



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

FATTORI GENETICI ED AMBIENTALI CHE REGOLANO
LA RISPOSTA ALLO STRESS

GENETIC AND ENVIRONMENTAL FACTORS REGULATING
THE STRESS RESPONSE

Tesi di Laurea di:
Valentina Telloni

Docente Referente:
Mara Fabri

Sessione Estiva 2023
Anno Accademico 2022-2023

STRESS = Condizione dell'organismo in seguito ad uno stimolo potenzialmente pericoloso (= **STRESSOR**) che induce una risposta fisiologica.

Obiettivo:

- Risoluzione situazione stressante
- Determinazione nuove strategie di affronto

come?

*Coinvolgimento Sistema Nervoso Autonomo
Neuroendocrino
Metabolico
Immunitario*

Asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene

Nucleo Paraventricolare Ipotalamo:

Ormone di Rilascio della Corticotropina (CRH)
Ormone Arginina Vasopressina (AVP)

Ipofisi:

Ormone Adrenocorticotropo (ACTH)

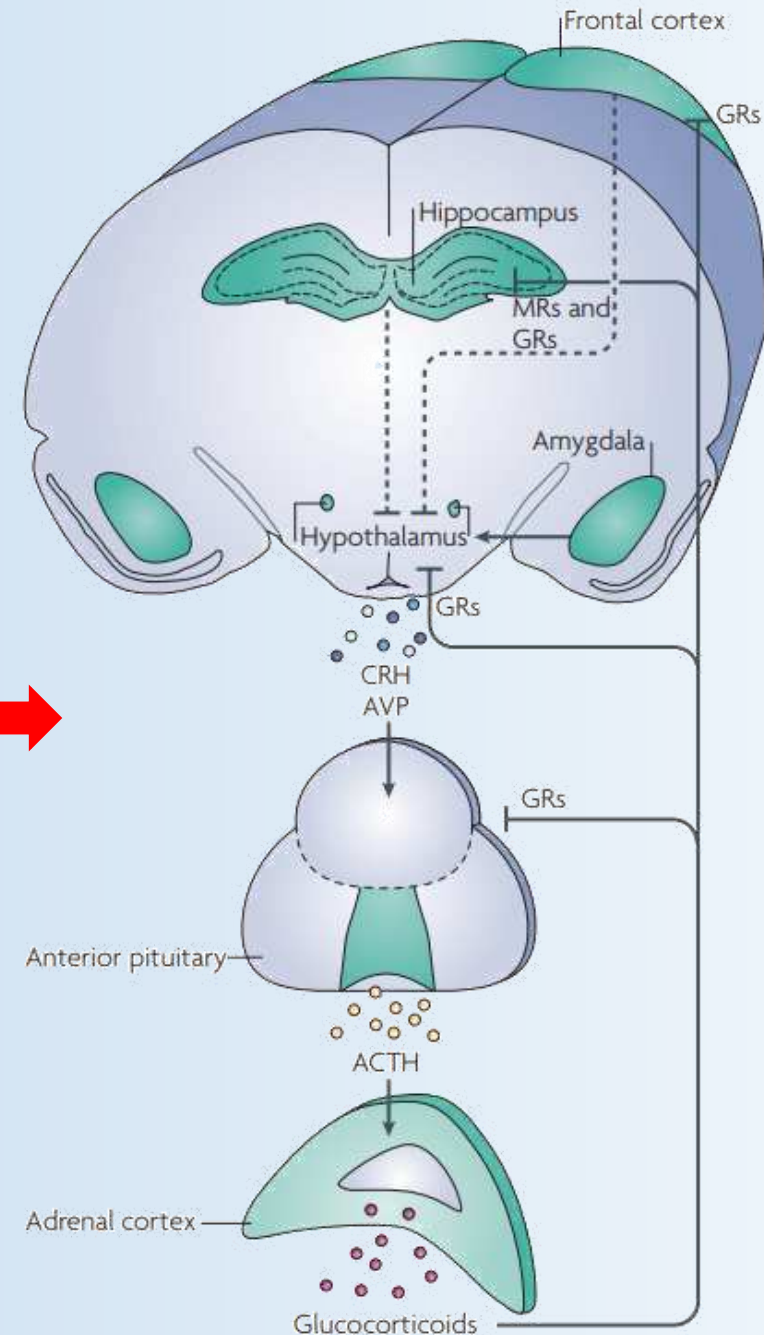
Corticale del Surrene:

Glucocorticoidi

Tessuti

Recettore Glucocorticoide (GR)

Recettore Mineralcorticoide (MR)



Stimolo stressorio = fattore **ambientale** che influenza diversi processi cellulari, *tra cui*: **modificazioni della cromatina.**



MODIFICAZIONI EPIGENETICHE

= Regolazioni dinamiche dell'espressione genica, a **breve** o a **lungo termine**, che non prevedono cambiamenti della sequenza nucleotidica del DNA.

