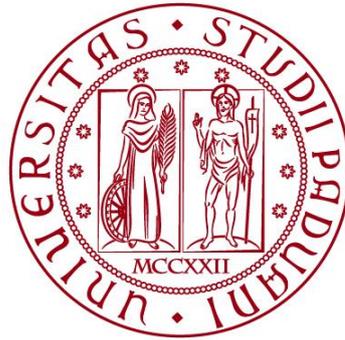


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**INTERAZIONE SOCIALE IN *DROSOPHILA*  
*MELANOGASTER*: ASPETTI MOLECOLARI,  
NEURONALI E COMPORTAMENTALI**

**Tutor: Prof.ssa Gabriella Margherita Mazzotta  
Dipartimento di Biologia**

**Laureanda: Greta Bagno**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**

## INDICE

ABSTRACT.....	3
1. INTRODUZIONE.....	4
2. GLI EFFETTI DELL'ISOLAMENTO SOCIALE SUL COMPORTAMENTO .....	5
2.1 AGGRESSIVITÀ.....	5
2.2 CORTEGGIAMENTO .....	8
2.3 SONNO.....	9
3. LE INTERAZIONI SOCIALI CAUSANO CAMBIAMENTI COMPORTAMENTALI PERSISTENTI NEL TEMPO .....	12
3.1 ANDAMENTO TEMPORALE DEI COMPORTAMENTI INDOTTI DALL'ISOLAMENTO SOCIALE .....	13
4. L'ANESTESIA ANNULLA GLI EFFETTI DELLA SOCIALIZZAZIONE.....	17
5. LA SOCIALIZZAZIONE È CORRELATA AD UN AUMENTO DELL'ATTIVITÀ NEURONALE E PLASTICITÀ SINAPTICA .....	18
6. CONCLUSIONI.....	20
BIBLIOGRAFIA .....	21

## **ABSTRACT**

L'isolamento sociale è un fattore in grado di modificare e avere un impatto significativo su alcuni comportamenti dell'uomo, portando a un rischio maggiore di depressione, ansia, stress, aggressività o alterando i risultati di aspetti fisiologici come il sonno e la fame. Questi cambiamenti comportamentali sono conservati in molte specie sociali. La *Drosophila melanogaster* rappresenta un ottimo modello di studio sul quale si possono applicare approcci di screening, come quelli di forward genetics e reverse genetics, per la scoperta delle funzioni di diversi geni. In questo modo è anche possibile scovare i meccanismi molecolari e neuronali alla base dei cambiamenti comportamentali dovuti all'isolamento sociale. Esperimenti hanno dimostrato che, tra i moscerini tenuti in isolamento sociale e quelli tenuti in gruppo, si possono evidenziare alcune differenze che riguardano i livelli di trascrizione di alcuni degli stessi geni e reazioni diverse a medesimi trattamenti. La *Drosophila melanogaster* tenuta in isolamento risulta più aggressiva oltre a mostrare un aumento del corteggiamento e maggior successo nell'accoppiamento della *Drosophila* che vive in gruppo, per la quale la socializzazione riduce significativamente l'aggressività e il corteggiamento. L'isolamento in *Drosophila*, inoltre, porta alla riduzione del sonno e all'incremento dell'alimentazione, in risposta ai cambiamenti dei meccanismi molecolari e neuronali.

## 1. INTRODUZIONE

*Drosophila melanogaster*, anche conosciuta come moscerino della frutta, è un interessante organismo modello, frequentemente utilizzato nella ricerca biologica per diversi aspetti che la caratterizzano. Ha una genetica semplificata, tempi di generazione brevi che consentono esperimenti rapidi con un numero elevato di campioni ed è inoltre poco costosa da mantenere in laboratorio.

La *Drosophila melanogaster* è un ottimo modello per studiare molte malattie umane e scoprire nuovi aspetti del nostro genoma: il genoma dell'insetto rappresenta il 5% di quello umano, ha una ridotta ridondanza genetica, il 75% dei geni responsabili di patologie nell'uomo hanno un gene ortologo in *Drosophila* ed è per questi motivi che è possibile ricreare la sindrome umana nella *Drosophila* con tecniche di genomica.

L'isolamento sociale è stato collegato a una vasta gamma di problemi di salute, nonché ad una ridotta aspettativa di vita negli esseri umani e in altri animali.

Ricercatori della scuola Perelman di medicina presso l'università della Pennsylvania (Brows, Strus, & Naidoo, 2017) hanno trovato una possibile spiegazione della correlazione tra isolamento sociale e rischio di malattia. Dallo studio di riferimento, condotto su *Drosophila melanogaster*, si riscontrava una correlazione tra isolamento sociale e perdita di sonno insieme ad altri comportamenti come l'aumento della depressione e dell'aggressività che comportavano uno stress cellulare tale da attivare un meccanismo di difesa chiamato "unfolded protein response" (UPR).<sup>[1]</sup>

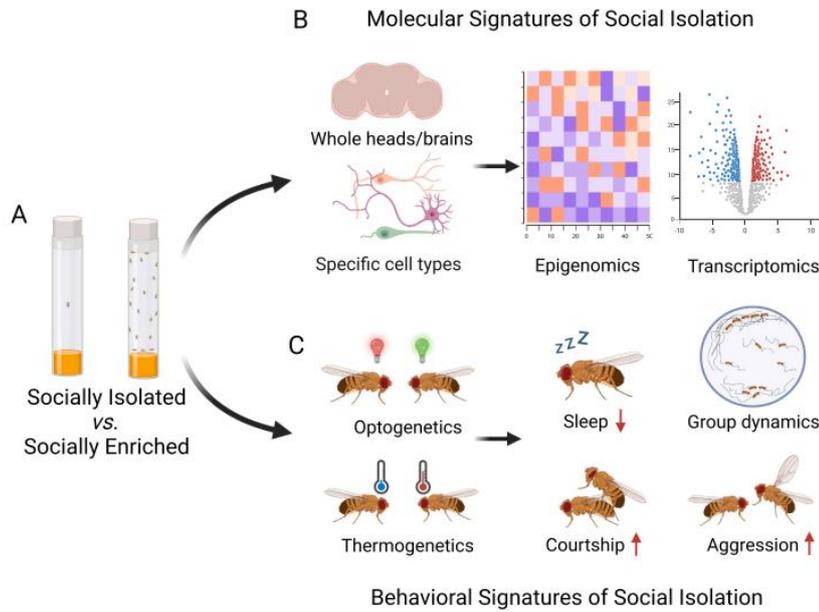
Gli effetti dell'isolamento possono essere studiati tenendo conto degli aspetti molecolari e neuronali, dove è possibile stabilire relazioni causali con i cambiamenti comportamentali.

Oltre a confrontare i diversi aspetti comportamentali di *Drosophila* cresciute in gruppo e *Drosophila* cresciute in isolamento, nel corso degli anni le ricerche si sono focalizzate nel comprendere più nel dettaglio se queste alterazioni del comportamento persistessero nel tempo o se scomparissero una volta terminata l'esperienza sociale.

