

Comportamento ed Epigenetica

**Effetti permanenti del comportamento
sull'espressione genica**

Regolazione ambientale dell'asse HPA

Studi di manipolazione effettuati nei roditori:

- Brevi periodi di separazione (3-15 min) dalla madre durante le prime settimane di vita. Da adulti (26 mesi)
 - Diminuzione della paura
 - Minore risposta da parte di ACTH e corticosterone allo stress
 - Minori segni di invecchiamento cerebrale a livello dell'ippocampo (i glucocorticoidi inducono invecchiamento dell'ippocampo)
 - Minore diminuzione dell'attività immunitaria in conseguenza dello stress

Effetto benefico? La risposta è che gli animali manipolati sono **diversi**

Regolazione ambientale dell'asse HPA

Infatti:

- Gli animali non manipolati sono più resistenti ad infezioni indotte come l'encefalomielite allergica sperimentale (EAE)
- Quindi gli animali non manipolati possono avere vantaggi in certe circostanze.
- Il costo di tale resistenza è un aumento di vulnerabilità ai danni provocati dai glucocorticoidi.

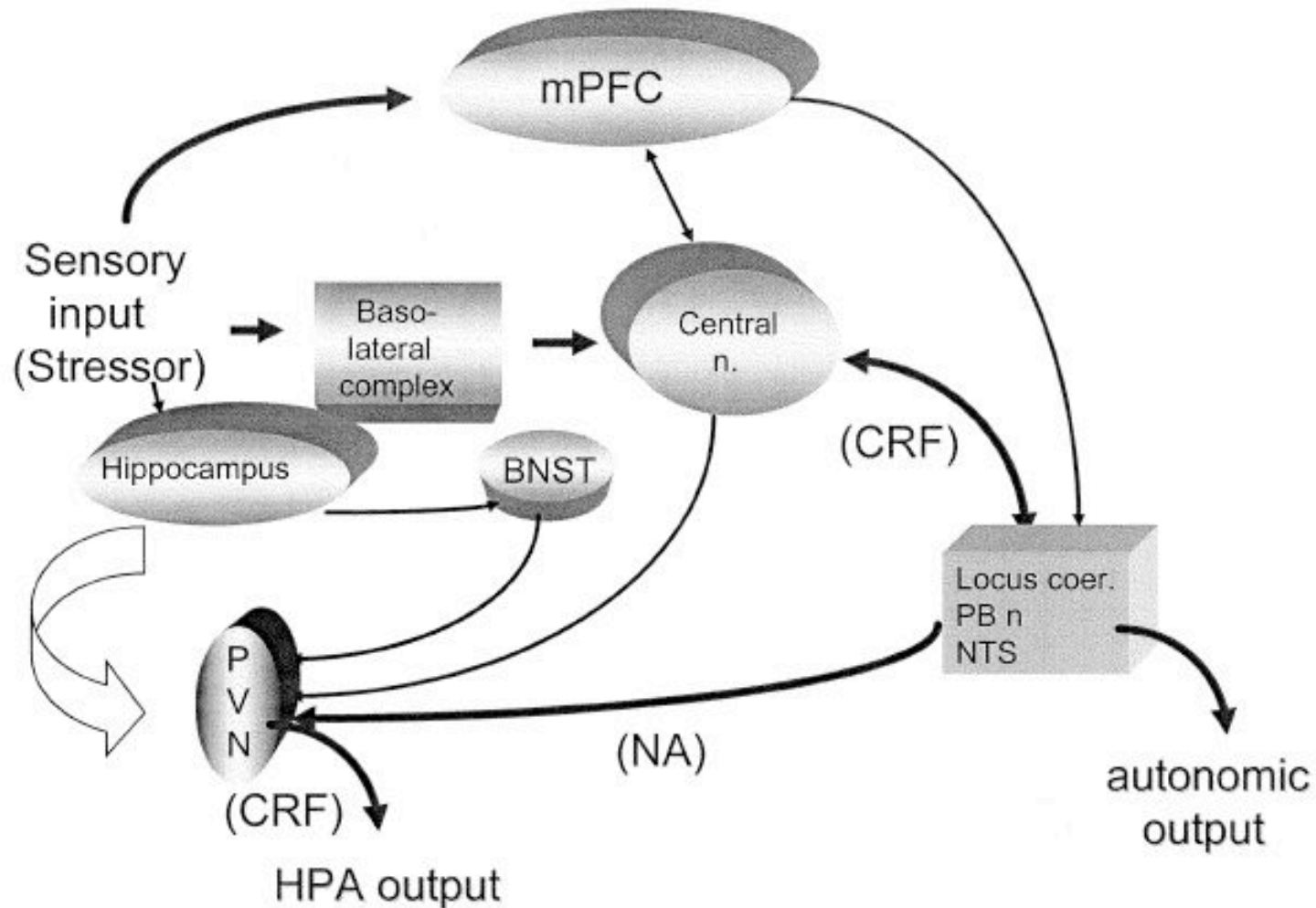
Gli studi di manipolazione rappresentano quindi un valido esempio di plasticità fenotipica nell'espressione di risposte di difesa dell'organismo.

Meccanismi neuroendocrini

Il sistema target è il sistema a CRF

- Negli animali manipolati si ha minore espressione di mRNA per il CRF in
 - **Nucleo paraventricolare**
 - **Nucleo centrale dell'amigdala**
- Diminuzione dei recettori per il CRF nel locus coeruleus

Circuito di controllo



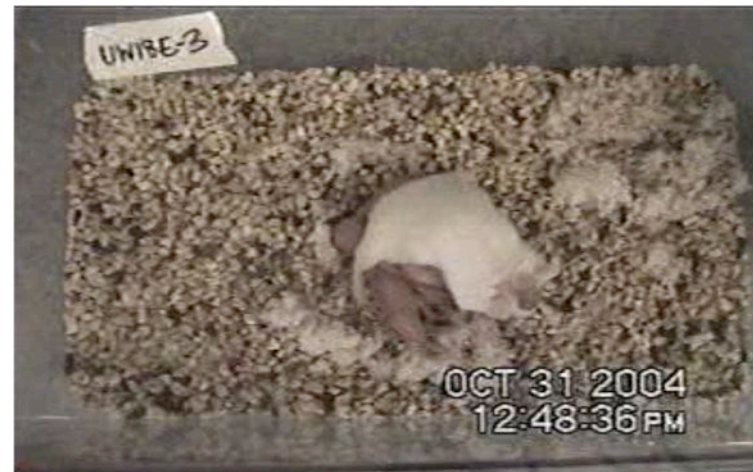
L'attivazione dell'asse HPA dipende dal release indotto da stress di noradrenalina nel PVN (che libera CRF verso l'ipofisi). L'amigdala rilascia CRF che attiva il LC inducendolo a rilasciare noradrenalina. Ci sarebbe quindi una minore attivazione del LC da parte del CRF durante lo stress in animali manipolati

Effetti sui recettori

- **La manipolazione riduce la sensibilità ai glucocorticoidi e di conseguenza induce un aumento del recettore per i glucocorticoidi nell'ippocampo e nella corteccia frontale, regioni che mediano la sintesi di CRF nel PVN**
- **I ratti manipolati hanno un incremento dei recettori GABA_A nel LC e nell'amigdala. Il GABA è un potente regolatore del sistema amigdala-LC**
- **Nell'uomo le differenze individuali nel sistema recettoriale GABA_A sono associate a vulnerabilità alle malattie su base ansiogena**
- **Gli effetti delle manipolazioni sui sistemi recettoriali GC-R e GABA_A possono interferire sulla sintesi di CRF (PVN) e sulla regolazione di siti critici come il LC.**

Manipolazioni e cure materne

- La manipolazione dei neonati aumenta il livello di cure parentali quando vengono rimessi nel nido
- Le cure parentali sono
- essenzialmente il
- licking-grooming
- Un altro comportamento
- frequente è quello di
- copertura (arched-back)



Differenti livelli di cure materne?

- **Meaney e coll. (2005) hanno ipotizzato l'esistenza di livelli differenti di cure parentali (LG e ABN) come presupposto delle differenze comportamentali degli adulti.**
- **LG e ABN sono altamente correlati nelle stesse madri (0.91 di coefficiente di correlazione).**
- **Nei loro esperimenti hanno quindi considerato le madri High LG-ABN e Low LG-ABN.**

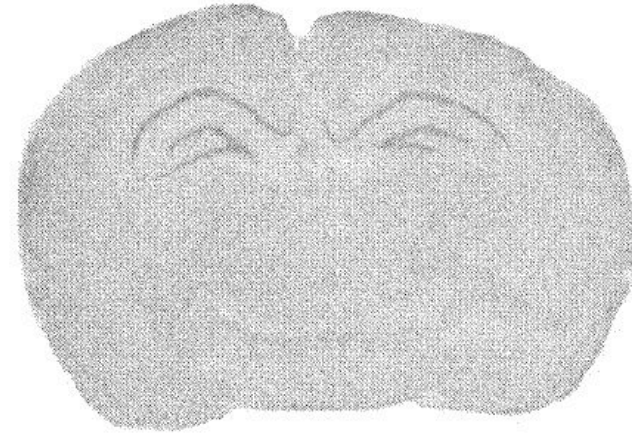
?

