



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOLOGICHE

INDIRIZZO FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA

CICLO XXVII

**Il sistema adrenomedullinico nel timo: un possibile
nuovo target farmacologico nell'autoimmunità.**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Palatini

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Sara De Martin

Dottoranda: Giovanna Paliuri

1. ABSTRACT	6
2. RIASSUNTO	8
3. INTRODUZIONE	10
3.1. Il timo	10
3.1.1. Anatomia	10
3.1.2. Anatomia microscopica	12
3.1.3. Involuzione timica	14
3.2. I linfociti T	14
3.2.1. Gli aspetti generali della differenziazione T linfocitaria	15
3.2.2. La maturazione dei linfociti T nel timo	15
3.3. Il cross-talk tra TEC e timociti	17
3.3.1. Il microambiente timico	17
3.3.2. Le citochine	19
3.4. L'adrenomedullina	21
3.4.1. Struttura e sintesi	21
3.4.2. Regolazione dell'espressione genica	22
3.4.3. Il recettore	23
3.4.4. L'attività biologica	24
3.4.5. L'adrenomedullina e il sistema immunitario	25
3.5. NF-kB	27
3.5.1. Struttura e attivazione	27
3.5.2. Ruolo di NF-kB nel timo	28
3.6. Il sistema dopaminergico	30
3.6.1. Struttura e sintesi della dopamina	30
3.6.2. Importanza della dopamina nei processi fisiopatologici	31
3.6.3. Meccanismi molecolari alla base della trasmissione dopaminergica	31
3.6.4. DAT (DA transporter)	32
3.6.5. COMT (Catecol-o-Metiltransferasi)	35
3.7. Sistema immunitario ed adrenomedullina nei disturbi psichiatrici	36
4. SCOPO	38
5. MATERIALI E METODI	39

5.1. Colture primarie	39
5.1.1. Terreni di coltura	39
5.1.2. Allestimento delle colture cellulari	40
5.2. Modelli animali	40
5.3. SDS-PAGE (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)	41
5.3.1. Soluzioni	41
5.3.2. Preparazione dei lisati proteici	42
5.3.3. Quantificazione delle proteine mediante saggio dell'acido bicinconinico	43
5.3.4. Valutazione dell'espressione proteica mediante Western blot	44
5.4. Immunofluorescenza accoppiata a microscopia confocale	46
5.4.1. Microscopio confocale	46
5.4.2. Immunofluorescenza condotta sulle cellule TEC	47
5.5. Immunogold	48
5.5.1. Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)	48
5.5.2. Preparazione del campione ed immunogold	49
5.6. Test del ciclico AMP (cAMP)	49
5.7. Dosaggio del rilascio di IL-6 mediante ELISA test	50
5.7.1. Dosaggio IL-6 nelle TEC	51
5.8. Valutazione dell'espressione genica mediante Real Time PCR	51
5.8.1. Quantificazione relativa	53
5.9. Analisi statistica	54
6. RISULTATI	55
6.1. Espressione e localizzazione del sistema adrenomedullinico nel timo umano neonatale	55
6.1.1. L'adrenomedullina e le sue proteine recettoriali RAMP2 e CRLR nelle cellule timiche epiteliali	55
6.1.2. L'adrenomedullina e le sue proteine recettoriali RAMP2 e CRLR nei timociti	59
6.1.3. Misura della produzione di AMP ciclico (cAMP) da parte di TEC e timociti	60
6.2. Effetto dell'adrenomedullina sul rilascio di IL-6 da parte delle TEC	61
6.3. Meccanismo d'azione dell'adrenomedullina: effetto del peptide sull'espressione della proteina p65 nelle TEC	62

6.4. Espressione del sistema adrenomedullinico nel timo dei topi eterozigoti per COMT e DAT	64
6.4.1. Espressione genica di ADM, RAMP2 e CRLR	64
6.4.2. Espressione genica di IL-6	65
6.4.3. Espressione proteica di IKB α	66
7. DISCUSSIONE	68
8. BIBLIOGRAFIA	75

1. Abstract

Background and aims: Adrenomedullin (ADM) is a peptide which exerts multiple biological effects by interacting with a functional receptor formed by the combination of the *calcitonin receptor-like receptor* (CRLR), a 7-transmembrane G protein-coupled receptor, with the *receptor activity-modifying protein 2* (RAMP2), which dictates its ligand binding specificity. The thymus is a primary lymphoid organ which provides a variety of specialized microenvironments that support the production of self-tolerant T cells starting from immature precursors. Developing thymocytes and thymic epithelial cells (TECs) establish a mutual “*cross talk*” that is necessary for the functional maturation of both types of cells. Given the growing appreciation of the importance of ADM in the immune system function, we investigated for the first time the expression and localization of ADM, CRLR and RAMP2 in primary cultures of TECs and thymocytes. Furthermore, we analyzed the ADM function in human thymus and the adrenomedullin system in a mouse model of psychiatric diseases, since psychosis has been associated with alteration of the immune function.

Methods: Primary cultures of TECs and thymocytes were obtained from thymi of newborns with cardiac malformations. Expression and localization studies were performed by means of western blot analysis, immunofluorescence coupled to confocal microscopy and immunogold staining coupled to electron microscopy. The secretion of IL-6 from TECs undergoing pro-inflammatory stimuli was analyzed by means of an ELISA kit. Gene expressions of ADM, CRLR, RAMP2, IL-6 and p65 of a mouse model of psychiatric diseases (mice heterozygous for COMT and/or DAT) were analyzed by real-time PCR.

Results and conclusions: We have for the first time demonstrated that both ADM and its receptor proteins CRLR and RAMP2 are expressed in newborn human thymus, notably in the nucleus of thymic epithelial cells. This localization was confirmed by western-blot analysis performed on cell fractions and by the lack of cAMP production in response to ADM exposure. AM, RAMP2 and CRLR could also be detected in thymocytes by means of double immunofluorescence coupled to confocal microscopy, although these proteins were not present in the whole thymocyte population. We demonstrated that ADM significantly reduces the

release of IL-6 by TECs, by interacting with the NF- κ B canonical pathway, since we observed an ADM-mediated reduction of p65 expression.

In the mouse model of psychiatric diseases, we observed that the expression of the adrenomedullin system and the NF- κ B-mediated production of IL-6 are differently modulated by the gender of mice: a significant increase in the gene expression of the adrenomedullin system, a decrease of NF- κ B activation and IL6 production was observed in males heterozygous for DAT and COMT, whereas in females the expression of the adrenomedullin system decreased and activation of NF- κ B and IL-6 production increased.

In conclusion, we demonstrated that the ADM system is expressed in thymus, where it plays a role in the regulation of cytokine secretion by interacting with the canonical NF- κ B pathway. This finding may open new avenues in the therapeutic management of autoimmune diseases and give new insight into the mechanism(s) by which the immune system may play a role in the onset of psychiatric diseases.

2. Riassunto

Introduzione e scopo: L'adrenomedullina (ADM) è un peptide che esercita molteplici effetti biologici interagendo con un recettore funzionale formato dalla combinazione del CRLR (*calcitonin receptor-like receptor*), un recettore accoppiato a proteine G con 7 domini transmembrana, con RAMP2 (*receptor activity-modifying protein 2*), porzione che conferisce al recettore la specificità di legame per ADM. Il timo è un organo linfoide primario che costituisce il microambiente specializzato nella produzione di cellule T tolleranti verso il *self* a partire da precursori immaturi. I timociti e le cellule epiteliali timiche (TEC) stabiliscono una comunicazione reciproca, definita *cross-talk*, necessaria per la maturazione funzionale di entrambi i tipi di cellule.

In questo lavoro sono state valutate per la prima volta l'espressione e la localizzazione di ADM, CRLR e RAMP2 in colture primarie di TEC e timociti. Inoltre, abbiamo analizzato la funzione di ADM nel timo umano e valutato espressione e funzione del sistema adrenomedullinico in un modello murino di malattie psichiatriche, che sono state spesso correlate ad alterazioni della funzione immunitaria.

Metodi: Colture primarie di TEC e timociti sono stati ottenuti da timi di neonati con malformazioni cardiache congenite. Gli studi di espressione e localizzazione sono state eseguiti mediante analisi western blot, immunofluorescenza accoppiata alla microscopia confocale ed immunogold accoppiato a microscopia elettronica. Il rilascio di IL-6 da parte delle TEC è stata analizzato mediante ELISA. L'espressione genica di ADM, CRLR, RAMP2, IL-6 e p65 in un modello murino di malattia psichiatrica (topi eterozigoti per COMT e/o DAT) è stata analizzata mediante real-time PCR.

Risultati e conclusioni: In questo lavoro è stato dimostrato per la prima volta che sia l'ADM che le sue proteine recettoriali CRLR e RAMP2 sono espresse nel timo umano neonatale, in particolare nel nucleo delle TEC. Questa peculiare localizzazione è stata confermata mediante western-blot eseguito su frazioni cellulari e anche dalla mancanza di produzione di cAMP in risposta all'ADM. Le proteine del sistema adrenomedullinico sono state rilevate anche in alcuni timociti mediante doppia fluorescenza accoppiata a microscopia confocale. Abbiamo dimostrato che ADM riduce significativamente il rilascio di IL-6 operato dalle TEC,

interagendo con la via canonica di NF-kB. È stato infatti osservato che ADM induce una riduzione dell'espressione della proteina p65, una delle subunità di NF-kB che trasloca nel nucleo in seguito all'attivazione della via canonica.

Nel modello murino di malattia psichiatrica, è stato osservato che l'espressione del sistema adrenomedullinico e la produzione di IL-6 mediata da NF-kB sono influenzate dal genere dei topi. Infatti, è stato osservato un significativo aumento dell'espressione genica del sistema adrenomedullinico, con conseguente diminuzione di IL-6 e dell'attivazione di NF-kB nei maschi eterozigoti per DAT e COMT, mentre nelle femmine degli stessi genotipi diminuisce l'espressione del sistema adrenomedullinico e aumenta l'attivazione di NF-kB e la produzione di IL-6.

In conclusione, abbiamo dimostrato che il sistema adrenomedullinico è espresso nel timo, dove svolge un ruolo nella regolazione della secrezione di citochine interagendo con la via canonica di NF-kB. Questa scoperta potrebbe aprire nuove strade nella terapia di patologie autoimmuni e dare nuova luce sul meccanismo mediante il quale il sistema immunitario gioca un ruolo nell'insorgenza di malattie psichiatriche.

3. Introduzione

3.1. Il timo

Il timo (*Fig. 1*) è un organo linfatico primario dalla struttura bilobata, localizzato nel mediastino anteriore, sopra al miocardio, tra lo sterno ed i grossi vasi che emergono dal cuore.

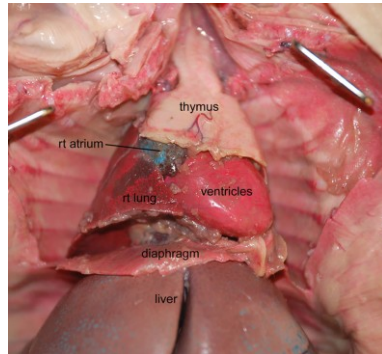


Figura 1: timo

Il timo provvede alla maturazione dei linfociti T, cellule responsabili della risposta immunitaria cellulo-mediata nell'immunità acquisita, che maturano la capacità di riconoscere e attaccare gli agenti patogeni esterni (*not-self*), attraverso processi di differenziazione, selezione e proliferazione. I progenitori dei linfociti T originano nel midollo osseo e successivamente raggiungono il timo, dove ha luogo il loro sviluppo dallo stadio di timociti sino a linfociti T maturi. Una volta giunti a maturazione, i linfociti lasciano il timo e migrano verso gli organi linfatici periferici (linfonodi, milza, tonsille) per svolgere la loro azione difensiva.

3.1.1. Anatomia

Il timo è un organo bilobato riccamente vascolarizzato dalle arterie timiche, che originano dall'arteria toracica interna; ogni lobo è avvolto da una capsula connettivale, le cui invaginazioni formano la caratteristica suddivisione in lobuli (spessi circa 1 mm) in cui confluiscono arterie, vene e nervi.

Al loro interno si distingue una zona periferica scura ad alta densità cellulare, denominata corticale, e una interna più chiara, chiamata midollare (*Fig.2 e 3*).

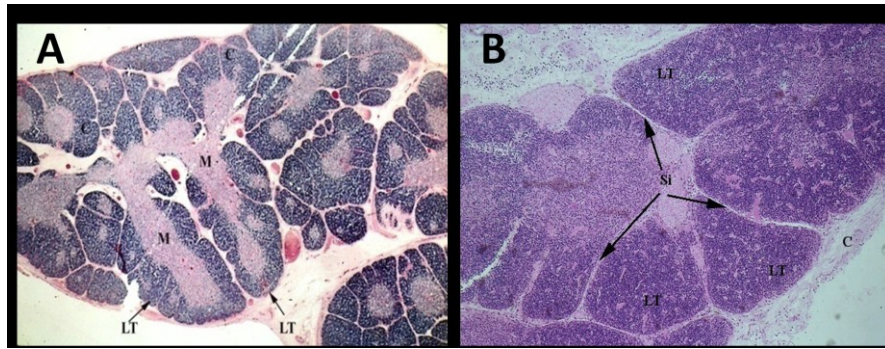


Figura 2: Sezione trasversale di un timo umano neonatale colorato con il metodo ematossilina-eosina. **A)** Architettura del parenchima: in viola scuro la corticale (C) e la midollare in rosa (M); **B)** Lobuli timici (LT) suddivisi dai setti connettivali interlobulari (Si), derivati da invaginazioni della capsula connettivale (C) che li circondano (Wick, Mills 2002).

La corticale presenta un'alta densità di linfociti T immaturi, mentre quelli maturi si raggruppano nella midollare, dove la popolazione cellulare è nettamente inferiore (Gameiro, Nagib et al. 2010). Dai setti connettivali che delimitano i lobuli si diramano filamenti sempre più sottili che si addentrano per brevi tratti nella corticale, suddividendola in piccole aree poligonali, chiamate lobulini. Dissociando il tessuto connettivo interposto tra i lobuli, ciascun lobo timico appare formato da un lungo cordone di sostanza midollare, detto cordone timico centrale, dal quale sporgono i lobuli.

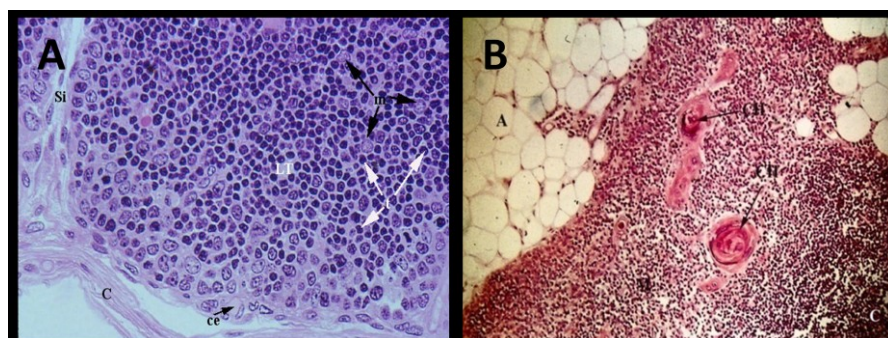


Figura 3: Particolari dell'anatomia microscopica di una sezione di timo, con colorazione ematossilina-eosina. **A)** Si evidenziano la capsula connettivale (C), da cui origina il setto interlobulare (Si), il lobulo timico (LT), i timociti (t), i macrofagi (m) e le cellule epiteliali (ce); **B)** Con colorazione ematossilina ferrica si evidenziano i corpuscoli timici o di Hassal (CH) nella midollare (Wick, Mills 2002).

L'irrorazione della corticale è garantita da vasi che decorrono lungo la giunzione cortico-midollare. I capillari venosi e le venule corticali sboccano nelle vene della giunzione cortico-midollare che, a loro volta, confluiscono in vene midollari. I

capillari e i vasi di calibro maggiore a livello della zona corticale dei lobuli timici sono avvolti da strati di cellule epiteliali. Queste cellule contribuiscono a formare una barriera emato-timica efficiente a livello corticale, ma incompleta a livello della giunzione cortico-midollare. Tale barriera impedisce un'inappropriata esposizione delle cellule T in via di sviluppo ad antigeni circolanti che porterebbe all'eliminazione di cloni utili, ed è quindi cruciale per la corretta maturazione delle cellule T.

3.1.2. Anatomia microscopica

Il parenchima timico è riccamente popolato da cellule capaci di favorire il differenziamento, la selezione e la clonazione dei linfociti T. Tali processi evolvono dalla zona corticale alla zona midollare.

La capsula timica è costituita da tessuto connettivo fibroso lasso, in cui sono immersi fibroblasti in una matrice di collagene e fibre reticolari. Dalla capsula si estendono setti che dividono ciascun lobo in numerosi lobuli di 0,5-2 mm di diametro. In essi confluiscono arterie, vene e nervi. Al di sotto della capsula è presente un singolo strato continuo di cellule epiteliali che la isolano dalla corticale.

La corticale del timo è costituita da un'impalcatura di cellule epiteliali timiche (TEC) di tipologia e forma differenti. Solitamente appaiono stellate con sottili prolungamenti che formano un reticolo nella corticale esterna; verso la corticale interna diventano più voluminose e con prolungamenti più corti e spessi. Oltre a fungere da impalcatura per il parenchima, la loro funzione principale è quella di promuovere lo sviluppo dei timociti che si stipano attorno ai loro prolungamenti; per questo vengono denominate cellule nutrici (*Nursing cells*). Ciascuna cellula timica epiteliale può occuparsi di 50-200 cellule T immature invaginate nella propria membrana plasmatica. Le TEC rilasciano fattori paracrini e costituiscono una nicchia emopoietica adatta alla maturazione dei timociti (Reyes Garcia, Garcia Tamayo 2013). I linfociti T alloggiati nel reticolo delle cellule nutrici sono tondeggianti e presentano un nucleo intensamente basofilo. Questa tipologia cellulare costituisce circa il 90% delle cellule presenti nel timo. A livello microscopico si possono distinguere numerosi linfociti T apoptotici, derivanti dal processo di selezione operato dalle cellule nutrici, che ne eliminano solitamente il

95%. Inferiormente allo strato di cellule epiteliali sottocapsulari sono presenti numerosi linfoblasti progenitori dei linfociti T che si addentrano nella corticale. Spostandosi verso la corticale interna del timo si trovano linfociti T sempre più maturi. A livello della giunzione cortico-midollare sono presenti vene attraverso le quali i linfociti T maturi possono entrare nella circolazione sanguigna. Dalle arteriole afferenti possono inoltre penetrare nel parenchima del timo dei monociti, che poi si differenzieranno in macrofagi, utili per fagocitare i linfociti T apoptotici. La midollare del timo si colora con l'eosina e appare di un colore rosa chiaro o violetto nelle sezioni istologiche, a differenza della corticale, fortemente basofila, che assume l'ematossilina e si colora di un blu-viola intenso. Appaiono ben visibili i corpuscoli di Hassal (CH, Fig.3B): strutture cellulari con un diametro di 30-100 μm formati da spirali di cellule epiteliali strettamente impacchettate. Sono formazioni costituite da residui appiattiti di cellule degenerate disposti a strati concentrici, il cui numero tende a crescere con l'età. Sono presenti, inoltre, cellule dendritiche che si interdigitano tra loro mediante estroflessioni citoplasmatiche: esse interagiscono con i timociti partecipando alla selezione negativa al fine di eliminare le risposte immunitarie contro il *self*, causando quindi l'apoptosi dei linfociti T che sono in grado di riconoscere e di reagire contro autoantigeni.

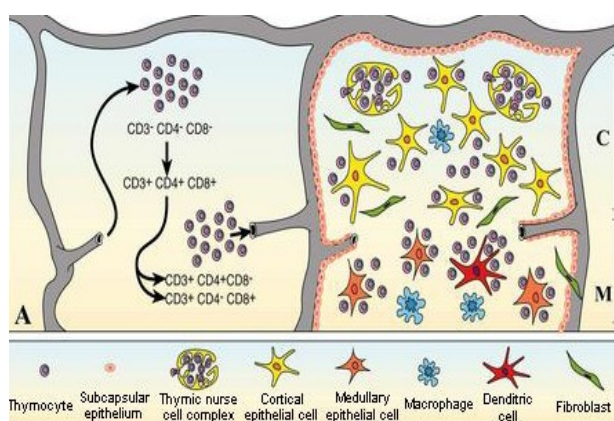


Figura 4: Maturazione dei timociti. A destra le varie cellule che compongono il microambiente timico nella zona corticale (C) e nella zona midollare (M) (Savino, Dardenne et al. 2007).

3.1.3. Involuzione timica

Il timo raggiunge la massima attività e dimensione all'inizio del periodo adolescenziale, quando il suo peso raggiunge circa i 30-40 grammi; successivamente subisce un'involuzione, che comporta la perdita della struttura parenchimale e la conseguente riduzione del rilascio di cellule T. Tale processo, definito atrofia fisiologica, avviene per azione degli ormoni sessuali e comporta un aumento del deposito di tessuto adiposo. Una volta terminata l'adolescenza l'organismo possiede difese immunitarie sufficienti per sopperire alla progressiva involuzione del timo; tuttavia il suo contributo alla maturazione delle cellule T continua con minore efficienza anche durante l'età adulta. Infatti i residui dell'involuzione timica sono sufficienti per garantire un certo grado di maturazione dei linfociti T; inoltre altri tessuti come le placche del Peyer suppliscono alla diminuzione dell'attività timica (Hollander, Gill et al. 2006). In caso di atrofia prematura del timo si riscontra un aumento considerevole della sensibilità alle infezioni.

3.2. I linfociti T

I linfociti T si sviluppano da progenitori linfoidei presenti nel midollo osseo, comuni ai linfociti B. Alcuni di questi progenitori migrano nel timo, dove maturano differenziandosi in diverse sotto-popolazioni (linfociti T Helper o Citotossici), proliferano e successivamente passano nel circolo sanguigno e migrano negli organi linfoidei periferici (milza, linfonodi e tessuto linfatico diffuso).

Le cellule T sono responsabili dell'immunità cellulare e presentano una duplice funzione, regolatoria ed effettrice: regolano le risposte immunitarie verso gli antigeni proteici, reclutando le cellule coinvolte nella fase effettrice della risposta immunitaria e modulandone la funzione; causano inoltre l'eliminazione dei patogeni intracellulari.

I linfociti T esprimono sulla loro superficie il recettore delle cellule T (*T cell receptor*, TCR), responsabile del riconoscimento degli antigeni. Il TCR è un eterodimero composto da due catene polipeptidiche (α e β) caratterizzate dalla presenza di un dominio transmembrana. Le catene sono legate tra loro mediante ponti disolfuro. Il TCR forma un complesso con il CD3, un eterodimero composto da tre catene denominate γ , δ ed ϵ .

