



Università degli Studi di Pisa
Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali
Corso di Laurea in Scienze Biologiche
Anno Accademico 2005-2006

Tesi di Laurea

**Possibili meccanismi post trascrizionali implicati nella regolazione
dell'ormone leptina.**

Relatori:

Dott.ssa Margherita Maffei

Dott. Mario Costa

Candidato

Marco Brondi

INDICE

RIASSUNTO.....	pag. 5
1 INTRODUZIONE.....	pag. 8
1.1 omeostasi energetica.....	pag. 8
1.2 Scoperta della leptina.....	pag. 10
1.3 La leptina nella regolazione centrale del bilancio energetico.....	pag. 13
1.4 La leptina è un ormone pleiotropico.....	pag. 17
1.5 Regolazione della produzione di leptina.....	pag. 19
1.6 Sistemi di regolazione post trascrizionale.....	pag. 26
1.7 Sistemi di regolazione traduzionale poliadenilazione dipendenti.....	pag. 28
1.8 Scopo del presente studio.....	pag. 32
2 MATERIALI E METODI.....	pag. 34
2.1 Animali.....	pag. 34
2.2 Prelievo dei tessuti.....	pag. 34
2.3 Induzione del differenziamento adipocitario nei fibroblasti 3T3 L1.....	pag.34
2.4.coltura primaria di adipociti di topo.....	pag. 35
2.4.1 <i>Trattamento con collagenasi</i>	pag. 35
2.4.2 <i>protocollo di induzione</i>	pag. 36
2.5 Test E.L.I.S.A.	pag. 36
2.6 Condizioni RNase-Free (RF).....	pag. 37
2.7 Elettroforesi.....	pag. 37
2.8 Condizioni generali di PCR.....	pag. 38
2.9 Primers utilizzati.....	pag. 38
2.10 Estrazione di RNA totale.....	pag. 39

2.10.1	<i>Determinazione della concentrazione e purezza dell'RNA estratto</i>	pag. 39
2.11	Trattamento con DNasi I	pag 40
2.12	3'RACE (rapid amplification of cDNA ends) dell' mRNA della Leptina	pag.40
2.12.1	<i>Fase di retrotrascrizione</i>	pag. 41
2.12.2	<i>Fase di amplificazione per PCR</i>	pag. 41
2.13	Sequenziamento del cDNA della Leptina	pag. 42
2.14	Retrotrascrizione ed amplificazione (RT-PCR) dell' mRNA di CPEB	pag. 43
2.14.1	<i>Fase di retrotrascrizione</i>	pag. 43
2.14.2	<i>Fase di amplificazione per PCR</i>	pag. 43
2.15	Saggio di poliadenilazione RACE-PAT (rapid amplification of cDNA ends-polyadenylation test)	pag. 44
2.15.1	<i>Fase di retrotrascrizione</i>	pag. 44
2.15.2	<i>Fase di amplificazione</i>	pag. 44
2.16	Saggio di poliadenilazione LM-PAT (ligase mediated-polyadenylation test)	pag. 45
2.16.1	<i>Fase di incubazione e ligation</i>	pag. 45
2.16.2	<i>Fase di retrotrascrizione</i>	pag. 46
2.16.3	<i>Fase di amplificazione</i>	pag. 46
2.17	Southern blotting	pag. 46
2.18	Allestimento della sonda marcata con $\alpha(^{32}\text{P})\text{dCTP}$	pag. 47
2.18.1	<i>Isolamento banda e HOT-PCR</i>	pag. 47
2.18.2	<i>Purificazione sonda</i>	pag. 48
2.19	Ibridazione su filtro	pag. 48
2.20	Analisi del contenuto di ^{32}P	pag. 49
2.21	Estratto di proteine totali da adipociti o da cervello di topo	pag. 49
2.22	Preparazione di sinaptosomi	pag. 50
2.23	Determinazione del contenuto proteico con metodo BIO-RAD (BIO-RAD protein assay)	pag. 50
2.24	Western Blotting	pag. 50

