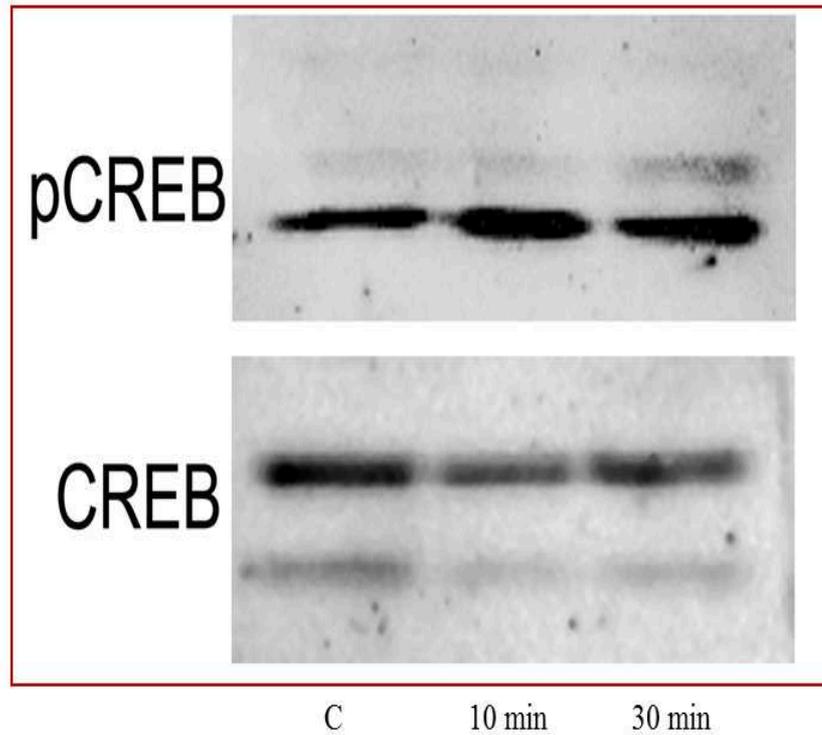
Esperimenti di vitalità cellulare su cellule differenziate dove le cellule controllo sono state trattate solo con perossido di idrogeno (450  $\mu$ M) mentre le cellule preconditionate sono state trattate con KCl 100 mM per 10' e poi sottoposte ad insulto con perossido di idrogeno (450  $\mu$ M).

#### **4.5 Caratterizzazione del sistema *in vitro* per lo studio del *Preconditioning*: analisi molecolari**

Come ulteriore dato per la validazione di questo sistema *in vitro*, si è saggiato il livello della proteina CREB nella sua forma fosforilata a 10 minuti e 30 minuti dall'induzione del *Preconditioning*, tramite analisi di Western blotting. E' infatti noto in letteratura che subito dopo l'induzione del *Preconditioning* tale proteina aumenti nella sua forma fosforilata rispetto a quella non fosforilata. Come mostrato nella Figura 13 si registra un aumento della forma fosforilata di CREB ad ambedue i tempi analizzati.

Terminata la validazione del sistema è sembrato importante andare ad analizzare, tramite analisi di qPCR, quali cambiamenti avvenissero nei livelli di espressione di specifici geni neuroprotettivi, quali: *Brain derived neurotrophic factor* (BDNF) ed il suo trascritto antisenso (BDNF-AS), *c-Fos*, e *Hypoxia inducible factor 1- $\alpha$*  (HIF1 $\alpha$ ).

La risposta di questi geni è stata valutata su cellule differenziate sia a vari tempi dopo il solo trattamento con KCl che dopo *Preconditioning* e danno molecolare. Le variazioni di espressione di questi tre geni in seguito a trattamento con KCl sono state misurate dopo 30 minuti, 60 minuti e 8h dall'aggiunta dell'agente preconditionante. Per la valutazione invece della risposta indotta dal *Preconditioning* al danno molecolare, i campioni



**Figura 13**

Esperimenti di *Western blotting* su proteine totali estratte da cellule differenziate dopo 10 minuti e 30 minuti dall'induzione del *Preconditioning* con KCl. La proteina p-CREB come atteso aumenta sia a 10 minuti che a 30 minuti dall'induzione rispetto al controllo non trattato.

di RNA sono stati recuperati dopo 30 e 60 minuti dall'aggiunta di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, che era avvenuta dopo 8 ore dall'aggiunta del KCl. Per ogni campione sottoposto all'analisi è stato retrotrascritto 1 µg di RNA e successivamente 50 ng di cDNA sono stati analizzati per qPCR.

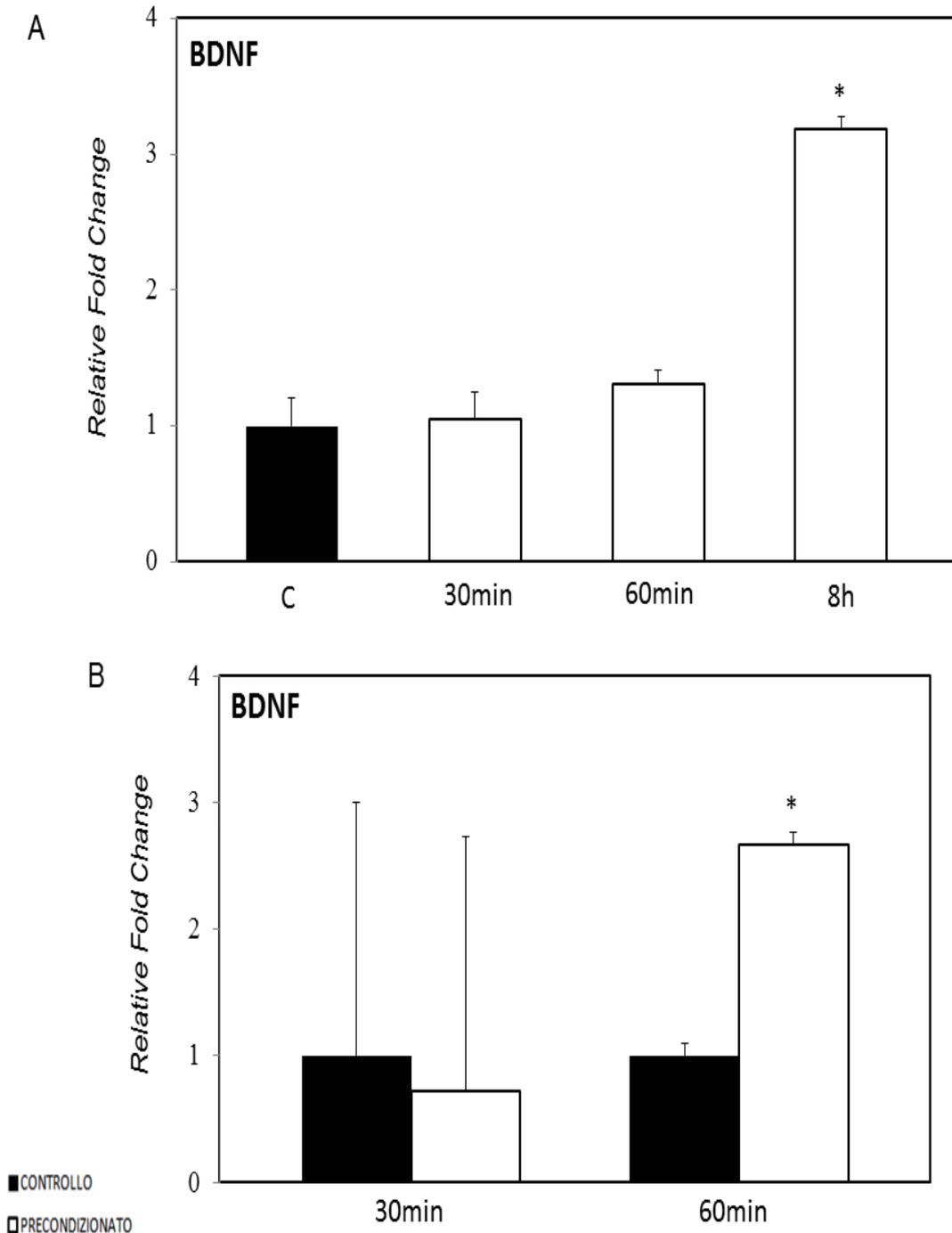
Il gene *BDNF* risponde, alla sola stimolazione con KCl, con un leggero aumento del livello del suo trascritto e l'incremento maggiore, di circa tre volte, viene raggiunto a 8h dal *Preconditioning* nelle cellule trattate (Figura 14-A). Dopo il trattamento con perossido di idrogeno *BDNF* mostra un livello di trascritto paragonabile a 30 minuti dall'induzione del danno molecolare; la quantità di trascritto aumenta invece significativamente a 60 minuti nei campioni preconditionati rispetto al controllo (Figura 14-B).