3.2.1. Gli aspetti generali della differenziazione T linfocitaria

I timociti subiscono nel timo un processo differenziativo che può essere suddiviso in tre fasi principali:

- 1) occupazione del timo da parte di precursori delle cellule T, la cui proliferazione e differenziazione è indotta dal microambiente timico;
- 2) formazione del repertorio immunologico T attraverso la ricombinazione e il riarrangiamento dei geni che codificano le catene eterodimeriche del TCR (α , β , γ e δ), assicurando in tal modo la specificità di riconoscimento. L'espressione dei recettori che riconoscono gli antigeni nei linfociti T immaturi è influenzata da citochine endogene, le quali modulano la migrazione delle cellule T all'interno del timo attraverso le TEC e la loro successiva selezione;
- 3) selezione del repertorio immunologico T attraverso una serie di processi di riconoscimento reciproco tra strutture di membrana del compartimento T (TCR) e delle cellule epiteliali attraverso le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Tale processo porta a selezionare le cellule che non sono in grado di riconoscere il self con elevata affinità. La differenziazione antigene-indipendente culmina con l'espressione esclusiva sulla membrana dei linfociti T vergini della molecola CD4, nel caso dei linfociti T Helper, oppure della molecola CD8, per i linfociti T citotossici.

Le cellule T individuano i peptidi derivati dagli antigeni estranei mediante la loro degradazione intracellulare. Questi frammenti peptidici vengono poi complessati dalle molecole MHC e tale complesso viene esposto sulla superficie delle cellule. Ogni molecola MHC possiede una tasca che accoglie l'antigene; le molecole MHC di classe I (MHC-I) presentano peptidi derivati da patogeni, generalmente virus, mentre le molecole MHC-II espongono peptidi derivati dai patogeni presenti nelle vescicole dei macrofagi o internalizzati da cellule B.

3.2.2. La maturazione dei linfociti T nel timo

I linfociti T originano da precursori staminali emopoietici presenti nel fegato fetale e nel midollo osseo dell'adulto. Le fasi dello sviluppo delle cellule T sono caratterizzate da cambiamenti nello stato dei geni del recettore per l'antigene e da cambiamenti nell'espressione di proteine di superficie, come il complesso CD3 e i co-recettori CD8 e CD4. Nelle prime fasi dello sviluppo sono generate

due linee distinte di cellule T caratterizzate da due tipi diversi di recettore per l'antigene chiamati $\alpha:\beta$ e $\gamma:\delta$, a seconda delle catene aminoacidiche che formano il recettore. In seguito i linfociti T $\alpha:\beta$ si sviluppano in due sottogruppi distinti funzionalmente: i linfociti CD4 e CD8.

I timociti attraversano tre tappe maturative nel corso del loro sviluppo (Fig.5):

1) inizialmente non esprimono né CD4 né CD8 e sono pertanto classificati come $CD4^-CD8^-$ o "Doppio-negativi" (circa il 5% del totale dei timociti). La maggior parte di queste cellule sono timociti corticali immaturi in fase di riarrangiamento attivo dei geni TCR, ma non esprimono ancora sulla loro superficie i complessi TCR. Gli stimoli che guidano la proliferazione e la maturazione dei timociti doppio-negativi sono scarsamente noti, anche se numerosi studi dimostrano che le citochine prodotte dalle cellule non linfoidi del timo sono fattori di crescita per i timociti immaturi (Gameiro, Nagib et al. 2010);

2) lo stadio successivo di maturazione porta i timociti ad esprimere entrambi i recettori diventando così timociti "Doppio-positivi" ($CD4^+CD8^+$), che rappresentano l'80% dei timociti presenti in un timo adulto;

3) le cellule T che non sono in grado di generare un TCR funzionale e che non riconoscono quindi il complesso antigene-MHC vengono eliminate per apoptosi attraverso il processo di selezione positiva. Questa tappa avviene nella corticale grazie all'ausilio delle cellule epiteliali esprimenti sulla loro superficie le molecole MHC ed elimina tutte le cellule T che sarebbero incapaci di riconoscere l'antigene in periferia. Le cellule T rimanenti vengono esposte ai peptidi *self* complessati con MHC divenendo "Singolo-positivi" in seguito all'espressione del recettore CD4 (cellule T helper, che riconoscono preferibilmente le molecole MHCII) o del recettore CD8 (cellule T citotossiche, che riconoscono invece le molecole MHCI) (Reyes Garcia, Garcia Tamayo 2013). In questa fase vengono pertanto indotte alla morte programmata le cellule T autoreattive, mediante un processo che prende il nome di selezione negativa. Questo processo garantisce che il repertorio delle cellule T mature sia tollerante nei confronti degli antigeni proteici autologhi presenti nel timo. In questo processo oltre alle cellule epiteliali timiche intervengono macrofagi e cellule dendritiche.

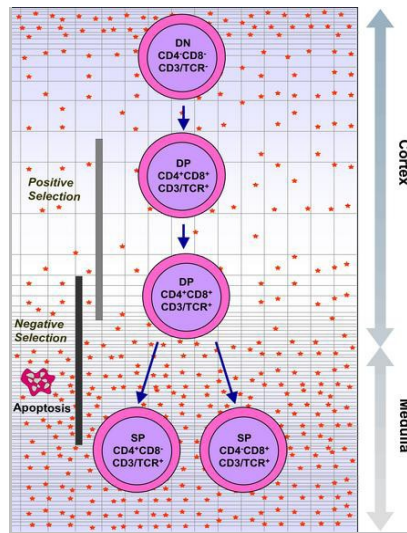


Figura 5: Differenziazione dei linfociti T nel timo (Savino, Dardenne et al. 2007).

Pertanto, i linfociti T vanno incontro alla selezione positiva per la restrizione *self*-MHC ed alla selezione negativa per la tolleranza *self*, interagendo con i complessi molecolari peptidi-MHC espressi dalle cellule stromali nel timo. Rimane da chiarire come l'interazione del TCR con i complessi peptide autologo-MHC autologo sia in grado di distinguere tra questi esiti opposti.

Le cellule T che non superano la selezione positiva o negativa muoiono per apoptosi, mentre quelle che sopravvivono, una volta mature migrano ai linfonodi periferici per svolgere la loro funzione nella risposta immunitaria.

3.3. Il cross-talk tra TEC e timociti

I timociti nel corso del loro sviluppo entrano in stretto contatto con un gran numero di cellule; in particolare è fondamentale la loro interazione con le cellule epiteliali timiche (TEC) che ne influenzano la maturazione, la proliferazione e la selezione (Fig.6). Le TEC si dispongono con i loro prolungamenti a formare un reticolo tridimensionale; esse sono voluminose e interconnesse da desmosomi.

3.3.1. Il microambiente timico

Le TEC sono distribuite in tutto il timo; in base alla loro ubicazione si distinguono TEC corticali (cTEC) e TEC midollari (mTEC); popolazioni cellulari che, sebbene

possiedano un'origine embrionale comune, esercitano funzioni diverse (Sun, Luo et al. 2013).

Ogni cTEC ingloba circa 200 timociti ancora immaturi grazie a delle invaginazioni della membrana plasmatica formando delle vescicole citoplasmatiche specializzate, chiamate *caveole*. Nella membrana interna delle vescicole sono espresse molecole di adesione e i complessi MHC di classe I e II, mediante le quali le TEC partecipano alla selezione positiva e negativa dei timociti. Le cTEC esprimono inoltre:

- la catepsina L, che regola la degradazione della catena polipeptidica che blocca il sito legante l'antigene di MHC II e impedisce il caricamento di peptidi antigenici;
- una serina proteasi-timo-specifica (TSSP), coinvolta nel riconoscimento dell'antigene;
- un complesso proteasico multicatalitico detto "Timoproteosoma", che genera modifiche alla catena β del TCR, implicata nella selezione positiva dei timociti (Alexandropoulos, Danzi 2012).

Le mTEC sono circondate da linfociti T semi-maturi ed esprimono chemochine, in grado di attrarre le cellule dendritiche e i timociti selezionati positivamente nella corteccia timica. I timociti autoreattivi non proseguono nella fase maturativa e vengono eliminati per apoptosi grazie a sinapsi che si formano tra la membrana interna delle mTEC e il TCR presente sulla superficie dei linfociti T nel processo di selezione negativa (Reyes Garcia, Garcia Tamayo 2013).

Le TEC regolano la maturazione dei timociti attraverso due azioni:

- esprimono sulla loro superficie MHC di classe I e II ed interagiscono con il recettore TCR dei timociti in fase di maturazione, evento fondamentale per la selezione negativa e positiva;
- tra TEC e timociti si verifica un cross-talk fondamentale per entrambe le specie cellulari, che prevede il rilascio di molecole solubili, l'interazione tra MHC espresso dalle TEC e il TCR del timocita, l'interazione tra molecole di adesione e i loro recettori, ed infine l'interazione tra ligandi della matrice extracellulare e i recettori presenti su entrambi i tipi cellulari. In questo processo sono coinvolte alcune citochine e chemochine, come CXCL12 e CCL21.

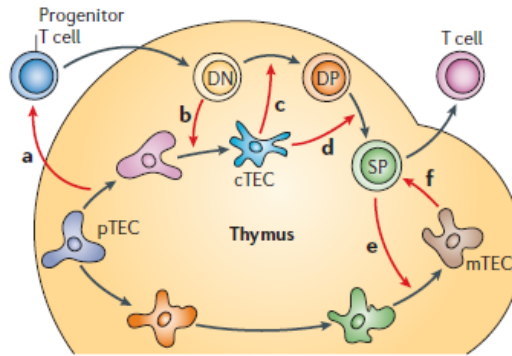


Figura 6: Schema del cross-talk tra timociti e TEC. Il cross-talk avviene anche dai precursori delle cellule epiteliali timiche corticali e midollari (pTEC) (a). In seguito allo sviluppo dei timociti doppio negativi (DN) le pTEC si trasformano in cTEC (b), le quali promuovono la generazione dei timociti doppio positivi (c). In seguito, la selezione positiva in doppio positivi (DP) (d), produce lo sviluppo di mTEC, che formano l'ambiente midollare per sostenere la maturazione (e). Infine, un'ulteriore selezione dei timociti in singolo positivi maturi (SP) e la loro esportazione (f) fornisce un pool di cellule T periferiche (Hollander, Gill et al. 2006).

3.3.2. Le citochine

Le citochine sono ormoni proteici importanti nell'immunità innata e specifica. In particolare nella prima sono coinvolte citochine prodotte da fagociti mononucleati, dette monochine, che evocano reazioni infiammatorie, mentre nel secondo tipo di immunità sono coinvolte le interleuchine prodotte dai linfociti T. Queste ultime svolgono un ruolo importante nella fase di attivazione delle risposte immuni, regolando la crescita e la differenziazione di varie popolazioni linfocitarie, ed anche nella fase effettrice, attivando le cellule infiammatorie (fagociti, neutrofili ed eosinofili). Le citochine iniziano la loro attività legandosi a recettori specifici presenti sulla superficie della cellula bersaglio; essa può essere la stessa che secerne la citochina (azione autocrina), la cellula vicina (azione paracrina), o una cellula lontana (azione endocrina).

L'interleuchina 6 (IL-6) è una citochina multifunzionale dal peso di circa 26 KDa che regola le risposte immuni e svolge un ruolo centrale nei meccanismi di difesa. Essa non è solitamente prodotta dalle cellule in condizioni basali ma la sua espressione è indotta da infezioni virali o da lipopolisaccaride (LPS), il quale viene liberato quando la parete cellulare dei batteri gram negativi viene degradata.

L'IL-6 è una citochina pleiotropica prodotta da una varietà di cellule, tra cui fagociti mononucleati, cellule endoteliali vascolari, cellule T e fibroblasti in risposta all'IL-1 e al fattore di necrosi tumorale (TNF). Essa è un omodimero, in cui ogni subunità forma un dominio globulare a 4 α -eliche (Fig.8). Il suo recettore è formato da una catena di 60 kDa, che contiene il sito di legame per la citochina e da una subunità di 130 kDa deputata alla trasduzione del segnale.



Figura 8: Struttura terziaria dell'IL-6.

L'IL-6 agisce su una vasta gamma di tessuti inducendone o inibendone la crescita e la differenziazione, a seconda della natura delle cellule bersaglio.

È coinvolta in numerosi processi implicati nella risposta immunitaria, in particolare:

- induzione della differenziazione delle cellule B;
- promozione della crescita delle cellule del mieloma, plasmacitoma e ibridoma;
- induzione di IL-2 e dell'espressione del recettore dell'IL-2; proliferazione ed attivazione delle cellule T;
- inibizione della crescita delle cellule presenti in alcune forme di leucemia mieloide e loro differenziazione in macrofagi;
- induzione della crescita dei cheratinociti.

Nel timo la funzione dell'IL-6 non è ancora completamente nota anche se è stata ampiamente descritta la sua partecipazione nel "Cross-talk" timico insieme all'interferone gamma (IFN- γ), al fattore di crescita trasformante beta (TGF- β) e all'interleuchina 1 (IL-1) (Le, Lazorick et al. 1990, Colic, Drabek 1991, Pedersen, Andersen et al. 1994, Fernandez, Vicente et al. 1994). Una mal regolazione nella produzione timica di IL-6 porta a uno stato infiammatorio cronico, spesso correlato alla formazione di timomi (Hodge, Hurt et al. 2005, Maggio, Guralnik et al. 2006). La sua iperproduzione inoltre è correlata ai meccanismi patologici che

si riscontrano nei pazienti affetti da miastenia grave cui viene diagnosticata una iperplasia timica (Mocchegiani, Giacconi et al. 2000).

3.4. L'adrenomedullina

L'adrenomedullina (ADM) è un ormone peptidico scoperto nel 1993 da un gruppo di scienziati giapponesi, estratto da un feocromocitoma umano (Kitamura, Kangawa et al. 2012). Il suo nome deriva dalla sua abbondante presenza nella midollare del surrene (che in inglese è detta "Adrenal medulla").

3.4.1. Struttura e sintesi

L'ADM è costituita da 52 aminoacidi e presenta un'amidazione a livello della tirosina C-terminale e un ponte disolfuro tra i residui 16 e 21 che contribuisce a formare un anello di 6 aminoacidi vicino ai residui di cisteina (Fig.9), permettendo la sua classificazione all'interno della famiglia dei peptidi correlati al gene per la calcitonina, detti CGRPs (*Calcitonin Gene-Related Peptides*). Tale struttura è indispensabile per il legame di questi peptidi con il loro recettore.

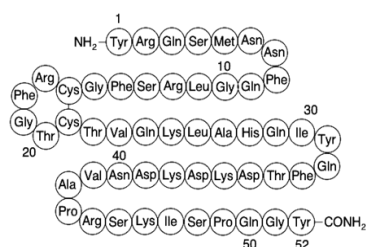


Figura 9: Struttura dell'adrenomedullina umana (Kato, Tsuruda et al. 2005).

L'adrenomedullina viene sintetizzata a partire dal suo precursore di 185 aminoacidi, la preadrenomedullina, che contiene una sequenza segnale di 20 aminoacidi a livello dell'N-terminale che viene persa nella proadrenomedullina. A sua volta quest'ultima viene suddivisa in quattro peptidi (Fig.10), di cui uno è l'adrenomedullina in forma glicinata a livello del C-terminale. In seguito ad un'amidazione enzimatica si forma infine l'adrenomedullina.

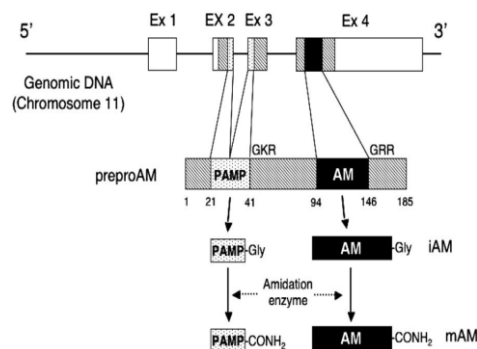


Figura 10: Rappresentazione schematica del gene dell'ADM con la formazione di ADM e PAMP a partire dall'ormone preadrenomedullina (Kato, Tsuruda et al. 2005).

Sono inoltre presenti diversi siti di legame per la proteina attivatrice-2 (AP-2), siti attivatori della trascrizione regolati dal cAMP e siti di binding del fattore nucleare kB (NF-kB).

Il gene dell'ADM è espresso in una vasta gamma di tessuti, in particolare nella midollare del surrene, nei reni, nei ventricoli e nei polmoni. Studi successivi hanno verificato la sua elevata espressione anche nelle cellule endoteliali.

3.4.2. Regolazione dell'espressione genica

L'adrenomedullina è espressa in modo pressoché ubiquitario, sebbene nella ghiandola surrenale, nella zona glomerulare del rene e nella midollare surrenale la sua espressione sia particolarmente elevata (Kapas, Martinez et al. 1998).

La sua concentrazione plasmatica (1-10 pM) non varia significativamente a seconda del genere o dell'età, mentre sono state riportate alterazioni nel corso di eventi parafisiologici o patologici (Lewis, Smith et al. 1998, Sakata, Shimokubo et al. 1993). Sono stati infatti osservati aumenti di ADM plasmatica nelle patologie cardiovascolari, nel corso della gravidanza, nello shock settico, nella cirrosi, nella schizofrenia (Zoroglu, Herken et al. 2002), in alcune malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide e la sclerosi multipla (Gonzalez-Rey, Chorny et al. 2007, Pedreno, Morell et al. 2014). I dati presenti in letteratura riguardo il controllo della produzione di ADM *in vivo* suggeriscono che il meccanismo di regolazione e produzione di ADM sia tessuto specifico.

Studi condotti *in vitro* hanno permesso di evidenziare come la produzione di ADM dalle cellule muscolari lisce del sistema vascolare (VSMCs) sia aumentata da

citochine, fattori di crescita e ormoni, compresi il fattore di necrosi tumorale α e β (TNF- α e TNF- β), IL-1 α e β , da desametasone, cortisolo, aldosterone, acido retinoico e ormone tiroideo.

Inoltre, il lipopolisaccaride si è rivelato essere un potente stimolo per il rilascio di ADM da parte dei macrofagi, delle VSMCs, dei fibroblasti e delle cellule endoteliali. Il gene dell'adrenomedullina è sotto controllo trascrizionale di alcuni elementi regolatori come NF-IL6, attivato da LPS, IL-1, TNF e la stessa IL-6 (Ishimitsu, Miyata et al. 1998, Hattori, Mimura et al. 1999).

3.4.3. Il recettore

Il recettore per l'adrenomedullina è dato dalla co-espressione di due proteine: *Calcitonin Receptor Like Receptor* (CRLR), il cui nome deriva dal fatto che presenta un'omologia del 55% con la sequenza aminoacidica del recettore per la calcitonina, e *Receptor Activity Modifying Protein 2* (RAMP2) (McLatchie, Fraser et al. 1998). La proteina RAMP2 è una proteina di membrana con un dominio transmembrana in grado di trasportare il CRLR sulla superficie cellulare per formare il recettore funzionale per ADM.

Sono state caratterizzate tre isoforme di RAMP, chiamate RAMP1, RAMP2 e RAMP3, che presentano una identità di sequenza inferiore al 30%, ma simile organizzazione strutturale. Esse sono piccole proteine composte da una sequenza di 160 aminoacidi, dal peso di 14-17 KDa, che possiedono un dominio extracellulare esteso (100 residui circa), un dominio transmembrana e un piccolo dominio intracellulare (10 residui). RAMP1 e RAMP3 possiedono sei cisteine a livello del dominio extracellulare mentre RAMP2 ne possiede quattro; RAMP1 è caratterizzata dall'assenza del sito di N-glicosilazione, mentre RAMP2 e RAMP3 presentano diversi siti di N-glicosilazione, il cui numero è variabile a seconda della specie, e sette aminoacidi presenti in sequenze conservate, necessari per il legame con il ligando.

La presenza di queste proteine è stata confermata in molti tessuti: RAMP1 in cuore, utero, cervello, pancreas, vescica e tratto gastrointestinale; RAMP2 in polmoni, cuore, placenta, muscoli scheletrici, tessuto adiposo, timo e pancreas; RAMP3 in polmoni, milza, tessuto adiposo e nel midollo spinale.

Il CRLR forma recettori diversi in base al legame specifico con i tre sottotipi di RAMP (Fig.11): CRLR e RAMP1 formano il recettore per CGRP (*Calcitonin Gene Related Peptide*); la co-espressione di CRLR con RAMP2 il recettore principale per ADM detto ADM1 ed infine la co-espressione di CRLR con RAMP3 il recettore ADM2 al quale l'adrenomedullina è meno affine (McLatchie, Fraser et al. 1998).

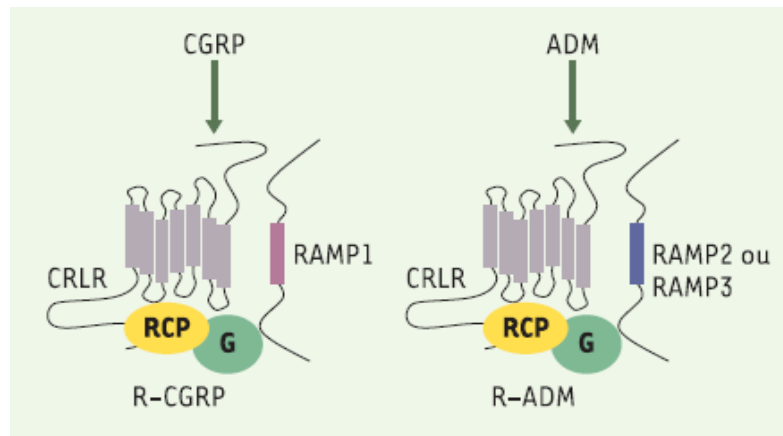


Figura 11: Diversi recettori formati da CRLR e le RAMP (Galy, Spits 1992).

E' ormai noto che il legame di ADM al suo recettore provoca un aumento del cAMP in vari tessuti e cellule, tipico della famiglia dei recettori per la calcitonina. Il meccanismo d'azione iniziale di ADM coinvolge l'attivazione della proteina Gs, dell'adenilatociclastasi e della proteinchinasi A (PKA).

Inoltre la sequenza aminoacidica compresa tra gli aminoacidi 22 e 52 dell'ADM funge da inibitore specifico per il recettore dell'ADM, in quanto priva del ponte disolfuro necessario per il legame di ADM al recettore.

3.4.4. L'attività biologica

L'ADM è un peptide regolatore espresso e secreto in molteplici tessuti e organi come cuore e vasi sanguigni, reni, polmoni, tratto gastrointestinale, milza, ghiandole esocrine, cervello e pancreas. Viene sintetizzata e secreta abbondantemente anche da diverse cellule del sistema cardiovascolare: cellule endoteliali, muscolari lisce dei vasi e cardiomiociti (Belloni, Petrelli et al. 2006). È stato osservato anche che ADM è espressa nel timo di ratto (Belloni, Trejter et al.

2003) e, recentemente, è stata dimostrata l'espressione di ADM e delle sue proteine recettoriali nel timo umano neonatale (De Martin, Paliuri et al. 2014).

Questa vasta distribuzione suggerisce che l'ADM sia implicata nella regolazione di numerose funzioni corporee e fisiologiche.

I primi dati funzionali hanno indicato la sua marcata attività ipotensiva e vasodilatatoria (Eto 2001), con conseguente ruolo nella regolazione del tono, della proliferazione e del rimodellamento vascolare, che si esplica nell'abbassamento della pressione sanguigna e nell'aumento di frequenza e gittata cardiaca. La sua azione avviene attraverso due meccanismi: mediante un'azione diretta per incremento della produzione cellulare di cAMP ed una indiretta che prevede la liberazione di NO dalle cellule endoteliali dopo un incremento del calcio intracellulare. Aumentando il flusso sanguigno renale, la filtrazione glomerulare e conseguentemente il flusso urinario, il peptide è coinvolto anche nella diuresi e natriuresi.