Esse sono una **risposta compensatoria** dello stress, che può essere di *due tipologie*:

Risposta a breve termine:

consiste in un'alterata trascrizione degli mRNA a seguito di esposizione a stress con il fine di mantenere l'omeostasi e di superare l'impatto ambientale;

Risposta a lungo termine:

richiede una sequenza di risposte molecolari immediate che *poi* portano ad aggiustamenti epigenetici di lunga durata.

RISPOSTA A LUNGO TERMINE



I fattori che determinano tale risposta: → QUALITÀ
→ INTENSITÀ
→ TEMPISMO

dell'esposizione
allo stressor

TEMPISMO = uno dei fattori cruciali nel determinare cambiamenti epigenetici in risposta allo stress.

Perché? I meccanismi epigenetici = **importanza fondamentale durante lo sviluppo**

Ruolo nella determinazione
delle linee cellulari

*Dallo sviluppo prenatale alla fine
dell'adolescenza:*

Sviluppo e maturazione dei circuiti
neuronal che sono alla base del:

→ **Vulnerabilità allo stress
età-dipendente !**

Comportamento
complesso

Vie per la
regolazione
immunologica ed
ormonale

= Impatto sulla **vulnerabilità** o **resilienza** allo stress

MECCANISMI

□ Modificazioni epigenetiche Post-Traduzionali

Esempio, methyl CpG binding protein 2 (MeCP2):
proteina che si lega direttamente al DNA metilato;

Nei Ratti: Separazione materna → P-MeCP2:
dissociazione nel promotore del gene AVP →
demetilazione → espressione gene.

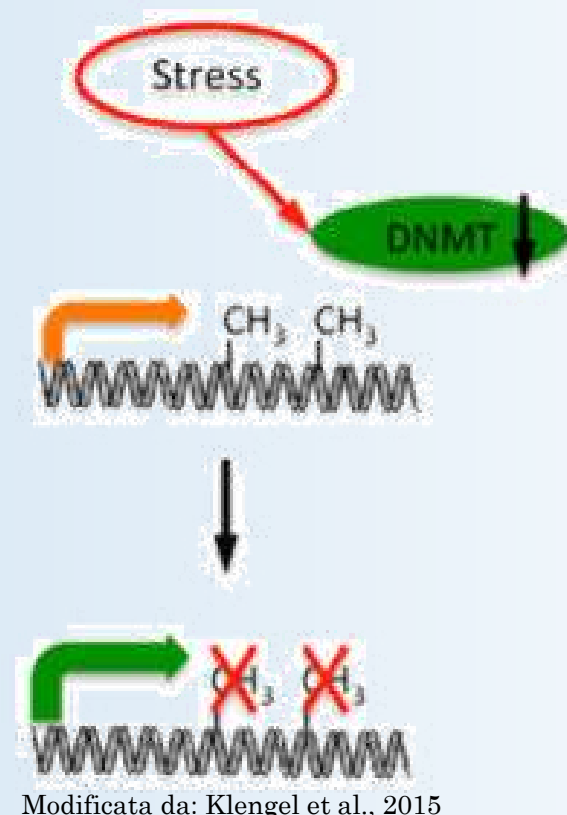
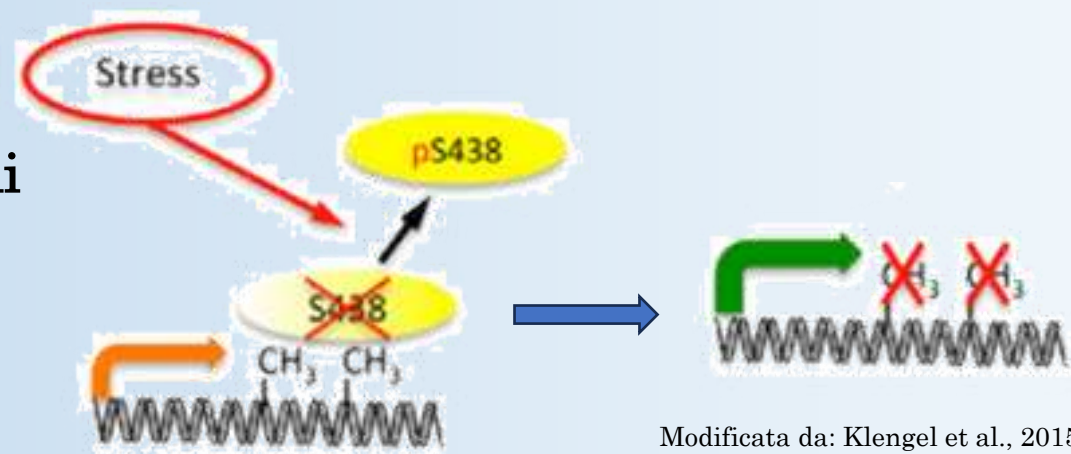
Se: eliminazione MeCP2 →
aumento livelli espressione mRNA dei geni di risposta ai Glucocorticoidi,
Es, fk05 binding protein 5 (fkbp5).