Inoltre, per comprendere quali regioni cerebrali e quali pathway neurali fossero coinvolti nella creazione di risposte alle diverse esperienze sociali, è stato decisivo sfruttare individui di *Drosophila* mutanti per diversi geni e vedere le differenze con i wild-type.

## 2. GLI EFFETTI DELL'ISOLAMENTO SOCIALE SUL COMPORTAMENTO

L'isolamento sociale ha un impatto importante su molteplici comportamenti. Negli ultimi anni ricerche approfondite hanno identificato alcuni cambiamenti comportamentali dovuti all'isolamento sociale in numerose specie: questi riguardano l'aggressività, il sonno, la locomozione, i rituali di corteggiamento e le dinamiche di gruppo.



**Fig. 1. Cambiamenti molecolari e comportamentali indotti dall'isolamento sociale.** (A) L'ambiente sociale alterato porta individui di *Drosophila* a cambiamenti nelle molecole e nei comportamenti. (B) Vengono identificati cambiamenti molecolari in intere teste o interi cervelli o in specifici tipi di cellule per generare mappe dell'epigenoma o del trascrittoma. (C) La manipolazione neuronale indotta dall'optogenetica o dalla termogenetica aiuta a studiare i cambiamenti comportamentali come il sonno, il corteggiamento, l'aggressività e le dinamiche di gruppo. Insieme, queste manipolazioni aiutano a scoprire le firme comportamentali e i meccanismi molecolari dovuti all'isolamento sociale. R.S.P Yadav et al., 2024

### 2.1 AGGRESSIVITÀ

L'aggressività è un comportamento sociale innato che si è evoluto per consentire la competizione per la ricerca del cibo, del partner e del territorio (Lim et al., 2014; Ueda et al., 2002).

Nel regno animale si è notato che l'isolamento sociale può aumentare i normali livelli di aggressività.

Questo comportamento in *Drosophila* è stato osservato per la prima volta nel 1915 da Sturtevant (Kravitz e Fernandez, 2015).

Numerosi screening genetici hanno utilizzato *Drosophila* tenute in gruppo anziché *Drosophila* isolate per identificare neuroni e geni responsabili della

soppressione dell'aggressività in contesti sociali. Tuttavia, studi recenti hanno iniziato a identificare meccanismi responsabili anche in individui isolati.

In *Drosophila*, approcci di screening genetico consolidati come la mutagenesi chimica, inserzioni di GAL4 con p-elemento, l'attivazione neuronale e lo screening RNAi, sono stati utilizzati per identificare geni e circuiti neuronali responsabili dell'aggressività.

Uno screening con microarray ha identificato *Cyp6a20*, i cui livelli erano più elevati in *Drosophila* che vivevano in gruppo (GH) rispetto a quelle in isolamento sociale (SH).

Il gene *Cyp6a20*, che codifica per il citocromo p450, è espresso in un sottoinsieme di cellule di supporto non neuronali associate ai sensilli olfattivi responsabili della percezione dei feromoni.

Si è notato che la riduzione di *Cyp6a20* ha reso le *Drosophila* GH più inclini all'aggressività rispetto alle SH, suggerendo la funzione del gene nella soppressione dell'aggressività legata all'esperienza sociale (Wang et al., 2008).

*Cyp6a20* è espresso nei sensilli tricoidi, sensibili ai feromoni, da parte di cellule di supporto che co-esprimono LUSH, una proteina legante gli odoranti e necessaria per la rilevazione di 11-cis-vaccenil acetato (cVA), un feromone volatile specifico maschile.

Queste osservazioni hanno portato all'ipotesi che cVA sia coinvolto nella regolazione feromonale dell'aggressività in *Drosophila*. Si è sfruttato il software CADABRA per valutare l'influenza di cVA sulle interazioni comportamentali tra coppie di maschi di *Drosophila melanogaster*, della linea chiamata Canton-S. Quando sono stati forniti 500 µg di cVA sintetico su un pezzo di carta filtro all'insetto, è stato osservato un numero significativamente maggiore di attacchi, il comportamento aggressivo predominante. L'effetto del cVA sintetico nel promuovere l'aggressività era dose-dipendente. Altri comportamenti aggressivi, inclusi la minaccia con le ali, la lotta e l'inseguimento, sono anch'essi aumentati dall'aggiunta di cVA sintetico. [2]

È stato dimostrato che coppie di *Drosophila* dello stesso sesso mostrano aggressività utilizzando schemi comportamentali specifici in relazione al genere sessuale (Chen et al., 2002). Nel caso di scontri tra due maschi di *Drosophila melanogaster* i comportamenti aggressivi sono caratterizzati dall'innalzamento di entrambe le ali, l'avvicinamento e l'attacco attraverso colpetti, spinte e scontri (Nilsen et al., 2004).

Le femmine di *Drosophila* invece sono generalmente meno aggressive in quanto si limitano principalmente a colpetti e sguardi negli scontri.

Similmente ai maschi di *Drosophila*, anche le femmine mostrano una maggiore aggressività quando allevate in isolamento (Belenioti e Chaniotakis, 2020).

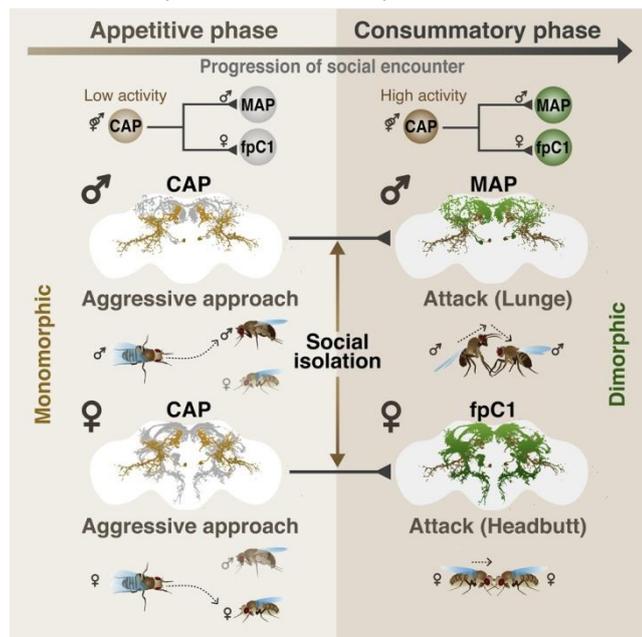
Le femmine di *Drosophila*, a differenza dei maschi, condividono più facilmente la risorsa alimentare che difendono, il che porta a un livello di aggressività di base complessivamente inferiore rispetto a quella dei maschi (Kravitz e Fernandez, 2015; Nilsen et al., 2004).

Uno screening di attivazione neuronale ha identificato i neuroni P1 che sono coinvolti nella promozione dell'aggressività nelle *Drosophila* cresciute in gruppo e non isolate socialmente (Hoopfer et al., 2015).

Un tempo si pensava che i neuroni P1 regolassero unicamente il corteggiamento; successivamente è stato scoperto che un'attivazione sub-soglia di questi stessi neuroni promuovesse un'aggressività prolungata nel tempo (Hoopfer et al., 2015).

