



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Sede Consorzziata: Seconda Università di Napoli

Dipartimento di Medicina Sperimentale della Facoltà di Medicina e Chirurgia

DOTTORATO DI RICERCA IN ENDOCRINOLOGIA COMPARATA
CICLO XXII

**IL 17 β -ESTRADIOLO REGOLA L'ESPRESSIONE DEL
TRASCritto DI *fRLX* IN *Rana esculenta*.
ISOLAMENTO DA CERVELLO DI RANA DI UN NUOVO
MEMBRO DELLA FAMIGLIA DELLE RELAXINE/INSULINE E
DI UN RECETTORE *fRXFP3***

Coordinatore: Ch.mo Prof. Lorenzo Colombo

Supervisore: Ch.mo Prof. Sergio Minucci

Dottorando: Vincenzo Zazzaro

31 dicembre 2009

VALUTAZIONE PER L'AMMISSIONE ALL'ESAME FINALE DEL DOTTORANDO VINCENZO ZAZZARO

Il dottorando **Vincenzo Zazzaro** ha iniziato gli studi per il conseguimento del Dottorato di Ricerca in Biologia e Medicina della Rigenerazione con indirizzo in Endocrinologia Comparata nell'anno accademico 2006-2007, XXII ciclo, n° di matricola 965096, lavorando presso i laboratori del Dipartimento di Medicina Sperimentale della Seconda Università degli Studi di Napoli, con supervisore il Prof. Sergio Minucci.

Il titolo della tesi di dottorato è: "Il 17β -estradiolo regola l'espressione del trascritto di *fRLX* in *Rana esculenta*. Isolamento da cervello di rana di un nuovo membro della famiglia delle Relaxine/Insuline e di un recettore *fRXFP3*".

L'attività di ricerca del dottorando Zazzaro è stata incentrata sullo studio dell'espressione di geni appartenenti alla famiglia delle Relaxine e dei suoi recettori nell'anfibio anuro *Rana esculenta*. In particolare, egli ha dimostrato che la somministrazione *in vivo* di 17β -estradiolo induce una diminuzione dei livelli di espressione del trascritto per *fRLX*, una relaxina espressa nel testicolo di rana e precedentemente clonata dal nostro gruppo di ricerca. Inoltre, il dottorando Zazzaro, ha isolato le sequenze specifiche per un recettore delle relaxine, *RXFP3* e per un'altra relaxina, *Rln3*, dal cervello di *Rana esculenta*. Ha analizzato l'espressione di questi trascritti nelle diverse aree cerebrali, evidenziando un differente profilo di espressione tra l'ormone e il recettore.

Le ricerche intraprese dal dottorando Zazzaro sono state condotte con rigore scientifico e sono state presentate a congressi nazionali ed internazionali. Inoltre, durante lo svolgimento del dottorato, il candidato ha rivelato buone capacità tecniche, senso critico ed entusiasmo per la ricerca. Il Collegio dei Docenti ritiene pertanto il dottorando Zazzaro meritevole di essere ammesso all'esame per il conseguimento del titolo di dottore di ricerca.

INDICE

Riassunto	pag.3
Summery	pag.7
Introduzione	pag.9
La famiglia delle Relaxine	
Ipotesi evolutiva dei geni Relaxina	
Ruolo e funzione delle relaxine	
I recettori delle Relaxine	
RXFP1 e RXFP2	
RXFP3 e RXFP4	
Le relaxine nei vertebrati non mammiferi	
Scopo della ricerca	
Materiali e metodi	pag.30
Risultati	pag.43
Esperimento <i>in vivo</i> con 17 β -estradiolo (E ₂)	
Clonaggio di <i>fRLX3</i>	
Esperimento di 3'RACE sul cDNA di <i>fRLX3</i>	
Clonaggio di <i>fRXFP3</i>	
Localizzazione intracerebrale di <i>fRXFP3</i> e <i>fRLX3</i>	
Discussione	pag.57
Bibliografia	pag.65

RIASSUNTO

La Relaxina e l'Insulin-like factor (RLX e INSL) sono piccoli ormoni peptidici appartenenti alla superfamiglia dell'Insulina/IGF/Relaxine, ben caratterizzati nei Mammiferi e solo di recente ritrovati in modelli compresi in gruppi tassonomici di bassi Vertebrati.

I peptidi appartenenti alla famiglia delle Relaxine sono codificati nell'uomo da sette geni differenti: i geni Relaxina *RLX1*, *RLX2* e *RLX3*, i geni insulina simile *INSL3*, *INSL4*, *INSL5*, e *INSL6* (Halls *et al.*, 2007; Wilkinson *et al.*, 2005b, Olinski, 2007). Analisi filogenetiche suggeriscono che essi possano derivare da un fenomeno di duplicazione che coinvolge tre locus genici denominati Relaxin Family Locus (RFL) evidenziati nei bassi vertebrati (Park *et al.*, 2008).

Benché le Relaxine siano presenti in diversi distretti anatomici, ricerche effettuate su Mammiferi ne associano le principali funzioni ai fenomeni riproduttivi. Per quanto concerne i Vertebrati non-mammiferi la ricerca sulle possibili funzioni è ad oggi un campo ancora completamente aperto.

Vista la conservazione di locus genici della famiglia delle Relaxine nei bassi vertebrati, è stata verificata l'esistenza di ulteriori forme di RFL in *Rana esculenta* tramite un approccio bioinformatico analizzando il genoma dell'anfibio *Xenopus tropicalis*.

Quest'analisi ha permesso di identificare quattro geni putativi conservati in *Xenopus tropicalis* corrispondenti alle tre famiglie RFL (RFLA, RFLB, RFLCI e CII).

Sulla base dell'allineamento nucleotidico dei trascritti identificati, è stato dunque possibile disegnare coppie di oligonucleotidi "degenerati" da utilizzare in esperimenti di RT-PCR su RNA totale

estratto da diversi tessuti di rana. In questo modo, utilizzando una coppia di primers disegnati sulla sequenza della RLX3 (RFLCI) si è ottenuto un amplificato di circa 360 cb, espresso esclusivamente nell'encefalo di rana. La banda ottenuta è stata, quindi, clonata e sequenziata: la sequenza ottenuta, una volta tradotta, presenta una cornice di lettura aperta di 120 aminoacidi. Tale sequenza, in seguito ad analisi in blastx, ha mostrato un'alta omologia con le proteine della famiglia delle Relaxine 3 depositate in banca dati genomica. In particolare, risultano essere altamente conservati il dominio strutturale della catena B e quello della catena A tipici di tutte le proteine appartenenti a questa famiglia.

E', inoltre, da tener presente che, nei mammiferi, la Relaxina-3 è espressa nel sistema nervoso a livello dei neuroni del nucleo incerto del ponte di Variolo, struttura presente nel tronco encefalico dove sembra svolgere la funzione di neuropeptide o neuromodulatore (Tregear *et al.*, 2005; Sherie Ma. *et al.*, 2009).

Per verificare se il profilo di espressione della Relaxina-3 di rana fosse sovrapponibile a quello riscontrato nel SNC di mammifero, è stato effettuato un esperimento di RT-PCR su RNA totali estratti da differenti aree encefaliche di rana: cervello *in toto*, telencefalo, diencefalo e mesencefalo. Una prima analisi ha mostrato che il trascritto è altamente e specificamente espresso a livello della vescicola mesencefalica e diencefalica, mentre a livello del telencefalo il segnale risulta essere più basso, così come già evidenziato nei mammiferi.

Parallelamente, al fine di poter intraprendere un discorso di tipo funzionale sul ruolo svolto da *fRLX* e *fRLX3*, si è cercato di identificare e caratterizzare i possibili recettori presenti in rana.

Dalla letteratura risultano quattro recettori per le relaxine: RXFP1 (recettore specifico della Relaxina di mammifero), RXFP2 (recettore di INSL3), RXFP3 (RLN3) e RXFP4 (INSL5) (Bathgate et al., 2006) .

Attraverso un'analisi di tipo bioinformatica basata sull'allineamento delle putative sequenze dei recettori presenti in banca dati, sono state disegnate delle coppie di primers degenerati che hanno permesso di amplificare dal cDNA di cervello di rana una banda specifica della lunghezza di 327 nucleotidi con sequenza molto conservata rispetto al recettore RXFP3 dei mammiferi.

Dal momento che RXFP3 è il recettore specifico della Relaxina 3, si è deciso di effettuare anche un'analisi del profilo di espressione di *f*RXFP3 nelle diverse aree encefaliche di rana.

L'analisi di RT-PCR ha mostrato che l'espressione di tale trascritto non corrisponde perfettamente a quella descritta per il ligando. Infatti, mentre i trascritti per *f*RLX3 sono maggiormente espressi a livello del Mesencefalo, non si osserva alcuna significativa differenza di espressione per l'mRNA di *f*RXFP3 a livello del Telencefalo e del Diencefalo.

Questo dato coincide con quelli analizzati nei mammiferi. Infatti, come precedentemente affermato, evidenze anatomiche suggeriscono che la RLN3 sia prodotta nel soma dei neuroni GABA presenti nel ponte di Variolo e nel mesencefalo; essa è successivamente trasferita tramite trasporto assonale e rilasciata a livello dei siti sinaptici o extrasinaptici nella parte anteriore del cervello, dove attiva il suo recettore RXFP3 espresso dai neuroni postsinaptici (Tregear *et al.*, 2005; Sherie Ma. *et al.*, 2009).

Summary

Relaxin and Insulin-like factor (RLX and INSL) are small peptide hormones belonging to the Insulin/IGF/Relaxin superfamily, well characterized in Mammalian and only recently discovered in lower Vertebrates.

Human Relaxin family peptides are encoded by seven different genes: *RLX1*, *RLX2*, *RLX3*, *INSL3*, *INSL4*, *INSL5*, and *INSL6*. Phylogenetic analysis suggests that they could derive from a duplication phenomenon that involved three genetic loci named Relaxin Family Locus (RFL) studied in lower Vertebrates (Park *et al.*, 2008).

Although the Relaxins are present in different anatomical districts, they are primarily associated to reproductive roles. Studies on non mammalian vertebrates are mostly recent and generic. Since Relaxin family loci are phylogenetically conserved among lower vertebrates, the existence of further members of RFL has been verified in *Rana esculenta* through a bioinformatics approach based on the genomic sequence of the amphibious *Xenopus tropicalis*. This analysis allowed us to identify four preserved putative genes in *Xenopus tropicalis*, corresponding to the three RFL families (RFLA, RFLB, RFLCI and CII).

We designed several degenerate primers, based on the nucleotidic alignment of the identified sequences, then used in RT-PCR experiments on total RNA extracted from some frog tissues. A couple of primers which targeted RLX3 (RFLCI) sequence we managed to amplify a 360 bp cDNA fragment, exclusively expressed in frog encephalon. Its identity was verified by cloning and sequencing.

The putative translation of the nucleotidic sequence showed a 120 A.A. open reading frame. Sequence analysis by blastx showed that *fRLX3* is homologous to mammalian RLX3 proteins. In particular,

there is notable structural similarity in the highly conserved B and A domains, typical of all the members of Relaxin family. It is worth noting that the Relaxin-3 is expressed in the nervous system at the level of nucleus incertus neurons in Variolo bridge, structure present in the encephalic trunk, and it seems to play the role of neuro-peptides or neuro-modulator. In order to understand if the expression profile of frog Relaxin-3 had the same trend than the one found in the mammalian CNS, an RT-PCR experiment was performed on total RNA extracted from different frog encephalic areas: *in toto* brain, telencephalon, diencephalon and mesencephalon. The first analysis showed that the transcript is highly and specifically expressed in the mesencephalic and diencephalic vesicles, while at telencephalic level the signal resulted lower, as already reported in mammals. In order to gather crucial knowledge about functional implication of *fRLX* and *fRLX3*, we had to identify and characterize any potential RLX receptors in the frog.

Four relaxin receptors are known so far: RXFP1 (specific Relaxin receptor in mammals), RXFP2 (INSL3 receptor), RXFP3 (RLX3 receptor) and RXFP4 (INSL5 receptor). Using the same approach described earlier we designed degenerate primers for an RT-PCR, in order to isolate the receptors. We were able to amplify, from brain cDNA, a specific 327 nucleotidites band, homologous to mammalian RXFP3. As RXFP3 is the specific receptor to Relaxin-3, we carried out an expression analysis of *fRXFP3* in the different encephalic areas of frog.

The RT-PCR allowed us to determine that the expression of *frxfp3* mRNA is not completely consistent with that of its ligand's. In fact, while *fRLX3* transcript is primarily detectable in the Mesencephal, we could not determine any significant difference in *rxfp3* mRNA expression in the three encephalic regions. These data coincides with those about mammals. In fact, as stated previously, anatomical

evidences suggest that the RLX3 is produced by GABA neurons soma present in the Variolo bridge and in the mesencephal; it is subsequently transferred through assonal transport and released in the sinaptics or extrasinaptics sites in the forebrain, where it activates its cognate receptor, RXFP3, produced by the postsynaptic neurons.

INTRODUZIONE

La famiglia delle Relaxine

Le Relaxine sono ormoni peptidici, appartenenti alla superfamiglia delle Insulina \ Fattori di crescita insulina simili (IGF) \ Relaxine, gruppo di proteine evolutivamente correlato che possiedono una varietà di differenti funzioni biologiche.

Descritte per la prima volta nel 1926 da Frederick Hisaw, queste proteine pure avendo una bassissima omologia a livello amminoacidico sono strutturalmente caratterizzate dalla presenza di motivi caratteristici.

Infatti, le proteine tradotte da questi geni sono caratterizzate dalla presenza di un segmento elicoidale (corrispondente alla catena B dell'Insulina) seguito da un segmento di dimensione variabile (catena C), seguito da un dominio denominato A che è legato alla catena B tramite due ponti di solfuro, è presente, inoltre, un terzo ponte intercatena nella catena A.

Tra i membri della famiglia Insulina\IGF\Relaxine la struttura proteica primaria è molto poco conservata eccetto la posizione delle Cisteine impegnate nei ponti di solfuro inter ed intracatena. Il segmento centrale è molto variabile anche tra specie evolutivamente molto vicine ed è di solito rimosso da endonucleasi specifiche durante le varie tappe di maturazione post-traduzionali.

La prima tappa post-traduzionale di maturazione prevede il taglio proteolitico della “sequenza segnale” presente all'estremità aminotermine del peptide tradotto e la formazione dei tre ponti disolfuro, di cui due sono intercatena B-A, mentre il terzo è un ponte intracatena localizzato nel dominio A. Questo processo genera il pro-ormone che viene convertito nella forma attiva eterodimerica mediante la rimozione della catena C di interconnessione tra B ed A. L'associazione covalente dei domini restanti è assicurata dalla precedente formazione dei legami disolfuro su citati (Fig.1B).

I peptidi appartenenti più strettamente alla famiglia delle relaxine divergono precocemente dall'insulina in termini evolutivisti (Hsu *et al.*, 2003; Wilkinson *et al.*, 2005b), e, nell'uomo, sono codificati da sette geni differenti, i geni *relaxina* *RLX1*, *RLX2* e *RLX3* ed i geni *insulina simile* *INSL3*, *INSL4*, *INSL5*, e *INSL6*.

Confrontando la sequenza amminoacidica dei peptidi relaxina simile appartenenti a differenti specie, anche se vicine nella scala evolutiva, si osserva una bassa omologia. Nelle molecole in questione gli elementi altamente conservati sono: sei residui cisteinici (due nel dominio B e quattro nel dominio A) necessari per la formazione dei tre ponti disolfuro e quindi per il mantenimento della struttura terziaria; il motivo R-XXX-R localizzato al centro della catena B e fondamentale per la bioattività delle molecole e per l'interazione con il recettore (Bullesbach *et al.*, 2000); tre residui di glicina sulla catena B che forniscono flessibilità alla regione compresa tra le due cisteine conservate (Fig.2).

Benché le caratteristiche della maggior parte di questi peptidi siano ancora poco note, si può affermare che la forte divergenza evolutivista riguardi anche i profili di espressione e le funzioni biologiche.

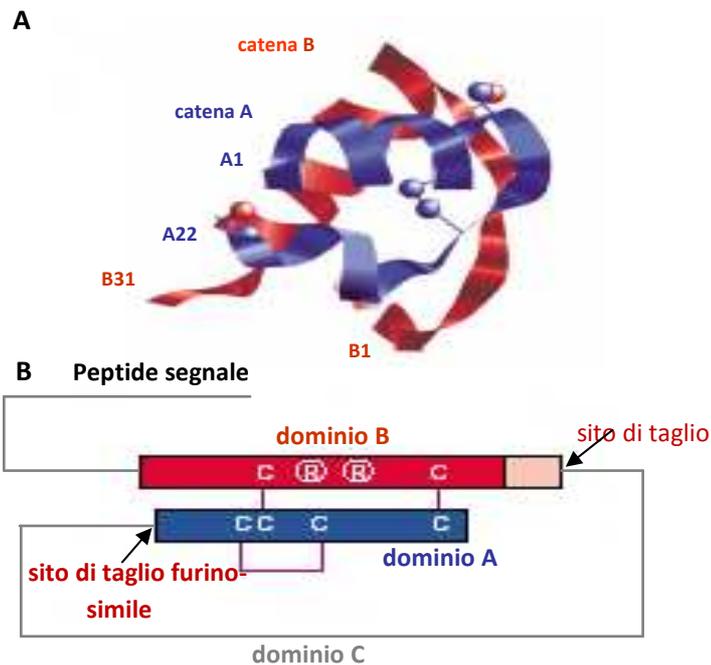


Fig.1 - Struttura e organizzazione della relaxina.

A) Struttura cristallografica degli eterodimeri B ed A della relaxina porcina, con la relativa posizione delle catene B ed A e le interconnessioni dei ponti disolfuro.

B) Rappresentazione schematica del precursore della relaxina con le posizioni dei domini A, B e C collegati tra loro. Sono anche mostrati i residui di arginina (R) della catena B che si pensa siano coinvolti nel legame con il recettore (da Ivell and Einspanier, 2002).