- **Esistono correlazioni tra comportamento delle madri e la risposta allo stress dei figli?**

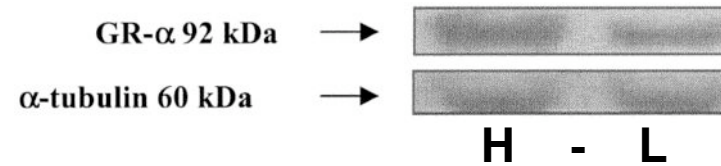
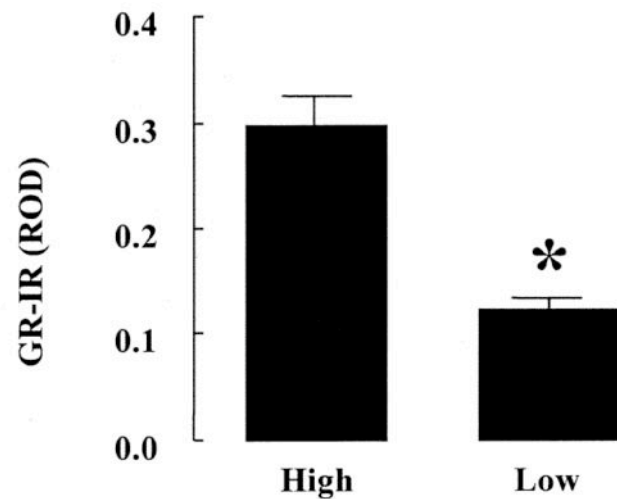
Effetti sui GC-R in adulti (90 gg)



Low LG-ABN



High LG-ABN



Meccanismo molecolare

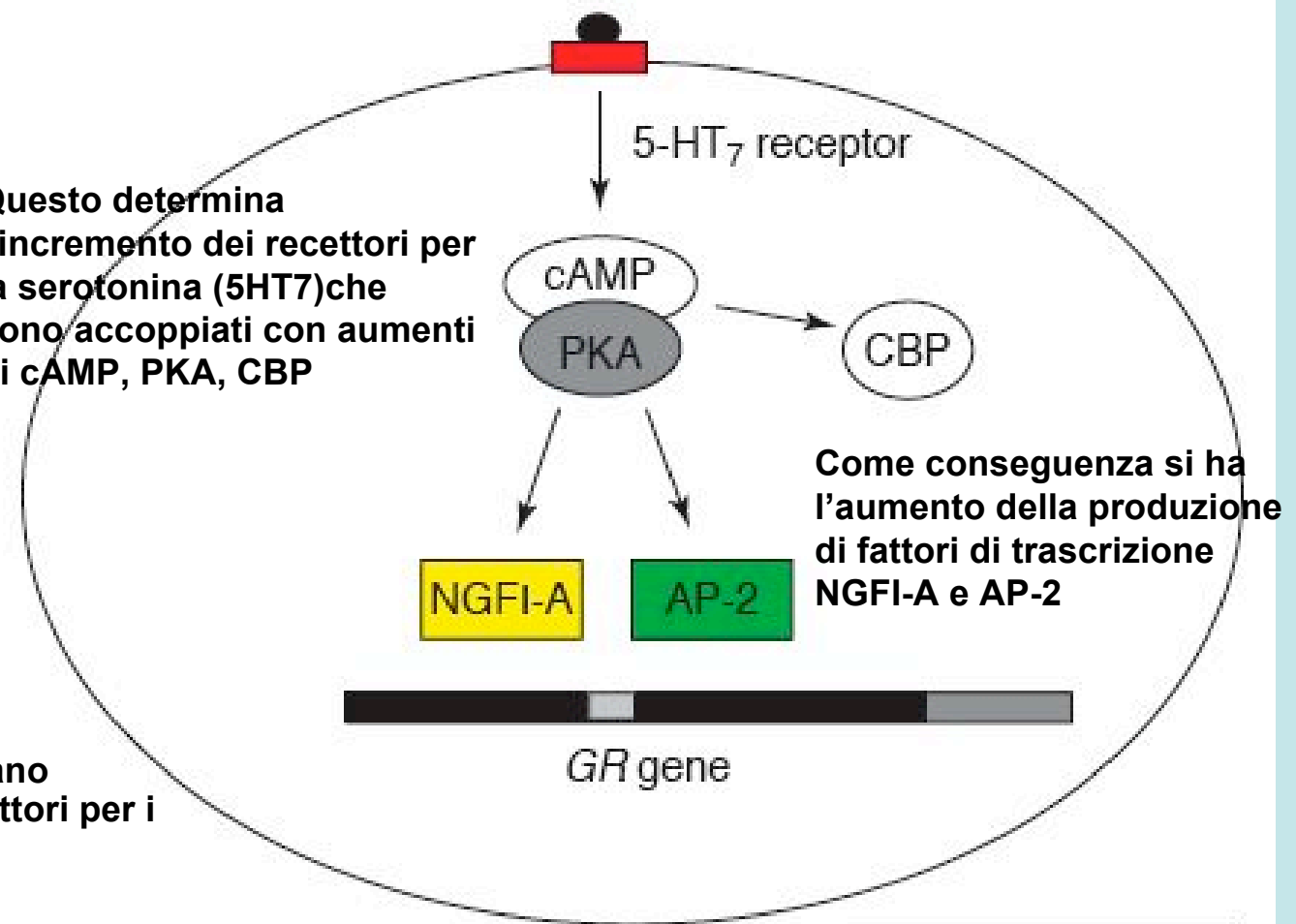
Tactile stimulation
(maternal LG)



Questo determina
l'incremento dei recettori per
la serotonina (5HT₇) che
sono accoppiati con aumenti
di cAMP, PKA, CBP

5-HT

Le cure materne aumentano il
turnover di serotonina (5HT)
ippocampale



Questi fattori aumentano
l'espressione dei recettori per i
glucocorticoidi

Come conseguenza si ha
l'aumento della produzione
di fattori di trascrizione
NGFI-A e AP-2

Come si trasferisce l'effetto agli adulti?

- **Gli effetti di 5HT sui GC-R di cellule ippocampali in vitro si hanno solo per le prime 3 settimane di coltura**
- **Se si rimuove la 5HT l'effetto di aumento permane fino a 50 giorni di coltura (ultimo giorno testato)**
- **Gli effetti della 5HT sulla densità dei recettori per i glucocorticoidi in cellule ippocampali, mimano gli effetti a lungo termine di eventi ambientali che si osservano negli adulti.**

Ci sono differenze nel genoma?

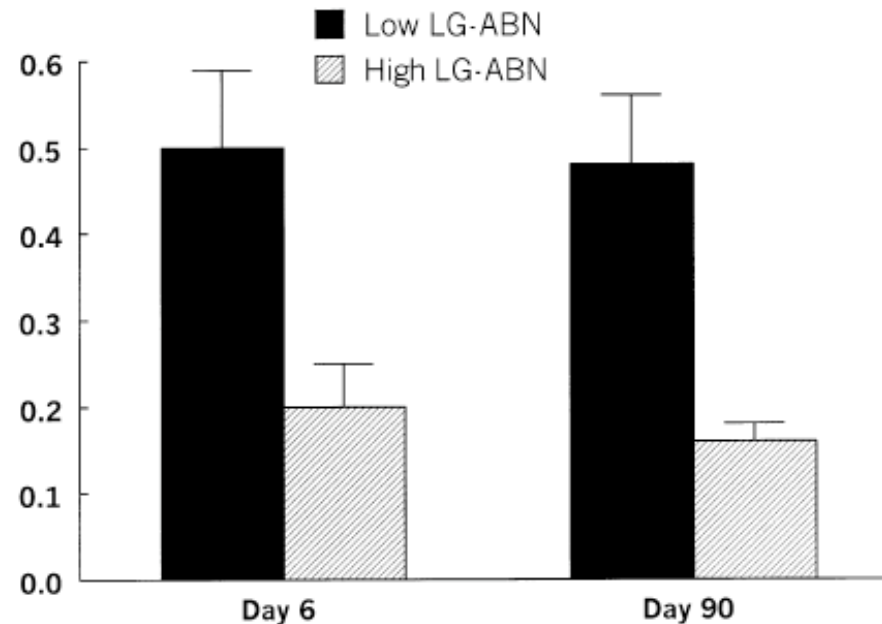
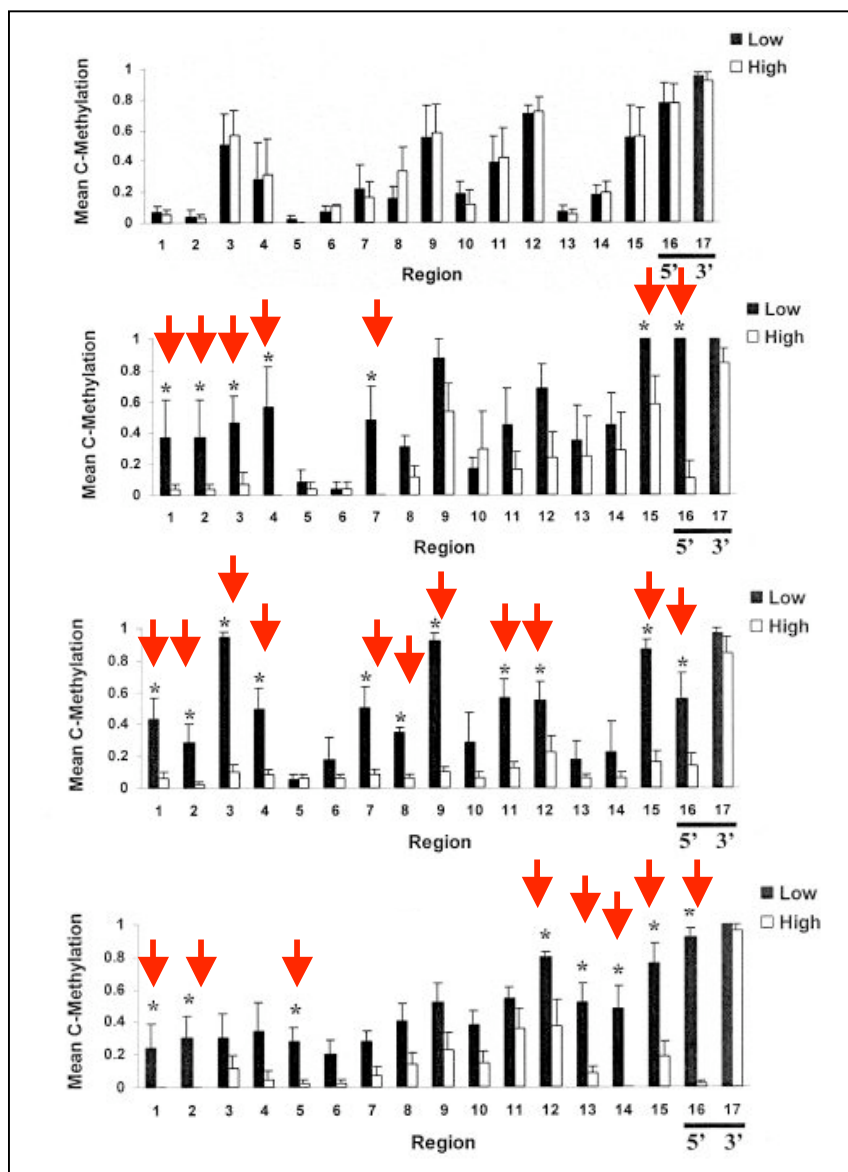


FIGURE 2. Global methylation pattern of the exon 17 glucocorticoid receptor promoter in 6-day-old (young pup) and 90-day-old (adult) offspring of High and Low LG mothers ($N = 4$ animals/group). The values are an average of the percentage methylation per cytosine for all 17 CpG dinucleotides in the two treatment groups ($*P < 0.0001$). Statistical analysis with a two-way ANOVA (Group \times Age) of the degree of cytosine methylation across the entire exon 17 glucocorticoid receptor promoter revealed a highly significant Group effect $F = 24.581$, $P < 0.0001$.