□ Regolazione della Trascrizione

Esempio, DNA (cytosine-5)-methyl-transferase 1 (DNMT1):
principale enzima per mantenere la metilazione del DNA.

esposizione Desametasone* → diminuzione espressione dell'enzima DNMT1
(nei Ratti) → riduzione metilazione gene fkbp5

*Desametasone = agonista Recettore Glucocorticoide



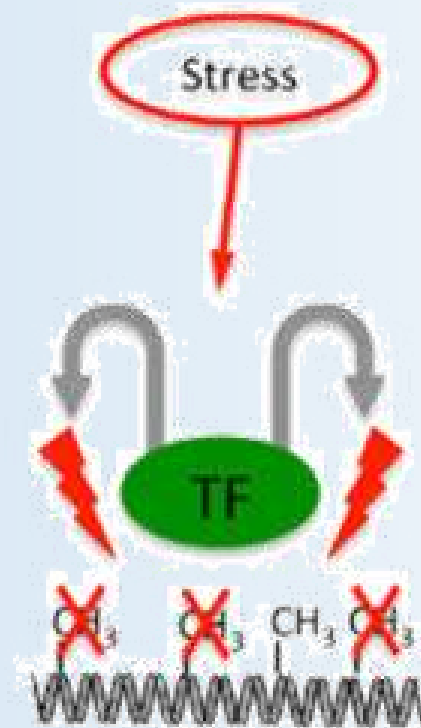
RISPOSTA A LUNGO TERMINE



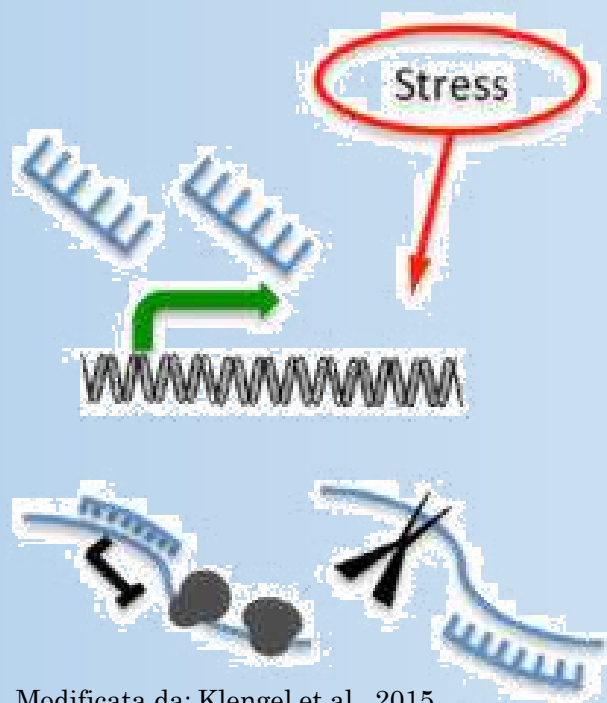
□ Attivazione Fattori di Trascrizione

Esempio, attivazione **Recettore Glucocorticoide (GR)** → locale demetilazione degli Elementi di risposta del Recettore Glucocorticoide (GRE) → Effetto trascrizionale dei geni target da parte del GR.