	Dominio B	Dominio A
Gruppo RLFC	RxxxxR	
fRLX3	... YGVKLCGREFIRAVI	FTCGGSRW---EAALGLSNTCKWGC
XlRFLCI	... FGVKLCGTEFIRAVI	FTCGGSRW---EAALGLSKTCKWGC
XtRFLCI	... FGVKLCGREFIRAVI	FTCGGSRW---EAALGLSNTCKWGC
DrRFLCI	... YGVKLCGREFIRAVI	FTCGGSRW---DVVVGLSNACCKWGC
HsRLX3	... YGVRLCGREFIRAVI	FTCGGSRW---DVLAGLSSSSCKWGC
RnRLX3	... YGVKLCGREFIRAVI	FTCGGSRW---DVLAGLSSSSCEWGC
fRLX	... VGIRLCGRDFIRTVMS	CGGSRW---KRSAGPALS
XtRFLCII	... LGIKLCGREFIRTVMS	CGGSRW---RRSVGPAGS
DrRFLCII	... YGVKLCGREFIRAVI	FTCGGSRW---DVVVGLSNACCKWGC
HsINSL3	... MREKLCGHHFVRLV	RVCGGPRW---AAATNPARY
RnINSL3	... ARAKLCGHHLVRLV	RVCGGPRW---SVATNAVHR
OaRFLCII	... TPVKLCGREFIRALIAS	CGGSSW---KRDMPASS
Gruppo RLFB		
XtRFLB	... YGVKLCGREFIRAVI	FTCGGSRW---EMNIGVAGI
GgRFLB	... YGVKLCGREFIRAVI	FTCGGSRW---RESLGLAGM
OaRFLB	... DKMKLCGREFIRTVI	FTCGGSRW---KRDFSLGSY
TrRFLB	... YGVKLCGREFIRAVI	FTCGGSRW---NFSLVAGK
HsRLN	... DVIKLCGRELVRAQIAI	CGMSTW---RPYVALFEK
HsRLN2	... EVIKLCGRELVRAQIAI	CGMSTW---QLYSALANK
RnRLN	... QVIQVCGRGYARAWI	EVCGASVG---QSGALLSEQ
HSINSL6	... SARKLCGRYLVEKIEK	LCGHANW---RKRRGYSEK
RnINSL6	... SPTKLCGRDLLVEVI	KLCGQNDW---RKRRGFADK
Gruppo RFLA		
DrRFLAI	... RTVKLCGREFIRAVV	YTCGGSRW---VSRDLDSI
DrRFLAII	... KGLRLCGREFFRAVV	YTCGGSRW---EVYETLPST
HsINSL5	... ESVRLCGLEYIRTVI	YICASSRW---MSRQDLQTL
MmINSL5	... QTVKLCGLDYVRTVI	YICASSRW---VSRDLQAL

Fig.2 - Allineamento Dominio A e B delle principali Relaxine in base alla sintenia dei geni conservati sui contig genomici (Park *et al.*, 2008).

Legenda: *f-Rana*, *Xt-Xenopus tropicalis*, *Xl-X.laevis*, *Dr-Danio*, *Gg-Gallus gallus*, *Oa-Ornitorhynchus a*, *Hs-H.sapiens*, *Rn-Rattus n*, *Mm-Mus m.*, *Tr-Takifugu r.*

Nomenclatura geni Relaxina:

RFLx: Relaxin Family Locus (locus conservato dei tre geni *Relaxina* ancestrali)

RFLA: Relaxin Family Locus A (locus da cui deriverebbe l'odierno *INSL5*)

RFLB: Relaxin Family Locus B (locus da cui deriverebbero *RLX1,2*, *INSL4* ed *INSL6*)

RFLC: Relaxin Family Locus C (locus da cui deriverebbero *RFLC1 = RLX3*, *RFLC2 = INSL3*). Evidenziato in verde gli amminoacidi conservati del dominio B essenziali per l'interazione con il recettore specifico.

Ipotesi evolutiva dei geni Relaxina

L'evoluzione della famiglia delle Relaxine è da molti anni oggetto di discussione tra i ricercatori.

Numerosi studi riportano l'esistenza di ormoni con proprietà simili a quelli della relaxina sia in specie vertebrate (Schwabe *et al.*, 1989) che in specie invertebrate come il protozoo *Tetrahymena pyriformis* (Schwabe *et al.*, 1983), l'ascidia *Herdmania momus* (Georges *et al.*, 1990b) e il tunicato *Ciona intestinalis* (Georges *et al.*, 1990b).

In particolare, nell'urocordato *Ciona intestinalis* sono state identificati tre geni della superfamiglia Insulina/IGF/Relaxine (Ins-L1, -L2, -L3) che per localizzazione cromosomica, analisi di sintenia e profilo di espressione rappresentano molto probabilmente le forme più vicine a quelle ancestrali dei vertebrati di Insulina, IGF e Relaxina (Olinski *et al.*, 2006). Tutti questi dati permettono di supporre che la superfamiglia Insulina\Relaxine si sia evoluta precocemente durante lo sviluppo del phylum dei cordati a partire da un gene ancestrale presente almeno 550 milioni di anni fa prima della divergenza dagli urocordati.

L'avvento recente dei progetti di sequenziamento genico dei principali organismi modello utilizzati nella biologia molecolare (uomo, ratto, topo, pesce zebra e xenopus) ha rappresentato un importante strumento per l'esame della filogenesi dei geni appartenenti alla famiglia delle Relaxine.

Infatti, a partire dal 2001 è stato possibile identificare per via bioinformatica (database Celera) almeno sette membri delle Relaxine presenti nei primati: *RLX1*, *RLX2*, *RLX3*, *INSL3*, *INSL4*, *INSL5* ed *INSL6*.

In particolare, l'analisi bioinformatica ha permesso di proporre una prima ipotesi evolutiva filogenetica basata sui fenomeni di riarrangiamento degli elementi cromosomici dovuti a duplicazioni, inversioni e delezioni di interi frammenti di DNA contenenti diversi geni (Olinski *et al.*, 2006) (Fig.3).

Secondo questo schema le quattro copie ancestrali dei geni *INSL/RLX* (*RLX3*, *INSL3*, *INSL5* e *RLX*) sono il risultato dei due eventi di duplicazione dell'intero genoma avvenuto nei vertebrati prima della separazione della classe dei teleostei, le successive duplicazioni sono avvenute nelle varie classe tassonomiche in maniera specifica (Hsu 2003; Wilkinson *et al.* 2005a).

Queste duplicazioni classi-specifiche hanno permesso l'adattamento dei vari gruppi tassonomici ai differenti ambienti grazie all'evoluzione di nuovi processi fisiologici regolativi tramite un processo di mutazione-acquisizione di nuova funzione.

Per esempio, per i mammiferi parallelamente allo sviluppo della viviparità le copie dei geni *INSL4*, *INSL6* e *RLX2* hanno assunto nuove funzioni di regolazione degli organi riproduttivi come l'utero e ghiandole mammarie.

E' anche vero che poiché *RLX2* e *INSL3* partecipano ai tipici processi riproduttivi maschili e femminili come il rilassamento della cervice, la contrazione uterina, nella preparazione della ghiandola mammaria per l'allattamento così come la regolazione della discesa testicolare nello scroto (Bathgate *et al.* 2003), l'importanza di questi omologhi nei vertebrati non-mammiferi resta in gran parte da chiarire.

Filogenesi delle relaxine

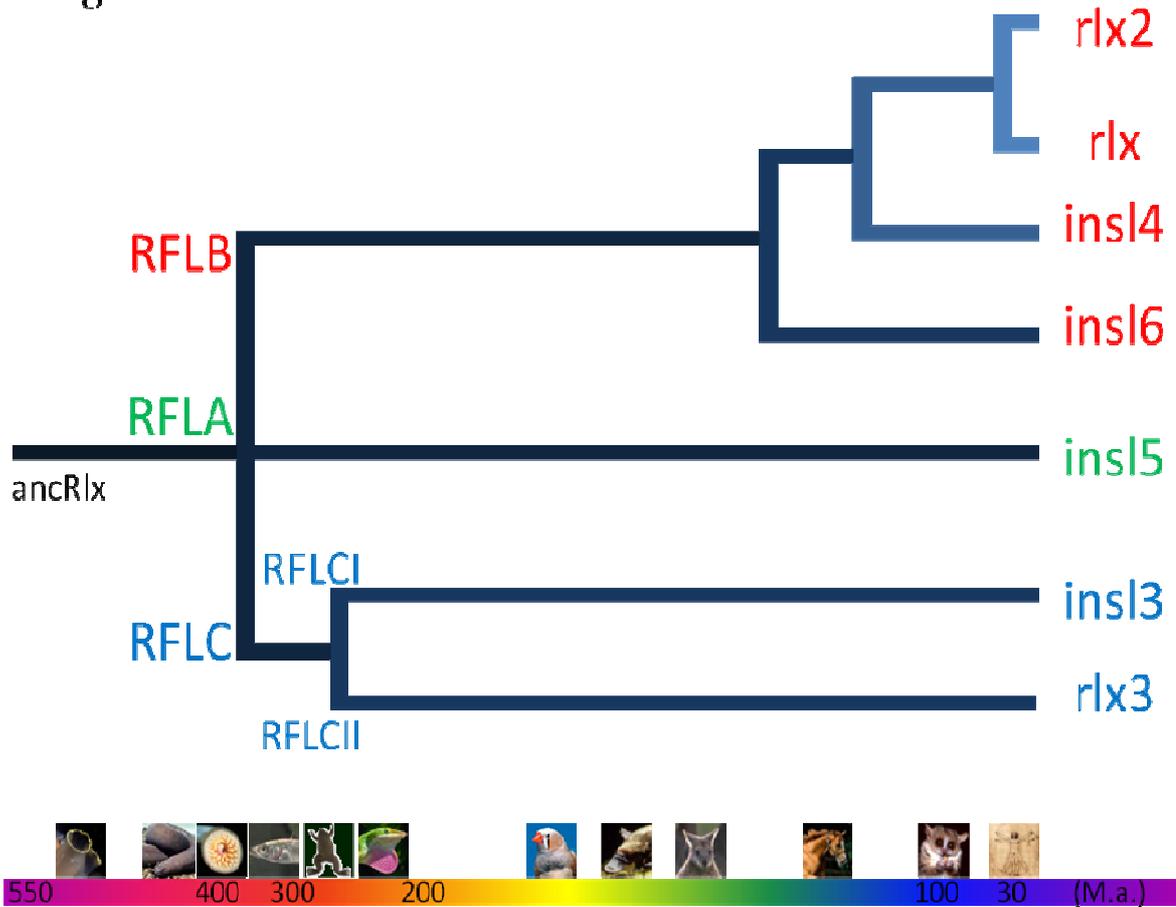


Fig.3 - Ipotesi evolutiva della famiglia dei geni *Relaxina* dalla forma ancestrale ai primati moderni.

Ruolo e funzione delle relaxine

Nel 1926 Frederick Hisaw purificò dal sangue di cavie di laboratorio gravide un ormone capace di “rilassare” le sinfisi pubiche facilitando il parto. Per questa sua caratteristica questo ormone venne chiamato Relaxina (RLN o RLX) (Hisaw, 1926).

I primi studi condotti sulla Relaxina nei mammiferi ne hanno associato le principali funzioni a fenomeni di tipo riproduttivo. Infatti, è stato dimostrato che essa è coinvolta nella crescita follicolare e nell’ovulazione attraverso un meccanismo intraovarico di tipo autocrino e/o paracrino (Bagnell *et al.*, 1993; Ohleth *et al.*, 1998). Inoltre prepara l’endometrio per l’impianto attraverso l’incremento dell’espressione di ormoni e di fattori di crescita.

Numerosi studi hanno evidenziato che la Relaxina controlla la crescita e lo sviluppo uterino prima del parto e che inibisce la contrattilità miometriale e l’adattamento cardiovascolare; anche il feto viene influenzato dalla circolazione relaxinica materna che ne favorisce lo sviluppo (Burger and Sherwood, 1995; Burger and Sherwood, 1998; Min *et al.*, 1997). Infine, le ghiandole mammarie (Hurley *et al.*, 1991), i capezzoli (Kuenzi and Sherwood, 1992), la cervice uterina (Burger and Sherwood, 1995), la vagina (Zhao and Sherwood, 1998) e il canale pubico (Sherwood, 1994) subiscono cambiamenti durante la gravidanza in seguito all’incremento dei livelli degli ormoni in esame. La relaxina è presente anche nel tratto riproduttore maschile; infatti è stata dimostrata la loro presenza a livello della prostata nell’uomo (Gunnensen *et al.*, 1996) e a livello delle vescicole seminali nel maiale (Kohsaka *et al.*, 1992).

Più di recente sono state identificate funzioni della Relaxina non correlate ad aspetti riproduttivi. Nel cuore di ratto è stata evidenziata un’azione cronotropa ed inotropica (Kakouris *et al.*, 1993); nel cancro mammario le diverse concentrazioni del peptide producono differenti

effetti mitogeni ed antimitogeni sulla crescita delle cellule MCF-7 (Bigazzi *et al.*, 1992; Ivell and Bathgate, 2002); inoltre, la Relaxina promuove la fibrosi (Sherwood, 1994), coadiuva il differenziamento dei mastociti (Nistri *et al.*, 2003) e delle cellule endoteliali nella risposta immunitaria provocata da agenti patogeni (Bani *et al.*, 1997).

Studi nell'uomo hanno evidenziato l'esistenza di due differenti forme di Relaxina strutturalmente molto simili (identità amminoacidica dell' 82%) denominate Relaxina-1 (H1) e Relaxina-2 (H2).

La relaxina-1 è stata ritrovata, oltre che nell'uomo, nelle grandi scimmie; essa è espressa nella decidua, nella placenta e nella prostata (Hansell *et al.*, 1991). La relaxina-2 pure essendo stata scoperta successivamente, rappresenta sia dal punto di vista fisiologico sia filogenetico la proteina omologa alla Relaxina presente negli altri mammiferi. Questa è nell'uomo la forma più abbondante in circolo ed è secreta dall'ovario (Winslow *et al.*, 1992).

La Relaxina-3 è il terzo membro appartenente alla famiglia dei geni Relaxina identificato in ordine cronologico tramite l'analisi blastN delle EST (sequenze espresse e sequenziale) presenti nel genoma di *Rattus norvegicus*, che presentano le chiare evidenze strutturali caratteristiche dei peptidi Relaxina (Burazin *et al.*, 2002).

Il suo gene è intervallato da un solo introne ed è caratterizzato da una sequenza codificante per 142 residui amminoacidici. La RLX3 presenta una notevole flessibilità strutturale, e questo ha indotto ad ipotizzare che essa possa interagire con diversi tipi di recettore. Può infatti legarsi ad RXFP1, sebbene con un'affinità 100 volte inferiore a quella della "Relaxina", e a due recettori orfani, RXFP3 e RXFP4. Tra questi ultimi due, il recettore specifico per RLX3 è risultato essere RXFP3, dal momento che presenta una maggiore affinità e profili di espressione corrispondenti.

L' espressione della Relaxina-3 è stata dimostrata essere molto differente da quella delle relaxine precedentemente caratterizzate a livello ovarico (RLX1 e 2), presentando livelli più alti nel cervello.

Nei ratti, i dati sulla distribuzione del mRNA della relaxina-3 mostrano una espressione molto abbondante nei neuroni del nucleo tegumentale ventro-mediale dorsale presenti nel ponte di Variolo, un area del cervello anche nota come nucleo incerto.

Anche i saggi di immunoreattività sulla Relaxina-3 hanno confermato la sua presenza in questa regione del cervello (Ma S, 2009).

Le esistenti evidenze anatomiche suggeriscono che la RLX3 sia prodotta nel soma dei neuroni GABA presenti nel ponte di Variolo nel mesencefalo e che venga trasferita tramite trasporto assonale e rilasciata a livello dei siti sinaptici o extrasinaptici nella parte anteriore del cervello dove attiva il suo recettore specifico RXFP3 espresso dai neuroni postsinaptici.

Tutti questi dati sperimentali portano ad ipotizzare il ruolo funzionale della relaxina-3 come un neuropeptide o un neuromodulatore con funzioni biologiche abbastanza differenti da quelle relaxine presenti a livello ovarico.

I successivi quattro membri appartenenti alla famiglia delle Relaxine identificati (*INSL3*, *INSL4*, *INSL5* ed *INSL6*) sono stati catalogati col nome di Insulin Like Factors (INSL).

Nel 1993, come risultato di un progetto di clonaggio differenziale, è stato isolato un nuovo membro della famiglia delle relaxine nel testicolo di maiale (Burkhardt E. *et al.*, 1994). Poiché questo peptide presentava una struttura secondaria molto simile a quella delle relaxine ed il caratteristico motivo del dominio B (R-XXX-R) fu inizialmente chiamato Relaxin like factor (RLF). La nomenclatura attuale lo identifica come Insulin like factor 3 (INSL3).

Il trascritto che codifica per INSL3 inizialmente è stato evidenziato nelle cellule del Leydig fetali ed adulte nel testicolo di tutti i

mammiferi esaminati (Adham *et al.*, 1993; Pusch *et al.*, 1996). Successivamente analisi di PCR e di Northern blotting hanno dimostrato la sua presenza anche nell'ovario e nel trofoblasto di uomo (Tashima *et al.*, 1995). Inoltre, INSL3 è altamente espresso anche nell'ovario dei ruminanti, dove manca un gene funzionale per la relaxina: è stato ipotizzato che esso sostituisca tale ormone svolgendo le funzioni normalmente ad esso attribuite (Bathgate *et al.*, 1999).

Le prime indicazioni riguardo un ruolo essenziale di INSL3 nella riproduzione derivano da studi effettuati su modelli di topo knockout. L'assenza del peptide determina criptorchidismo bilaterale negli animali, suggerendo un coinvolgimento di INSL3 nello sviluppo del *gubernacolo* e nella discesa del testicolo nello scroto durante lo sviluppo fetale, con conseguente assenza di spermatogenesi (Zimmermann *et al.*, 1999). Il ripristino di una normale spermatogenesi nei topi criptorchidi nei quali i testicoli sono fatti discendere chirurgicamente, indica che INSL3 non ha effetti diretti sulla produzione di spermatozoi (Nef and Parada, 1999). Anche le femmine -/- per INSL3 presentano una fertilità compromessa in seguito ad una disregolazione del ciclo estruale. Inoltre, il peptide ha un ruolo importante nella maturazione dell'uovo e, agendo da soppressore dell'apoptosi, nella sopravvivenza della cellule germinali maschili (Kawamura *et al.*, 2004).

