

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
" FEDERICO II "**

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE NATURALI

**Dottorato di Ricerca in Biologia Avanzata
Indirizzo
*Sistematica Molecolare***

XVIII CICLO

**L'enzima feniletanolamina-N-metiltransferasi
(PNMT)
nelle cellule cromaffini della ghiandola interrenale
di
Triturus carnifex (Amphibia, Urodela).**

**FATTORI IN GRADO DI MODULARE L'ATTIVITÀ DELL'ENZIMA,
E SEQUENZIAMENTO DEL SUO mRNA.**

***Relatore*
Ch.ma Dott.ssa
ANNA CAPALDO**

***Dottoranda*
FLAMINIA GAY**

***Correlatore*
Ch.ma Prof.ssa
VINCENZA LAFORGIA**

***Coordinatore*
Ch.ma Prof.ssa
SILVANA FILOSA**

ANNO ACCADEMICO 2004 - 2005

INDICE

Introduzione

Capitolo I

Biosintesi delle catecolamine: ruolo dell'enzima PNMT..... pag. 1

Capitolo II

PNMT

Localizzazione e Caratterizzazione..... pag. 3

Capitolo III

PNMT

Sequenza..... pag. 10

Capitolo IV

PNMT

Regolazione..... pag. 16

Capitolo V

La ghiandola interrenale di *Triturus carnifex*..... pag. 30

Le cellule a steroidi..... pag. 32

Le cellule cromaffini..... pag. 38

Finalità della ricerca

Capitolo VI

Interazioni paracrine tra il tessuto a steroidi e il tessuto cromaffine.... pag. 42

Materiali e Metodi

Capitolo VII

Animali..... pag. 46

Analisi della localizzazione cellulare dell'enzima PNMT..... pag. 46

Analisi della relazione tra ciclo sessuale e ciclo funzionale delle
cellule cromaffini..... pag. 57

Analisi della sequenza dell'mRNA..... pag. 62

Osservazioni

Capitolo VIII

Localizzazione cellulare dell'enzima PNMT..... pag. 83

Relazione tra ciclo sessuale e ciclo funzionale delle
cellule cromaffini..... pag. 86

Analisi della sequenza dell'mRNA per la PNMT pag. 90

Conclusioni

Capitolo IX

Localizzazione cellulare dell'enzima PNMT.....	pag. 95
Relazione tra il ciclo sessuale e il ciclo funzionale delle cellule cromaffini.....	pag. 96
Analisi della sequenza dell'mRNA per la PNMT.....	pag. 99

<i>Bibliografia</i>	pag. 101
----------------------------------	----------

BIOSINTESI DELLE CATECOLAMINE: RUOLO DELL'ENZIMA PNMT

La sintesi delle catecolamine avviene a partire dall'aminoacido tirosina in un processo in quattro fasi, ciascuna catalizzata da un diverso enzima (Carmichael e Winkler, 1985).

La prima fase, la conversione della **tirosina** in **dopa**, è catalizzata dalla tirosinidrossilasi, un enzima presente nel citoplasma delle cellule cromaffini; un secondo enzima citoplasmatico, la dopadecarbossilasi, converte poi la **dopa** in **dopamina**.

L'enzima successivo, la dopamina- β -idrossilasi, responsabile della conversione della **dopamina** in **noradrenalina (NA)**, si trova all'interno delle vescicole cromaffini, perciò la dopamina deve essere trasportata in esse per essere convertita in noradrenalina, in un processo in cui probabilmente la β -idrossilasi dona elettroni e l'acido ascorbico, che agirebbe come cofattore per l'enzima, e che abbonda nelle vescicole cromaffini, si modifica in semideidroascorbato.

L'enzima necessario poi per ricostituire l'acido ascorbico e mantenere in atto la sintesi della noradrenalina si trova solo nel citoplasma ed esige, quindi, un collegamento biochimico tra l'interno delle vescicole ed il citosol. Il citocromo

b₅₆₁, che abbonda nella membrana delle vescicole cromaffini, trasferisce attraverso di essa elettroni al semideidroascorbato, riconvertendolo in acido ascorbico e permettendo la continuazione della sintesi delle catecolamine.

In gran parte delle cellule cromaffini, il processo termina con la produzione di NA, mentre in altre l'amina si trasforma in **adrenalina (A)** grazie all'enzima citoplasmatico PNMT; la NA pertanto deve fuoriuscire dalle vescicole per essere trasformata in A, che torna poi nelle vescicole dov'è immagazzinata (Fig.1).

Biosintesi delle catecolamine

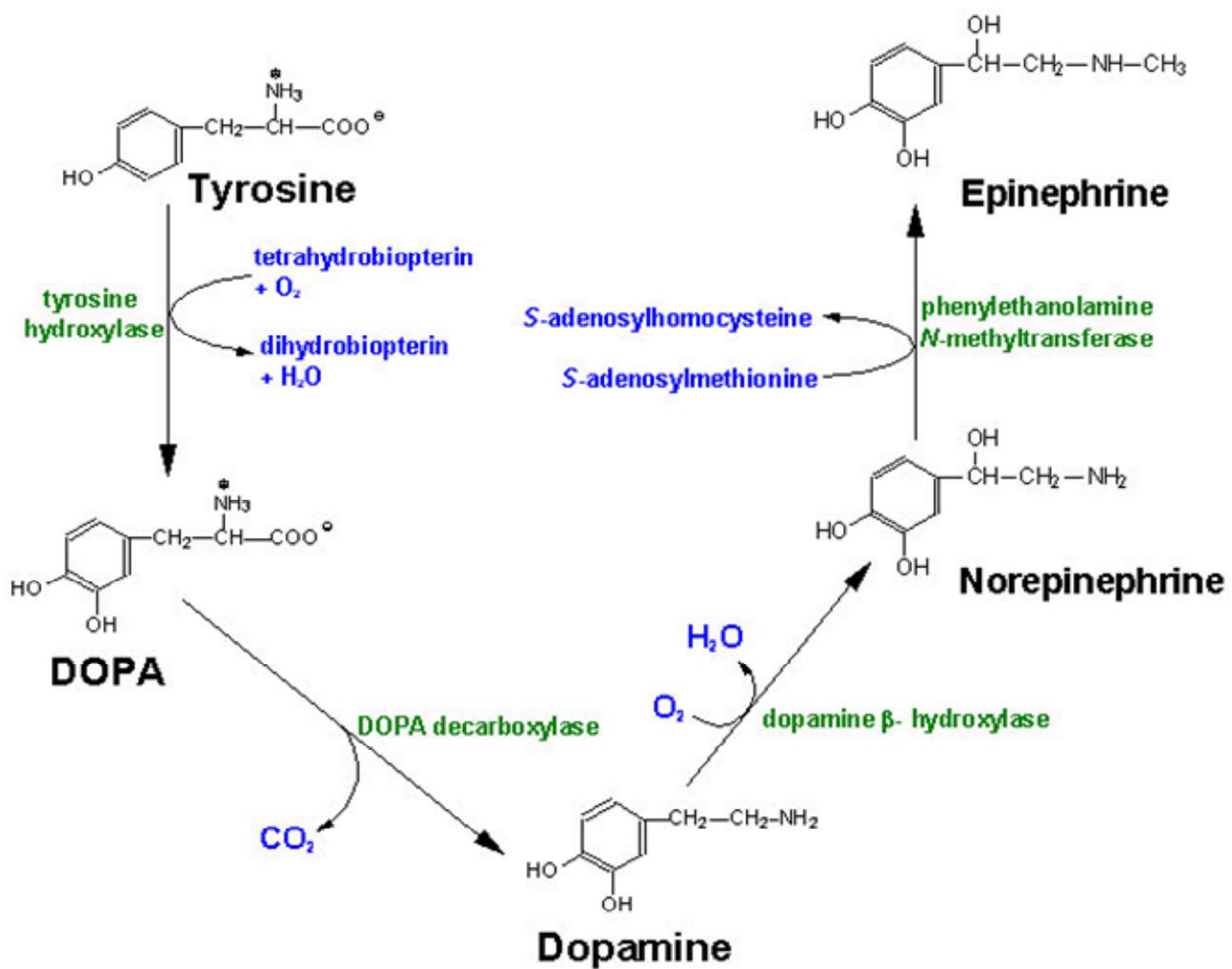


Fig. 1

PNMT

- LOCALIZZAZIONE E CARATTERIZZAZIONE -

Localizzazione dell'enzima

L'enzima PNMT è un enzima presente in tutti i Vertebrati, (Axelrod, 1962) è responsabile della conversione della noradrenalina in adrenalina (Bülbring, 1949; Blaschko, 1957).

La presenza di questa proteina enzimatica è stata studiata nei Primati, mediante tecniche immunocitochimiche (Cryer, 1992); nei Mammiferi euteri Wurtman and Axelrod (1966) hanno evidenziato che la maggior parte della NA(noradrenalina) è convertita enzimaticamente in A (adrenalina) grazie all'enzima PNMT.

Gripois e Parvez (1972) hanno dosato l'attività dell'enzima PNMT nell'adrenale di ratti adulti, mediante omogenizzazione del tessuto e centrifugazione a freddo.

La localizzazione sub-cellulare della PNMT nella ghiandola surrenale di ratto è stata effettuata mediante la tecnica PAP (perossidasi - antiperossidasi). L'enzima è stato localizzato non solo nel citosol ma anche sulle membrane di alcuni granuli contenenti adrenalina (Nagatsu et al., 1979).

Studi ulteriori eseguiti mediante immunocolorazione hanno dimostrato che la PNMT nelle cellule adrenali di ratto sembra occupare una zona eccentrica delle vescicole cromaffini tra i siti immunoreattivi alla serotonina (Brownfield et al., 1985).

La co-localizzazione della serotonina e dell'enzima PNMT in alcuni tipi di vescicole è probabilmente dovuta alla capacità delle cellule cromaffini di co-rilasciare serotonina ed adrenalina.

Sembrerebbe che la distribuzione della serotonina possa essere differenziata da quella dell'enzima PNMT a livello sub-cellulare: l'immunoreattività alla serotonina è associata con la membrana vescicolare così come è associata al core, mentre l'immunoreattività alla PNMT è associata alla porzione periferica del core vescicolare.

Le tecniche immunistochemiche consentono di evidenziare la localizzazione e la distribuzione delle cellule che producono adrenalina sia nella ghiandola adrenale che nel sistema nervoso centrale (Hokfelt et al., 1984).

Mediante ibridazione in situ, l'uso di queste sonde ha dimostrato che una larga maggioranza di cellule nella midollare di ratto e bovino è positiva per l'enzima PNMT (Schalling et al., 1987).

Zachariassen and Newcomer (1975), mediante tecniche di immunocitochimica, hanno localizzato l'enzima PNMT nella ghiandola adrenale degli Uccelli, dove svolge una funzione analoga a quella svolta nei Mammiferi.

Nei Rettili, studi biochimici hanno confermato che la PNMT è presente nelle cellule cromaffini adrenaliche e che trasforma la NA in A (Wasserman and Tramezzani, 1963; Wurtmam et al., 1967).

Studi di immunocitochimica in microscopia ottica mediante tecnica ABC e in microscopia elettronica mediante immunogold, effettuati sulla *Podarcis sicula* (Reptilia, Lacertidae), hanno permesso di dimostrare che l'enzima PNMT è localizzato nelle cellule ad A, che appaiono immunopositive; l'enzima è presente sia nel citoplasma che intorno ai granuli adrenergici (Laforgia and Muoio, 1997).

L'enzima PNMT è stato localizzato anche negli Anfibi, in *Rana catesbeiana*, mediante immunocitochimica. La presenza di questo enzima nella ghiandola adrenale è stata riscontrata non solo nel citosol ma anche sulla membrana di alcuni granuli ad adrenalina (Nagatsu et al., 1979).

Per quanto concerne i Pesci, analisi immunoistochimiche condotte sulle cellule cromaffini dell'anguilla americana hanno evidenziato che la PNMT è presente solo in una frazione delle cellule cromaffini, il che suggerisce la

presenza di entrambi i tipi di cellule cromaffini, a NA e ad A, e l'assenza di cellule specifiche a dopamina (Hathaway and Epple, 1990).

L'enzima PNMT è stato anche localizzato in *Gadus morhua*, *Oncorhynchus mykiss*, *Anguilla anguilla* (Reid et al., 1995).

Caratterizzazione del gene

Recentemente il gene per la PNMT di bovino e ratto è stato clonato (Baetge et al., 1986; Carroll et al., 1991), e si è sintetizzata la sonda oligonucleotidica complementare a una sequenza di 48 basi dell'mRNA per la PNMT di bovino e ratto (Schalling et al., 1987).

Inoltre il gene umano che codifica per l'enzima PNMT, è stato localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 (Hoehe et al., 1992).

Il gene per la PNMT di ratto è stato isolato a partire da una library genomica mediante ibridazione incrociata con una sonda di cDNA di PNMT bovina (Suh et al., 1994). La PNMT di ratto è un'enzima monomero di 31 kD e gli autori hanno isolato, identificato e determinato la sequenza nucleotidica completa del gene che codifica per quest'enzima; il gene è lungo 2789 bp e consiste di 3 esoni e 2 introni. Morita e collaboratori (1992) hanno identificato, nella regione codificante N-terminale del gene per la PNMT di topo, due sequenze dirette ripetute composte di 23 nucleotidi, non osservate nelle corrispondenti regioni dei

geni per la PNMT umana e bovina. Nella regione N-terminale del gene per la PNMT di ratto, sono state identificate due sequenze dirette ripetute di 29 nucleotidi, anziché 23; in più, una sola sequenza diretta ripetuta di 29 nucleotidi è stata osservata nella regione codificante del gene per la PNMT di ratto.

E' probabile che la presenza o assenza di sequenze dirette ripetute causi le

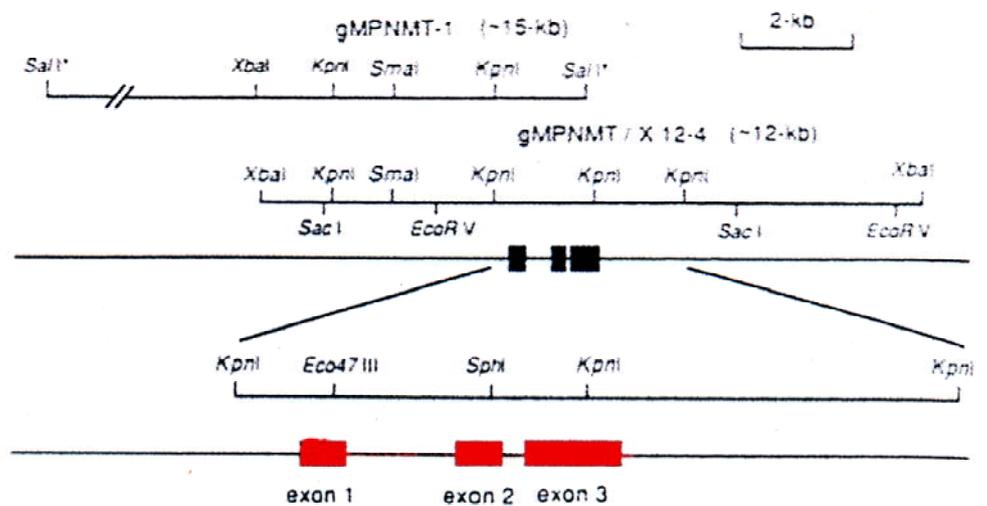
maggiori differenze nella sequenza della PNMT tra le specie, e probabilmente una delle sequenze dirette ripetute osservate nel gene per la PNMT di topo è stata rimossa nel ratto durante l'evoluzione.

L'espressione della PNMT è differenzialmente regolata nei neuroni adrenergici, nel cervello e nelle cellule cromaffini adrenali. Usando la tecnica dell'RT-PCR si è dimostrato, nello sviluppo prenatale del tronco cerebrale di ratto, l'esistenza di 2 specie di mRNA per la PNMT, le quali sono prodotte da un raro evento di splicing alternativo noto come ritenzione di introni.

Il messaggio privo di introni è down regolato dopo la nascita, mentre le specie di mRNA che trattengono gli introni sono espresse costitutivamente nell'adulto. Al contrario nel surrene, in tutti gli stadi di sviluppo, è espresso solo il messaggero privo di introni. In linea con risultati precedenti che mostrano l'incapacità dei glucocorticoidi ad indurre l'espressione della PNMT nel cervello, il pattern di splicing della PNMT in espianti di tronco cerebrale non è influenzato dalla presenza del dexametasone. E' possibile che la regolazione

tessuto specifica dell'espressione della PNMT sia basata sul meccanismo di ritenzione di introni, e che nel surrene, ma non nel cervello, questo meccanismo sia sensibile alla regolazione dei glucocorticoidi (Unswort et al., 1999) (Fig.2).

Organizzazione del gene della PNMT di ratto



Studi in vitro su colture primarie di cellule cromaffini bovine hanno permesso di dimostrare che la regione del gene compresa tra -273 e -877 bp è responsabile della regolazione neurale del gene per la PNMT nelle cellule cromaffini bovine; il promotore della PNMT compreso tra 0.3 e 0.9 kb contiene sequenze capaci di rispondere a stimoli colinergici e depolarizzanti (Lee et al., 1999).

L'enzima PNMT è presente in alte concentrazioni nella medulla adrenale, ma si trova anche in molti altri tipi di tessuti del corpo; infatti questo enzima è localizzato in specifiche cellule neurali del tronco cerebrale e della retina, è presente nel cuore fetale e se ne sono trovati livelli relativamente alti anche nell'atrio sinistro di individui adulti. Le cellule adrenergiche cardiache sono distribuite nel miocardio adulto e contengono tutti gli enzimi necessari per la sintesi di A.