Macchina Riparatrice del DNA implicata in questo meccanismo, anche se non ancora del tutto noto.



Modificata da: Klengel et al., 2015



Modificata da: Klengel et al., 2015

□ Segnalazione attraverso piccoli RNA non codificanti

Piccoli RNA non codificanti nella forma di miRNA.

Esempio, esposizione a stress → up-regulation di **miR-34C** → interazione regione 3'UTR gene Recettore 1 del CRH (*crhr1*) → diminuzione espressione.



RISPOSTA A BREVE TERMINE

Una delle prime risposte dell'organismo in seguito a stimolo stressorio.

Mantenimento dell'equilibrio interno, o Omeostasi – *come?*

→ Rimodellamento espressione genica e attivazione trascrizionale di fattori, come: **proteina DRR1**.

Down-regulated in renal cell carcinoma 1 o DRR1:

Inizialmente: funzione oncosoppressore

Recentemente: osservazione di **elevata espressione nel Sistema Nervoso**



Studi che hanno portato a numerose scoperte:

- Il gene di DRR1: dotato degli Elementi di risposta del Recettore Glucocorticoide (GRE) → Regolazione da parte dei Glucocorticoidi = DRR1, è al momento l'unica **proteina stress-indotta nel cervello** → **Reazione compensatoria per il mantenimento dell'omeostasi.**
- La proteina DRR1: **lega l'actina**, raggruppando e stabilizzando i filamenti actinici → **funzione di modulazione della funzionalità sinaptica e della neuroplasticità.**
- Capacità di **modulare i processi cognitivi legati all'ippocampo:**

Regione CA3 Ippocampo — *Sovra-espressione virus-mediata della proteina* → Aumento performance cognitiva

RISPOSTA A BREVE TERMINE

Elevata espressione proteina nel Setto Laterale



Studio nel 2014: *modulazione anche dei domini comportamentali legati al Setto in risposta a stress nei Ratti?*

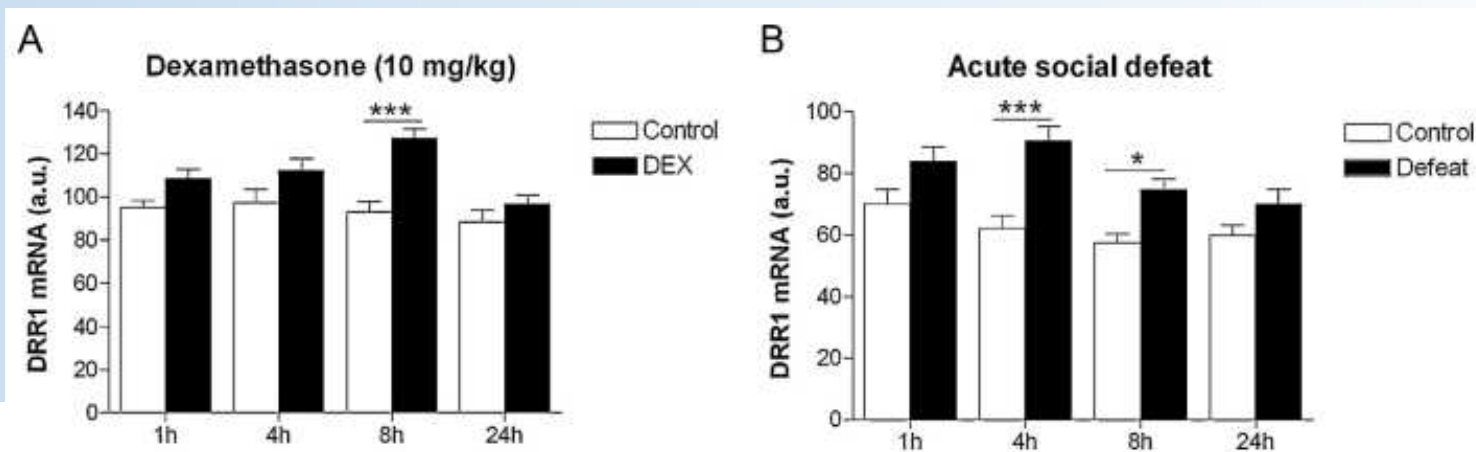


Integrazione informazioni con il fine di:

- Rispondere allo stress
- Elaborare processi emozionali
- Elaborare comportamento sociale

Osservazioni:

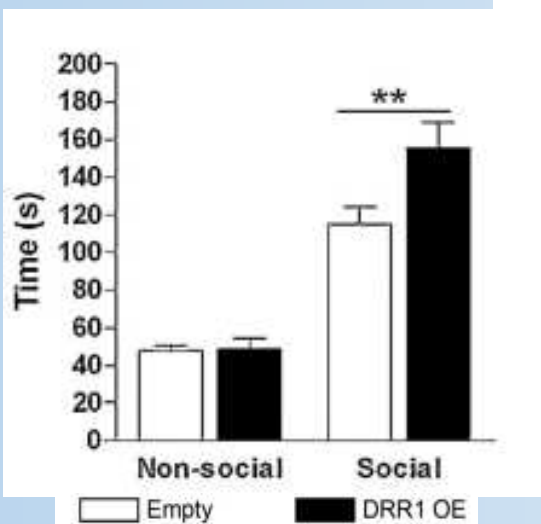
- ❖ Analisi dei livelli dell'mRNA di DRR1
- aumento dopo iniezione Desametasone (A)
- aumento dopo 5 minuti di *Sconfitta Sociale Acuta* (B)



Masana et al., 2014

Non-social: Target non sociale del Test della Sociabilità

Social: Target sociale del Test della Sociabilità



- ❖ Analisi comportamentale in seguito ad over-espressione di DRR1 attraverso un vettore virale associato ad Adenovirus nel gruppo in analisi (DRR1 OE), poi batteria di test (gruppo di analisi e controllo)

- cambiamento comportamentale durante il *Test della sociabilità*: aumento livello della sociabilità.

RISPOSTA A BREVE TERMINE



- ❖ In condizioni basali: localizzazione proteina DRR1 in neuroni, astrociti e nei loro nuclei, tramite la co-localizzazione con marker neuronali e astrogliali usando l'immunofluorescenza.

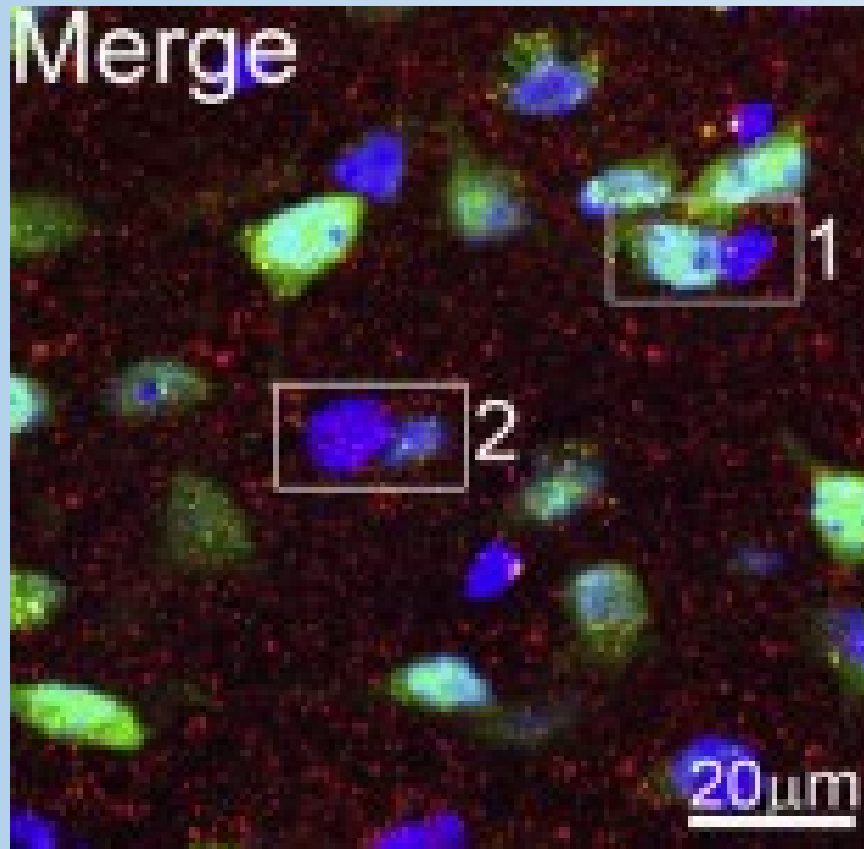
Proteina DRR1

nei Neuroni:

Rosso: DRR1

Verde: NeuN →
marker
neuronale

Blu: DAPI →
Nuclei neuronali
e gliali;



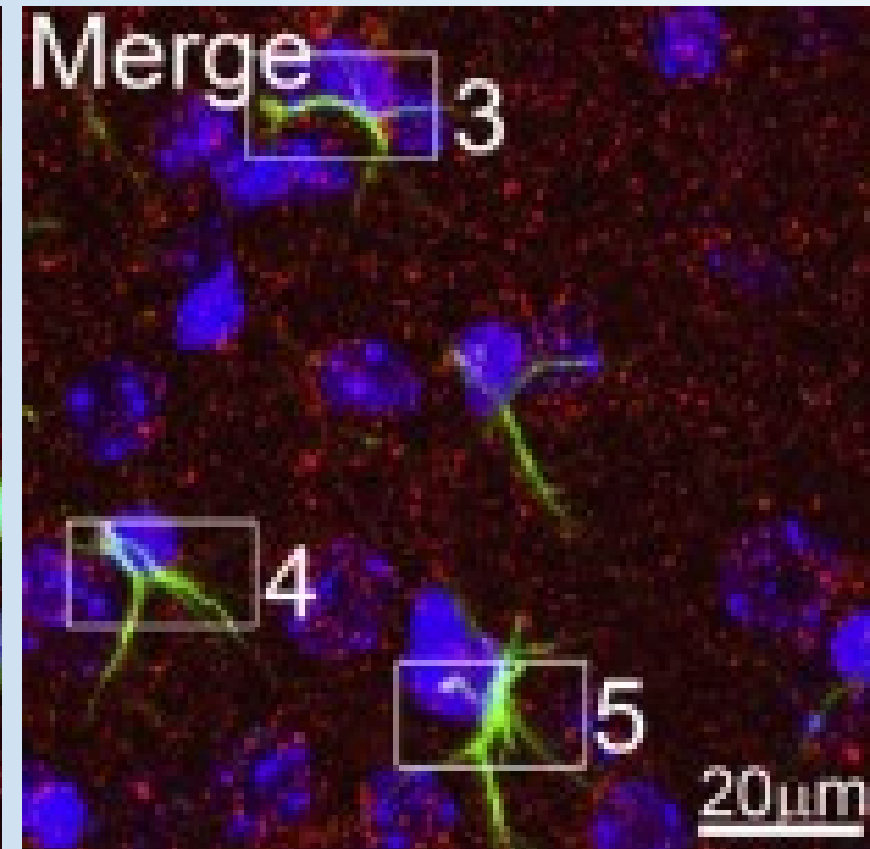
Proteina DRR1

negli Astrociti:

Rosso: DRR1

Verde: GFAP →
marker
astrogliale

Blu: DAPI



Modificate da: Masana et al., 2014

DRR1 nel Setto Laterale in risposta a stress:

- Promozione della resilienza attraverso il comportamento sociale;
- Controllo funzioni neuronali e comportamento attraverso modificazioni delle dinamiche actiniche;
- Probabile modulazione della risposta allo stress attraverso il rimodellamento della cromatina.

RISPOSTA A BREVE TERMINE



Funzione DRR1 di modulazione funzionalità sinaptica e neuroplasticità → *confermata* da due studi.

Studio nel 2018: trattamento con Desametasone in Ratti adulti → analisi localizzazione subcellulare dell'espressione di DRR1 (su tessuto ippocampale).