In cellule trattate con KCl il trascritto antisenso del gene *BDNF* mostra un aumento significativo del suo livello di espressione soprattutto a 8h dall'induzione (Figura 15-A). In cellule trattate invece con KCl e successivamente con perossido di idrogeno il trascritto di *BDNF-AS* mostra una diminuzione significativa a 30 minuti dal danno molecolare e poi sembra non mostrare variazioni a 60 minuti nei campioni preconditionati rispetto al controllo (Figura 15-B).

Il gene *HIF1α* mostra un live incremento del suo livello di espressione in cellule preconditionate già a 30 minuti dal trattamento con il solo KCl, che permane poi nei tempi successivi fino a raggiungere un picco a 8h

(Figura 16-A). Nelle cellule trattate invece con KCl e poi sottoposte a danno molecolare, *HIF1 $\alpha$*  non mostra variazioni nel suo livello di espressione a nessuno dei tempi analizzati (Figura 16-B).

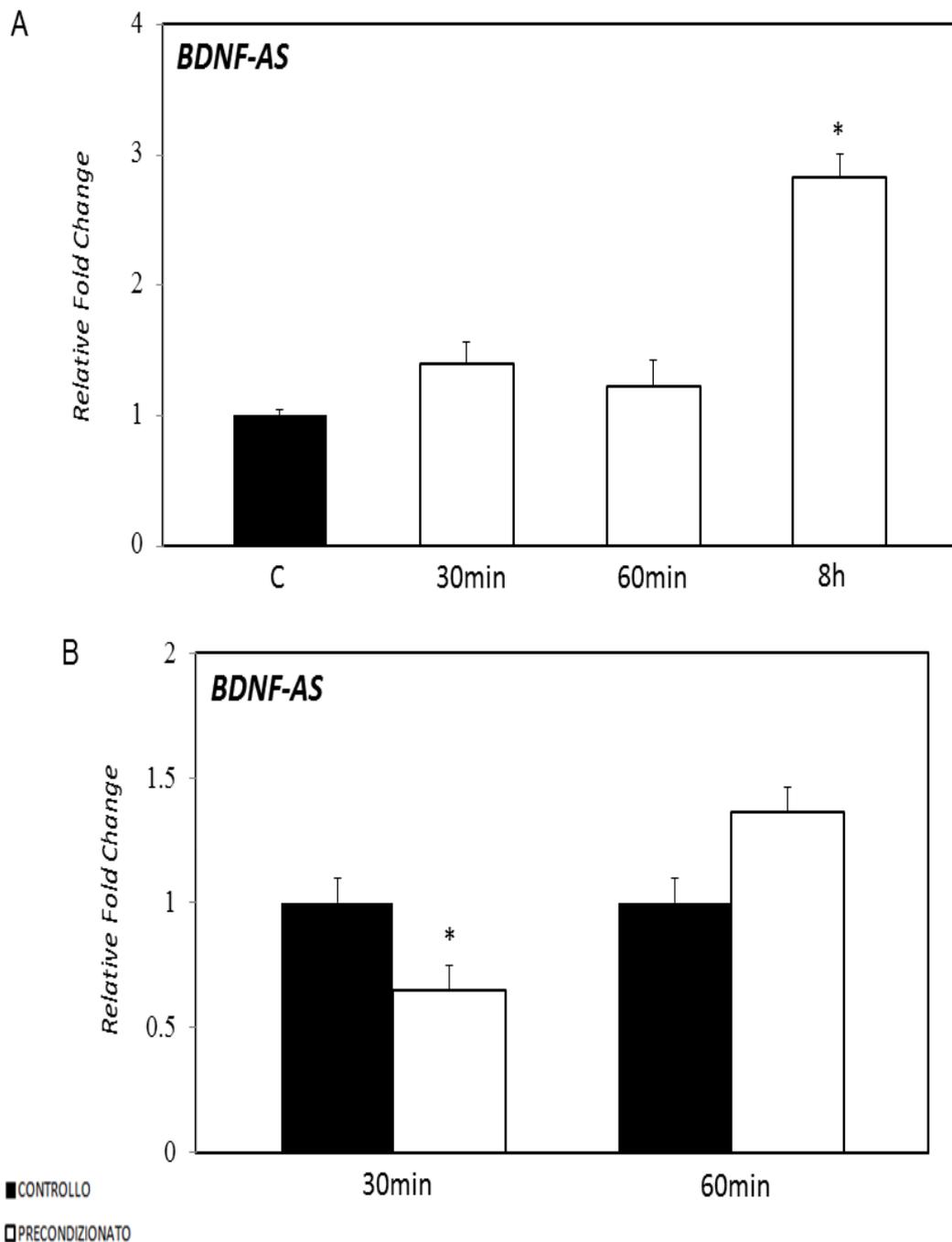
Infine il gene *c-Fos* sembra diminuire la quantità del suo trascritto a 30 minuti e 60 minuti dopo l'aggiunta del KCl per poi tornare al suo stato basale a 8h (Figura 17-A). A 30 minuti dall'induzione del danno molecolare invece sembra mostrare una diminuzione che poi si attenua a 60 minuti (Figura 17-B).



**Figura 14**

A) Esperimenti di qPCR per la valutazione, in cellule trattate con KCl, del livello di trascritto del gene neuroprotettivo BDNF a 30 minuti, 60 minuti, 8h dall'induzione. Il livello del trascritto di questo gene aumenta a partire da 60 minuti dall'induzione per poi raggiungere un picco a 8h.

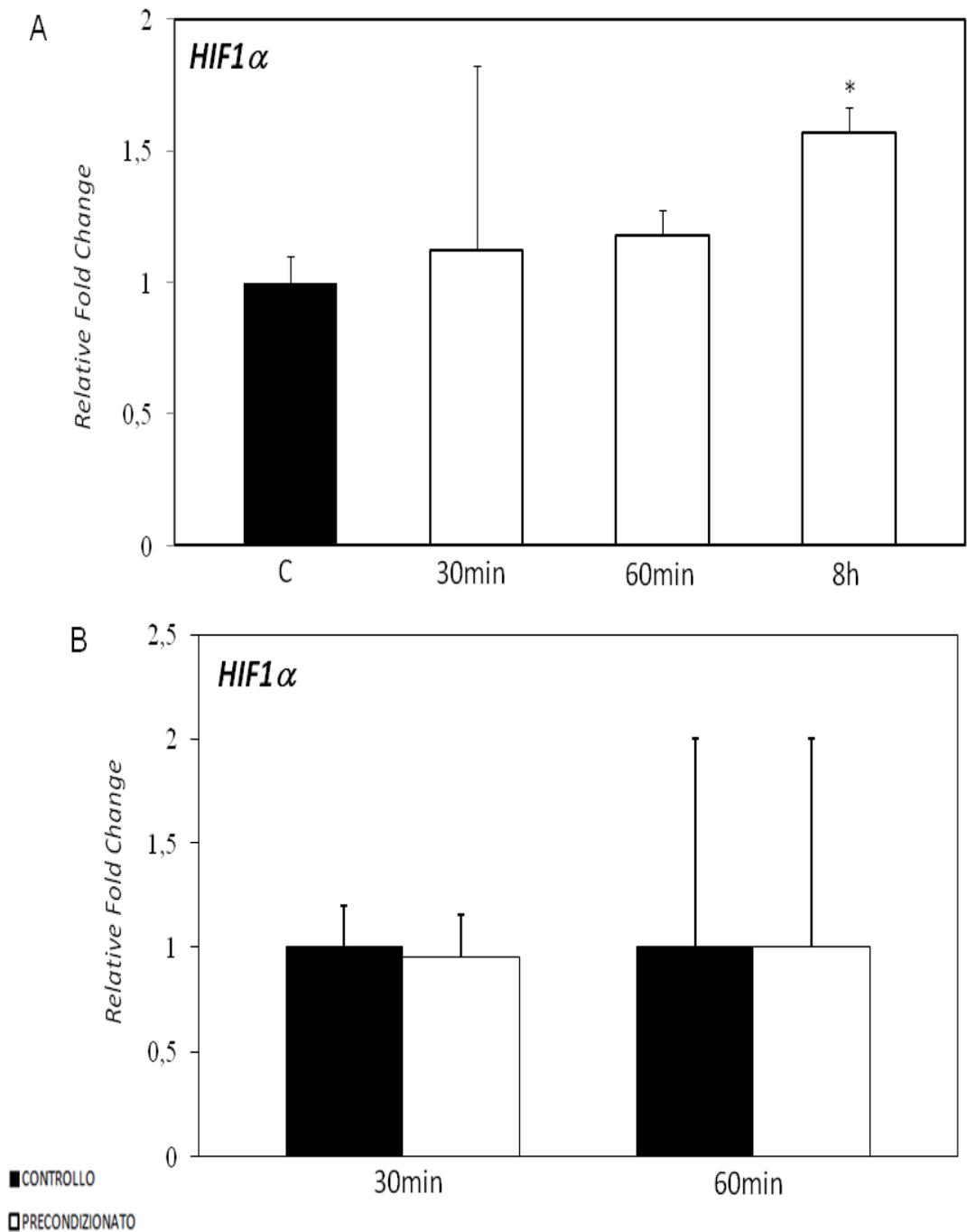
B) Esperimenti di qPCR per la valutazione, in cellule trattate con KCl e sottoposte a danno da perossido d'idrogeno, del livello del trascritto di BDNF dopo 30 minuti e 60 minuti. Il livello del trascritto di BDNF in risposta al danno molecolare sembra restare costante a 30 minuti per poi aumentare a 60 minuti in cellule preconditionate rispetto a cellule controllo.