Il gene per la PNMT di ratto contiene 3 esoni e 2 introni; la regione del promotore del gene per la PNMT contiene un elemento di risposta ai

glucocorticoidi; tuttavia, lo sviluppo iniziale della PNMT fetale del cervello e cardiaca è indipendente dai glucocorticoidi.

I glucocorticoidi sono essenziali per lo sviluppo di alti livelli di PNMT nel

surrene, ma appaiono meno importanti al di fuori del surrene. L'mRNA della PNMT adrenale esiste come singolo tipo, mentre nel cuore l'mRNA per la PNMT è presente sia come forma priva che fornita di introni.

Quindi l'espressione del gene per la PNMT al di fuori del surrene differisce gradualmente dall'espressione di quest'enzima nella ghiandola adrenale.

L'espressione della PNMT extra-adrenale è regolata da un meccanismo di splicing alternativo che non si è osservato nel surrene (Ziegler et al., 2002).

- SEQUENZA -

Gli studi tesi ad identificare la sequenza del gene per l'enzima PNMT sono stati svolti nei Mammiferi, nei quali è stato in linea generale identificato, isolato, caratterizzato e sequenziato l'mRNA e/o il gene completo per questo enzima.

Un gruppo di ricercatori ha isolato l'mRNA per la PNMT nella midollare del surrene bovino e poi determinato la sequenza nucleotidica completa del cDNA, deducendo poi la sequenza aminoacidica dell'enzima PNMT. Il confronto della sequenza aminoacidica della PNMT bovina con quella della tirosina- β -idrossilasi di ratto ha rivelato una parziale omologia aminoacidica tra i due enzimi, ed ha confermato studi precedenti che suggeriscono una correlazione strutturale tra gli enzimi della via biosintetica delle catecolamine (Baetge et al., 1986).

Si è riusciti, inoltre a determinare la struttura del gene codificante per la PNMT bovina mediante la costruzione di una mappa di restrizione e successivamente mediante la tecnica del Southern blot. L'analisi di questi frammenti ed un maggiore studio a monte, indicano che il gene per l'enzima

PNMT bovino è 1,594 bp in lunghezza, consistendo di 3 esoni e 2 introni.

Il sito d'inizio della trascrizione è stato identificato tramite due metodi indipendenti ed è approssimativamente localizzato 12bp a monte rispetto al sito di inizio ATG della traduzione. La regione 3' non tradotta è 88 bp in lunghezza e contiene il segnale di poliadenilazione (AATAAA). Una sequenza promoter putativa (TATA box) è localizzata a circa 25 bp a monte rispetto al sito d'inizio della trascrizione.

Il calcolo comparativo dei dati della sequenza nucleotidica con la sequenza consenso di elementi di regolazione noti, rivela siti potenziali di legame per recettori dei glucocorticoidi e per la proteina SP1 nella regione 5' fiancheggiante il gene. Inoltre, la comparazione della sequenza degli esoni del gene per la PNMT con la sequenza del cDNA per altri enzimi coinvolti nella biosintesi delle catecolamine non rivela una omologia significativa, indicando che l'enzima

PNMT non è un membro di una famiglia multigenica di enzimi biosintetici delle catecolamine (Batter et al., 1988).

Il gene umano per la PNMT è stato clonato ed è stata determinata la sequenza nucleotidica completa utilizzando topi transgenici; la struttura del gene consiste di 3 esoni e 2 introni che si estendono per circa 2100 pb.

Per questo tipo di esperimento furono prodotti topi transgenici contenenti il gene per la PNMT umana con 2 o 8 kilobasi sulla sequenza fiancheggiante la 5', dando luogo all'espressione di un mRNA per la hPNMT nel surrene e nell'occhio.

Un gene chimerico, che consisteva di 2 kilobasi di hPNMT fiancheggianti la regione 5' fusa vicino alla regione precoce del virus SV40, dette luogo all'espressione dell'mRNA per l'antigene T (tumorale) nella ghiandola adrenale e negli occhi; inoltre, per via immunocitochimica si è evidenziato che l'antigene tumorale è localizzato in nuclei di cellule della medulla adrenale ed in cellule dello strato nucleare cellulare interno della retina, siti preminenti della sintesi di A (adrenalina).

Questi risultati indicano che la sequenza enhancer per l'espressione appropriata del gene per l'hPNMT in questi tipi di cellule è in una regione 5' di 2 kilobasi fiancheggiante la regione del gene umano (Baetge et al., 1988).

Si è isolato un clone di cDNA per la PNMT umana a partire da un primo clone di cDNA per la PNMT adrenale bovina, utilizzando un mix di oligoribonucleotidi come sonde la cui sintesi si basa su di una parziale sequenza aminoacidica di peptidi triptici dall'enzima bovino. Attraverso una library di cDNA bovina, è stato isolato un clone di cDNA con un inserto di 200 bp.

Questo clone consiste di 84 pb della regione codificante carbossiterminale, la quale contiene la sequenza aminoacidica corrispondente a 2 peptidi triptici, e circa 100 bp della regione 3' non trascritta.

Usando questo frammento di cDNA come sonda, si è realizzato lo screening di una library di cDNA di feocromocitoma umano e si è isolato, in un secondo momento, un clone di cDNA con un inserto di circa 1.0 paia di kilobasi contenenti la regione codificante completa dell'enzima.

L'analisi (Northern blot) del poli(A)⁺ RNA del feocromocitoma umano, usando il cDNA inserto come sonda, ha evidenziato una singola specie di RNA di circa 1000 nucleotidi, suggerendo che il clone è un cDNA di intera lunghezza. Lo studio della sequenza nucleotidica ha rivelato che la PNMT umana consiste di 282 residui aminoacidici e che la sequenza della PNMT umana presenta un 88%

di omologia con la sequenza della PNMT bovina. Inoltre si è riusciti, mediante cellule ibride somatiche uomo - topo, a dimostrare che il gene per la PNMT mappa sul cromosoma 17 (Kaneda et al., 1988).

Nell'adrenale del *Rattus norvegicus* l'enzima PNMT è stato clonato usando una library. Comparato al cDNA bovino, il clone sequenziato manca di 72 nucleotidi nella regione codificante al terminale 5' e mostra un 83% ed un

84% di omologia nella regione codificante con le sequenze bovina ed umana, rispettivamente.

La sequenza proteica mostra un 83% di similarità con quella bovina ed un 92% con quella umana, inoltre la sequenza del clone per la PNMT di ratto non è comparabile a quella di altri enzimi coinvolti nella biosintesi delle catecolamine (TH, D β H) o comunque, non mostra una similarità con le altre metiltransferasi riportate nella banca dati genomica. Mediante ibridazione in situ, si è osservato che le sonde oligonucleotidiche basate sulla sequenza clonata marcano specificamente le cellule della medulla adrenale così come i neuroni del midollo spinale contenenti PNMT (Mezey, 1989).

Nel 1994 Quaipe e collaboratori, hanno clonato e sequenziato il gene per la PNMT di topo. Gli autori hanno valutato la capacità di sequenze di diversa

lunghezza, fiancheggianti i geni per la PNMT umana o di topo, a dirigere l'espressione di geni in topi transgenici, ed hanno osservato che una regione di 9 Kb delle sequenze fiancheggianti 5' dal gene clonato per la PNMT di topo, può dirigere l'espressione della β -galattosidasi di *Escherichia coli* in regioni del surrene, dell'occhio e del cervello in topi adulti transgenici.

Morita e collaboratori (1992), hanno descritto l'organizzazione e la

sequenza nucleotidica completa del gene che codifica per la PNMT di topo. Il gene per questo enzima si estende per 1.8 Kb, e consiste di 3 esoni (Fig.3). Il gene cromosomico è stato isolato per cross-ibridazione con il cDNA per la PNMT umana. La sequenza aminoacidica dedotta della PNMT di topo rivela che le maggiori differenze tra le sequenze umana e bovina sono presenti nella regione N-terminale. Al 5'-terminale della PNMT di topo, sono state trovate sequenze ripetute dirette di 23 bp, non presenti nelle regioni corrispondenti dei geni per la PNMT umana e bovina (Fig.4).

Struttura del gene della PNMT di topo

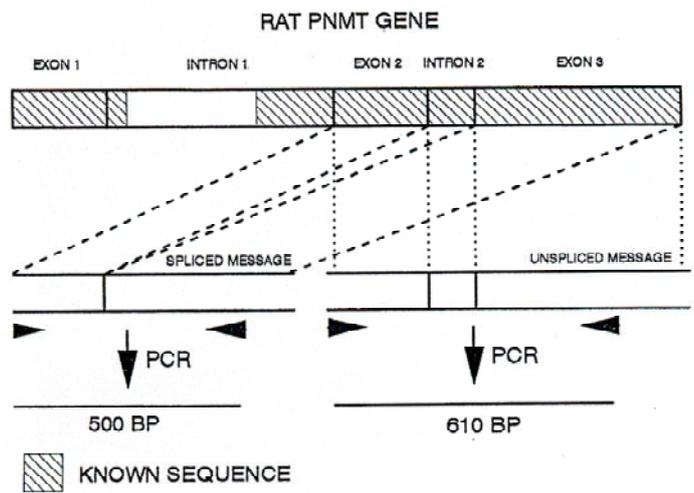


Fig. 3

*Comparazione delle sequenze aminoacidiche dedotte
della PNMT di ratto, topo, uomo e bovino
(Morita et al., 1992)*

Ratto MD-----RGSDPKHTAGMDS~~SD~~DPGQAEVALAYQRFEP~~RAYLRNNYAPPRGDL~~SNPDGVGPW
 Topo MNGGSDLKHATGSGSDPKHAAEIDPDSAGQVRVALAYQRFEP~~RAYLRNNYAPPRGDL~~SNPDGVGPQ
 Uomo M-----SGAD~~RSPNAGAAPDS~~APGQAAVASAYQRFEP~~RAYLRNNYAPPRGDL~~CNPNGVGPW
 Bovino M-----SGTDRSQAAGAVPDSDPGLAAVSSAYQRFEP~~RAYLRNNYAPPRGDL~~SNPDGVGPW

Ratto KLR~~CM~~AQVFATGENSGQVLI~~DIGSGPT~~IYQLLSACAHFEDI~~TMTDFLEVNRQEL~~GLWLREEPGAFDW
 Topo KLR~~CM~~AQVFATGEVSGR~~TLIDIGSGPT~~IYQLLSACAHFEDI~~TMTDFLEVNRQEL~~GLWLREEPGAFDW
 Uomo KLR~~CL~~AQTFATGEVSGR~~TLIDIGSGPT~~VYQLLSACSHFEDI~~TMTDFLEVNRQEL~~GRWLQEEPGAFNW
 Bovino KLR~~CL~~AQTFATGEVSGR~~TLIDIGSGPT~~IYQLLSACAHFEDI~~TMTDFLEVNRQEL~~RLWLREEPGAFDW

Ratto SVYSQH~~VCL~~IEDKGESWQE~~KE~~RQLRARV~~KRVLPIDVHKPQPLGASGLAPLPADALVSAFCLEAVSPD~~
 Topo SVYSQH~~A~~CLIEDKGESWQE~~KE~~RQLRARV~~KRVLPIDVHKPQPLGTPSLAPLPADALVSAFCLEAVSPD~~
 Uomo SMYSQH~~A~~CLIEGKGE~~CWQE~~KE~~RQLRARV~~KRVLPIDVHKPQPLGASGLAPLDADALVSAFCLEAVSPD
 Bovino SVYSQH~~VCL~~IEGKGESWQE~~KE~~CQLRARV~~KRILPIDVHKPQPLGAGGLAPLDADALVSAFCLEAVSPD~~

Ratto LPSFRQALYHIT~~TLLRPGGNLL~~FIGALEESWYLAGEARLSVVPVSEEEVREALVCSGYEVRDLRTYI
 Topo L~~T~~SFQRALHHIT~~TLLRPGGNLL~~LIGALEESWYLAGEARLSVVPVSEEEVREALVLGGYEVRELRTYI
 Uomo L~~A~~SFQRALDHIT~~TLLRPGGNLL~~LIGALEESWYLAGEARLTVVPVSEEEVREALVRS~~GYKVRDLRTYI~~
 Bovino L~~A~~SFQRALDHIT~~TLLRPGGNLL~~LIGALEESWYLAGEARLAVVPVSEEEVREALVRSAMRCGICALHL

Ratto MP~~A~~H~~L~~RTGVDDVKGIFFAWAQKIEVQV
 Topo MP~~A~~H~~L~~CTGVDDVKGIFFAWAQKMEVQV
 Uomo MP~~A~~H~~L~~Q~~T~~GVDDVKGVFFAW-----VGL
 Bovino HH~~A~~CPPSDRCRRCQGHLHLHAQKKVGV

Fig. 4

La presenza o l'assenza di sequenze ripetute dirette causa le maggiori differenze nelle sequenze della PNMT tra le specie. Le tipiche TATA, GC e CACCG box, così come le sequenze omologhe (GRE), elementi di risposta ai glucocorticoidi, sono state localizzate nella regione 5' fiancheggiante il gene per la PNMT di topo.

Anche nel cavallo è stata clonata la molecola di mRNA per la PNMT (Sato et al., 2001).

Per quanto riguarda i Vertebrati non Mammiferi, sono state effettuate ricerche in *Danio rerio* (Osteitto), in cui Clark e collaboratori (1998), hanno sequenziato e clonato il gene per la PNMT ovarica.

- REGOLAZIONE -

Numerose ricerche hanno cercato di chiarire i meccanismi in grado di regolare l'attività dell'enzima PNMT.

Regolazione mediata da droghe La somministrazione cronica di SH&F-64139, un potente inibitore dell'enzima PNMT, ha determinato inizialmente, nella ghiandola adrenale, un abbassamento del contenuto di adrenalina sia nel ratto sia nella scimmia crisotrice. Con un trattamento prolungato, comunque, si osserva un ritorno dei livelli a valori controllo, accompagnato da un aumento catecolaminergico dei livelli di noradrenalina e PNMT, ma contemporaneamente, non si osserva una riduzione dei livelli plasmatici della droga. Questi dati fanno ipotizzare che l'inibizione farmacologica a lungo termine della PNMT possa evocare dei meccanismi compensatori per mantenere la biosintesi della A a condizioni basali di laboratorio (Pendleton et al., 1976).

E' noto che l'attività degli enzimi responsabili della sintesi delle

catecolamine, ed in particolare l'enzima PNMT, è incrementata dalla presenza di stressori e dalla somministrazione di droghe. In particolar modo sono stati studiati i neurotrasmettitori in grado di regolare l'attività della PNMT di ratto, mediante la somministrazione di agenti farmacologici che influenzano le funzioni monoaminergiche. Un trattamento prolungato con reserpina è in grado

di aumentare l'attività della PNMT attraverso la deplezione di catecolamine e serotonina, quest'ultima più efficace della prima. Si ritiene che una via inibitoria serotonergica possa essere coinvolta nella regolazione centrale dell'attività adrenale della PNMT (Lima and Sourkes, 1986).

Un gruppo di ricercatori ha esaminato, in cellule cromaffini bovine in coltura, l'espressione dell'mRNA per la PNMT e dell'mRNA per la Pro-Enkefalina A in risposta alla somministrazione di analoghi dell'AMP ciclico, forskolina e esteri del forbolo. I risultati hanno evidenziato un effetto stimolatorio differenziale dei meccanismi di secondi messaggeri sul controllo dell'espressione dell'mRNA per la PNMT e la Pro-Enk, dimostrando un controllo indipendente per la sintesi di enkefalina e adrenalina (Wan et al., 1991).

Evinger et al., (1995) hanno dimostrato che la clonidina incrementa i livelli di mRNA per la PNMT e TH: gli effetti della clonidina appaiono distinti e

additivi rispetto a quelli esercitati dalla nicotina. Pertanto, i siti di legame per le imidazoline, presenti nelle cellule adrenocromaffini, appaiono in grado di regolare l'espressione dei geni per le catecolamine.

Mediante somministrazione di Metrazolo, che attiva il nervo splanchnico, si è investigato il coinvolgimento di Egr-1 nel controllo neurale della trascrizione

del gene per la PNMT nella surrenale di ratto; infatti Egr-1 potrebbe giocare un ruolo fisiologico nella regolazione neurale dell'espressione del gene per la PNMT in ratto. Il metrazolo incrementa l'mRNA per Egr-1, e anche per la PNMT, mentre la cocaina si dimostra meno potente. Da questo e altri risultati si evince che Egr-1 è coinvolto nella regolazione neurale dell'espressione del gene per la PNMT. Tutto ciò lascia ipotizzare che l'espressione del gene per la PNMT nell'adrenale sia soggetta ad un controllo ormonale e che il ciclo ormonale e neurale potrebbero cooperare per controllare l'espressione del gene per la PNMT (Morita et al., 1996).

Regolazione ceppo-specifica

Studi biomolecolari hanno evidenziato differenze ceppo-specifiche nei livelli di mRNA per la PNMT. Infatti l'attività biosintetica dell'enzima PNMT è dalle 3 alle 8 volte maggiori nelle specie di ratto Fischer 344 e Buffalo. La base biochimica per le differenze di ceppo è stata analizzata a livello della proteina PNMT e della produzione di mRNA.