Questo suggerisce che i circuiti che regolano l'aggressività e il corteggiamento sono spesso interconnessi (Anderson, 2016; Sano et al., 2013; Veening et al., 2005; Yang et al., 2013) e possono dipendere dallo stesso gruppo di neuroni.

Uno screening di attivazione neuronale di una collezione di 19 linee GAL4, identificate nello studio precedentemente citato di Hoopfer e dei colleghi (2015), è stato recentemente condotto sulle femmine (Chiu et al., 2021). Questo screening ha identificato i neuroni R60G08, la cui attivazione optogenetica promuove fortemente l'approccio e l'attacco sia nei maschi che nelle femmine. A partire da questi neuroni si sono identificati dei sottoinsiemi di neuroni responsabili dell'aggressività comune (CAP) in entrambi i sessi, neuroni che promuovono l'aggressività maschile specifica (MAP) e neuroni (fpC1) specifici per le femmine (Chiu et al., 2021).



**Fig. 2. Come si comportano durante gli attacchi maschi e femmine di *Drosophila*?**  
 I neuroni CAP regolano l'approccio aggressivo in entrambi i sessi. Ad una bassa attività dei neuroni CAP l'approccio aggressivo è il medesimo per maschi e femmine. I neuroni

*MAP sono specifici maschili e la loro attivazione promuove la transizione dall'approccio all'attacco, caratterizzato da scatti offensivi. I neuroni fpC1 sono specifici femminili e la loro attivazione regola l'attacco tra individui femmine di Drosophila, caratterizzato da brusche testate. Chiu et al., 2021*

Un altro screening, che ha utilizzato l'attivazione termogenetica di neuroni peptidici, ha individuato un cluster di 3-4 neuroni FruM+ addetti alla secrezione di Tachichinina (Tk) nel protocerebro laterale per la modulazione dell'aggressività, specificamente nelle *Drosophila* che vivono in gruppo (Asahina et al., 2014). Al contrario, un recente screening con RNA-Seq ha identificato un neuropeptide, la Drosulfachinina (Dsk), che aumenta l'aggressività solo nelle *Drosophila* socialmente isolate (Agrawal et al., 2020).

Questi risultati suggeriscono che due diversi neuropeptidi, la Tachichinina e la Drosulfachinina, secreti da diverse regioni del cervello, regolano l'aggressività in situazioni sociali opposte.

Il neuropeptide Drosulfachinina è l'omologo della colecistochinina (CCK) dei vertebrati, con la funzione di modulatore di ansia e aggressività (Katsouni et al., 2013).

## **2.2 CORTEGGIAMENTO**

La *Drosophila melanogaster* attua una serie di comportamenti standard innati per attrarre, corteggiare ed accoppiarsi con potenziali partner (Hall J C, 1994).

Il corteggiamento in *Drosophila* è condizionato dall'isolamento sociale sia in maschi che in femmine.

I maschi di *Drosophila melanogaster* del ceppo Canton-S di 3 giorni, che sono stati mantenuti in gruppo, hanno mostrato una forte riduzione del corteggiamento nei confronti di una femmina accoppiata rispetto ai maschi isolati.

Nel maschio l'isoforma del gene *fruM* è importante per il corteggiamento, in quanto quelli con l'allele nullo per tale gene non corteggiano quando mantenuti in isolamento sociale (Pan et al., 2014). Ma, se questi maschi mutanti di *Drosophila* vengono cresciuti in gruppo, imparano a corteggiare le femmine. Inoltre si è notato che gli stessi maschi mutanti mettono in atto un corteggiamento più lungo ed articolato rispetto a quello dei mutanti cresciuti in isolamento (Marie-Orleach, L. et al., 2019).

Questo risultato si pensa sia causato dalle interazioni sociali che scatenano l'attivazione della maturità riproduttiva, regolata dalla segnalazione della proteina legante CREB (CBP, CREB-binding protein) per migliorare l'efficacia dell'ormone giovanile (JH) (Sethi et al., 2019).

Con l'utilizzo della tecnica del channelrhodopsin, attivabile dalla luce rossa (ReaChR) in grado di depolarizzare neuroni optogeneticamente, si è notato che

l'attivazione dei neuroni P1, già visti coinvolti nei circuiti neuronali alla base dell'aggressività in *Drosophila*, comporta una diminuzione di eccitabilità negli individui maschi GH rispetto a quelli SH (Inagaki et al., 2014).

### 2.3 SONNO

Il sonno svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi fisiologica e nel supporto del funzionamento cognitivo ottimale. Negli animali sociali, come la *Drosophila melanogaster*, è noto che le interazioni sociali influenzano pattern di sonno e ritmi circadiani (Levine et al., 2002).

Sono stati osservati individui di *Drosophila melanogaster* cresciuti in gruppo ed in seguito comparati ad altri messi in isolamento sociale subito dopo la nascita: nel primo caso si è osservato che le *Drosophila* socialmente arricchite, esposte ad un gruppo di 30 o più individui sia maschili che femminili, dormivano significativamente di più rispetto alle *Drosophila* socialmente isolate. [3]

Studi dimostrano che l'interazione sociale può portare a modifiche di regioni del cervello che regolano il sonno in *Drosophila* (Donlea et al., 2014). Infatti, l'isolamento sociale modula l'espressione di geni e dell'epigenoma all'interno di tipi di cellule specifiche, portando come risultato ad una modulazione del sonno. L'isolamento sociale nello specifico porta ad una riduzione delle ore di sonno diurne in *Drosophila* in quanto ha un effetto negativo sui livelli di dopamina ed è anche responsabile di cambiamenti epigenetici che condizionano i neuroni dopaminergici (DANs), cellule nervose del cervello che producono dopamina (Agrawal et al., 2019).

Silenziare i DANs con l'utilizzo del driver TH-GAL4 per guidare la tossina TNT, in grado di silenziare l'attività neuronale, ha evidenziato che i maschi di *Drosophila* cresciuti in gruppo dormono quanto gli individui mantenuti in isolamento, suggerendo che la segnalazione della dopamina gioca un ruolo fondamentale nella stimolazione del sonno (Lone et al., 2016).

I meccanismi epigenetici sono fondamentali per le raffinate funzioni cerebrali e fattori come l'isolamento sociale possono alterare il comportamento dell'individuo proprio attraverso questi cambiamenti. Tuttavia, identificare i cambiamenti epigenetici in linee cellulari specifiche del cervello può risultare difficile a causa dell'eterogeneità cellulare.

In uno studio condotto da Agrawal e dai colleghi [4], si è utilizzato un metodo chiamato mini-INTACT (isolation of nuclei tagged in specific cell type) per l'isolamento dei nuclei marcati in specifici tipi cellulari, che consente studi sull'epigenetica e sulla regolazione genica in contesti comportamentali.

Come si è già detto, i neuroni dopaminergici giocano un ruolo chiave nella modulazione dei comportamenti della *Drosophila*, come il sonno, influenzato dall'isolamento sociale.