**Figura 15**

A) Esperimenti di qPCR per la valutazione, in cellule trattate con KCl, del livello di trascritto di BDNF-AS a 30 minuti, 60 minuti, 8h dall'induzione. Il livello del trascritto di questo gene mostra un aumento significativo già a 30 minuti dall'induzione fino a 8h.

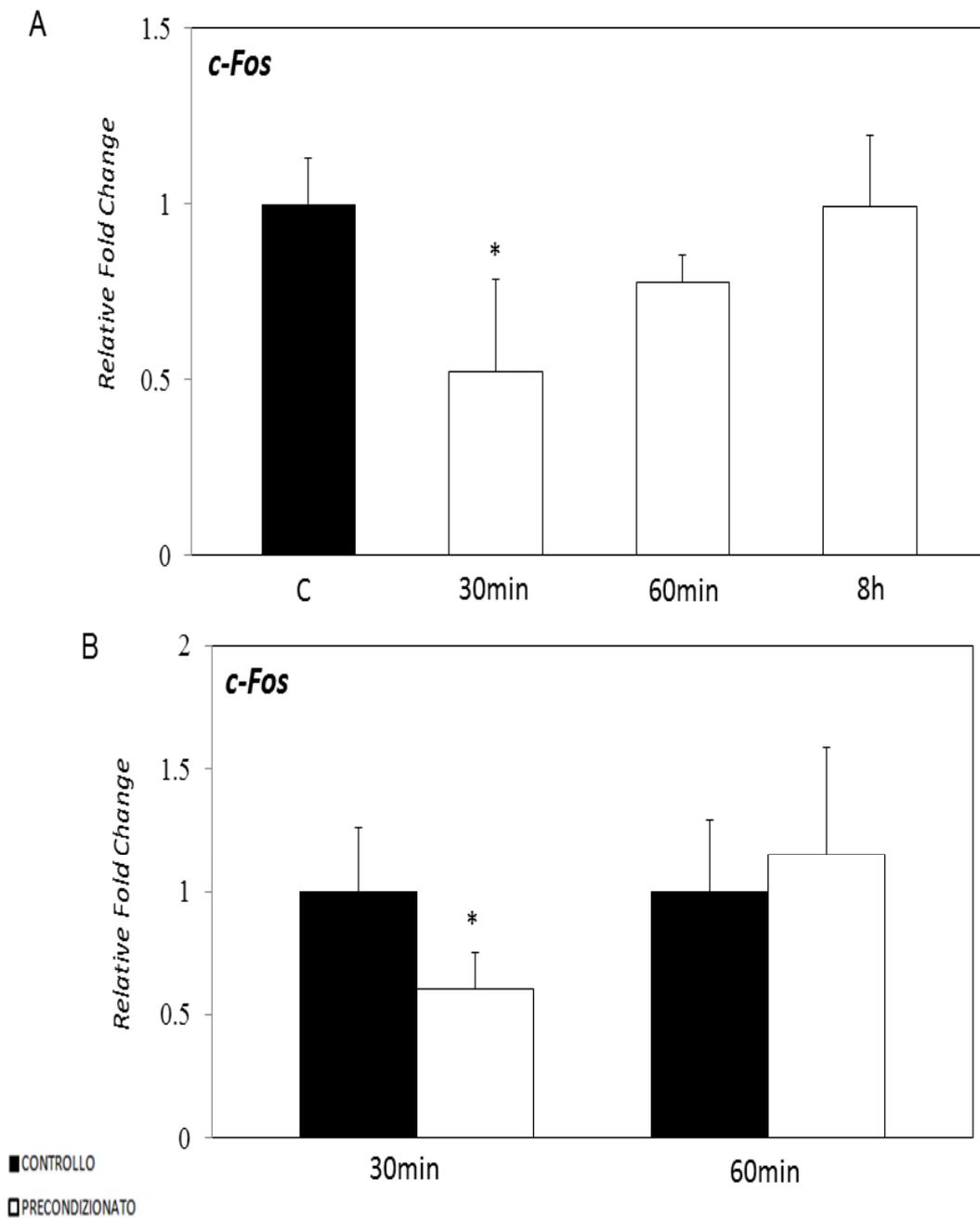
B) Esperimenti di qPCR per la valutazione, in cellule trattate con KCl e sottoposte a danno da perossido d'idrogeno, del livello del trascritto di BDNF-AS dopo 30 minuti e 60 minuti. Il livello del trascritto di BDNF-AS in risposta al danno molecolare sembra diminuire a 30 minuti per poi aumentare a 60 minuti in cellule preconditionate rispetto a cellule controllo.



**Figura 16**

A) Esperimenti di qPCR per la valutazione, in cellule trattate con KCl, del livello di trascritto del gene neuroprotettivo HIF1 $\alpha$  a 30 minuti, 60 minuti, 8h dall'induzione. Il livello del trascritto di questo gene aumenta in maniera significativa a partire da 60 minuti dall'induzione con KCl e permane fino a 8h.

B) Esperimenti di qPCR per la valutazione, in cellule trattate con KCl e sottoposte a danno da perossido d'idrogeno, del livello del trascritto di HIF1 $\alpha$  dopo 30 minuti e 60 minuti. Il livello del trascritto di HIF1 $\alpha$  in risposta al danno molecolare sembra rimanere costante a 30 minuti per poi aumentare a 60 minuti in cellule preconditionate rispetto a cellule controllo.