Le adrenali di ratto Fischer presentano approssimativamente 5 volte più PNMT rispetto alle adrenali di ratto Buffalo e ciò è stato dimostrato mediante tecnica di Western blotting ed immunoprecipitazione da omogenati di ghiandole adrenali. Stessa cosa è stata osservata mediante ibridazione, con l'utilizzazione di un cDNA per la PNMT e successivamente applicando un'analisi di tipo quantitativo con il dot blot, così da stabilire che le adrenali di ratto Fischer contengono da 2 a 4 volte più mRNA per la PNMT rispetto ai ratti Buffalo. La specificità di ceppo nella produzione di PNMT riflette differenze nell'espressione del gene per la PNMT. I risultati suggeriscono un legame diretto tra la regolazione della biosintesi degli enzimi delle catecolamine a livello genomico e la disponibilità di catecolamine specifiche per le funzioni neurotrasmettitoriche e ormonali (Evinger et al., 1986).

Differenze ceppo-specifiche si individuano anche nel tasso di trascrizione

del gene per la PNMT che risulta maggiore nei ceppi Fischer che in altri; sembra che il tasso di trascrizione del gene per la PNMT sia il fattore responsabile delle differenze ceppo-specifiche nei livelli di mRNA per la PNMT (Evinger and Joh, 1989).

Cellule cromaffini sono state isolate dalla ghiandola adrenale di bovino e frazionate in 2 distinte sub-popolazioni mediante centrifugazione in gradiente di densità; la frazione di cellule a più alta densità presenta come catecolamina predominante, adrenalina, A (circa l'81% delle catecolamine tot), contenendo quindi, elevati livelli di attività della PNMT e mostrando un'intensa immunoreattività alla PNMT. La frazione di cellule a minor densità presenta principalmente noradrenalina, NA (circa il 75% delle catecolamine tot).

Benchè le cellule cromaffini ricche di NA (noradrenalina) presentino solo il 3% di attività della PNMT rispetto alle cellule ricche di A, solo il 20% delle cellule ricche di NA risultano immunoreattive alla PNMT. Questo suggerisce che le cellule positive alla PNMT nella frazione ricca di NA contengano meno PNMT per cellula rispetto a quelle ricche di A (adrenalina) e quindi non possono essere tipiche cellule adrenergiche. Inoltre la regolazione dei livelli dell'mRNA per la PNMT e l'attività della stessa in colture primarie di cellule ricche di A e in

cellule ricche di NA è stata comparata somministrando in vitro una serie di diversi fattori di regolazione.

I risultati suggeriscono che l'espressione della PNMT sia regolata differentemente nelle 2 sotto-popolazioni di cellule cromaffini (Cahill, et al., 1996).

Regolazione mediata da recettori colinergici Importanti studi sono stati effettuati per verificare se una selettiva stimolazione dei recettori colinergici muscarinici e nicotinici su cellule cromaffini adrenaliche bovine, possa indurre l'inizio della trascrizione del gene per la PNMT così da promuovere l'accumulo di mRNA per la PNMT.

La regolazione colinergica dell'mRNA per la PNMT procede attraverso recettori muscarinici e nicotinici. La stimolazione muscarinica e nicotinica modifica le risposte genomiche delle cellule cromaffini, aumentando i livelli di mRNA per la PNMT (Evinger et al., 1994).

Regolazione di tipo trascrizionale Si è studiato in cellule RS1 la possibilità che tre attivatori trascrizionali del gene per la PNMT, Egr-1, AP-2 e

GR possano interagire sinergicamente per controllare l'espressione del gene. Il fattore GR può sinergicamente interagire con Egr-1, o una combinazione di AP-2 e Egr-1 per stimolare l'attivazione del promotore della PNMT. L'induzione della trascrizione del gene per la PNMT può avvenire sia per interazione di GR con altre proteine trascrizionali dopo legame al GRE, sia attraverso interazione diretta proteina-proteina in assenza di legame a GRE. Mentre il meccanismo con cui Egr-1 e GR e Egr-1, AP-2 e GR funzionano cooperativamente per stimolare l'attività del promotore della PNMT dev'essere chiarito, la stimolazione sinergica del promotore grazie a questi fattori può fornire un importante controllo regolatorio del gene per la PNMT (Fig.5) (Wong et al., 1998).

Ultimi studi suggeriscono che due fattori trascrizionali quali SP1 e MAZ possono potenzialmente contribuire in maniera tessuto-specifica all'espressione del gene per la PNMT, con un'azione di tipo competitivo tra i due fattori trascrizionali, che conferisce un controllo addizionale di tipo tessuto-specifico

Attivazione sinergica del gene per la PNMT da parte di Egr-1, AP-2 e DEX

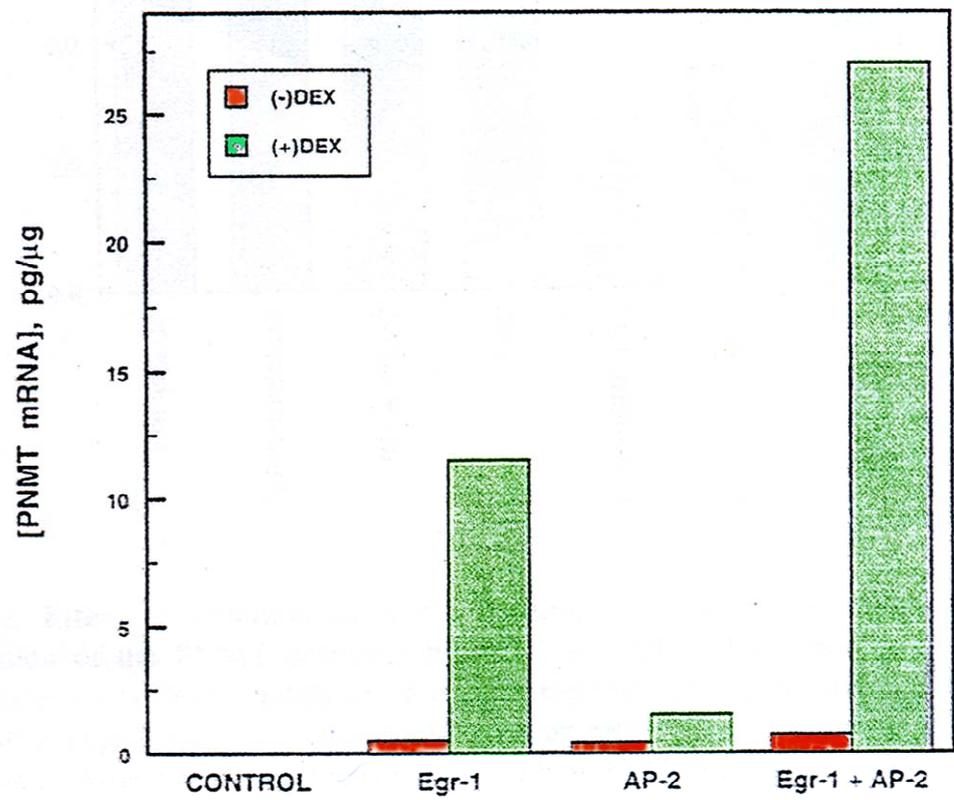


Fig. 5

(Her et al., 1999).

Inoltre, si è dimostrato che l'espressione del gene per la PNMT è regolata da stimoli ormonali e neurali. Osservando che le regioni 5' a monte del gene per la PNMT non contengono sequenze analoghe a quelle responsabili della regolazione neurale per la TH (tirosina idrossilasi) e D β H (dopamina- β - idrossilasi), sono state utilizzate analisi di tipo funzionale e biochimico per caratterizzare la risposta del promotore dell'enzima PNMT ad agenti colinergici e depolarizzanti.

I risultati indicano che il promotore della PNMT, tra 0.3 e 0.9 Kb contiene sequenze capaci di rispondere a stimoli colinergici e depolarizzanti; questi trattamenti influenzano le interazioni di specifiche proteine nucleari con questa particolare regione del promoter della PNMT (Lee et al., 1999).

Regolazione e metodo transgenico

In esemplari di topo transgenici si è osservato che l'espressione addizionale della PNMT nelle cellule produttrici NA può convertire queste cellule in cellule con fenotipo ad A, suggerendo che le cellule produttrici NA normalmente possiedono un macchinario di base necessario per la sintesi di A tranne per la PNMT; questo tipo di studio ha permesso, quindi, di costruire un modello sperimentale per studiare le differenze funzionali tra NA ed A (Kobayashi et al., 1992).

Regolazione e fattori ambientali

In uno studio finalizzato a investigare gli effetti dello stress sull'espressione degli enzimi preposti alla biosintesi delle catecolamine, si è isolato un clone di cDNA per la PNMT adrenale di ratto, e si è utilizzato come sonda per stimare le alterazioni nei livelli di espressione del gene per la PNMT in risposta ad un'esposizione al freddo. L'esposizione al freddo determina un rapido e prolungato incremento nell'mRNA per la PNMT, seguito da un concomitante incremento nell'immunoreattività alla PNMT. Tuttavia, vi sono differenze qualitative e quantitative nelle risposte adattative della TH e della PNMT allo stress da freddo (Weisberg et al., 1989).

Un gruppo di autori ha studiato gli effetti di differenti condizioni di stabulazione sui livelli basali di mRNA per il citocromo P450_{scc} (enzima a monte nella sintesi del colesterolo) e per la PNMT, nella ghiandola adrenale di ratto, per investigare l'influenza dell'ambiente sulle funzioni adrenocorticali ed adrenomedullari. Il mantenimento degli animali in condizioni "arricchite" (10 ratti per gabbia contenente giocattoli e altri oggetti) determina un rallentamento dell'attività motoria spontanea, rispetto agli esemplari isolati. Gli esemplari "arricchiti" mostravano livelli molto più alti di mRNA per il citocromo P450_{scc}

e livelli più bassi di mRNA per la PNMT.

Ciò suggerisce che condizioni ambientali diverse possano causare differenti alterazioni nelle funzioni adrenocorticomedullari, sebbene, la loro possibile associazione con i cambiamenti comportamentali resti ancora da chiarire (Morita et al., 2001).

Regolazione mediata da glucocorticoidi L'enzima PNMT è stato utilizzato come marker per esaminare lo sviluppo dell'espressione adrenergica nella ghiandola adrenale di ratto ed il ruolo putativo dei glucocorticoidi in questo processo. I risultati preliminari mostrano che i meccanismi regolatori durante lo sviluppo possono essere in parte mediati da glucocorticoidi, ma il controllo corticosteroideo dell'espressione del gene per la PNMT non appare essere un meccanismo di controllo predominante (Wong et al., 1992).

Studi ulteriori (Wong et al., 1992), finalizzati a spiegare le dosi sovralfisiologiche richieste per ripristinare, in vivo, l'attività della PNMT in ratti ipofisectomizzati hanno riscontrato: 1) che la regolazione dei glucocorticoidi

avviene in maniera largamente indipendente dall'espressione genica; 2) che gli effetti dei glucocorticoidi sull'attività enzimatica sono primariamente indiretti, attraverso la regolazione dei co-substrati e/o la stabilizzazione dell'enzima; 3) questi effetti non sono mediati attraverso un meccanismo classico (tipo II) di recettori dei glucocorticoidi.

L'influenza dei glucocorticoidi sull'attività della PNMT (Betito et al., 1992) varia in relazione a cambiamenti dinamici nel segnale ormone-recettore; usando il dexametasone e RU28362 (un agonista puro del recettore GC) marcati come radioligandi, si è confermata la presenza di recettori per i glucocorticoidi nelle cellule cromaffini medullari bovine.

L'incremento nell'attività dell'enzima PNMT in seguito a esposizione a livelli alti e bassi di cortisolo è bloccato dall'antagonista dei recettori per i glucocorticoidi, suggerendo un evento mediato dal recettore dei glucocorticoidi. Anche un breve pulse di glucocorticoidi eleva l'attività della PNMT. I risultati suggeriscono che l'esposizione a breve termine delle cellule adrenomidollari a alti livelli di cortisolo possono elevare l'attività dell'enzima PNMT (Betito et al., 1992).

In particolar modo i glucocorticoidi eserciterebbero i loro effetti sull'espressione dell'mRNA della PNMT inducendo un aumento del tasso di trascrizione del gene per la PNMT stessa;

in conclusione, i glucocorticoidi stimolano direttamente e rapidamente la trascrizione della PNMT di ratto (Evinger et al., 1992) (Fig.6).

Si è cercato di determinare se i corticosteroidi regolassero l'enzima PNMT a livello del suo mRNA, somministrando dexametasone a esemplari di ratto ipofisectomizzati.

I risultati (aumentati livelli di corticosterone, e di attività della PNMT e del suo mRNA) hanno suggerito che il mantenimento dei livelli di mRNA per la PNMT dipende dal mantenimento dei livelli di corticosterone, e supportano l'ipotesi che l'espressione del gene per la PNMT nel surrene sia direttamente regolata dai glucocorticoidi prodotti dal cortex (Jiang et al., 1989).

Sembrirebbe, inoltre, che gli steroidi adrenocorticali esercitino una funzione regolatoria sugli enzimi midollari coinvolti nella sintesi di catecolamine: i glucocorticoidi, in particolare, esercitano una varietà di effetti sulle cellule adrenocromaffini, modulando l'espressione di geni specifici mediante l'attivazione di recettori dei glucocorticoidi, che agiscono come fattori di trascrizione in grado di inibire o stimolare la sintesi di mRNA.

Il Gene per la PNMT

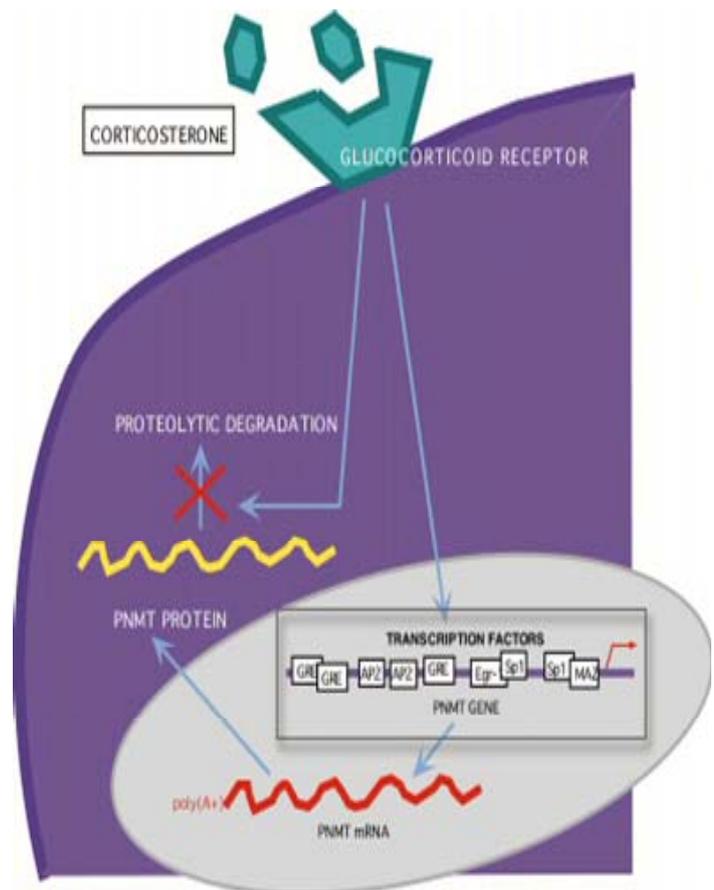


Fig. 6

Altri meccanismi proposti sono il legame diretto e la modulazione dei canali cationici così come il controllo della stabilità dell'mRNA o delle proteine. L'attività della PNMT, responsabile della conversione della NA in A, è nei Mammiferi, stimolata in modo complesso: infatti la trascrizione del gene che codifica per questo enzima è stimolata sia da meccanismi dipendenti che indipendenti da recettori per i glucocorticoidi.

Ad esempio, questi ormoni inducono un raro evento di splicing alternativo nelle cellule adrenocromaffini, che consente un'induzione indipendente da recettori dei glucocorticoidi, dell'espressione dell'enzima PNMT. Inoltre, i glucocorticoidi sembrano in grado di stimolare la sintesi, l'accumulo e la secrezione delle catecolamine e, sono coinvolti nella differenziazione delle cellule cromaffini, in cui regolano inoltre la sintesi di Leu-Encefalina (Fig.7) (Hodel, 2001)

Numerose ricerche sono volte a determinare il ruolo dei glucocorticoidi sull'attività della ghiandola adrenale. A tale fine sono stati eseguiti trattamenti con metyrapone (inibitore dell'enzima 11- β -idrossilasi) o dexametasone. Il trattamento di ratti con il metyrapone abbassa la produzione di adrenalina ed innalza quella di noradrenalina; inoltre aumenta la sintesi di TH e dell'espressione dell'mRNA per il TH, senza influenzare l'mRNA per la PNMT.

*Effetti diretti dei glucocorticoidi
sulle
cellule cromaffini*

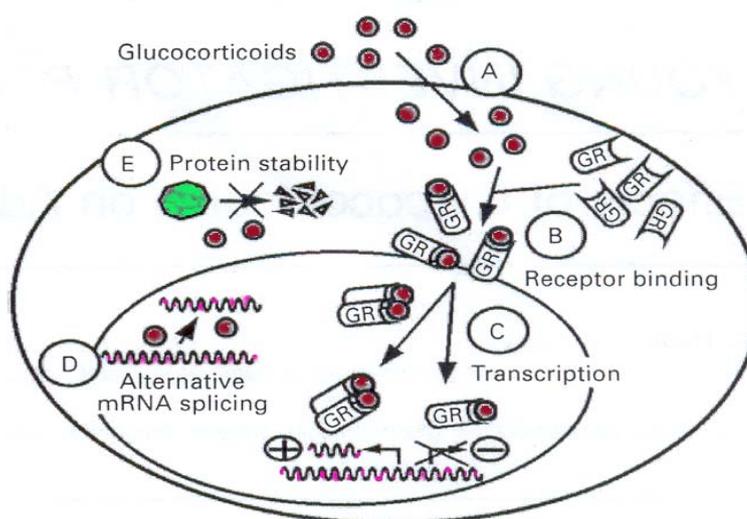


Fig. 7

Il dexametasone ripristina i livelli plasmatici e adrenalici di adrenalina e aumenta i livelli di mRNA per la PNMT, il che depone a favore di una richiesta di glucocorticoidi per l'espressione della PNMT (Laborie, et al., 2003).