Per ottenere unicamente le cellule d'interesse, ovvero i neuroni dopaminergici, bisogna selezionarle dal materiale di partenza, in questo caso i cervelli degli insetti o l'insetto intero, e discriminare le varie linee cellulari tra loro. Questo non è un passaggio semplice in quanto il materiale di partenza è poco, viste le dimensioni del modello animale: dissezionare manualmente le diverse regioni cerebrali risulta impossibile.

Per questa esigenza si sono utilizzate linee di *Drosophila* in cui è stato sfruttato il sistema GAL4-UAS.

Il sistema GAL4-UAS è una tecnica che consente di controllare l'espressione di geni specifici. La sequenza UAS (upstream activating sequence) è il sito di legame per il fattore GAL4; quando GAL4 si lega si attiva l'espressione di geni inseriti a valle di UAS.

Una linea di *Drosophila* che esprime GAL4 in specifiche cellule o tessuti può essere progettata per esprimere GAL4 in presenza di specifici marcatori genetici, consentendo un controllo preciso.

Si è quindi utilizzato mini-INTACT per purificare nuclei di neuroni dopaminergici, che costituiscono meno del 0.1% del cervello della *Drosophila*: è stato necessario usare tra le 200 e le 250 teste di *Drosophila* (10-15,000 nuclei) sia per quanto riguarda quelle socialmente isolate che quelle cresciute in gruppo.

Successivamente, con l'utilizzo di ChIP-seq, utile per analizzare le modifiche della cromatina e la regolazione dell'espressione genica, è stato possibile scovare i cambiamenti epigenetici accertati su scala genomica.

Comparare i profili arricchiti di 6 diversi marcatori istonici (histone modification marks) con l'utilizzo di RNA-seq, per evidenziare i livelli di espressione di mRNA nei neuroni dopaminergici, ha rivelato alcuni cluster di geni che potrebbero contribuire ai cambiamenti comportamentali in risposta all'isolamento sociale.

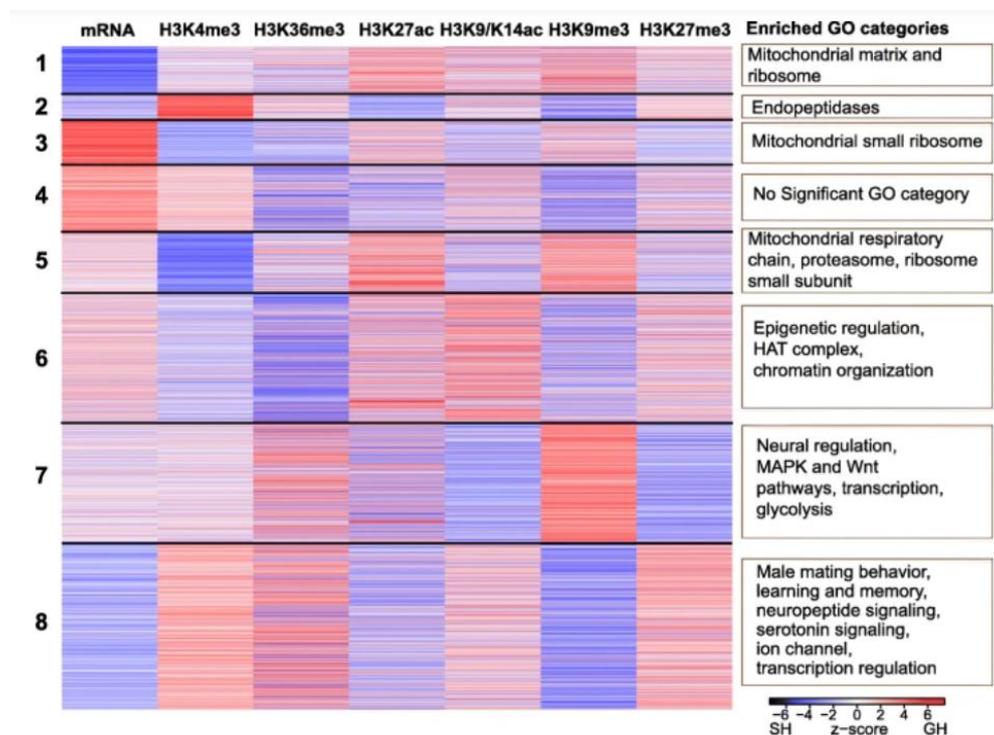
L'esperienza sociale altera lo stato epigenetico di clusters genici coinvolti nella trascrizione e funzione neurale. Alcune di queste alterazioni potevano essere attese modificando l'espressione di quattro fattori trascrizionali e la maggior parte dei loro siti di legame in numerosi clusters.

Questi fattori trascrizionali sono stati silenziati con la tecnica del knockdown nei neuroni dopaminergici portando come risultato la riduzione degli effetti sul sonno dovuti all'esperienza sociale: un'ulteriore conferma del ruolo fondamentale che detiene l'esperienza sociale sulle alterazioni comportamentali in *Drosophila*.

Il gene che codifica per l'enzima DOPA decarbossilasi (Ddc) porta alla formazione dei neurotrasmettitori dopamina e serotonina: i livelli di mRNA di Ddc sono up-regolati nelle *Drosophila* GH rispetto a quelle in isolamento. Questo spiega perché gli individui in isolamento sociale hanno livelli di dopamina più bassi.

H3K4me3 è una modificazione epigenetica che indica una tri-metilazione al quarto residuo di lisina dell'istone H3 ed è spesso coinvolta nella regolazione dell'espressione genica. Analisi comparative dei profili epigenetici tra maschi di *Drosophila* cresciuti in gruppo e cresciuti in isolamento hanno mostrato che i livelli di H3K4me3 erano significativamente più alti in individui cresciuti in gruppo a livello del gene *Ddc*.

Gli eventi di metilazione ed acetilazione sono alla base dello stato epigenetico del DNA: la metilazione è associata al silenziamento genico, in quanto impedisce l'accesso ed il posizionamento dei fattori di trascrizione; l'acetilazione invece è associata ad un aumento dell'espressione genica poiché favorisce la formazione di una cromatina più lasca in grado di accettare e legare i vari fattori di trascrizione.



**Fig. 3. Differenze nei livelli di mRNA tra maschi GH e SH.** Lo stato epigenetico dei geni espressi nei neuroni dopaminergici è modulato dall'esperienza sociale. La figura mostra le differenze nei livelli di mRNA in otto categorie tra maschi GH e SH. Le linee rosse indicano i geni i cui marcatori o mRNA sono più presenti nei maschi GH rispetto ai maschi SH, le linee blu invece indicano quelli che sono più presenti nei maschi SH rispetto ai maschi GH. Le categorie 6, 7 ed 8 in particolare sono arricchite di geni con funzioni neurali e regolatorie. Le categorie GO (gene ontology) arricchite per ogni gruppo, sono riportate a destra. Agrawal et al., 2019

In sintesi, i livelli di trascrizione di molti geni espressi nei neuroni dopaminergici sono stati modificati dal fattore sociale, inclusi numerosi geni fondamentali per le modificazioni epigenetiche.