I livelli di metilazione del promoter del GC-R a 6gg e a 90gg sono più elevati negli animali da madri *Low* in confronti a quelli da madri *High*. La metilazione permette un legame molto stretto con gli istoni, determinando la inattivazione della cromatina

Metilazione del promotore



1gg

I livelli di metilazione sono uguali dopo un giorno.

6gg

Iniziano a cambiare dopo 6 gg di vita e poi si mantengono anche nell'adulto (90gg).

21gg

Le differenze non sono sempre costanti e negli stessi punti.

90gg

La metilazione è quindi un flusso continuo che si mantiene stabile attraverso un equilibrio dinamico

Un modello per la programmazione genica determinata da fattori ambientali



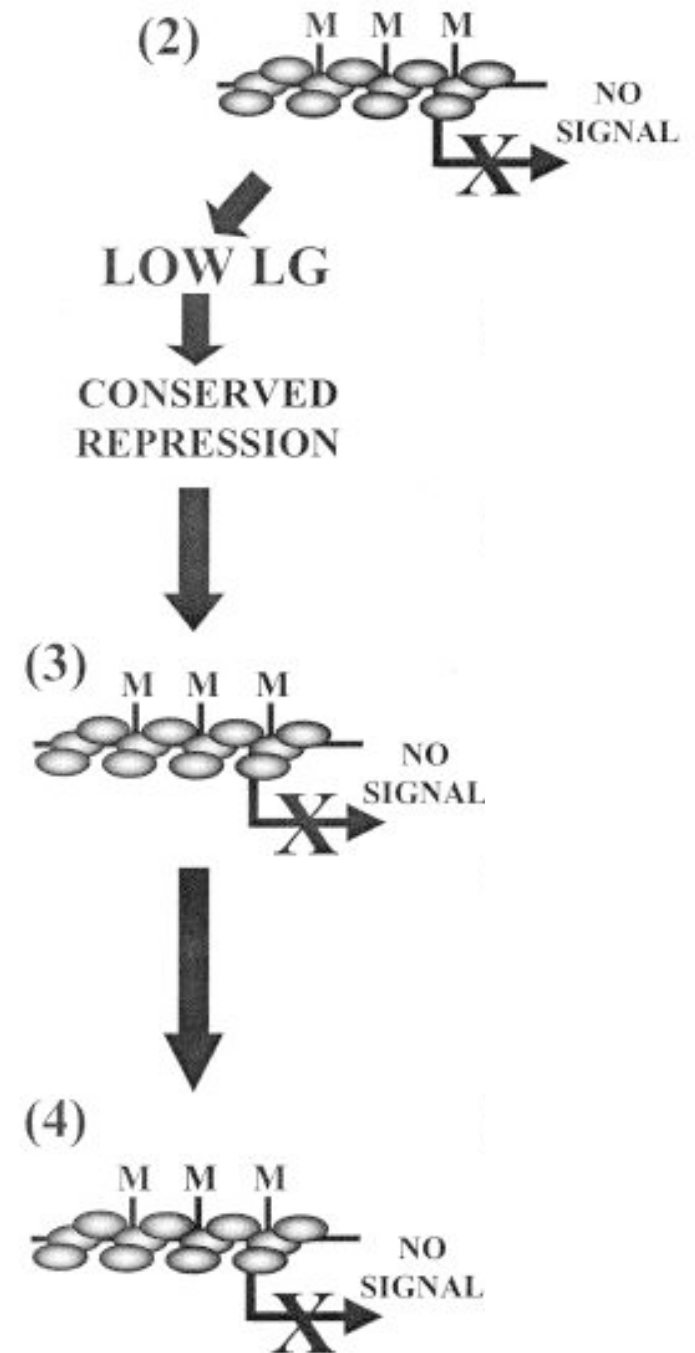
Prima della nascita l'esone è completamente non metilato

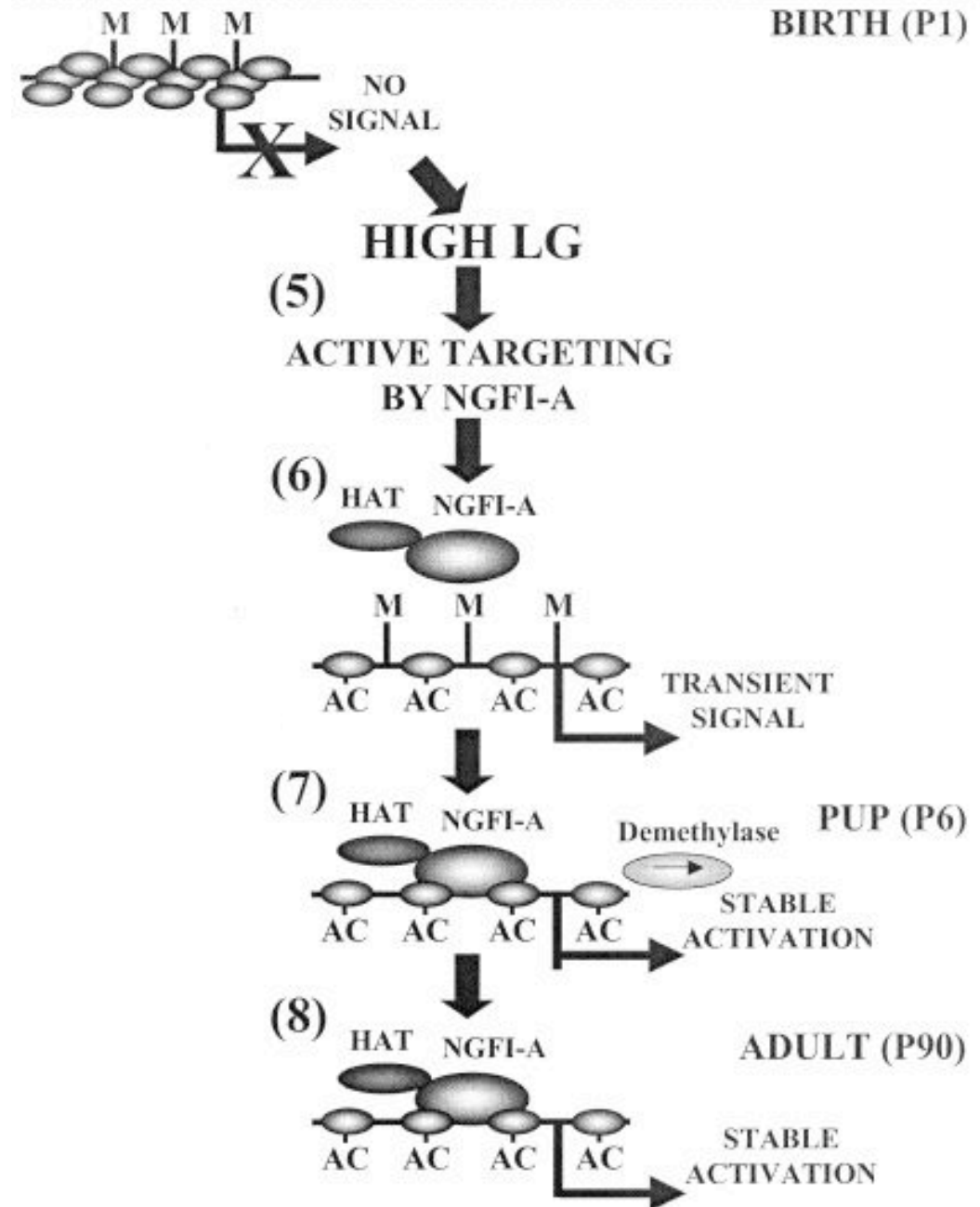
WAVE OF METHYLATION ?



Al momento della nascita l'esone è ipermetilato ed accoppiato con istoni che bloccano la trascrizione (cromatina inattiva)

Negli animali da madri Low LG-ABN il livello di repressione si mantiene costante e quindi la corrispondente cromatina è sempre inattiva

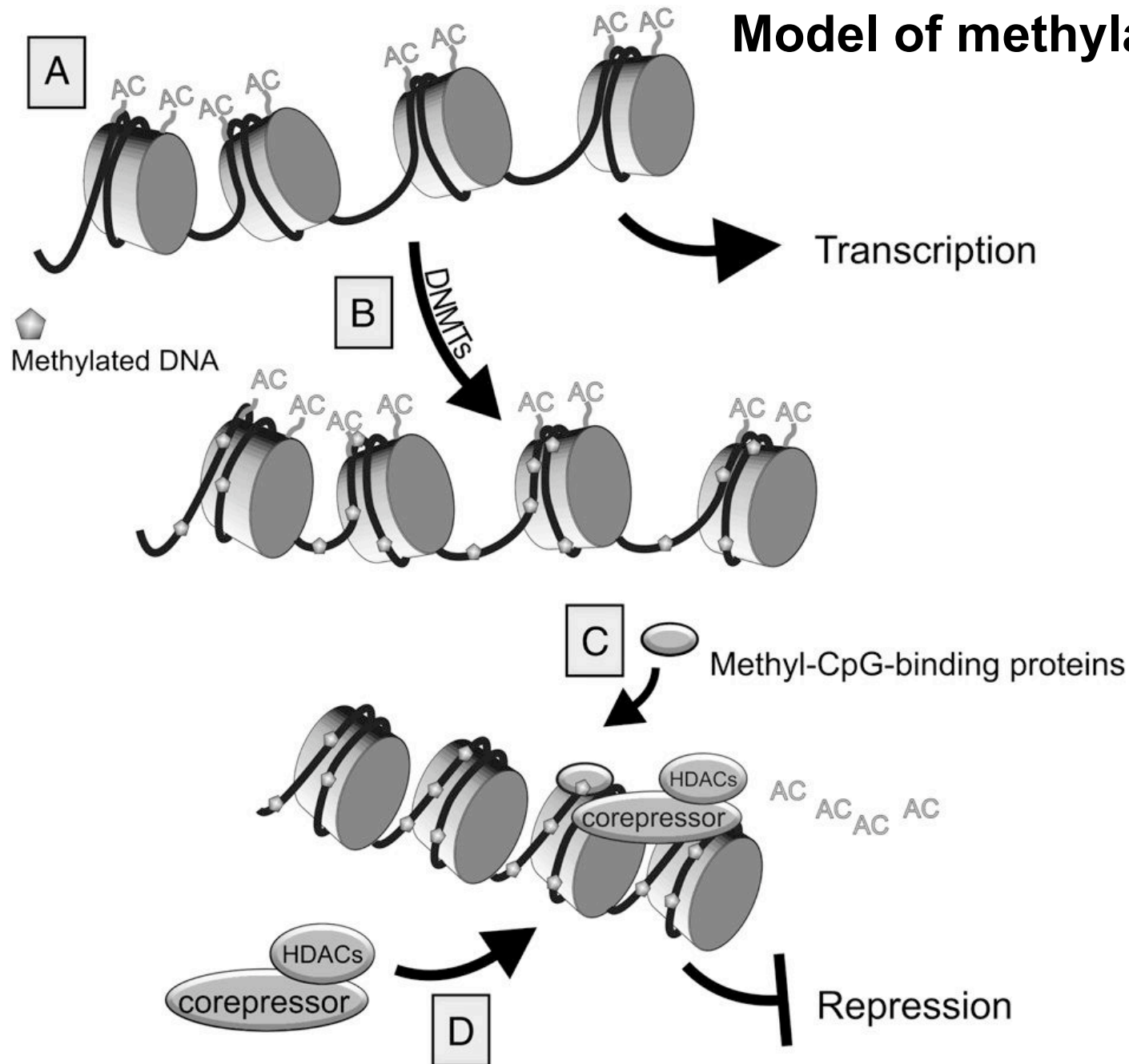




Negli animali da madri High LG-ABN la produzione di NGFI-A determina il distacco degli istoni dal promotore del GC-R e quindi origina un segnale transitorio (6)

Il distacco degli istoni permette la demetilazione del DNA (che impedisce l'ulteriore attacco degli istoni) mentre NGFI-A si lega stabilmente determinando un'attivazione stabile del promotore (7-8)

Model of methylation



Schematic of epigenomic repression.