LA GHIANDOLA INTERRENALE

DI

Triturus carnifex

Nel corso dell'evoluzione dei Vertebrati la ghiandola adrenale, come molte ghiandole endocrine, ha subito un processo caratterizzato soprattutto da una crescente concentrazione delle sue componenti tissutali, il tessuto steroidogenico e quello cromaffine (Fig.8).

Alcune tappe di questo processo sono rappresentate anche negli Anfibi Urodeli, in cui, lungo le superfici ventrali dei reni, vicino al margine mediale, il tessuto steroidogenico forma numerosi isolotti separati, a volte completamente circondati dal rene, costituiti di cellule steroidogeniche e cromaffini frammiste (Hanke, 1978).

Tuttavia la quantità, le dimensioni e la distribuzione degli isolotti variano notevolmente nelle diverse famiglie, e talora anche nei generi (Grassi Milano and Accordi, 1986).

Inoltre, mentre in alcune specie gli isolotti sono pochi e dispersi, in altre sono numerosi e più aggregati.

***Morfologia comparativa della
ghiandola adrenale
nei Vertebrati***

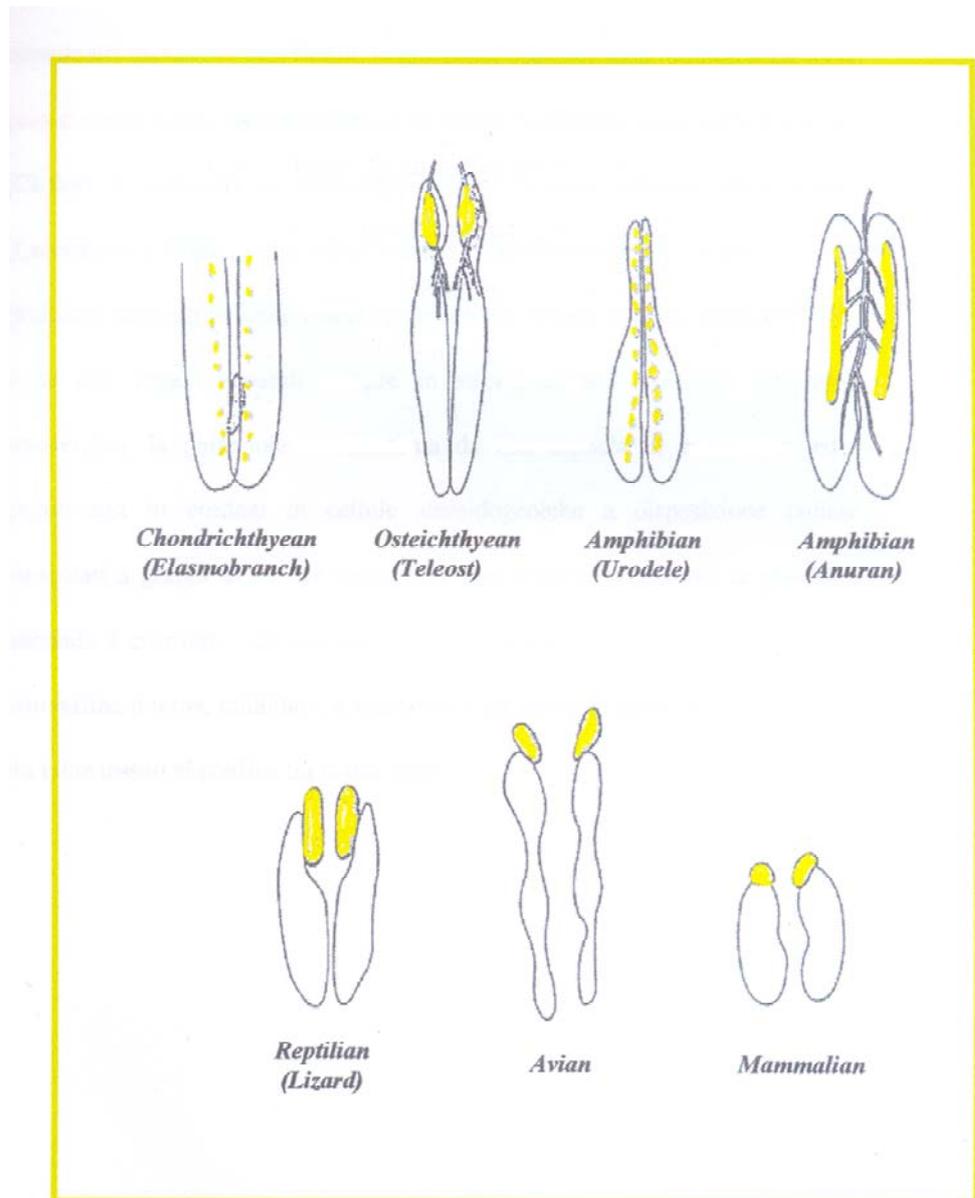


Fig. 8

Variazioni si riscontrano anche, nell'ambito degli Urodeli, nella struttura istologica degli isolotti e quindi nel rapporto tra cellule steroidogeniche, cromaffini e sottostante tessuto renale. Infatti i corpicciuoli interrenali sono composti di cordoni circondati da tessuto connettivo, che li separa tra loro e dal tessuto renale circostante; però, mentre in tutti gli Urodeli le cellule steroidogeniche sono sempre riunite in gruppi a costituire i cordoni interrenali, le cellule cromaffini possono esistere sia isolate che in gruppi e contrarre o meno rapporti con le prime. Il grado di aggregazione fra le cellule cromaffini e di contatto tra queste ultime e quelle a steroidi è diverso nelle varie famiglie e potrebbe essere correlato all'evoluzione filetica dell'ordine (Fig.9) (Morescalchi, 1975).

Negli Urodeli più evoluti l'aggregazione tra cellule cromaffini e steroidogeniche è maggiore, pur presentando una certa variabilità nelle varie famiglie, specie in Amfiumidi e Ambistomidi. In Salamandridi (come *T. carnifex*) e Pletodontidi le cellule cromaffini tendono sempre a formare gruppi per lo più in stretto contatto con le cellule a steroidi (Fig.10).

Morfologia comparativa della ghiandola interrenale di Anfi Urodela

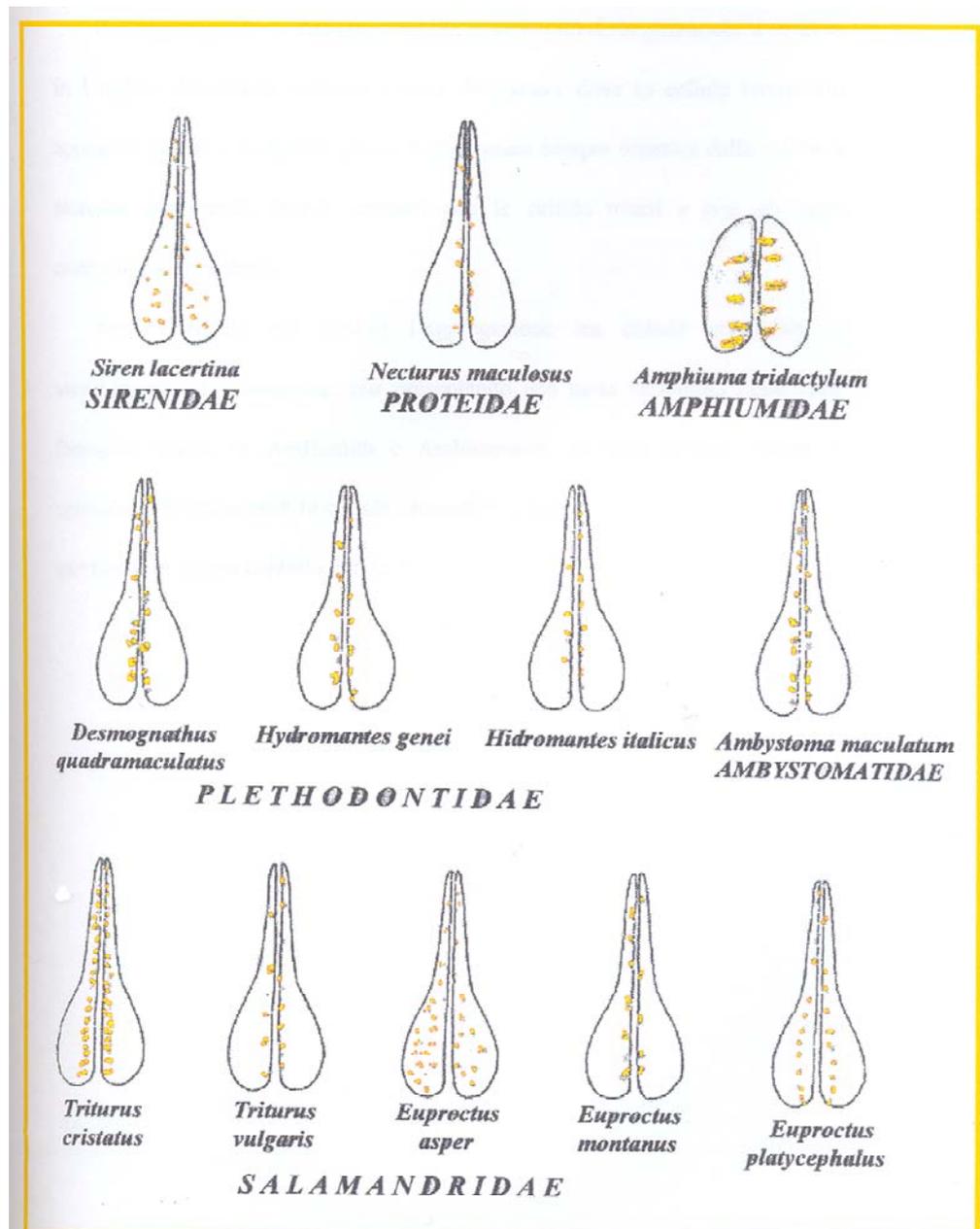


Fig. 9

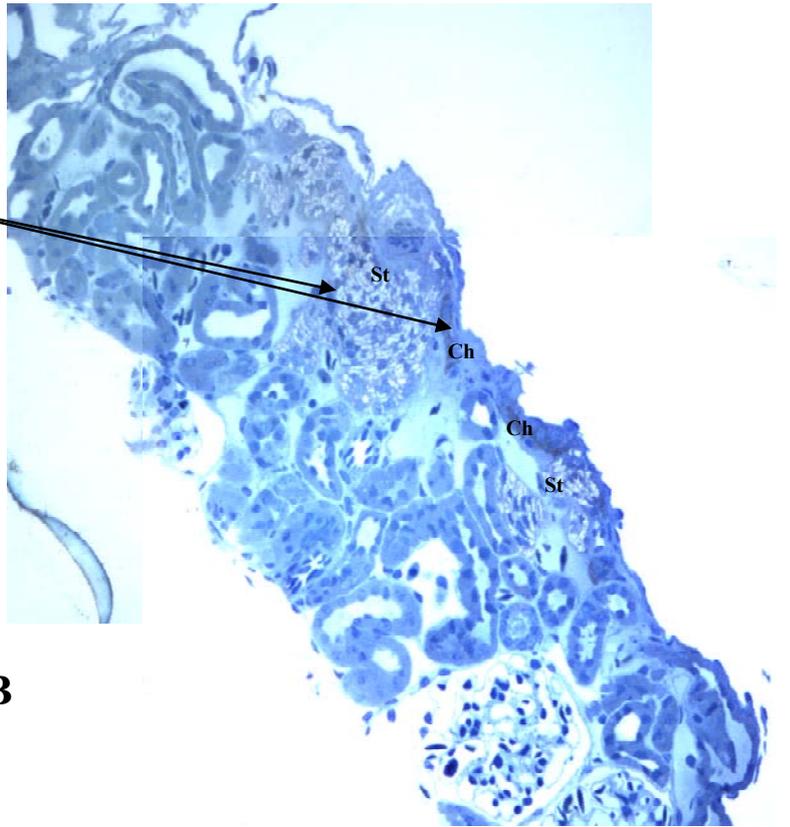
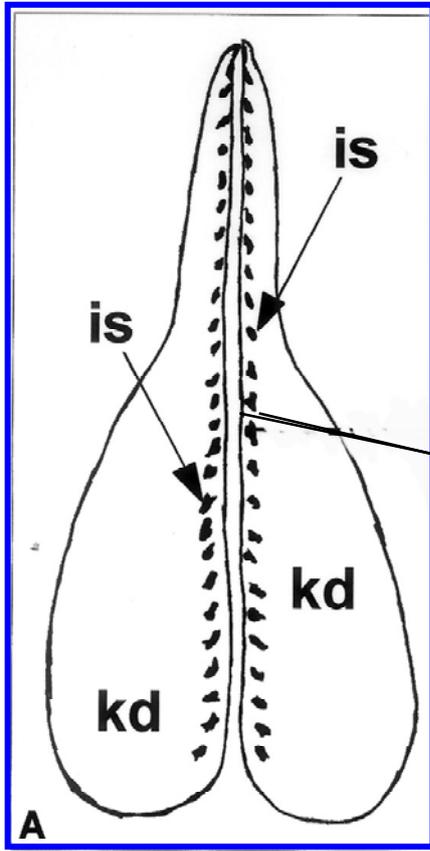


Fig. 10

LE CELLULE A STEROIDI

Le cellule steroidogeniche degli Anfibi Urodela presentano forma rotondeggiante o poligonale, nucleo lobato con larghe masse di cromatina, molti vacuoli lipidici rotondeggianti, mitocondri a creste tubulari, lisosomi, granuli di glicogeno e reticolo endoplasmico liscio ben sviluppato; inoltre, nelle cellule steroidogeniche di *Triturus cristatus* e *Salamandra salamandra*, sono stati osservati numerosi perossisomi, principalmente in prossimità della membrana plasmatica e del reticolo endoplasmico liscio (Berchtold, 1975).

Le cellule steroidogeniche presentano grandi quantità di colesterolo e diversi enzimi, come la β -glucuronidasi e varie esterasi non specifiche. In particolare in *T. cristatus* è stata evidenziata la presenza di Delta-5-3-beta-idrossisteroidodeidrogenasi (Δ^5 -3 β -HSDH), un enzima coinvolto in uno dei primi stadi della biosintesi degli ormoni steroidi (Vellano and Peyrot, 1966) e di 17- β -idrossisteroidodeidrogenasi (17- β -HSDH)-ADP dipendente, che catalizza la conversione dei 17-idrossisteroidi a 17-chetosteroidi (Peyrot and Vellano, 1967).

Mentre in esemplari non sottoposti a trattamenti sperimentali l'attività dei due enzimi è dimostrabile in tutte le cellule dei cordoni steroidogenici, in animali trattati con prolattina o acqua distillata, o ormone somatotropo, l'attività dell'enzima $\Delta 5-3\beta$ -HSDH è esibita solo dalle cellule situate nella zona più interna dei cordoni interrenali, mentre le altre zone mostrano una reazione debole o negativa. Al contrario, l'attività dell'enzima $17-\beta$ -HSDH ADP dipendente, che nei controlli è debole, anche se distribuita in modo omogeneo nelle cellule steroidogeniche, diventa molto più alta in esemplari trattati con prolattina o ormone somatotropo, in cui tende ad essere circoscritta ad alcune aree ristrette dei cordoni interrenali.

Queste osservazioni porterebbero perciò ad ipotizzare una differente localizzazione topografica delle cellule che sintetizzano ormoni steroidi diversi, e che non risponderebbero quindi allo stesso modo a differenti trattamenti sperimentali.

Studi ulteriori (Berchtold, 1978) sulla localizzazione a livello ultrastrutturale

della $\Delta 5$ - 3β -HSDH nelle cellule adrenocorticali di *T. cristatus* e *S. salamandra* hanno dimostrato che i siti dell'attività di questo enzima sono associati con le superfici esterne delle membrane del reticolo endoplasmico liscio, o localizzati nel citoplasma, nelle loro immediate vicinanze; sono associati, inoltre, in piccolissima quantità, con la membrana mitocondriale interna.

Anche negli Anfibi Urodeli i principali ormoni prodotti dall'interrenale sono il corticosterone, il cortisolo e l'aldosterone; in particolare, in *T. carnifex*, in entrambi i sessi, il corticosterone plasmatico mostra un ciclo giornaliero che non varia durante l'anno, e che mostra un picco alle h. 17.00. Inoltre il pattern annuale del corticosterone plasmatico mostra un picco in inverno all'inizio del periodo riproduttivo, che normalmente dura da gennaio alla fine di marzo, e l'altro in estate, quando i tritoni lasciano gli stagni.

E' probabile che gli alti livelli di corticosterone plasmatico invernali possano essere correlati all'aumentata attività, al più elevato metabolismo e/o ai problemi di osmoregolazione, relativi all'attività riproduttiva. La presenza di un picco estivo sembra suggerire che il corticosterone possa regolare l'abbandono estivo

dell'acqua; l'elevata sintesi di corticosterone è probabilmente necessaria a sostenere l'aumentata attività locomotoria che caratterizza l'abbandono dell'acqua e la scomparsa dei tritoni sotto terra.

Il corticosterone è inoltre coinvolto nel comportamento sessuale; infatti i suoi livelli sono più alti in maschi impegnati nel corteggiamento rispetto a quelli inattivi. Esiste inoltre una correlazione negativa tra corticosterone e testosterone (che ha un andamento opposto), e quindi una relazione causale a questi due ormoni.