INSL4, presente nel genoma dei primati probabilmente a partire dalla divergenza delle scimmie del nuovo mondo da quelle del vecchio, è espresso solamente nella placenta dei mammiferi superiori. In particolare, l'espressione di INSL4 è legata alla sincronizzazione della crescita della placenta rispetto al feto. Infatti, è stato dimostrato che INSL4 è capace di agire sulle cellule del sinciziotrofoblasto della decidua regolando i processi apoptotici periferici. Ad oggi, non è stato identificato il meccanismo di azione di INSL4 e si suppone che il suo recettore sia diverso dai recettori delle altre Relaxine identificati.

E' stato recentemente osservato che il promotore del gene umano *INSL4* contiene un elemento retrovirale.

In particolare, è stato dimostrato che espressione placentaria-specifica di *INSL4* è mediata dalla sequenza 3'-LTR (long terminal repeats) dell'elemento stesso. Questo dato suggerisce che questa antica infezione possa essere stata una delle cause principali nell'evoluzione funzionale di *INSL4* per la placenta umana (Halls *et al.*, 2007).

INSL5 è stato trovato ad alti livelli soprattutto nei tessuti periferici quali il rene, nel colon, nel cervello e nell'ipofisi, ma la sua funzione è ancora sconosciuta (Liu *et al.*, 2005a, b).

Il trascritto per *INSL6* è espresso maggiormente nel testicolo (Halls *et al.*, 2007) e, a più bassi livelli, nell'intestino, nel timo, nel rene, nell'utero, nell'ovario, nella milza, nella mammella, nel fegato e nel polmone (Lu *et al.*, 2006). Nel topo, è stata chiarita la sua localizzazione cellulare mediante esperimenti di immunocitochimica: esso si trova nel citoplasma nelle cellule germinali allo stadio di spermatociti in pachitene, spermatociti secondari e spermatidi tondi. E' stato messo in evidenza che *INSL6* è secreto da tali cellule, pertanto è stato ipotizzato che abbia un'azione autocrina su di esse e paracrina sulle cellule del Sertoli (Lu *et al.*, 2006).

I recettori delle Relaxine

Sebbene l'ormone Relaxina sia stato scoperto 80 anni fa, solo nell'ultimo decennio è stato possibile identificarne i recettori.

Basandosi sull'ipotesi della coevoluzione del ligando con il proprio recettore specifico, si supposeva che i recettori per la Relaxina e *INSL3* potessero essere probabilmente correlati a quelli noti dell'insulina e quindi di tipo tirosin-chinasico. Era anche chiara evidenza che la relaxina provocasse l'aumento di cAMP nei tessuti riproduttivi.

Nonostante la similarità strutturale, la famiglia dei peptidi delle relaxine e insulina agiscono attraverso vie di trasduzione indipendenti:

i peptidi relaxina e insulin-like attivano recettori a sette domini transmembrana associati a proteine-G (Relaxin Family Peptide Receptors - RXFP), mentre il gruppo insulina attiva recettori tirosin-chinasico (Hsu *et al.*, 2000).

Gli RXFP comprendono ad oggi un gruppo di quattro recettori: RXFP1 e RXFP2 (in passato conosciuti come LGR7 ed LGR8) di tipo C caratterizzati da un grande eterodominio amminotermale contenente dieci ripetizioni ricche di leucina (LRR), e due recettori orfani di tipo A con un eterodominio amminotermale di dimensioni molto minori denominati RXFP3 e RXFP4 (GPCR135 e 142) (Bathgate *et al.*, 2006) .

RXFP1 e RXFP2

I recettori RXFP1 e RXFP2 sono stati identificati come recettori della relaxina grazie ad uno screening sistematico dei nuovi recettori orfani identificati nel genoma umano espressi in cellule embrionali di fegato (HEK293T). Le cellule che esprimevano LGR7 ed 8 infatti, erano le sole capaci di rispondere alla relaxina porcina in maniera dose-dipendente tramite l'aumento dell' cAMP, mentre non rispondevano né all'insulina né al IGF-I (Hsu *et al.*, 2002).

Alcuni studi di inattivazione di INSL3 e analisi dell'espressione fenotipica, hanno rivelato che RXFP2 è il recettore specifico per il prodotto di questo gene e che il legame è ad alta affinità e provoca l'incremento della concentrazione di cAMP nelle cellule (Hsu *et al.* 2002). La conferma dell'accoppiamento INSL3-RXFP2 è derivata da studi su topi knock-out per entrambi i fattori: l'assenza di INSL3-RXFP2 determina in questi animali criptorchidismo o impossibilità di discesa del testicolo durante lo sviluppo (Kumagai *et al.* 2002). Alla luce dell'alta similarità tra RXFP1 e RXFP2, della somiglianza dei pattern di espressione di RXFP1 e dei geni per le relaxine, e della più alta affinità della "Relaxina" per RXFP1 rispetto a RXFP2, RXFP1 è stato di conseguenza definito come recettore specifico per la

“Relaxina” (Hsu *et al.* 2002). Entrambi questi recettori fanno parte di una sottofamiglia di **G-Protein-Coupled Receptors** (GPCR) denominata LGR (Ascoli *et al.* 2002). Studi degli LGR di varie specie hanno portato a comprendere che esistono tre sottotipi di questi recettori (A, B, C) originatisi durante le fasi precoci di evoluzione dei metazoi, che differiscono per i domini LRR (Hsu, 2003). RXFP1 e 2 appartengono al sottotipo C. Essi si distinguono dagli altri LGR per un modulo LDLa presente all'estremità N-terminale che sembra sia essenziale per l'attuazione delle loro proprietà di trasduzione. Il modulo è seguito da una regione fiancheggiante frutto di splicing alternativo e, infine, dalle 10 LRR. La struttura si mostra con dei foglietti interni paralleli, e delle eliche all'esterno della struttura caratteristica a “ferro di cavallo” (Bullesbach and Schwabe, 2005) (Fig.4).

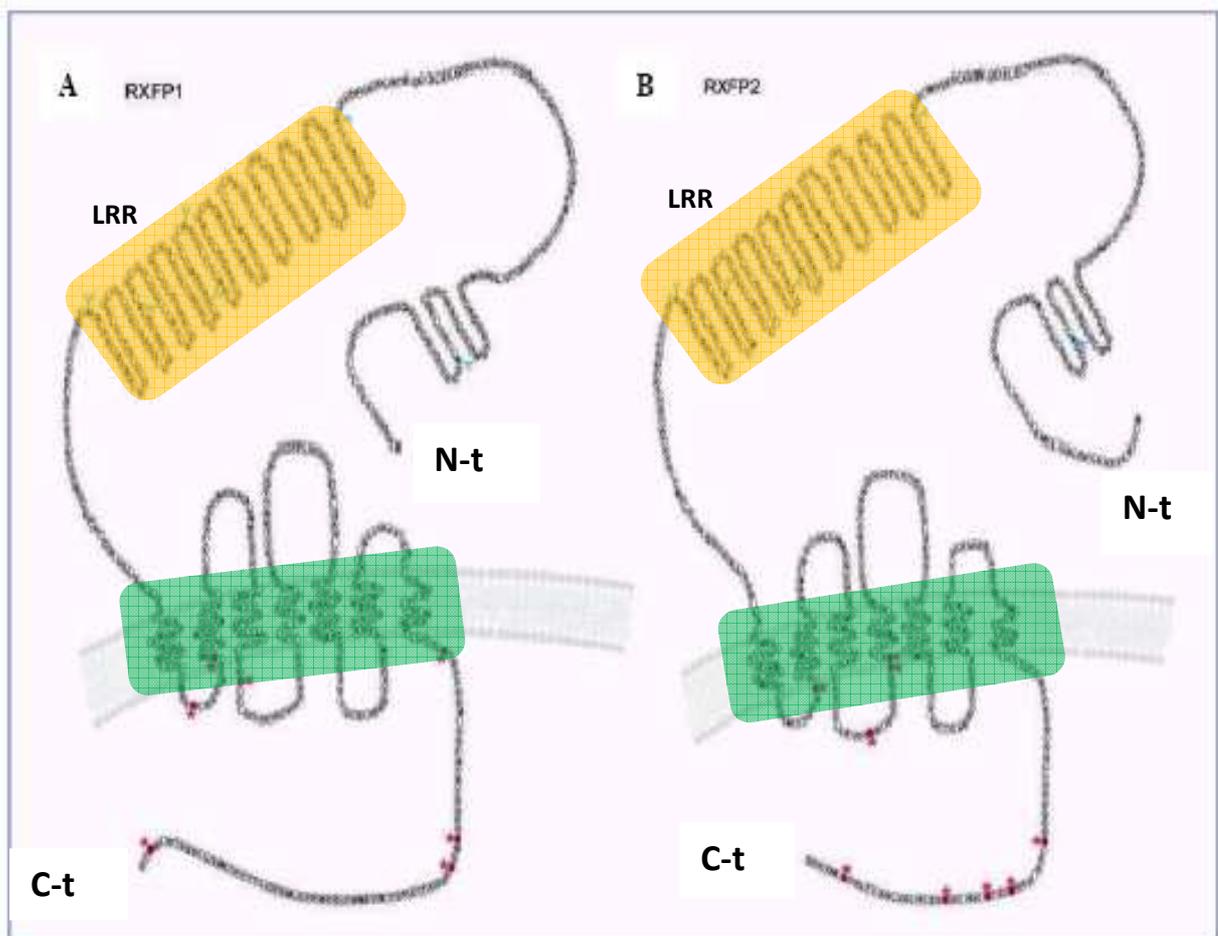


Fig.4 - Immagine rappresentativa dei recettori RXFP1 (A) RXFP2 (B) con i corrispetti sette segmenti transmembrana (in verde) e, sul versante ammino-terminale le dieci anse costituenti la regione ricca di leucina (LRR in giallo).

RXFP3 e RXFP4

RXFP3 e RXFP4 sono stati recentemente identificati rispettivamente come i recettori della relaxina-3 (Liu *et al.*, 2005b) e INSL5 (Liu *et al.*, 2005). Questi due recettori, classificati come GPCR della famiglia A, hanno le estremità ammino e carbossi-terminale relativamente ridotte rispetto a RXFP1 e 2 (Matsumoto *et al.*, 2000; Boels and Shaller, 2003; Liu *et al.* 2003). RXFP3 (precedentemente noto come GPCR135 o SALPR) è stato identificato in base alla

somiglianza con i recettori per la somatostatina e per l'angiotensina, nonostante non interagisca con questi ligandi. RXFP4 (GPCR142, o GPCR100), è stato scoperto tramite ricerche nel database genomico umano, impiegando la sequenza di RXFP3 (Boels and Shaller, 2003, Liu *et al.*, 2003) ed è stato ipotizzato, data l'alta percentuale di similarità, che entrambi avessero ligandi simili. Successivamente, è stato determinato il ligando per RXFP3 estraendo peptidi da organi di ratto e testandoli su estratti contro Gs-GTP nelle cellule di ovaio di cavia che esprimevano in maniera transiente tale recettore.

I peptidi estratti nel cervello mostravano alti livelli di GTPγS. I peptide purificati tramite HPLC e sequenziato hanno fornito una proteina simile alla relaxina-3 umana (relaxina H3) (Bathgate *et al.* 2003).

Infine, sono stati effettuati studi funzionali per determinare se questo fosse anche il ligando di RXFP4, confermando tale ipotesi. A differenza di RXFP1 e 2, RXFP3 e 4 hanno domini extracellulari di dimensioni limitate. RXFP4 è il più piccolo dei recettori, anche se non sono state ancora determinate le potenziali differenze funzionali legate a questo recettore. L'analisi della sequenza amminoacidica mostra che tutti i quattro recettori possiedono sette domini idrofobici transmembrana. Inoltre, subiscono N-glicosilazione e possiedono siti di fosforilazione nelle anse intracellulari e nelle code C-terminali, che sono importanti per la regolazione della traduzione; è stato inoltre ipotizzato che possano essere ugualmente importanti anche per l'internalizzazione del recettore (Halls *et al.* 2006) (Fig.5).

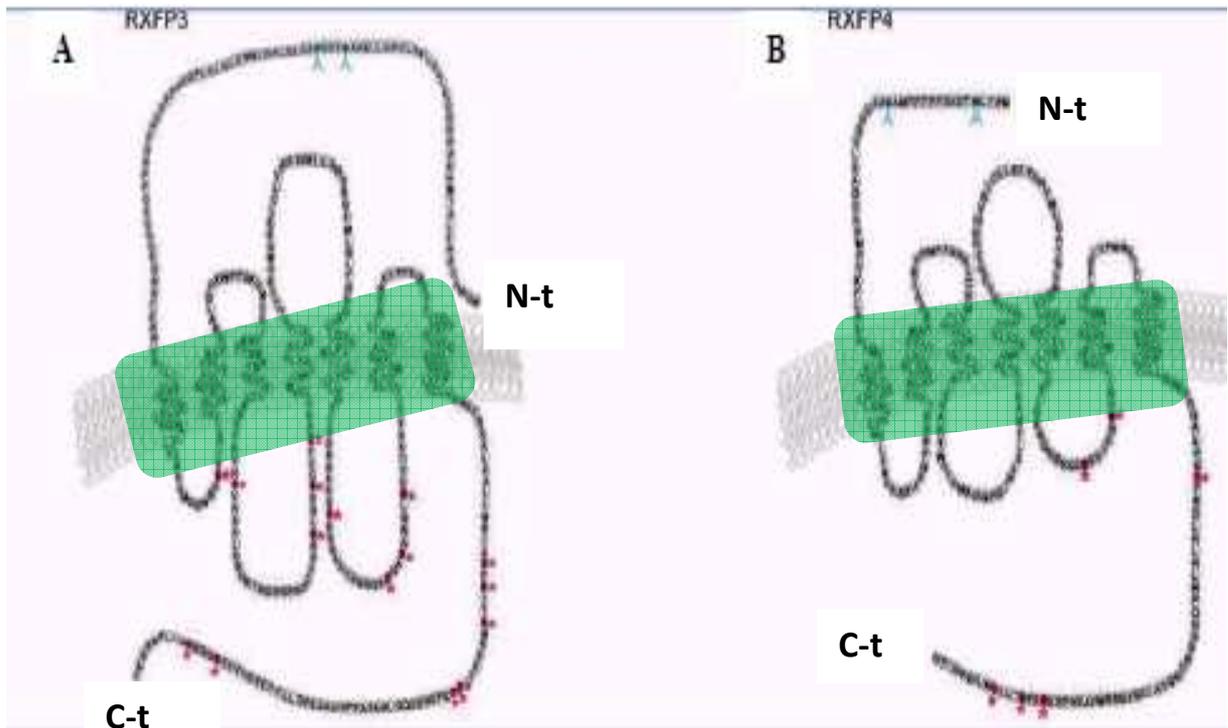


Fig. 5-Immagini rappresentanti RXFP3 (A) e RXFP4 (B) con i corrispettivi sette segmenti transmembrana (in verde). Si noti la mancanza del dominio LRR amminoterminale.

Le Relaxine nei vertebrati non mammiferi

Gli studi sulle relaxine sono stati condotti prevalentemente nell'uomo e negli altri mammiferi, e solo di recente sono state identificate molecole relaxina-simile anche in vertebrati non mammiferi.

Forme di relaxina sono state individuate, a livello proteico, nello *Squalus acanthias* (Bullesbach *et al.* 1986; Steinez *et al.* 1998) e nel *Gallus gallus* (Brackett *et al.* 1997). I primi studi a livello molecolare in bassi vertebrati sono stati effettuati nel 2001 da De Rienzo *et al.* nei laboratori di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro sperimentale.

Dalla libreria di cDNA di testicolo di *Rana esculenta* è stata clonata una sequenza codificante per un nuovo membro della famiglia delle relaxine/insuline, chiamato *frog Relaxin (fRLX)* (De Rienzo *et al.*, 2001). L'mRNA individuato codifica per una ipotetica proteina di 155 residui amminoacidici che mostra una modesta omologia rispetto alle relaxine e agli INSL3 di mammiferi. Questa possiede le tipiche caratteristiche condivise da tutti i membri della famiglia: i domini B-C-A; sei residui cisteinici, due nella catena B e quattro nella catena A; il motivo altamente conservato R-XXX-R. Confrontando la sequenza amminoacidica delle sole catene B ed A che compongono l'eterodimero maturo con le catene B ed A delle forme già conosciute, si ottengono valori maggiori di omologia. Infatti, i domini B ed A presentano rispettivamente il 40% ed il 30.8% di omologia con i domini B/A di INSL3 di topo ed il 50% e il 41.7% di omologia con i domini B/A della relaxina dei marsupiali. Al contempo, però, la localizzazione di *fRLX* coincide con quella di INSL3: l'analisi di Northern blotting ha evidenziato che il trascritto di *fRLX* è presente ad alti livelli nel testicolo; esperimenti di ibridazione *in situ* hanno dimostrato che l'mRNA è presente solo a livello dell'interstizio. La sua localizzazione specifica a livello delle cellule di Leydig è stata dimostrata mediante esperimenti *in vivo* con etano 1,2-dimetano solfonato (EDS), un agente alchilante che distrugge selettivamente tali cellule. Analisi di ibridazione *in situ* condotte su testicoli di rane iniettate con EDS a vari tempi, hanno mostrato che il segnale per *fRLX* scompare in seguito al trattamento. Inoltre, *fRLX* mostra bassi livelli di espressione nell'ovario e nell'ovidotto di rana proprio come INSL3 nei mammiferi.

Aggiungendo a questi dati analisi filogenetiche si è supposto che *fRLX* possa rappresentare una forma ancestrale di relaxina a partire dalla quale si sia evoluta INSL3 nel gruppo dei mammiferi. Interessanti dati sperimentali suggeriscono un diretto coinvolgimento di *fRLX* nella spermatogenesi. Il trascritto presenta, durante l'anno,

livelli di espressione variabili: è molto espresso in gennaio/febbraio; mostra un picco in marzo/aprile; a partire da maggio la sua espressione declina, mostrando un minimo nei mesi settembre/ottobre. Questo andamento risulta essere in fase con le variazioni annuali della concentrazione degli androgeni che controllano il ciclo spermatogenetico di *Rana esculenta* stimolando la formazione degli spermatidi. Inoltre, ibridazioni *in situ* effettuate su testicolo di animali ipofisectomizzati mostrano una netta riduzione dell'espressione di *fRLX* rispetto ad animali di controllo, suggerendo che l'espressione del trascritto sia sotto il controllo dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (De Rienzo *et al.*, 2001). Ulteriori esperimenti, effettuati sia *in vivo* che *in vitro*, hanno dimostrato che il testosterone regola l'espressione del trascritto di *fRLX* inducendone un incremento. Questa evidenza sperimentale è convalidata anche dai risultati di RT-PCR ed ibridazione *in situ* effettuate su testicoli di rana trattate a giorni alterni con CPA. Questi dati hanno mostrato una diminuzione dell'espressione del trascritto dovuto all'effetto antagonistico del CPA sul testosterone.