Di rilevante interesse è il coinvolgimento di ADM nei processi angiogenetici sia durante lo sviluppo embrionale sia nella vita adulta in diverse condizioni sia fisiologiche, quali la riparazione di ferite, che patologiche, cioè nei processi infiammatori e nella proliferazione di cellule tumorali (Ribatti, Nico et al. 2005).

L'ADM presenta proprietà antimicrobiche sia contro batteri gram-positivi che gram-negativi. Grazie alla sua struttura anfipatica, costituita da domini idrofobici carichi e separati spazialmente, può intercalarsi nelle membrane batteriche. La concentrazione di ADM necessaria per uccidere o inibire la crescita batterica è superiore alla concentrazione fisiologica di ADM circolante; tuttavia, in determinate circostanze, come la sepsi, la sua concentrazione plasmatica aumenta. Infine, presenta anche azione anti-apoptotica protettiva dallo stress ossidativo e dal danno da ipossia (Oehler, Norbury et al. 2001).

3.4.5. L'adrenomedullina e il sistema immunitario

Nel 1999 è stata scoperta una proteina plasmatica legante l'ADM (AMBP-1) che è stata poi identificata come il fattore del complemento H, il quale è un attivatore della via alternativa del sistema del complemento. Il risultante complesso ADM-

fattore H regola l'attività biologica di entrambe le molecole (Pio, Elsasser et al. 2002).

Studi effettuati sul ratto dimostrano un aumento di ADM nei tessuti viscerali e nel plasma in seguito ad una infusione endovenosa di LPS (Eto, Kato et al. 2003). La maggior parte dei dati al momento presenti in letteratura dimostrano un ruolo protettivo di ADM nella sepsi, osservazione confermata anche da studi su animali transgenici che iperesprimono ADM in cellule endoteliali vascolari e cellule muscolari lisce (Shindo, Kurihara et al. 2000).

Le cellule dendritiche esprimono anch'esse in condizioni basali ADM, la cui produzione aumenta durante il loro sviluppo, facendo ipotizzare un possibile ruolo nella loro maturazione (Rulle, Ah Kioon et al. 2012).

Recentemente è stata valutata l'attività antinfiammatoria e immunomodulatoria di ADM. Ad esempio, in modelli animali di artrite reumatoide è stato dimostrato che la somministrazione intraperitoneale di ADM provoca una diminuzione delle cellule T helper 1 (Th1), implicate nella risposta autoimmune, ed un aumento delle cellule Treg (cellule T regolatorie) responsabili della soppressione delle cellule T autoreattive; a livello articolare ADM riduce i livelli di citochine proinfiammatorie mentre aumenta la concentrazione di quelle con attività antinfiammatoria (Gonzalez-Rey, Chorny et al. 2007). In modelli di sclerosi multipla, malattia autoimmune che determina una neuroinfiammazione mediata dai linfociti proinfiammatori Th1 e Th17, la somministrazione di ADM porta ad una diminuzione dei Th1, dei Th17 e dei mediatori infiammatori infiltranti il sistema nervoso centrale (Pedreno, Morell et al. 2014). Risulta chiaro quindi come ADM svolga un ruolo protettivo in condizioni di infezione o malattie autoimmuni.

ADM è implicata anche nella regolazione dei mastociti; in particolare, in ratti trattati con ADM per via intraperitoneale è stata osservata una degranolazione delle cellule mastocitiche; dato osservato anche *in vitro* in colture di mastociti umani, le quali vengono degranulate in presenza di elevate concentrazioni di ADM e rilasciano fattori di promozione tumorale (Zudaire, Martinez et al. 2006).

A livello del sistema nervoso centrale, ADM inibisce l'attivazione della microglia conseguente a stimoli infiammatori, operando una riduzione del rilascio di citochine pro-infiammatorie come IL-6 (Consonni, Morara et al. 2011).

Rimangono da verificare i meccanismi mediante i quali ADM interviene nei processi infiammatori e nell'immunità cellulare.

3.5. NF- κ B

Con il termine NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) si intende una famiglia di fattori di trascrizione presente in tutti i tipi di cellule, in grado di legare specifiche sequenze di DNA. In condizioni fisiologiche, tali proteine sono localizzate nel citoplasma mentre traslocano nel nucleo in risposta a stimoli esterni alla cellula, come infezioni batteriche o virali, fattori infiammatori ed alterazioni genetiche. È stata dimostrata la loro attività anche nei tessuti tumorali, dove favoriscono la proliferazione delle cellule tumorali a discapito delle cellule non malate (Perkins 2012).

3.5.1. Struttura e attivazione

Le proteine implicate nella cascata di attivazione di NF- κ B sono cinque: c-Rel, p65 (RelA), RelB, p50 (NF- κ B1) e p52 (NF- κ B2). Ciascuna proteina Rel contiene una sequenza di 300 amminoacidi detta RHD (*Rel Homology Domain*) necessaria per interagire con il DNA (Gilmore 2006). L'attivazione di NF- κ B può avvenire attraverso due vie di trasduzione del segnale: la via classica (detta anche canonica) e la via alternativa, definita anche non-canonica (*Fig. 12*). La via classica prevede l'attivazione del dimero p50-p65 mentre nella via non classica avviene la traslocazione del dimero p52-RelB (Hoffmann, Baltimore 2006).

In particolare antigeni, ligandi del Toll-Like Receptor (TLR) e citochine infiammatorie quali TNF α ed IL-1 β promuovono la via classica che prevede l'attivazione del complesso chinasi IK β (IKK), composto da due chinasi distinte, IKK α ed IKK β , e da una proteina regolatoria detta NEMO (IKK γ). Quando la chinasi IKK β viene attivata, si verifica la fosforilazione di I κ B α complessato al dimero p65-p50. In seguito, il complesso p65-p50 diviene libero di entrare nel nucleo e svolgere la sua funzione (Gerondakis, Fulford et al. 2014).

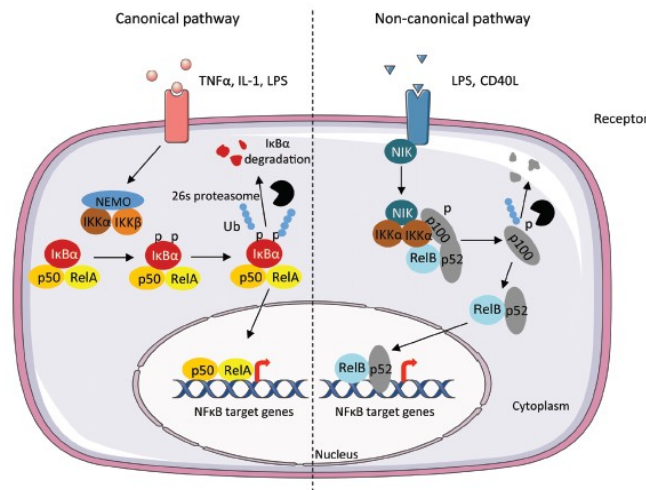


Figura 12: Schema delle vie di attivazione canonica e non-canonica di NF-κB.

3.5.2. Ruolo di NF-κB nel timo

Benchè il ruolo di NF-κB nel timo non sia stato ancora completamente chiarito, esistono evidenze scientifiche che la sua attivazione avvenga già durante la prima fase differenziativa dei timociti, cioè quella antigene-indipendente (Fig. 13). L'espressione nucleare di NF-κB nei timociti aumenta dallo stadio DN1 (primo stadio maturativo dei timociti doppio negativi) fino allo stadio DN3, per poi diminuire durante lo stadio DN4, l'ultima fase di maturazione prima del passaggio allo stadio di doppio positivi (DP). Il segnale che scatena l'attivazione di NF-κB allo stadio DN3 dipende dal recettore pre-TCR che attiva nel timocita la via canonica dipendente da p65-p50. Il segnale innescato da NF-κB favorisce la differenziazione dei timociti T helper 17 (Th17) (Voll, Jimi et al. 2000).

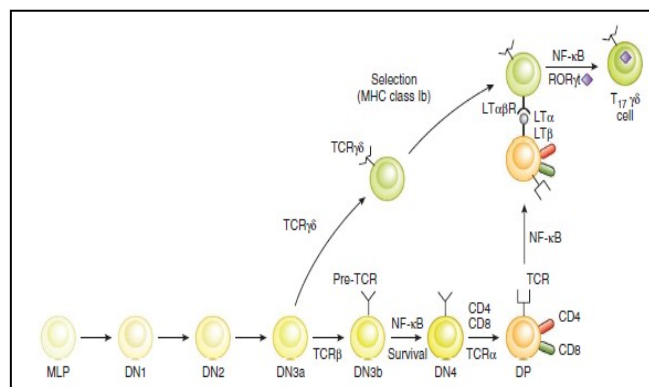


Figura 13: Schema dell'azione di NF-κB nel timo nella differenziazione dei timociti (DN: doppio negativi in diversi stadi di sviluppo in base alla differente espressione di CD44 e CD25) (Gerondakis, Fulford et al. 2014).

La via classica di NF- κ B controlla nel timo anche la differenziazione delle cellule Treg, note anche come cellule CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, implicate nel prevenire i meccanismi di autoimmunità a livello tissutale mediante la distruzione dei linfociti T reattivi contro il *self*. Le Treg si formano nel timo dai precursori CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁻ in risposta a segnali innescati dal CD28 e dal TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*), mentre l'espressione successiva del fattore di trascrizione Foxp3, mediata da NF- κ B attraverso la via non-canonica, richiede la presenza di IL-2 e IL-15 (Hsieh, Lee et al. 2012).

Oltre all'azione svolta nel timo nel favorire la differenziazione delle cellule Th17, NF- κ B ha un ruolo cruciale anche nel controllo della selezione negativa dei timociti (Jimi, Strickland et al. 2008). La sua funzione nella selezione negativa è quella di potenziare i meccanismi di difesa contro i timociti reattivi che sfuggono al controllo delle mTEC. Questo avviene promuovendo l'apoptosi dei timociti autoreattivi (Gerondakis, Fulford et al. 2014) e lo sviluppo delle cellule dendritiche, fondamentali per la presentazione degli antigeni ai timociti durante la fase di selezione negativa (Proietto, van Dommelen et al. 2009).

3.6. Il sistema dopaminergico

3.6.1. Struttura e sintesi della dopamina

La dopamina (DA) è un neurotrasmettitore appartenente alla famiglia delle catecolamine costituita da una porzione catecolica legata ad un'etilamina (Fig. 14).

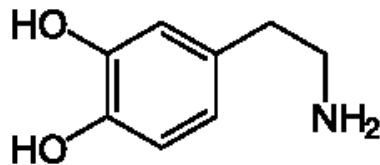


Figura 14: Struttura della dopamina.

Nel SNC, la sua sintesi avviene a livello della substantia nigra e dell'area ventrale tegmentale a partire dal precursore L-fenilalanina che viene assunto con la dieta. Questa viene poi convertita in L-tirosina, trasportata attivamente all'interno della cellula neuronale, e successivamente avviene la conversione in L-DOPA e infine in dopamina. In queste fasi intervengono gli enzimi fenilalanina idrossilasi, tirosina idrossilasi e decarbossilasi degli L-aminoacidi aromatici. La tirosina è tipicamente presente a livelli saturanti nel cervello e la sua conversione a L-DOPA da parte dell'enzima tirosina idrossilasi rappresenta la tappa limitante per la velocità di sintesi della dopamina. Altre aree che presentano alti livelli di dopamina sono il nuclei caudato e putamen, l'accumbens, il tubercolo olfattorio, il nucleo centrale dell'amigdala, l'eminenza mediana e alcune aree della corteccia frontale.

La DA è il precursore delle catecolamine noradrenalina (NA) e adrenalina, la cui sintesi avviene principalmente nelle cellule cromaffini delle ghiandole surrenali e nei neuroni catecolaminergici grazie all'intervento degli enzimi dopamina β -idrossilasi e feniletanolamina n-metiltrasferasi.

Il suo metabolismo invece coinvolge gli enzimi MAO (*Monoamino-Ossidasi*) e COMT (*Catecol-O-Metiltrasferasi*) che degradano la dopamina a acido omovanillico (HVA).

3.6.2. Importanza della dopamina nei processi fisiopatologici

La dopamina svolge un ruolo importante nella regolazione del rilascio di prolattina dall'ipofisi, nella secrezione di renina dal rene, di adrenalina e NA dal surrene; inoltre regola svariati processi fisiologici attraverso le vie Mesolimbica, Nigrostriatale, Mesocorticale e Tubero-Infundibolare. Le attività regolate dal sistema dopaminergico comprendono la cognizione, il comportamento, la motivazione, la ricompensa, il movimento volontario, il sonno, l'attenzione, la *working-memory*, l'apprendimento e la regolazione della pressione arteriosa.

I neuroni dopaminergici sono presenti soprattutto a livello del mesencefalo, del VTA, della substantia nigra e del nucleo arcuato dell'ipotalamo. La sua attività non è propriamente inibitoria o eccitatoria: la DA interviene nella modulazione della neurotrasmissione e i neuroni dopaminergici a loro volta vengono eccitati dagli stimoli glutamatergici e inibiti da quelli GABAergici (Ugrumov 2013).

Alterazioni della stimolazione dopaminergica si riscontrano in alcune patologie come la depressione bipolare, la schizofrenia, la malattia di Parkinson, il disturbo da deficit dell'attenzione ed iperattività (ADHD) e la dipendenza da sostanze (Vaughan, Foster 2013).

3.6.3. Meccanismi molecolari alla base della trasmissione dopaminergica

Gli eventi neurochimici che regolano la neurotrasmissione nei neuroni dopaminergici prevedono:

- il sequestro della DA in vescicole secretorie all'interno dei neuroni pre-sinaptici ad opera del *Vesicular Monoamine Transporter 2* (VMAT2). In tal modo il neurotrasmettitore non viene metabolizzato e può essere prontamente rilasciato per esocitosi;
- la liberazione della DA dalla cellula: quando si trova nelle fessure sinaptiche, la DA attiva recettori post-sinaptici e autorecettori (propri dei neuroni dopaminergici implicati nei meccanismi di feedback) pre-sinaptici.

I recettori dopaminergici sono proteine accoppiate a proteine G e si articolano in due famiglie. I recettori D1 e D5 appartengono alla famiglia D1 che è accoppiata con proteine Gs e i recettori D2, D3, D4 fanno parte della famiglia D2 accoppiata a proteine Gi. I recettori della famiglia D1 sono solo post-sinaptici mentre i recettori D2 sono sia pre che post-sinaptici; inoltre le due famiglie hanno diversa

affinità per il ligando e localizzazione non analoga; l'attivazione dei recettori D1 causa una stimolazione dell'adenilato ciclasi in membrana post-sinaptica e un conseguente aumento del cAMP che causa l'attivazione della fosfochinasi A coinvolta in diverse vie regolatorie di espressione genica. Inoltre l'attivazione dei recettori D1 attiva la fosfolipasi C, che causa un aumento di calcio citoplasmatico che contribuisce alla regolazione di alcuni fattori trascrizionali. Nel complesso il contributo dei recettori D1 sembra essere inibitorio. I recettori D2 agiscono in modo del tutto differente: se attivati dalla DA essi causano un abbassamento della concentrazione di calcio citoplasmatico e un'inibizione dell'adenilato ciclasi (Fig. 15) (Knab, Lightfoot 2010).

- la ricaptazione della DA può avvenire mediante il trasportatore della DA (DAT) e della NA (NAT) a livello pre-sinaptico. Una volta entrata nella cellula la DA è soggetta a degradazione per opera delle MAO, delle aldeide deidrogenasi (ALDH) e delle COMT.

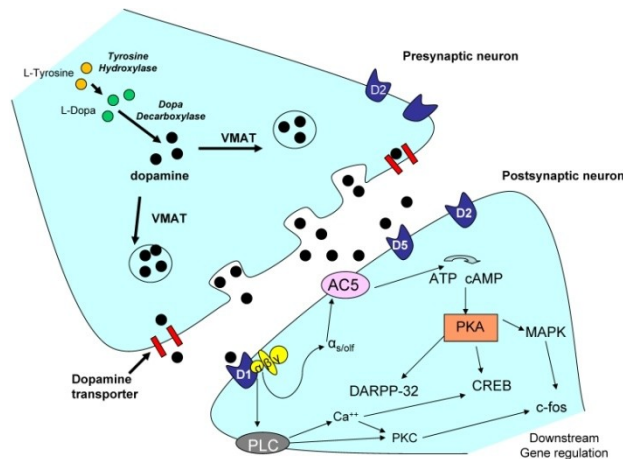


Figura 15: Eventi molecolari che regolano la trasmissione dopaminergica.

3.6.4. DAT (DA transporter)

DAT è un trasportatore dopaminergico di 620 aminoacidi il cui gene DAT1 è localizzato nel cromosoma 5. Appartiene alla famiglia dei SLC (*Solute Carrier*) ed è espresso nella membrana neuronale a livello pre-sinaptico. DAT sfrutta il gradiente Na^+/Cl^- per spostare la DA extracellulare all'interno dei neuroni mediante il simporto con due ioni Na^+ e uno Cl^- . La sua attività di ricaptazione influisce sulla modulazione della stimolazione dopaminergica nelle aree cerebrali in cui è espresso come il nucleo accumbens, il tubercolo olfattorio, l'ipotalamo e

la corteccia prefrontale e il corpo striato. Soprattutto in quest'ultima area DAT risulta essere espresso ad elevate concentrazioni (*Fig. 16*) (Giros, Jaber et al. 1996).

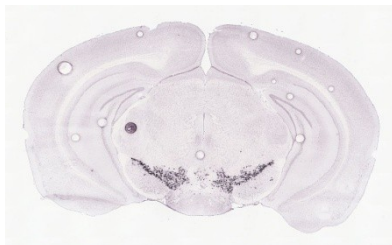


Figura 16: Espressione di DAT nella substantia nigra nel cervello di un topo.

Al di fuori del SNC il trasportatore si trova espresso anche nella retina, nel pancreas, nei reni, nel tratto gastro-intestinale e nei linfociti.

Strutturalmente presenta 12 domini transmembrana di circa 20 aminoacidi in α -elica, un loop idrofobico che sporge verso la porzione extracellulare con 2-4 siti di glicosilazione e lunghe porzioni citoplasmatiche N- e C- terminali (*Fig. 17*). I siti di fosforilazione principali sono a livello della Ser7 e della Thr53 nella sequenza N terminale; il primo viene fosforilato dalla PKC (*Protein Kinase C*) mentre il secondo dalla ERK (*Extracellular Signal Regulated Kinase*). Tra i due siti di fosforilazione vi sono due residui di lisina in posizione 19 e 27 che rendono possibile l'ubiquitinazione di DAT da parte della ubiquitina ligasi E3. L'attività della E3 viene stimolata dall'attivazione della PKC con un meccanismo che aumenta il processo di endocitosi di DAT. L'effetto della PKC su DAT induce un calo di espressione dei trasportatori nella superficie dei neuroni pre-sinaptici. L'esito di questo processo è un aumento della DA extracellulare e quindi della stimolazione dopaminergica. Altre proteine in grado di regolare DAT sono ad esempio la CaMK (*Chinasi Calcio-Calmodulina-dipendente*), l' α -synucleina e la Parkina (Vaughan, Foster 2013).

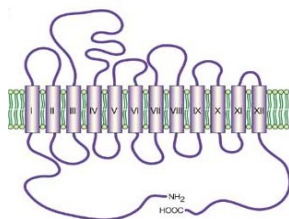


Figura 17: Struttura del trasportatore della dopamina.

Un deficit dell'attività del trasportatore è strettamente correlato allo sviluppo di disturbi psichiatrici come:

- l'ADHD (*Attention Deficit Hyperactivity Disorder*) e il disturbo bipolare. Queste patologie risultano correlate ad alcuni rari polimorfismi di DAT1 che causano delle sostituzioni aminoacidiche. La sostituzione di una valina al posto di una alanina in posizione 559 (A559V) a livello del dodicesimo tratto transmembrana causa una modificazione conformazionale del trasportatore che intacca il normale flusso dopaminergico; in particolare si riscontra un innalzamento dei livelli di DA extracellulare. Una sostituzione in posizione 615 a livello del C terminale della cisteina con un'arginina causa una sottoregolazione cronica di DAT che conduce ad una costante presenza di elevati livelli di DA extracellulare. Inoltre le sostituzioni V382A e V55A alterano la Km del trasportatore per la dopamina facendone calare l'affinità.

- la sindrome di Angelman in cui si registra un tremore simile a quello della malattia di Parkinson. La patologia deriva da un difetto nell'allele della E3 ereditato per via materna che causa un calo dell'attività della CaMK che risulta inibita da un'autofosforilazione (regolatore di DAT). La conseguenza è un abbassamento dei livelli di DA sinaptica probabilmente a seguito di un'alterazione del flusso del neurotrasmettitore attraverso DAT.

- PD (*Parkinson Disease*) in cui si assiste ad una degenerazione dei neuroni nella substantia nigra. Due possibili forme familiari di PD sono causate dall'overespressione di α -synucleina e di Parkina. La prima sembra avere affinità per il medesimo sito al C terminale che lega la CaMK e intaccare il normale flusso di DA attraverso DAT. Tale variazione sembrerebbe indurre apoptosi neuronale. La Parkina invece ha attività ubiquitinaria che a livello basale garantisce la corretta degradazione di DAT. La scorretta regolazione del processo dovuta all'overespressione della proteina causa neurotossicità e morte cellulare (Vaughan, Foster 2013).

3.6.5. COMT (Catecol-o-Metiltransferasi)

COMT è un enzima di 271 aminoacidi con attività Mg^{2+} -dipendente coinvolto nel metabolismo e inattivazione delle catecolamine. COMT catalizza il trasferimento di un gruppo metilico da una S-Adenosil Metionina (SAM) ad un ossidrile del gruppo catecolico della DA (e delle altre catecolamine). Nel caso della DA la reazione ha come prodotto una 3-metossitiramina (*Fig.18*). COMT è inoltre responsabile della metilazione del DOPAC, prodotto della deaminazione della DA da parte di MAO. A seguito di queste reazioni la DA non è più attiva nella stimolazione dei neuroni dopaminergici.

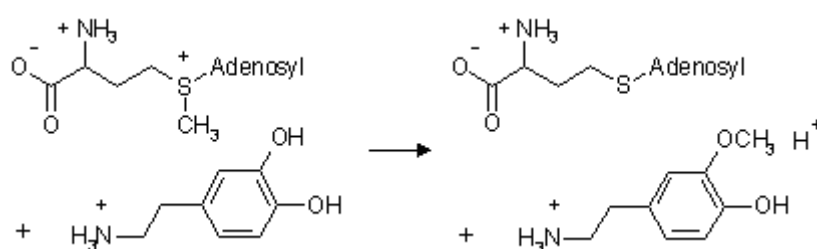


Figura 18: Metilazione della dopamina catalizzata da COMT.

Esistono due isoforme di COMT con diversa localizzazione subcellulare: una solubile citoplasmatica (priva dei primi 50 aminoacidi) e una inserita nella membrana plasmatica con un singolo dominio transmembrana (dal residuo 7 al 26). Nella regione 167-170 è presente un sito di legame per la SAM, centralmente si lega il magnesio e nella porzione C-terminale vi è la regione in grado di legare il substrato.