A differenza dei maschi, i livelli plasmatici di testosterone ed estradiolo sono simili in femmine recettive e non, mentre i livelli plasmatici di corticosterone ricalcano quelli dei maschi, mantenendosi più alti in femmine recettive rispetto a quelle che non lo sono. Benchè la discrepanza tra i sessi nel rilascio di steroidi sessuali durante il corteggiamento non sia chiara, l'andamento dei livelli del corticosterone sembra attribuire a questo ormone un ruolo importante nel comportamento sessuale di questa specie (Zerani and Gobbetti, 1993). In *Triturus cristatus* (Vellano et al., 1984) è stato dimostrato che l'ipofisi controlla direttamente la produzione di aldosterone. Infatti l'ipofisectomia produce una diminuzione del tasso ematico di aldosterone, e la somministrazione di ACTH lo

riporta a valori superiori al normale, anche se non è comunque possibile escludere l'influenza, sui livelli ematici di aldosterone, di altri fattori, come la temperatura, l'attività della renina e la concentrazione di elettroliti.

Inoltre, ricorrendo all'ipofisectomia sub-totale e somministrando ad animali completamente ipofisectomizzati, omogenati di regioni circoscritte dell'adenoipofisi, è stato possibile localizzare l'attività adrenocorticotropa nel terzo rostrale dell'adenoipofisi di *T. cristatus*, nella zona I, in cui i basofili di tipo III sembrano essere le cellule in grado di sintetizzare ACTH (Mazzi et al., 1973).

Questi risultati sono stati confermati successivamente con tecniche immunocitochimiche, che hanno evidenziato positività all'ACTH anche in cellule della pars intermedia dell'adenoipofisi (Gaudino et al., 1983); d'altra parte, l'osservazione che i livelli plasmatici di aldosterone e corticosterone restano inalterati in animali in cui la maggior parte, o tutte le cellule adrenocorticotrope vengono rimosse, autorizza a ritenere che il lobo intermedio dell' ipofisi possa esplicare un'attività adrenocorticotropa (Vellano et al., 1990). A supporto di quest'ipotesi vi è l'origine comune dell'ACTH e dell' α -MSH dalla proopiomelanocortina (POMC), un precursore molecolare presente nei lobi

distale ed intermedio dell'ipofisi; in effetti ricerche ulteriori (Mancuso et al., 1997) hanno confermato che il lobo intermedio, disconnesso dal controllo ipotalamico, può esplicare attività adrenocorticotropica; probabilmente le sue cellule, oltre a secernere α -MSH, possono arrestarsi ad uno step precedente del processo di sintesi, rilasciando ACTH.

Studi ulteriori hanno evidenziato in *T. cristatus* un ruolo primario del CFR nella regolazione dell'attività adrenale da parte dell'ACTH, e hanno suggerito che gli ormoni neuroipofisari come l'arginina-vasotocina (AVT) possano essere coinvolti nel meccanismo regolatorio di tale attività (Andreoletti et al., 1988).

LE CELLULE CROMAFFINI

Le prime ricerche eseguite negli Urodela hanno evidenziato, nelle cellule cromaffini, granuli cromaffini altamente polimorfi e caratterizzati da una elettrone-densità variabile.

Solo ai Salamandridi furono attribuite cellule ad adrenalina ed a noradrenalina chiaramente distinguibili (Grassi Milano and Accordi, 1986); d'altronde Mastrolia et al. (1976), hanno identificato in *T. cristatus* cellule ad adrenalina e a noradrenalina, sulla base della prevalenza di ciascun tipo di granulo nel citoplasma di ogni cellula cromaffine.

Ricerche eseguite in *Siren lacertina* (Accordi, 1988) hanno evidenziato una forma variabile ed una elettrone-densità non uniforme dei granuli cromaffini nelle singole cellule; hanno messo inoltre in evidenza un terzo tipo di cellule cromaffini, caratterizzato da granuli cromaffini di piccolo diametro (60nm) ed elevata elettrone-densità (small granule – containing cells, SSG).

Ricerche più recenti eseguite sulle ghiandole interrenali di *T. cristatus carnifex* (Laforgia and Capaldo, 1991) hanno dimostrato invece l'esistenza di

un unico tipo di cellula cromaffine, in grado di produrre entrambe le catecolamine, secondo un ciclo annuale che comporta variazioni stagionali nel contenuto di granuli.

Il ciclo annuale delle cellule cromaffini in *Triturus carnifex*

Nei periodi dell'anno caratterizzati da temperature estreme (dicembre - gennaio; maggio - agosto) vi è una forte prevalenza nelle cellule cromaffini di granuli a noradrenalina, mentre nei periodi intermedi (settembre - novembre; febbraio - aprile) i granuli di adrenalina e noradrenalina sono presenti in quantità all'incirca uguali.

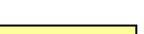
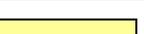
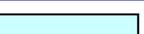
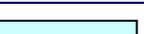
Le variazioni annuali del contenuto di granuli cromaffini sono solo qualitative, infatti il numero totale di granuli contenuti nelle cellule cromaffini è all'incirca costante in tutti i periodi dell'anno. Le variazioni cicliche del rapporto granuli NA/A ricalcano quelle dei caratteri sessuali secondari (SSC) (Andreoletti et al., 1984; Galgano, 1942) che raggiungono il loro pieno sviluppo nel periodo febbraio - aprile quando, in concomitanza con le attività di corteggiamento, ovulazione e fecondazione, i due tipi di catecolamine sono presenti in quantità eguali nelle cellule cromaffini.

Successivamente, gli SSC scompaiono completamente nel periodo maggio – agosto, quando i granuli A sono rari. Questi ultimi ricompaiono nelle cellule cromaffini nel periodo settembre – novembre, quando il testicolo inizia a produrre grandi quantità di testosterone e gli SSC riprendono nuovamente a svilupparsi.

La coesistenza quindi della ripresa della spermatogenesi (febbraio – aprile) e della produzione di testosterone (settembre – novembre) con alti livelli di adrenalina nelle cellule cromaffini sembra confermare l'ipotesi che questo ormone sia necessario per sostenere (Laforgia and Capaldo, 1992) l'incremento del metabolismo richiesto per tali attività (Tav.1).

La presenza di un parallelismo tra il ciclo sessuale di *T. carnifex* ed il ciclo annuale della ghiandola adrenale è confermato anche dagli effetti della somministrazione a *T. carnifex* di un antiandrogeno, il ciproterone acetato, che induce la comparsa di A nelle cellule cromaffini, nel periodo in cui quest'amina è normalmente presente in quantità trascurabili (Laforgia and Capaldo, 1993).

Studi di tipo ultrastrutturale hanno messo in evidenza, inoltre, che il rilascio delle catecolamine ha luogo, in *Triturus*, mediante esocitosi, un processo

Mese	Attività riproduttiva	Testosterone	Sviluppo CSS	Spermatogenesi	FSH	LH	Amine	Corticoidi
gennaio		aumenta	aumenta	Livelli basali	Livelli basali	aumenta	NA	♂ piccolo ♀ diminuisce
febbraio		aumenta	aumenta	Livelli basali	Livelli basali	aumenta	NA-A (1:1)	♂ diminuisce ♀ livelli basali
marzo		picco	aumenta	Livelli basali	Livelli basali	picco	NA-A (1:1)	♂ livelli basali ♀ livelli basali
aprile		Diminuisce	diminuisce	aumenta	aumenta	picco	NA-A (1:1)	♂ aumento ♀ livelli basali
maggio		Diminuisce	diminuisce	aumenta	aumenta	diminuisce	NA	♂ aumento ♀ livelli basali
giugno		Diminuisce	diminuisce	aumenta	aumenta	diminuisce	NA	♂ aumento ♀ livelli basali
luglio		Livelli basali	Forte riduzione	aumenta	picco	Livelli basali	NA	♂ piccolo ♀ aumento
agosto		Livelli basali	Forte riduzione	picco	picco	Livelli basale	NA	♂ NP ♀ NP
settembre		aumenta	Lieve riduzione	picco	diminuisce	aumenta	NA-A (1:1)	♂ NP ♀ NP
ottobre		aumenta	Lieve riduzione	diminuisce	diminuisce	aumenta	NA-A (1:1)	♂ livelli basali ♀ livelli basali
novembre		aumenta	Aumenta	diminuisce	diminuisce	aumenta	NA-A (1:1)	♂ aumento ♀ aumento
dicembre		aumenta	aumenta	Livelli basali	Livelli basale	aumenta	NA	♂ piccolo ♀ piccolo

-  Periodi degli amori
-  Fine periodo degli amori
-  Assenza attività riproduttiva

Tav. 1

evidenziato già in Mammiferi, Anfibi ed Uccelli (Coupland, 1965; Diner, 1967; Unsicker, 1973; Accordi, 1988).

Come nella maggior parte dei Vertebrati, le cellule cromaffini di *T. cristatus* rilasciano, oltre alle catecolamine, vari peptidi bioattivi come NPY, Somatostatina 14 e Leu-Encefaline, localizzati prevalentemente sui granuli di adrenalina, e quindi più abbondanti nei periodi intermedi, quando la quantità di A nelle cellule cromaffini è più elevata (Laforgia et al., 1998).

INTERAZIONI PARACRINE TRA IL TESSUTO A STEROIDI E IL TESSUTO CROMAFFINE

La particolare disposizione del tessuto steroidogenico e del tessuto cromaffine nella ghiandola interrenale degli Anfibi può sicuramente suggerire un'interazione paracrina tra i due tipi di cellule.

Negli Anfibi l'effetto delle catecolamine sull'attività del tessuto a steroidi è alquanto controverso: in *Rana ridibunda* esercitano un debole effetto inibitorio sul rilascio di aldosterone e corticosterone da tessuto adrenale perfuso, a concentrazioni di circa $10^{-5}/10^{-4}$ M per il corticosterone e 10^{-3} M per l'aldosterone (Morra et al., 1990).

In *Xenopus laevis*, invece, l'adrenalina, ad una concentrazione di 10^{-6} M riduce l'azione stimolante dell'ACTH sulla secrezione adrenale di corticosterone ed aumenta quella sulla produzione di aldosterone (Hanke and Kloas, 1994;1995).

In *Rana temporaria* (König, dati non pubblicati), l'adrenalina (4 iniezioni da 100 µg) aumenta i livelli plasmatici di corticosterone in un intervallo di due ore: il rilascio di catecolamine dalle cellule cromaffini può quindi stimolare l'attività interrenalica (Hanke, 1978).

In *Triturus carnifex*, la somministrazione di noradrenalina stimola il rilascio di aldosterone (Capaldo et al., 2004a), mentre l'adrenalina ne inibisce il rilascio (Capaldo et al., 2004b).

Per quanto concerne l'influenza del tessuto a steroidi su quello cromaffine, numerosi dati in letteratura testimoniano nella maggior parte dei Vertebrati un effetto stimolante degli ormoni corticosteroidi, principalmente glucocorticoidi, sulle cellule cromaffini; l'ACTH, ad esempio, stimola la secrezione di A attraverso la sua azione sui livelli circolanti di glucocorticoidi (Norris, 1996).

Per quanto riguarda gli Anfibi si hanno poche notizie (Bourgeois et al., 1978), che riferiscono che la PNMT non è influenzata dai glucocorticoidi; anche i risultati di ricerche eseguite in *T. carnifex* sembrano confermare quest'ipotesi. Sono state infatti eseguiti studi somministrando ACTH ad esemplari di *Triturus carnifex*: l'ACTH, infatti, anche in questa specie, come in altri Anfibi e nei Vertebrati superiori, è coinvolto nella regolazione dell'attività steroidogenica (Mazzi et al., 1973); inoltre regola i livelli ematici dell'aldosterone (Mazzi et al., 1984).

La somministrazione di ACTH ad esemplari adulti di *T. carnifex* in gennaio, quando nelle cellule cromaffini vi sono modestissime quantità di adrenalina, pur elevando il rilascio di corticosteroidi dalle cellule steroidogeniche dell'interrenale, non determina alcun aumento della quantità totale media dei granuli di adrenalina nelle cellule cromaffini, come ci si potrebbe aspettare se l'enzima PNMT fosse corticosteroide dipendente (Capaldo et al., 2004c).

Allo stesso modo, neanche la somministrazione di cortisone (betametasone) induce la comparsa di adrenalina nei periodi in cui è presente nelle cellule cromaffini in quantità trascurabile (Capaldo et al., dati non pubblicati).

L'apparente insensibilità dell'enzima PNMT degli Anfibi, ed in particolare di quello del tritone, all'azione dei corticosteroidi, rende interessante studiarne le caratteristiche e i fattori in grado di regolarne l'attività.

L'enzima, infatti, risulta attivarsi in determinati periodi dell'anno, caratterizzati da temperature miti, e in corrispondenza di determinati momenti del ciclo riproduttivo dell'animale, cioè la ripresa della spermatogenesi (febbraio-aprile) e la ripresa della produzione di testosterone (settembre-novembre).

Pertanto, ho affrontato lo studio dell'enzima PNMT in *Triturus carnifex* con tre diversi obiettivi:

- 1) Evidenziare la localizzazione cellulare dell'enzima PNMT, sia in microscopia ottica che elettronica.
- 2) Analizzare i fattori in grado di modulare l'attività dell'enzima e in particolare la relazione tra ciclo sessuale e ciclo funzionale delle cellule cromaffini.
- 3) Determinare la sequenza dell'mRNA per l'enzima, PNMT di *T. carnifex* sul quale, in letteratura, mancano dati.

Animali

Esemplari maschi adulti di *Triturus carnifex* (peso medio 8g), catturati nei dintorni di Napoli, sono stati stabulati in acquari, esposti alla temperatura e al fotoperiodo stagionali, nutriti con fegato bovino, ed usati dopo un periodo di acclimatamento di 2 settimane (Zerani and Gobbetti, 1991). Le cellule cromaffini di *T. carnifex* presentano un ciclo funzionale che comporta variazioni stagionali nel contenuto di granuli cromaffini. In periodi caratterizzati da temperature estreme (estate ed inverno) le cellule presentano prevalentemente granuli di noradrenalina, mentre in periodi caratterizzati da temperature intermedie (primavera e autunno) granuli di noradrenalina ed adrenalina sono presenti nel citoplasma in quantità all'incirca uguali (La forgia and Capaldo, 1991). Pertanto i prelievi, ed il trattamento sperimentale, sono stati eseguiti a marzo e dicembre, corrispondenti a stadi diversi del ciclo funzionale delle cellule cromaffini.

Analisi della localizzazione cellulare dell'enzima PNMT

1) Tecniche istologiche su sezioni incluse in paraplast per la microscopia ottica

Esemplari adulti di *T. carnifex* sono stati anestetizzati per ipotermia e uccisi per decapitazione.

Le ghiandole interrenali sono state prelevate e fissate con una soluzione di bicromato di potassio, solfato di sodio anidro e formaldeide al 10% in tampone acetato M/5 a pH 4.0 (fissativo Wood).

Dopo la fissazione e la disidratazione, le interrenali sono state incluse in paraplast ed affettate ad uno spessore di 7 μm .

I vetrini ottenuti sono stati colorati con:

Colorazione Mallory, tricromica, modificata secondo Galgano, che colora le cellule a noradrenalina in giallo scuro e quelle ad adrenalina in rosso.

Colorazione Giemsa, modificata secondo Pearse, che colora le cellule a noradrenalina in verde scuro e quelle ad adrenalina in verde chiaro.

2) Immunoistochimica su sezioni incluse in paraplast

Le sezioni sono state trattate con il metodo avidina - biotina perossidasi (ABC complex) (Hsu et al., 1981). Subito dopo il prelievo, le ghiandole interrenali sono state fissate in fissativo Bouin per 2 ore a temperatura ambiente, disidratate ed incluse in paraplast. Le sezioni reidratate sono state poste in una soluzione al 3% di perossido di idrogeno in metanolo per 5 min. così da inibire le perossidasi endogene.

Successivamente, le sezioni sono state incubate con il siero normale di capra (NGS) per 20 min. e poi con l'anticorpo anti-PNMT di coniglio (Biogenesis, Poole, England, UK) a concentrazione 1:500 in tampone fosfato a pH 7.4 (PBS), overnight a 4°C in camera umida.

Dopo più lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 30 min. con l'anticorpo secondario (IgG) di capra anti-coniglio (1:400) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) e, dopo lavaggio in PBS, incubate per altri 30 min. con il reagente Vectastain Elite ABC.

L'immunoreattività è stata visualizzata mediante reazione con lo 0.05% 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB: Sigma, St. Louis, MO) e lo 0.01% perossido di idrogeno in 0.05M di tampone Tris- HCl, a pH 7.2 per 10 min. . Le cellule immunoreattive si colorano di marrone. Dopo la reazione con il DAB, le sezioni sono state contrastate con l'emallume.

3) Ibridazione in situ su sezioni in paraplant

Primo giorno

3a Pre-ibridazione dei vetrini e preparazione delle sezioni

Immediatamente dopo l'anestesia e l'uccisione degli esemplari le interrenali sono state prelevate e fissate per 24 ore in Bouin (24% formaldeide, 4.8% di

acido acetico e 71.2% di acido picrico) e trattate per l'ibridazione in situ con 4% paraformaldeide in PBS. Dopo disidratazione e inclusione in paraplast, le sezioni sono state tagliate a uno spessore di 5-6 μm e poste su vetrini Plus Superfrost (Menzel-Glaser).

Lo screening delle sezioni su cui erano presenti isolotti cromaffini è stato realizzato effettuando la colorazione Giemsa su un vetrino ogni dieci. La reazione di ibridazione è stata eseguita su vetrini adiacenti a quelli in cui erano presenti le cellule cromaffini.