**Figura 17**

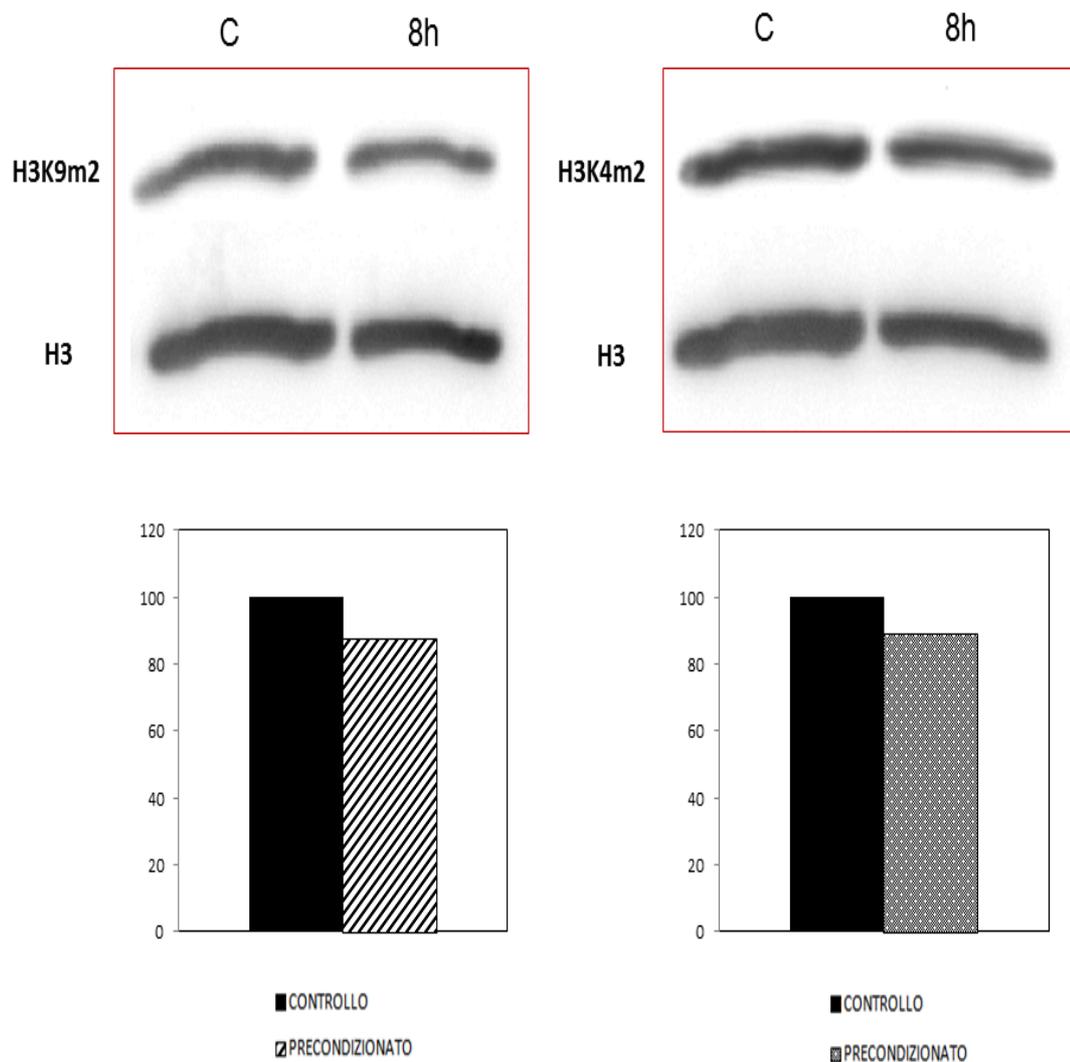
A) Esperimenti di qPCR per la valutazione, in cellule trattate con KCl, del livello di trascritto del gene neuroprotettivo c-Fos a 30 minuti, 60 minuti, 8h dall'induzione. Il livello del trascritto di questo gene diminuisce in maniera significativa nei primi punti sperimentali saggiati rispetto al controllo, per poi ritornare ad un livello di espressione basale a 8h.

B) Esperimenti di qPCR per la valutazione, in cellule trattate con KCl e sottoposte a danno da perossido d'idrogeno, del livello del trascritto di c-Fos dopo 30 minuti e 60 minuti. Il livello del trascritto di c-Fos in risposta al danno molecolare sembra diminuire a 30 minuti per tornare ad un livello basale a 60 minuti in cellule preconditionate rispetto a cellule controllo.

#### **4.6 Analisi preliminari: livello di espressione della di-metilazione dell'istone H3K4 e dell'istone H3K9**

Attraverso esperimenti di Western blotting sono state effettuate analisi preliminari per la valutazione del livello di espressione delle modifiche istoniche H3K4me2 e H3K9me2 in cellule preconditionate dopo 8h dall'induzione con KCl. Come mostrato in Figura 18, dopo 8h dal trattamento le due modifiche istoniche non sembrano presentare variazioni molto consistenti rispetto alle cellule controllo non preconditionate. I grafici in figura, ottenuti attraverso un programma di scansione densitometrica delle bande, mostrano una leggera diminuzione dei livelli di espressione sia per H3K4me2 che per H3K9me2 in cellule preconditionate rispetto al controllo.

Le analisi verranno ampliate anche a tempi più lunghi dall'induzione del *Preconditioning*.



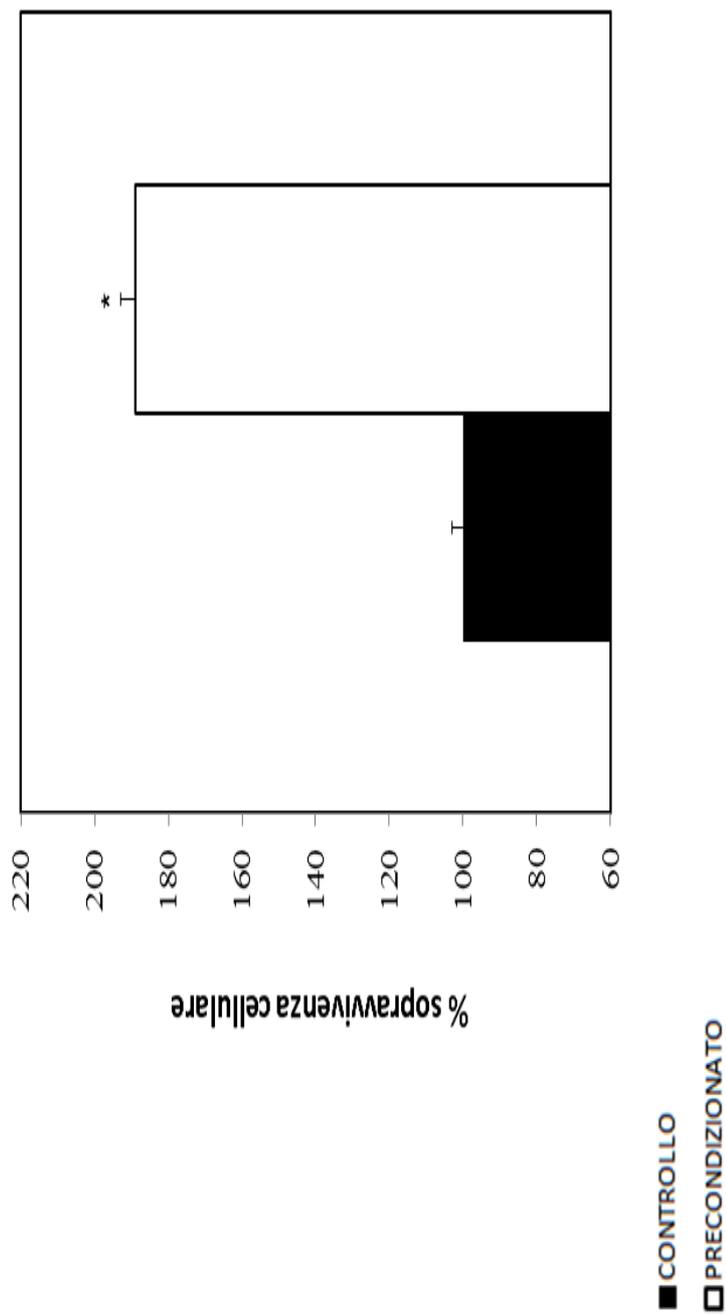
**Figura 18**

Esperimenti di *Western blotting* su proteine istoniche estratte da cellule differenziate dopo 8h dall'induzione del *Preconditioning* con KCl. Il livello di H3K9me2 e H3K4me2 sembra diminuire nei campioni preconditionati rispetto al controllo.

#### **4.7 Saggi di vitalità cellulare dopo 24 ore dall'induzione del *Preconditioning***

Prendendo in considerazione i dati ottenuti dai saggi di vitalità effettuati su cellule differenziate dopo 8h dall'aggiunta dell'agente preconditionante, si è deciso di andare a saggiare la risposta cellulare anche dopo 24h dall'induzione con KCl.

Cellule differenziate sono state trattate con 100 mM KCl per 10', dopo 24h dall'aggiunta del KCl, è stato indotto il danno molecolare utilizzando 450  $\mu$ M di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dopo altre 24h, attraverso saggi MTT, è stata valutata la ripresa di tali cellule rispetto a cellule controllo unicamente trattate con 450  $\mu$ M di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Come si può vedere dalla Figura 19, si osserva un aumento della vitalità cellulare di circa il doppio nelle cellule preconditionate.



**Figura 19**

Esperimenti di vitalità cellulare su cellule differenziate dove le cellule controllo sono state trattate solo con perossido di idrogeno (450  $\mu$ M) mentre le cellule preconditionate sono state trattate con KCl 100 mM per 10' e poi sottoposte ad insulto con perossido di idrogeno (450  $\mu$ M) dopo 24h dall'aggiunta dell'agente preconditionante.