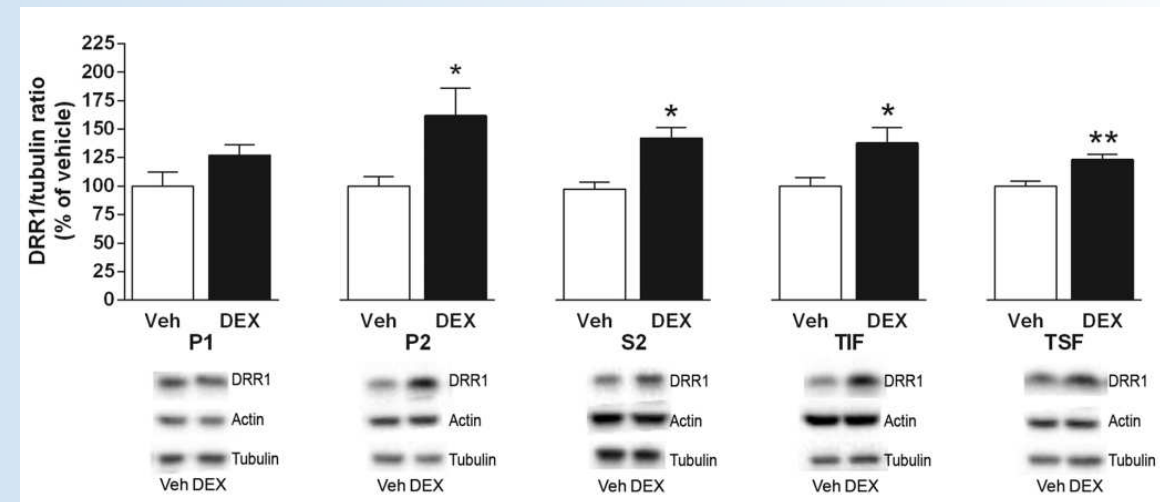
↳ Aumento della DRR1 nella frazione di membrana grezza (P2), nel citosol (S2), e nelle regioni sinaptiche: Frazioni Triton-Insolubili (TIF) e Frazioni Triton-Solubili (TSF).

DRR1 è espressa in dendriti ed assoni ed è parte, sebbene non integrante, delle strutture sinaptiche.

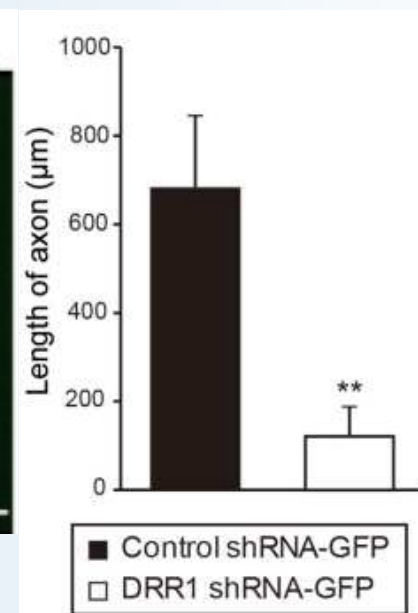
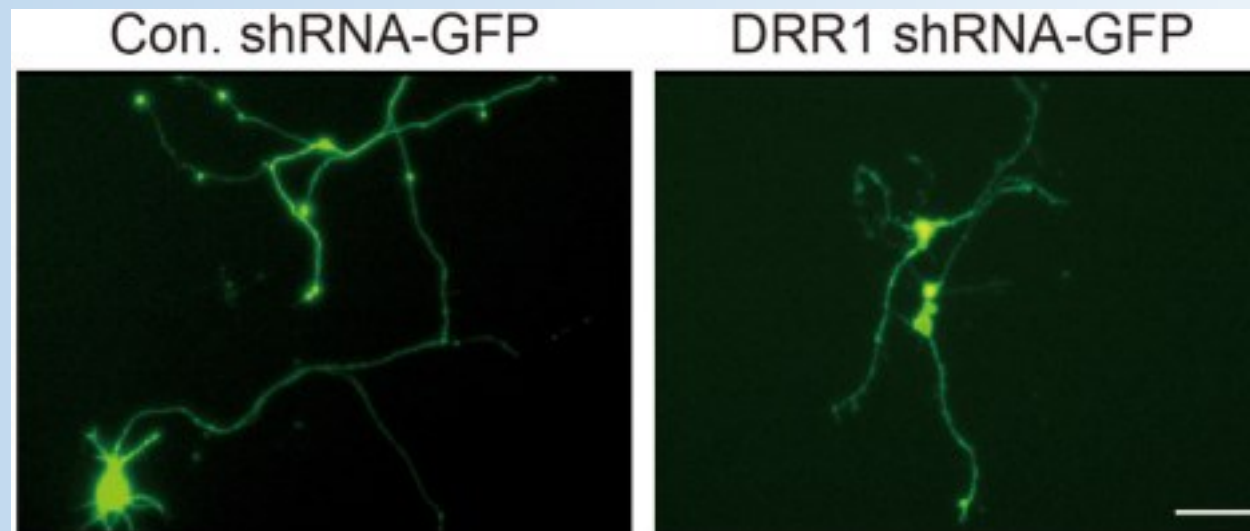
Studio nel 2021: analisi espressione proteina a diversi stadi dello sviluppo nel cervello e nelle colture primarie ippocampali di Ratto → mRNA presente durante l'intero sviluppo neuronale.