E' stata utilizzata la versione 1.8 del Cluster X (Thompson et al., 1997) per comparare le sequenze aminoacidiche per l'enzima PNMT di diverse classi di Vertebrati. La percentuale di conservazione delle sequenze è stata di circa il 73% per la PNMT. Questi elevati valori di conservazione e l'elevata severità nei lavaggi e nella temperatura nelle procedure sperimentali hanno permesso di utilizzare una sonda eterologa che ha portato a dei risultati significativi.

Quattro sonde, due senso e due anti-senso di circa 80 bp ognuna, sono state sintetizzate usando come sonda un cDNA per la PNMT di ratto contenente la regione 3' codificante e il loop 3'-finale citoplasmatico della sequenza aminoacidica della PNMT, fornitemi gentilmente dalla professoressa M. Evinger (USA), inserito in un plasmide Bluescript.

Dopo, il plasmide è stato purificato usando il kit Ultraclean miniplasmid (Mobio Laboratories) e tagliato con appropriati enzimi di restrizione.

Le sonde ad RNA sono state sintetizzate e trattate con digoxigenina usando il kit DIG RNA (Boehringher- Mannheim) o T3 RNA polimerasi (Fermentas).

Il controllo dell'efficienza di marcatura è stato eseguito disponendole su membrane di nylon a carica positiva (Boehringher-Mannheim, Mannheim, D) con il sistema colorimetrico (Sigma, St. Louise, MO).

Le sezioni sono state trattate con acqua DEP-C ed RNAasi per prevenire eventuali contaminazioni. I vetrini poi sono stati posti a 200°C per 2-3 ore per rimuovere le RNAasi.

La PFA-PBS al 4% è stata stoccata e conservata a -20°C.

3b Lavaggio / idratazione

Tutte le soluzioni e gli alcool sono stati diluiti in acqua DEP-C.

Dopo aver effettuato la sparaffinatura in xilolo le sezioni sono state idratate mediante l'uso di una serie di alcool decrescente (100°, 95°, 90°, 80°, 70°, 50° e 30° diluiti in acqua DEP-C). Le sezioni poi sono state lavate più volte in PBS, poi per 30 min. a temperatura ambiente in 4% PFA in PBS-DEP-C e poi di nuovo lavate in PBS.

Successivamente le sezioni sono state trattate con proteinasi K ad una concentrazione di 10 µg/ml in 20 mM di Tris-HCl e in 1 mM di EDTA a pH 7.2,

per un tempo pari a 5 min. . Seguono altri lavaggi in PBS per 30 min. ed altri successivi lavaggi in PBS.

Le sezioni sono state poi poste in 2xSSC (con DEP-C) per 5 min. con due lavaggi e poi immerse per circa 30 min. nel tampone Tris/Glicina. Questo tampone si ottiene da: 40% formaldeide (deionizzata con un volume finale al 50%), SSC 5x, Denhard 1x, sSDNA (salmon testis DNA 100 µg/ml, recentemente marcato), tRNA. Il tutto è stato portato a volume con acqua DEP-C. I vetrini, successivamente sono tenuti in camera umida, con il tampone di ibridazione, quelli per la sonda senso separati da quelli per la sonda anti-senso. Su ogni vetrino si pongono circa 55 µl di sonda diluita nel mix di pre-ibridazione, che a sua volta è stato precedentemente posto, in camera umida, per 1 ora in stufa a 70°C. La sonda diluita è vortexata e posta nel bagnetto a 95°C per 2 min., immersa nel ghiaccio ed infine utilizzata.

3c Applicazione della sonda

Dopo 60 min. a 70°C sui vetrini senso e anti-senso si applica la sonda e si cambia il tampone della camera umida. I vetrini sono coperti con i cover slip e riposti nella stufa a 70°C overnight.

Secondo giorno

3d Lavaggio post-ibridazione e rilevamento della sonda con anticorpo digoxigenina.

Tutte le soluzioni utilizzate per la post-ibridazione sono state precedentemente sterilizzate e diluite con acqua bidistillata.

Si rimuovono i cover slips immergendo le sezioni in SSC a temperatura ambiente, poi i vetrini con le sezioni sono lavati in SSC al 0.5x ed in formaldeide al 20% per 3 ore a 60°C. Si effettuano più lavaggi in soluzione a temperatura ambiente così da diminuire la temperatura gradualmente. Successivamente le sezioni si lavano in NTE (0.5M di NaCl, 10mM Tris a pH 7.0, 5 mM di EDTA in acqua bidistillata) per 15 min., poi si pongono in NTE plus ed RNasi A per 30 min. a 37°C, effettuando più lavaggi.

Dopo una serie di passaggi in SSC 0.5x in formaldeide al 20%, e poi solo in SSC 2x per 30 min. a temperatura ambiente, una soluzione blocking in acido maleico viene addizionata all'anticorpo per un tempo minimo di 30 min. .

L'anticorpo anti-digoxigenina è diluito 1:500 in soluzione blocking (2% Boeringher blocking solution più 10% di siero di pecora) in 100 mM di acido maleico e 150 nM di NaCl ad un pH di 7.5. Il volume necessario di soluzione per

ogni vetrino è di circa 500 µl. Le sezioni sono incubate a 4°C overnight ponendo ogni vetrino su un disco Quadriperm.

Terzo giorno

3e Colorazione del tessuto

I vetrini sono stati posti a temperatura ambiente, sono stati rimossi i coverslips e le sezioni sono state messe in TBS effettuando più lavaggi in questo tampone. Poi per 30 min. i vetrini sono stati posti in una soluzione 0.1% di tween-20 e 0.5 mg/ml di levamisol in acqua bidistillata. Si prepara la soluzione colorante, costituita da FAST Green FCF.

Il colorante viene applicato a ciascun vetrino, monitorando la colorazione al microscopio. A reazione ultimata, si pongono i vetrini in PBS ed EDTA 1mM per un tempo minimo di 30 min. .

Infine, si effettua il montaggio mediante Dako glicegel (Merck).

4) Tecniche di microscopia elettronica a trasmissione

Le interrenali sono state fissate in glutaraldeide al 2.5% in tampone fosfato di Millonig a pH 7.4 a 4°C, sciacquate in buffer, post-fissate in tetrossido di osmio all'1% (2 ore, 4 °C) ed incluse in Epon; le sezioni semifini (3 µm) sono state colorate con Blu di toluidina, che colora la sezione in blu mentre le cellule cromaffini assumono un colore marrone. Le sezioni ultrasottili (30 nm) poi, sono state raccolte su retini di rame rivestiti di formvar, colorate con acetato di uranile e citrato di piombo, quindi osservate al microscopio elettronico (Philips EM301 al CISME).

La fissazione in glutaraldeide consente di distinguere le cellule a noradrenalina da quelle ad adrenalina, in quanto la noradrenalina forma con la glutaraldeide un complesso insolubile responsabile della reazione positiva con il tetrossido di osmio. L'adrenalina, invece, non forma con la glutaraldeide questo complesso ed è persa per la maggior parte durante i processi di fissazione e disidratazione, così che i granuli mostrano solo una debole elettron-densità (Wasserman and Tramezzani, 1964) .

Per ogni esemplare sono state esaminate 10 microfotografie a basso ingrandimento del tessuto a steroidi e 10 del tessuto cromaffine, contenenti

ciascuno almeno 4 cellule; l'analisi morfometrica è stata eseguita grazie ad un sistema computerizzato di analisi d'immagine (KS 300 per Windows 98, Zeiss).

In ogni cellula cromaffine sono stati valutati: il numero totale di granuli cromaffini/ μm^2 , il numero medio di granuli a noradrenalina/ μm^2 , il numero medio di granuli ad adrenalina/ μm^2 , il rapporto numerico tra i due tipi di granuli cromaffini.

In ogni cellula a steroidi è stata valutata l'area occupata dai vacuoli lipidici, in rapporto all'area citoplasmatica, secondo la formula:

$$\text{Indice lipidi/citoplasma} = \frac{\text{Area tot. lipidica media } (\mu\text{m}^2)}{\text{Area tot. citoplasmatica media } (\mu\text{m}^2)}$$

Area lipidica media = media della sommatoria delle aree lipidiche tot. (μm^2)

Area citopl. media = media della sommatoria delle aree citoplasmatiche tot. (μm^2)

5) Analisi statistica per i parametri morfometrici

I dati sono espressi come media \pm errore standard delle medie (ES). I dati degli esemplari controllo e di quelli trattati sono stati testati per la significatività usando il test *t* di Student, seguito dal test di Duncan-Anova. Le differenze sono state considerate significative per $P < 0.05$.

6) Immunolettromicroscopia

Le sezioni ultrasottili sono state montate su retini di nickel rivestiti di formvar; successivamente sottoposte a etching in metaperiodato di sodio saturo per 1 ora, (De Mey et al., 1981) lavate in acqua bidistillata, esposte ad una soluzione 1% BSA (Sigma, bovine serum albumin, libero da globulina) in TBS (Tris buffersalt) per 30 min. quindi incubate overnight, a 4°C, con anticorpo anti-PNMT di coniglio (Biogenesis, Poole, England,UK) 1:300 in 1% BSA-TBS.

I retini sono stati sciacquati più volte a temperatura ambiente in 1% BSA-TBS ed incubati per 90 min. con l'anticorpo secondario di capra anti-coniglio marcato con oro colloidale (10 nm, Sigma) (1:50). Sono stati ulteriormente lavati

con 1% BSA-TBS, poi con acqua bidistillata e colorati con acetato di uranile e citrato di piombo.

I controlli, sia per la M.O. che per la M.E., sono stati eseguiti I) sostituendo l'antisiero specifico con siero normale di coniglio II) omettendo l'anticorpo primario. In entrambi i casi non sono state osservate strutture immunopositive.

Analisi della relazione tra ciclo sessuale e ciclo funzionale delle cellule cromaffini

1) Trattamento sperimentale

Negli Anfibi Anuri l'enzima PNMT è indipendente dall'influenza dei corticosteroidi (Wurtman et al., 1968; Dupont et al., 1977), mentre mancano dati per quanto concerne gli Urodela. Ricerche precedenti (Capaldo et al., 2004c) suggeriscono che anche in *T. carnifex* l'enzima non sia sensibile all'azione dei glucocorticoidi; inoltre la corrispondenza tra i periodi di attività dell'enzima (febbraio-aprile e settembre-novembre) e determinati eventi del ciclo riproduttivo (ripresa della spermatogenesi e ripresa della produzione di testosterone, rispettivamente) suggeriscono una relazione tra il ciclo funzionale

delle cellule cromaffini e il ciclo sessuale (Laforgia and Capaldo, 1992). In particolare il picco dell'ormone FSH (luglio-agosto), (Galgano,1942) preposto alla regolazione della gametogenesi, coincide nel tritone con il periodo in cui l'enzima PNMT è inattivo, suggerendo un'influenza inibitrice dell'FSH sulla PNMT. Pertanto è stato intrapreso un trattamento sperimentale con quest'ormone sia nel mese di marzo, in cui l'enzima PNMT è attivo, che a dicembre, periodo in cui l'enzima PNMT è scarsamente attivo.

Trenta animali sono stati raccolti due settimane prima dell'esperimento di marzo e 30 prima di quello di dicembre. In entrambi i periodi, 10 animali hanno ricevuto 11 iniezioni intraperitoneali (ogni 3 gg.) ognuna di 7.5 U.I. di FSH (93,75 U.I./100g) (Metrodin, HP. 75., SERONO), sciolti in 0.1 ml di NaCl 0.64%. Il prelievo è stato eseguito 72 ore dopo l'11^a iniezione. 10 animali sono stati trattati soltanto con il carrier (NaCl 0.64%) e prelevati a 72 ore dall'ultima iniezione; 10 esemplari non hanno subito alcun trattamento sperimentale.

Gli animali sono stati anestetizzati per ipotermia. Il sangue è stato prelevato in 3 min. per puntura cardiaca, tra le 11.00 e le 14.00. Dopo la coagulazione, il sangue è stato centrifugato per 15 min. a 2000g . Il siero è stato raccolto e conservato a -22°C.

Le ghiandole interrenali sono state processate per la microscopia elettronica a trasmissione, come descritto precedentemente.

2) Analisi ormonale

Sui campioni di siero sono stati valutati i livelli di aldosterone e corticosterone (RIA), e delle catecolamine adrenalina e noradrenalina (HPLC).

I livelli sierici di aldosterone e corticosterone sono stati valutati secondo un metodo precedentemente usato in *T. carnifex* (Andreoletti et al., 1988; Capaldo et al., 2004a,b).

L'aldosterone non radioattivo (standard) è stato fornito dalla Sorin Biomedica; il corticosterone purificato fornito dalla Fluka è stato dissolto in etanolo (100 µg/µl) prima della diluizione in buffer. Gli steroidi radioattivi (1,2,6,7-³H), aldosterone e (1,2,6,7-³H), corticosterone, sono stati forniti dalla Amersham.

I campioni di siero non emolizzati (80 µl per l'aldosterone, e da 30 a 40 µl per il corticosterone) sono stati incubati per 30 min. a 37°C con quantità note degli steroidi radioattivi in 0.06 M di tampone Na-fosfato contenente 0.01M di EDTA sale disodico, e 0.1% BSA pH 7.4.

I campioni sono stati caricati su colonne da estrazione (Sep-Pak C18, Waters) lavati una volta con 500 µl di metanolo puro; gli estratti sono stati essiccati a 37°C sotto vuoto e ridisciolti in 1400 µl di PBS. Un'aliquota (400 µl) è stata utilizzata per determinare il recupero dell'ormone marcato, e aliquote duplicate (2 x 400 µl) per le determinazioni RIA.

Gli antisieri sono stati ottenuti in coniglio contro aldosterone 3-(0-Carboxymethyl)oxime BSA e 21-thyroglobulin corticosterone rispettivamente; le diluizioni finali e i livelli di cross-reattività sono stati forniti dalla ditta produttrice (Biogenesis Ltd, Poole, England UK) . Dopo incubazione con l'appropriato antisiero per 30 min. a 37°C e per altre 2 ore in bagno di ghiaccio, è stato utilizzato carbone rivestito di destrano per separare gli steroidi liberi da quelli legati. Dopo immersione per 10 min. in bagno di ghiaccio e dopo centrifugazione (2000 rpm), un'aliquota di supernatante è stata pipettata in 5 ml di fluido di scintillazione e contata con uno spettrofotometro a scintillazione liquida (Tri-Carb Pakard, GMI, Inc., Albertville, Minnesota, USA). L'efficacia dell'estrazione è variata dall'80% al 90% per entrambi gli ormoni; i risultati sono stati ottenuti mediante una curva standard di calibrazione linearizzata con un metodo log-logit, e corretti per ciascun prodotto estratto. La sensibilità è stata di 5 pg/provetta per l'aldosterone, e 15 pg/provetta per il corticosterone. Il coefficiente di variazione intrassay ottenuto è stato del 10% e quello interassay del 12% per entrambi gli steroidi.

I livelli di adrenalina e noradrenalina sono stati determinati in 150 µl di siero.

Per l'estrazione delle catecolamine, 50 µl di diidrossibenzilamina sono stati aggiunti come standard interno. Dieci milligrammi di ossido di Al (Sigma) attivati, sono stati utilizzati come adsorbente per le catecolamine e lo standard interno. Dopo 15 min. di agitazione e centrifugazione, il supernatante è stato rimosso e l'ossido di Al contenente le catecolamine adsorbite e lo standard interno è stato lavato per tre volte con 1 ml di acqua distillata, mediante agitazione, centrifugazione ed eliminazione del supernatante, usando un metodo HPLC, con rivelazione elettrochimica, già utilizzato negli Anfibi (Capaldo et al., 2004a,b; Kloas and Hanke, 1992). La rivelazione elettrochimica HPLC utilizza un eluente acido; i livelli di NA e di A sono stati calcolati mediante comparazione con lo standard interno (diidrossibenzilamina). I valori limite di rivelazione per A e NA sono intorno a 20 pg.

3) Analisi statistica

I dati ottenuti da ogni esemplare sono stati utilizzati per la valutazione del valore medio per ciascun gruppo sperimentale, ed è stato calcolato l'errore standard della media (SE). L'analisi statistica è stata eseguita usando il test *t* di

Student, seguito dal test di Duncan-Anova. Le differenze sono state considerate significative per $P < 0.05$.

Analisi della sequenza dell'mRNA

1) Estrazione dell'RNA totale mediante guanidina isotiocianato

- La tecnica di omogeneizzazione consiste nel porre il tessuto in una soluzione guanidina isotiocianato in un rapporto 1:1 ($V_{\text{soluzione}}$: tessuto).
- Centrifugare per 10 min. a 10.000 rpm così da far precipitare i detriti e filtrando il supernatante mediante garza.
- Contemporaneamente, si versano 4 ml di soluzione di CsCl in un tubo poliallomerico.
- Si versano lentamente lungo le pareti del tubo 7.0 ml della soluzione filtrata in precedenza (vedi punto precedente) sopra il velo di Cs.
- Si ultracentrifuga per 20 ore a 18°C a 28.000 rpm.

- Si aspira il supernatante lasciando il pellet leggermente bagnato.
- Il pellet si sciacqua con H₂O DEPC (Diethyl pirocarbonato) allo 0.1%, risospendere in H₂O DEPC allo 0.1% (300μl) e correre un'aliquota su di un gel di agarosio.
- Leggere l'A₂₆₀ così da determinare la concentrazione.

2) Isolamento dell'mRNA poli(A) dall'RNA totale

Si utilizza un kit che usa colonne a pressione rivestite di cellulose oligo(dT) che efficientemente e rapidamente isolano e purificano l'RNA messaggero poliadenilico (RNA poli(A)⁺) dall'RNA totale.