2.24.1 SDS-PAGE.....	pag. 51
2.24.2 Immunoblotting.....	pag. 51
2.25 Analisi statistica.....	pag. 52
3 RISULTATI.....	pag. 53
3.1 Studio della sequenza del 3'UTR del trascritto della leptina.....	pag. 53
3.2 Studio di espressione della proteina CPEB negli adipociti.....	pag. 58
3.2.1 Presenza del trascritto per CPEB.....	pag. 58
3.2.2 Presenza della proteina CPEB.....	pag. 60
3.3 Studio della poliadenilazione nell'mRNA della leptina.....	pag. 62
3.3.1 Premesse teoriche e tecniche del metodo RACE-PAT.....	pag. 62
3.3.2 RACE-PAT sul tessuto adiposo bianco.....	pag. 64
3.3.3 Saggio dello stato di poliadenilazione della leptina su 3T3 L1.....	pag. 69
3.4 Studi di poliadenilazione e produzione di leptina negli adipociti primari.....	pag. 71
3.5 saggi di poliadenilazione su adipociti da coltura primaria.....	pag. 76
4 DISCUSSIONE.....	pag. 89
5 CONCLUSIONI.....	pag. 96
6 Ringraziamenti.....	pag. 97
7 BIBLIOGRAFIA.....	pag. 99

RIASSUNTO

Il gene *ob* codifica per la leptina, un ormone-citochina prodotto prevalentemente dal tessuto adiposo bianco (WAT) e considerato un importante segnale di sazietà: da cui il nome della proteina che deriva dal greco "leptos", magro. Mutanti spontanei di topo, deficienti per questo ormone, sviluppano una obesità grave in fasi molto precoci della vita.

La leptina viene secreta in proporzione alla massa grassa totale e i suoi recettori sono stati individuati in nuclei ipotalamici implicati nella regolazione del bilancio energetico e di comportamenti associati alla nutrizione. L'innalzamento dei livelli plasmatici dell'ormone, causa l'attivazione di un pathway neuronale che determina una risposta anoressizzante, mentre una loro diminuzione induce una risposta contraria.

La leptina è interessata anche in altri processi, quali: maturazione dell'apparato riproduttivo e del sistema immunitario, angiogenesi, omeostasi del tessuto osseo, processi infiammatori.

La produzione della leptina, è regolata da diverse condizioni croniche come: lo stato nutrizionale, l'età, il sesso e da stimoli acuti quali: citochine, ipossia, β 3agonisti, glucocorticoidi, insulina.

I processi molecolari che stanno alla base di alcune di queste regolazioni non sono stati ancora chiariti.

Non sono, ad esempio, noti elementi attivi in *cis* nella regione 5'-UTR del gene della leptina, che possano giustificare una azione trascrizionale da parte dell'insulina o dei glucocorticoidi. Gli elementi regolativi potrebbero quindi essere situati altrove, ad esempio nella lunga regione 3' non tradotta (3' UTR, circa 2700 basi) del messaggero di quest'ormone che costituisce più dell'80% della lunghezza dell'intero trascritto.

La regione 3' UTR di alcuni mRNA, è un elemento essenziale nella modulazione della stabilità (emivita) degli stessi e della loro accessibilità da parte del macchinario traduzionale; la regolazione della stabilità/traducibilità, si riflette nella modulazione della produzione proteica.

Nei vertebrati, meccanismi di questo tipo, sono attivi ad esempio durante lo sviluppo embrionale di *Xenopus* e di topo e nel contesto di alcune funzioni apprendimento dipendenti in neuroni adulti. In generale si tratta di sistemi che consentono il mantenimento di trascritti "dormienti" (non tradotti) in distretti subcellulari e la loro "attivazione traduzionale" in seguito a precisi stimoli.

L'attivazione di questi trascritti è stata messa in relazione con il fenomeno della poliadenilazione citoplasmatica, nel quale, la coda di poliadenilazione (di lunghezza standard, per gli mRNA, pari a 250 nucleotidi circa), aggiunta nella fase nucleare di maturazione, viene estesa in sede citoplasmatica.