La transferasi COMT è espressa a livello epatico, placentare, nei linfociti e negli eritrociti; a livello del SNC si trova in svariate aree cerebrali e in misura maggiore nella PFC (*Fig. 19*). In particolare è stato visto che in quest'area l'enzima COMT è responsabile di circa il 50% del metabolismo della DA (Papaleo, Lipska et al. 2012). Inoltre è noto che l'attività della transferasi sia subordinata ad una regolazione epigenetica da parte degli estrogeni (Gogos, Morgan et al. 1998). Come nel caso di DAT, è stato osservato che anche COMT è implicata nello sviluppo di alcune patologie psichiatriche. La delezione in emizigosi del gene COMT (che si trova nella banda q11 del cromosoma 22) è coinvolta in alcune malattie psichiatriche come la schizofrenia (*Fig. 20*), la schizofrenia con esordio infantile e il disturbo compulsivo ossessivo (OCD) e in alcuni sintomi come

l'ansietà e la depressione. La mancanza di un allele COMT causa un calo dell'attività enzimatica prevalentemente nell'area prefrontale e un accumulo di DA a livello sinaptico con il conseguente aumento della stimolazione. Inoltre il coinvolgimento di COMT nei processi fisiopatologici è stato provato da alcuni studi sul polimorfismo Val¹⁵⁸Met che si è scoperto aumentare la suscettibilità verso alcuni disturbi psichiatrici dovuti a disfunzioni del sistema dopaminergico (Gogos, Morgan et al. 1998).

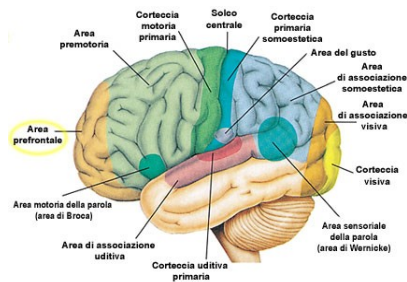


Figura 19: Aree corticali: posizione della PFC.

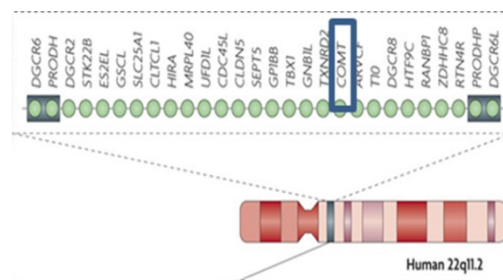


Figura 20: Geni del locus 22q11.2.

Esistono fattori ambientali che favoriscono lo sviluppo delle diverse patologie psichiatriche in combinazione con tali alterazioni genetiche; ad esempio, nel caso della schizofrenia sono condizioni favorevoli la malattia le infezioni virali materne e la coesistenza di disturbi autoimmuni (Benros, Pedersen et al. 2014).

3.7. Sistema immunitario ed adrenomedullina nei disturbi psichiatrici

Il ruolo del sistema immunitario nella patogenesi di disturbi psichiatrici con alterazioni della trasmissione dopaminergica non è ancora chiaro, ma esistono delle prime evidenze sperimentali di una correlazione tra patologie psichiatriche e disordini del sistema immunitario, in particolare ad infezioni e patologie autoimmuni.

L'infezione materna in gravidanza rappresenta un fattore di rischio per il feto che è maggiormente soggetto allo sviluppo di patologie autoimmuni e schizofrenia (Benros, Pedersen et al. 2014).

Esiste inoltre un'associazione positiva anche fra malattie autoimmuni e schizofrenia: in pazienti schizofrenici si stima un aumento del 53% di incidenza di

malattie autoimmuni e in malati con disturbi autoimmuni si registra una maggiore probabilità di ammalarsi di schizofrenia (Benros, Pedersen et al. 2014).

Ne consegue che disturbi nella trasmissione dopaminergica potrebbero essere associati a malfunzionamenti del sistema immunitario che causano fenomeni di tipo autoimmuni.

Un paziente schizofrenico ha inoltre una maggiore suscettibilità a contrarre infezioni a causa delle alterazioni del sistema immunitario (Benros, Pedersen et al. 2014).

Altre evidenze della relazione fra disturbi immunitari e psichiatrici sono emerse da alcuni studi che hanno rilevato delle variazioni di espressione dei geni per il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) nella schizofrenia, correlando così alcune anomalie immunitarie allo sviluppo di patologie mentali (Elmer, McAllister 2012). Inoltre, ratti trattati con lipopolisaccaride (LPS) a livello dell'ippocampo mostrano alterazioni comportamentali tipiche della schizofrenia, con attivazione della microglia e aumento di fattori pro-infiammatori. Questo ha permesso di ipotizzare la presenza di una correlazione fra stati infiammatori e disturbi psichiatrici (Zhu, Zhang et al. 2014).

Infine uno studio ha fatto emergere la capacità della DA di stimolare il rilascio di IL-6, evento in grado di promuovere la maturazione di cellule Th17 e di inibire quella delle Treg (Ferreira, Barros et al. 2014).

4. Scopo

Il lavoro svolto ha avuto come primo scopo quello di verificare l'espressione e la localizzazione del peptide adrenomedullina e delle sue proteine recettoriali (CRLR e RAMP2) in colture cellulari primarie di TEC e timociti ottenute da timo umano neonatale, in quanto la presenza e la funzione del sistema adrenomedullinico era ampiamente stata verificata in molti tessuti ma mai nel timo umano. Questo studio si è successivamente proposto di valutare funzionalmente l'ADM nelle TEC. Il peptide ha un noto effetto antiapoptotico sui timociti di ratto (Belloni, Trejter et al. 2003), ma non esistono informazioni sulla funzione del sistema adrenomedullinico nelle TEC e sulle conseguenze di un suo eventuale malfunzionamento sulla popolazione linfocitaria T. Dato che la maturazione e la selezione delle cellule T richiedono una comunicazione costante tra TEC e timociti ("*Thymic cross-talk*") (Takahama 2006), è plausibile che la funzione timica dell'adrenomedullina possa riguardare entrambe le specie cellulari. Essendo tale *cross-talk* regolato da citochine ed ormoni rilasciati localmente nel microambiente timico (Hollander, Gill et al. 2006), in questo studio è stato valutato l'effetto dell'ADM sul rilascio di citochine (IL-6) prodotte dalle TEC e sono state raccolte informazioni meccanicistiche sull'effetto del peptide su tale rilascio.

La seconda parte di questa tesi ha avuto come obiettivo principale l'analisi di variazioni nell'espressione del peptide ADM e delle sue proteine recettoriali CRLR e RAMP2 nel timo di topi emizigoti per COMT e DAT, animali attualmente sotto valutazione come modello di disturbi psichiatrici caratterizzati da un'alterazione della stimolazione dopaminergica in alcune aree cerebrali (Papaleo, Lipska et al. 2012). Nei pazienti schizofrenici è stato riscontrato un innalzamento dei livelli plasmatici di ADM (Zoroglu, Herken et al. 2002); inoltre il peptide inibisce l'attività della tirosina idrossilasi e quindi la biosintesi di dopamina (Yuksel, Yurekli 2003).

Date queste evidenze, che fanno ipotizzare un ruolo di ADM nella patogenesi di malattie psichiatriche, è stata analizzato il sistema adrenomedullinico nel timo di questi modelli, per verificare se esistano variazioni nell'espressione dell'adrenomedullina e del suo recettore che possano supportare l'ipotesi della correlazione tra schizofrenia ed autoimmunità (Benros, Pedersen et al. 2014).

5. Materiali e metodi

5.1. Colture primarie

Il timo utilizzato per le colture primarie proviene da neonati con malformazioni cardiache congenite sottoposti a cardiocirurgia e timectomia presso il reparto di Cardiocirurgia Pediatrica del Policlinico Univesitario di Padova. Il tessuto timico è stato prelevato e immerso in sala operatoria in un apposito terreno di coltura (Minimum Essential Medium Eagle-MEM).

5.1.1. Terreni di coltura

Terreno di coltura per timociti	
88ml	Minimum Essential Medium Eagle MEM (Sigma)
1ml	Pen-Strep (GIBCO) (100 UI penicillina; 0,1 mg/ml streptomicina)
1ml	Glutamina (GIBCO) Concentrazione finale: 2 mM
10ml	Fetal Bovine Serum, FBS (GIBCO)

Terreno di coltura per TEC	
88ml	Minimum Essential Medium Eagle MEM (Sigma)
10ml	Fetal Bovine Serum, FBS (GIBCO)
1ml	Glutamina (GIBCO) Concentrazione finale: 2 mM
1ml	Pen-Strep (GIBCO) (100 UI penicillina; 0,1 mg/ml streptomicina)
100µl	Epithelial grown factor 100 µg/ml (Sigma) Concentrazione finale: 100 ng/ml
50µl	Idrocortisone 50 µM (Sigma)
1µl	Tossina colerica 100 µg/ml (Sigma)

Il terreno di coltura per le TEC permette di selezionare questa linea cellulare grazie alla presenza dell'idrocortisone e della tossina colerica: il primo promuove la proliferazione delle TEC, mentre la seconda causa la morte dei timociti (Galy 1996).

5.1.2. Allestimento delle colture cellulari

Il timo, posto nel terreno di raccolta, è stato sminuzzato in piccoli frammenti, eliminando la capsula fibrosa che lo riveste (De Martin, Paliuri et al. 2014). I piccoli frammenti di timo sono stati disposti all'interno di fiasche con il terreno di coltura per le TEC e posti nell' incubatore a 37°C e al 5% di CO₂.

Dopo qualche giorno le cellule TEC iniziano a migrare dal tessuto e ad aderire sulla fiasca attorno al frammento. Dopo approssimativamente 14 giorni è possibile effettuare un primo passaggio con trispina, utile soprattutto ad eliminare i frammenti di tessuto.

I timociti utilizzati per la co-coltura con le TEC sono cellule che non aderiscono e sono stati ottenuti direttamente dal terreno di raccolta dopo aver sminuzzato il tessuto. I globuli rossi contaminanti la sospensione di timociti sono stati eliminati utilizzando la soluzione red blood cell lysing buffer (Sigma-Adrich, Milan, Italy), seguendo le istruzioni riportate. I timociti ottenuti sono stati congelati in azoto liquido e utilizzati al momento opportuno. Il rapporto tra le concentrazioni di TEC e timociti utilizzata è stato di 1:100.

Le TEC sono state utilizzate per tutti gli esperimenti nei passaggi 2-5.

5.2. Modelli animali

Sono stati utilizzati in questo studio topi C57BL/6 adulti, sia maschi che femmine emizigoti per i geni DAT e/o COMT. I timi sono stati ottenuti da animali su cui erano stati condotti test comportamentali, allo scopo di validarli come modelli di disturbi psichiatrici (schizofrenia, ADHD, autismo). In particolare sono stati analizzati topi con quattro genotipi DATxCOMT:

- wild type per i geni DAT e COMT: *DAT+/+,COMT+/+*;
- wild type per DAT ed eterozigote per COMT: *DAT+/+,COMT+/-*;
- eterozigote per DAT e wild type per COMT: *DAT+/-,COMT+/+*;
- eterozigote per i geni DAT e COMT: *DAT+/-,COMT+/-*.

Il timo dei topi è stato prelevato e conservato a -80°C fino al momento dell'estrazione dell'mRNA.

Gli studi sono stati condotti su gruppi di 5 animali per ciascuno dei 4 genotipi per un totale di 20 animali maschi e 20 femmine.

5.3. SDS-PAGE (SDS-PolyAcrilamide Gel Electrophoresis)

L'SDS-PAGE è una elettroforesi su gel di poliacrilammide, che prevede l'utilizzo di un detergente denaturante, il sodio dodecil solfato (SDS), per l'analisi di estratti proteici. L'SDS interagisce con le proteine in un rapporto costante di 1,4 g di SDS per ogni grammo di proteina. La separazione avviene quindi sulla base della differenza fra i pesi molecolari visto che il rapporto massa/carica per ogni proteina denaturata con SDS rimane costante.

5.3.1. Soluzioni

Running Buffer 1X	
3,02g	TRIS 25mM
18,8g	Glicina
5ml	SDS 0,1%
Portare ad un 1 L	H ₂ O

Transfer buffer 1X	
3,02g	TRIS 25mM
14,4g	Glicina
Portare ad un 1 L	H ₂ O

Loading buffer 2X (Laemmli)	
0,004%	Blu di bromofenolo
4%	SDS
20%	Glicerolo

10%	2-Mercaptoetanol
0,125M	TRIS-HCl 1M pH 6,8
Portare a 10ml	H ₂ O

TBS-T Buffer	
12,11g	TRIS (100mM)
87,66g	NaCl (1,5M)
10ml	TWEEN (1%)
Portare ad un 1L	H ₂ O

5.3.2. Preparazione dei lisati proteici

Per ottenere un lisato proteico, a partire sia da cellule che da tessuto, il campione è stato incubato con una soluzione di Radio Immunoprecipitation Assay (RIPA) buffer ed inibitori delle proteasi (Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics, Germany).

RIPA Buffer 1X	
25mM	TRIS-HCl pH 7,4
150mM	NaCl
1%	IGEPAL
1%	Sodio Desossicolato
0,1%	SDS
1mM	EDTA pH 8
Portare a 0,1L	H ₂ O

Le TEC sono state staccate dalla fiasca mediante l'uso di uno scaper e centrifugate per 15 minuti 16000 giri a 4°C. Il surnatante contiene le proteine.

Il tessuto timico invece è stato frammentato con l'omogeneizzatore IKA T-25 digital ULTRA-TURRAX. Il surnatante ottenuto è stato centrifugato per 15 minuti a 1400 RPM a 4°C e poi per 5 minuti a 5000 RPM a 4°C. I lisati ottenuti sono stati conservati a -80°C.

I lisati **citoplasmatici** e **nucleari** sono stati ottenuti seguendo il protocollo ampiamente descritto in (Dimauro, Pearson et al. 2012). Brevemente, i lisati citoplasmatici sono stati lisati e centrifugati a 800 x g per 15 minuti a 4°C in un buffer contenente saccarosio 250 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 5 mM e inibitori di proteasi (Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics, Germany). Il surnatante ottenuto contiene le proteine citoplasmatiche mentre il precipitato contiene i nuclei. Questi ultimi sono stati lisati e centrifugati a 9.000 x g per 30 minuti a 4°C in un buffer contenente HEPES 20 mM pH 7.9, MgCl₂ 1.5 mM, NaCl 0.5 M, EDTA 0.2 mM, glicerolo 20% e Triton X-100 1%.

5.3.3. Quantificazione delle proteine mediante saggio dell'acido bicinconinico

Questa metodica permette di determinare la concentrazione proteica in una soluzione fino a 0,5 µg/ml. In condizioni alcaline gli ioni Cu²⁺ del solfato di rame formano un complesso con i legami peptidici delle proteine e vengono ridotti a Cu⁺. L'acido bicinconinico forma con il Cu⁺ un composto di color porpora, la cui intensità di colorazione è proporzionale alla quantità di proteine presenti. Il kit che è stato utilizzato (Thermo Scientific, MA, USA) è costituito da due soluzioni, la soluzione A, costituita da acido bicinconinico e la soluzione B, costituita da solfato di rame al 4%. Le due soluzioni, miscelate in proporzione 1:50, costituiscono la *Working Solution*, la quale è stata aggiunta ad ogni campione in proporzione 1:8, con una successiva incubazione di 30 minuti a 37°C.

Successivamente, l'assorbanza dei campioni è stata misurata a 562 nm allo spettrofotometro per piastre (Victor2 –Wallac). La concentrazione proteica è stata calcolata tramite regressione lineare da una retta di taratura, costruita utilizzando campioni di albumina di siero bovino (BSA) a concentrazione nota, fornita nel kit.

5.3.4. Valutazione dell'espressione proteica mediante Western blot

La tecnica del western blot permette il trasferimento di proteine dal gel ad un supporto inerte rappresentato dalla membrana di nitrocellulosa, carica di ioni positivi, la quale viene poi incubata con anticorpi specifici contro la proteina di interesse e successivamente analizzata mediante chemiluminescenza.

Innanzitutto, è necessario preparare il gel per l'elettroforesi, che contiene poliacrilamide ad una determinata percentuale. L'acrilamide polimerizza a poliacrilamide, un polimero che forma un setaccio in cui le proteine migrano ad una velocità inversamente proporzionale alla loro dimensione.

Il gel è composto da due parti:

- lo *stacking gel*, posto nella parte superiore, rappresenta la porzione in cui vengono creati i pozzetti di caricamento e avviene la focalizzazione campioni delle proteine in modo da permettere che queste arrivino uniformemente al fronte di corsa;
- il *running gel*, in cui avviene l'effettiva corsa elettroforetica e la separazione delle proteine contenute nel campione sulla base del loro peso molecolare.

Stacking gel 5%	
1,22ml	H ₂ O
250µl	Acrilamide 40%
500µl	TRIS 1M pH 6,8
20µl	SDS 20%
2,5µl	Temed
20µl	APS 10%

Running gel 10%	
1,64ml	H ₂ O
1,25ml	Acrilamide 40%
1,88ml	TRIS 1 M pH 8,8

25µl	SDS 20%
5µl	Temed
50µl	APS 10%

In un esperimento di western blot si individuano quattro fasi: caricamento del campione e corsa elettroforetica su gel, elettrotrasferimento, marcatura con anticorpi ed, infine, rilevamento delle bande.

I lisati proteici sono stati addizionati con il loading buffer 2X, secondo il protocollo di Laemmli (Laemmli 1970), bolliti per 5 minuti e caricati nei pozzetti del gel. In ogni pozzetto sono stati caricati 20 ug di proteine. Per seguire l'andamento della corsa elettroforetica, in ogni gel è stato caricato il marker *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher) che contiene una serie di bande proteiche colorate comprese tra i 170 KDa e i 10 kDa. Terminata la corsa elettroforetica è stato eseguito il trasferimento delle proteine su una membrana di nitrocellulosa (Amersham Biosciences, GE Healthcare, UK) utilizzando un amperaggio di 250mA per 90 minuti.

Dopo il trasferimento, la membrana è stata incubata con una soluzione di latte in polvere al 10% in TBS-T 1X per 60 minuti, per saturare i siti di legame aspecifico e prevenire quindi il legame dell'anticorpo a siti non antigenici. Successivamente, la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario overnight. Il giorno successivo si incuba la membrana con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi di rafano (HRP, horseradish peroxidase) per 90 minuti. Infine, le proteine d'interesse sono state evidenziate incubando la membrana con il substrato Luminata (EMD Millipore Corporation, MA, USA), contenente luminolo ed acqua ossigenata, che in presenza di HRP si ossida generando chemiluminescenza, la quale è stata visualizzata mediante lo strumento VersaDoc (BioRad).

Anticorpi primari: mouse monoclonal RAMP2 (diluizione 1:200), rabbit polyclonal CRLR (diluizione 1:200), mouse monoclonal β Actin (diluizione 1:1000), rabbit polyclonal I κ B- α (diluizione 1:500), rabbit polyclonal GAPDH (diluizione 1:500), goat polyclonal Lamin A/C (diluizione 1:500), tutti forniti dalla Santa Cruz

Biotechnology, USA diluiti in TBS-T 1X al 5% di latte in polvere. Le membrane sono state incubate overnight a 4°C.

Anticorpi secondari: rabbit anti-mouse (Abcam, Cambridge, UK), goat anti-rabbit (Millipore, USA), donkey anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, USA) con diluizione 1:5000 in TBS-T 1X.

5.4. Immunofluorescenza accoppiata a microscopia confocale

L'immunofluorescenza è una tecnica utilizzata per individuare l'espressione e la localizzazione di una specifica proteina nelle cellule mediante l'uso di uno specifico anticorpo primario ed un secondario; il primo si lega alla proteina, mentre il secondario è coniugato ad un fluoroforo. L'acquisizione della fluorescenza avviene tramite l'uso del microscopio confocale.

5.4.1. Microscopio confocale

Il microscopio confocale è un microscopio ottico che permette lo studio tridimensionale di strutture biologiche isolate o *in situ* e prevede l'uso di uno o più laser, sorgenti luminose molto intense utilizzate per eccitare le molecole. La luce emessa dai fluorofori eccitati dal laser viene catturata dalle lenti dell'obiettivo, attraversa lo specchio dicroico e raggiunge il fotomoltiplicatore, che trasforma l'intensità luminosa in un segnale elettrico di intensità proporzionale. Il segnale elettrico in uscita dal fotomoltiplicatore viene quindi digitalizzato ed inviato ad un computer che registra i valori di intensità misurati per ogni punto. Questi valori vengono utilizzati per ricostruire l'immagine: ogni punto corrisponde ad un pixel dello schermo, e l'intensità luminosa del punto verrà rappresentata da una corrispondente tonalità di grigio.

Il vantaggio del microscopio confocale consiste nella sua capacità di acquisire un solo piano focale, ovvero sezioni ottiche, e spostando il campione lungo l'asse verticale (Z) dopo ogni scansione, è possibile eseguire una serie di scansioni successive corrispondenti ai diversi piani focali, sempre più profondi all'interno del campione, permettendo la ricostruzione di un'immagine complessiva dell'intero volume scandito, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco.

5.4.2. Immunofluorescenza condotta sulle cellule TEC

Le TEC sono state seminate in piastre da 24 pozzetti aderenti ad un vetrino sterile, dopo aver effettuato un coating con polilisina (Poly-L-lysina, Sigma), utilizzata alla concentrazione di 20 µg/ml. Nel caso delle co-culture di TEC con i timociti questi ultimi sono stati aggiunti al terreno 24 ore prima dell'esperimento. Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% per 10 minuti, incubate con una soluzione di Triton allo 0,1% per 10 minuti e successivamente con FBS (Fetal Bovine Serum) per 10 minuti. L'incubazione con l'anticorpo primario è avvenuta a 37°C per 1h. Gli anticorpi sono stati utilizzati singolarmente per la ottenere una "singola fluorescenza" oppure due anticorpi per ottenere la "Doppia fluorescenza". L'anticorpo secondario è stato incubato per 1h a 37°C. Infine le cellule sono state lavate con una soluzione di RNasi 2mg/ml per 5 minuti e montate su vetrini porta-oggetto con Mowiol contenente 1µl/ml di ioduro di propidio (Sigma-Aldrich, Milan, Italy).

La fluorescenza è stata rilevata mediante microscopio confocale (C1), dotato di software Nikon EZ-C1, utilizzando un obiettivo 60X ad olio.

Anticorpi primari: rabbit polyclonal ADM, mouse monoclonal RAMP2, rabbit polyclonal CRLR (Santa Cruz Biotechnology, USA), diluiti 1:200 in PBS; rabbit polyclonal p65 (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluito 1:200 in PBS al 6% di FBS; rabbit polyclonal antibody acetyl-histone H3 (EMD Millipore Corporation, MA, USA). Esperimenti di controllo sono stati condotti con un altro anticorpo rabbit polyclonal anti-RAMP2 diretto contro un differente epitopo della proteina alla diluizione di 1 µg/ml (Abcam, Cambridge, UK).

Anticorpi secondari: rabbit blu (DyLight™405-conjugated affiniPure Donkey anti-rabbit IgG(H+L)Emax:421nm), mouse verde (DyLight™ 488-conjugated affiniPure Goat Anti-mouse IgG, Emax:518nm) e rabbit verde (DyLight™ 488-conjugated affiniPure F(ab') Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG(H+L), Emax:518nm) diluiti 1:500 in PBS forniti dalla Jackson, immunoResearch Labs Inc.

Per visualizzare le membrane plasmatiche è stato utilizzato un kit contenente il PKH67 fluorescent cell linker for general cell membrane labelling (Sigma-Aldrich, Milan, Italy). Prima di procedere con l'immunofluorescenza, le cellule sono state incubate per 1 minuto con una soluzione di PKH67 (fluorescente in verde). La reazione è stata bloccata con FBS.