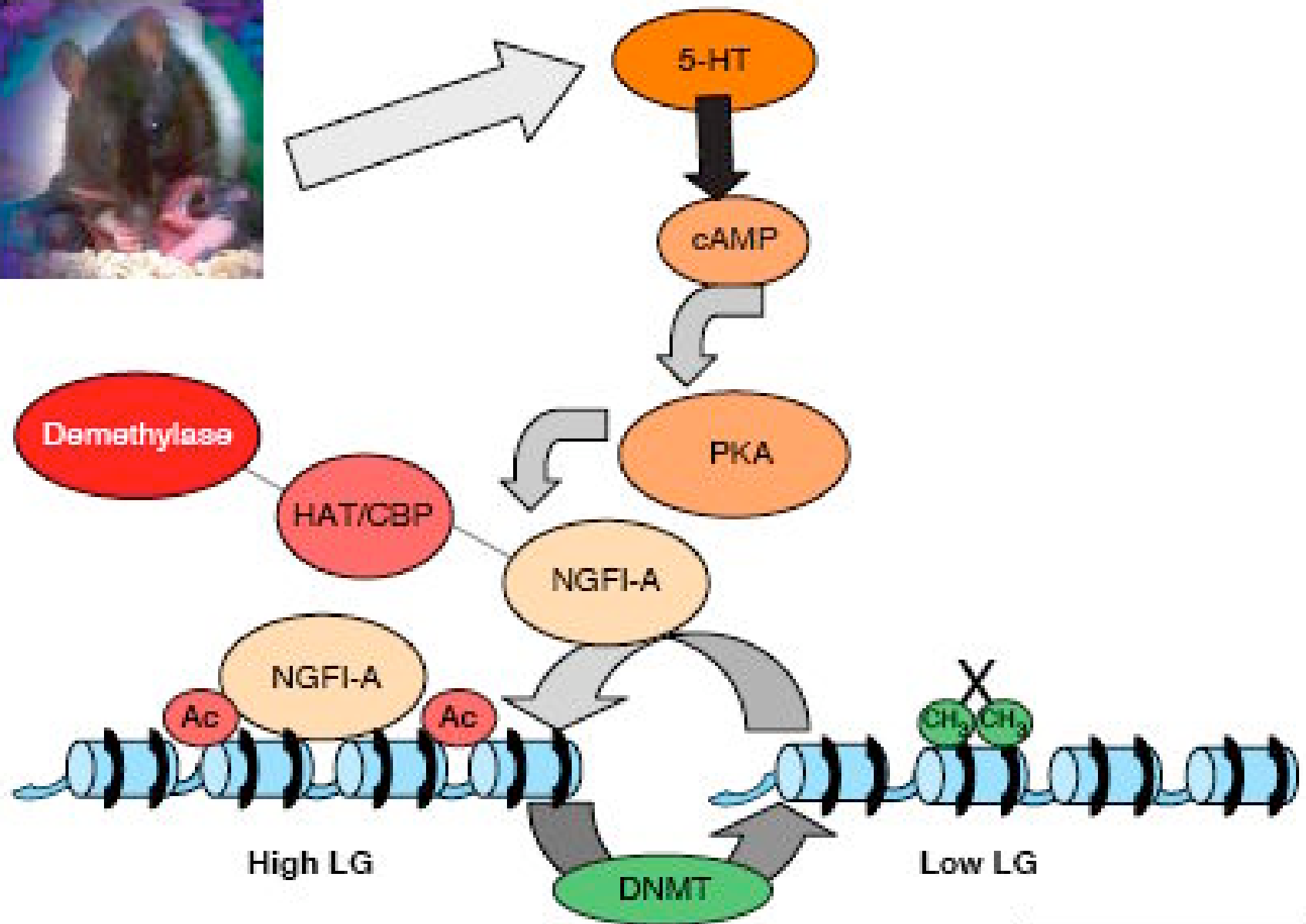
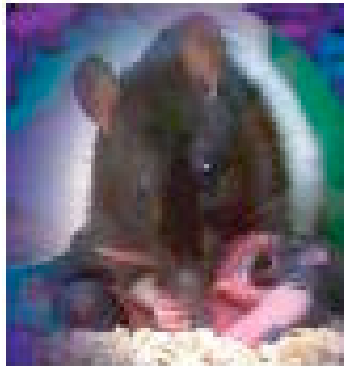
(A) Active transcriptional state.

(B) Methylation of DNA occurs when a methyl group attaches to a cytosine within a 5'-CpN-3' dinucleotide site through an enzymatic reaction that is catalyzed by DNMTs.

(C) Methyl-CpG-binding proteins bind to methylated DNA, and

(D) increase the interactions of chromatin remodeling co-repressor complexes with DNA and histones, resulting in gene repression.

Abbreviations: AC, acetyl group; DNMTs, DNA cytosine-5-methyltransferases; HDACs, histones deacetylases.



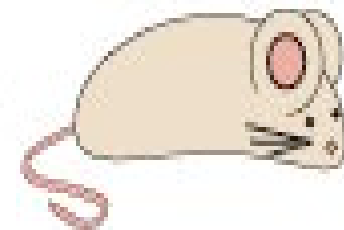
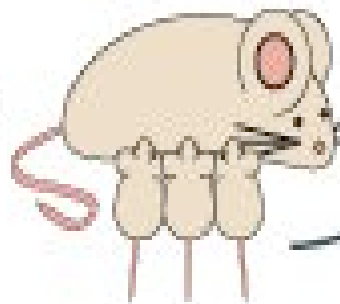
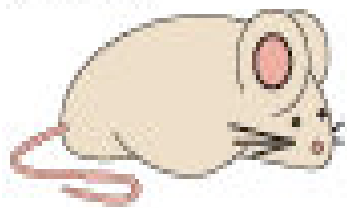
Prenatal development