Le tipologie cellulari interessate da questi meccanismi, sono accumulate da una estrema polarizzazione strutturale e molecolare. Tali sistemi di regolazione non sono mai stati descritti negli adipociti, né studiati in relazione alla leptina. Tuttavia, è noto che nella regione 3'UTR di altre citochine, sono presenti elementi consensus per il legame con proteine che regolano la stabilità e quindi l'emivita dell'mRNA. Tali elementi sono caratterizzati da sequenze ricche in adenosine e uridine (A+U rich elements, AREs) e possono essere implicati nei processi di poliadenilazione citoplasmatica.

Scopo della mia tesi è stato quello di stabilire se la regione 3'UTR della leptina possa essere implicata nella regolazione della produzione dell'ormone, attraverso un meccanismo di poliadenilazione variabile del messaggero.

Poiché non esisteva in banca dati un clone completo del gene murino della leptina, abbiamo utilizzato la tecnica 3' RACE per isolare la parte terminale del gene. Il sequenziamento di tale regione ha mostrato la presenza di alcune AREs, in particolare sono stati identificati: un segnale di poliadenilazione (esanucleotide altamente conservato AAUAAA) e alcuni elementi detti di poliadenilazione citoplasmatica (CPE), caratterizzati dalla sequenza consensus UAUUUUU(U). La presenza dell'elemento CPE ha fatto ipotizzare che il 3'-UTR del trascritto della leptina, potesse essere un target della proteina CPE-binding protein (CPEB), molecola precedentemente non caratterizzata negli adipociti, che gioca un ruolo chiave nei processi di regolazione della poliadenilazione citoplasmatica.

La presenza di CPEB nel tessuto adiposo bianco, mai riportata fino a qui in letteratura, è stata da noi dimostrata sia tramite RT-PCR che per analisi di Western Blot.

Ci siamo quindi chiesti se il messaggero per la leptina subisse un allungamento variabile della coda di poliadenilazione e se questo potesse essere messo in relazione con la quantità di ormone prodotto. Si può evidenziare tale fenomeno con una particolare tecnica di RT-PCR ancorata che, nel caso di una poliadenilazione variabile, dà luogo a prodotti di PCR visualizzabili su di un gel di agarosio come una banda principale e uno *smear* specifico sovrastante. Questo è esattamente il pattern osservabile nel caso della leptina, utilizzando come materiale di partenza RNA estratto da tessuto adiposo bianco di topo.

Il confronto tra topo geneticamente obeso, che sovraesprime l'ormone, e topo magro, non ha tuttavia evidenziato differenze nella lunghezza o nell'aspetto dello smear; questo può

essere messo in relazione con il fatto che i modelli utilizzati sono cronici e complessi. Per questo motivo, abbiamo ritenuto opportuno valutare l' allungamento della coda del messaggero per la leptina in un sistema più semplice, costituito da colture primarie di adipociti, trattate o meno con gli induttori della sintesi di leptina: insulina e dexametasone. La valutazione dei livelli dell'ormone rilasciato dagli adipociti nel mezzo di coltura tramite un saggio E.L.I.S.A. , ci ha permesso di verificare l'effetto positivo degli induttori utilizzati. Dati preliminari indicano che, soprattutto nei campioni trattati con l'insulina, si osserva una associazione positiva tra l'allungamento della coda di poliadenilazione e l'aumento di produzione di leptina.

Con questo studio abbiamo quindi dimostrato che:

1. La regione 3' non codificante del gene murino della leptina presenta elementi consensus per il legame con fattori che partecipano alla stabilizzazione dell'RNA maturo, in particolare si sono osservati elementi CPE.
2. Nel tessuto adiposo bianco di topo è presente almeno uno dei fattori che guidano la poliadenilazione citoplasmatica dei messaggeri, ovvero la proteina CPEB.
3. Il messaggero della leptina subisce una poliadenilazione variabile *in vivo* ed *in vitro*
4. L'insulina sembra modulare l'allungamento della coda, in dipendenza della sua capacità di induzione sulla produzione di leptina