5.5. Immunogold

L'immunogold è una tecnica utilizzata per evidenziare la localizzazione di una proteina tramite l'acquisizione di immagini bidimensionali con il microscopio elettronico (Roth 1996). Prevede l'uso di anticorpi primari, cui si legano anticorpi secondari coniugati a particelle di oro colloidale (l'anticorpo secondario biotinilato è legato a particelle d'oro coniugate alla streptavidina) di diversi diametri, compresi tra i 5 nm e i 40 nm. Le particelle sono direttamente rilevabili al microscopio elettronico poiché l'oro ha un'alta densità elettronica, che aumenta la dispersione di elettroni per dare ad alto contrasto una immagine bianca e nera. Inoltre, questa tecnica può essere usata per verificare la co-localizzazione di più proteine in uno stesso campione utilizzando particelle d'oro di diversi diametri.

5.5.1. Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

Il microscopio elettronico può essere a scansione (SEM), strumento usato soprattutto per lo studio delle superfici, o a trasmissione (TEM, *Transmission electron microscopy*), strumento che fornisce informazioni circa la struttura interna del campione analizzato. Nel TEM, gli elettroni prodotti da un filamento di tungsteno attraversano una sezione dove è stato creato precedentemente il vuoto, per poi passare completamente attraverso il campione. Questo deve avere uno spessore estremamente ridotto, compreso tra 50 e 500 nm. Il potere di risoluzione di questa tecnica è di circa 0.2 nm, cioè circa 500 mila volte maggiore di quello dell'occhio umano. Questo microscopio fornisce le immagini in bianco e nero.

5.5.2. Preparazione del campione ed immunogold

Il campione consiste in sezioni molto sottili, appoggiate su di un piccolo dischetto in rame o nichel (del diametro di pochi millimetri) fenestrato di solito a rete ("retino"), in modo che la sezione possa essere osservata tra le sue maglie senza interposizione di vetro (a differenza di quello che avviene nel microscopio ottico) che non sarebbe attraversato dagli elettroni. Questi ultimi infatti non possono attraversare materiali spessi.

La preparazione del campione è stata effettuata seguendo un protocollo complesso: le cellule una volta raccolte sono state fissate per un'ora a 4°C con paraformaldeide al 4% in glutaraldeide, disidratate a concentrazioni crescenti di etanolo (dal 70% al 100%) ed incluse in una resina LR-White (London Resin White), lasciata polimerizzare per 24 ore a 55°C. Il campione è stato tagliato in fettine da 100nm all'ultramicrotomo (Ultratome 5), strumento dotato di una lama di diamante con acqua distillata. Le fettine sono state disposte su griglie circolari di nichel.

Sulle griglie è stato possibile poi eseguire l'immunogold, il cui protocollo prevede: il fissaggio dei retini con la blocking solution (BSA 1%, TWEEN 0,01%, PBS 1%) per 1 ora, l'incubazione overnight a 4°C con gli anticorpi primari (mouse monoclonal anti-RAMP2 e rabbit polyclonal anti-CRLR forniti dalla Santa Cruz Biotechnology USA), diluiti 1:50 in PBS 1% e BSA 1%; l'incubazione con gli anticorpi secondari coniugati alle particelle di oro (anti-mouse IgG-Gold 5nm e anti-rabbit IgG-Gold 10nm forniti dalla Santa Cruz Biotechnology USA), diluiti 1:100 in PBS a temperatura ambiente. Infine i vetrini sono stati lavati con acetato di uranile 1% in acqua e citrato di piombo 1% in acqua, per far sì che gli elettroni vengano assorbiti dal campione (Mentlein, Buchholz et al. 1990).

I campioni sono stati analizzati al microscopio TEM (TEM FEI Technin Gp2 100KV).

5.6. Test del ciclico AMP (cAMP)

L'adenosina monofosfato ciclica (cAMP) è un secondo messaggero prodotto dalla degradazione dell'ATP da parte di un enzima, l'adenilatociclastasi, presente sulla membrana cellulare, la cui attivazione è controllata dalle proteine G.

Il dosaggio del cAMP è stato effettuato mediante un metodo immunoenzimatico (EIA, *Enzyme Immuno Assay*), il quale sfrutta in modo accoppiato una reazione immunologica per legare la molecola di ricerca ed una reazione enzimatica per produrre un segnale colorato misurabile con uno spettrofotometro.

Il dosaggio del cAMP è stato effettuato mediante il kit *Cyclic AMP EIA* (Cayman Chemical Company) ed è basato sulla competizione tra cAMP libero e coniugato con acetilcolinesterasi (cAMPTracer) per un numero limitato di siti di legame dell'anticorpo specifico per il cAMP. La quantità di cAMPTracer che è in grado di legarsi all'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione di cAMP nel pozzetto. Come rivelatore, è stato utilizzato il reagente di Ellman (acetiltiocolina e 5,5-ditio-di-2-Acido nitrobenzoico), che contiene il substrato di AChE. Il prodotto di questa reazione enzimatica ha un caratteristico colore giallo ed assorbe a 412 nm. L'intensità del segnale è proporzionale alla quantità di cAMPTracer legato al pozzetto, il quale è inversamente proporzionale alla quantità di cAMP libero presente nel pozzetto durante l'incubazione.

Le cellule sono state incubate per 10 minuti con concentrazioni crescenti di adrenomedullina (10^{-9} M, 10^{-8} M e 10^{-7} M) e con forskolina (10^{-4} M), il controllo positivo. In seguito le cellule sono state raccolte e centrifugate a 1000 x g per 10 minuti. Successivamente, l'assorbanza dei campioni è stata misurata a 412 nm allo spettrofotometro per piastre (Victor2 –Wallac).

5.7. Dosaggio del rilascio di IL-6 mediante ELISA test

Le TEC, in seguito a stimolazione con lipopolisaccaride (LPS), aumentano il rilascio di interleuchina 6 (von Patay, Loppnow et al. 1998), la quale può essere dosata mediante saggio enzimatico di tipo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Questo metodo permette di rilevare la presenza di una proteina usando uno o più anticorpi ad uno dei quali è legato un enzima; infatti l'antigene, immobilizzato in fase fluida in micropiastre da 96 pozzetti, si lega ad un anticorpo specifico, che è successivamente legato da un anticorpo secondario accoppiato ad un enzima. Un substrato dell'enzima produce un cambiamento di colore, dal quale si calcola la concentrazione di antigene.

5.7.1. Dosaggio IL-6 nelle TEC

Le TEC sono state trattate con LPS 10 µg/ml per 24 h e/o adrenomedullina 10^{-7} M per 4h o 24h in presenza di terreno di coltura contenente il 5% di FBS.

Il dosaggio dell'IL-6 prodotta dalle TEC è stato effettuato mediante il kit *Human IL-6 Instant ELISA*, (eBioscience, CA, USA). Il dosaggio è stato eseguito in pozzetti rivestiti con l'anticorpo monoclonale specifico per IL-6. Il protocollo prevede l'incubazione degli standard e dei campioni per 2h a 37°C, l'incubazione con l'anticorpo secondario biotinilato per 1h e 30minuti a temp.ambiente ed infine l'incubazione con streptavidina perossidata, enzima che si lega all'anticorpo biotinilato per 30minuti.

Dopo aggiunta di una soluzione di substrato, è stato ottenuto un prodotto di reazione blu. E' stata successivamente aggiunta una soluzione bloccante, che interrompe la reazione, e misurata l'assorbanza allo spettrofotometro a 495 nm. L'intensità di questo prodotto colorato è direttamente proporzionale alla concentrazione di IL-6 presente nel campione originale, calcolata sulla base di una retta di taratura.

5.8. Valutazione dell'espressione genica mediante Real Time PCR

L'RNA totale è stato estratto dai campioni di timo congelato con il kit SV Total Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI). La procedura prevede di omogenare con un Ultraturrax® il timo con il buffer di lisi (SV RNA Lysis Buffer) fornito nel kit. L'omogenato ottenuto è stato estratto aggiungendo la soluzione SV RNA Dilution Solution, scaldato a 70°C per 3 minuti e successivamente centrifugato a 13000 x g per 11 minuti. Il supernatante è stato lavato con etanolo al 95%, trasferito nelle colonnine per estrazione e quindi centrifugato a 13000 x g per 2 minuti. Il precipitato è stato lavato due volte con la soluzione di lavaggio (SV RNA Wash Solution) e centrifugato a 13000 x g per 2 minuti. A questo punto è stata aggiunta nella colonnina una soluzione contenente DNAasi, che idrolizza ed elimina i possibili frammenti di DNA che possono contaminare il campione interferendo con la metodica di amplificazione. La DNAasi è stata fatta agire per 15 minuti a temperatura ambiente e ne è stata quindi bloccata l'attività con un'opportuna soluzione (SV RNA Stop Solution). L'RNA purificato è stato eluito dalla colonnina con acqua sterile e priva di nucleasi (SV RNA Nuclease Free

Water) centrifugando la colonnina a 13000 x g per 3 minuti. La quantità di RNA ottenuta è stata misurata tramite NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). L'RNA è stato congelato e conservato a -80 °C.

Per la reazione di amplificazione stato utilizzato il kit One Step SYBR PrimeScript RT-PCR kit II (Takara, Japan).

Dapprima sono stati disegnati i primer specifici per l'amplificazione del cDNA dei geni di interesse, selezionati in modo che avessero un contenuto in CG non superiore al 60% ed una temperatura di fusione (T_m) intorno ai 58-60°C.

Primer utilizzati	
ADM	For: GAGGCAGAGGAACCCAAGAC Rev: ACCAGTTTATGAGCGGGCAA
RAMP2	For: CTCCCCTCCCTACCCACTTA Rev: CATTGTGTCGTGAGTCCCCT
CRLR	For: AGGCGTTTACCTGCACACACT Rev: CAGGAAGCAGAGGAAACCCC
IL-6	For: GCCAGAGTCCTTCAGAGAGAT Rev: CTTGGTCCTTAGCCACTCCT
β-actina	For: ATGTGGATCAGCAAGCAGGA Rev: AAGGGTGTAACGCAGCTCA

Per lo svolgimento dell'esperimento sono state utilizzate piastre da 48 pozzetti, in ognuno dei quali cui sono stati caricati 10 µl secondo il seguente schema:

Mix per la PCR	
5µl	2X One Step SYBR RT-PCR
0,4µl	PrimeScript 1 step Enzyme Mix 2
0,8µl	Primer For+Rev (entrambi 10µM)

0,2µl	ROX Reference Dye
10ng	RNA
Portare a 10µl	RNase free dH ₂ O

Il PrimeScript 1 step Enzyme Mix 2 comprende una retrotrascrittasi (RTase) che produce rapidamente il cDNA e una Taq polimerasi molto efficiente ad alte temperature che compie la reazione di PCR. Il reagente ROX Reference Dye è un normalizzatore della fluorescenza sfruttato dal software di analisi per distinguere la fluorescenza proveniente dal SYBR da quella interferente.

La reazione è stata eseguita con lo strumento Illumina Eco System, in cui è stato impostato il ciclo termico (Fig. 21) e fissata la normalizzazione con ROX mediante il software EcoStudy.

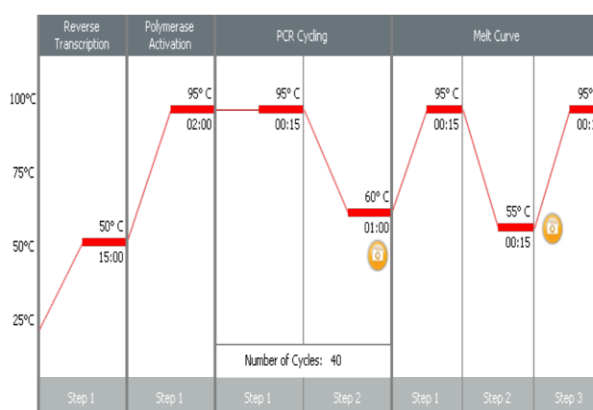


Figura 21: profilo termico della reazione.

5.8.1. Quantificazione relativa

Per verificare l'assenza di amplificazioni aspecifiche sono state osservate le curve di melting: esse vengono ottenute a seguito di un riscaldamento successivo alla reazione e registrano il progressivo calo di fluorescenza. La curva rileva la presenza di amplificati diversi da quelli ottenuti partendo dal messaggero di interesse ed eventuali dimeri di primer, indicati dalla comparsa di extra-picchi. L'altezza e ampiezza della curva fornisce invece un indice delle dimensioni e della quantità dell'amplificato d'interesse.

Durante la fase esponenziale della reazione è stato misurato il segnale soglia della fluorescenza e, mediante analisi delle curve, è stato determinato il numero di cicli di PCR necessari a ciascun campione per raggiungere il ciclo soglia (Cycle threshold, Ct). I valori di Ct diminuiscono in modo lineare all'aumentare della quantità di mRNA e vengono quindi usati per calcolare l'espressione relativa dell'mRNA.

Al Ct relativo all'mRNA di ciascuna proteina studiata è stato sottratto il Ct dell'*housekeeping gene* β -actina del medesimo campione, ottenendo un Δ Ct. Ai Δ Ct calcolati per i topi emizigoti per DAT e/o per COMT sono stati sottratti i Δ Ct degli animali wild type, ottenendo il valore $\Delta\Delta$ Ct. Con la formula matematica $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sono stati infine ottenuti i valori di espressione relativa dei geni di interesse, quantificando in tal modo variazioni dei livelli di espressione dei diversi genotipi rispetto ai campioni wild type.

5.9. Analisi statistica

I dati di questo studio sono stati analizzati con un test ANOVA ad una via seguito da test post-hoc di Dunnett o di Newman Keuls, mediante il software GraphPadPrism 5.0, quando appropriato. Un $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Le immagini ottenute al microscopio confocale sono state analizzate mediante il software ImageJ.

6. Risultati

6.1. Espressione e localizzazione del sistema adrenomedullinico nel timo umano neonatale

6.1.1. L'adrenomedullina e le sue proteine recettoriali RAMP2 e CRLR nelle cellule timiche epiteliali

Per verificare la presenza delle proteine RAMP2 ed ADM nelle TEC sono stati condotti esperimenti di doppia fluorescenza.

La *Fig.22* mostra il segnale fluorescente di queste proteine, ottenuto utilizzando anticorpi primari diretti contro gli aminoacidi 28-166 della proteina RAMP2 e contro la proteina ADM intera (FL-185). RAMP2 (*Fig.22, in verde*) si distribuisce nei compartimenti nucleare e perinucleare e non è rilevabile nella membrana citoplasmatica, mentre ADM (*in blue*) è localizzata nel compartimento citoplasmatico e sembra essere localizzata in vescicole. La doppia immunofluorescenza, apprezzabile nel *merged* dove i nuclei sono marcati con lo ioduro di propidio (*in rosso*), dimostra l'assenza di co-localizzazione tra le due proteine.

Quando l'anticorpo primario è stato sostituito con PBS, non è stata osservata nessuna reattività.

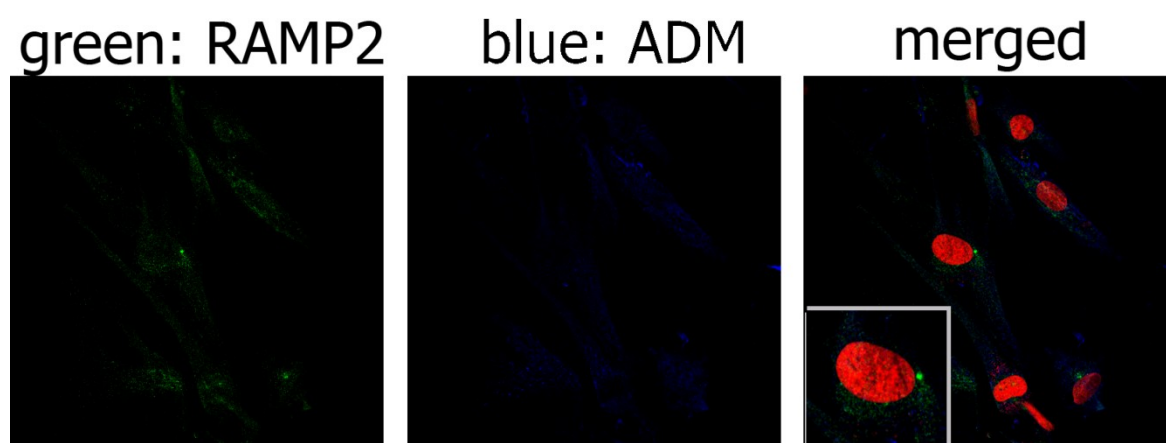


FIGURA 22: Immunofluorescenza della proteina RAMP2 (in verde) ed ADM (in blue) condotta sulle cellule TEC.

I risultati ottenuti per la proteina RAMP2 sono stati confermati anche utilizzando un anticorpo primario diretto verso un diverso epitopo (porzione N-terminale della proteina) (Fig. 23). Si conferma quindi che la proteina RAMP2 (*in verde*) ha localizzazione soprattutto nucleare.

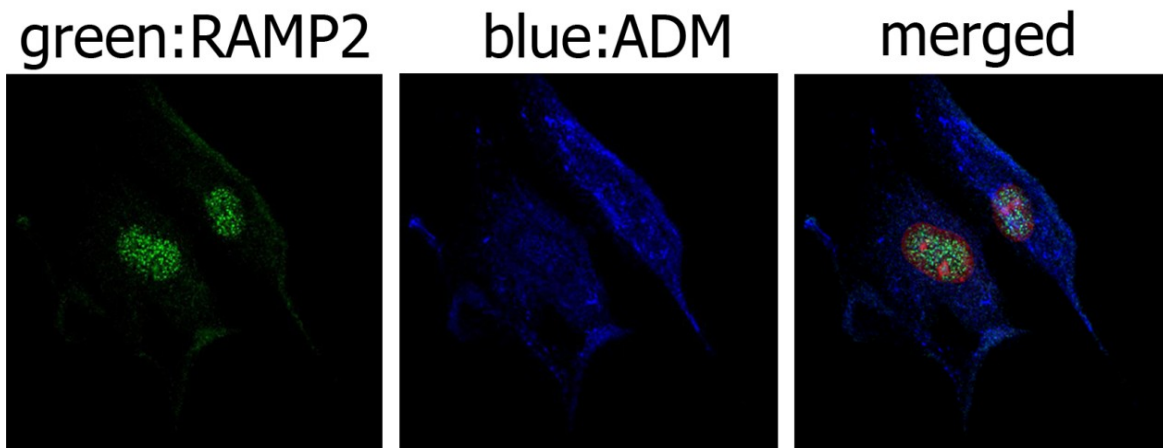


FIGURA 23: Immunofluorescenza della proteina RAMP2 (*in verde*) ed ADM (*in blue*) condotta sulle cellule TEC.

È stata successivamente valutata l'espressione delle proteine RAMP2 e CRLR, che formano il recettore funzionale per ADM, tramite doppia immunofluorescenza (Fig.24-A) e western blot (Fig.24-B). Come visibile in Fig.24-A, sia RAMP2 (*in verde*) che CRLR (*in blue*) sono distribuiti nel nucleo e nel citoplasma della cellula TEC, mentre solo il CRLR è localizzato anche a livello della membrana citoplasmatica, come evidenziato dalla freccia rossa in figura.

L'analisi al western blot effettuata sui lisati citoplasmatici e nucleari conferma la localizzazione di RAMP2 e CRLR. Le proteine GADPH e laminina A/C sono state utilizzate come controlli per la purezza delle frazioni: GADPH è presente solo nel citoplasma mentre la laminina A/C solo nei lisati nucleari. La proteina β -Actina è stata usata come controllo di caricamento.

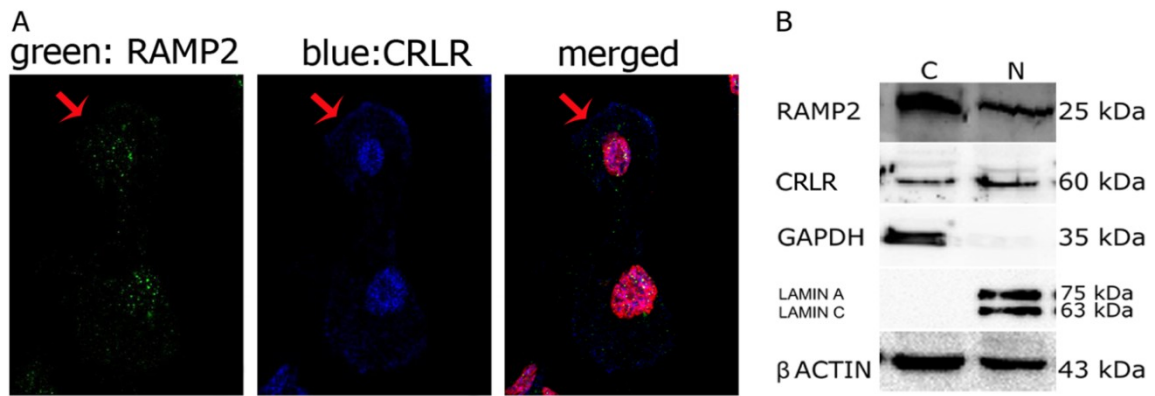


FIGURA 24: **A)** Immunofluorescenza della proteina RAMP2 (in verde) e CRLR (in blue) condotta sulle cellule TEC. La freccia indica la membrana plasmatica della cellula, dove si osserva solo il segnale del CRLR in blu. **B)** Western blot per RAMP2 e CRLR sulle frazioni citoplasmatiche (C) e nucleari (N). GAPDH e laminina A/C evidenziano la purezza delle frazioni.

La presenza del CRLR e l'assenza di RAMP2 nella membrana plasmatica delle TEC è stata confermata da una analisi di co-localizzazione delle due proteine con il marker di membrana plasmatica PKH67 (*Fig.25*). Il pannello A mostra la fluorescenza del PKH67 *in verde*, CRLR *in blue* e RAMP2 *in rosso*. L'analisi della co-localizzazione, effettuata mediante elaborazione della distribuzione di fluorescenza (*Fig.25-B*), ha confermato che a livello della membrana plasmatica l'intensità e la distribuzione di fluorescenza di PKH67 (*in verde*) e CRLR (*in blue*) sono identiche, mentre RAMP2 (*in rosso*) non presenta segnale fluorescente in questo compartimento cellulare.

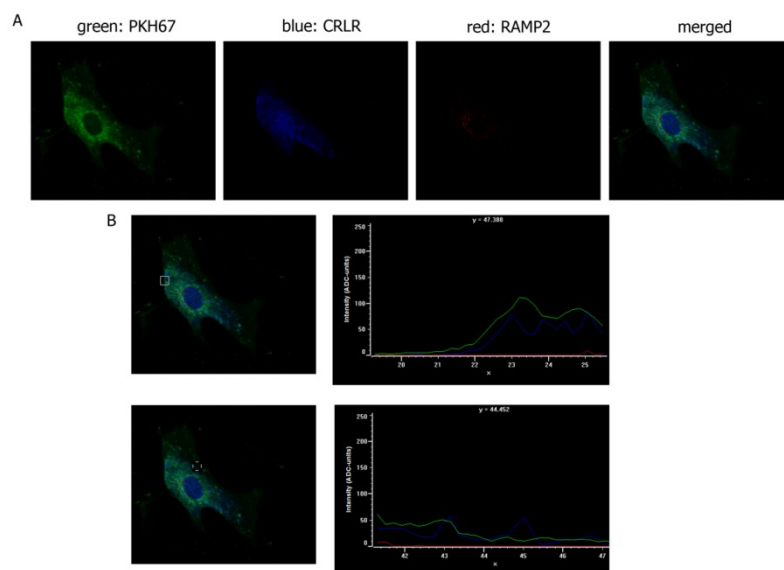


FIGURA 25: Distribuzione di PKH67, CRLR E RAMP2 nelle TEC. **A)** Immunofluorescenza del marcatore di membrana PKH67 (in verde), di CRLR (in blue) e di RAMP2 (in rosso). **B)** Distribuzione dell'intensità di fluorescenza (ADC units) di PKH67 (in verde), CRLR (in blue) e RAMP2 (in rosso) in due distinte regioni della membrana plasmatica (indicate da un riquadro).