Postnatal development

Adult

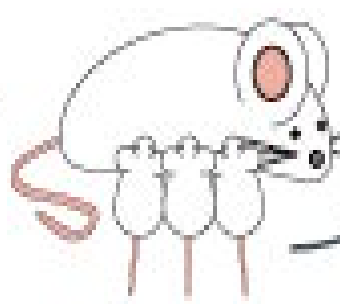
Anxiety

Mother



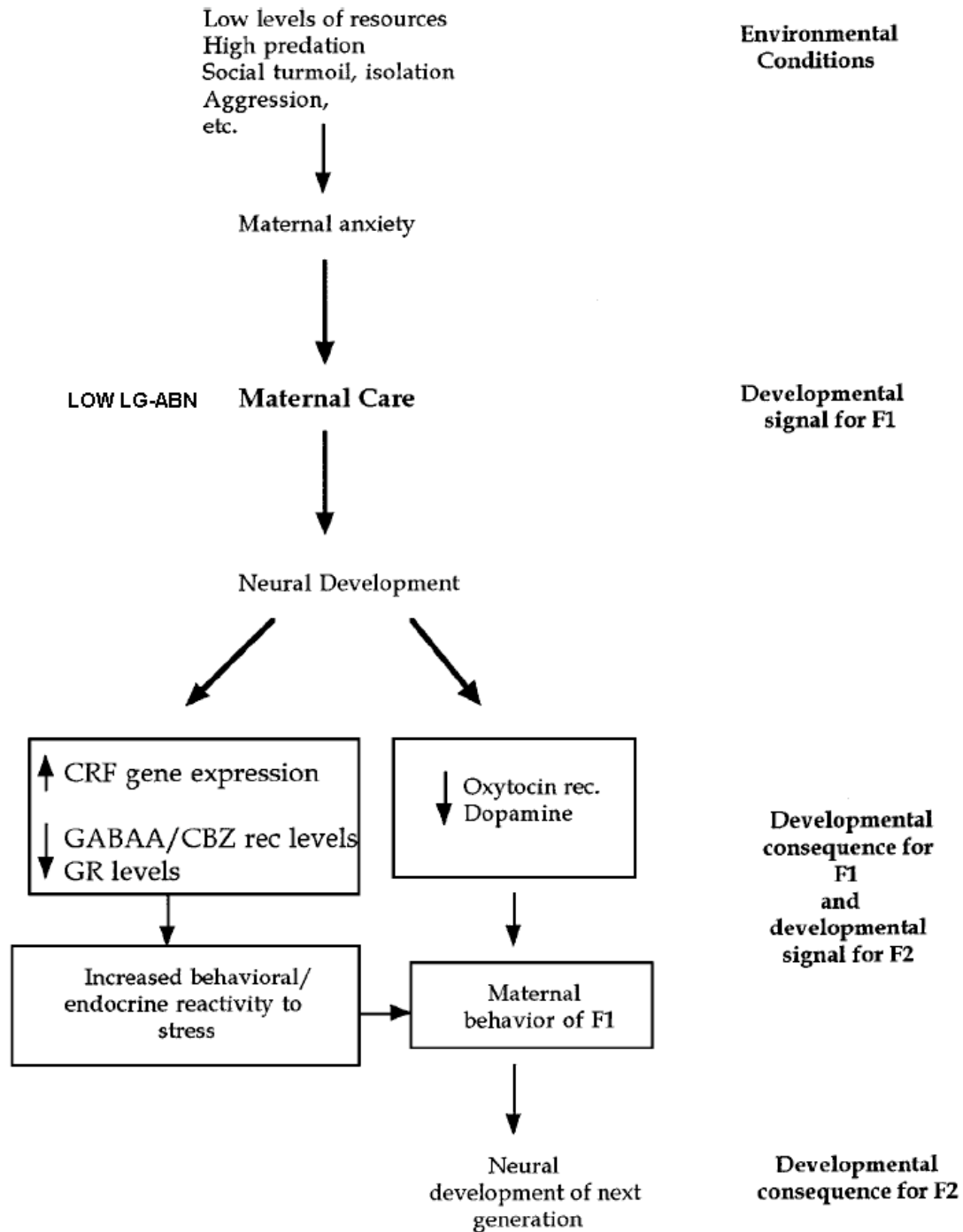
Low

Mother



High

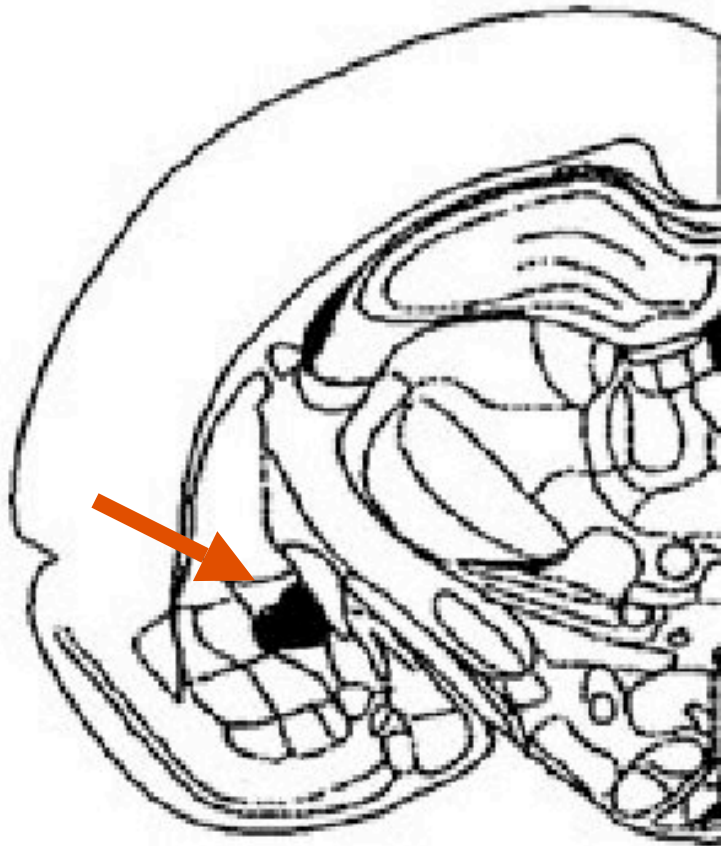
Conseguenze transgenerazionali



Comportamento materno e recettori per OT e VP nei figli

- **Anche altri recettori oltre a quello dei glucocorticoidi mostrano variazioni come conseguenza di alti o bassi livelli di licking e grooming materni**
- **Si osservano differenze nei recettori per OT e VP a livello dell'amigdala**
- **Ossitocina (OT) e vasopressina (VP) sono implicati nel controllo dell'ansia e dei comportamenti sociali**
- **In questo caso l'effetto è diverso nei due sessi**

(A)

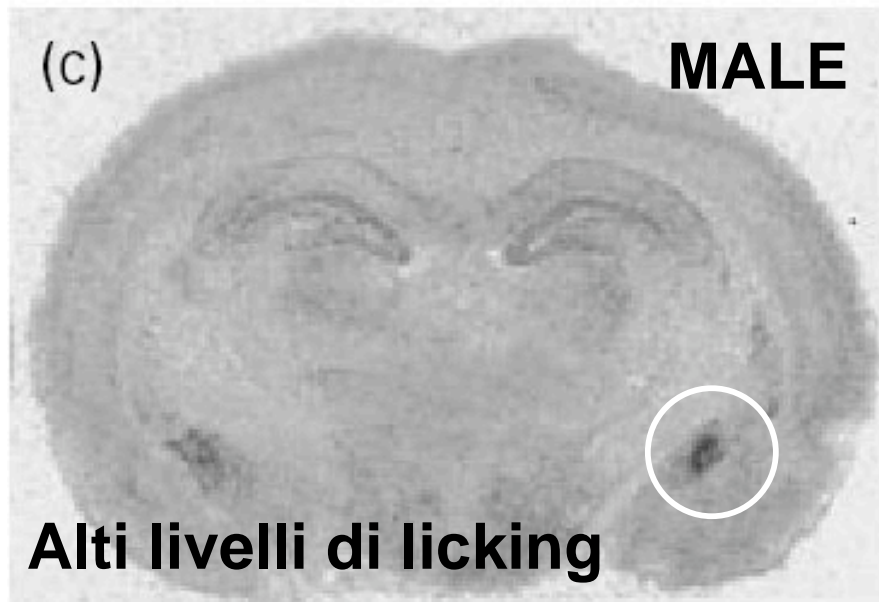
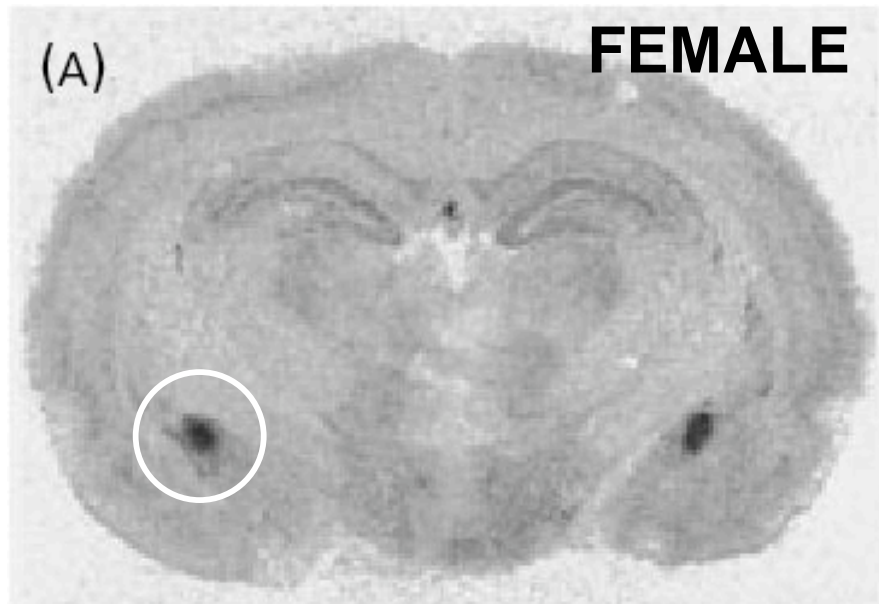


(B)



Nucleo centrale dell'amigdala (freccia gialla)

RECETTORE PER OT NELL'AMIGDALA



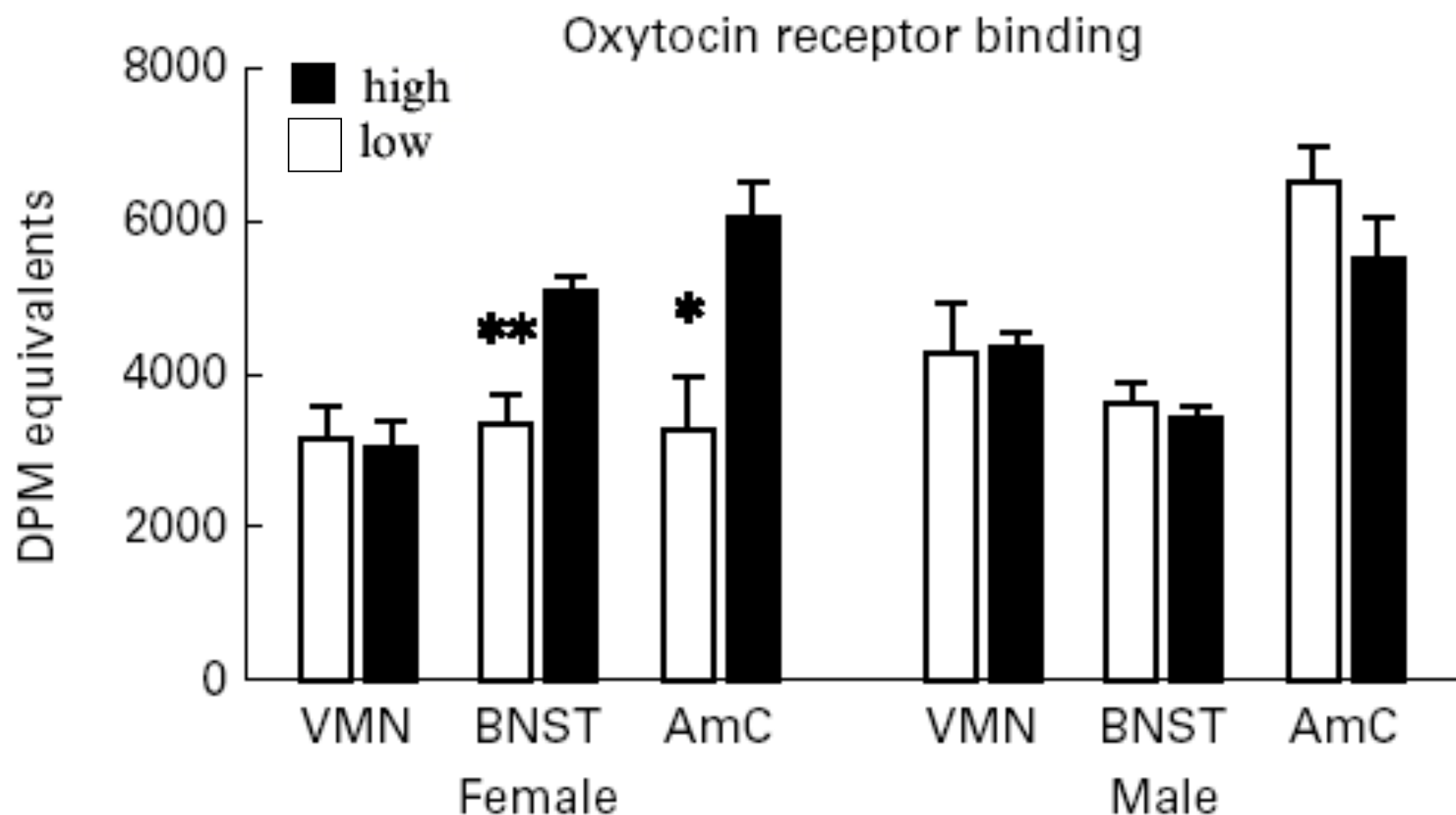
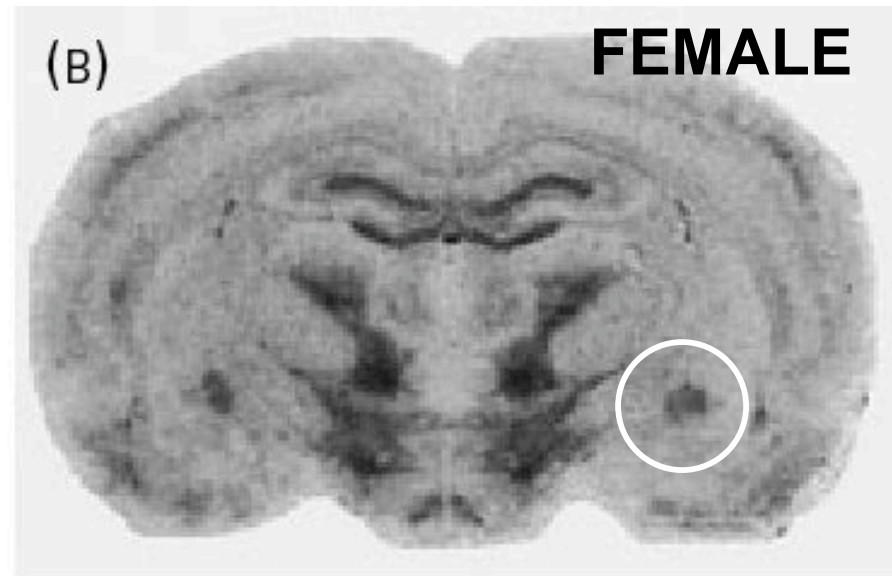
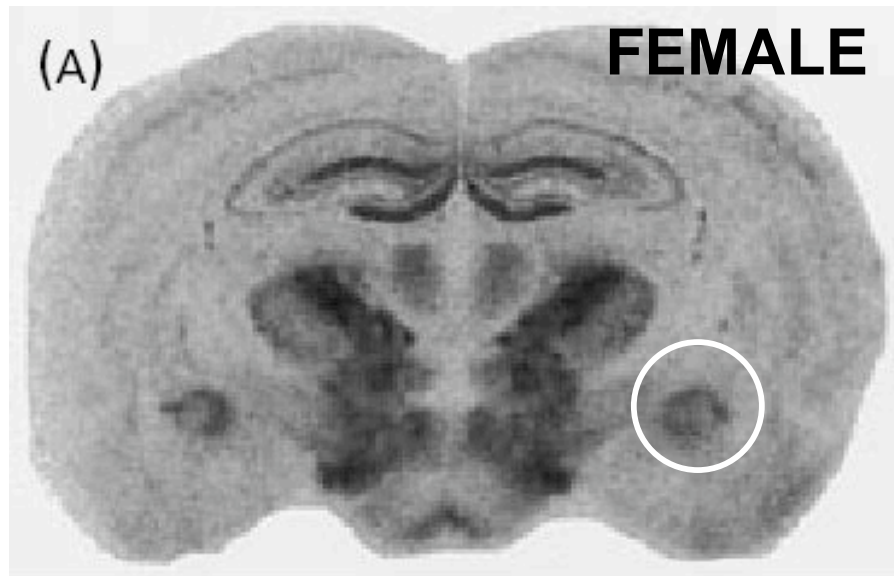


