

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE



Dipartimento di scienze della vita e dell'ambiente

Corso di laurea triennale in Scienze biologiche

Valutazione degli effetti di zinco ed estrogeno sull'espressione ipofisaria dei geni della somatolattina in *Cyprinus carpio*

Evaluation of the effects of zinc and estrogen on the pituitary expression of somatolactin genes in *Cyprinus carpio*

Docente Referente

Prof. Marco Barucca

Candidata

Stefania Caselli

Sessione Straordinaria

Anno Accademico 2020-2021

Abstract

I cambiamenti ambientali influenzano l'espressione genica osservata nell'ipofisi, un organo di regolazione centrale all'interfaccia tra il sistema nervoso centrale e il sistema endocrino. Negli organismi acquatici, in questo caso, i componenti estrogenici sono tra i contaminanti più studiati ma, un'altra grande preoccupazione ambientale è l'inquinamento da ioni di metalli pesanti derivanti dalle attività industriali. Con l'obiettivo di rivelare gli effetti di zinco (Zn) ed estrogeno (E2) sull'espressione dei fattori ipotalamo-ipofisari, è stata caratterizzata la somatolattina (SL) in *Cyprinus carpio*. In particolar modo, due geni della somatolattina, i geni α e β .

Sono state rilevate sequenze di mRNA dei due rispettivi geni (SI α e β) della carpa comune. Inoltre, è stata valutata la quantità di mRNA di fattori ipotalamo-ipofisari correlati, rivelando effetti variabili sulla prolattina(prl),ormone della crescita(gh) e fattori coinvolti nella regolazione di (SL): il fattore di trascrizione ipofisario(pit1) e il peptide attivatore dell'adenilasi ciclasti ipotalamica dell'ipofisi(pacap).

Parallelamente, la risposta fisiologica degli animali da esperimento al trattamento con Zn o E2 è stata confermata mostrando un significativo aumento della metallothioneina (mt) o vitellogenina (vg) sull'espressione genica nel fegato, classiche sentinelle per l'esposizione a metalli pesanti o estrogeni.

Introduzione

I cambiamenti ambientali, che influenzano l'espressione genica, vengono sempre più impiegati per monitorare la presenza di fattori di stress ambientali attraverso i loro effetti su geni specifici. Tra questi ad esempio ci sono :

- ➔ Gli **Estrogeni**
- ➔ L'inquinamento da **ioni di metalli pesanti**.

Con lo scopo quindi di rilevare gli effetti di zinco (Zn) ed estrogeno (E2), è stata caratterizzata la somatolattina (SL) in *Cyprinus carpio*.

La somatolattina è un ormone ipofisario specifico per il pesce, appartenente alla superfamiglia dell'ormone prolattina/crescita. Coinvolto nell'adattamento di fondo, nell'osmoregolazione, nella riproduzione e nel metabolismo degli acidi grassi. Sono stati identificati due geni della somatolattina α e β .

Sono state rilevate sequenze di mRNA dei rispettivi geni, SL α e SL β , della carpa comune, valutando l'espressione della somatolattina e fattori ipotalamo-ipofisari correlati:

- Prolattina (PRL)**
- Ormone della crescita (GH)**
- Pit1 (fattore di trascrizione ipofisario)**
- Pacap (peptide attivatore dell'adenilasi ciclasasi ipotalamica ipofisaria)**

Contemporaneamente a marcatori di controllo:

- metallotioneina (mt)**
 - vitellogenina (vg)**
- } Nel fegato**

In risposta a ioni zinco o a 17β -estradiolo, rappresentativo di due tipi comuni di interferenti endocrini nell'ambiente acquatico.

Materiali e metodi

Animali e trattamento

Carpe maschi adulti (C.carpio) di peso compreso tra 1kg e 2 kg sono stati catturati nei dintorni di Valdivia e mantenuti per due settimane in uno stagno a temperatura ambiente. Sono stati eseguiti due esperimenti in modo indipendente:

Il trattamento con estrogeni :

-Pesci maschi selezionati sono stati iniettati per via intraperitoneale con 0,5 mg/kg di 17 β -estradiolo sciolto in olio vegetale/etanolo (9:1).

Il trattamento con zinco :

-Allo stesso modo, a carpe maschi adulti sono stati iniettati 0,6 mg/kg di ZnCl₂.