## *Discussione*

## 5.1 Discussione - I

La capacità del cervello di acquisire una sorta di tolleranza ad insulti di tipo letale, se esposto in precedenza a stimoli sub letali, è chiamata *Preconditioning*. Negli ultimi anni la neuroprotezione indotta dal fenomeno del *Preconditioning* è diventata oggetto di numerosi studi; comprendere infatti come il cervello riesca a proteggersi da una vasta gamma di stimoli nocivi potrebbe essere la chiave per la scoperta di terapie utili alla cura di numerose patologie.

Il *Preconditioning* potrebbe agire sia inducendo cambiamenti immediati nel livello di espressione di alcuni specifici geni, a livello dell'mRNA o della proteina, che promuovendo cambiamenti di lunga durata nella conformazione cromatinica del genoma, tali da permettere una risposta più veloce ad un successivo insulto letale.

Nel laboratorio dove ho svolto la mia attività di dottorato era stato ipotizzato che cambiamenti nel livello di dimetilazione dell'istone H3, a carico sia della lisina 4 che della lisina 9, potessero essere coinvolti nel rimodellamento cromatinico che sottende il fenomeno del *Preconditioning* (Passaro et al., 2010; Rana et al., 2012). In particolare, è stato dimostrato che cambiamento nei livelli di H3K4me2 e H3K9me2 di sequenze retrotrasponibili dopo 24h dall'induzione della CSD aumentano probabilmente la stabilità genomica in cervelli di ratto preconditionati (Rana et al., 2012). Il ruolo degli elementi retrotrasponibili in cellule sane

non è ancora ben chiaro; nei neuroni è stato ipotizzato un possibile ruolo per tali sequenze nel contribuire al mosaicismo cerebrale, ossia nel permettere una diversità genomica individuale (Singer et al., 2010). E' però ben noto che la mobilità dei retrotrasposoni è perlopiù correlata a molte patologie neurologiche come la schizofrenia o l'ischemia (Wang and Kelly 2013; Bundo et al., 2014). E' stato dimostrato che l'ischemia cerebrale, dopo 24h, induce un massivo incremento di nove diverse sequenze retrotrasponibili; fra tutte, i retrotrasposoni IAP sembrano mostrare l'accumulo maggiore di mRNA e allo stesso tempo una forte diminuzione nel loro pattern di metilazione del DNA (Wang and Kelly, 2013). Questi dati suggeriscono un ruolo attivo per le sequenze retrotrasponibili nell'ischemia. Per corroborare la nostra precedente ipotesi di un silenziamento delle sequenze retrotrasponibili dovuto al *Preconditioning*, abbiamo deciso di analizzare il livello dei trascritti di due sottofamiglie di retrotrasposoni, specificamente le sequenze LINE1 e L1. Entrambe le sequenze sono state analizzate a tre differenti tempi dall'induzione della CSD, un momento precoce (15min), uno intermedio (6h) ed uno tardivo (24h). L'ultimo momento risulta essere particolarmente interessante in quanto è stato dimostrato che dopo 24 ore dall'induzione della CSD vi è l'insorgenza di una forte neuroprotezione indotta da *Preconditioning*, che poi gradualmente scompare in circa due settimane (Kirino, 2002). Il livello del trascritto di LINE1 e L1 diminuisce negli emisferi di ratto indotti per la

CSD rispetto al controllo, con una differenza significativa a 6h e 24h rispettivamente. Questi dati suggeriscono che uno dei meccanismi alla base della neuroprotezione dipendente dal *Preconditioning* potrebbe consistere nell'inibizione della mobilizzazione delle sequenze retrotrasponibili. Questo meccanismo di protezione è stato dimostrato anche in altri tessuti oltre che nel cervello; nel cuore, per esempio, l'inibizione della mobilità di elementi retrotrasponibili ed il conseguente blocco della loro mobilità contribuiscono al miglioramento della patologia riducendo il volume della regione infartuata (Lucchinetti et al., 2006).

Poiché una delle strategie cellulari per impedire la mobilizzazione dei retrotrasposoni coinvolge la metilazione del DNA, si è deciso di andare a valutare i possibili cambiamenti nel pattern di metilazione del DNA in cervelli di ratto preconditionati. Attraverso esperimenti di meDIP, è stato dimostrato che sia le sequenze LINE1 che L1 si ritrovano ipermetilate in cervelli di ratto preconditionati rispetto al controllo, dopo 24h dall'induzione della CSD. Dato che le sequenze retrotrasponibili sono molto rappresentate all'interno del genoma, questi dati corroborano l'ipotesi che il *Preconditioning* indotto da CSD agisca andando a modificare globalmente lo stato epigenetico del genoma.

Tenendo conto che cambiamenti nel livello di metilazione del DNA potrebbero essere collegati a cambiamenti nel livello di espressione degli enzimi deputati all'aggiunta del gruppo metile sulla molecola di carbonio 5

del DNA, ossia le DNA metiltrasferasi, abbiamo inoltre deciso di valutare il livello di espressione di Dnmt3a, Dnmt3b and Dnmt1 a vari tempi dopo l'induzione della CSD. I risultati del livello di espressione delle tre DNA metiltrasferasi analizzate evidenziano che la CSD induce un incremento nei livelli dei trascritti; in particolare un significativo aumento è visibile per la Dnmt3b e la Dnmt1, rispettivamente dopo 6h e 24h dall'induzione. Un diverso momento nella regolazione di questi enzimi è probabilmente collegato ai diversi ruoli che questi enzimi svolgono: la DNMT3a e la DNMT3b sono implicate nella metilazione *de novo* e svolgono la loro funzione temporalmente prima se comparate con la DNMT1, che invece è una DNA metiltrasferasi di mantenimento. Recenti studi hanno dimostrato che bisogna prendere maggiormente in considerazione la diversa interazione di questi enzimi fra loro e le zone del genoma dove tali enzimi devono agire; infatti gli effetti sulla metilazione possono essere nettamente differenti tra loro e con conseguenze variabili per la struttura del genoma (Tiedemann et al., 2015).

Abbiamo inoltre analizzato il livello di metilazione del DNA a carico delle regioni promotrici di due geni neuroprotettivi, Hif1 $\alpha$  and iNos. E' noto che tali geni si attivano dopo induzione della CSD, precisamente tra le 2h e le 6h dal trattamento, per poi tornare a livelli di espressione basale dopo 24h (Viggiano et al. 2008).

Rana et al. (2012) avevano già dimostrato che a 24h dal trattamento per la CSD questi geni esibivano un incremento dei loro livelli di H3K4me2 ed un corrispondente decremento di H3K9me2 nelle regioni intrageniche. Questi dati hanno fatto supporre che, nel *Preconditioning*, tali geni si ritrovassero in una conformazione cromatinica aperta, esposta al macchinario di trascrizione, così da poter rispondere in maniera rapida ad un successivo insulto letale. Esperimenti di meDIP sulle sequenze promotore hanno evidenziato che lo stato di metilazione del DNA per entrambi questi geni non mostra segni di variazione tra emisferi preconditionati ed emisferi controllo. E' risaputo che generalmente le regioni promotrici si ritrovano non metilate lungo il genoma; nel nostro caso, la mancanza di cambiamenti nel livello di metilazione del DNA fra emisferi preconditionati ed emisferi controllo, a 24h dall'induzione della CSD, suggerisce che i promotori di questi geni rimangano in una conformazione cromatinica aperta così da poter essere prontamente trascritti in caso di necessità.

## 5.2 Discussione – II

Per poter eseguire alcuni approcci sperimentali era necessario mettere a punto un sistema che rispondesse ad alcune caratteristiche: a) maggior quantità di campione biologico di partenza, b) facile manipolazione. La scelta è dunque ricaduta sull'utilizzo di un sistema cellulare *in vitro* per continuare lo studio del fenomeno biologico del *Preconditioning*. Si è quindi deciso di passare all'utilizzo di linee cellulari immortalizzate sia per poter usufruire di una maggiore quantità di campione biologico, sia per poter lavorare su linee cellulari pure (non contaminate dalla presenza di glia o astrociti).

Per la messa a punto di tale sistema sono state scelte cellule di neuroblastoma umano (SHSY5Y). Questa linea cellulare è stata scelta sia perché è già noto in letteratura il suo utilizzo nello studio del *Preconditioning*, sia per la capacità di tali cellule di raggiungere un *commitment* neuronale maturo, se trattate con acido retinoico.