FIG. 3. Quantitative analysis of oxytocin receptor binding in select regions of high and low licking animals. Note the significant group differences in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) (** $P < 0.01$) and central nucleus of the amygdala (AmC) ($*P < 0.05$) in female, but not male, animals. VMN, ventromedial nucleus of the hypothalamus.

RECETTORE PER VP NELL'AMIGDALA



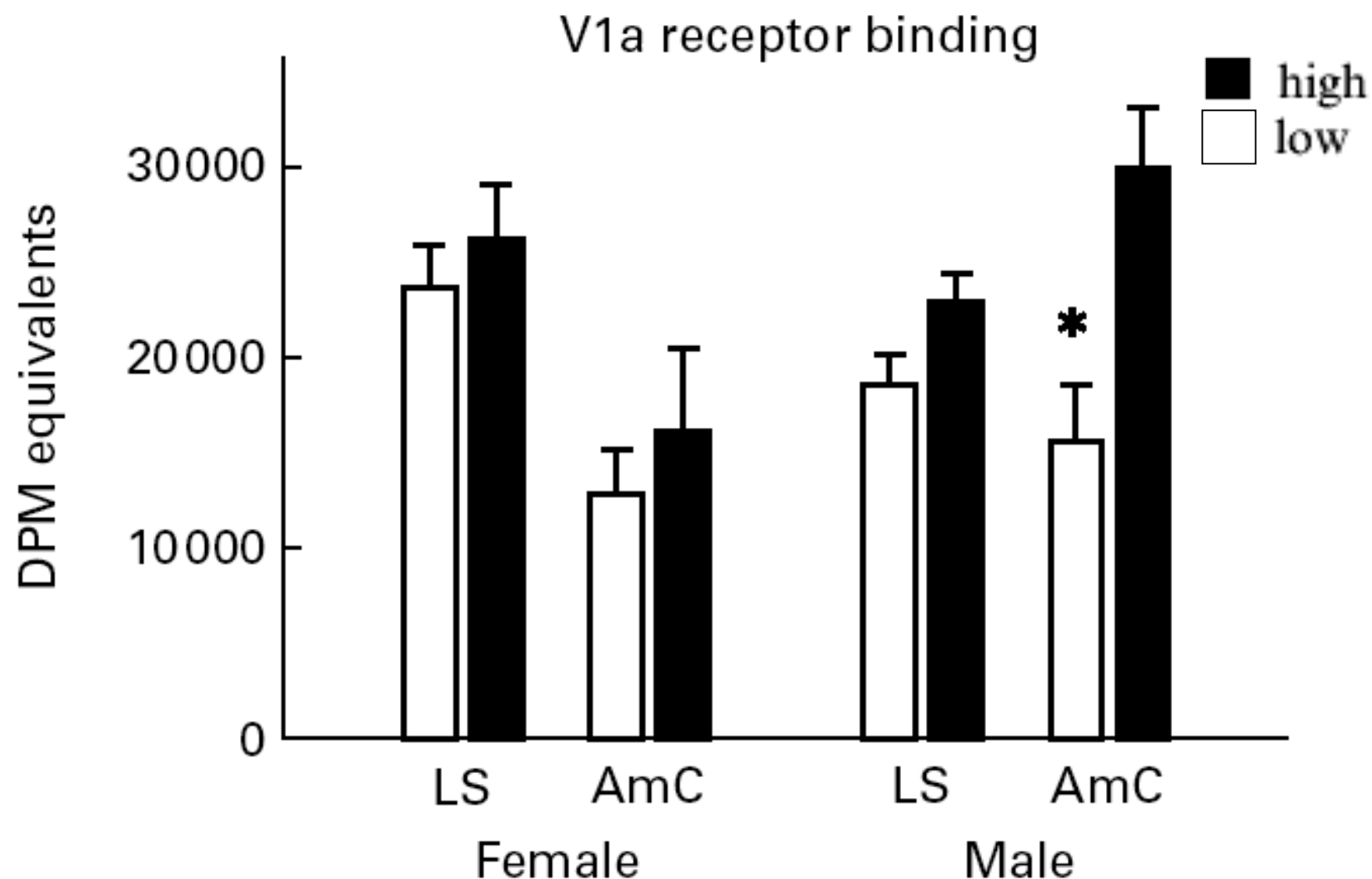
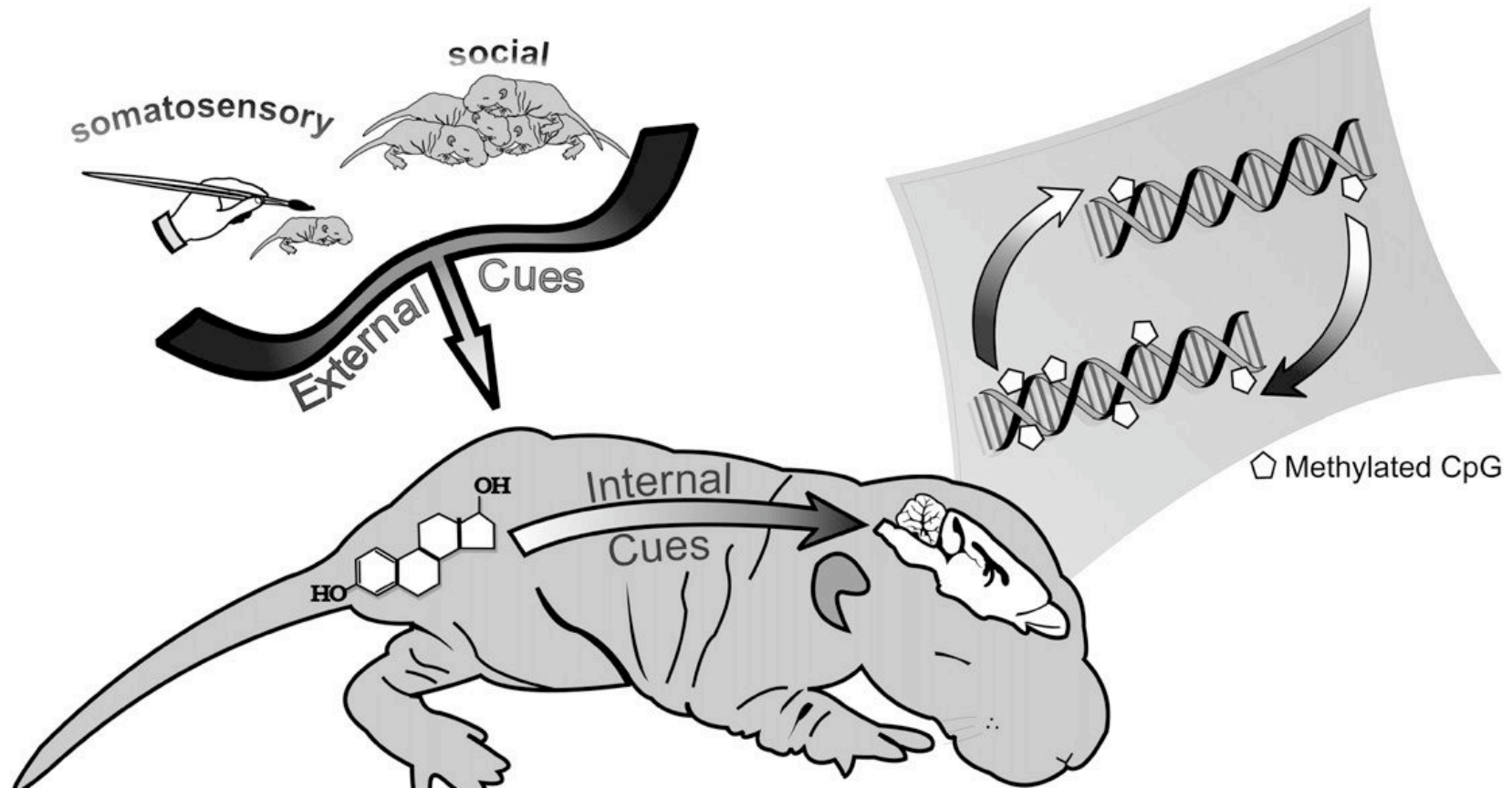