I campioni di tessuto sono stati sezionati e immersi nella soluzione Chomzynsky per la preparazione dell'Rna.

L'Rna totale è stato estratto dall'ipofisi e dal fegato secondo Chomzynsky e Sacchi, e poi retrotrascritto in cDNA, utilizzando oligo-dt e trascrittasi inversa. Per ottenere sequenze di SL di carpe è stata utilizzata come punto di partenza una piccola sequenza di 105bp disponibile in GenBank.

GEN	Accession number/position	Oligonucleotide	Amplicon
c β act	M24113 2942-3326	s 5'-ggacctgtatgccaactg-3' a 5'-gtcggcgtgaagtggtaaca-3'	gDNA 383 bp cDNA 281 bp
<i>Hypothalamus</i> cPACAP	AB121760 1-105	1s 5'-cattcggatgggatcttcac-3' 2a 5'-gaaggtacagacagagagtt-3'	105 bp
<i>Pituitary</i> cPit1	AF132287 (gen)	8s 5'-ggtgaagatctagagtcag-3' 9a 5'-gatgcgggtctgggagatgc-3'	349 bp
cPRL	X12543 434-595	f 5'-agctgcaggacaacatcaac-3' r 5'-aacaggacagcaggaaatgg-3'	162 bp
cGH	M27000 443-613	f 5'-tgggcatcagtgctcctc-3' r 5'-tctcgactttgtgcatgtcc-3'	171 bp
cSL β	DQ021542 1-91	f 5'-tggattaatccactggtaga-3' r 5'-tagacatcaattgctctc-3'	91 bp
cSL α	GU434163 531-690	2 5'-ttctgactcgcgtctctc-3' 1.1 5'-gcaacaagctcagctgcctt-3'	179 bp
<i>Liver</i> cMT	AF002162 92-224	1s 5'-tggaaactgcaactgtggtg-3' 2a 5'-ggagttgccttacacacg-3'	133 bp
cVT	AF414432 962-1135	1s 5'-ccttgttgcaacaatgtgg-3' 2a 5'-gtgccaacagaaggaagagc-3'	174 bp

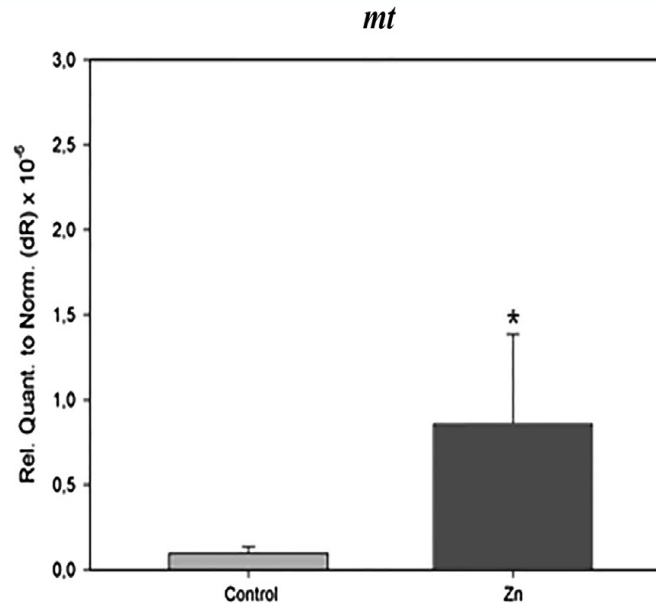
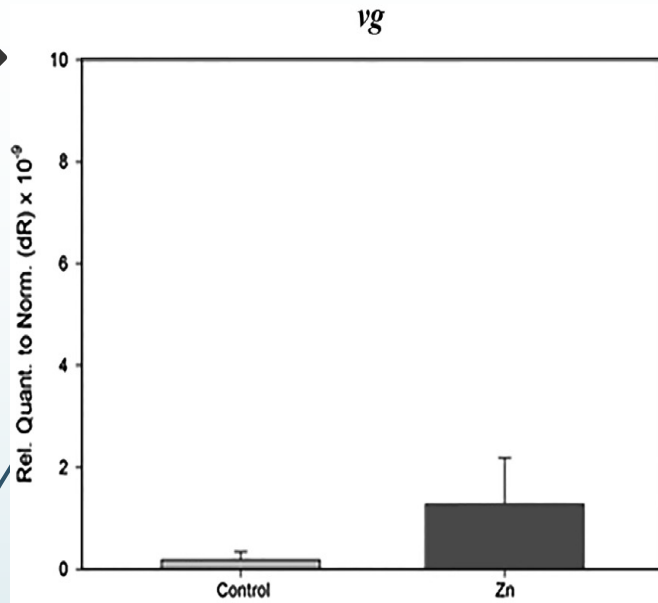
Analisi RT-qPCR