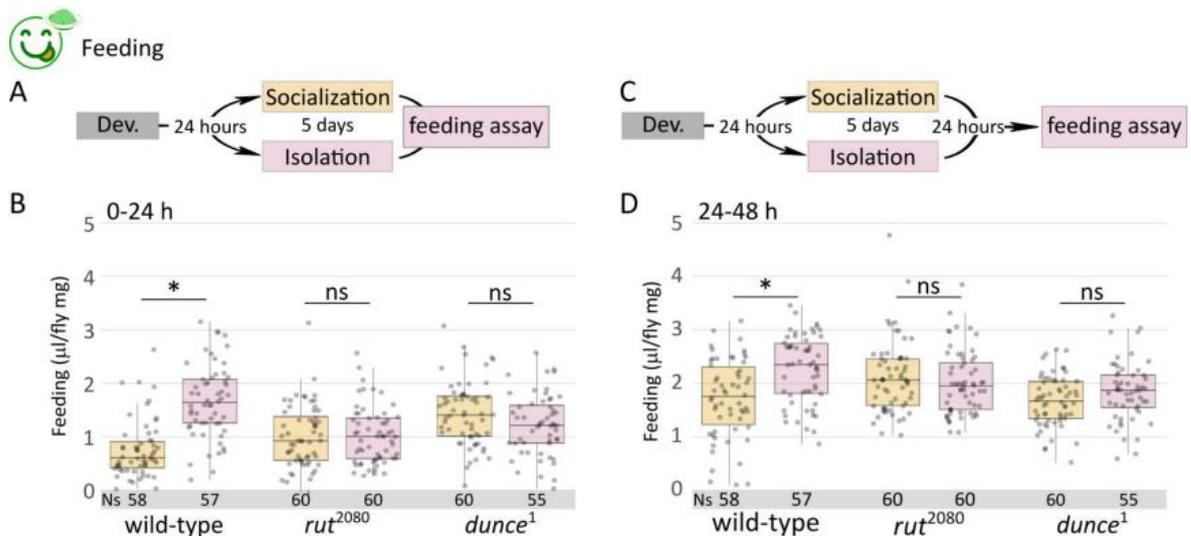
### 3. LE INTERAZIONI SOCIALI CAUSANO CAMBIAMENTI COMPORTAMENTALI PERSISTENTI NEL TEMPO

A livello molecolare, la formazione della memoria a lungo termine (LTM) nei corpora pedunculata, delle strutture nel cervello degli insetti con funzione nell'apprendimento olfattivo e nella memoria, richiede la funzione dei geni *rutabaga* (*rut*-adenilato ciclasi) e *dunce* (*dnc*- cAMP fosfodiesterasi), in modo da poter regolare i livelli di cAMP e assicurarsi la plasticità neuronale. La segnalazione da parte di cAMP porta alla fosforilazione di CREB (cAMP response binding element), un fattore di trascrizione fondamentale per la memoria a lungo termine e la plasticità sinaptica (Kaldun et al., 2019).

Le interazioni sociali causano cambiamenti strutturali nei corpora pedunculata: questo non avviene nelle *Drosophila* con i geni che mediano la memoria *rut* e *dnc* mutati (Technau et al., 2007). La funzione di questi geni è necessaria per cambiamenti relativi al sonno innescati da interazioni sociali (Ganguly-Fitzgerald et al., 2006).

Uno studio recente, condotto da Gil-Martì e dai colleghi [5], ha mostrato che la socializzazione altera i comportamenti per più di 8 ore dopo l'esposizione, fino a 72 ore. In più, i meccanismi alla base sono simili a quelli che caratterizzano la memoria a lungo termine. Questi dipendono dai livelli di cAMP, possono essere bloccati dall'utilizzo di anestesia e risentono del cambiamento di numero di sinapsi e neuroni reattivi a CREB.

Questo si può osservare, per esempio, osservando l'alimentazione: le *Drosophila* GH consumano meno cibo se comparate alle *Drosophila* cresciute in gruppo e successivamente isolate.



**Fig. 4. Cambiamenti comportamentali persistenti nel tempo.** (A) Schema del protocollo della socializzazione: dopo la loro nascita, le *Drosophila* sono state inserite in gruppi con altri individui oppure isolate per 5 giorni, successivamente si è svolto l'esperimento. (B)

*Quantificazione della consumazione di cibo da parte di individui wild-type, mutanti per rut e per dnc sia per quanto riguarda Drosophila GH che SH nella finestra di tempo 0-24h. (C) Schema del protocollo della socializzazione modificato: individui isolati o mantenuti in gruppo per 5 giorni sono stati isolati per le successive 24 ore antecedenti la rilevazione dei risultati. (D) Quantificazione della consumazione di cibo da parte di individui wild type, mutanti per rut e per dnc sia per quanto riguarda Drosophila GH che SH nella finestra di tempo 24-48h. Gil-Martì et al., 2024*

Si sono confrontate le quantità di cibo consumato da alcune *Drosophila* cresciute in gruppo per 5 giorni con altre nate e cresciute in isolamento. Si è notato che, una volta trascorsi i 5 giorni, per le conseguenti 24 ore, gli individui GH hanno assunto meno cibo rispetto agli individui SH. (A-B)

Per comprendere se questo risultato è mantenuto nelle *Drosophila* GH anche in assenza di interazioni sociali si è modificato l'esperimento: gli individui SH e GH sono stati messi in isolamento, dopo i 5 giorni, per 24 ore. I risultati di questo secondo esperimento riportano che le *Drosophila* GH, nonostante siano state mantenute in isolamento per 24 ore, consumano meno cibo rispetto alle SH.