Per confermare la presenza della proteina RAMP2 a livello nucleare (*Fig.26*) è stata effettuata una analisi di co-localizzazione con due marcatori nucleari quali l'acetil-istone H3 e lo ioduro di propidio. Il pannello A mostra la fluorescenza della proteina RAMP2 *in verde* e dell'acetyl-histone H3 *in blue*. Il merged mostra i due segnali sovrapposti e la marcatura nucleare dovuta allo ioduro di propidio (*in rosso*). Il grafico del pannello B rappresenta la distribuzione dei tre segnali di fluorescenza, dimostrando che essi hanno un'identica distribuzione all'interno del nucleo delle TEC, nonostante l'intensità di fluorescenza della proteina RAMP2 (*in verde*) risulti minore di quella dei due marker nucleari.

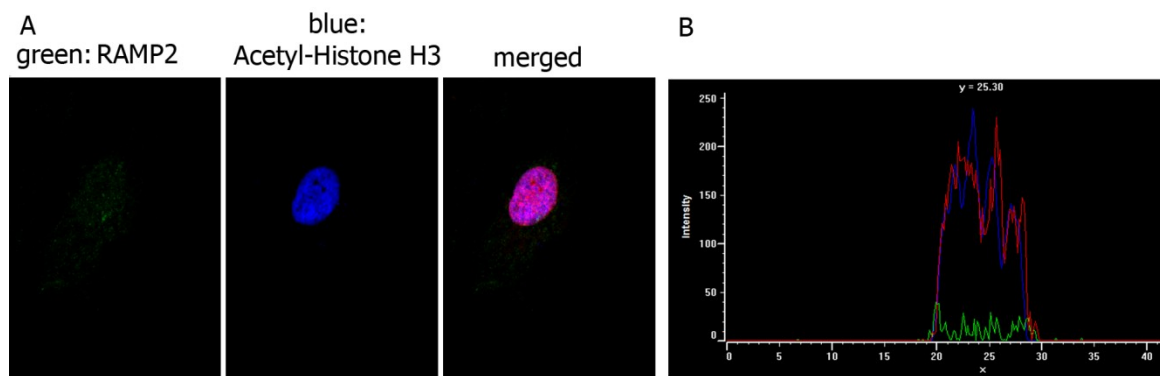


FIGURA 26: Distribuzione della proteina RAMP2 nelle TEC. **A)** Immunofluorescenza di RAMP2 (in verde), di acetil-istone H3 (in blue). I nuclei sono marcatori con ioduro di propidio (in rosso). **B)** Distribuzione dell'intensità di fluorescenza (ADC units) di RAMP2 (in verde), di acetil-istone H3 (in blue) e del propidio ioduro (in rosso).

A ulteriore conferma della localizzazione delle proteine recettoriali dell'ADM, sono stati effettuati esperimenti di immunogold sulle cellule TEC. Come evidenziato in *Fig. 27A* (e nello zoom in *figura 27C*), la proteina CRLR è presente a livello della membrana plasmatica, del citoplasma, della membrana nucleare e del nucleo della cellula TEC. La proteina RAMP2 è invece molto meno espressa del CRLR ed è visibile solo a livello della membrana nucleare e dentro al nucleo (*Fig. 27B* e

relativo zoom 27D). Quando l'anticorpo primario è stato sostituito con PBS, non è stata osservata nessuna reattività.

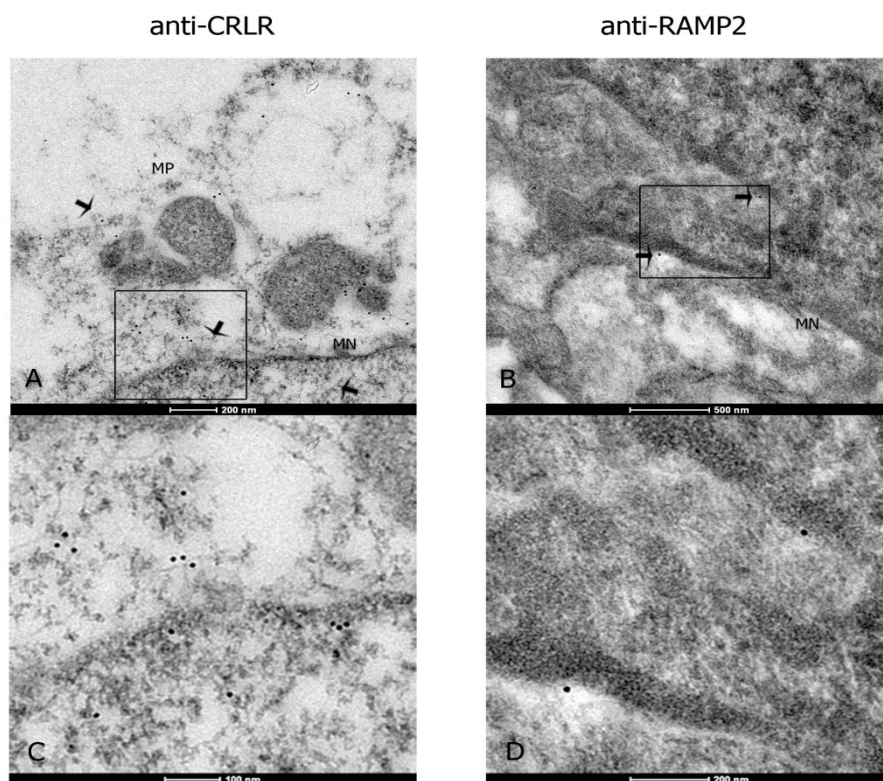


FIGURA 27: Immunogold su cellule TEC. Le immagini sono state acquisite al TEM. L'immunopositività è evidenziabile dai puntini neri delineati indicati dalle frecce. **A)** Porzione di TEC positiva all'anticorpo contro CRLR (indicato dalle frecce). **C)** Ingrandimento di un dettaglio della cellula TEC in figura A. **B)** TEC positive all'anticorpo contro RAMP2 (indicato dalle frecce). **D)** Ingrandimento di un dettaglio della cellula TEC in figura B. (MP: membrana plasmatica, MN: membrana nucleare).

6.1.2. L'adrenomedullina e le sue proteine recettoriali RAMP2 e CRLR nei timociti

Esperimenti di immunofluorescenza sono stati condotti anche su timociti posti in co-cultura con le TEC (Fig.28). ADM, RAMP2 e CRLR sono stati evidenziati solo in alcuni timociti (in figura segnati con frecce rosse), nei quali ADM (Fig.28-A, *in blue*) si trova nel citoplasma della cellula e RAMP2 (*in verde*) nel citoplasma e nel nucleo. CRLR (Fig.28-B, *in blue*) è stato osservato nel citoplasma, nel nucleo e nella membrana plasmatica. I timociti che non esprimono le proteine del sistema adrenomedullinico sono stati indicati con frecce bianche.

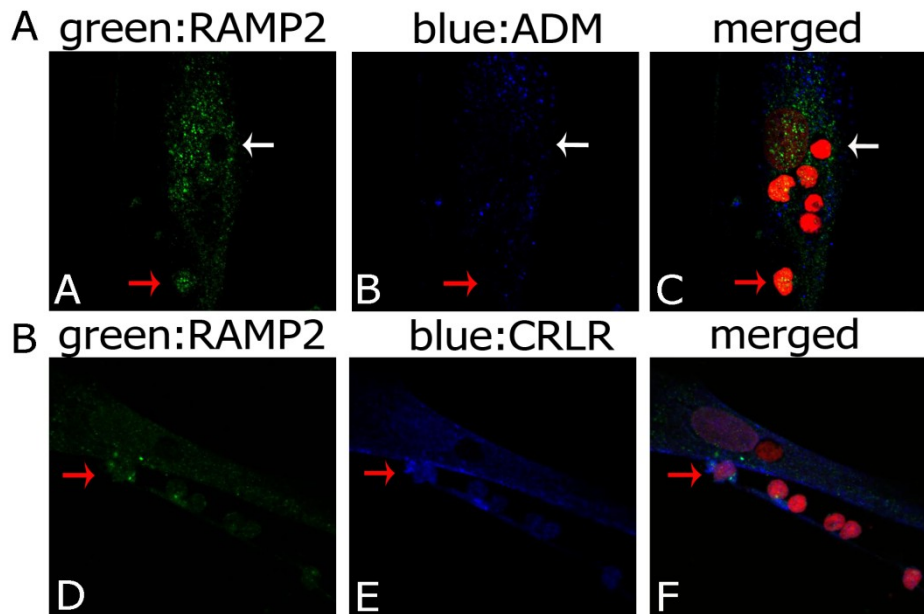


FIGURA 28: Immunofluorescenza dei timociti in co-coltura con le cellule TEC. I timociti segnati con le frecce rosse sono immunopositivi per le proteine del sistema adrenomedullinico, al contrario di quelli indicati con frecce bianche. **A)** Immunofluorescenza per RAMP2 (verde) ed ADM (blue); **B)** Immunofluorescenza per RAMP2 (verde) e CRLR (blue). I nuclei sono marcati con ioduro di propidio.

6.1.3. Misura della produzione di AMP ciclico (cAMP) da parte di TEC e timociti

Per confermare la mancanza della proteina RAMP2 a livello della membrana plasmatica, è stato effettuato il test del cAMP sia sulle cellule TEC (*Fig.29-A*) sia sui timociti (*B*).

L'incubazione delle cellule con ADM per 10 minuti non ha portato a nessun aumento della produzione di cAMP intracellulare, mentre nelle stesse cellule, stimulate con forskolina, un noto attivatore dell'adenilato ciclasi (Seamon, Daly 1986), si è registrato un significativo aumento di cAMP ($p < 0.001$).

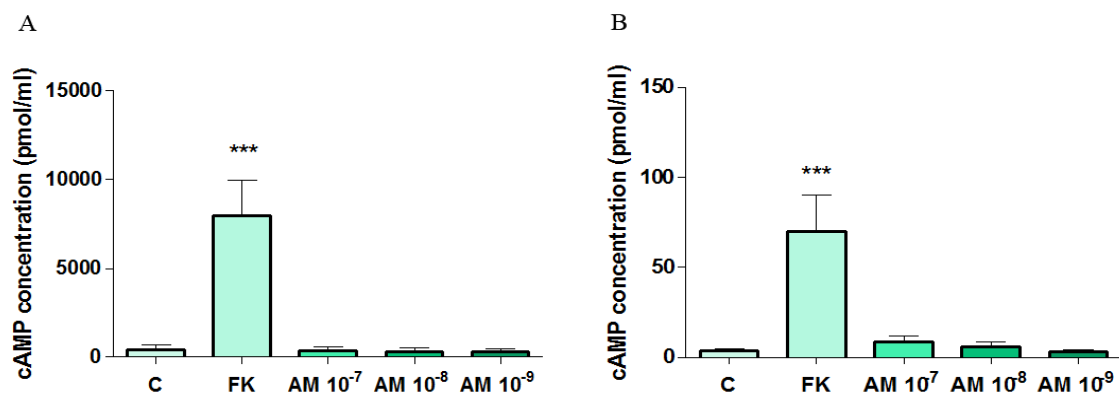


FIGURA 29: Produzione di cAMP (pmol/ml) da parte delle TEC **(A)** e dei timociti **(B)** dopo stimolazione con ADM (10⁻⁷M, 10⁻⁸M e 10⁻⁹M) e Forscolina 10⁻⁴M (FK). I valori sono medie ± SD (n = 3). *** P<0.001 vs controllo (C).

6.2. Effetto dell'adrenomedullina sul rilascio di IL-6 da parte delle TEC

Partendo da osservazioni condotte sulla microglia (Consonni, Morara et al. 2011), popolazione cellulare in cui è stato osservato che l'ADM riduce il rilascio di fattori infiammatori, tra i quali IL-6, indotto da Lipopolisaccaride (LPS), è stato verificato l'effetto del peptide sul rilascio di IL-6 nelle TEC.

Come evidenziato *in Figura 30*, il rilascio di IL-6 nel terreno di coltura aumenta significativamente dopo la stimolazione con LPS per 24 ore e tale aumento non è influenzato dalla co-incubazione con ADM. Al contrario, il pre-trattamento con ADM per 4 ore, applicato prima dello stimolo infiammatorio, riduce significativamente l'aumento di rilascio di IL-6, indotto da LPS. L'incubazione delle TEC con ADM per 4 ore non influenza la produzione basale di IL-6.

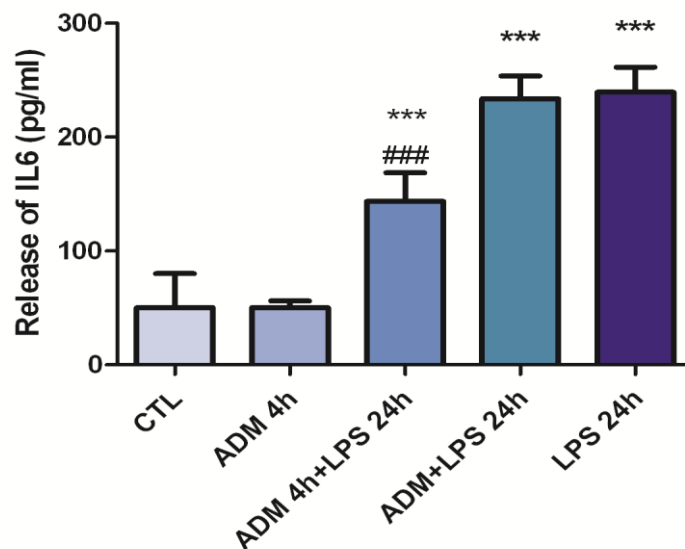


FIGURA 30: Rilascio di IL-6 nel terreno di coltura dalle TEC dopo stimolazione con ADM 4 ore, ADM 4 ore e successivamente LPS 24 ore, LPS con ADM 24 ore ed infine LPS 24 ore. (CTL: controllo; ADM 10^{-7} M; LPS: lipopolisaccaride $10\mu\text{g}/\text{mL}$). I valori sono medie \pm SD (n = 10). *** P<0.001 vs CTL; ### P<0.001 vs LPS 24h

6.3. Meccanismo d'azione dell'adrenomedullina: effetto del peptide sull'espressione della proteina p65 nelle TEC

È noto che l'espressione del gene dell'IL-6 sia regolata dall'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B (Fiorini, Marchisio et al. 2000). Per verificare se tale meccanismo è influenzato dall'ADM nelle TEC, è stata eseguita una immunofluorescenza per evidenziare la proteina p65, una delle proteine appartenenti alla famiglia di NF- κ B (Maguire, Collins et al. 2011).

Come evidenziato in *Figura 31*, l'espressione di p65 è essenzialmente correlata con il rilascio di IL-6 da parte delle TEC: l'incubazione con LPS aumenta significativamente l'espressione di p65, mentre l'ADM annulla questo aumento. Concordemente con quanto evidenziato in Fig. 30, tale effetto non si verifica quando il trattamento con LPS ed ADM viene effettuato contemporaneamente. L'ADM riduce inoltre l'espressione costitutiva di p65.

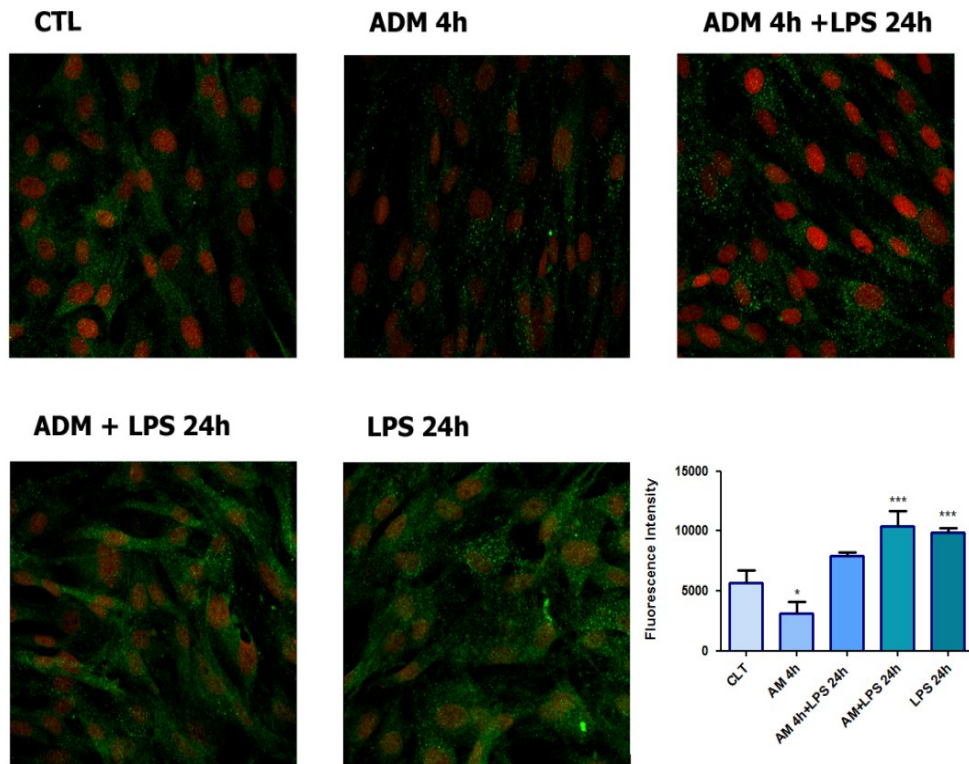


FIGURA 31: Immunofluorescenza per p65 (in verde) nelle TEC dopo stimolazione con ADM 4 ore, ADM 4 ore e successivamente LPS 24 ore, LPS con ADM 24 ore e LPS 24 ore (CTL:controllo; ADM $10^{-7}M$; LPS $10\mu g/mL$). I nuclei sono marcati con ioduro di propidio. Grafico riassuntivo dell'intensità di fluorescenza calcolata con il software ImageJ. *** $P < 0.001$ vs CTL; * $0,01 < P < 0.05$ vs CTL

6.4. Espressione del sistema adrenomedullinico nel timo dei topi eterozigoti per COMT e DAT

6.4.1. Espressione genica di ADM, RAMP2 e CRLR

Dall'analisi dell'espressione genica effettuata mediante Real-Time PCR, si osserva un aumento statisticamente significativo dei livelli di RAMP2 (*Fig.32-A*) nei maschi eterozigoti per il gene DAT e per entrambi i geni, mentre nelle femmine (*Fig.32-B*) si osserva una diminuzione di RAMP2 in tutti tre i genotipi mutati. I livelli di mRNA di ADM correlano sostanzialmente con l'andamento di RAMP2 sia nei maschi (*Fig.33-A*) che nelle femmine (*Fig.33-B*). I livelli di CRLR (*Fig.34*) presentano una marcata variabilità e mostrano una tendenza all'aumento nei genotipi mutati. La mancata correlazione tra i livelli di CRLR e di RAMP2 non è sorprendente, in quanto CRLR si combina anche con altre proteine per formare recettori per altri peptidi, come il CGRP.

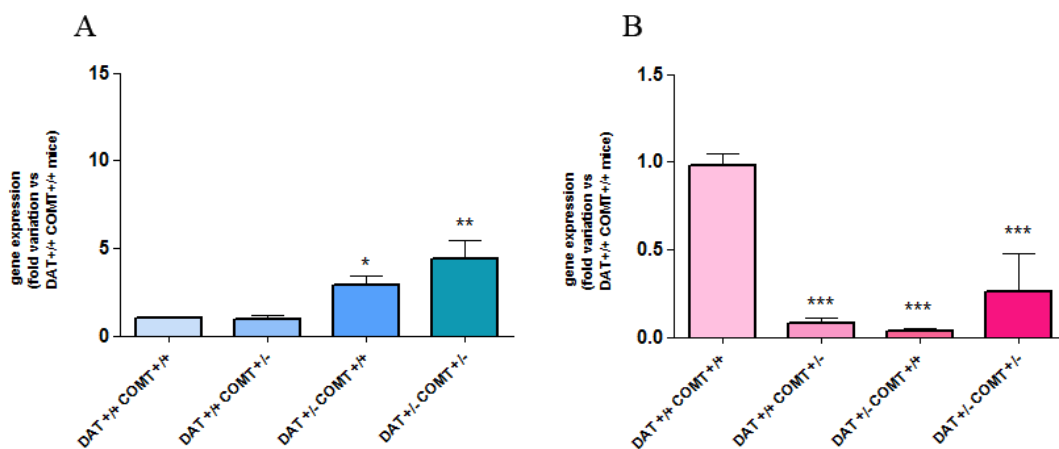


FIGURA 32: Quantificazione relativa dell'espressione genica di RAMP2 nei topi eterozigoti COMT/DAT maschi (**A**) e femmine (**B**). I valori sono medie \pm SD (n = 5). *** P<0.001 vs DAT+/+ COMT+/+; ** P<0.01 vs DAT+/+ COMT+/+; *P<0.05 vs DAT+/+ COMT+/+.

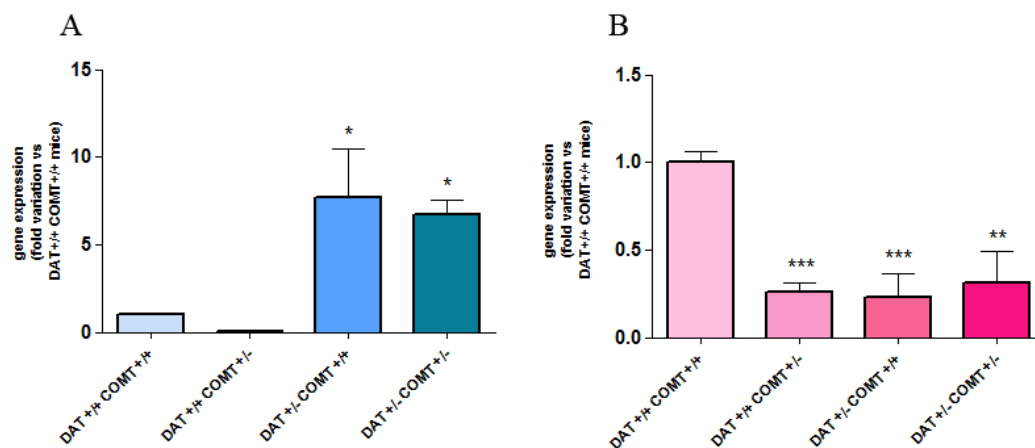


FIGURA 33: Quantificazione relativa dell'espressione genica di ADM nei topi eterozigoti COMT/DAT maschi (A) e femmine (B). I valori sono medie \pm SD (n = 5). *** P<0.001 vs DAT+/+ COMT+/+; ** P<0.01 vs DAT+/+ COMT+/+; *P<0.05 vs DAT+/+ COMT+/+.