Coppie di specifici primer sono stati progettati mediante la **real-time PCR**,
transcription
su stampo di cDNA e utilizzate per analisi quantitative dell'espressione
PCR
dei geni *sl α* , *sl β* , *gh*, *prl*, *pit1* nell'ipofisi, *Pacap* nell'ipotalamo
e *mt* e *vg* nel fegato.

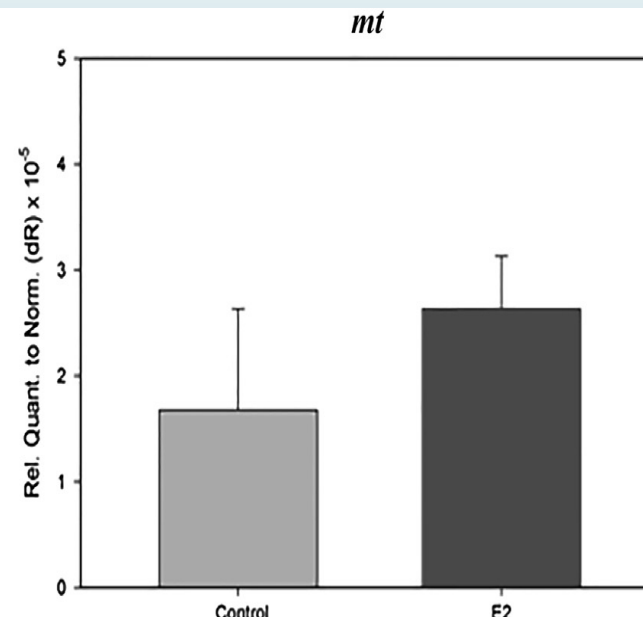
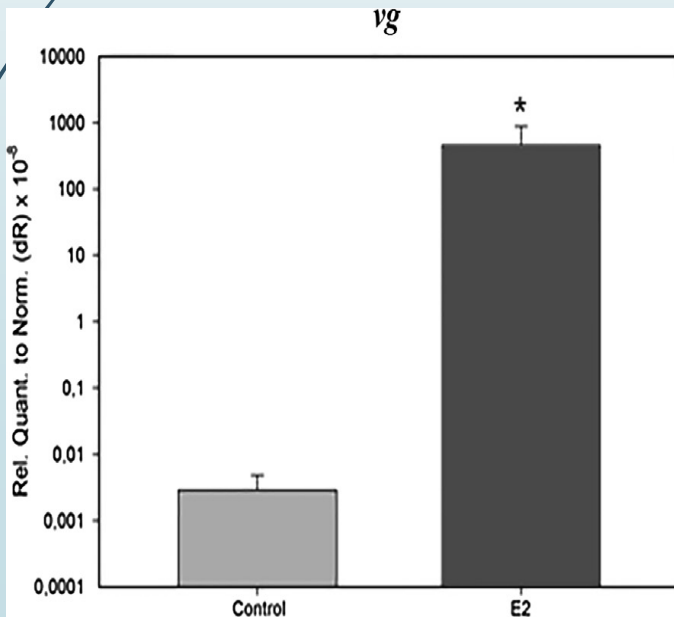
Reverse
quantitative-
(RT-qPCR)

I livelli di mRNA sono stati quantificati nel cDNA (mediante qPCR) con il SYBR Green
un intercalante del DNA a elevatissima sensibilità.