I due sistemi di elezione, noti in letteratura, per lo studio del *Preconditioning* prevedono l'utilizzo o di colture cellulari neuronali primarie (van Rensburg et al., 2009) o di cellule di neuroblastoma umano SHSY5Y (Andoh et al., 2002; Lee et al., 2005). Quasi la totalità degli studi sul *Preconditioning* che hanno previsto l'utilizzo di cellule di neuroblastoma umano sono stati eseguiti utilizzando SHSY5Y non differenziate. L'utilizzo di cellule differenziate è sicuramente un valore

aggiunto, infatti avvicina il sistema alle colture primarie senza però incorrere nei problemi che derivano dal loro utilizzo (senescenza precoce, problemi di crescita e manipolazione).

Il fenotipo specifico che le SHSY5Y assumono dopo il processo di differenziamento con acido retinoico non è ancora del tutto chiaro.

Alcune evidenze sperimentali hanno mostrato che il trattamento con acido retinoico sembra indurre un aumento dell'espressione dei marcatori specifici dei neuroni colinergici; studi più recenti hanno invece dimostrato che le SHSY5Y differenziate mostrano un consistente aumento dell'espressione dell'enzima tirosina idrossilasi, marcatore specifico dei neuroni dopaminergici (Korecka et al., 2013).

In primo luogo, si è passati a mettere a punto il trattamento per l'induzione del *Preconditioning*. I primi esperimenti su questo sistema *in vitro* sono stati condotti su cellule di neuroblastoma non differenziate. Si è scelto di utilizzare come agente preconditionante il cloruro di potassio; tale composto è noto essere usato per indurre la depolarizzazione della membrana neuronale sia in sistemi *in vivo* (Viggiano et al. 2008; Rana et al. 2012) sia su cellule *in vitro* (van Rensburg et al., 2009; Kim et al., 2008).

Il disegno sperimentale ha previsto sia la scelta dell'agente con cui indurre il *Preconditioning* sia la scelta del composto con cui andare in seguito ad indurre il danno molecolare. L'utilizzo del sistema *in vitro*, rispetto al sistema *in vivo*, ci ha permesso di approfondire le nostre analisi andando

quindi a valutare, oltre la risposta cellulare al *Preconditioning*, anche quella al danno molecolare. Per indurre il danno molecolare è stato scelto il perossido di idrogeno che provoca stress ossidativo; tale molecola è naturalmente prodotta dall'organismo come effetto collaterale di processi metabolici quali la respirazione. In condizioni normali il perossido di idrogeno viene smaltito dalla cellula tramite una serie di enzimi come la superossido dismutasi e la catalasi. Quando l'accumulo di perossido di idrogeno diviene eccessivo, questo provoca stress ossidativo. Alcuni processi, quali l'ischemia o l'ipossia, possono promuovere l'accumulo di perossido di idrogeno. E' per questo motivo che tale molecola è spesso usata come insulto in sistemi cellulari per lo studio del *Preconditioning*, in quanto mima ciò che accade durante altri fenomeni biologici (Sui et al., 2014; Ghaffari et al., 2014).

Rispetto al sistema in vivo in cui il massimo effetto del *Preconditioning* era visto a 24h dall'induzione con KCl, nel sistema in vitro si è scelto di condurre le varie tipologie di analisi dopo 8h dall'induzione con il KCl; si è ritenuta un'idea valida ridurre i tempi delle analisi in quanto i tempi di risposta di una coltura cellulare sono sicuramente più brevi se paragonati a quelli di un tessuto complesso come quello cerebrale.

Attraverso esperimenti di vitalità cellulare si è scelto di utilizzare una concentrazione di perossido di idrogeno di 250  $\mu$ M; tale concentrazione è stata scelta perchè permette la sopravvivenza di circa il 50% delle cellule

trattate. Una volta definiti i parametri ottimali si è quindi passati all'analisi della risposta di cellule non differenziate al danno molecolare con perossido di idrogeno dopo trattamento con KCl. Nello specifico le cellule sono state indotte al *Preconditioning* con 100 mM di KCl per 10 minuti, e dopo 8h trattate con perossido di idrogeno. Dopo 24h si è andati ad analizzare la sopravvivenza di tali cellule rispetto a cellule controllo unicamente trattate con perossido di idrogeno. Per le cellule non differenziate si è osservato un aumento della vitalità cellulare di circa il 30%. Abbiamo quindi ottenuto un effetto di *Preconditioning*.

Dopo aver valutato la risposta di cellule non differenziate, si è deciso di passare all'utilizzo di cellule pienamente differenziate. Il protocollo di differenziamento cellulare ha previsto l'utilizzo di acido retinoico 10  $\mu$ M per un tempo totale di cinque giorni. La validazione del protocollo di differenziamento è stata effettuata andando a valutare i livelli di espressione di due specifici marcatori neuronali: TrKb e NF-H, il primo attraverso esperimenti di qPCR ed il secondo attraverso esperimenti di *Western Blotting*. Entrambe le metodiche hanno dimostrato un aumento dei livelli di espressione di tali geni in cellule differenziate rispetto a cellule non differenziate.

I saggi di vitalità cellulare sono quindi stati ripetuti anche su cellule differenziate; anche in questo caso le cellule sono state dapprima trattate con KCl 100 mM per 10 minuti e dopo 8h è stato aggiunto il perossido di

idrogeno. Nel caso delle cellule differenziate la concentrazione di perossido usata è stata di 450  $\mu\text{M}$ . Dopo 24h si è andati ad analizzare la sopravvivenza delle cellule preconditionate rispetto a quelle controllo; per le cellule differenziate la percentuale di sopravvivenza delle cellule preconditionate dopo insulto è di circa il 40%. Anche in questo caso siamo riusciti ad indurre il fenomeno del *Preconditioning*.

Tali risultati sono in linea con i dati della letteratura; è riportato infatti per altri sistemi *in vitro* che il trattamento con KCl, seguito da un insulto che può essere diverso dal perossido di idrogeno, porta ad un aumento di vitalità cellulare tra il 15% ed il 40% (Rensburg et al., 2009; Hester et al., 2007). Si è inoltre andati a valutare la risposta cellulare al *Preconditioning* e danno molecolare aumentando i tempi di *Preconditioning*, passando da 8h a 24h di induzione con KCl. Il dato mostrato, anche se preliminare, suggerisce che anche con queste condizioni sperimentali, vi è un aumento della sopravvivenza di cellule differenziate preconditionate rispetto a cellule controllo trattate solo  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Si è quindi passati ad analizzare il fenomeno del *Preconditioning* a livello molecolare. Nello specifico si è deciso di utilizzare solo cellule differenziate e di focalizzare l'attenzione su alcuni specifici geni neuroprotettivi: BDNF, BDNF-AS, HIF1 $\alpha$ , c-Fos.

I geni BDNF, BDNF-AS e HIF1 $\alpha$  sembrano risentire già dell'induzione del KCl; per questi geni infatti si osserva un leggero aumento della quantità del

trascritto nelle fasi precoci dell'induzione che poi raggiunge il picco massimo ad 8h dal trattamento.

Per c-Fos sembra invece che l'azione del KCl induca una diminuzione del livello del trascritto soprattutto nelle fasi precoci dell'induzione (30 minuti) per poi tornare ad una situazione di tipo basale ad 8h.

Dopo aver valutato l'azione del solo KCl, si è deciso di andare a valutare la risposta di questi geni dopo induzione del *Preconditioning* e danno molecolare.

Per i geni BDNF e BDNF-AS si ha un aumento del livello del trascritto dopo danno molecolare in cellule preconditionate. HIF1 $\alpha$  non mostra invece variazioni ad entrambi i tempi analizzati, sarà interessante andare a valutare la risposta di questo gene a tempi successivi dall'induzione del danno molecolare. c-Fos sembra invece diminuire il suo livello di espressione dopo l'induzione del danno in cellule preconditionate rispetto a cellule controllo.

Essendo BDNF implicato nella sinaptogenesi, nella rigenerazione neuronale, nello sviluppo della memoria e nell'angiogenesi (Chen et al., 2012), non stupisce che in seguito a danno molecolare le cellule richiedano come meccanismo di neuroprotezione l'attivazione precoce di tale fattore. E' stato inoltre ipotizzato che, durante la neuroprotezione, fosse importante anche seguire l'andamento di accumulo del trascritto antisenso di BDNF (BDNF-AS). Recenti studi hanno infatti dimostrato che, in seguito al

trattamento con KCl, i trascritti senso ed antisenso di BDNF hanno un profilo di espressione complementare; il trascritto antisenso avrebbe quindi la funzione di andare a regolare l'espressione del trascritto senso di BDNF (Lipovich et al., 2012). Alla luce dei dati presenti in letteratura, la diminuzione del livello del trascritto di BDNF-AS a 30 minuti dall'induzione del danno potrebbe essere interpretata come una ridotta inibizione dell'espressione del gene BDNF, che mostra infatti un aumento significativo del suo trascritto a 60 minuti. Nel sistema nervoso è stato ipotizzato un ruolo di regolazione da parte di trascritti antisenso derivanti anche da altri geni (Carrieri et al. 2012).