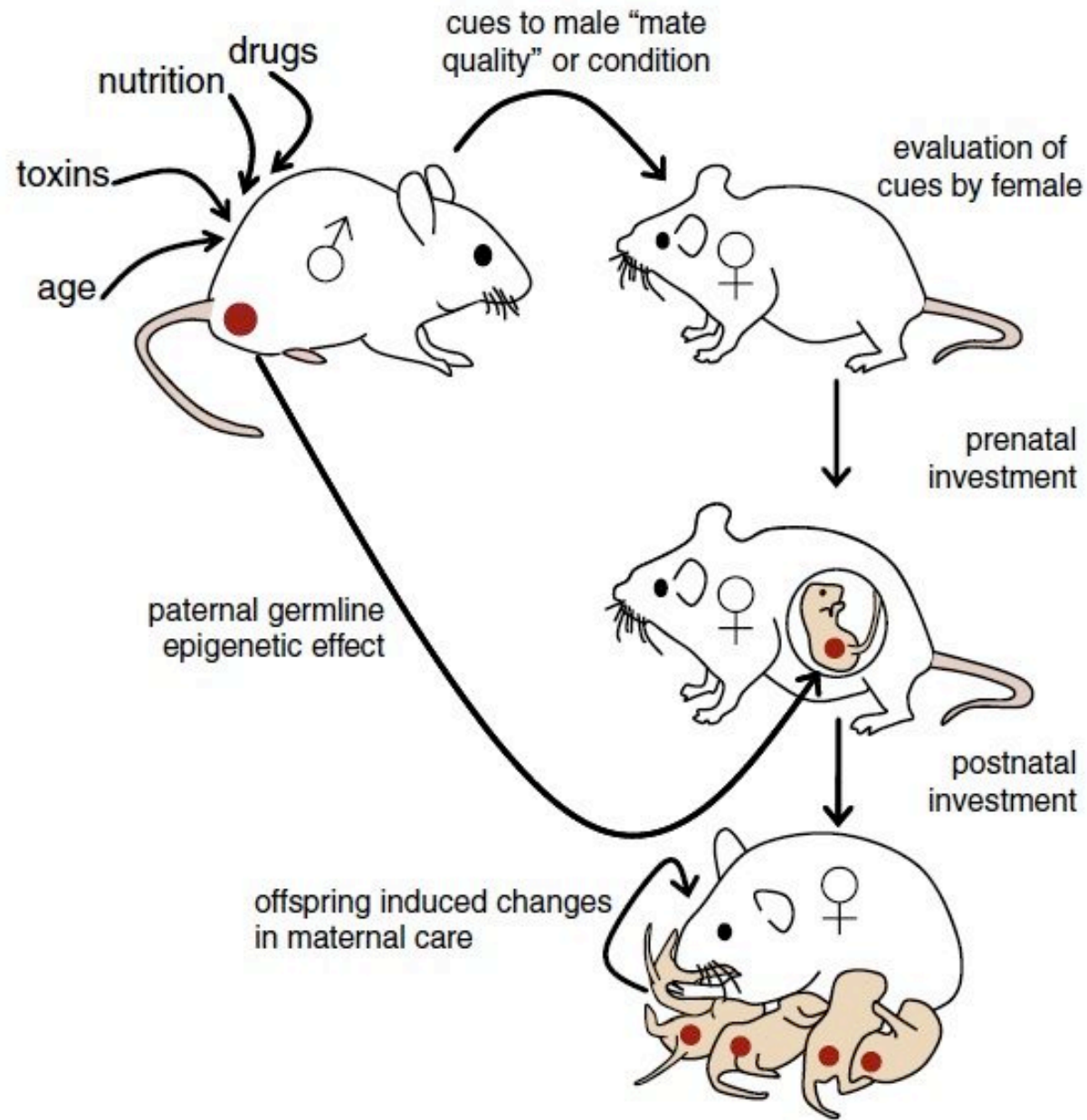
FIG. 5. Quantitative analysis of V1a receptor binding in the lateral septum (LS) and central nucleus of the amygdala (AmC) of high and low licking and grooming animals. Note the significant group differences in male, but not female, animals in the AmC (* $P < 0.05$).

- **Recettori per OT sono influenzati nella femmina (BST e Central Amigdala)**
- **Recettori per VP sono influenzati nel maschio (Central Amigdala)**



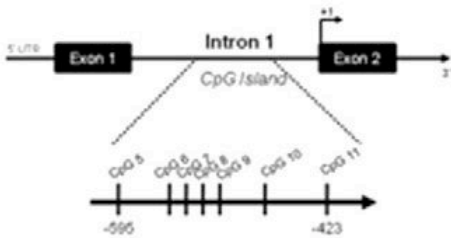
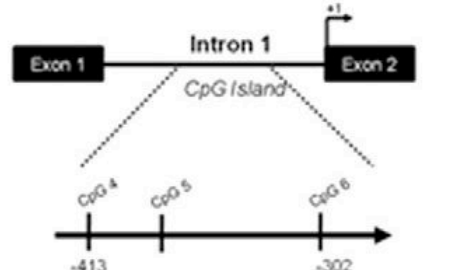
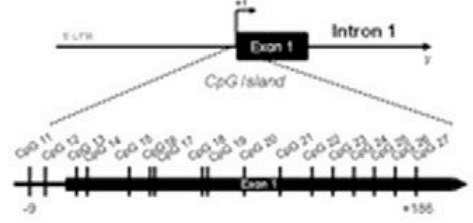
- **In entrambi i casi gli animali con madri High LG hanno i livelli più alti di recettore**



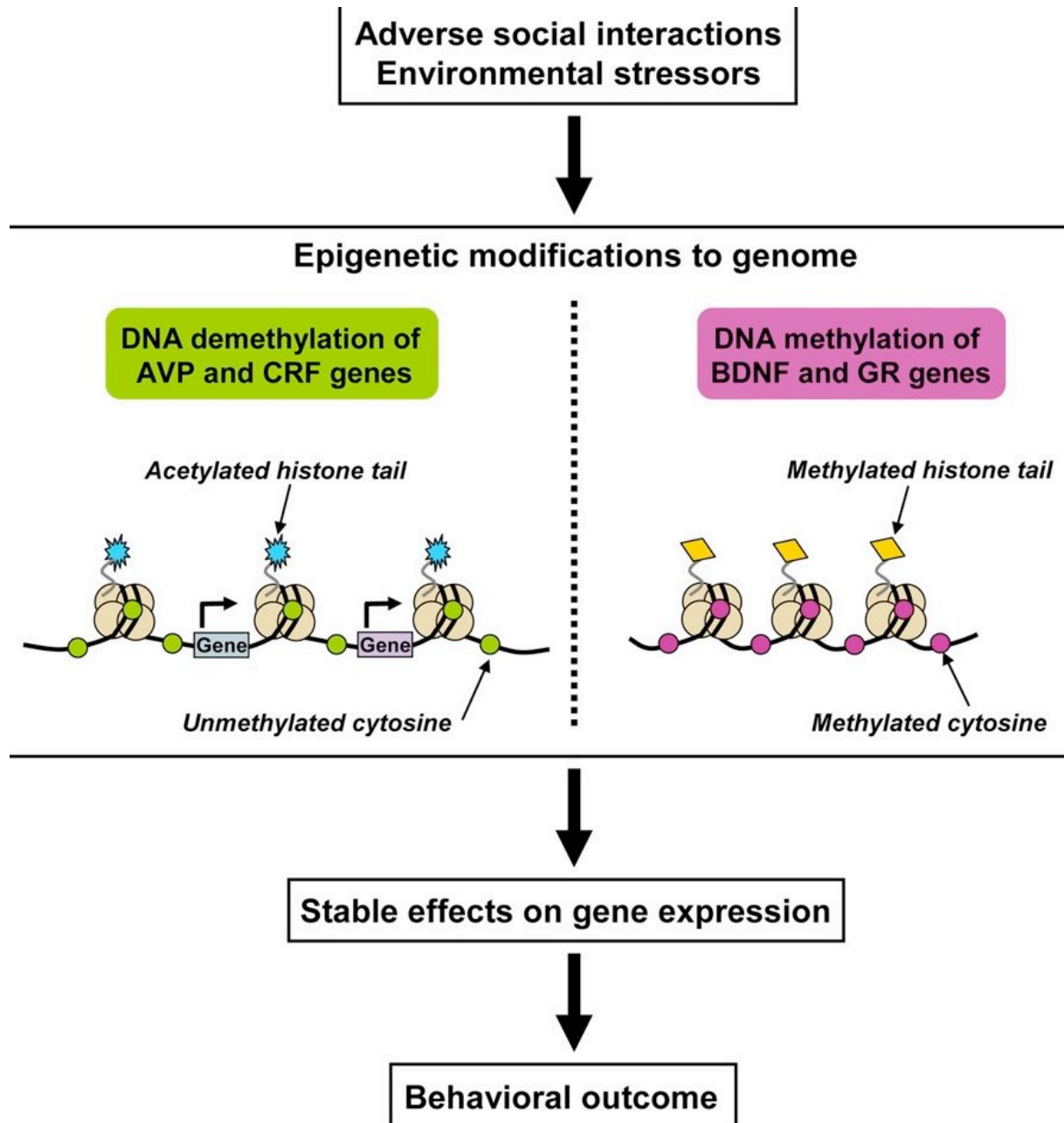
Stimolazione ambientale ed effetti epigenetici