Risposta specifica dei geni marcatori di estrogeni e zinco nel fegato

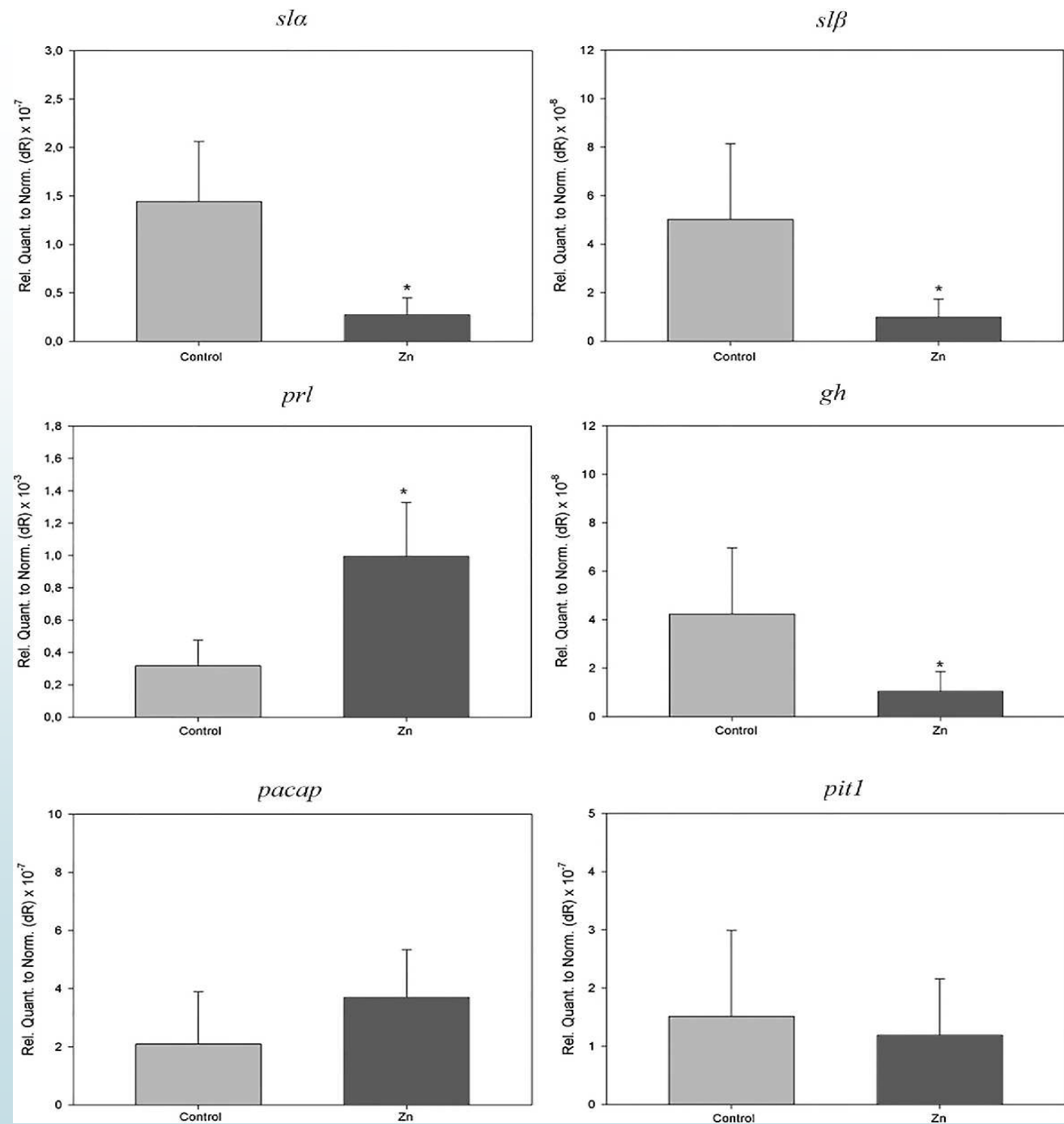


Effetto dello zinco sull'espressione genica del fegato nella carpa

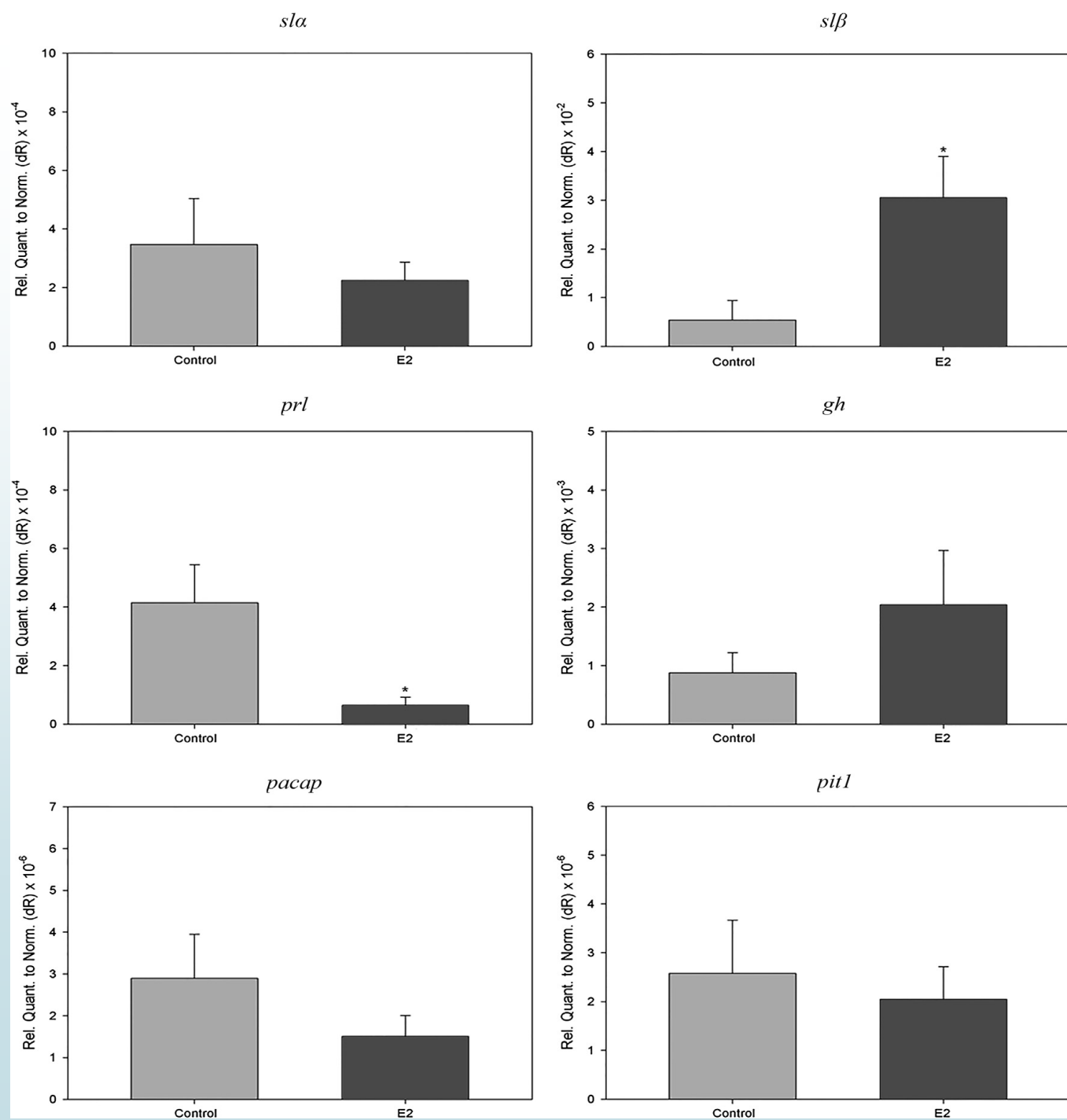


Effetto degli estrogeni sull'espressione genica del fegato nella carpa

Effetto del trattamento con zinco sull'espressione genica di fattori ipofisari e ipotalamici nella carpa maschio.



**Effetto degli estrogeni
sull'espressione genica di
fattori ipofisari e ipotalamici
nella carpa maschio.**



Discussione


Nel modello sperimentale è stato osservato un chiaro aumento dell'espressione di mt in carpe trattate con Cloruro di Zinco, senza cambiamenti significativi nell'espressione di vg. Nell'esperimento parallelo è stato osservato un aumento significativo dell'espressione di vg nelle carpe trattate con 17β -estradiolo, senza cambiamenti nell'espressione di mt.

Nell'ipofisi è stata misurata l'espressione a livello trascrizionale, di tre ormoni: l'ormone della crescita (Gh), la prolattina (Prl) e la somatolattina (Sl). Osservando una diminuzione dell'espressione di Gh nelle carpe trattate con zinco ed una diminuzione dell'espressione di Prl nell'ipofisi della carpa maschio trattata con estrogeni.

Nelle carpe trattate con zinco è stata osservata una diminuzione dell'espressione di entrambi i geni della somatolattina. Mentre è interessante notare che nelle carpe trattate con estrogeni è stato osservato un aumento significativo solo per l'espressione del gene Sl β .