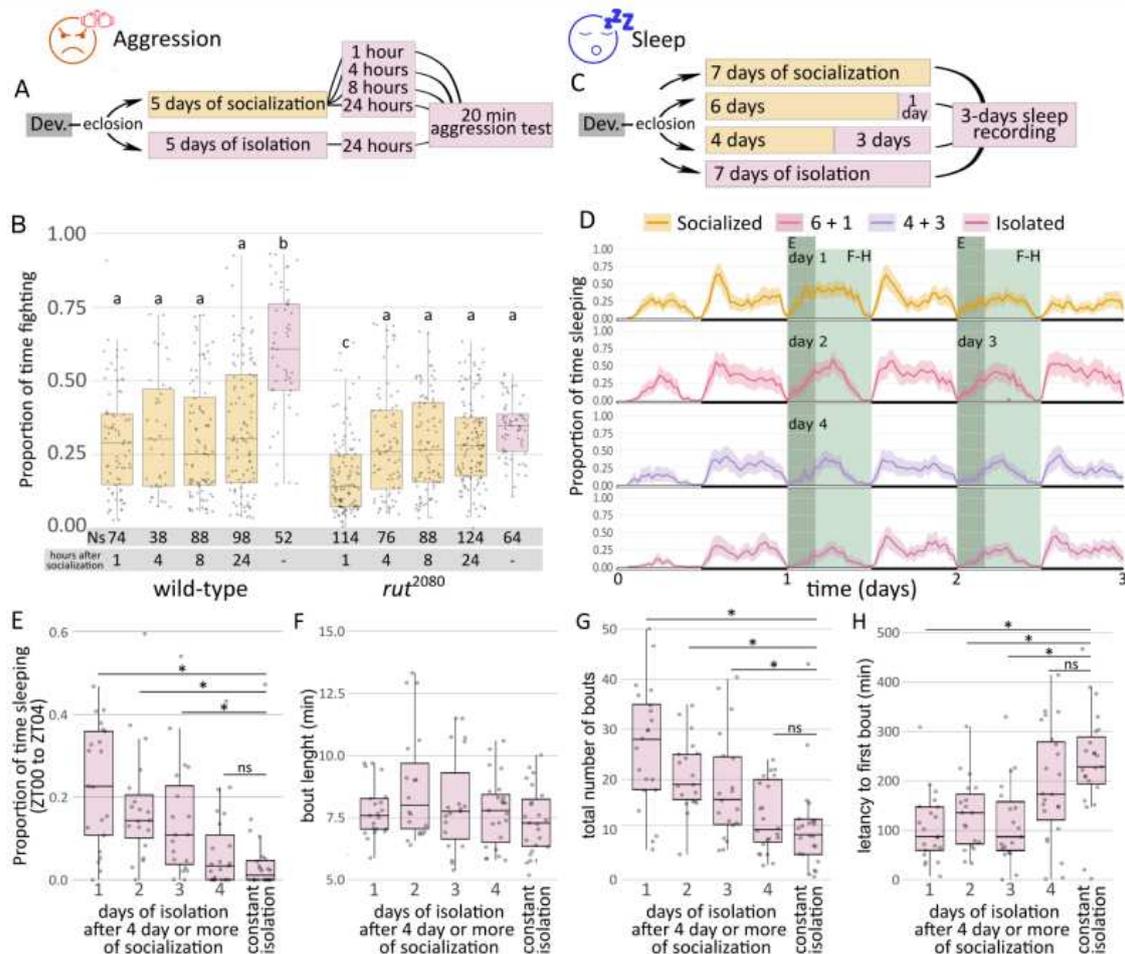
Ciò conferma che l'interazione sociale ha un effetto duraturo sul comportamento alimentare.

È stato ipotizzato che tra i geni, i candidati più plausibili a giocare un ruolo negli effetti duraturi fossero i geni coinvolti nella memoria come rut (Lee et al., 2015). Infatti, nonostante l'esperienza sociale, le *Drosophila* GH mutanti per il gene rut dopo essere state isolate, non mostravano nella finestra temporale 24-48h differenze nella consumazione di cibo se comparate con individui isolati dalla nascita (Fig. 4D). Oltre a questo, i mutanti per il gene rut non alterano il comportamento alimentare durante la finestra temporale 0-24h, suggerendo la richiesta di cAMP per questo tipo di effetto (Fig. 4B).

Per confermare il coinvolgimento della segnalazione da parte di cAMP si è ripetuto l'esperimento usando mutanti per il gene *dunce* (dnc). I risultati si possono comparare a quelli precedenti: le *Drosophila* mutanti per il gene dnc non modificavano il loro comportamento alimentare, non solo durante la finestra temporale 0-24h, ma anche per quanto riguarda la finestra 24-48h.

### **3.1 ANDAMENTO TEMPORALE DEI COMPORAMENTI INDOTTI DALL'ISOLAMENTO SOCIALE**

Lo stesso studio, precedentemente esaminato, ha voluto delineare un andamento temporale della comparsa delle alterazioni comportamentali in *Drosophila* nel periodo di isolamento. Più precisamente lo scopo è quello di determinare in modo preciso la progressione nel tempo degli effetti dell'isolamento sociale sull'aggressività e sul sonno in *Drosophila melanogaster*.



**Fig. 5.** Beatriz Gil-Martí et al., Socialization causes long-lasting behavioral changes. 2024.

**Andamento temporale dei comportamenti indotti dall'isolamento sociale.** (A) Schema del protocollo per l'andamento temporale dell'aggressività: *Drosophila* GH sono state isolate per 1, 4, 8 e 24 ore per poi essere rinchiuso con un altro individuo maschio per osservare il livello di aggressività. Le *Drosophila* SH sono state direttamente mantenute in isolamento per altre 24 ore prima della prova. (B) Quantificazione della proporzione di tempo usato per attuare atteggiamenti aggressivi dopo differenti ore di isolamento. *Drosophila* wild-type o mutanti per il gene *rut* sono state messe in gruppi oppure isolate per 5 giorni e successivamente gli atteggiamenti delle GH sono stati osservati allo scorrere di 1, 4, 8 e 24 ore di isolamento. (C) Schema del protocollo per l'andamento temporale del sonno: più gruppi di *Drosophila* sono stati isolati o mantenuti in gruppo dopo la nascita per 7, 6 o 4 giorni e poi isolati per 0, 1 o 3 giorni. Successivamente sono state mantenute sotto osservazione per 3 giorni. (D) Profilo del sonno per individui isolati da 1 a 4 giorni, usando le *Drosophila* SH come controllo. (E) Quantificazione del sonno di *Drosophila* in isolamento da 1, 2, 3 o 4 giorni dopo 4 giorni o più di socializzazione e *Drosophila* in isolamento costante. (F-H) Analisi della lunghezza del periodo di sonno (H), numero totale di periodi di sonno (G) e latenza al primo periodo di sonno (H) di individui in isolamento da 1, 2, 3 o 4 giorni dopo 4 giorni o più di socializzazione e *Drosophila* in isolamento costante.

*Drosophila* con esperienza di socializzazione hanno mostrato un'aggressività ridotta ad 1, 4, 8 e 24 ore dopo l'isolamento, quando comparate alle compagne SH, evidenziando un cambiamento comportamentale sia nel breve che lungo termine.

Nonostante l'interazione sociale sia terminata, da 1 fino a 24 ore, le *Drosophila* GH hanno mostrato per minor tempo atteggiamenti violenti rispetto alle *Drosophila* SH.

Al contrario, mutanti per il gene *rut* hanno mostrato una diminuzione dei livelli di aggressività, con un valore di riferimento molto più basso se comparato agli individui wild-type: questo indica che i mutanti per *rut* sono meno aggressivi.

Osservando i mutanti per il gene *rut* è possibile notare una differenza nell'aggressività tra *Drosophila* GH ed SH, ma esclusivamente per quanto riguarda le alterazioni a breve termine (1 ora). Per quanto riguarda il medio-lungo termine (4, 8 e 24 ore) non si notano differenze significative.

Per le alterazioni del sonno si sono comparati gruppi di *Drosophila* cresciuti in socialità per 7, 6 o 4 giorni e successivamente isolati per 0, 1 o 3 giorni (nominati rispettivamente come 6+1 o 4+3). Anche in questo caso si sono utilizzate le *Drosophila* SH come controllo.

Successivamente si è monitorato per 3 giorni le ore di sonno dei diversi gruppi.

Si è osservata una progressiva riduzione delle ore di sonno dopo l'isolamento, con una significativa diminuzione per le *Drosophila* isolate per 4 giorni, che potevano essere comparate alle SH (Fig. 5 E). Questo dimostra che sono sufficienti 4 giorni di isolamento per alterare le ore di sonno di *Drosophila* con esperienza di socialità fino ad essere comparabili a *Drosophila* SH che sono sempre state isolate.