SCOPO DELLA RICERCA

Essendo stata già stata dimostrata, nello stesso laboratorio di ricerca dove ho svolto il mio lavoro di dottorato, l'esistenza di una relazione tra il testosterone e l'espressione di *fRLX* (De Rienzo *et al.* 2006) in *Rana esculenta*, si è cercato di verificare se la sua espressione è regolata anche dal 17β -Estradiolo, molecola quest'ultima in grado di indurre la massima capacità mitotica degli spermatogoni nonché la prima divisione meiotica (Li EZ *et al.*, 2007). Naturalmente, al fine di dimostrare un azione diretta di *fRLX* sul testicolo, si è cercato di identificare, uno specifico recettore così da poter essere certi di un suo specifico ruolo a livello gonadico. Ricordiamo che pure essendo in genere i principali organismi modello utilizzati per lo studio della spermatogenesi mammiferi roditori, il

modello animale utilizzato, la *Rana esculenta*, presenta significativi vantaggi per il suo studio. Infatti, il testicolo di tale anfibio anuro presenta una peculiare organizzazione cistica, in cui, all'interno di ogni cisti, le cellule germinali sono allo stesso stadio di maturazione e sono sincrone tra loro. Ne deriva una netta separazione spaziale dei vari stadi di differenziamento verso lo spermatozoo, utile all'osservazione morfologica. Inoltre, quest'anfibio è un riproduttore stagionale ed in quanto tale alterna periodi di intensa attività spermatogenica a periodi di bassa attività. Di conseguenza, considerando le variazioni di attività spermatogenica e di concentrazione degli ormoni sessuali endogeni durante il ciclo annuale, si è facilitati nel mettere a punto trattamenti ormonali volti ad inibire o a stimolare la spermatogenesi.

MATERIALI E METODI

Animali

Esemplari adulti di *Rana esculenta* sono stati catturati nelle vicinanze di Napoli da un fornitore locale e stabulati in vasche di plastica di dimensione 50x25x17 cm con cibo (larve di mosche) ed acqua *ad libitum* e con fotoperiodo luce : buio = 8:16.

Prelievo di tessuti da *Rana esculenta*

Gli animali, dopo anestesia (MS-222, Sigma), sono stati sacrificati mediante despinalizzazione ed i tessuti, velocemente dissezionati, sono stati immersi in azoto liquido e conservati a -80°C per l'estrazione degli RNA. I testicoli di alcuni animali sono stati immediatamente immersi nel fissativo di Bouin (tab.1) per le analisi di microscopia ottica.

Esperimento *in vivo* con estradiolo (E₂)

Nel mese di ottobre 50 maschi adulti di *Rana esculenta* sono stati suddivisi in 3 gruppi sperimentali, come segue:

- 1) 10 animali di controllo iniettati con 100 µl di veicolo (soluzione di Krebs-Ringer, KRB; Tabella 4) e sacrificati al tempo zero.
- 2) 20 animali iniettati con KRB + E₂ (2 µg/100 µl di KRB).
- 3) 20 animali iniettati con KRB + E₂ (2 µg/100 µl di KRB) + ICI 182-780 (6 µg/100 µl di KRB).

Gli animali sono stati sacrificati 48 e 72 ore dopo il trattamento (10 animali/gruppo/tempo) ed i testicoli prelevati, sono stati processati per le analisi istologiche e biomolecolari.

Estrazione di RNA totali da tessuti di *Rana esculenta*

E' stata seguita la metodica di Chomczynski & Sacchi, 1987 come di seguito descritto. I tessuti sono stati rapidamente prelevati dall'azoto liquido ed omogeneizzati con un Ultra-Turrax nella soluzione A (Tab.2) nella proporzione di 10 ml di guanidina tiocianato + 200 µl di β-mercaptoetanololo per ogni grammo di tessuto (peso umido).

All'omogenato sono stati aggiunti:

0.1 volumi di Na-Acetato pH 4.2 (2M)

1 volume di fenolo saturato a pH 4.0 e cloroformio (5:1).

Dopo agitazione su vortex, il campione è stato lasciato per 30 minuti a 4°C e centrifugato a 4600 rpm per 30 minuti a 4°C. Il supernatante contenente gli RNA, è stato precipitato con 1 volume di alcool isopropilico freddo e precipitato a -20°C per una notte. Gli RNA precipitati sono stati centrifugati in Beckman per 30 minuti a 4600 rpm a 4°C, solubilizzati in 10 ml di tampone TE (Tab.2), 10% SDS e 0.5 mg/ml di proteasi K ed incubati a 50°C per 1 ora. Gli RNA sono stati estratti con un volume di fenolo pH 4.0-cloroformio (5:1) e centrifugati come precedentemente descritto. Al supernatante è stato aggiunto 1 volume di cloroformio-alcool isoamilico (24:1) e nuovamente centrifugato nelle stesse condizioni. Gli RNA sono stati precipitati con l'aggiunta di 250mM NaCl e 3 volumi di alcool etilico assoluto e conservati a -20°C per una notte. Il precipitato è stato raccolto per centrifugazione, lavato con etanolo al 70% e al 95% e sciolto in ddH₂O sterile. Ne sono stati infine determinati la concentrazione mediante lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 ed il valore della ratio per stabilirne la purezza.

Aliquote di 500ng di RNA totali sono state separate elettroforeticamente su gel di agarosio (1% BIORAD) per controllare l'integrità degli RNA ribosomiali 18 S e 28 S.

Analisi mediante ibridazione di “Northern Blotting”

I campioni di RNA sono stati diluiti con 3 volumi di tampone così composto:

MOPS pH 7.5	1.3x (tab. 3)
Formaldeide	3 M
Formammide	64 %

I campioni sono stati denaturati per 5 minuti, è stato aggiunto 1/10 di volume di colorante (composto da: blu di bromofenolo 0.4%, xilene cianolo 0.4%, glicerolo 50%, EDTA 1%) ed infine sono stati caricati su un gel denaturante contenente:

Agarosio	1%
MOPS pH 7,5	1x
Formaldeide	2.2 M
Bromuro di etidio	0.25µg/ml

La corsa elettroforetica è stata eseguita per 15 ore a 30 mA, usando come tampone di corsa MOPS 1x.

Il gel d'agarosio è stato lavato per 1 volta in H₂O sterile per 30 minuti e lasciato ad equilibrare per 2 volte in SSC 10x (tab. 3) per 30 minuti. Per il trasferimento degli RNA sul filtro di nylon è stato usato il metodo descritto da Sambrook *et al.*, (1989): il filtro di nylon è stato poggiato sul gel d'agarosio con sopra diversi strati di carta 3 MM ed un peso di circa 1 Kg, usando come tampone per il trasferimento SSC 10x (tab. 3). Dopo aver eseguito il trasferimento per la notte a temperatura ambiente, il filtro è stato lasciato in stufa ad 80° C per 2 ore per la fissazione degli RNA.

Il filtro è stato quindi ibridato con la sonda corrispondente al cDNA codificante per *fRLX* o per la proteina ribosomiale di rana *fP1* marcate radioattivamente, come descritto nel paragrafo successivo.

L'ibridazione è stata condotta nel modo seguente: i filtri sono stati posti in buste ed è stata aggiunta una miscela di preibridazione così composta:

Soluzione di Denhardt 5x

SSC 5x

SDS 0.5%

EDTA 5 mM

Sodio fosfato 50 mM a pH 7

DNA di sperma di salmone (SSS) 100 µg/ml

Dopo 2 ore di incubazione a 65°C, la sonda di *fRLX* o di *fP1* marcata radioattivamente mediante “Random primer” e precedentemente denaturata con incubazione a 95°C per 5 minuti, è stata aggiunta in una quantità pari 2×10^6 cpm/ml a 65°C tutta la notte.

Il giorno successivo, i filtri sono stati lavati per 20 minuti in SSC 2x e SDS 0.1%, seguito da uno o due lavaggi di 20 minuti, sempre a 65° C, in SSC 0.2x e SDS 0.1%.

L'autoradiografia è stata condotta mettendo i filtri a contatto con lastre Fuji HR-H a -80° C per una notte in cassette di esposizione provviste di uno schermo intensificatore. Il segnale autoradiografico è stato successivamente quantificato mediante analisi al GELDOC.

Marcatura radioattiva di sonde mediante la tecnica dei “random primers”

Le sonde costituite dai cDNA di *fRLX* e *fP1*, impiegate per l'ibridazione dei filtri ottenuti dai Northern blotting, sono state marcate radioattivamente mediante la tecnica del “random primer” (Feinberg and Volgelstein, 1984). Il DNA è stato denaturato e posto in presenza di una miscela di esanucleotidi statistici che, legandosi al singolo

filamento, fungono da innesco per la polimerizzazione operata dal frammento di Klenow della DNA polimerasi I di *E. Coli*. La reazione è stata eseguita in presenza dei deossinucleotidi [α^{32} -P]dCTP e [α^{32} -P]dATP che vengono incorporati nel filamento di DNA neosintetizzato e lo rendono radioattivo.

A 40 ng del DNA da marcare sono state aggiunte 1.5 pmoli di esanucleotidi statistici ed acqua sterile per un volume totale di 37 μ l. Il DNA stampo è stato denaturato a 95° C per 5 minuti. La miscela è stata riportata a temperatura ambiente e sono stati aggiunti i seguenti componenti alle concentrazioni indicate, in un volume finale di 65 μ l:

dGTP 50 μ M
dTTP 50 μ M
BSA 0.5 mg/ml
HEPES 200 μ M a pH 6.6
Tris-HCl 200 μ M a pH 7
EDTA 10 μ M
[α - 32 P]dATP (3000 Ci/mmole) 30 μ Ci
[α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmole) 30 μ Ci
frammento di Klenow della DNA
polimerasi di *E. coli* 3 U

La marcatura del DNA è stata condotta a 37° C per 2 ore. Dopo l'incubazione, per separare il DNA marcato dai precursori liberi, la soluzione è stata applicata su di una colonna riempita con la resina Sephadex-G50 ("Nick column" della Pharmacia equilibrata) con TE 1x (tab. 2) e SDS 0.1%. L'eluato è stato raccolto in frazioni di 150 μ l ed 1 μ l di ognuna di esse è stata analizzata per determinare la quantità di radioattivo incorporato utilizzando lo scintillatore LS1701 Beckman con il liquido di scintillazione Insta-Gel (Packard). Le prime

due frazioni radioattive, contenenti circa il 90% della radioattività incorporata, sono state unite ed utilizzate come sonda.

RT-PCR

Per la sintesi del primo filamento di cDNA sono stati utilizzati come stampo gli mRNA totali.

3 μ g di RNA sono stati incubati per 15 minuti a 65° C in presenza di pdN8 di innesco (0.8 mM), di dNTP (0.8 mM) ed H₂O trattata con DEPC. La miscela è stata poi immediatamente raffreddata in ghiaccio e successivamente sono stati aggiunti ad essa: tampone di sintesi (1x), DTT (10mM) e Superscript III Trascrittasi inversa (100U). La reazione di sintesi è stata tenuta 10' a temperatura ambiente e poi portata alla temperatura di 50° C per 1 ora al termine della quale l'enzima è stato inattivato a 70° C per 15 minuti. Il cDNA così ottenuto è stato utilizzato per le successive reazioni di amplificazione, in una miscela di reazione così composta:

2 μ l cDNA (1:10 della reazione di RT)

2.5 μ l di tampone di sintesi 10x

0.75 μ l MgCl₂ 50mM

2 μ l di dNTP 2.5mM

1 μ l di oligo up (5 pmol/ μ l)

1 μ l di oligo down (5 pmol/ μ l)

0.25 μ l di TAQ DNA polimerasi (5U/ μ l)

H₂O per un volume finale di 25 μ l.

I cicli di amplificazione sono stati eseguiti mediante un Thermal cycler Perkin Elmer-Cetus, come descritto di seguito:

- PCR specifiche per *fRLX3* e *fP1*

	Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
Fase di denaturazione:	94°	5'	1
	94°	45''	} 30/28
Fase di appaiamento:	60° (<i>fRLX3/fP1</i>)	45''	
Fase di allungamento:	72°	45''	
Fase terminazione:	72°	6'	1

- PCR specifiche per *fRXFP3*

	Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
Fase di denaturazione:	94°	5'	1
	94°	45''	} 35
Fase di appaiamento:	56° (<i>fRXFP3</i>)	45''	
Fase di allungamento:	72°	45''	
Fase terminazione:	72°	6'	1

In particolare, per amplificare il cDNA di interesse sono stati utilizzati oligonucleotidi degenerati, e specifici, per *fRLX3* ed *fRXFP3*, e come controllo positivo oligo specifici per *fP1*, un trascritto codificante per una proteina ribosomale costitutivamente espressa in tutti i tipi cellulari.

Le sequenze dei primers sono le seguenti:

<i>fRXFP3Up1</i>	5'	GGCAARGCCATGTGYAARATCGT	3'
<i>fRXFP3Rev1</i>	5'	AAGCCCARCAGMACCTTCTG	3'
<i>fRLX3degUp</i>	5'	TWTGGGGTGAAGCTNTGYGC	3'
<i>fRLX3degRev</i>	5'	TTGCTRCACCCCATTTGCA	3'
<i>fRLX3up</i>	5'	ATACGGGCTGTCATCTTTACG	3'
<i>fRLX3rev</i>	5'	CCAATGCCGCTTCTCTTCC	3'
<i>fP1 For1</i>	5'	TACGAGCGTCCATCACACAC	3'
<i>fP1 Rev1</i>	5'	AGACCAAAGCCCATGTCATC	3'
3'Race Adapter	5'	GGCCACGCGTCTGACTAGTAC(T ₁₇)	3'

Elettroforesi su gel

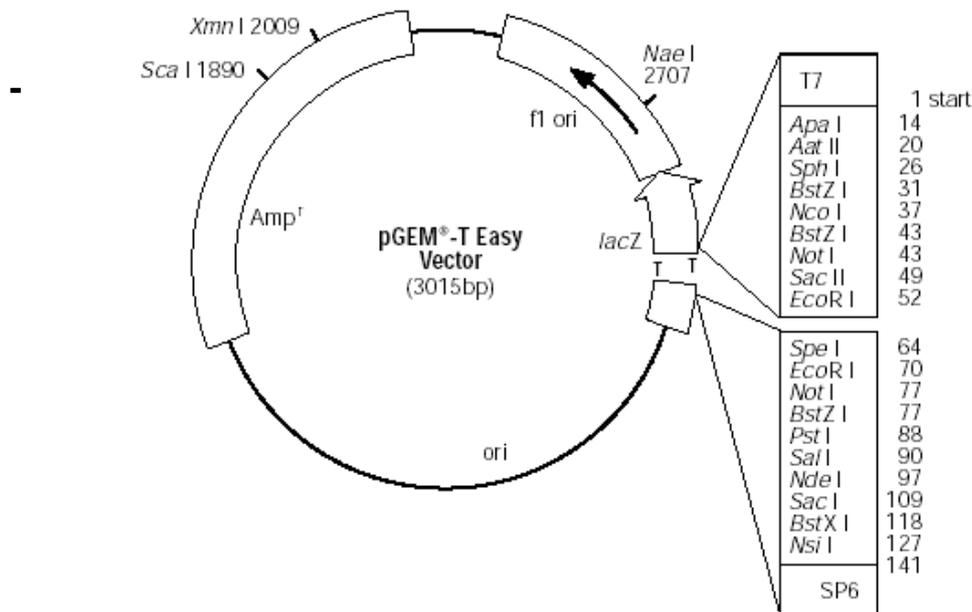
I prodotti di RT-PCR sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio condotta a temperatura ambiente in un gel orizzontale applicando una differenza di potenziale costante da 3 a 8 V/cm. L'agarosio (1% BIORAD) è stato sciolto a 100°C in una soluzione tampone TAE 1x (Tab.2) e, una volta raffreddata tale soluzione, è stato ad essa aggiunto bromuro di etidio ad una concentrazione finale di 0.5 µg/ml. I campioni di cDNA sono stati caricati sul gel solidificato dopo essere stati appesantiti con una soluzione contenente glicerolo 5%, xilene cianolo 0.042% e blu di bromofenolo 0.042%.

I risultati della separazione elettroforetica sono stati visualizzati per esposizione del gel su un transilluminatore a lampada UV, analizzati mediante l'utilizzo del Geldoc e quantificato normalizzando i valori di densitometria ottenuti per *fRLX3* con i valori dei corrispettivi *fP1*.

Clonaggio

Dopo la corsa su gel d'agarosio la banda di interesse è stato eluita utilizzando il kit "QIAquick Gel Extraction Kit" della Qiagen seguendo le istruzioni della casa produttrice. Il clonaggio dei frammenti purificati dal gel, è stato effettuato utilizzando il vettore di clonaggio pGEM[®]-T Easy della Promega.

Vettore di clonaggio pGEM[®]-T-Easy



Un'aliquota del prodotto di PCR (3 μ l) è stata incubata over night in presenza di:

Tampone 2x (Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase)	5 μ l
Vettore pGEM-T Easy (50 ng/ μ l)	1 μ l
Enzima T4 DNA ligasi (3 U/ μ l)	1 μ l
H ₂ O per un volume finale di 20 μ l.	

Trasformazione chimica dei batteri

Per la trasformazione sono stati utilizzati 40 μ l di batteri competenti del ceppo *E.coli* JM109 ai quali sono stati aggiunti 2 μ l della reazione di ligasi. Questa miscela è stata sottoposta a shock termico: 30 secondi in ghiaccio, 1 minuto e mezzo a 42° C, e 1 minuto e mezzo nuovamente in ghiaccio. I batteri trasformati sono stati trasferiti in un tubo da inoculo e lasciati crescere a 37° C per 1 ora e mezza sotto agitazione costante (280 rpm). Al termine dell'incubazione, aliquote di 150 e 250 μ l sono state piastrate su piastre di Agar in LB (tab.5) contenente Ampicillina (50 μ g/ml) e lasciate crescere tutta la notte a 37° C.

Minipreparazione di DNA plasmidico

Per poter ottenere una minipreparazione di DNA plasmidico da sequenziare, sono state picchettate dalle piastre singole colonie e sono state messe a crescere in 3ml di LB con 50µg/ml di ampicillina, in agitazione costante a 150 rpm per tutta la notte.