- L'RNA totale si denatura a 65°C per 5min. andando ad aggiungere quantità appropriate di tampone 10X fino ad ottenere una concentrazione finale 1X.
- Anche il tampone di eluizione viene preriscaldato a 65°C.
- Ad entrambe le estremità della colonna vengono rimossi i tappi.

- Il tampone viene spinto lentamente attraverso la colonna (~ 1 goccia ogni 2").
- Si aggiungono lentamente 200µl di tampone alto-sale (10 mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA, 0.5 M di NaCl) alla colonna.
- Ripetere questo passaggio con una seconda aliquota di 200 µl di tampone alto-sale.
- Il campione di RNA totale preparato (~ 400 µl) si aggiunge alla colonna, il tutto sempre lentamente.
- Successivamente si aggiungono altri 200 µl di tampone alto-sale alla colonna spingendolo ad una velocità di 1 goccia / secondo.
- Si ripete il passaggio con una seconda aliquota da 200 µl dello stesso tampone.
- Si lava tre volte la colonna usando aliquote da 200 µl di tampone basso-sale (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1 M di NaCl) spingendo il tampone nella colonna con velocità 1 goccia/secondo.
- Fluire l'mRNA usando 200 µl di tampone di eluizione preriscaldato (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) e spingerlo ad una velocità di 1 goccia/secondo. L'eluato si conserva.

- Successivamente si aggiunge il tampone campione 10 X (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 M NaCl) fino alla concentrazione di 1 X. Miscelare, aggiungere 2.5 volumi di etanolo al 100% freddo e miscelare bene. Il tutto si conserva overnight a 20°C. Il giorno dopo si centrifuga alla massima velocità per 30 min. . Si lava il pellet con etanolo al 70% preparato con H₂O DEPC.
- In fine il pellet viene asciugato, ed una volta accertata l'assenza di contaminazione da parte delle ribonucleasi, si risospinge il pellet nel tampone. Viene conservato, previa risospensione dell'RNA in etanolo al 100 % o in H₂O DEPC a – 80 °C.

3) Libreria di cDNA

3.1 *Sintesi della prima elica di cDNA*

- In un tubo da microcentrifuga sono aggiunti:
 - 5 μl di first-strand buffer 10 X
 - 3 μl di miscela di dNTP (10 mM dATP, dGTP, dTTP e 5 mM di 5 metil dCTP)
 - 2 μl di clinker primer (1.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
 - X μl di H₂O DEPC
 - 1 μl di inibitore ribonucleasico (40 U/ μl)
- Il tutto viene miscelato e dopo si aggiungono X μl di RNA poli(A)⁺ (5 μg). Si rimiscela delicatamente.
- Il primer si pone a temperatura ambiente, per 10 min., affinché si possa legare allo stampo. Durante l'incubazione, si vanno ad aliquotare 0.5 μl di [α -³²P] dNTP (800 Ci/mmol) in un tubo separato per il controllo.
- In un secondo momento, si aggiungono 1.5 μl di MMLV-RT (Moloney Rumine Leukemia Virus Reverse Transcriptase 50 U/ μl) alla reazione di

- sintesi della prima elica. Si miscela delicatamente e si centrifuga per pochi secondi.
- Si trasferiscono 5 μl di reazione di sintesi della prima elica in un tubo separato contenente 0.5 μl di [α - ^{32}P] dNTP (800 Ci/mmol). Questo campione marcato rappresenta il controllo per la reazione di sintesi della prima elica di cDNA.
- Si vanno poi ad incubare le reazioni di sintesi della prima elica, incluso il controllo, a 37°C per 1 ora.
- Infine si vanno a rimuovere le reazioni di sintesi della prima elica dal bagno a 37°C, mantenendo la reazione non marcata in ghiaccio e conservando il controllo marcato a - 20°C.

3.2 Sintesi della seconda elica di cDNA

- Si aggiungono diversi componenti a 45 μl della reazione di sintesi della prima elica non marcata:

20µl di 10 X second-strand buffer

6 µl di miscela di dNTP (10 mM dATP, dGTP, dTTP e 26 mM di CTP)

114 µl di H₂O DEPC

2 µl di [α -³²P] dNTP (800 Ci/mmol)

- In un secondo momento alla reazione di sintesi della seconda elica si aggiungono due enzimi:

2 µl di Rnasi H (1.5 U/µl)

11 µl di DNA polimerasi I (9.0 U/µl)

- Si va ad agitare delicatamente il contenuto del tubo, si centrifuga per pochi secondi e viene incubato a 16°C per 3 ore. E' necessario che la temperatura rimanga costante perché temperature superiori a 16°C possono causare la formazione di strutture ad uncino che non sono clonabili e possono andare ad interferire con l'efficienza di inserzione del cDNA correttamente sintetizzato nel vettore.
- Dopo 3 ore il tubo viene posto in ghiaccio

3.3 Pareggiamento delle estremità di cDNA

- Alla reazione di sintesi della seconda elica si aggiungono:
23µl di miscela di dNTP (2.5 mM di ATP, dGTP, dTTP, dCTP)
2 µl di Pfu DNA polimerasi (2.5 U/µl)
- Si centrifuga per pochi secondi e si va ad incubare la reazione per 45 min. a 70 °C.
- Si rimuove la reazione e si aggiungono 200 µl di fenolo-cloroformio [1:1 (v/v)].
- Si ricentrifuga per 2 min. alla massima velocità a temperatura ambiente e, si trasferisce lo strato acquoso superiore, contenente il cDNA in un nuovo tubo.
- Successivamente, si aggiunge un uguale volume di cloroformio e si centrifuga per 2 min. a temperatura ambiente, e si trasferisce lo strato acquoso superiore, contenente il cDNA, in un nuovo tubo.
- Si fa precipitare il cDNA aggiungendo:

20 μ l di sodio acetato 3 M

400 μ l di etanolo a 100 %

- Si lascia precipitare overnight a -20°C .
- Il giorno seguente si centrifuga per 1 ora a 4°C .
- Si va ad eliminare il supernatante marcato e si lava il pellet con 500 μ l di etanolo al 70 %.
- Si centrifuga nuovamente alla massima velocità a temperatura ambiente per 2 min. .
- Lasciare asciugare il pellet aspirando l'etanolo
- Si risospende il pellet in 9 μ l di adattatore EcoR I e si va ad incubare a 4°C per 30 min. .
- In fine si trasferisce 1 μ l di questa reazione di sintesi della seconda reazione in un tubo. Questo campione marcato rappresenta il controllo della reazione di sintesi della seconda elica. Quindi si fa correre un gel di agarosio per determinare la dimensione di cDNA e la presenza di ogni struttura secondaria.

3.4 Ligaggio degli adattatori EcoR I

- Al tubo contenente cDNA con le estremità smussate e gli adattatori EcoR

I si addiziona:

1 μ l di 10 X di tampone di ligasi

1 μ l di 10 mM di rATP

1 μ l di T4 DNA ligasi (4 U/ μ l)

- Successivamente si centrifuga per qualche secondo e si va ad incubare overnight a 8°C.
- Il giorno dopo si induce l'inattivazione della ligasi mediante calore ponendo il tubo a 70°C per 30 min. .

3.5 Fosforilazione delle estremità EcoR I

- Una volta inattivata la ligasi si centrifuga la reazione per qualche istante e poi si fa raffreddare a temperatura ambiente per 5 min. .

- Le estremità sono fosforilate aggiungendo:
 - 1 μl di 10 X di tampone di ligasi
 - 2 μl di 10 mM di rATP
 - 6 μl di H₂O sterile
 - 1 μl di T4 polinucleotide chinasi (10 U/ μl)
- La reazione viene incubata a 37°C per 30 min. .
- Successivamente si inattiva la chinasi a 70°C per 30 min. .
- In fine si centrifuga velocemente e si permette alla reazione di raggiungere la temperatura ambiente.

3.6 Digestione con Xho I

- Si aggiungono i seguenti composti alla reazione:
 - 28 μl di tampone per Xho I
 - 3 μl di Xho I (40 U/ μl)
- La reazione viene incubata per 1.5 ore a 37°C.

- Al tubo sono aggiunti 5 μ l di STE 10 X e 125 μ l di etanolo al 100 %.
- La reazione precipita overnight a -20°C .
- IL giorno seguente la reazione viene centrifugata alla massima velocità a 4°C per 1 ora.
- Si elimina il supernatante, si asciuga completamente il pellet, risospingendolo nuovamente in 14 μ l di STE 1 X.
- Si aggiungono 3.5 μ l di colorante per il caricamento della colonna a ciascun campione.

3.7 Frazionamento dei campioni

- La colonna si lava riempiendo il serbatoio con un minimo di 10 ml di STE 1 X.

- Giunto a ~ 50 µl di STE sulla superficie della resina, si carica il cDNA, rilasciando il campione delicatamente.
- Appena i campioni di cDNA eluiscono attraverso la colonna, il colorante diffonde gradualmente migrando attraverso la resina.
- Nel momento in cui il colorante raggiunge sulla siringa il livello di – 0.4 ml, si raccolgono 3 gocce per frazionare (~ 120 µl).
- Si continuano a collezionare le frazioni finchè il colorante raggiunge il livello di 0.3 ml. Si dovrebbero almeno raccogliere 10 frazioni.
- Prima di andare a processare le frazioni e recuperare il cDNA, è necessario rimuovere 10 µl da ciascuna frazione e farli correre su gel di acrilamide per determinare l'effettiva dimensione dei frammenti.

3.8 Il processamento di frazioni di cDNA

- Si va ad aggiungere ad ogni frazione un uguale volume di fenolo-cloroformio.

- Successivamente si centrifuga alla massima velocità per pochi secondi a temperatura ambiente.
- Si trasferisce lo strato superiore in un nuovo tubo.
- Si aggiunge un uguale volume di cloroformio.
- Ricentrifugare a temperatura ambiente per pochi secondi.
- Si trasferisce lo strato acquoso superiore in un nuovo tubo
- Aggiungere 2 volumi di etanolo al 100%.
- Si fa precipitare a -20°C overnight
- Il giorno seguente, si centrifuga a 4°C per 1 ora, e si trasferisce il supernatante in un tubo nuovo.
- Si lava il pellet con $200\ \mu\text{l}$ di etanolo all'80% e in seguito si centrifuga per pochi secondi alla massima velocità a temperatura ambiente.
- Si rimuove l'etanolo e si fa asciugare il pellet .

3.9 Ligaggio del cDNA nel vettore Uni-Zap XR

- Si aggiungono in ordine:

X μ l di cDNA (~ 100 ng) risospeso

0.5 μ l di tampone di ligasi 10 X

0.5 μ l di rATP 10 mM

1.0 μ l di vettore Uni-Zap XR (1 μ g/ μ l)

0.5 μ l di T4 ligasi (4U/ μ l)

Si va ad incubare la reazione a 4°C per 36 ore

- Dodici ore prima del termine dell'incubazione, affinché si possa impaccare la libreria di cDNA, si preparano 50 ml di cultura di cellule XLi-Blu MRF' da una colonia isolata su di una piastra di agar-tetraciclina. Contemporaneamente, in modo analogo, si preparano 50 ml di cultura di cellule VC257 così da poter piastrare il DNA wild-type γ di controllo dell'estratto dell'impaccamento Gigapack III Gold. Quindi, al termine del lignaggio, si va ad impaccare 1 μ l di ciascun lignaggio, utilizzando l'estratto dell'impaccamento Gigapack III Gold.

3.10 *Piastramento e titolazione*

- Si prepara l'ospite batterico
- Si diluisce il fago γ in tampone SM così come descritto:

a. Per una libreria primaria

Si aggiungono a 200 μ l di cellule ospiti, diluite in 10 mM di MgSO_4 ad una $\text{OD}_{600} = 0.5$, 1 μ l di fago γ .

b. Titolazione di una libreria amplificata

Il fago γ amplificato deve essere diluito in tampone SM nel rapporto 1:10.000, 1:100.000, 1:1.000.000. In un secondo momento si aggiungono 1 μ l di ciascuna diluizione a 200 μ l di cellule ospiti.

- Successivamente, si incuba il fago e batteri per 30 min. a 37°C, per permettere al fago di legarsi alle cellule.
- Poi si sono addizionate diverse componenti:

2 ml di NZY agar top

15 μ l di 0.5 M 18 TG

50 μ l di X-gal [250 mg/ml (in DMF)]

- Si piastra su piastre di agar NZY e dopo \sim 20 min. di assestamento si vanno ad incubare a 37°C.
- Dopo \sim 10 ore, le piastre dovrebbero essere visibili, nonostante però, la comparsa di colore richieda un'incubazione overnight.
- Compariranno blu le placche di fondo ($< 1 \times 10^5$ pfu/ μ g di bracci), mentre le placche dei ricombinanti saranno bianco latte (10-100 volte $>$ del fondo).

3.11 Amplificazione della libreria

- L'ospite batterico si prepara
- Si diluiscono le cellule ad una $OD_{600} = 0.5$ in 10 mM di $MgSO_4$ (600 μ l di cellule ad una OD_{600} di 0.5 per ciascuna piastra di 150 mm).

- Aliquote della sospensione della libreria contenente $5 \cdot 10^4$ pfu di batteriofago, sono combinate con 600 μ l di cellule ospiti (per amplificare $1 \cdot 10^6$ placche è necessario utilizzare un totale di 20 aliquote).
- Si vanno ad incubare i tubi contenenti il fago γ e le cellule ospiti a 37°C per 30 min. .
- Ciascuna aliquota di batteri infetti viene miscelata con 6.0 ml di NZY agar top ed il tutto è sparso sulle piastre di agar NZY da 150 mm.
- Successivamente, una volta solidificatosi l'NZY, si vanno ad incubare a 37°C per 10 ore.
- Si ricoprono le piastre con 10 ml di tampone SM e si conservano a 4°C overnight.
- Il giorno seguente si va a recuperare la sospensione contenente il batteriofago da ciascuna piastra e la si va a porre in un contenitore di polipropilene sterile. Le piastre sono risciacquate con altri 2 ml di tampone SM, si aggiunge poi cloroformio (ad una concentrazione finale di 5% v/v). Miscelare bene ed incubare per 30 min. a temperatura ambiente.

- E' necessario, mediante centrifugazione a 2500 rpm per 15 min. ad 8°C, rimuovere il sedimento cellulare.
- Si recupera e si trasferisce il supernatante in un contenitore sterile (è fondamentale ripetere più volte gli ultimi due passaggi fino a quando il supernatante appare opaco).
- Non appena il supernatante risulta chiaro, si aggiunge cloroformio (ad una concentrazione finale di 0.3% v/v) e si conserva a 4°C.
- E' sempre consigliabile conservare aliquote di libreria amplificata in DMSO a 7% (v/v) a - 80°C.
- In fine si titola la libreria amplificata usando cellule ospiti e diluizioni seriali della libreria.

3.12 *Lifting*

- Si pone su ciascuna piastra di agar NZY, una membrana di nitrocellulosa per 2-3 min. . Ciò si attua per garantire il trasferimento delle particelle fagiche sulla membrana. Si usa l'agar per l'orientazione ed un ago per forare la membrana.
- Dopo il lifting la membrana di nitrocellulosa è denaturata immergendola in una soluzione denaturante di NaCl 1.5 M e NaOH 0.5 M per 1 min. .
- Successivamente viene neutralizzata immergendola per 3 min. in una soluzione di NaCl 1.5 M e Tris-HCl 0.5 M (pH 8.0).
- Risciacquata per ~ 20 min., immergendola in una soluzione tampone di Tris-HCl 0.2 M e SSC 2 X.
- Asciugare su carta Whatman 3MM
- Porre in stufa ad 80°C per 2 ore
- Conservare le piastre a 4°C.

4) La Sonda

Poiché il gene per la PNMT non è stato ancora isolato negli Anfibi, ho deciso di utilizzare un clone di cDNA (4.85 μ g/ μ l) per la PNMT isolato da una libreria di cDNA di ghiandola adrenale di ratto. Questo clone è stato suclonato nel sito EcoR I del vettore Bluescript SK⁻. L'orientamento è tale che si ottiene un elica +, nel momento in cui si ha la trascrizione con l'RNA polimerasi T7.

Questo clone mi è stato gentilmente fornito dalla Professoressa M. Evinger, Department of Pediatrics, University of Suny Health Sciences – Stony Brook, N.Y., USA.

5) Sequenziamento

Il sequenziamento è stato effettuato dai laboratori PRIMM s.r.l. (DNA Sequencing Naples Facility), Via Pietro Castellino 111, 80131 Napoli-Italia.

Localizzazione cellulare dell'enzima PNMT

Microscopia ottica

La ghiandola interrenale di *Triturus carnifex* è costituita di numerosi isolotti, separati tra loro, disposti sulla superficie ventrale del rene, vicini al suo margine mediale.

Gli isolotti contengono cellule steroidogeniche e cromaffini, queste ultime comprese tra cordoni pluristratificati di cellule a steroidi. I due tipi di cellule sono strettamente mescolati (Hanke, 1978; Grassi Milano and Accordi, 1986). Le colorazioni istologiche specifiche per le granulazioni cromaffini non consentono in entrambi i periodi di distinguere due diversi tipi cellulari perché sia con la colorazione Mallory, che colora le cellule NA in giallo scuro e quelle A in rosso, che con la colorazione Giemsa, che colora le cellule NA in verde scuro e quelle A in verde chiaro, le cellule cromaffini assumono un colore intermedio, non riferibile a nessuno dei due tipi cellulari (Figg. 11,12).