Allo stesso modo è stato anche possibile analizzare la durata del sonno, il numero di periodi di sonno e la latenza al primo periodo di sonno in una finestra temporale di 12 ore (ZT0-ZT12). Non si sono notate differenze significative nella durata dei periodi di sonno tra i gruppi sperimentali (Fig. 5 F).

Per quanto riguarda il numero di periodi di sonno, invece, si è osservato una riduzione progressiva del valore fino ad arrivare alle *Drosophila* isolate da 4 giorni che hanno diminuito il numero a livelli paragonabili a quelli degli individui SH dalla nascita.

Osservando la latenza al primo periodo di sonno è possibile evidenziare che i valori sono rimasti simili per i primi tre gruppi di *Drosophila* (isolate per 1, 2, 3 giorni), per poi aumentare significativamente per le *Drosophila* isolate da 4 giorni fino ad un valore, ancora una volta, vicino a quello degli altri campioni di controllo.

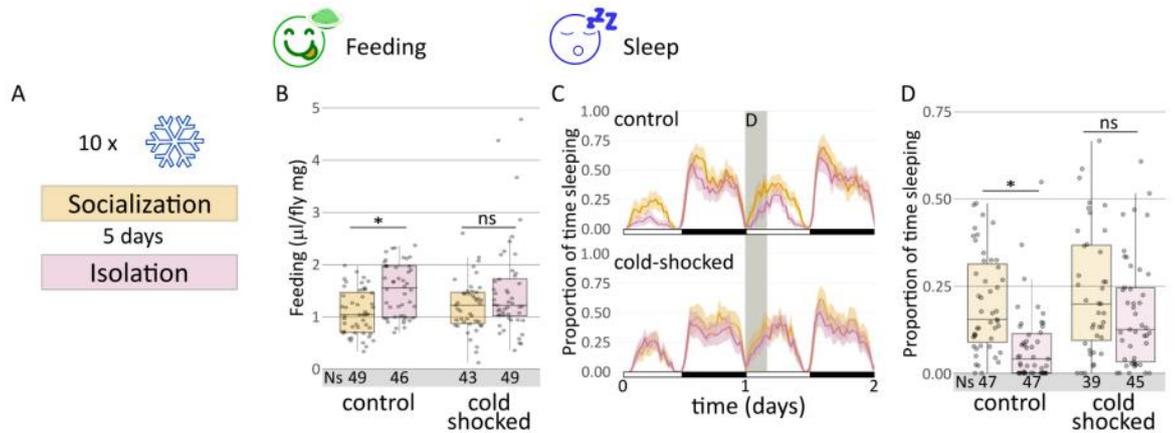
È chiaro che l'alterazione della socializzazione e quindi anche l'isolamento, influenzino l'organizzazione del sonno andando a modificare il numero e la

distribuzione dei periodi, ma non la durata temporale di un dato episodio di sonno in *Drosophila melanogaster*. In più si può affermare che gli effetti della socialità durano almeno 3 giorni e quindi possono essere considerati a lungo termine.

#### 4. L'ANESTESIA ANNULLA GLI EFFETTI DELLA SOCIALIZZAZIONE

L'anestesia blocca la consolidazione della memoria a lungo termine nella maggior parte delle specie (Wang et al., 2010). In *Drosophila* un evento della durata di 2 minuti di shock termico a basse temperature (cold-shock) agisce come un anestetico interferendo con i meccanismi di consolidamento della memoria (Bourouliti et al., 2022). Il trattamento con il freddo può inibire il rafforzamento sinaptico e il consolidamento della memoria, impedendo così la formazione della memoria a lungo termine.

Ci si è domandati se l'anestesia fosse in grado di bloccare anche gli effetti dovuti alle alterazioni della socializzazione.



**Fig. 6.** Beatriz Gil-Martí et al., Socialization causes long-lasting behavioral changes. 2024.

**Come lo shock termico altera gli effetti della socializzazione.** (A) Schema del protocollo dello shock freddo (due volte al giorno). (B) Quantificazione del consumo di cibo. (C) profilo del sonno e (D) quantificazione del sonno.

Individui di *Drosophila melanogaster*, sia GH che SH, sono stati esposti per 3 minuti allo shock da freddo due volte al giorno per 5 giorni, per poi essere isolati per un giorno prima di procedere con l'analisi.

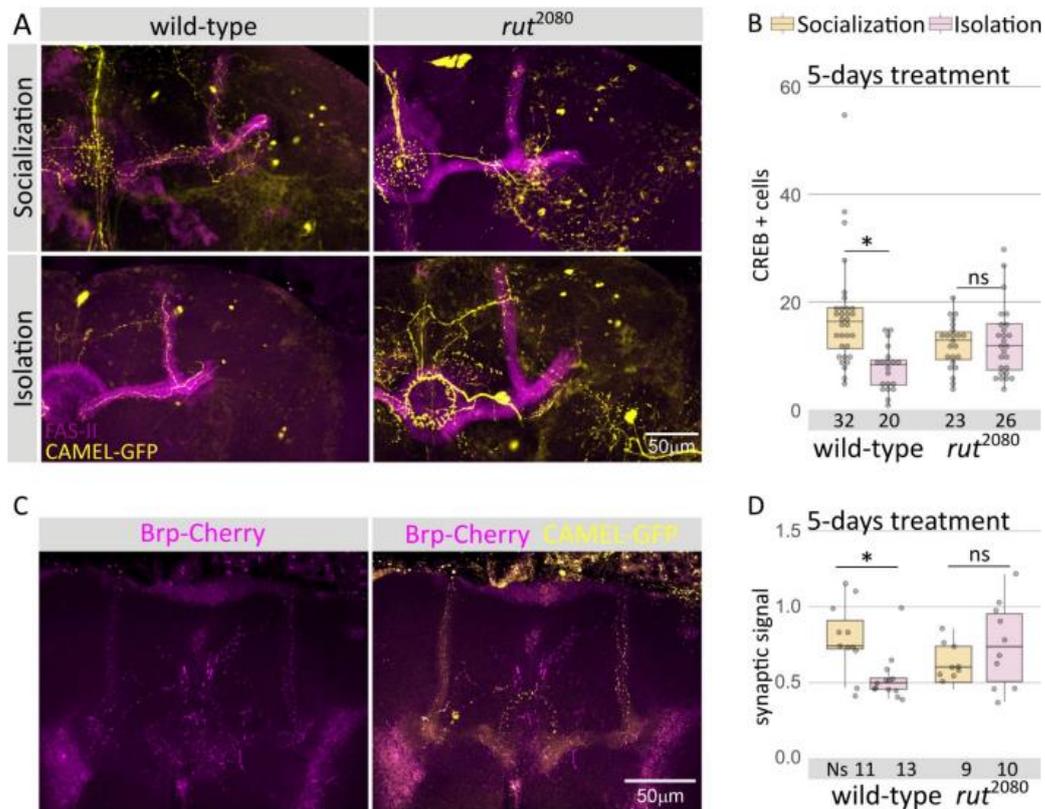
Entrambi i due gruppi SH e GH non hanno mostrato alcuna differenza significativa per quanto riguarda la consumazione di cibo nella finestra temporale 24-48 h dopo l'isolamento di un giorno, in contrasto con gli individui che non hanno subito lo shock termico (Fig. 6 B).