Il giorno seguente, al fine di ottenere una riserva di batteri trasformati, 500µl di ciascuna coltura batterica sono stati mescolati ad un uguale volume di glicerolo al 40% e conservati a -20° C. Il restante volume è stato centrifugato a 13000 rpm per 1'. Fatto ciò si è proseguito con il protocollo utile per l'estrazione di materiale plasmidico della Quiagen. In ultimo è stata quantificata la concentrazione plasmidica della minipreparazione utilizzando uno spettrofotometro VARIAN DMS 90 e la concentrazione del plasmide è stata determinata utilizzando la relazione:

$$20 \text{ O.D.}_{\lambda 260 \text{ nm}} = 1 \text{ mg/ml di DNA plasmidico}$$

Digestione con l'enzima di restrizione EcoRI

Al fine di identificare i cloni positivi contenenti l'inserto delle dimensioni attese, è stata effettuata la digestione di 1µg di DNA plasmidico ottenuto dalla miniprep utilizzando 0.5µl dell'enzima EcoRI (10u/µl). La reazione è stata condotta a 37°C per 2 ore in presenza di 2µl di tampone H (10x) ed ddH₂O per un volume finale di 20µl. Allo scopo di verificare l'avvenuta digestione, è stato analizzato 1µl di reazione su gel di agarosio all'1% in TAE 1x (tab.2) contenente 0.5µg /ml di bromuro di etidio.

Sequenziamento del DNA plasmidico ed analisi delle sequenze

Le sequenze dei plasmidi sono state determinate utilizzando il metodo di marcatura Dye terminator della Beckman mediante sequenziamento ciclico. La procedura, completamente automatizzata, è stata eseguita dal servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica “Anton Dohrn” di Napoli al quale è stata inviata una miscela in acqua sterile contenente 100 ng di DNA plasmidico e 5pmol di primer d’innescio (T7 o SP6). L’analisi delle sequenze è avvenuta mediante lo studio dell’elettroferogramma corrispondente, e le sequenze ottenute sono state confrontate con i cDNA e le sequenze EST depositate nella banca dati NCBI.

TABELLE

TABELLA 1

FISSATIVI PER LA MICROSCOPIA

Fissativo di Bouin

Acido picrico in sol.satura	15 ml
Formalina	5 ml
Acido acetico glaciale	1 ml

TABELLA 2

SOLUZIONI PER ESTRAZIONE RNA ED ELETTROFORESI

Soluzione A

Tiocianato di guanidina	4 M
Na-Citrato pH 7	25 mM
Sarkosyl	0.5 %
2- β mercaptoetanololo	100 mM

Tampone TE

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

TAE 20x modificato (1 lt)

Tris	96,8 gr
Acido Acetico glaciale	22,8 ml
EDTA 0.5M pH8	4,0 ml

TABELLA 3

SOLUZIONI PER NORTHERN BLOTTING

Mix di preibridazione (50ml)

SSC 20x	12.5ml
Soluzione di Denhart 50x	5ml
EDTA 0.5M	0.5ml
Na ₂ PO ₄ 1M pH6,8	2.5ml
SDS 20%	1.25ml

DNA di sperma di salmone	10 µg/ml
H ₂ O	27.5ml

TABELLA 4

SOLUZIONE FISIOLÓGICA PER ANFIBI

Krebs-Ringer

Cloruro di sodio	0.9 g
Cloruro di potassio	0.042 g
Bicarbonato di sodio	0.02 g
Cloruro di calcio secco	0.64 g
Acqua distillata	100 ml

TABELLA 5

MEZZI PER COLTURE BATTERICHE

LB – Luria Bertani (1 lt)

NaCl	10 gr
Tryptone	10 gr
Estratto di lievito	5 gr

Terreno di coltura solido: LB + Agar (1lt)

LB	
Agar granulare	15 gr/lt

Abbreviazioni

SSC: SODIO SALINO CITRATO

PBS: TAMPONE SALINO FOSFATO

RISULTATI

Esperimento *in vivo* con 17 β -estradiolo (E₂)

Allo scopo di studiare gli effetti dell'estradiolo sull'espressione dell'mRNA di *fRLX*, è stato realizzato un esperimento *in vivo*, iniettando le rane con E₂ o con E₂ ed un suo antagonista, l'ICI 182-780, e sacrificandole dopo 48 e 72 ore. Le analisi di Northern blotting hanno mostrato che il trattamento con E₂ determina una riduzione dei livelli del trascritto di *fRLX*. Infatti, nei testicoli degli animali trattati con lo steroide, sia a 48 sia a 72 ore, si osservano valori di *fRLX* inferiori rispetto a quelli riscontrati nei testicoli degli animali di controllo (fig. 6A). Tale diminuzione è completamente contrastata dall'uso dell'ICI, a conferma di un'azione diretta dell'estradiolo sull'espressione di *fRLX* (fig.6A).

In grafico (fig. 6C) sono riportati i valori di densitometria relativa degli amplificati, ottenuti dividendo il valore letto per *fRLX* nei vari trattamenti, per quello del corrispettivo *fP1*.

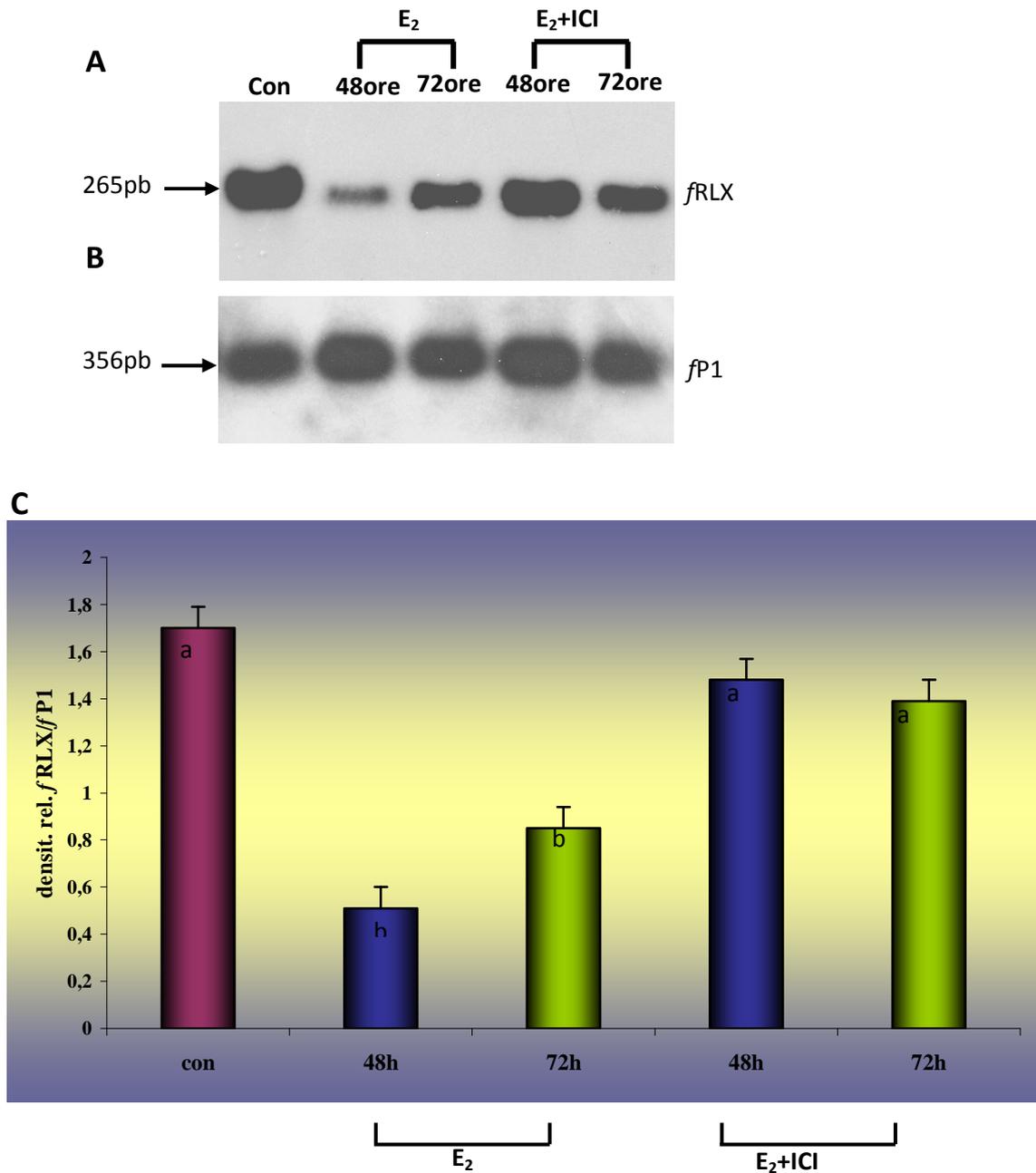


Fig. 6 - Espressione del trascritto di *fRLX* in seguito a trattamento con E₂ o con E₂+ICI dopo 48 o 72 ore. Analisi di Northern blotting su RNA totali per il trascritto di *fRLX* (A) e *fP1* (B). Con = controllo iniziale. In C è riportata la rappresentazione grafica della densitometria relativa dei valori ottenuti per *fRLX* normalizzati rispetto ai corrispondenti valori ottenuti per *fP1*. a vs b P<0,01.

Clonaggio di *fRLX3*

Le principali strategie per l'identificazione di nuovi geni in specie che non presentano un database genomico quale *Rana esculenta* sono la tecnica della libreria sottrattiva di cDNA tra specie cellulari che hanno pattern di espressione molto differenti, e la costruzione di oligonucleotidi degenerati costruiti sulle sequenze nucleotidiche conservate degli organismi presenti in banca dati genomica evolutivamente vicini all'organismo da studiare, da usare in esperimenti di RT-PCR.

Al fine di identificare nuovi geni appartenenti alla famiglia delle Relaxine in *Rana esculenta* si è deciso di utilizzare l'approccio dei primer degenerati, basandosi sullo studio delle sequenze dei geni relaxina di mammifero, pesci ed in particolare dell'anfibio anuro *Xenopus tropicalis*.

Il genoma di *Xenopus tropicalis* (JGI [version 4.1](#) [August 2005]) rilasciato sul sito della Ensembl è organizzato in 19501 scaffolds con una dimensione di circa 1.5 Gbasi. L'analisi blastx delle EST presenti ha permesso di identificare almeno tre putative forme di relaxine di *Xenopus*.

In particolare, una di queste ha una identità amminoacidica del 62% (96/155) rispetto ad *fRLX*.

Al fine di verificare l'ipotesi secondo cui *fRLX* è omologo funzionale di INSL3, ho analizzato la sua localizzazione cromosomica per definire eventuali conservazioni nell'ordine di geni noti associati nei Mammiferi ad INSL3 (sintenia), quali Janus Kinasi-3 (JAK3), B3GNT3 e FCHO1. Questo putativo gene *XtRLX*, è localizzato in un megacontig (scaffold_969) che contiene anche JAK3, B3GNT3 e FCHO1. Questi dati, tenendo conto dei precedenti dati sperimentali, permettono di supporre che, probabilmente, *fRLX* pur essendo molto simile strutturalmente alle Relaxine, rappresenti da un punto di vista funzionale l'omologo di INSL3.

Gli altri putativi geni di Relaxine sono presenti rispettivamente sullo scaffold_86 e 649 e mostrano entrambe un'identità molto alta con la Relaxina-3 di mammifero (Fig.7).

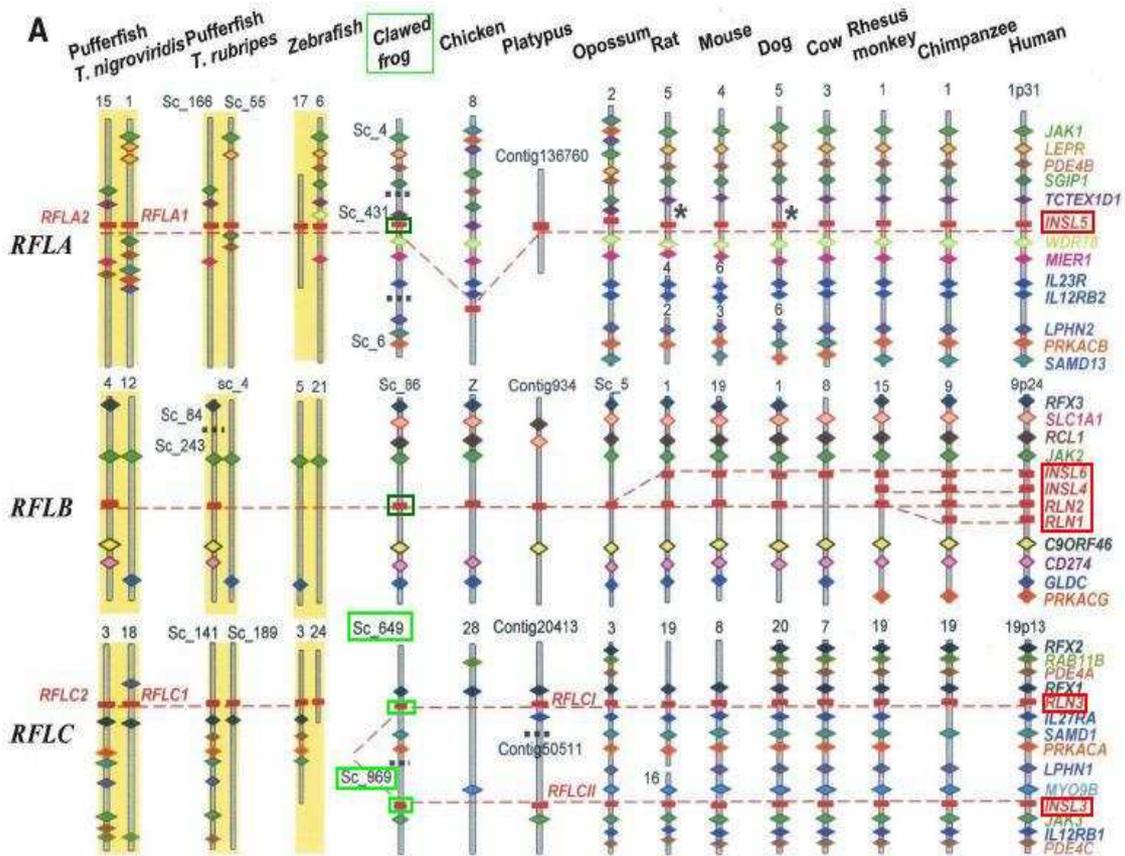


Fig.7- la mappa di sintenia indica che i sette geni della famiglia delle Relaxine umane (in rosso) si sono evolute da tre differenti geni ancestrali (*AncRFLA*, *AncRFLB*, e *AncRFLC*) presenti nell'antenato comune dei tetrapodi e teleostei (modificato da Hsu, 2007). In verde le Relaxine presenti nello *Xenopus tropicalis* (african clawed frog).

Queste sequenze sono state quindi utilizzate per disegnare degli oligonucleotidi degenerati per identificare la sequenza specifica dell'mRNA per *fRLX3* di *Rana esculenta*. Utilizzando questi oligonucleotidi d'innescio è stata effettuata una reazione di RT-PCR su RNA totali estratti da testicolo, cervello, ed altri tessuti (Fig. 8), che ha permesso di ottenere un amplificato di 362 pb presente

specificamente nel cDNA di cervello (Fig. 9). Il cDNA eluito da gel, è stato successivamente clonato e sequenziato: la traduzione della sequenza nucleotidica rivela la presenza di una cornice di lettura aperta che codifica per 119 residui aminoacidici (Fig. 10).

La putativa sequenza amminoacidica è stata confrontata con quelle già presenti in banche dati ed ha mostrato omologia con la Relaxina-3 di altri vertebrati. Nel dettaglio la sequenza d'interesse mostra un'identità del 75% con *Xenopus tropicalis*; del 45% con *Danio rerio*; del 46% con *Mus musculus*; ed infine del 44% e del 39% con *Homo sapiens* e *Gallus gallus*. E' da notare che gli amminoacidi essenziali per la struttura terziaria, evidenziati in figura, sono gli stessi anche in organismi filogeneticamente molto distanti come *Danio rerio* e *Homo sapiens* (Fig.11).

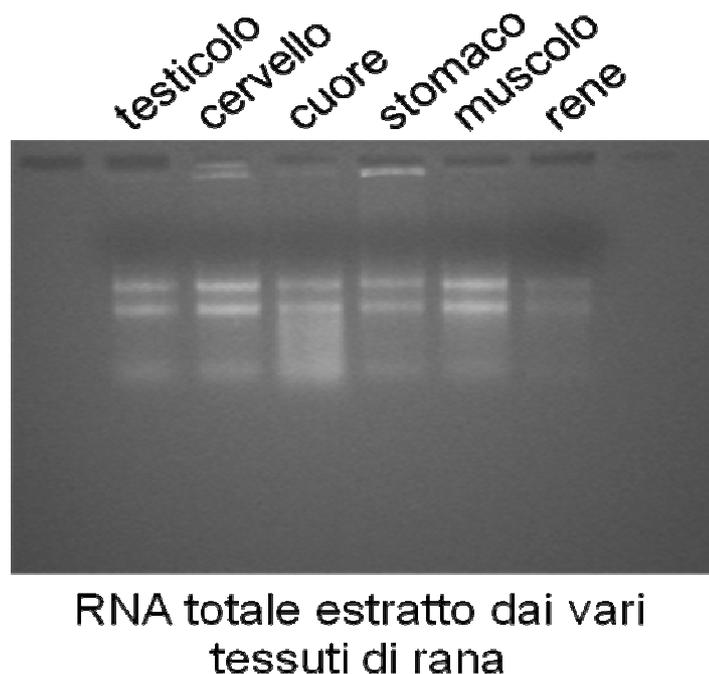


Fig.8 – RNA totali estratti dai vari tessuti prelevati da Rana esculenta prima del trattamento con DNasi. Sono bene osservabili le due bande principali degli RNA ribosomali 28S e 18S.

