



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI ENDOCRINOLOGIA E METABOLISMO

Dottorato in Scienze Endocrine e Metaboliche

Tesi di Dottorato

**Meccanismi molecolari di regolazione
dell'espressione del gene di GH e IGF-I
da parte di PPAR- γ**

Referente: Prof.E.Martino

Tutore: Prof.E.Martino

Dottorando: Dott. Raggi Francesco

ANNO ACCADEMICO 2004-2006

INDICE

Riassunto	1
Abstract	3
1. Introduzione	5
1.1 Acromegalia	5
1.2 Isoforma gamma del recettore attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPARgamma)	6
1.2.1 PPARgamma:gene e proteina	8
1.2.2 Regolazione della trascrizione genica	10
1.2.3 Regolazione della trascrizione genica da parte di PPARgamma	10
1.2.4 Elemento di risposta a PPAR (PPRE)	12
1.3 Ormone della crescita (GH)	13
1.3.1 Struttura, espressione e regolazione del gene di GH	14
1.4 Fattore di crescita insulino-simile di tipo I (IGF-I)	16
1.4.1 Struttura, espressione e regolazione del gene di IGF-I	19
1.5 Modello murino di acromegalia	21
2. Scopo dello studio	26
3. Materiali e metodi	27
3.1 Colture cellulari	27

3.2	Animali	28
3.3	Tiazolidinedioni (TZDs) e GH	28
3.4	Protocollo sperimentale in vitro	29
3.5	Protocollo sperimentale in vivo	30
3.6	Dosaggio di GH e IGF-I	32
3.7	Northern Blot	32
3.8	Real-Time PCR	33
3.9	Western Blot	34
3.10	Immunofluorescenza	35
3.11	Plasmidi	36
3.12	Trasfezioni	37
3.13	Gel mobility shift assay (EMSA)	38
3.14	DNase I Footprinting	39
3.15	Statistica	40
4.	Risultati	41
4.1	Ros riduce la secrezione di GH dalle GH3.	41
4.2	L'espressione dell'mRNA di GH nelle GH3 è ridotta dalla presenza di cig e ros	41
4.3	Nelle GH3 PPARgamma è espresso e funzionalmente attivo	42
4.4	L'effetto inibitorio dei TZDs sulla trascrizione di Hgh è mediato da PPARgamma e coinvolge il promotore del gene.	43
4.5	PPARgamma interagisce con il promotore di hGH	43
4.6	Il promotore di hGH contiene un putativo PPRE	44

4.7 I TZDs riducono la secrezione di IGF-I dalle HepG2	44
4.8 Nelle HepG2, l'aumento di espressione, GH-dipendente, dell' mRNA di IGF-I, è inibito dalla presenza dei TZDs	45
4.9 La sintesi proteica, GH-dipendente, di IGF-I è ridotta dalla presenza di cig e ros	45
4.10 Nelle HepG2 PPARgamma è espresso e funzionalmente attivo	46
4.11 L'effetto inibitorio dei TZDs sull'espressione di IGF-I, dopo stimolo con GH, è PPARgamma-dipendente	47
4.12 L'effetto inibitorio dei TZDs, mediato da PPARgamma, non coinvolge la 5'-flanking region del gene di IGF-I	47
4.13 L'effetto inibitorio dei TZDs sull'espressione, GH-dipendente, di IGF-I, coinvolge STAT5b	48
4.14 In vivo, il rosiglitazone non modifica il livello di IGF-I circolante nei topi MTbGH	49
4.15 In vivo, il rosiglitazone riduce il livello di IGF-I circolante nei ratti Wistar Furth che sviluppano tumori GH-secernenti	50
5. Discussione	51
6. Conclusioni	58
7. Letteratura citata	60
Ringraziamenti	77