Allo stesso modo anche per quanto riguarda le ore di sonno non si è notata una differenza significativa tra il gruppo SH e GH dopo il trattamento mentre, come ci si aspettava, la differenza con i due gruppi di controllo, che non hanno subito il trattamento, è significativa (Fig. 6 C-D).

In conclusione, si può affermare che la socialità sia connessa alla segnalazione da parte di cAMP e sia bloccata dall'anestesia, come avviene nella memoria a lungo termine.

## 5. LA SOCIALIZZAZIONE È CORRELATA AD UN AUMENTO DELL'ATTIVITÀ NEURONALE E PLASTICITÀ SINAPTICA

In *Drosophila*, la memoria a lungo termine è associata ad un aumento del numero di neuroni attivati da CREB nei corpora pedunculata (Davis et al., 2023). Per comprendere se anche la socializzazione sia correlata o meno a livelli più elevati di CREB nei corpora pedunculata, è stato utilizzato lo strumento CAMEL reporter dopo 5 giorni di socializzazione direttamente dopo la nascita delle *Drosophila*. Questo strumento porta un costrutto transgenico specifico per i corpora pedunculata che risponde al CREB fosforilato (e quindi all'attiva segnalazione di CREB) con la produzione di GFP (Siegenthaler et al., 2019).



**Fig. 7.** Beatriz Gil-Martì et al., Socialization causes long-lasting behavioral changes. 2024.

**Attività neuronale e plasticità sinaptica nell'ambito della socializzazione e dell'isolamento.** (A) Immagini confocali rappresentative dello strumento CAMEL per i corpora pedunculata di wild-type e mutanti per il gene *rut*, sia di individui GH che SH. (B) Numero di cellule CREB GFP-positive nei corpora pedunculata di individui wild-type e mutanti *rut* sia GH che SH dopo 5 giorni. (C) Esempio dello strumento CAMEL (cellule di corpora pedunculata marcate da GFP) combinato con il marcatore pre-sinaptico *brp-cherry* dopo 5 giorni per wild-type e mutanti *rut* sia GH che SH. (D) Quantificazione del numero di sinapsi dopo l'isolamento o la socializzazione sia in wild-type che in mutanti *rut*.

Individuando il numero di cellule GFP-positive nei cervelli di individui di *Drosophila* wild-type adulti, si è osservato un aumento del numero di cellule CREB-positive in GH se comparate alle SH (Fig 7 A). Al contrario, questa risposta di CREB è andata persa nell'analisi dei cervelli di individui mutanti per rut.

La formazione della memoria a lungo termine, attraverso un processo di condizionamento che prevede una ricompensa appetitiva (come il cibo), ha portato ad un aumento del numero di sinapsi che trasmettono segnali ai corpora pedunculata (Baltruschat et al., 2021). Pertanto, per determinare se i neuroni attivati da CREB dopo la socializzazione mostrassero anche segnali di aumentata plasticità sinaptica, si è incluso nello strumento CAMEL un secondo reporter, il marcatore presinaptico BRP, fuso con la variante RFP cherry. Questa combinazione di reporter ha permesso la visualizzazione delle densità presinaptiche senza alterare il numero di zone attive (Kremer et al., 2010) (Fig. 7 C).

È stato quantificato il numero di sinapsi per volume di cellule nei cervelli di individui di *Drosophila* cresciuti in gruppo per 5 giorni o cresciuti in isolamento. Si è notato un aumento significativo del numero di segnali sinaptici, e quindi numero di pre-sinapsi, nei corpora pedunculata di *Drosophila* GH se comparati a quelli di *Drosophila* SH (Fig. 7 D).

Diversamente, nei mutanti per il gene rut non si è identificata una grande differenza nel numero di pre-sinapsi dei corpora pedunculata (Fig. 7 D).

In conclusione, i risultati mostrano una chiara correlazione tra i neuroni attivati da CREB ed un aumento della plasticità sinaptica durante un'interazione sociale efficace. Tuttavia, questa correlazione viene meno nei mutanti, suggerendo una somiglianza tra la formazione della memoria a lungo termine e gli effetti dell'esperienza sociale.

## 6. CONCLUSIONI

Il recente lockdown dovuto alla pandemia di COVID-19 ha obbligato la quasi totalità della popolazione mondiale all'isolamento e all'annullamento delle interazioni sociali, con conseguente aumento diffuso dello stress, dell'ansia (Wilkialis et al., 2021), e depressione (Pietrabissa et al., 2020). Gli studi suggeriscono che l'isolamento sociale durante la pandemia di COVID-19 ha portato ad un aumento di aggressività in alcuni individui (Drieskens et al., 2022; Humphrey et al., 2020). Per questo, comprendere i meccanismi molecolari e neuronali alla base dell'isolamento sociale è cruciale per interpretare molti dei comportamenti diffusi riscontrati in svariate parti del mondo.

Condurre esperimenti sulla *Drosophila melanogaster* si è rivelato utile poiché questa, in tempi brevi di isolamento, matura delle risposte comportamentali analoghe a quelle dell'uomo: un aumento dell'alimentazione, dell'aggressività e una diminuzione dei periodi di sonno.

Su modelli animali come *Drosophila* è possibile, come si è visto, risalire ai meccanismi molecolari e neurali che portano effetti di alterazione comportamentale dovuti alla socializzazione o all'isolamento.

Allo stesso tempo è anche semplice ricreare ambienti sociali diversi in cui crescere gruppi separati di individui per poi confrontarli e trarre conclusioni in tempi relativamente ridotti.

## **BIBLIOGRAFIA**

[1] Marishka K. Brown, PhD, Ewa Strus, MS, Nirinjini Naidoo, PhD. Reduced Sleep During Social Isolation Leads to Cellular Stress and Induction of the Unfolded Protein Response. 25 maggio 2017.

[2] Liming Wang, David J. Anderson. Identification of an aggression-promoting pheromone and its receptor neurons in *Drosophila*. 6 dicembre 2009.

[3] Indrani Ganguly-Fitzgerald, Jeff Donlea, Paul J. Shaw. Waking Experience Affects Sleep Need in *Drosophila*. 22 settembre 2006.

[4] Pavan Agrawal, Phuong Chung, Ulrike Heberlein, Clement Kent. Enabling cell-type-specific behavioral epigenetics in *Drosophila*: a modified high-yield INTACT method reveals the impact of social environment on the epigenetic landscape in dopaminergic neurons. 10 aprile 2019.

[5] Beatriz Gil-Martí, Julia Isidro-Mézcua, Adriana Poza-Rodríguez, Gerson S. Asti Tello, Gaia Treves, Enrique Turiégano, Esteban J. Beckwith, Francisco A. Martín. Socialization causes long-lasting behavioral changes. 27 settembre 2024.