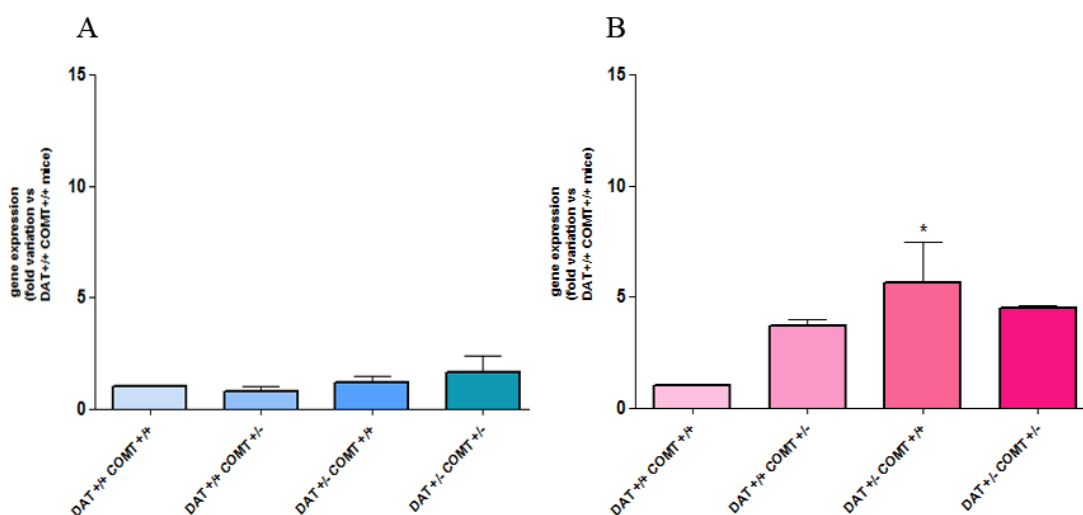


FIGURA 34: Quantificazione relativa dell'espressione genica di CRLR nei topi eterozigoti COMT/DAT maschi (A) e femmine (B). I valori sono medie \pm SD (n = 5). *P<0.05 vs DAT+/+ COMT+/+.

6.4.2. Espressione genica di IL-6

La valutazione dell'espressione genica di IL-6 è stata eseguita per evidenziare l'eventuale relazione fra l'espressione del sistema adrenomedullinico, l'attivazione di alcuni meccanismi di infiammazione e le anomalie del sistema dopaminergico che caratterizzano gli animali.

Come riportato in *Figura 35*, risulta evidente come i livelli di IL-6 nel timo dei topi maschi (*Fig.A*) diminuiscano nei genotipi che presentano alterazioni del sistema

dopaminergico, mentre nelle femmine (*Fig.B*) l'espressione aumenti in tutti i gruppi rispetto al wild type. Queste variazioni risultano significative per i gruppi DAT+/+COMT+/- e DAT+/-COMT+/- . L'andamento dei livelli di IL-6 quindi appare correlare inversamente con i livelli di RAMP2 e ADM sia nei maschi e nelle femmine.

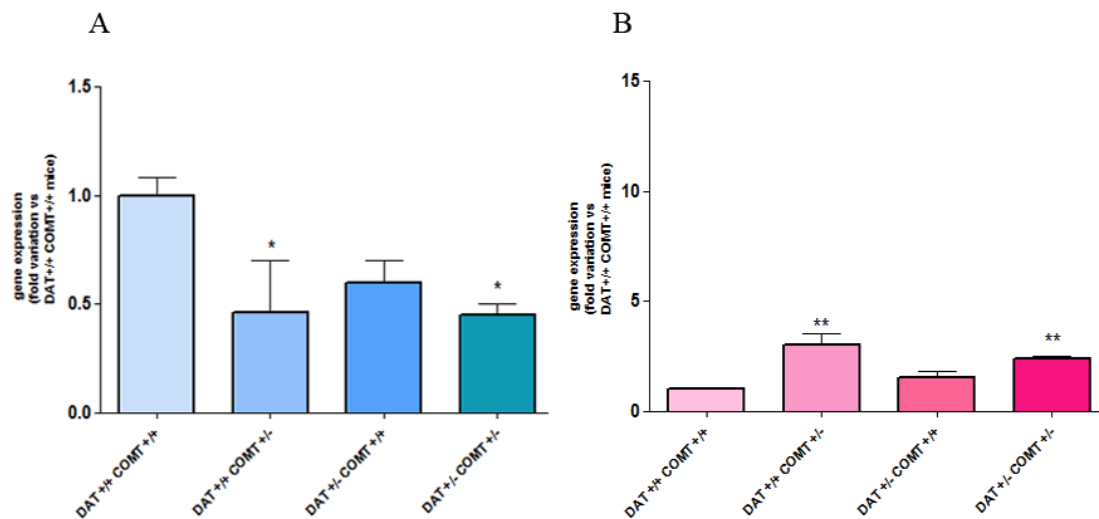


FIGURA 35: Quantificazione relativa dell'espressione genica di IL-6 nei topi eterozigoti COMT/DAT maschi (A) e femmine (B). I valori sono medie \pm SD (n = 5). ** P<0.01 vs DAT+/+ COMT+/+; *P<0.05 vs DAT+/+ COMT+/+.

6.4.3. Espressione proteica di I κ B α

Per valutare se nelle variazioni di espressione genica di IL-6 fosse implicata la via canonica di NF- κ B (Gerondakis, Fulford et al. 2014) è stata analizzata la sua attivazione, mediante la quantificazione della proteina I κ B α .

I κ B α è un inibitore di NF- κ B che, quando viene fosforilato, permette la traslocazione del dimero p50/RelA nel nucleo, con conseguente attivazione della trascrizione genica. Dalla quantificazione densitometrica ottenuta dall'analisi delle bande proteiche è visibile una tendenza all'aumento di I κ B α (a cui corrisponde una minore attivazione di NF- κ B) nei maschi geneticamente modificati, che raggiunge la significatività statistica nel genotipo DAT+/+COMT+/- e, viceversa, una diminuzione nelle femmine. Questi dati concordano con i livelli di IL-6, indicando una minore attivazione del fattore trascrizionale nei maschi geneticamente modificati (che mostrano livelli di IL-6 più bassi) e, al contrario, un

aumento di attività nelle femmine, che dimostrano un'elevata espressione genica di IL-6.

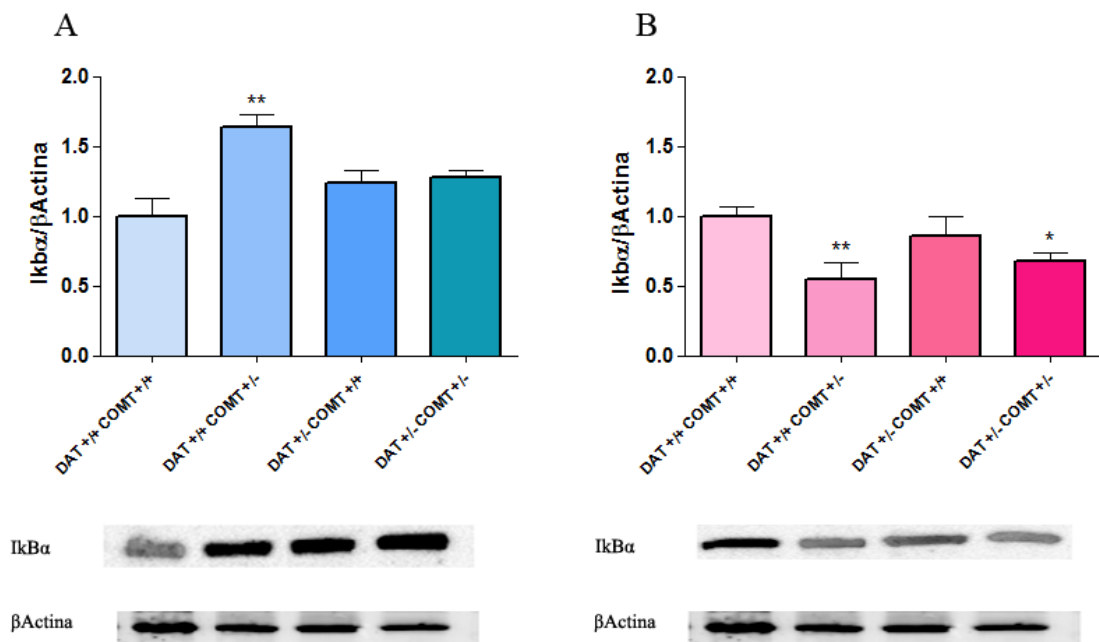


FIGURA 36: Livelli di espressione proteica di IκBα nei topi eterozigoti COMT/DAT maschi (A) e femmine (B). I valori sono medie ± SD (n = 5). ** P<0.01 vs DAT^{+/+} COMT^{+/+}; *P<0.05 vs DAT^{+/+} COMT^{+/+}.

7. Discussione

È già stato dimostrato che l'adrenomedullina e RAMP2 sono espresse nel tessuto timico di ratto, dove ADM promuove la proliferazione dei timociti di ratto e ne riduce l'apoptosi (Belloni, Trejter et al. 2003, Carraro, Albertin et al. 2002). In questa tesi, sono state analizzate per la prima volta l'espressione e la localizzazione di ADM e delle due proteine recettoriali CRLR e RAMP2 in colture primarie di cellule epiteliali timiche umane, le principali componenti del parenchima timico. Si sottolinea che tutte le colture cellulari esaminate in questo studio sono state ottenute da frammenti timici che comprendevano sia la porzione corticale che la midollare, ed erano, pertanto, colture miste di cellule epiteliali timiche sia corticali (cTEC) che midollari (mTEC). Tutte le cellule TEC che sono state analizzate esprimono ADM, CRLR e RAMP2. La distribuzione di ADM (clusters citoplasmatici) è simile a quella precedentemente osservata in ghiandole epiteliali (Welsch, Unterberger et al. 2002) e in mastociti (Belloni, Petrelli et al. 2006, Belloni, Guidolin et al. 2005), dove il peptide viene immagazzinato in granuli secretori e agisce mediante meccanismo autocrino/paracrino. E' possibile pertanto ipotizzare che ADM agisca in modo analogo anche nelle TEC, da cui potrebbe essere liberata per poi svolgere la sua funzione antiapoptotica o proliferativa sui timociti (effetto paracrino), o agire in modo autocrino sulle stesse TEC, probabilmente regolando la produzione di citochine (vedi più avanti).

Come già dimostrato in altre linee cellulari (Sexton, Poyner et al. 2009, Liverani, McLeod et al. 2012), la proteina RAMP2 è presente a livello intracellulare, nel citoplasma delle TEC. Tuttavia, contrariamente a quanto osservato in altri tipi di cellule (Sexton, Poyner et al. 2009, Kuwasako, Shimekake et al. 2000, Hay, Howitt et al. 2003), tale proteina è espressa anche nel nucleo, ma non nella membrana plasmatica delle TEC. L'assenza di RAMP2 a livello della membrana plasmatica, che impedisce la formazione di un recettore funzionale per ADM, è stata confermata dal mancato aumento della produzione di cAMP in seguito al trattamento delle cellule con ADM. La localizzazione citoplasmatica e nucleare di CRLR e RAMP2 nelle TEC suggerisce che la localizzazione intracellulare del recettore per ADM possa essere peculiare di queste cellule, nelle quali l'adrenomedullina potrebbe quindi agire mediante un nuovo meccanismo di

attivazione e trasduzione del segnale. L'espressione di CRLR a livello della membrana plasmatica non è incompatibile con l'assenza di RAMP2, poiché è noto che CRLR si associa anche con altre proteine, ad esempio RAMP1, per formare il recettore di membrana per peptidi correlati al gene per la calcitonina come il CGRP (McLatchie, Fraser et al. 1998). La presenza del recettore per il CGRP, costituito dal dimero CRLR/RAMP1, è stata effettivamente confermata nella membrana plasmatica delle TEC (Marie, Wakkach et al. 1999). La localizzazione intracellulare di un recettore collegato a proteine G come il CRLR, caratterizzato da sette domini transmembrana, non è sorprendente, poiché è stata dimostrata la presenza di numerosi GPCR in vari organelli subcellulari, in aggiunta alla loro canonica localizzazione nella membrana plasmatica. Le sedi di GPCR intracellulari sono l'apparato di Golgi, il reticolo endoplasmatico, il citoscheletro, la membrana nucleare e il nucleo (Zhou, Chaudry et al. 2001). È stato inoltre suggerito o addirittura dimostrato che GPCR localizzati nel nucleo hanno la funzione di regolare numerosi processi fisiologici, quali la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, la sintesi del DNA e la sua trascrizione, e alcune risposte infiammatorie (Boivin, Vaniotis et al. 2008). Rimangono da indagare i meccanismi molecolari attraverso i quali ADM svolge la sua funzione nelle cellule timiche epiteliali e come questa si colleghi alla capacità proliferativa e antiapoptotica che le è stata riconosciuta nei riguardi dei timociti (Belloni, Trejter et al. 2003, Carraro, Albertin et al. 2002).

A differenza delle cellule TEC, le quali sono tutte immunopositive ad ADM, RAMP2 e CRLR, l'espressione di queste proteine è stata evidenziata solo in alcuni timociti con una localizzazione intracellulare molto variabile e di diversa intensità. Bisogna considerare che nel timo sono presenti varie sottoclassi di timociti, suddivisi in funzione del loro grado di maturazione. Tale processo può essere monitorato dall'espressione degli antigeni di superficie CD4 e CD8: i timociti più immaturi, che non esprimono né il CD4 né il CD8 (denominati "*Doppio negativi*") seguono un processo differenziativo che li porta ad esprimere o l'antigene CD4 o l'antigene CD8 diventando timociti "*Singolo positivi*". Il diverso grado di maturazione del timocita potrebbe quindi influenzare l'espressione delle proteine ADM, RAMP2 e CRLR.

Lo sviluppo e la selezione delle cellule T non sono processi che riguardano esclusivamente i timociti stessi, in quanto i precursori delle cellule T richiedono un costante contatto e apporto dalle TEC (Takahama 2006) e, viceversa, la maturazione funzionale delle TEC è strettamente dipendente dai segnali istruttivi forniti dai timociti. Questo processo costituisce il cosiddetto "*Thymic cross-talk*", ed è un processo simbiotico e bidirezionale (Anderson, Jenkinson et al. 2006) (Alves, Huntington et al. 2010). È noto che questa forma di comunicazione è regolata da citochine e/o ormoni che vengono secreti localmente (Takahama 2006). Poiché è noto che ADM regola la secrezione di citochine, per esempio nelle cellule epiteliali dell'epidermide (Pleguezuelos, Hagi-Pavli et al. 2004), nella microglia (Consonni, Morara et al. 2011) e nei macrofagi (Wong, Cheung et al. 2005), è possibile ipotizzare che essa giochi un ruolo importante nel controllo del *cross-talk* tra TEC e timociti. Al fine di valutare il possibile coinvolgimento di ADM in questo processo, è stata verificata la sua capacità di influenzare il rilascio di IL-6 da parte delle TEC conseguente a stimolazione con LPS. È nota infatti la capacità di ADM di ridurre il rilascio di tale citochina da parte della microglia in seguito a stimoli infiammatori (Consonni, Morara et al. 2011). I dati presentati in questa tesi confermano tale osservazione, in quanto anche l'IL-6 rilasciata dalle TEC diminuisce significativamente in caso di pre-trattamento di queste cellule con ADM. Tale effetto non si verifica in caso di stimolazione contemporanea delle TEC con ADM e LPS, e ciò suggerisce che ADM possa attivare processi cellulari che rendono le TEC meno sensibili all'azione del lipopolisaccaride. Il ruolo dell'IL-6 nel timo non è ancora stato definitivamente chiarito. È noto che questa citochina ha un ruolo fisiologico nell'adesione tra TEC e timociti, evento indispensabile per la creazione del microambiente in cui avviene la maturazione delle cellule T (Fiorini, Marchisio et al. 2000). Una sua iperproduzione porta a stati infiammatori cronici, che hanno un ruolo nella patogenesi di malattie autoimmuni, come la miastenia grave (Cohen-Kaminsky, Devergne et al. 1993). Ulteriori studi sono comunque necessari per chiarire definitivamente il ruolo dell'IL-6 nella funzione timica e per definire il meccanismo mediante il quale ADM interviene in tali processi. Per verificare se la riduzione del rilascio di IL-6 sia dipendente da NF- κ B, è stata indagata anche l'espressione della proteina p65, uno dei fattori di trascrizione appartenenti a questa famiglia, in seguito al trattamento con ADM e/o LPS. Come noto in altre linee cellulari, è stato

confermato che il trattamento con LPS aumenta l'espressione di p65 nelle TEC. Tale aumento viene invece limitato dal pre-trattamento con ADM, confermando che la riduzione del rilascio di IL-6 deriva dalla capacità del peptide di intervenire nella via canonica di NF-kB, riducendo l'espressione di uno dei due fattori di trascrizione che traslocano nel nucleo nell'attivazione di questa via. Dato che questa famiglia di fattori di trascrizione è implicata nella selezione negativa delle cellule CD8⁺ e nello sviluppo delle Treg (Gerondakis, Fulford et al. 2014), è possibile ipotizzare che ADM abbia un ruolo nella maturazione di entrambi questi tipi di cellule e, quindi, sia nella risposta immunitaria cellulo-mediata che nello sviluppo della tolleranza immunologica e di fenomeni di autoimmunità.

In conclusione, i dati presentati nella prima parte di questo lavoro evidenziano per la prima volta che:

- ADM e le sue proteine recettoriali CRLR e RAMP2 sono espresse nelle cellule timiche epiteliali umane;
- il recettore per ADM non si trova nella membrana plasmatica, ma le sue due componenti CRLR e RAMP2 sono presenti nel citoplasma e nel nucleo. Questo risultato è coerente con recenti osservazioni (Boivin, Vaniotis et al. 2008, Bkaily, Avedanian et al. 2009) che un recettore collegato a proteine G possa essere localizzato nel nucleo e suggerisce che ADM possa partecipare alla regolazione delle funzioni timiche interagendo con un recettore localizzato all'interno della cellula;
- ADM riduce il rilascio di IL-6 operato dalle TEC, agendo sulla famiglia di fattori di trascrizione NF-kB. Il significato fisiopatologico di tale funzione rimane da chiarire.

Il lavoro preliminare svolto nel timo dei topi eterozigoti per DAT e/o COMT ha evidenziato significative differenze nell'espressione del sistema adrenomedullinico rispetto a topi wild type. Le variazioni di espressione del peptide ADM e della sua proteina recettoriale RAMP2 risultano inoltre essere dipendente dal genere: i maschi geneticamente modificati mostrano un generale aumento dell'espressione delle proteine del sistema adrenomedullinico, mentre nelle femmine dei medesimi gruppi si osserva una diminuzione dell'espressione delle stesse proteine.

La diversa localizzazione cerebrale interessata dalla iperstimolazione dopaminergica (striato, PFC o entrambe le aree) non sembra incidere significativamente sull'espressione del sistema adrenomedullinico: non vi sono differenze statisticamente significative nei profili di espressione genica tra i diversi genotipi mutati (DAT+/+ COMT+/-, DAT+/- COMT+/-, DAT+/- COMT+/-) sia nei maschi che nelle femmine. L'espressione di CRLR presenta una elevata variabilità interindividuale e non appare sottoposta a significative variazioni nei diversi genotipi. Anche in questo caso, la sua mancanza di correlazione con l'espressione di RAMP2 può derivare dal fatto che CRLR non si associa solo con questa proteina, ma anche, ad esempio, con RAMP1 per formare il recettore per CGRP (Cueille, Garel 2004). Coerentemente, l'espressione genica di IL-6 è significativamente ridotta nei maschi geneticamente modificati rispetto ai controlli, mentre nelle femmine si osserva un effetto opposto e quindi un aumento di IL-6 negli animali con iperespressione dopaminergica. L'espressione di IL-6 è in correlazione con l'attivazione del fattore trascrizionale NF-kB. Pertanto, nei diversi genotipi, le variazioni di attivazione di NF-kB e i livelli genici di IL-6 hanno un andamento inverso a quello del sistema adrenomedullinico (RAMP2 ed ADM). Inoltre la loro espressione dipende dal genere dell'animale: i maschi emizigoti per COMT e/o DAT sono caratterizzati da una maggiore espressione nel timo del sistema adrenomedullinico e una minore attivazione di NF-kB e una minore produzione di IL-6, mentre le femmine da una diminuzione del sistema adrenomedullinico, a cui corrispondono un aumento di IL-6 e una maggiore attivazione di NF-kB. In entrambi i casi, questo dato raggiunge la significatività statistica nei topi eterozigoti per COMT o per entrambi i geni COMT e DAT, suggerendo che il gene COMT sia maggiormente coinvolto nei meccanismi studiati.

Sono scarse le informazioni disponibili riguardo ad una correlazione tra ADM e le malattie psichiatriche: esiste un solo studio (Zoroglu, Herken et al. 2002) nel quale è stato dimostrato un aumento della concentrazione plasmatica di ADM in pazienti schizofrenici, ma non sono stati indagati effetti di genere. È noto anche che ADM inibisce la tirosina idrossilasi, e conseguentemente la biosintesi della dopamina, riducendone la concentrazione a livello cerebrale (Yuksel, Yurekli 2003). Pertanto è possibile ipotizzare che l'aumento dell'espressione di ADM nei topi maschi geneticamente modificati sia un meccanismo compensatorio volto a

ridurre la concentrazione di dopamina. Considerato che i livelli di estrogeni sono inversamente correlati alla concentrazione di ADM (Minamino, Shoji et al. 1995), questo potrebbe spiegare perché tale compensazione avvenga solo nei topi maschi e non nelle femmine. Gli estrogeni rivestono un ruolo importante nel controllo dei sintomi della schizofrenia, in quanto svolgono un'azione psicoprotettiva interagendo in modo diretto con il sistema dopaminergico (Sanchez, Bourque et al. 2010) mentre il testosterone sembra non svolgere alcuna attività regolatoria su tale sistema. Gli estrogeni inoltre proteggono dall'instaurarsi di fenomeni autoimmuni a livello del sistema nervoso centrale, attraverso la loro capacità di inibire la differenziazione delle cellule T in cellule Th1 e Th17. L'uso di estrogeni è attualmente in sperimentazione clinica per la terapia di malattie del sistema nervoso centrale (es. sclerosi multipla), in cui sia importante la componente infiammatoria (Lelu, Laffont et al. 2011). L'assenza di estrogeni rende i soggetti di sesso maschile più suscettibili alla schizofrenia, e rende l'insorgenza della malattia più precoce e i sintomi più gravi (Godar, Bortolato 2014). La schizofrenia è quindi una malattia multifattoriale, cui concorrono predisposizione genica e diversi fattori, tra cui il genere. Sulla base dei risultati ottenuti in questo studio, è possibile quindi affermare che ADM modula l'attività del fattore pro-infiammatorio NF-kB nel timo di modelli animali che presentano alterazioni del sistema dopaminergico in modo dipendente dal genere e che questa modulazione correla in modo inverso con l'espressione genica di ADM e RAMP2. Rimane da chiarire il ruolo del sistema adrenomedullinico timico nell'insorgenza e nello sviluppo di disturbi psichiatrici, in quanto teorie emergenti ipotizzano una correlazione tra disturbi del sistema immunitario e malattie psichiatriche (Benros, Pedersen et al. 2014). Devono essere inoltre chiariti i meccanismi molecolari che stanno alla base dell'effetto regolatorio esercitato da ADM sull'attivazione di NF-kB e la complessa rete di interazioni del peptide con gli ormoni sessuali e il sistema dopaminergico. Nell'ipotesi che ADM possa svolgere un ruolo in pazienti con disturbi della trasmissione dopaminergica si aprirebbe la possibilità di un'applicazione del peptide o dei suoi derivati a scopo farmacologico.