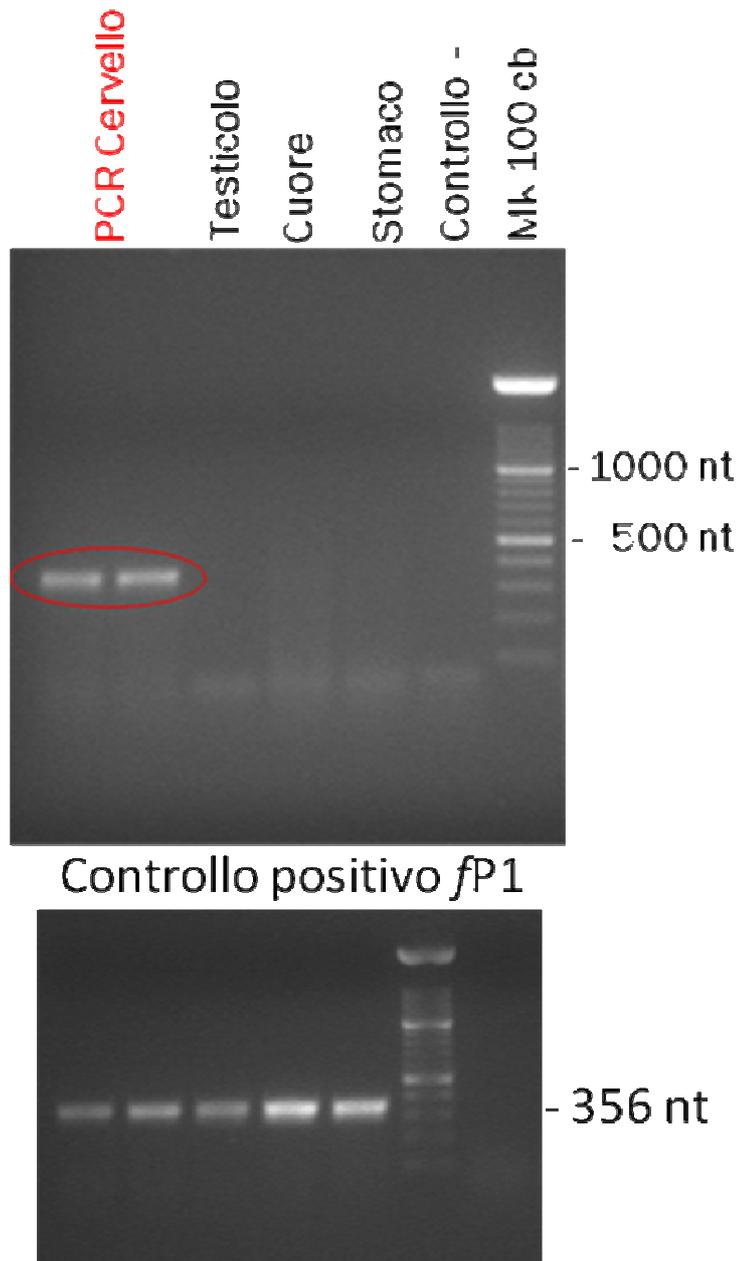
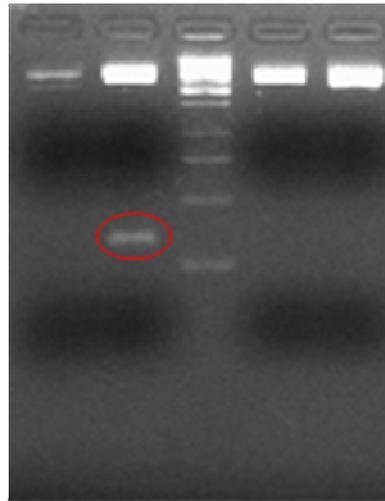


Fig.9 - Gel d'agarosio da cui è stato clonato e sequenziato il frammento di cDNA di *fRLX3*. Nel gel in basso i corrispettivi controlli dei cDNA tramite *fP1*. MK = marker 100cb



Miniprep di
fRLX3



Rana esculenta relaxina 3 (*fRLX3*) parziale

tatggggtgaagotgtgtggcagagaattcatacgggctgtcatctttacgtgCGGaggg
 Y G V K L C G R E F I R A V I F T C G G
 tcccgctggaggagaaatgaagccctgcaggcgggggacctcacagagatatttgggaac
 S R W R R N E A L Q A G D L T E I F G N
 cttggttccaccgatgtagactcaggagaagaagaggtgttcagcgagtggacaaacaac
 L G S T D V D S G E E E V F S E W T N N
 ttgCGcccacacaacggtgacatcatggactatggagtcCCCCagagctggagagaacca
 L R P H N G D I M D Y G V P Q S W R E P
 tctgttggaaggcatggggtagcaccatcatcggatgactccctcagggcgggtggagaga
 S V G R H G V A P S S D D S L R A V E R
 aggggaagagaagcggcattggggttgtccaacacatgatgcaaatgggggtgtaga
 R G R E A A L G L S N T C C R W G C S

Fig.10 - Minipreparazione di cDNA plasmidico digerito con EcoRI contenente il frammento del putativo *fRLX3*.

Sequenza del frammento clonato con la putativa cornice di lettura.

L'analisi della sequenza mette in evidenza la presenza parziale della catena B (azzurro) e della catena A (verde).

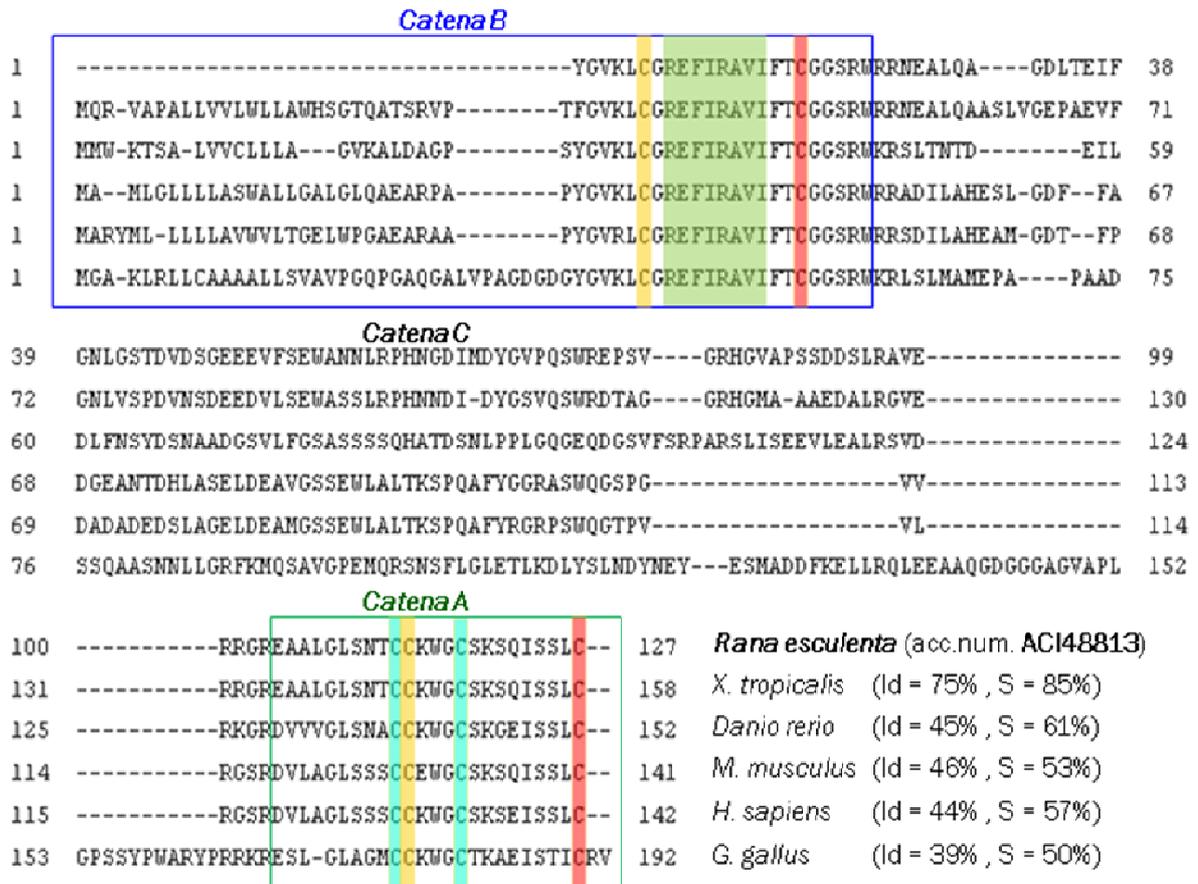


Fig. 11 - Allineamento tra la sequenza proteica di *fRLX3*, dedotta sulla base della sequenza nucleotidica del cDNA clonato, e le sequenze di altre Relaxine-3 presenti in banca dati genomica.

Il rettangolo in blu indica la catena B, mentre quello in verde indica la catena A. Si noti come gli amminoacidi essenziali per la struttura terziaria, evidenziati in figura, siano gli stessi anche in organismi filogeneticamente molto distanti come *Danio rerio* e *Homo sapiens*.

Esperimento di 3'RACE sul cDNA di *fRLX3*

Al fine di allungare il frammento del cDNA clonato di *fRLX3* si è deciso di effettuare un esperimento di 3'RACE.

Tale esperimento consiste in una RT-PCR utilizzando come oligo nella trascrittasi inversa un Adaptor Primer disegnato sulla coda poli Adenilica presente al 3' del trascritto eucariotico maturo.

E' stato ottenuto dal cDNA di cervello un amplificato di circa 600 cb che include il frammento già precedentemente clonato, gli otto amminoacidi terminali della catena A, e l'estremità 3'UTR dove è possibile identificare sia il segnale di terminazione che la coda di poli-A.

La regione C-terminale clonata, permette di ricostruire, sulla base dei dati presenti in bibliografia, la struttura tridimensionale della Relaxina-3. In particolare, sono conservate le sei Cisteine essenziali per la corretta formazione dei ponti di solfuro inter ed intracatena e la sequenza REFIRAVI che interagisce specificatamente nel sito catalitico del recettore RXFP3 (Fig.12).

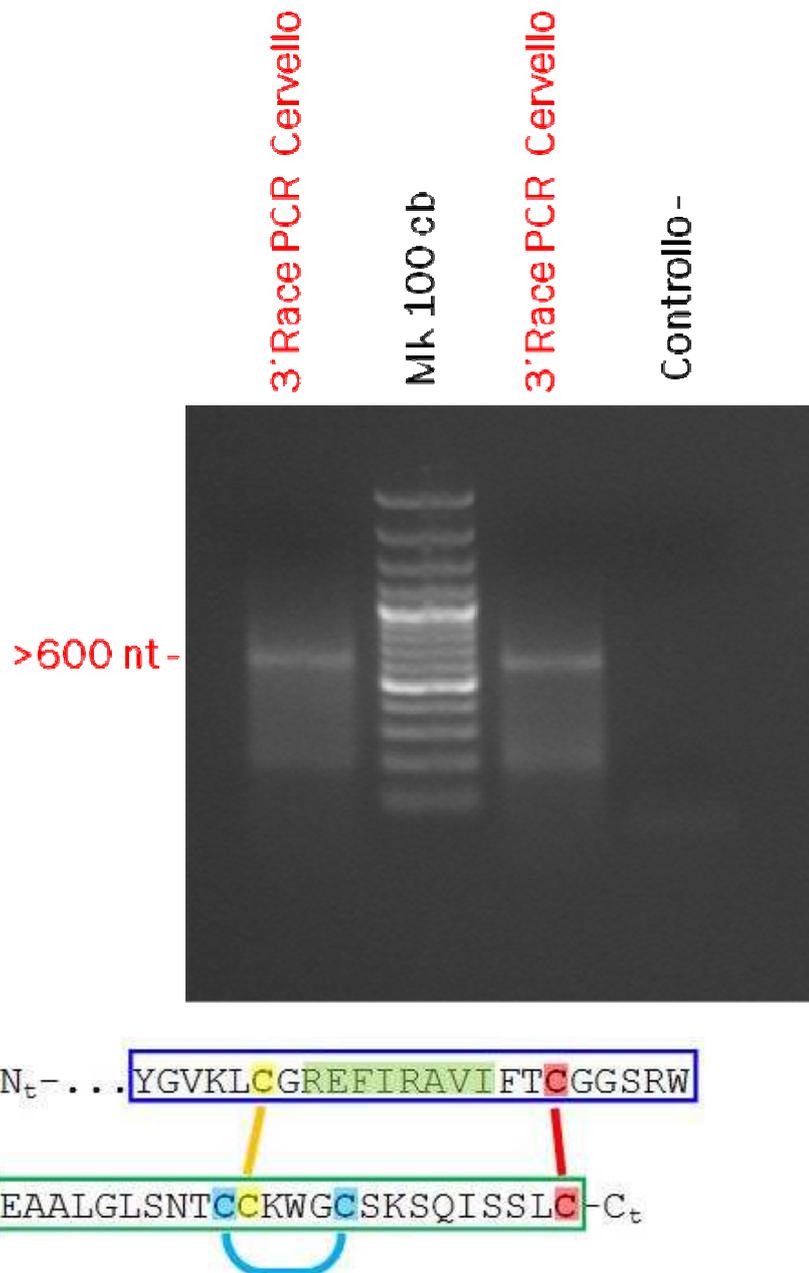


Fig.12 – Esperimento di 3’Race sul cDNA di cervello di rana utilizzando come oligo for fRLX3up1. Struttura tridimensionale di fRLX3

Clonaggio di *f*RXFP3

Allo scopo di identificare la sequenza specifica dell'mRNA per RXFP3 in *Rana esculenta*, sono stati disegnati degli oligonucleotidi degenerati sulla base delle sequenze di tale recettore di altri vertebrati presenti in banca dati. Utilizzando questi oligonucleotidi d'innescio è stata effettuata una reazione di RT-PCR su RNA totali estratti da testicolo e cervello, che ha permesso di ottenere un amplificato di 327 cb presente unicamente nel cDNA di cervello. Il cDNA eluito dal gel, è stato successivamente clonato e sequenziato: la traduzione della sequenza nucleotidica rivela la presenza di una cornice di lettura aperta che codifica per 104 aminoacidi (Fig.13A), e che non comprende né la tripletta d'inizio traduzione, né una delle triplette di terminazione. Questa, analizzata in banca dati, ha mostrato avere un'elevata omologia di sequenza con gli RXFP3 di altri vertebrati. In particolare, *f*RXFP3 presenta il 63% di omologia con *Danio rerio*, il 62% con *Homo sapiens*, il 61% con *Rattus norvegicus* e il 63% con *Mus musculus* (Fig. 13B).

A

Rana esculenta relaxin/insulin-like family peptide receptor 3 (fRXFP3) parziale

B

<i>R. esculenta</i>	YVTAMNMYASVFFLTAVSVARYYSVASALKSKRRPIG-----
<i>M. musculus</i>	MVTSMNMYASVFFLTAMSVARYHVASALKSHRTRGRGRGDCC
<i>R. norvegicus</i>	MVTSMNMYASVFFLTAMSVARYHVASALKSHRTRGHGRGDCC
<i>H. sapiens</i>	MVTSMNMYASVFFLTAMSVTRYHVASALKSHRTRGHGRGDCC
<i>D. rerio</i>	YVTATNMYASVFFLTAMSVARYCSVASALKSKRRRLR-----
	*****.**.**.***** :*
<i>R. esculenta</i>	-----CSAKWVSVLIWVSAIVASLPHAIFFSTTATVSSEV
<i>M. musculus</i>	GQSLRESCCFSAKVLCGLIWASAALASLPNAIFFSTTIRVLGEE
<i>R. Norvegicus</i>	GQSLGES--FSAKVLCGLIWASAAIASLPNVIFFSTTINVLGEE
<i>H. sapiens</i>	GRSLGDSCCFSAKALCVWIWALAALASLPNAIFFSTTVKVMGEE
<i>D. rerio</i>	-----FSAQWMTVIWIAAVGAALPNAIFFSTTATVSNEE
	** : ** * * : ** . ***** * . * *
<i>R. esculenta</i>	LCLVKEFVNHG--
<i>M. musculus</i>	LCLMHFPDKLLGW 63%
<i>R. norvegicus</i>	LCLMHFPDKLLGW 61%
<i>H. sapiens</i>	LCLVRF PDKLLGR 62%
<i>D. rerio</i>	LCLVKEFPDRSG-- 63%
	: : ** .

Fig. 13 - Allineamento tra la sequenza proteica di fRxfp3 e le sequenze di altri Rxfp3 presenti in banca dati genomica. * = residui amminoacidici identici; : = residui amminoacidici fortemente simili, . = residui amminoacidici debolmente simili.

Localizzazione intracerebrale di *fRXFP3* e *fRLX3*

Le analisi di RT-PCR su RNA totali estratti da differenti aree encefaliche di *Rana esculenta* hanno evidenziato che l'espressione del trascritto per *fRLX3* è minore nella regione telencefalica rispetto al mesencefalo ed al diencefalo (fig.15A), così come per la *RLX3* di altri vertebrati superiori. Non si nota, invece, una significativa variazione d'espressione del trascritto per il recettore *fRXFP3* nelle diverse aree (fig.15A).

In grafico (fig. 15B) sono riportati i valori di densitometria relativa degli amplificati, ottenuti dividendo il valore letto per *fRLX3* nei vari trattamenti, per quello del corrispettivo *fP1*.