L'aumento del livello di espressione del gene HIF1 $\alpha$  in seguito al *Preconditioning* è in linea con la funzione, nota in letteratura, di tale gene. HIF1 $\alpha$  è un fattore di trascrizione che partecipa al corretto smaltimento dei ROS (specie reattive dell'ossigeno) in eccesso durante fenomeni di ischemia o ipossia. Tra i ROS ricordiamo il perossido di idrogeno. Nan-Liu et al. (2013) hanno dimostrato che quando il livello di HIF1 $\alpha$  aumenta si ha un aumento delle funzioni neurologiche in ratti trattati con *Preconditioning* farmacologico. Sarà interessante andare a valutare la risposta anche del suo trascritto antisenso, che potrebbe giocare un ruolo chiave nella regolazione di questo gene in seguito a *Preconditioning* e danno molecolare.

Si è inoltre andati a valutare, come primo approccio sperimentale di modifiche epigenetiche, il livello globale di dimetilazione degli istoni H3

nelle lisine 4 e 9 in cellule ad 8h dall'induzione del *Preconditioning*. La dimetilazione in H3K4 diminuisce globalmente di circa il 10% in accordo con quanto ottenuto nel sistema *in vivo*, ma si registra anche lo stesso livello di diminuzione in H3K9. Essendo questo un primo risultato sperimentale non è possibile valutarne la significatività e quindi si dovrà ripetere l'esperimento, anche a tempi diversi dall'induzione.

In conclusione i dati ottenuti, supportati anche da dati presenti in letteratura, suggeriscono una forte regolazione dei geni neuroprotettivi saggiati sia in seguito alla sola induzione del *Preconditioning* che in risposta al danno molecolare.

Sarà interessante andare a valutare se l'aumento del livello di espressione di tali geni dopo *Preconditioning* e danno molecolare sottenda la presenza di una memoria molecolare che prepara le cellule a rispondere in maniera più veloce in seguito ad un insulto. Tale memoria molecolare potrebbe essere collegata al rimodellamento della cromatina che viene indotto dall'azione del KCl e potrebbe generare una conformazione più accessibile all'apparato trascrizionale che si conserverebbe nel tempo. Tale ipotesi potrebbe essere validata tramite esperimenti di ChIP, 3C, meDIP su cellule precondizionate.

## *Bibliografia*

Akbarian S, Huang HS (2009), Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation. *Biol Psychiatry*. 65: 198-203

Andoh T, Chock PB, Chiueh CC (2002), Preconditioning-mediated neuroprotection: role of nitric oxide, cGMP, and new protein expression. . *Ann N Y Acad Sci*. 962:1-7

Beck CR, Collier P, Macfarlane C, Malig M, Kidd JM, Eichler EE, Badge RM, Moran JV (2010), LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. *Cell* 141:1159-1170

Branciforte D, Martin SL (1994), Developmental and cell type specificity of LINE-1 expression in mouse testis: implications for transposition. *Mol Cell Biol*. 14:2584-2592

Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K (2014), Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron*.81:306-313

Carrieri C, Cimatti L, Biagioli M, Beugnet A, Zucchelli S, Fedele S, Pesce E, Ferrer I, Collavin L, Santoro C, Forrest AR, Carninci P, Biffo S, Stupka E, Gustincich S (2012), Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature* 491:454-457

Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M (2013), The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Rep.* 1:167-176

Cho S, Park EM, Zhou P, Frys K, Ross ME, Iadecola C (2005), Obligatory role of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25:493-501

Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM (2003), Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 26:248-254

Erwin JA, Marchetto MC, Gage FH (2014), Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 15:497-506

Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, Silva AJ, Fan G (2010), Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci.* 13(4): 423-430

Ghaffari H, Venkataramana M, Jalali Ghassam B, Chandra Nayaka S, Nataraju A, Geetha NP, Prakash HS (2014), Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neuronal cell damage in N2A cells. *Life Sci.* 113:7-13

Gidday JM (2006), Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci.* 7:437-448

Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL (2009), New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci.* 29:12764-12767

Guo JU, Su Y, Shin JH, Shin J, Li H, Xie B, Zhong C, Hu S, Le T, Fan G, Zhu H, Chang Q, Gao Y, Ming G, Song H (2014), Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci.* 17:215–222

Guo JU, Szulwach KE, Su Y, Li Y, Yao B, Xu Z, Shin JH, Xie B, Gao Y, Ming GL, Jin P, Song H (2015), Genome-wide antagonism between 5-hydroxymethylcytosine and DNA methylation in the adult mouse brain. *Front Biol (Beijing).* 9:66-74

Gros C, Fahy J, Halby L, Dufau I, Erdmann A, Gregoire JM, Ausseil F, Vispé S, Arimondo PB (2012), DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie*. 94:2280-2296

Hartley I, Elkhoury FF, Heon Shin J, Xie B, Gu X, Gao Y, Zhou D, Haddad GG (2013), Long-lasting changes in DNA methylation following short-term hypoxic exposure in primary hippocampal neuronal cultures. *PLoS One*. 8:e77859 eCollection 2013

Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X (2010), Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics*. 2010 2:657-669

Herdegen T, Sandkühler J, Gass P, Kiessling M, Bravo R, Zimmermann M (1993), JUN, FOS, KROX, and CREB transcription factor proteins in the rat cortex: basal expression and induction by spreading depression and epileptic seizures. *J Comp Neurol*. 333:271-288

Herrera DG, Robertson HA (1990), Application of potassium chloride to the brain surface induces the c-fos proto-oncogene: reversal by MK-801. *Brain Res*. 510:166-170.

Hester I, McKee S, Pelletier P, Thompson C, Storbeck C, Mears A, Schulz JB, Hakim AA, Sabourin LA (2007), Transient expression of Nxf, a bHLH-PAS transactivator induced by neuronal preconditioning, confers neuroprotection in cultured cells. *Brain Res.* 1135:1-11

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998), Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci* 95:7987-7992

Iskow RC, McCabe MT, Mills RE, Torene S, Pittard WS, Neuwald AF, Van Meir EG, Vertino PM, Devine SE (2010), Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell.* 141:1253-1261

Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, Berdasco M, Fraga MF, O'Hanlon TP, Rider LG, Jacinto FV, Lopez-Longo FJ, Dopazo J, Forn M, Peinado MA, Carreño L, Sawalha AH, Harley JB, Siebert R, Esteller M, Miller FW, Ballestar E (2010), Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res.* 20:170-179

Karikó K, Harris VA, Rangel Y, Duvall ME, Welsh FA (1998), Effect of cortical spreading depression on the levels of mRNA coding for putative neuroprotective proteins in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18:1308-1315

Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, Okano M, Li E, Nozaki M, Sasaki H (2007), Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet.* 16:2272-2280

Kim Y, Seo M, Lee YI, Kim SY, Cho EA, Kim SH, Ahn YM, Kang UG, Kim YS, Juhn YS (2008), Interaction between Neuronal Depolarization and MK-801 in SH-SY5Y Cells and the Rat Cortex. *Psychiatry Investig.* 5:94-101

Kirino T (2006), Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22:1283-1296

Korecka JA, van Kesteren RE, Blaas E, Spitzer SO, Kamstra JH, Smit AB, Swaab DF, Verhaagen J, Bossers K (2013), Phenotypic characterization of retinoic acid differentiated SH-SY5Y cells by transcriptional profiling. *PLoS One* 8(5):e63862

Kozlenkov A, Roussos P, Timashpolsky A, Barbu M, Rudchenko S, Bibikova M, Klotzle B, Byne W, Lyddon R, Di Narzo AF, Hurd YL, Koonin EV, Dracheva S (2013), Differences in DNA methylation between human neuronal and glial cells are concentrated in enhancers and non-CpG sites. *Nucleic Acids Res.* 42:109–127

Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T (2008), DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.* 22:908-917

Leao A.A.P (1944), Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7: 359–390

Lee YI, Seo M, Kim Y, Kim SY, Kang UG, Kim YS, Juhn YS (2005), Membrane depolarization induces the undulating phosphorylation/dephosphorylation of glycogen synthase kinase3, and this dephosphorylation involves protein phosphatases 2A and 2B in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 280:22044-22052

Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH (2003), Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol.* 13:1192-1200

Levin HL, Moran JV (2011), Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat Rev Genet.* 12:615-627

Li E (2002), Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 3:662-673

Lipovich L, Dacht F, Cai J, Bagla S, Balan K, Jia H, Loeb JA (2012), Activity-dependent human brain coding/noncoding gene regulatory networks. *Genetics.* 192:1133-1148

Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, Lucero J, Huang Y, Dwork AJ, Schultz MD, Yu M, Tonti-Filippini J, Heyn H, Hu S, Wu JC, Rao A, Esteller M, He C, Haghghi FG, Sejnowski TJ, Behrens MM, Ecker JR (2013), Global Epigenomic Reconfiguration During Mammalian Brain Development. *Science* 341: DOI: 10.1126/science.1237905.