Inoltre, attraverso trasfezione cellulare di short hairpin RNA che silenziano il gene DRR1 (DRR1 shRNA-GFP) → riduzione lunghezza assoni.

DRR1 durante lo sviluppo → funzione nella regolazione dello sviluppo assonico e formazione sinaptica.



Modificata da: Masana et al., 2018



Modificate da: Fangjin et al., 2021

DRR1 → Nuovo link molecolare tra **stress**, **efficacia sinaptica** e **performance comportamentale**, grazie alla sua capacità di legare l'actina e modulare le sue dinamiche.

IMPORTANZA COMPRENSIONE MECCANISMI ALLA BASE DELLA RISPOSTA ALLO STRESS

Eccessiva e prolungata esposizione a stress → attivazione delle Risposte a lungo termine = alla base dell'**insorgenza** delle «**Malattie legate allo stress**».

Espressione alterata della DRR1 = in associazione con **disordini del sistema nervoso**, come il Disturbo Bipolare e la Schizofrenia.

→ Capire **come si stabiliscono** e **come si mantengono** queste modifiche → Avere la capacità di **interferire direttamente o indirettamente** su questi «**segni**», data la loro natura reversibile, e poter quindi **invertire** e **migliorare** lo stato della malattia dell'individuo.

Sviluppo di biomarkers e nuovi trattamenti

RIASSUNTO



Quando un individuo è esposto ad un fattore stressante, o stressor, l'organismo attiva dei meccanismi fisiologici che si occupano di risolvere la situazione potenzialmente pericolosa attraverso l'attivazione di vari sistemi, tra i quali vi è l'Asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), sistema chiave della risposta allo stress.

Lo stimolo stressorio è un fattore ambientale che influenza diversi processi cellulari, tra i quali le Modificazioni Epigenetiche: risposte compensatorie allo stress che regolano l'espressione genica.

Queste modificazioni possono dare vita a due tipi di risposta: a breve termine ed a lungo termine.

L'attivazione delle **risposte a lungo termine** è influenzata da fattori quali: qualità, intensità e tempismo del fattore stressante. Il tempismo, in particolare, è un fattore cruciale per determinare questa tipologia di cambiamenti epigenetici, dato che questi meccanismi hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo cellulare e neuronale dell'individuo.

Le modalità attraverso cui si instaurano queste modifiche nel genoma che permangono nel tempo sono:

Modificazioni epigenetiche Post-Traduzionali, Regolazione della Trascrizione, Attivazione dei Fattori di Trascrizione, Segnalazione attraverso piccoli RNA non codificanti (miRNA).

Le **risposte a breve termine**, invece, sono una tipologia di risposta dell'organismo che, attraverso l'attivazione dell'espressione di vari fattori, permettono di mantenere l'equilibrio interno, o omeostasi.

Tra questi fattori è stata identificata la proteina: Down-regulated in renal cell carcinoma 1 (DRR1), indotta e regolata dallo stress. Essa ha la caratteristica di legare l'actina: di fondamentale importanza per la mediazione della risposta allo stress.

Infatti, attraverso le modificazioni delle dinamiche actiniche, si è scoperto che può regolare lo sviluppo assonico e la formazione sinaptica, e modellare la funzionalità sinaptica e la neuroplasticità; attraverso queste funzioni la DRR1 può influenzare i processi cognitivi ed emozionali legati all'ippocampo ed al setto laterale, che concorrono a promuovere la resilienza allo stress.

Infine, l'importanza di conoscere i meccanismi molecolari alla base delle risposte allo stress, è quella di contribuire allo sviluppo di biomarkers e di nuovi trattamenti per i disordini associati al sistema nervoso e per le Malattie legate allo stress.