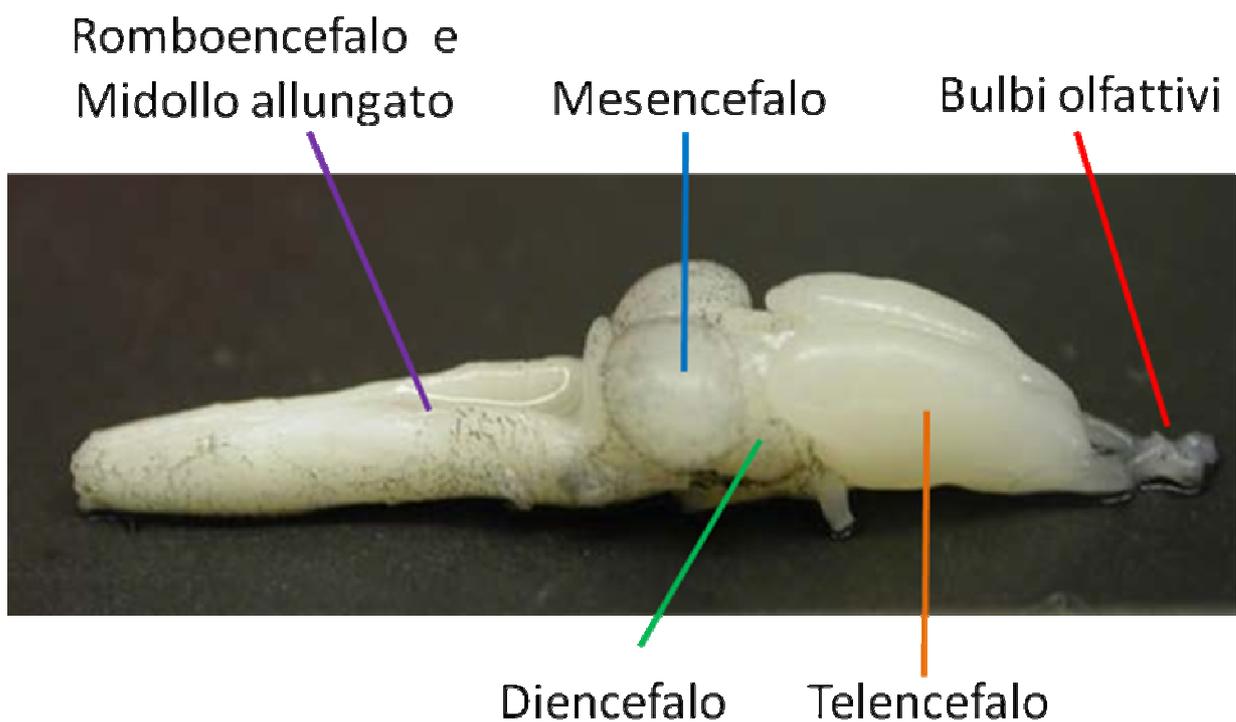
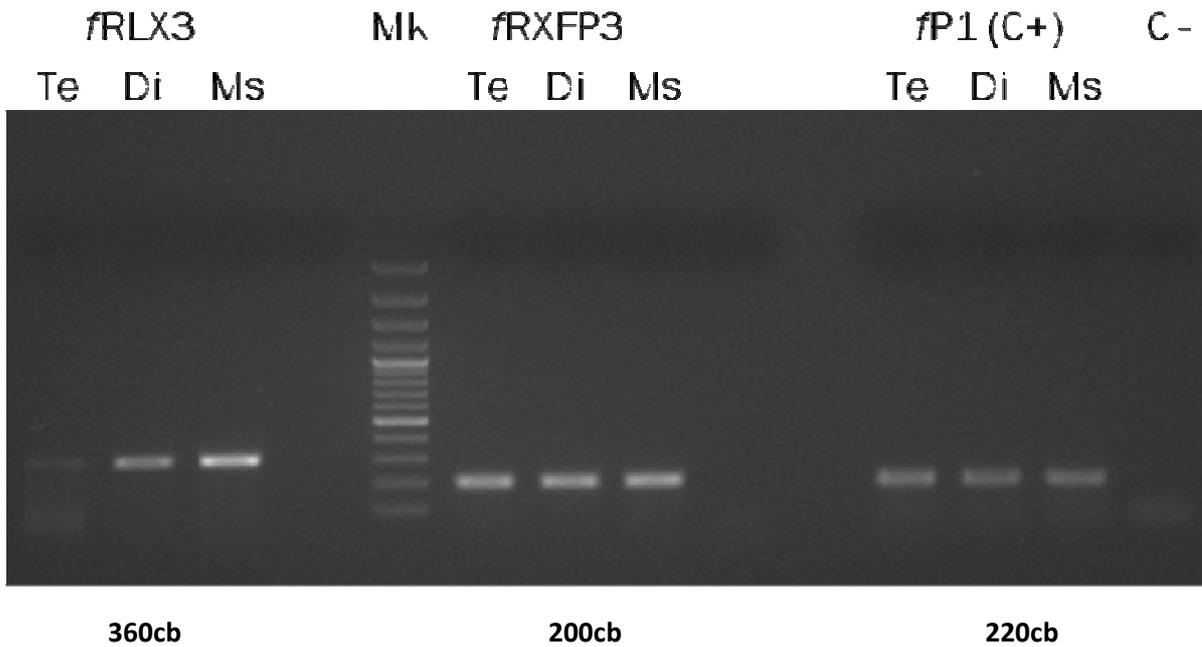


Fig.14- Cervello di *Rana esculenta*

A



B

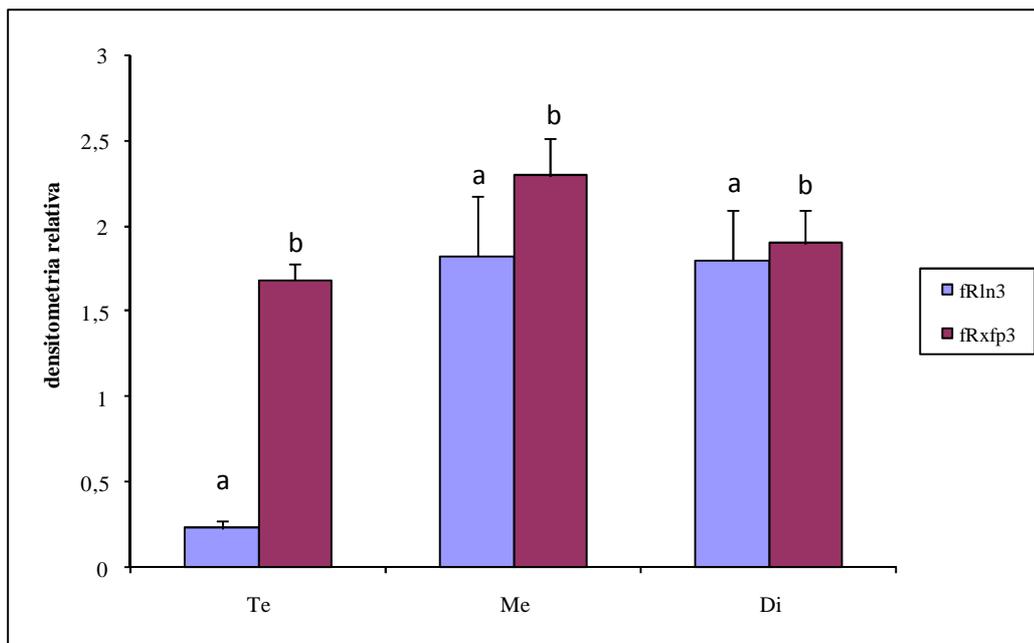


Fig. 15 - Espressione del trascritto di fRLX3 e di fRXFP3 in diverse aree cerebrali di Rana esculenta. Analisi elettroforetica dei prodotti di RT-PCR su RNA totali per il trascritto di fRLX3, fRXFP3 e fP1. C- = controllo della reazione; Mk = marker; Te = telencefalo; Di = diencefalo; Ms = mesencefalo. In B è riportata la rappresentazione grafica dei valori di densitometria del trascritto dei geni in esame normalizzati rispetto ai valori corrispondenti del trascritto di fP1.

DISCUSSIONE

Il ruolo che i peptidi relaxinici svolgono a livello testicolare non è ancora ben conosciuto. È noto che nei mammiferi INSL3 è coinvolto nella discesa dei testicoli nello scroto durante lo sviluppo embrionale. Questo è chiaramente dimostrato dal fatto che topi knock-out per il gene che codifica l'ormone sono affetti da criptorchidismo bilaterale (Zimmerman *et al.* 1999). Inoltre, nei mammiferi, INSL3 funge, mediante una regolazione di tipo paracrina, da soppressore dell'apoptosi rispetto alle cellule della linea germinale (Kawamura *et al.* 2004). Di recente è stato pubblicato un lavoro, riguardante INSL3 nell'uomo, dove si dimostra che l'espressione di tale gene non è da mettere in relazione ai fattori gonadici che normalmente regolano la spermatogenesi, ma che la presenza di tale peptide nell'interstizio testicolare è in funzione dello stato di salute delle cellule del Leydig che lo producono (Ravinder *et al.* 2006). Nel 2001, De Rienzo *et al.*, hanno clonato, per la prima volta in un vertebrato non mammifero, una forma di relaxina nel testicolo di *Rana esculenta*, *fRLX*, che può essere considerata ancestrale rispetto a RLX3 e ad INSL3 di mammifero: la sua sequenza, confrontata in banca dati con quelle già note, è risultata essere più simile a RLX3, mentre la sua espressione spaziale, massima nelle cellule del Leydig, rispecchia quella di INSL3 (De Rienzo *et al.* 2001). L'anfibio utilizzato come modello sperimentale per tale studio è un eterotermo e, in quanto tale, presenta testicoli interni. Pertanto, siccome la discesa testicolare è un fenomeno assente, è stato interessante cercare di capire quale funzione potesse svolgere *fRLX* a livello testicolare. Si è subito ritenuto che questa forma relaxinica potesse essere in qualche modo coinvolta nella spermatogenesi. Infatti, i suoi livelli di espressione variano durante il ciclo spermatogenetico annuale della rana, presentando un pattern ben sovrapponibile alle variazioni di concentrazione degli androgeni (De

Rienzo *et al.* 2001), direttamente implicati nella regolazione della spermatogenesi in quanto necessari per la proliferazione spermatogoniale e per la formazione degli spermatidi (Rastogi *et al.*, 1976; Minucci *et al.* 1992). Nei laboratori in cui ho svolto il mio lavoro di tesi sperimentale, sono stati condotti, in rana, esperimenti *in vivo* ed *in vitro* volti a valutare l'effetto del testosterone e del suo antagonista, il ciproterone acetato (CPA) sull'espressione di *fRLX* (De Rienzo *et al.* 2006) al fine di stabilire se alla base della sovrapposibilità dei pattern d'espressione di *fRLX* e degli androgeni vi fosse o meno un rapporto casuale. I risultati di tali esperimenti hanno dimostrato che il testosterone induce un significativo aumento dell'espressione del trascritto di *fRLX* nei testicoli di rana e che questo effetto è contrastato dal CPA. Tale dato permette di supporre l'esistenza di un meccanismo d'azione intratesticolare (autocrino/paracrino). Un risultato analogo lo si ottiene trattando *in vitro* i testicoli di *Rana esculenta* con buserellina (GnRHa), un agonista del GnRH, in grado di stimolare la produzione di testosterone (Minucci *et al.* 1996). Ancora, risulta interessante notare il fatto che, a 24 ore di incubazione, sia nei testicoli trattati che in quelli di controllo l'espressione del trascritto di *fRLX* diminuisce notevolmente rispetto a 2 ed 8 ore dallo stesso. Questo risultato induce ad ipotizzare che vi sia una dipendenza di *fRLX* dall'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, e trova conferma nel precedente articolo di De Rienzo *et al.* dove è dimostrato che rane ipofisectomizzate mostrano, a trenta giorni dall'intervento, una riduzione dell'espressione del trascritto di *fRLX* nell'interstizio testicolare. Studi che supportano tale ipotesi sono stati condotti anche nei mammiferi. E' stato dimostrato, infatti, che in topi ipogonadici che presentano una delezione del gene ipotalamico del GnRH con conseguente deficienza di gonadotropine e totale assenza di INSL3 a livello testicolare, il trattamento con hCG induce il ripristino della spermatogenesi e dell'espressione di INSL3 (Balvers *et al.* 1998). Un ulteriore conferma sulla connessione tra testosterone ed espressione

del trascritto di *fRLX* è stata ottenuta grazie ad analisi di RT-PCR ed ibridazioni *in situ* effettuate su testicoli di rana iniettati con CPA per 15 giorni, a giorni alterni (De Rienzo *et al.* 2006). Tale esperimento ha permesso di notare che il CPA è in grado di inibire l'azione del testosterone endogeno portando ad una riduzione dei livelli d'espressione di *fRLX*. Gli studi finora riportati hanno permesso di stabilire una connessione tra l'espressione di *fRLX* ed il testosterone, mentre il mio lavoro di tesi ha primariamente indagato sulla relazione tra *fRLX* ed il 17 β -estradiolo, ormone ugualmente importante nella spermatogenesi di *Rana esculenta* ed in grado di indurre le divisioni mitotiche degli spermatogoni nonché la prima divisione meiotica. In letteratura sono presenti studi che indagano sulla relazione tra estradiolo e peptidi insulina-simili; di recente, è stato infatti dimostrato che nei mammiferi, l'esposizione di femmine gravide ad estrogeni naturali o ad estrogeni sintetici, come il dietilstildestrolo (DES), può comportare lo sviluppo del criptorchidismo nell'embrione. Era stato precedentemente affermato che un'alterazione di INSL3 è direttamente implicata nella eziogenesi di questa patologia. Emmen *et al.*, infine, hanno messo in relazione questi due dati in uno studio in cui è stato dimostrato che la somministrazione di DES a femmine gravide provoca una forte diminuzione dell'espressione dell'mRNA per INSL3 proprio nel periodo di formazione del *gubernaculum* (Emmen *et al.* 2000). Probabilmente, quindi, l'esposizione agli estrogeni determina un'espressione del gene INSL3 non sufficiente a sostenere lo sviluppo del *gubernaculum* e quindi la discesa testicolare. In un articolo (Ravinder *et al.* 2006) è stata analizzata la correlazione tra INSL3 ed estradiolo nell'uomo. L'analisi di un campione numeroso di uomini ha portato alla conclusione che non esiste alcuna correlazione tra l'espressione di INSL3 e i parametri fisiologici analizzati (pressione sanguigna, contenuto di colesterolo), fatta eccezione per i livelli d'estradiolo, molecola, quest'ultima, in grado di modulare l'attività delle LC attraverso dei meccanismi non ancora del tutto

chiariti. Quindi, tornando al nostro modello sperimentale, per meglio chiarire il ruolo degli ormoni sessuali nella regolazione dell'espressione di *fRLX* a livello testicolare, sono stati realizzati esperimenti *in vivo* al fine di stabilire se il 17- β -estradiolo sia coinvolto o meno nella regolazione del trascritto in esame. In ottobre, quando la concentrazione plasmatica di estradiolo è bassa, maschi di *Rana esculenta* sono stati iniettati con l'ormone o con l'ormone e con il suo antagonista ICI 182780. I risultati ottenuti mostrano chiaramente che l'estrogeno è in grado di determinare una diminuzione dell'espressione del trascritto e che l'ICI contrasta questo effetto. Quindi è stato dimostrato che due ormoni direttamente implicati nella regolazione della spermatogenesi, il testosterone e l'estradiolo, hanno un effetto regolatore sull'espressione di *fRLX*. Tuttavia, prima di poter capire quale sia il ruolo di *fRLX* nella spermatogenesi bisogna assicurarsi che agisca direttamente a livello testicolare; per dimostrare ciò, è necessario individuare, sempre nello stesso tessuto, il recettore specifico della relaxina in esame. I quattro recettori per le relaxine costituiscono una famiglia specifica denominata RXFP, di cui RXFP1 ed RXFP2 sono caratterizzati da un dominio extracellulare contenente il gruppo LRR, mentre RXFP3 ed RXFP4 posseggono una coda ammino-terminale relativamente corta. Per quanto riguarda l'evoluzione di questi recettori, attualmente si ritiene che RXFP1 ed RXFP2, così come tutti i recettori appartenenti alla famiglia degli LGR, si siano evoluti a partire dagli invertebrati, ma che abbiano acquisito il ruolo di recettori per le relaxine solo successivamente nella scala evolutiva e precisamente nel gruppo dei mammiferi. Il sistema ancestrale recettore-ligando relaxinico, invece, è rappresentato probabilmente dall'interazione RXFP3 / RLX3 (Wilkinson *et al.* 2005). Sono state identificate nel genoma di *Takifugu rubripes* e di *Danio rerio* copie multiple sia di *RLX3* che di *RXFP3*. L'esistenza di questi ligandi e recettori multipli è dovuta probabilmente ad eventi di duplicazione genetica (Hsu *et al.* 2003;

Wilkinson *et al.* 2006) in un contesto di coevoluzione ligando-recettore. I mammiferi, invece, presentano una singola copia del gene *RLX3* e *RXFP3* (Wilkinson *et al.* 2005). Questa teoria della coevoluzione ligando-recettore è supportata da alcuni dati ricavati dall'analisi di *INSL5* e *RXFP4* nel cane e nel ratto: in questi modelli *INSL5* e *RXFP4* sono entrambi pseudogeni non funzionali non contenenti cornici di lettura aperte (Wilkinson *et al.* 2005). Tuttavia bisogna tener presente che quella relativa alla coevoluzione ligando-recettore non è una teoria sempre accettabile, basta infatti pensare al fatto che essendo le relaxine un gruppo di proteine strutturalmente simili all'insulina sarebbe logico attendersi che interagiscano con un recettore ad attività tirosin-chinasica (come il recettore dell'insulina) mentre invece si legano a recettori ad attività cAMP dipendente. Al fine di individuare il recettore specifico per *fRLX* sono state prese in considerazione le sequenze dei diversi recettori di vari vertebrati presenti i banca dati ed in base alle omologie di sequenza sono stati disegnati degli oligonucleotidi degenerati che amplificassero, mediante PCR, eventuali cDNA presenti in rana. Nella fattispecie, essendo *fRLX* dal punto di vista strutturale molto simile ad *RLX3*, si è proceduto, per la scelta degli oligonucleotidi da utilizzare, con un allineamento tra sequenze di *RXFP3* già presenti in banca dati. La coppia di oligonucleotidi così scelti ha fornito una banda netta della lunghezza attesa di circa 327 nucleotidi su cDNA di cervello, ma non si è ottenuto nessun amplificato dal cDNA di testicolo. Tale banda, una volta clonata e sequenziata, ha mostrato contenere una cornice di lettura aperta che codifica per una sequenza aminoacidica putativa di 88 residui. Tale sequenza mostra livelli d'identità del 63% con l'omologa sequenza aminoacidica in *Danio rerio*, del 62% con *Homo sapiens*, del 61% con *Rattus norvegicus* e del 63% con quella di *Mus musculus*. Risulta pertanto giustificato ipotizzare che il frammento clonato identifichi l'mRNA trascritto a partire dal gene ortologo di *RXFP3* di mammifero in *Rana esculenta*. Il fatto che il trascritto per