Liu BN, Han BX, Liu F (2014), Neuroprotective effect of pAkt and HIF-1  $\alpha$  on ischemia rats. *Asian Pac J Trop Med.* 7:221-225

Liu XQ, Sheng R, Qin ZH (2009) The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacol Sin.* 30:1071-1080

Lu H, Liu X, Deng Y, Qing H (2013), DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci.* 5: DOI: 10.3389/fnagi.2013.00085

Lucchinetti E, Feng J, Silva Rd, Tolstonog GV, Schaub MC, Schumann GG, Zaugg M (2006), Inhibition of LINE-1 expression in the heart decreases ischemic damage by activation of Akt/PKB signaling. *Physiol Genomics* 25:314-324

Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SH, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Thiessen N, Shchors K, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Schillebeeckx M, Jones SJM, Haussler D, Marra MA, Hirst M, Wang T, Costello JF (2010), Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466:253-257

Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL (2005), Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 105:659-669

Massa SM, Yang T, Xie Y, Shi J, Bilgen M, Joyce JN, Nehama D, Rajadas J, Longo FM (2010), Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents. *J Clin Invest*. 120:1774-1785

Mellén M, Ayata P, Dewell S, Kriaucionis S, Heintz N (2012), MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* 151:1417-1430

Moo Lee j, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW (2000), Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest*. 106: 723–731

Muotri AR, Marchetto MC, Coufal NG, Oefner R, Yeo G, Nakashima K, Gage FH (2010), L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* 468:443-446

Passaro D, Rana G, Piscopo M, Viggiano E, De Luca B, Fucci L (2010), Epigenetic chromatin modifications in the cortical spreading depression. *Brain Res*.1329:1-9

Pezic D, Manakov SA, Sachidanandam R, Aravin AA (2014), piRNA pathway targets active LINE1 elements to establish the repressive H3K9me3 mark in germ cells. *Genes Dev.* 28:1410-1428

Pietrobon D, Moskowitz MA (2014), Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci.* 15:379-393

Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T (2007), Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics.* 90:397-406

Rana G, Donizetti A, Virelli G, Piscopo M, Viggiano E, De Luca B, Fucci L (2012), Cortical spreading depression differentially affects lysine methylation of H3 histone at neuroprotective genes and retrotransposon sequences. *Brain Res.* 1467:113-119

Ravati A, Ahlemeyer B, Becker A, Klumpp S, Kriegstein J (2001), Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *J Neurochem.* 78:909-919

Rose NR, Klose RJ (2014), Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta.* 839:1362-1372

Sailaja BS, Cohen-Carmon D, Zimmerman G, Soreq H, Meshorer E (2012), Stress-induced epigenetic transcriptional memory of acetylcholinesterase by HDAC4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:E3687-95

Sati S, Tanwar VS, Kumar KA, Patowary A, Jain V, Ghosh S, Ahmad S, Singh M, Reddy SU, Chandak GR, Raghunath M, Sivasubbu S, Chakraborty K, Scaria V, Sengupta S (2012), High resolution methylome map of rat indicates role of intragenic DNA methylation in identification of coding region. *PLoS One* 7: DOI: 10.1371/journal.pone.0031621

Serman A, Vlahovic M, Serman L, Bulic-Jakus F (2006), DNA Methylation as a Regulatory Mechanism for Gene Expression in Mammals. *Coll. Antropol.* 3:665–671

Sharp FR, Ran R, Lu A, Tang Y, Strauss KI, Glass T, Ardizzone T, Bernaudin M (2004), Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx.* 1:26-35

Shukla R, Upton KR, Muñoz-Lopez M, Gerhardt DJ, Fisher ME, Nguyen T, Brennan PM, Baillie JK, Collino A, Ghisletti S, Sinha S, Iannelli F, Radaelli E, Dos Santos A, Rapoud D, Guettier C, Samuel D, Natoli G, Carninci P, Ciccarelli FD, Garcia-Perez JL, Faivre J, Faulkner GJ (2013), Endogenous retrotransposition activates oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. *Cell* 153:101-111

Singer T, McConnell MJ, Marchetto MC, Coufal NG, Gage FH (2010), LINE-1 retrotransposons: mediators of somatic variation in neuronal genomes?. *Trends Neurosci.* 33:345-354

Smit AF, Toth G, Riggs AD, Jurka, J (1995), Ancestral mammalian-wide subfamilies of LINE-1 repetitive sequences. *J. Mol. Biol.* 246:401–417

Solyom S, Ewing AD, Rahrman EP, Doucet T, Nelson HH, Burns MB, Harris RS, Sigmon DF, Casella A, Erlanger B, Wheelan S, Upton KR, Shukla R, Faulkner GJ, Largaespada DA, Kazazian HH Jr (2012), Extensive somatic L1 retrotransposition in colorectal tumors. *Genome Res.* 22:2328-2338

Stetler RA, Leak RK, Gan Y, Li P, Zhang F, Hu X, Jing Z, Chen J, Zigmond MJ, Gao Y (2014), Preconditioning provides neuroprotection in models of

CNS disease: paradigms and clinical significance. *Prog Neurobiol.* 114:58-83

Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S (2014), DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol.* 4:80 eCollection 2014

Sui XQ, Xu ZM, Xie MB, Pei DA (2014), Resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis in endothelial cells via the activation of PI3K/Akt by miR-126. *J Atheroscler Thromb.* 21:108-118

Tiedemann RL, Putiri EL, Lee JH, Hlady RA, Kashiwagi K, Ordog T, Zhang Z, Liu C, Choi JH, Robertson KD (2015) , Acute depletion redefines the division of labor among DNA methyltransferases in methylating the human genome. *Cell Rep.* 9:1554-1566

Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005), ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75<sup>NTR</sup> and sortilin. *J Neurosci.* 25:5455-5463

Urbach A, Bruehl C, Witte OW (2006), Microarray-based long-term detection of genes differentially expressed after cortical spreading depression. *Eur J Neurosci.* 24:841-856

Viggiano E, Ferrara D, Izzo G, Viggiano A, Minucci S, Monda M, De Luca B (2008), Cortical spreading depression induces the expression of iNOS, HIF-1alpha, and LDH-A. *Neuroscience* 153:182-188

van Rensburg R, Errington DR, Ennaceur A, Lees G, Obrenovitch TP, Chazot PL (2009), A new model for the study of high-K(+)-induced preconditioning in cultured neurones: role of N-methyl-d-aspartate and alpha7-nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci Methods.* 177:311-316

Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH (1998), Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet.* 20:116-117

Wang S, Kelly S (2013), Global cerebral ischemia induces increased expression of multiple retrotransposons. *Biochem Biophys Res Commun.* 434:572-576

Wen L, Tang F (2014), Genomic distribution and possible functions of DNA hydroxymethylation in the brain. *Genomics* 104:341-346

Xu F, Mao C, Ding Y, Rui C, Wu L, Shi A, Zhang H, Zhang L, Xu Z (2010), Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs. *Curr Med Chem.* 17:4052-4071

Yanamoto H, Xue JH, Miyamoto S, Nagata I, Nakano Y, Murao K, Kikuchi H (2004), Spreading depression induces long-lasting brain protection against infarcted lesion development via BDNF gene-dependent mechanism. *Brain Res.* 1019:178-188

Yu F, Zingler N, Schumann G, Strätling WH (2001), Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Res.* 29:4493-4501

Zamudio N, Bourc'his D (2010), Transposable elements in the mammalian germline: a comfortable niche or a deadly trap? *Heredity (Edinb)* 105:92-104

Zhao S, Fernald RD (2005), Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol.* 12:1047-1010