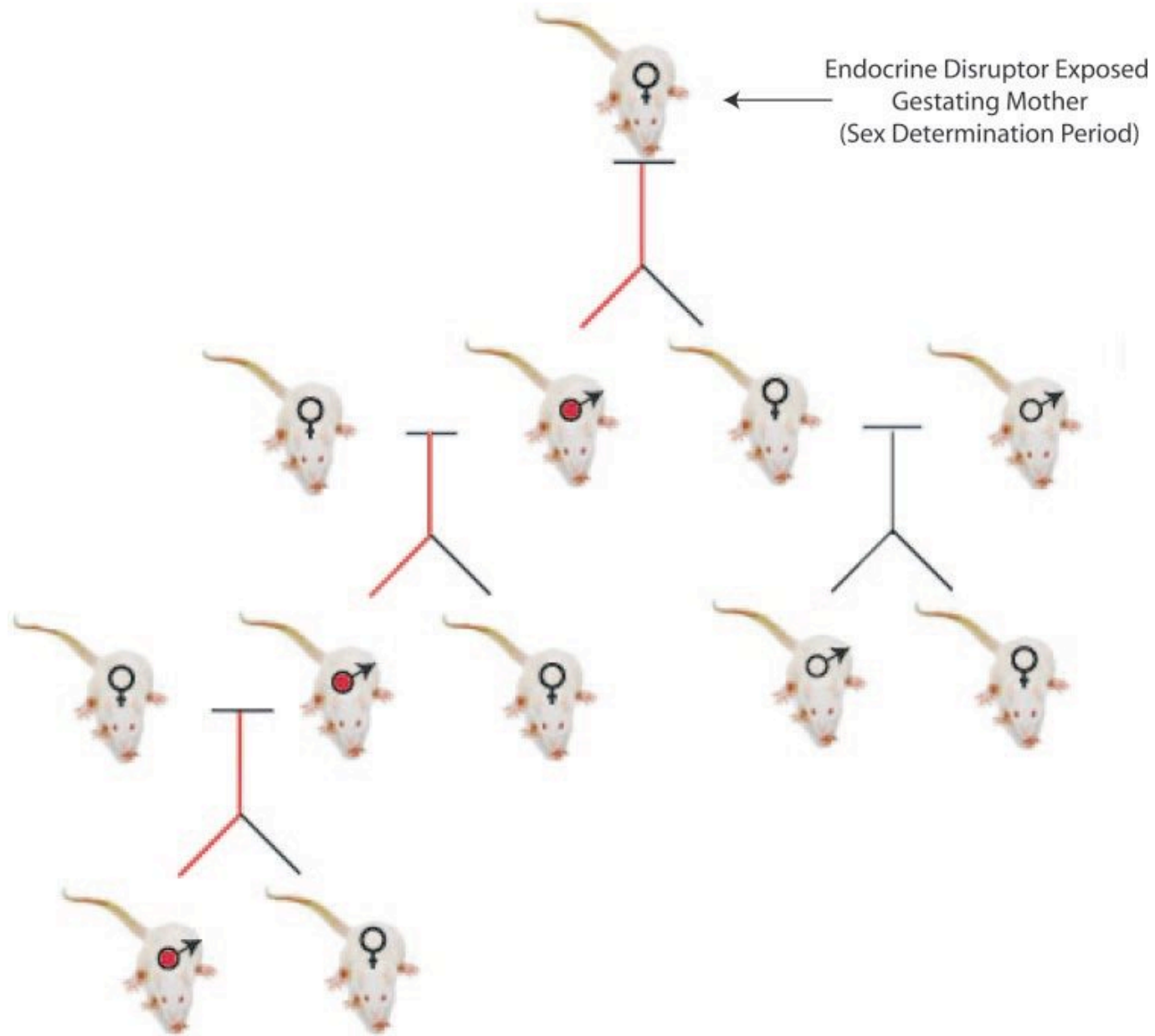
Effetti epigenetici paterni

Gene of Interest	Brain Region			
		Postnatal Day 1	Postnatal Day 20	 Postnatal Day 60
Estrogen Receptor α 	POA	Site 7: F > M, F+E2 Site 9: F > M, F+E2	No differences	Site 5: F > M, F+E2
	MBH	Site 6: F > M Site 9: F > M	No differences	No differences
	HIPP	-----	No differences	No differences
Estrogen Receptor β 	POA	Site 5: M > F (p=0.07)	Site 6: F+E2 > M	Site 5: M > F, F + E2
	MBH	No differences	Site 6: F < M, F+E2	Site 4: F > M, F+E2 Site 5: F > F+E2 > M
	HIPP	No differences	No differences	Site 4: F+E2 > M, F
Progesterone Receptor 	POA	Site 11: F+E2 > M, F Site 12: F+E2 > F	No differences	No differences
	MBH	Site 13: F+E2 > M, F	Site 11: F < M, F+E2 Site 13: F < M, F+E2 Site 17: F < M, F+E2 Site 27: F+E2 > M, F	Site 27: F+E2 > M, F

Variazione della metilazione di ER α , Erb, PR in varie regioni

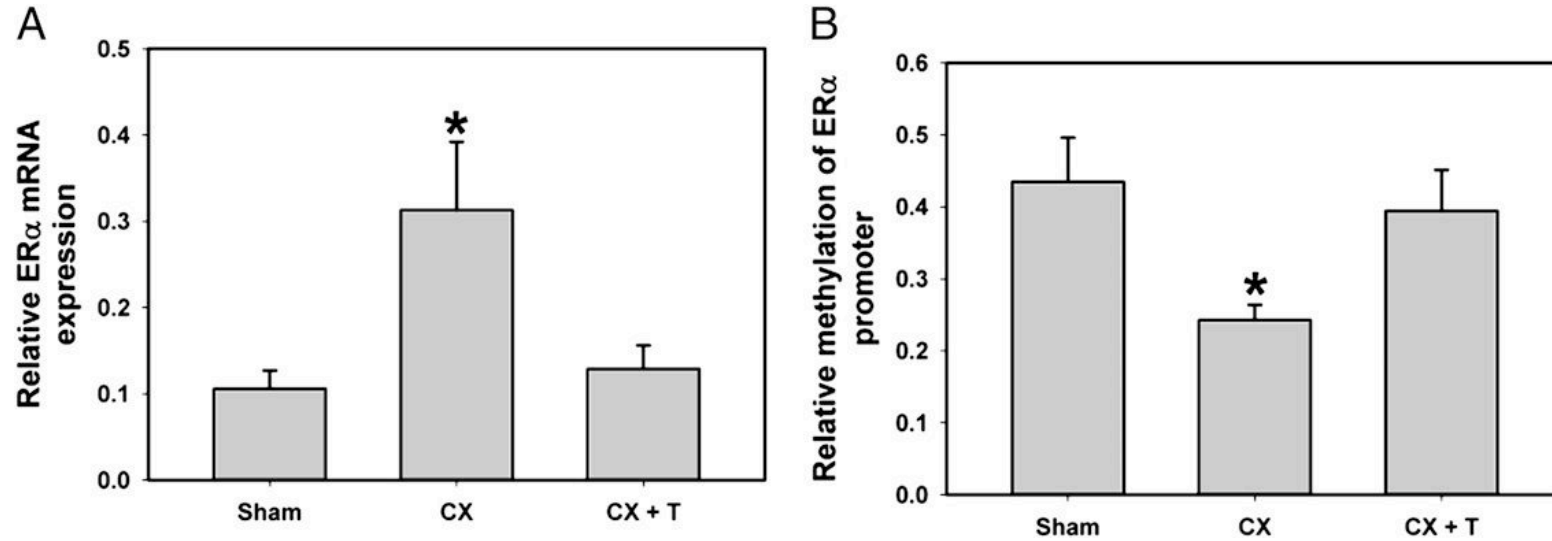


Rimodellamento della cromatina ed effetti neurobiologici

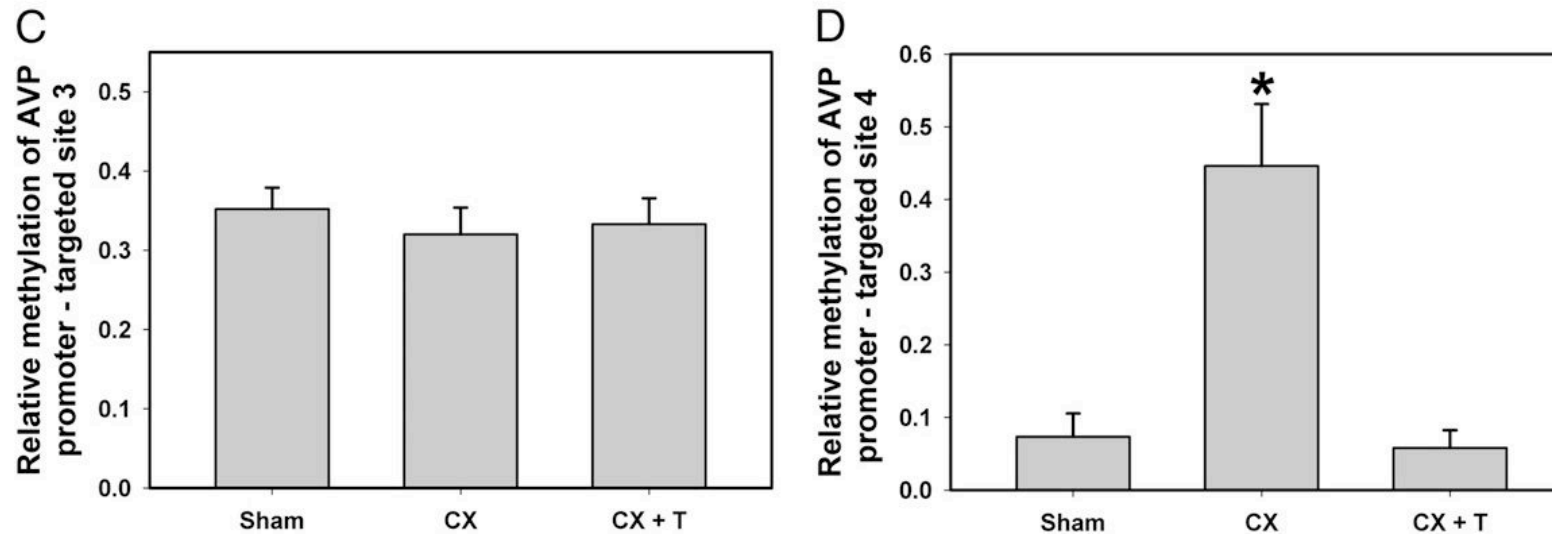


Distruttori endocrini ed epigenetica - Trasmissione paterna

Testosterone e metilazione



Maschi castrati: aumento espressione ER e diminuzione metilazione del promoter ER



Maschi castrati: aumento metilazione promoter AVP (D) sul sito 4 e non sul 3 (C)

Epigenetica e differenziazione sessuale cerebrale