RXFP3 sia stato clonato da cervello anziché da testicolo non sorprende se si pensa che in altri organismi il ligando per tale recettore, RLX3 normalmente è espresso a livello cerebrale; ma fa capire che di sicuro non è la molecola interagente con *fRLX* dal momento che si osservano due tropismi differenti. A tal proposito di recente è stato pubblicato un articolo (Andrew *et al.*, 2009) nel quale è analizzata la distribuzione dei diversi recettori delle relaxine nei cervelli di ratto, topo e primati, identificandone la natura eccitatoria od inibitoria dei circuiti neuronali coinvolti; inoltre è stato ottenuto un ulteriore riscontro grazie alla specifica localizzazione dei rispettivi ligandi. Il mappaggio di RXFP3 ha permesso inoltre di capire la funzione della RLX3 tramite iniezioni di agonisti- recettori selettivi e lo studio di ceppi murini silenziati per RXFP3. Lo studio ha messo in evidenza che mentre RXFP1/2 sono espressi nei neuroni dei circuiti eccitatori, RXFP3 viene soprattutto associato a neuroni dei circuiti inibitori e che, mentre la localizzazione di RXFP1/2 varia tra ratto e topo, quella di RXFP3 si mantiene sostanzialmente immutata tra un organismo e l'altro. Sempre lo stesso studio si conclude analizzando gli effetti in topo di un arricchimento di RXFP1/2/3 a livello del lobo olfattivo, corticale, talamico e limbico. Nel dettaglio, un arricchimento di RXFP1 sembra essere associabile ad un mancato consolidamento della memoria, mentre l'arricchimento di RXFP3 sarebbe coinvolto in alterazioni metaboliche e nella perdita di memoria spaziale. Una volta clonato nel cervello di *Rana esculenta* il recettore RXFP3, abbiamo indagato sulla sua espressione tra le diverse aree cerebrali effettuando una RT-PCR sulle diverse aree del cervello dell'anfibio utilizzato come modello sperimentale. Nel dettaglio, il tessuto d'interesse è stato sezionato nelle sue componenti fondamentali quali la regione mesencefalica, quella telencefalica ed infine la diencefalica. Il risultato di quest'esperimento, confermando i dati già presenti in letteratura, ha mostrato che il trascritto per RXFP3 presenta gli stessi livelli di espressione in tutte le regioni analizzate. I risultati finora

ottenuti, relativi ad RXFP3, hanno portato al clonaggio, sempre partendo da cDNA di cervello in toto, dello specifico ligando ovvero di *fRLX3*. Anche per l'identificazione della sequenza specifica dell'mRNA per *fRLX3* in *Rana esculenta* sono stati disegnati degli oligonucleotidi degenerati basandosi sulle sequenze note di tale ormone in altri vertebrati. Utilizzando questi primers d'innesco è stata effettuata una reazione di RT-PCR che ha permesso di ottenere un amplificato di 362 nt. Il cDNA eluito da gel, è stato successivamente clonato e sequenziato: la traduzione della sequenza nucleotidica rivela la presenza di una cornice di lettura aperta che codifica per 119 residui aminoacidici. Tale sequenza aminoacidica ha un'identità del 75% con *Xenopus tropicalis*, del 65% con *Danio rerio*, del 46% con *Rattus norvegicus* e del 44% con *Homo sapiens*. Quindi, svincolati oramai dall'iniziale intento della ricerca, è stata individuata una seconda relaxina in *Rana esculenta*. Il profilo di espressione di *fRLX3* conferma tutti i dati presenti in letteratura, secondo i quali tale peptide agisce probabilmente da neurotrasmettitore. Proprio a tal proposito, è stato pubblicato un articolo (Ma S *et al.* 2009) nel quale si cerca di localizzare RLX3 nel cervello di *Macaca fascicularis*. L'individuazione, effettuata tramite ibridazioni *in situ* dei trascritti d'interesse a livello dell'estremità assonali, anziché dei soma neuronali, ha portato alla conclusione che il peptide, usato come neurotrasmettitore, va a localizzarsi alle estremità cellulari in attesa di essere incluso in apposite vescicole sinaptiche. Anche per *fRLX3*, come per RXFP3, è stato effettuato un esperimento di RT-PCR sulle diverse aree cerebrali sopra menzionate, che ha evidenziato una minore espressione del trascritto in esame a livello del Telencefalo. Questa discrepanza limitatamente alla regione del Telencefalo, tra recettore e ligando ha portato alla conclusione che RXFP3 possa agire con dei ligandi, oggetti di studi futuri, non ancora individuati. In conclusione, nei seguenti punti, sono schematizzati i dati messi in risalto dal mio lavoro di tesi:

1. L'ormone estradiolo regola negativamente l'espressione di *fRLX* e tale effetto è contrastato dal suo antagonista ovvero dall' ICI.
2. E' presente "nel cervello" di *Rana esculenta* un mRNA del quale una regione di 327cb è omologa alla sequenza codificante, in altri organismi, per RXFP3. Il differente profilo di espressione rispetto a *fRLX* fa capire che non può trattarsi del recettore inizialmente ricercato.
3. La consapevolezza di quanto detto nel precedente punto ha permesso di clonare, sempre nel cervello di *Rana esculenta*, un mRNA del quale una regione di 602cb è omologa alla sequenza codificante, in altri organismi, per la Relaxina-3.

BIBLIOGRAFIA

Adham I et al., (1993)

Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells.

J Biol Chem. 1993 Dec 15;268(35):26668-72.

Andrew L and Sherie M, (2009)

Relaxin family peptides and their receptors in mammalian brain

Annals of the New York Academy of science pp 226-235

Ascoli L et al., (2002)

Journal of Urology 167, 2534-2537.

Bagnell et al., (1993)

Developmental expression of the relaxin gene in the porcine corpus luteum.

J Mol Endocrinol. Feb;10(1):87-97.

Balvers M et al., (1998)

Relaxin-like factor expression as a marker of differentiation in the mouse testis and ovary.

Endocrinology. 139(6):2960-70.

Bani D et al., (1997)

Relaxin counteracts asthma-like reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pigs.

Endocrinology. May;138(5):1909-15.

Bathgate R, et al., (1999)

Expression and regulation of relaxin-like factor gene transcripts in the bovine ovary: differentiation-dependent expression in theca cell cultures.

Biol Reprod. 61(4):1090-8.

Bathgate R and Hsueh A, (2006)

Physiology and molecular biology of the relaxin peptide family.

In J.D. Neill(Ed), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (pp 679-768). Elsevier

Bigazzi M et al., (1992)

Relaxin influences the growth of MCF-7 breast cancer cells. Mitogenic and antimitogenic action depends on peptide concentration.

Cancer. 1992 Aug 1;70(3):639-43.

Boels K and Schaller HC, (2003)

Identification and characterisation of GPR100 as a novel human G-protein-coupled bradykinin receptor.

British Journal of Pharmacology 140, 932-938.

Brackett KH et al., (1997)

Relaxin: an ovarian hormone in an avian species (*Gallus domesticus*).

Gen Comp Endocrinol. 105: 155-63.

Braddon SA, (1978)

Relaxin-dependent adenosine 60.50-monophosphate concentration changes in the mouse pubic symphysis.

Endocrinology. 102: 1292–1299.

Büllesbach E et al., (1986)

Isolation, purification, and the sequence of relaxin from spiny dogfish (*Squalus acanthias*).

Eur J Biochem. 161: 335-41

Bullesbach E and Schwabe C, (2005)

The relaxin receptor-binding site geometry suggests a novel gripping mode of interaction.

J Biol Chem. 275(45):35276-80.

Burazin T, et al., (2002)

Restricted, but abundant, expression of the novel rat gene-3 (R3) relaxin in the dorsal tegmental region of brain.

J Neurochem 82:1553-1557

Burger L and Sherwood O, (1995)

Evidence that cellular proliferation contributes to relaxin-induced growth of both the vagina and the cervix in the pregnant rat.

Endocrinology Nov;136(11):4820-6.

Burkhardt E et al., (1994)

Structural organization of the porcine and human genes coding for a Leydig cell-specific insulin-like peptide (LEY I-L) and chromosomal localization of the human gene (*INSL3*).

Genomics. Mar 1;20(1):13-9.

Cheah SH and Sherwood OD, (1980)

Target tissues for relaxin in the rat: tissue distribution of injected 125I-labeled relaxin and tissue changes in adenosine 30,50-monophosphate levels after in vitro relaxin incubation.

Endocrinology. 106: 1203–1209.

De Rienzo G, Aniello F, Branno M, Izzo G, Minucci S, (2006)

The expression level of *fRLX*, in *Rana esculenta*, is influenced by testosterone.

Journal of experimental biology

De Rienzo G, Aniello F, Branno M, Minucci S, (2001).

Isolation and characterization of a novel member of the relaxin/insulin family from the testis of the frog *Rana esculenta*.

Endocrinology 142, 3231-3238.

Emmen JM *et al.*, (2000)

Involvement of insulin- like factor 3 (INSL3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism.
Endocrinology. 141:846–849.

Evans B and Tregear GW, (1994)

Characterization of two relaxin genes in the chimpanzee
Journal of endocrinology 140, 385-392

Evans B *et al.*, (1993)

The mouse relaxin gene: nucleotide sequence and expression
Journal of Molecular Endocrinology 10, 15-23.

Feinberg AP, Volgestein B, (1984)

A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal Biochem. 137:266-267.

Gavino ES and Furst DE, (2001)

Recombinant relaxin: a review of pharmacology and potential therapeutic use.
Bio Drugs 15, 609-614.

Georges D *et al.*, (1990)

Relaxin-like peptide in ascidians. II. Bioassay and immunolocalization with anti-porcine relaxin in three species.
Gen Comp Endocrinol. Sep;79(3):429-38.

Goto M *et al.*, (2002)

Connections of the nucleus incertus.
J Comp Neurol 438:86-122.

Graham EF and Dracy AE, (1953)

The effect of relaxin-mechanical dilatation

Gunnerson JM *et al.*, (1996)

Expression of human relaxin genes: characterization of a novel alternatively-spliced human relaxin mRNA species.

Mol Cell Endocrinol. 1996 Apr 19;118(1-2):85-94.

Halls ML *et al.*, (2006)

Relaxin family peptide receptors--former orphans reunite with their parent ligands to activate multiple signalling pathways.

Br J Pharmacol. 150(6):677-91. Review

Halls ML *et al.*, (2007)

Relaxin family peptide receptors--former orphans reunite with their parent ligands to activate multiple signalling pathways.

Br J Pharmacol. 150(6):677-91. Review

Hisaw FL (1926)

Experimental relaxation of the pubic ligament of the guinea pig.

Proc.Soc. Exp. Biol. Med. 23: 661-666

Hansell DJ *et al.*, (1991)

Expression of the human relaxin H1 gene in the decidua, trophoblast, and prostate.

J Clin Endocrinol Metab. 1991 Apr;72(4):899-904.

Hsu SY, (2000)

New insights into the evolution of the relaxin-LGR signaling system.

Trends Endocrinol Metab. 14(7):303-9.

Hsu SY, (2003)

New insights into the evolution of the relaxin-LGR signaling system.
Trends Endocrinol Metab. 14(7):303-9.

Hsu SY et al., (2002)

Activation of orphan receptors by the hormone relaxin.
Science 295, 671-674

Hudson P., John, M., Crawford, R., Scanlon, D.,

Gorman EMBO journal 3, 2333-2339.
Journal of molecular Evolution 48, 565-576.

Hurley et al., (1991)

Effect of relaxin on mammary development in ovariectomized pregnant gilts.
Endocrinology. Mar;128(3):1285-90.

Ivell R and Einspainer A, (2002)

Relaxin peptides are new global players.
Trends Endocrinology Metab Vol.13 No.8 October,343-347.

Ivell R and Bathgate R, (2002)

Reproductive biology of the relaxin-like factor (RLF/INSL3).
Biology of Reproduction 67, 699-705.

Ivell R and Hartung S, (2003)

The molecular basis of cryptorchidism.
Molecular Human Reproduction 9, 175-181.

Kakouris H *et al.*, (1993)

Relaxin: more than just a hormone of pregnancy.

Trends Pharmacol Sci. Jun;14(6):231-2.

Kawamura K. *et al.*, (2004)

Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 101, 7323-7328.

Kohsaka T *et al.*, (1992)

Evidence for immunoreactive relaxin in boar seminal vesicles using combined light and electron microscope immunocytochemistry.

J Reprod Fertil. Jul;95(2):397-408.

Krantz JC *et al.*, (1950)

The action of the aqueous corpus luteum extract upon uterine activity.

Surg Gynecol Obstet. 1950 Mar;90(3):372-5

Kuenzi MJ and Sherwood OD, (1992)

Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. VII. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy prevents development of normal mammary nipple morphology and function in rats.

Endocrinology. Oct;131(4):1841-7.

Kumagai J *et al.*, (2002)

INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent.

J Biol Chem. 277: 31283–31286.

Li EZ *et al.*, (2007)

17beta-estradiol stimulates proliferation of spermatogonia in experimental cryptorchid mice

Asian J Androl. 2007 Sep;9(5):659-67

Liu C et al., (2005)

Relaxin-3/insulin-like peptide 5 chimeric peptide, a selective ligand for G protein-coupled receptor (GPCR)135 and GPCR142 over leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 7.

Mol Pharmacol. 67(1):231-40

Liu C et al., (2003).

Identification of relaxin-3/INSL7 as an endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPCR135.

J Biol Chem 278:50754-50764

Liu C et al., (2005)

Journal of Biological Chemistry 280, 292-300

Lu C et al., (2006)

Insulin-like peptide 6: characterization of secretory status and posttranslational modifications. Endocrinology. Dec;147(12):5611-23.

Ma S and Gundlach A, (2009)

Localizzazione di Relaxin-3 in cervello di *Macaca fascicularis*: identificazione di un nucleo incertus in primate

Journal of comparative neurology pp 856-872

Ma S et al., (2005)

Relaxin receptor activation in the basolateral amygdala impairs memory consolidation.

European Journal of Neuroscience 22, 2117-2122.

Matsumoto M et al., (2000)

The novel G-protein coupled receptor SALPR shares sequence similarity with somatostatin and angiotensin receptors.

Gene 248, 183-189

McGowan B et al., (2005)

Central Relaxin-3 Administration Causes Hyperphagia in Male Wistar Rats.

Endocrinology 146:3295-3300

Min G et al., (1997)

Evidence that endogenous relaxin promotes growth of the vagina and uterus during pregnancy in gilts.

Endocrinology. 1997 Feb;138(2):560-5.

Minucci S, Di Matteo L, Fasano S, Chieffi Baccari G, Pierantoni R, (1992)

Intratesticular control of spermatogenesis in the frog *Rana esculenta*.

J Exp Zool 261: 113-118.

Minucci S, Di Matteo L, Pierantoni R, Varriale B, Rastogi RK, Chieffi G, (1996)

In vivo and *in vitro* stimulatory effect of a gonadotropin-releasing hormone analog (MOE766) on spermatogonial multiplication in the frog *Rana esculenta* L..

Endocrinology 119: 731-736.

Nef S and Parada, LF, (1999)

Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*.

Nat. Genet. 22, 295-299.

Nistri S et al., (2003)

Relaxin inhibits lipopolysaccharide-induced adhesion of neutrophils to coronary endothelial cells by a nitric oxide-mediated mechanism.

FASEB J. 2003 Nov;17(14):2109-11.

Ohleth et al., (1998)

Relaxin protein and gene expression in ovarian follicles of immature pigs.

J Mol Endocrinol. Oct;21(2):179-87.

Olinski et al., (2006)

Three insulin-relaxin-like genes in *Ciona intestinalis*.
Peptides. Nov; 27(11):2535-46.

Pusch, W et al., (1996)

Molecular cloning and expression of the relaxin-like factor from the mouse testis.
Endocrinology. Jul;137(7):3009-13.

Rastogi RK et al., (1976)

The control of spermatogenesis in the green frog *Rana esculenta*.
J Exp Zool. 196(2):151-165

Ravinder AI and Ivell R, (2006)

Peripheral INSL3 concentration decline with age in a large population of Australian men.
International Journal of andrology pp 618-626

Ravinder et al., (2006)

Insulin-like peptide 6: characterization of secretory status and posttranslational modifications.
Endocrinology. 147(12):5611-23.

Sambrook J et al., (1989)

Molecular cloning. A Laboratory Manual (second edition).
Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.

Samuel CS et al., (2003)

Relaxin deficiency in mice is associated with an age-related progression of pulmonary fibrosis.
FASEB J. 2003 Jan;17(1):121-3.

Schwabe C *et al.*, (1983)

Relaxin extracted from protozoa (*Tetrahymena pyriformis*). Molecular and immunologic properties.

J Biol Chem. Mar 10;258(5):2778-81.

Schwabe C *et al.*, (1989)

Cetacean relaxin. Isolation and sequence of relaxins from *Balaenoptera acutorostrata* and *Balaenoptera edeni*.

J Biol Chem. 1989 Jan 15;264(2):940-3

Sherwood OD, (1994)

“Relaxin”. In: Knobil E, Neil J D, eds.

The physiology of reproduction. New York: Raven press; 861-1009.

Sherwood OD, (2004)

Relaxin’s physiology roles and other diverse actions.

Endcr Rev 25:205-234.

Silvertown JD *et al.*, (2006)

Functional expression of mouse relaxin and mouse relaxin-3 in the lung from an Ebola virus glycoprotein pseudotyped lentivirus via tracheal delivery.

Endocrinology 147, 3797 – 3808.

Steinetz BG *et al.*, (1998)

Dogfish shark (*Squalus acanthias*) testes contain a relaxin.

J Androl. 19:110-5.

Tanaka M *et al.*, (2005)

Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress.

Eur J Neurosci 21:1659-1670.

Tashima LS *et al.*, (1995)

The human Leydig insulin-like (hLEY I-L) gene is expressed in the corpus luteum and trophoblast.

J Clin Endocrinol Metab. 80(2):707-10.

Wilkinson TN *et al.*, (2005)

Coevolution the relaxin-like peptides and their receptors.

Ann NY Acad Sci. 1041: 534–539.

Wilkinson TN *et al.*, (2005)

Evolution of the relaxin-like peptide family: from neuropeptide to reproduction.

Ann N Y Acad Sci. 1041:530-3.

Winslow *et al.* (1992)

Human seminal relaxin is a product of the same gene as human luteal relaxin.

Endocrinology 130, 2660-2668.

Zhang J *et al.*, (2005)

Effect of relaxin on myocardial ischemia injury induced by isoproterenol.

Peptides 26, 1632 – 1639.

Zhao and Sherwood O, (1995)

Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. X. Endogenous relaxin induces changes in the histological characteristics of the rat vagina during the second half of pregnancy.

Endocrinology. Nov;139(11):4726-34.

Zimmermann S *et al.*, (1999)

Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism.

Mol Endocrinol. 13, 681-691.