Non sono state rilevate differenze significative nell'espressione a livello trascrizionale di Pacap e Pit1 in risposta a zinco o estrogeni.

Conclusioni

A dark grey arrow points to the right from the left edge of the slide. Several thin, dark blue lines originate from the left side and curve downwards and to the right, creating a decorative graphic element.

Oggi l'ecotossicologia deve affrontare una sfida enorme per valutare la tossicità e il modo in cui i composti chimici influenzano l'ambiente acquatico. Ancora più complicato quando sono presenti interferenti endocrini a causa della loro complessa rete di interazioni all'interno dell'asse di regolazione ormonale. Recentemente l'ipofisi è stata identificata come un organo centrale di regolazione, per rispondere agli stimoli ambientali sia durante l'acclimatazione stagionale che in caso di inquinamento. L'effetto di potenziali composti nocivi sull'espressione dei geni specifici della somatolattina nella carpa, potrebbero essere alterati dall'inquinamento ambientale. Infatti sebbene la funzione precisa di questo ormone non sia ben nota molti rapporti indicano che la sua espressione è modulata da varie condizioni fisiologiche, e quindi la risposta differenziale dei due geni della SI potrebbero contribuire a rilevare la contaminazione nell'ambiente acquatico.

Bibliografia

-**G.E. Valenzuela, A. Perez, M. Navarro, A. Romero, J. Figueroa, G. Kausel**, '*Differential response of two somatolactin genes to zinc or estrogen in pituitary of Cyprinus carpio*'. *General and Comparative Endocrinology* 2015 May 1;215:98-105. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.09.015.

-**P. Chomczynski, N. Sacchi**, "*Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*". *Analytical biochemistry*, 1987, Elsevier. 1987 Apr;162(1):156-9. doi: 10.1006/abio.1987.9999.

-**F. Amaldi, P. Benedetti, G. Pesole, P. Plevani** , *Biologia molecolare*, Milano, Casa editrice Ambrosiana,2014.

Riassunto esteso

I cambiamenti ambientali, che influenzano l'espressione genica, vengono sempre più impiegati per monitorare la presenza di fattori di stress ambientali attraverso i loro effetti su geni specifici. Tra questi ad esempio ci sono: gli estrogeni e l'inquinamento da ioni di metalli pesanti.

Con lo scopo quindi di rilevare gli effetti di zinco (Zn) ed estrogeno (E2), è stata caratterizzata la somatolattina (SL) in *Cyprinus carpio*. Sono stati identificati due geni della somatolattina, α e β . Sono state rilevate sequenze di mRNA dei due rispettivi geni della somatolattina della carpa comune, valutando anche l'espressione della somatolattina e fattori ipotalamo-ipofisari correlati quali, la prolattina, l'ormone della crescita e fattori coinvolti nella regolazione della somatolattina (tra cui il Pit 1 e il Pacap). Contemporaneamente a marcatori di controllo, come la metallotioneina e la vitellogenina, nel fegato. Carpe maschi adulti di peso compreso tra 1kg e 2kg sono stati catturati nei dintorni di Valdivia. Sono stati eseguiti due esperimenti in modo indipendente: il trattamento con estrogeno (17 β -estradiolo), e il trattamento con zinco (ZnCl). L'Rna totale è stato estratto dall'ipofisi e dal fegato secondo Chomzynsky e Sacchi, e poi retrotrascritto in cDna, utilizzando oligo-dt e trascrittasi inversa. Sono state eseguite analisi mediante la real-time PCR (Reverse transcription quantitative-PCR). I livelli di mRNA sono stati quantificati nel cDna (mediante qPCR) con il SYBR Green. Dai risultati, sono state ottenute sequenze del trascritto della somatolattina (del gene α e β). Riposta specifica dei geni marcatori di estrogeni e zinco nel fegato, osservando un aumento dell'espressione di metallotioneina in carpe trattate con ZnCl, ed un aumento di vitellogenina al trattamento con 17 β -estradiolo. Nell'ipofisi è stata osservata una diminuzione dell'espressione dell'ormone della crescita al trattamento con zinco, mentre è stata rilevata una diminuzione dell'espressione della prolattina al trattamento con estrogeni. Nelle carpe trattate con zinco è stata osservata una diminuzione di entrambi i geni della somatolattina, mentre nelle carpe trattate con estrogeni è stato osservato un aumento solo per l'espressione del gene β . Non sono state rilevate