In conclusione, abbiamo dimostrato che il sistema adrenomedullinico è espresso nel timo, dove svolge un ruolo nella regolazione della secrezione di citochine, in

particolare di IL-6, agendo sulla via canonica di NF- κ B. Questa scoperta potrebbe aprire nuove strade nella terapia di patologie autoimmuni, considerata l'importanza di IL-6 nel bilancio tra Th17 e Treg, e fornire nuovi elementi sui meccanismi mediante i quali il sistema immunitario interviene nell'insorgenza di malattie psichiatriche.

8. Bibliografia

ALEXANDROPOULOS, K. and DANZL, N.M., 2012. Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development. *Immunologic research*, **54**(1-3), pp. 177-190.

ALVES, N.L., HUNTINGTON, N.D., MENTION, J.J., RICHARD-LE GOFF, O. and DI SANTO, J.P., 2010. Cutting Edge: a thymocyte-thymic epithelial cell cross-talk dynamically regulates intrathymic IL-7 expression in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **184**(11), pp. 5949-5953.

ANDERSON, G., JENKINSON, W.E., JONES, T., PARNELL, S.M., KINSELLA, F.A., WHITE, A.J., PONGRAC'Z, J.E., ROSSI, S.W. and JENKINSON, E.J., 2006. Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. *Immunological reviews*, **209**, pp. 10-27.

BAI, M., PAPOUDOU-BAI, A., KARATZIAS, G., DOUKAS, M., GOUSSIA, A., STEFANAKI, K., RONTOGIANNI, D., DALAVANGA, Y., AGNANTIS, N.J. and KANAVAROS, P., 2008. Immunohistochemical expression patterns of neural and neuroendocrine markers, the neural growth factor receptors and the beta-tubulin II and IV isotypes in human thymus. *Anticancer Research*, **28**(1A), pp. 295-303.

BELLONI, A.S., GUIDOLIN, D., SALMASO, R., BOVA, S., ROSSI, G.P. and NUSSDORFER, G.G., 2005. Adrenomedullin, ANP and BNP are colocalized in a subset of endocrine cells in the rat heart. *International journal of molecular medicine*, **15**(4), pp. 567-571.

BELLONI, A.S., PETRELLI, L., GUIDOLIN, D., DE TONI, R., BOVA, S., SPINAZZI, R., GEROSA, G., ROSSI, G.P. and NUSSDORFER, G.G., 2006. Identification and localization of adrenomedullin-storing cardiac mast cells. *International journal of molecular medicine*, **17**(5), pp. 709-713.

BELLONI, A.S., TREJTER, M., MALENDOWICZ, L.K. and NUSSDORFER, G.G., 2003. Adrenomedullin stimulates proliferation and inhibits apoptosis of immature rat thymocytes cultured in vitro. *Peptides*, **24**(2), pp. 295-300.

BENROS, M.E., PEDERSEN, M.G., RASMUSSEN, H., EATON, W.W., NORDENTOFT, M. and MORTENSEN, P.B., 2014. A nationwide study on the risk of autoimmune diseases in individuals with a personal or a family history of schizophrenia and related psychosis. *The American Journal of Psychiatry*, **171**(2), pp. 218-226.

BKAILY, G., AVEDANIAN, L. and JACQUES, D., 2009. Nuclear membrane receptors and channels as targets for drug development in cardiovascular diseases. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, **87**(2), pp. 108-119.

BOIVIN, B., VANIoTIS, G., ALLEN, B.G. and HEBERT, T.E., 2008. G protein-coupled receptors in and on the cell nucleus: a new signaling paradigm? *Journal of receptor and signal transduction research*, **28**(1-2), pp. 15-28.

CARRARO, G., ALBERTIN, G., BOVA, S., MALENDOWICZ, L.K., BELLONI, A.S. and NUSSDORFER, G.G., 2002. Differential expression of adrenomedullin and its receptors in newborn and adult rat thymus. *International journal of molecular medicine*, **10**(6), pp. 767-771.

COHEN-KAMINSKY, S., DEVERGNE, O., DELATTRE, R.M., KLINGEL-SCHMITT, I., EMILIE, D., GALANAUD, P. and BERRIH-AKNIN, S., 1993. Interleukin-6 overproduction by cultured thymic epithelial cells from patients with myasthenia gravis is potentially involved in thymic hyperplasia. *European cytokine network*, **4**(2), pp. 121-132.

COLIC, M. and DRABEK, D., 1991. Expression and function of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on rat thymic macrophages in culture. *Immunology letters*, **28**(3), pp. 251-257.

CONSONNI, A., MORARA, S., CODAZZI, F., GROHOVAZ, F. and ZACCHETTI, D., 2011. Inhibition of lipopolysaccharide-induced microglia activation by calcitonin gene related peptide and adrenomedullin. *Molecular and cellular neurosciences*, **48**(2), pp. 151-160.

CUEILLE, C. and GAREL, J.M., 2004. RAMPs and G protein coupled receptors. *Medecine sciences : M/S*, **20**(8-9), pp. 773-778.

DE MARTIN, S., PALIURI, G., BELLONI, A., ORSO, G., ZANARELLA, E., STELLIN, G., MILANESI, O., BASSO, G., RUGA, E.M., FRASSON, C., GABBIA, D., PERDONCIN, G., PALATINI, P. and BOVA, S., 2014. Expression and distribution of the adrenomedullin system in newborn human thymus. *PloS one*, **9**(5), pp. e97592.

DIMAURO, I., PEARSON, T., CAPOROSSO, D. and JACKSON, M.J., 2012. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC research notes*, **5**, pp. 513-0500-5-513.

ELMER, B.M. and MCALLISTER, A.K., 2012. Major histocompatibility complex class I proteins in brain development and plasticity. *Trends in neurosciences*, **35**(11), pp. 660-670.

ETO, T., 2001. A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides*, **22**(11), pp. 1693-1711.

ETO, T., KATO, J. and KITAMURA, K., 2003. Regulation of production and secretion of adrenomedullin in the cardiovascular system. *Regulatory peptides*, **112**(1-3), pp. 61-69.

FERNANDEZ, E., VICENTE, A., ZAPATA, A., BRERA, B., LOZANO, J.J., MARTINEZ, C. and TORIBIO, M.L., 1994. Establishment and characterization of cloned human thymic epithelial cell lines. Analysis of adhesion molecule expression and cytokine production. *Blood*, **83**(11), pp. 3245-3254.

FERREIRA, T.B., BARROS, P.O., TEIXEIRA, B., CASSANO, T., CENTURIAO, N., KASAHARA, T.M., HYGINO, J., VASCONCELOS, C.C., FILHO, H.A., ALVARENGA, R., WING, A.C., ANDRADE, R.M., ANDRADE, A.F. and BENTO, C.A., 2014. Dopamine favors expansion of glucocorticoid-resistant IL-17-producing T cells in multiple sclerosis. *Brain, behavior, and immunity*, **41**, pp. 182-190.

FIORINI, E., MARCHISIO, P.C., SCUPOLI, M.T., POFTE, O., TAGLIABUE, E., BRENTGANI, M., COLOMBATTI, M., SANTINI, F., TRIDENTE, G. and RAMARLI, D., 2000. Adhesion of immature and mature T cells induces in human thymic epithelial cells (TEC) activation of IL-6 gene transcription factors (NF-kappaB and NF-IL6) and IL-6 gene expression: role of alpha3beta1 and alpha6beta4 integrins. *Developmental immunology*, **7**(2-4), pp. 195-208.

GALY, A.H., 1996. Human thymic epithelial cell cultures. *Methods in Molecular Medicine*, **2**, pp. 111-119.

GALY, A.H. and SPITS, H., 1992. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **149**(3), pp. 775-782.

GAMEIRO, J., NAGIB, P. and VERINAUD, L., 2010. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell adhesion & migration*, **4**(3), pp. 382-390.

GERONDAKIS, S., FULFORD, T.S., MESSINA, N.L. and GRUMONT, R.J., 2014. NF-kappaB control of T cell development. *Nature immunology*, **15**(1), pp. 15-25.

GILMORE, T.D., 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, **25**(51), pp. 6680-6684.

GIROS, B., JABER, M., JONES, S.R., WIGHTMAN, R.M. and CARON, M.G., 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, **379**(6566), pp. 606-612.

GODAR, S.C. and BORTOLATO, M., 2014. Gene-sex interactions in schizophrenia: focus on dopamine neurotransmission. *Frontiers in behavioral neuroscience*, **8**, pp. 71.

GOGOS, J.A., MORGAN, M., LUINE, V., SANTHA, M., OGAWA, S., PFAFF, D. and KARAYIORGOU, M., 1998. Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(17), pp. 9991-9996.

- GONZALEZ-REY, E., CHORNY, A., O'VALLE, F. and DELGADO, M., 2007. Adrenomedullin protects from experimental arthritis by down-regulating inflammation and Th1 response and inducing regulatory T cells. *The American journal of pathology*, **170**(1), pp. 263-271.
- HATTORI, Y., MIMURA, A., AKIMOTO, K. and KASAI, K., 1999. Transcriptional regulation of adrenomedullin in rat vascular smooth muscle cells. *Molecular and cellular endocrinology*, **147**(1-2), pp. 143-147.
- HAY, D.L., HOWITT, S.G., CONNER, A.C., SCHINDLER, M., SMITH, D.M. and POYNER, D.R., 2003. CL/RAMP2 and CL/RAMP3 produce pharmacologically distinct adrenomedullin receptors: a comparison of effects of adrenomedullin22-52, CGRP8-37 and BIBN4096BS. *British journal of pharmacology*, **140**(3), pp. 477-486.
- HODGE, D.R., HURT, E.M. and FARRAR, W.L., 2005. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, **41**(16), pp. 2502-2512.
- HOFFMANN, A. and BALTIMORE, D., 2006. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunological reviews*, **210**, pp. 171-186.
- HOLLANDER, G., GILL, J., ZUKLYS, S., IWANAMI, N., LIU, C. and TAKAHAMA, Y., 2006. Cellular and molecular events during early thymus development. *Immunological reviews*, **209**, pp. 28-46.
- HSIEH, C.S., LEE, H.M. and LIO, C.W., 2012. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature reviews.Immunology*, **12**(3), pp. 157-167.
- ISHIMITSU, T., MIYATA, A., MATSUOKA, H. and KANGAWA, K., 1998. Transcriptional regulation of human adrenomedullin gene in vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **243**(2), pp. 463-470.
- JIMI, E., STRICKLAND, I., VOLL, R.E., LONG, M. and GHOSH, S., 2008. Differential role of the transcription factor NF-kappaB in selection and survival of CD4+ and CD8+ thymocytes. *Immunity*, **29**(4), pp. 523-537.
- KAPAS, S., MARTINEZ, A., CUTTITTA, F. and HINSON, J.P., 1998. Local production and action of adrenomedullin in the rat adrenal zona glomerulosa. *The Journal of endocrinology*, **156**(3), pp. 477-484.
- KATO, J., TSURUDA, T., KITA, T., KITAMURA, K. and ETO, T., 2005. Adrenomedullin: a protective factor for blood vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **25**(12), pp. 2480-2487.
- KITAMURA, K., KANGAWA, K., KAWAMOTO, M., ICHIKI, Y., NAKAMURA, S., MATSUO, H. and ETO, T., 2012. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. 1993. *Biochemical and biophysical research communications*, **425**(3), pp. 548-555.

KNAB, A.M. and LIGHTFOOT, J.T., 2010. Does the difference between physically active and couch potato lie in the dopamine system? *International journal of biological sciences*, **6**(2), pp. 133-150.

KUWASAKO, K., SHIMEKAKE, Y., MASUDA, M., NAKAHARA, K., YOSHIDA, T., KITAURA, M., KITAMURA, K., ETO, T. and SAKATA, T., 2000. Visualization of the calcitonin receptor-like receptor and its receptor activity-modifying proteins during internalization and recycling. *The Journal of biological chemistry*, **275**(38), pp. 29602-29609.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), pp. 680-685.

LE, P.T., LAZORICK, S., WHICHARD, L.P., YANG, Y.C., CLARK, S.C., HAYNES, B.F. and SINGER, K.H., 1990. Human thymic epithelial cells produce IL-6, granulocyte-monocyte-CSF, and leukemia inhibitory factor. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **145**(10), pp. 3310-3315.

LELU, K., LAFFONT, S., DELPY, L., PAULET, P.E., PERINAT, T., TSCHANZ, S.A., PELLETIER, L., ENGELHARDT, B. and GUERY, J.C., 2011. Estrogen receptor alpha signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **187**(5), pp. 2386-2393.

LEWIS, L.K., SMITH, M.W., YANDLE, T.G., RICHARDS, A.M. and NICHOLLS, M.G., 1998. Adrenomedullin(1-52) measured in human plasma by radioimmunoassay: plasma concentration, adsorption, and storage. *Clinical chemistry*, **44**(3), pp. 571-577.

LIVERANI, E., MCLEOD, J.D. and PAUL, C., 2012. Adrenomedullin receptors on human T cells are glucocorticoid-sensitive. *International immunopharmacology*, **14**(1), pp. 75-81.

MAGGIO, M., GURALNIK, J.M., LONGO, D.L. and FERRUCCI, L., 2006. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, **61**(6), pp. 575-584.

MAGUIRE, O., COLLINS, C., O'LOUGHLIN, K., MIECZNIKOWSKI, J. and MINDERMAN, H., 2011. Quantifying nuclear p65 as a parameter for NF-kappaB activation: Correlation between ImageStream cytometry, microscopy, and Western blot. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, **79**(6), pp. 461-469.

MARIE, J., WAKKACH, A., COUDRAY, A., CHASTRE, E., BERRIH-AKNIN, S. and GESPACH, C., 1999. Functional expression of receptors for calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and vasoactive intestinal peptide in the human thymus and thymomas from myasthenia gravis patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **162**(4), pp. 2103-2112.

- MCLATCHIE, L.M., FRASER, N.J., MAIN, M.J., WISE, A., BROWN, J., THOMPSON, N., SOLARI, R., LEE, M.G. and FOORD, S.M., 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, **393**(6683), pp. 333-339.
- MENTLEIN, R., BUCHHOLZ, C. and KRISCH, B., 1990. Somatostatin-binding sites on rat telencephalic astrocytes. Light- and electron-microscopic studies in vitro and in vivo. *Cell and tissue research*, **262**(3), pp. 431-443.
- MINAMINO, N., SHOJI, H., SUGO, S., KANGAWA, K. and MATSUO, H., 1995. Adrenocortical steroids, thyroid hormones and retinoic acid augment the production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **211**(2), pp. 686-693.
- MOCCHEGIANI, E., GIACCONI, R., MUZZIOLI, M., GASPARINI, N., PROVINCIALI, L., SPAZZAFUMO, L. and LICASTRO, F., 2000. Different age-related effects of thymectomy in myasthenia gravis: role of thymoma, zinc, thymulin, IL-2 and IL-6. *Mechanisms of ageing and development*, **117**(1-3), pp. 79-91.
- OEHLER, M.K., NORBURY, C., HAGUE, S., REES, M.C. and BICKNELL, R., 2001. Adrenomedullin inhibits hypoxic cell death by upregulation of Bcl-2 in endometrial cancer cells: a possible promotion mechanism for tumour growth. *Oncogene*, **20**(23), pp. 2937-2945.
- PAPALEO, F., LIPSKA, B.K. and WEINBERGER, D.R., 2012. Mouse models of genetic effects on cognition: relevance to schizophrenia. *Neuropharmacology*, **62**(3), pp. 1204-1220.
- PEDERSEN, H., ANDERSEN, A. and ROPKE, C., 1994. Human thymic epithelial cells in serum-free culture: changes in cytokine production in primary and successive culture periods. *Immunology letters*, **41**(1), pp. 43-48.
- PEDRENO, M., MORELL, M., ROBLEDO, G., SOUZA-MOREIRA, L., FORTELAGO, I., CARO, M., O'VALLE, F., GANEA, D. and GONZALEZ-REY, E., 2014. Adrenomedullin protects from experimental autoimmune encephalomyelitis at multiple levels. *Brain, behavior, and immunity*, **37**, pp. 152-163.
- PERKINS, N.D., 2012. The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nature reviews.Cancer*, **12**(2), pp. 121-132.
- PIO, R., ELSASSER, T.H., MARTINEZ, A. and CUTTITTA, F., 2002. Identification, characterization, and physiological actions of factor H as an adrenomedullin binding protein present in human plasma. *Microscopy research and technique*, **57**(1), pp. 23-27.
- PLEGUEZUELOS, O., HAGI-PAVLI, E., CROWTHER, G. and KAPAS, S., 2004. Adrenomedullin signals through NF-kappaB in epithelial cells. *FEBS letters*, **577**(1-2), pp. 249-254.

- PROIETTO, A.I., VAN DOMMELEN, S. and WU, L., 2009. The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. *Immunology and cell biology*, **87**(1), pp. 39-45.
- REYES GARCIA, M.G. and GARCIA TAMAYO, F., 2013. The importance of the nurse cells and regulatory cells in the control of T lymphocyte responses. *BioMed research international*, **2013**, pp. 352414.
- RIBATTI, D., NICO, B., SPINAZZI, R., VACCA, A. and NUSSDORFER, G.G., 2005. The role of adrenomedullin in angiogenesis. *Peptides*, **26**(9), pp. 1670-1675.
- ROTH, J., 1996. The silver anniversary of gold: 25 years of the colloidal gold marker system for immunocytochemistry and histochemistry. *Histochemistry and cell biology*, **106**(1), pp. 1-8.
- RULLE, S., AH KIOON, M.D., ASENSIO, C., MUSSARD, J., EA, H.K., BOISSIER, M.C., LIOTE, F. and FALGARONE, G., 2012. Adrenomedullin, a neuropeptide with immunoregulatory properties induces semi-mature tolerogenic dendritic cells. *Immunology*, **136**(2), pp. 252-264.
- SAKATA, J., SHIMOKUBO, T., KITAMURA, K., NAKAMURA, S., KANGAWA, K., MATSUO, H. and ETO, T., 1993. Molecular cloning and biological activities of rat adrenomedullin, a hypotensive peptide. *Biochemical and biophysical research communications*, **195**(2), pp. 921-927.
- SANCHEZ, M.G., BOURQUE, M., MORISSETTE, M. and DI PAOLO, T., 2010. Steroids-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS neuroscience & therapeutics*, **16**(3), pp. e43-71.
- SAVINO, W., DARDENNE, M., VELLOSO, L.A. and DAYSE SILVA-BARBOSA, S., 2007. The thymus is a common target in malnutrition and infection. *The British journal of nutrition*, **98 Suppl 1**, pp. S11-6.
- SEAMON, K.B. and DALY, J.W., 1986. Forskolin: its biological and chemical properties. *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research*, **20**, pp. 1-150.
- SEXTON, P.M., POYNER, D.R., SIMMS, J., CHRISTOPOULOS, A. and HAY, D.L., 2009. Modulating receptor function through RAMPs: can they represent drug targets in themselves? *Drug discovery today*, **14**(7-8), pp. 413-419.
- SHINDO, T., KURIHARA, H., MAEMURA, K., KURIHARA, Y., KUWAKI, T., IZUMIDA, T., MINAMINO, N., JU, K.H., MORITA, H., OH-HASHI, Y., KUMADA, M., KANGAWA, K., NAGAI, R. and YAZAKI, Y., 2000. Hypotension and resistance to lipopolysaccharide-induced shock in transgenic mice overexpressing adrenomedullin in their vasculature. *Circulation*, **101**(19), pp. 2309-2316.

SUN, L., LUO, H., LI, H. and ZHAO, Y., 2013. Thymic epithelial cell development and differentiation: cellular and molecular regulation. *Protein & cell*, **4**(5), pp. 342-355.

TAKAHAMA, Y., 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature reviews.Immunology*, **6**(2), pp. 127-135.

UGRUMOV, M.V., 2013. Brain neurons partly expressing dopaminergic phenotype: location, development, functional significance, and regulation. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, **68**, pp. 37-91.

VAUGHAN, R.A. and FOSTER, J.D., 2013. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends in pharmacological sciences*, **34**(9), pp. 489-496.

VOLL, R.E., JIMI, E., PHILLIPS, R.J., BARBER, D.F., RINCON, M., HAYDAY, A.C., FLAVELL, R.A. and GHOSH, S., 2000. NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. *Immunity*, **13**(5), pp. 677-689.

VON PATAY, B., LOPPNOW, H., FEINDT, J., KURZ, B. and MENTLEIN, R., 1998. Catecholamines and lipopolysaccharide synergistically induce the release of interleukin-6 from thymic epithelial cells. *Journal of neuroimmunology*, **86**(2), pp. 182-189.

WELSCH, U., UNTERBERGER, P., HOFTER, E., CUTTITTA, F. and MARTINEZ, A., 2002. Adrenomedullin in mammalian and human skin glands including the mammary gland. *Acta Histochemica*, **104**(1), pp. 65-72.

WICK, M.R. and MILLS, S.E., 2002. Evaluation of surgical margins in anatomic pathology: technical, conceptual, and clinical considerations. *Seminars in diagnostic pathology*, **19**(4), pp. 207-218.

WONG, L.Y., CHEUNG, B.M., LI, Y.Y. and TANG, F., 2005. Adrenomedullin is both proinflammatory and antiinflammatory: its effects on gene expression and secretion of cytokines and macrophage migration inhibitory factor in NR8383 macrophage cell line. *Endocrinology*, **146**(3), pp. 1321-1327.

YUKSEL, S. and YUREKLI, M., 2003. The effect of adrenomedullin (ADM) on tyrosine hydroxylase (TH) enzyme activity and blood pressure in cold exposed rats. *Endocrine journal*, **50**(5), pp. 553-559.

ZHOU, M., CHAUDRY, I.H. and WANG, P., 2001. The small intestine is an important source of adrenomedullin release during polymicrobial sepsis. *American journal of physiology.Regulatory, integrative and comparative physiology*, **281**(2), pp. R654-60.

ZHU, F., ZHANG, L., DING, Y.Q., ZHAO, J. and ZHENG, Y., 2014. Neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide induces deficits in social behavior and prepulse inhibition and microglial activation in rats: Implication for a

new schizophrenia animal model. *Brain, behavior, and immunity*, **38**, pp. 166-174.

ZOROGLU, S.S., HERKEN, H., YUREKLI, M., UZ, E., TUTKUN, H., SAVAS, H.A., BAGCI, C., OZEN, M.E., CENGIZ, B., CAKMAK, E.A., DOGRU, M.I. and AKYOL, O., 2002. The possible pathophysiological role of plasma nitric oxide and adrenomedullin in schizophrenia. *Journal of psychiatric research*, **36**(5), pp. 309-315.

ZUDAIRE, E., MARTINEZ, A., GARAYOA, M., PIO, R., KAUR, G., WOOLHISER, M.R., METCALFE, D.D., HOOK, W.A., SIRAGANIAN, R.P., GUISE, T.A., CHIRGWIN, J.M. and CUTTITTA, F., 2006. Adrenomedullin is a cross-talk molecule that regulates tumor and mast cell function during human carcinogenesis. *The American journal of pathology*, **168**(1), pp. 280-291.