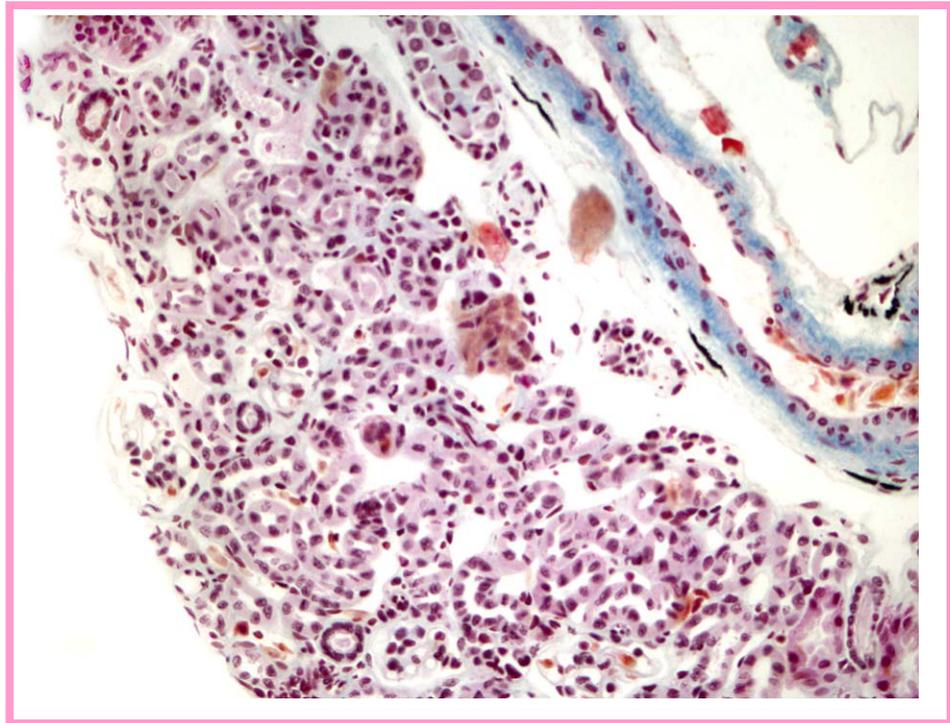


Fig. 11: Immagine di M.O.; Colorazione Mallory, le cellule cromaffini assumono un colore intermedio tra il giallo scuro e il rosso arancio.

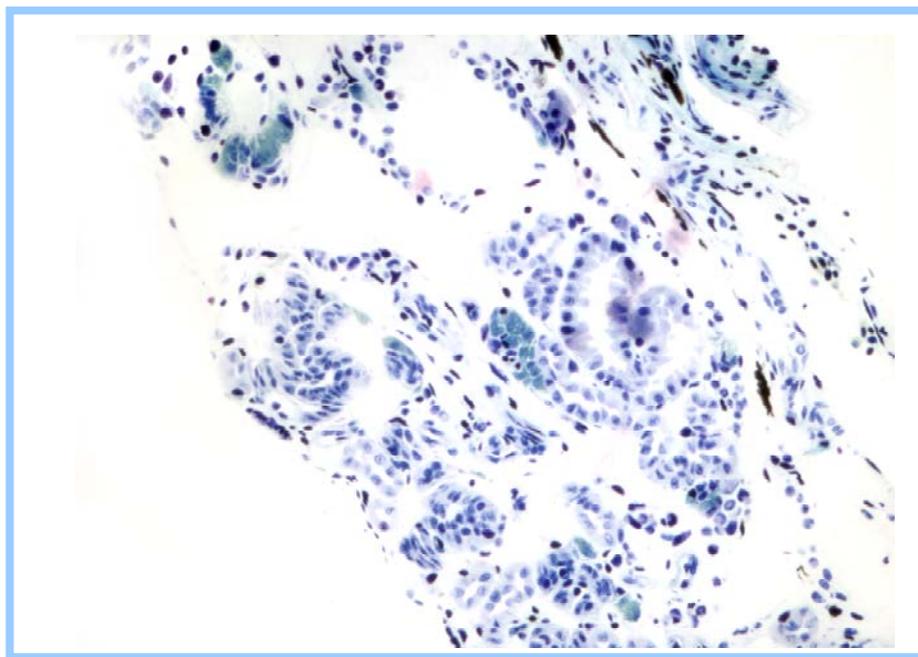


Fig. 12: Immagine di M.O.; Colorazione Giemsa, le cellule cromaffini assumono un colore intermedio tra il verde scuro ed il verde chiaro.

Microscopia elettronica a trasmissione

Le cellule cromaffini sono caratterizzate da nuclei larghi ricchi di eterocromatina, reticolo endoplasmatico ben sviluppato e numerosi mitocondri.

I granuli di NA appaiono polimorfi e fortemente elettroni-densi, con un core spesso strettamente aderente alla membrana limitante. I granuli di A sono rotondeggianti, debolmente elettroni-densi, con un core finemente granulare separato dalla membrana limitante da un alone chiaro (Fig. 13a,b).

T. carnifex presenta un singolo tipo di cellula cromaffine, che presenta un ciclo annuale con variazioni stagionali nel rapporto tra granuli di noradrenalina e adrenalina contenuti nel citoplasma. Nei periodi dell'anno caratterizzati da temperature estreme (inverno ed estate) (Fig. 13a) c'è una forte prevalenza di granuli di noradrenalina; nei periodi caratterizzati da temperature intermedie (autunno e primavera) (Fig. 13b) i granuli di A e NA sono presenti nelle cellule in quantità all'incirca uguali (Laforgia and Capaldo, 1991).

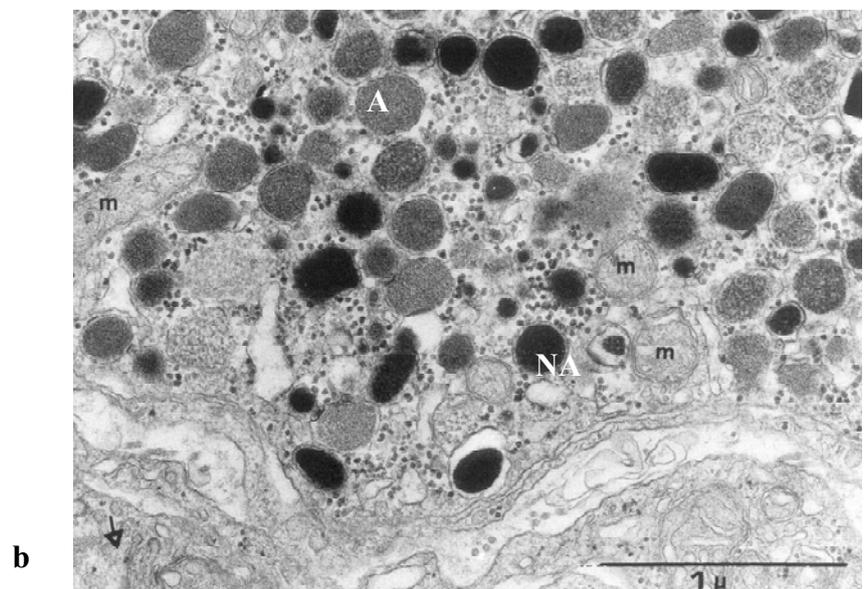
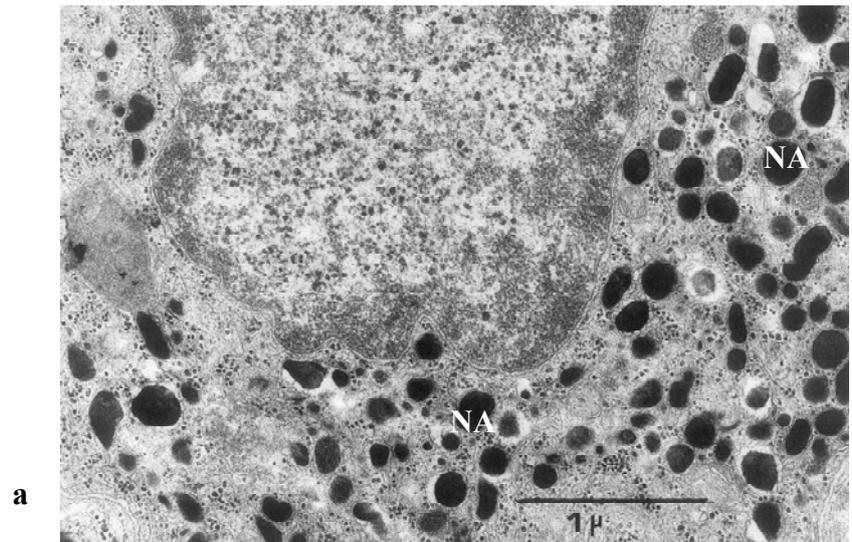


Fig. 13: Immagine al TEM; La Fig. 13a mostra una forte prevalenza di granuli di noradrenalina (NA), tipica dei periodi dell'anno caratterizzati da temperature estreme. La Fig. 13b mostra all'incirca un uguale quantità di granuli di adrenalina (A) e di noradrenalina (NA), tipica dei periodi dell'anno caratterizzati da temperature intermedie.

Immunoistochimica

Nel mese di marzo la positività delle cellule cromaffini all'enzima PNMT appare più intensa (Fig. 14a,b). che nel periodo di dicembre, quando le cellule cromaffini appaiono debolmente positive all'enzima PNMT (Fig. 15a,b). In entrambi i periodi il tessuto a steroidi appare negativo (Fig. 14a, b; Fig. 15a, b; Fig. 16).

Nessuna marcatura è presente nelle sezioni controllo (Fig. 14c; Fig. 15c).

Immunolettromicroscopia

Nel mese di marzo la marcatura appare abbondante e localizzata nel citoplasma e intorno ai granuli, prevalentemente ad A (Figg. 17, 18). Nel mese di dicembre la marcatura è scarsa e rappresentata da poche particelle di oro colloidale localizzate nel citoplasma ed intorno ai granuli secretori (Figg. 19, 20). Nessuna positività appare nel tessuto a steroidi. Le sezioni controllo non presentano marcatura (Figg. 21a, b).

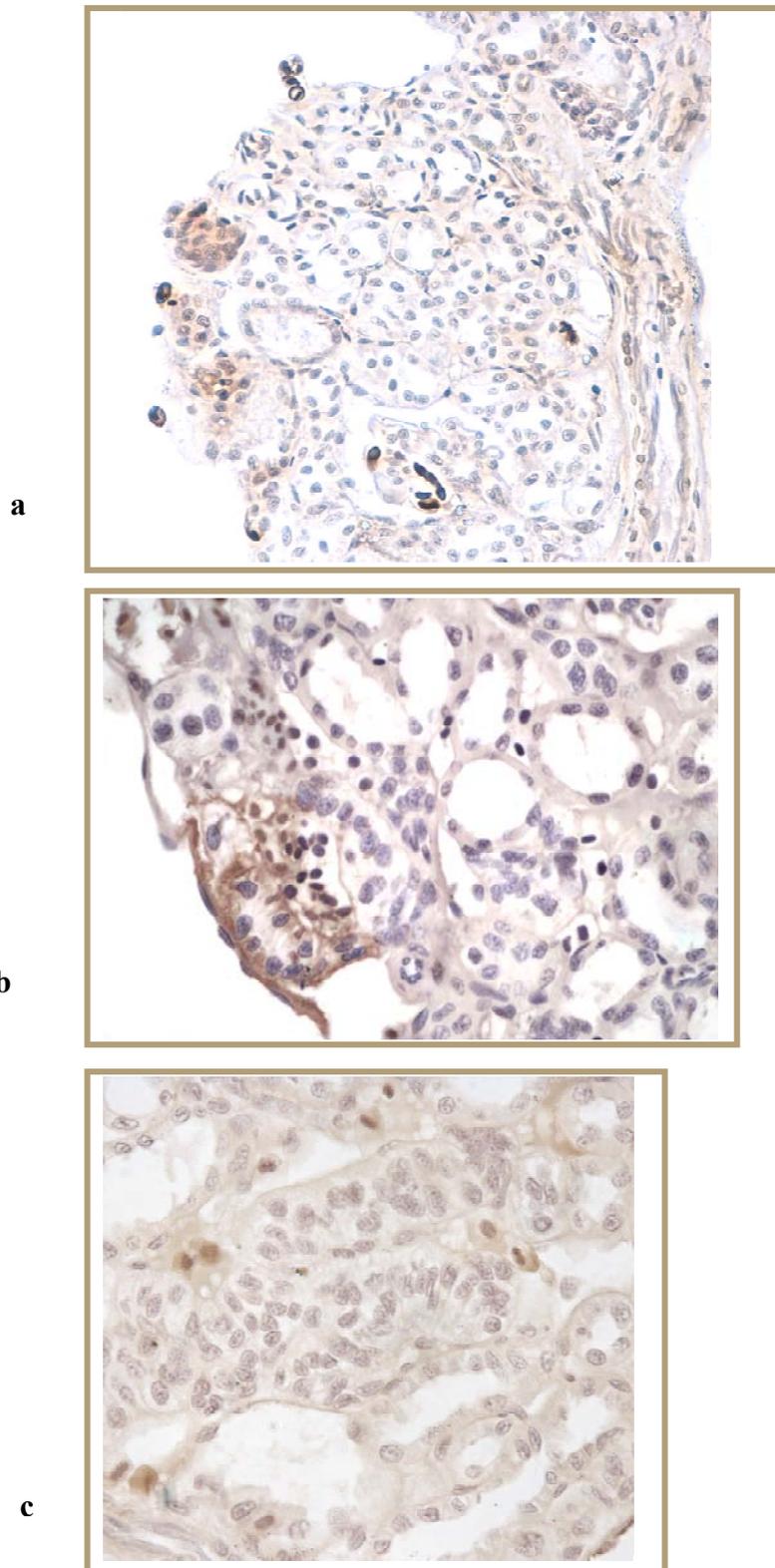
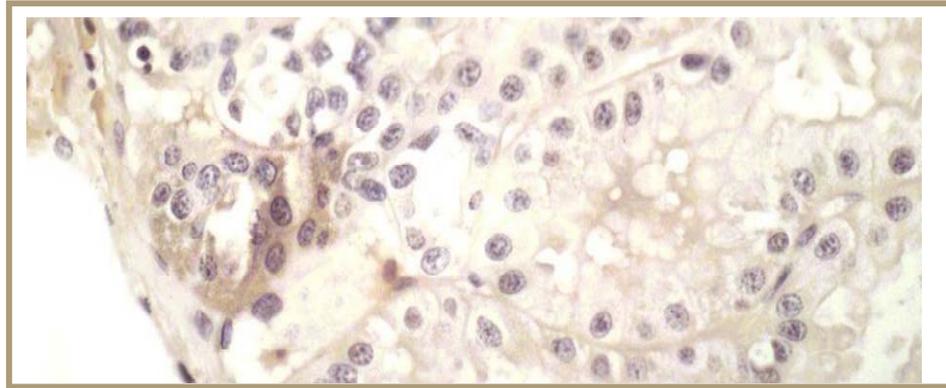
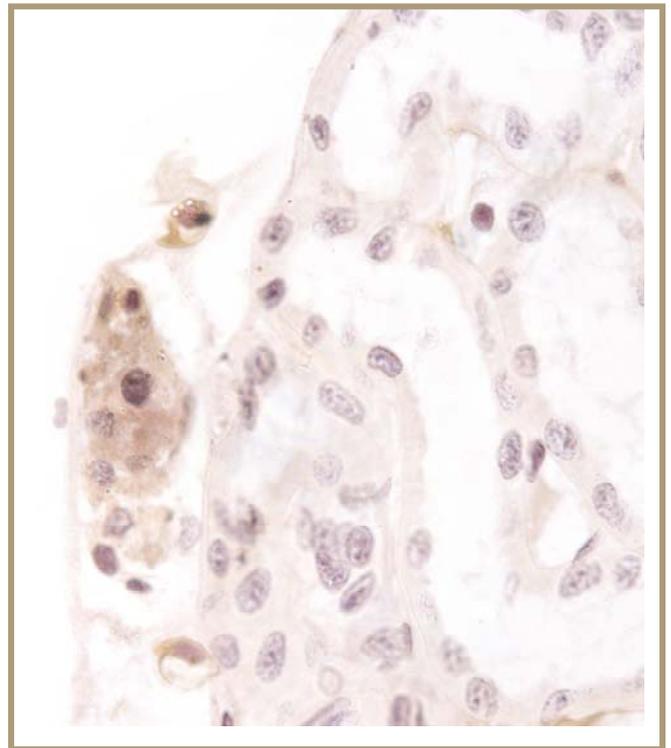


Fig. 14: Immagine di M.O.;Tecnica di immunocitochimica, la figg. 14a,b mostrano, nel mese di marzo, un'intensa positività delle cellule cromaffini all'enzima PNMT. La fig. 14c evidenzia l'assenza di marcatura nel controllo.

a



b



c

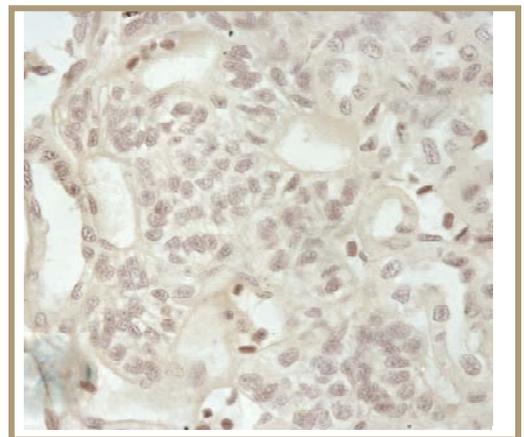


Fig. 15: Immagine di M.O.;Tecnica di Immunocitochimica, la figg. 15a,b indicano nel periodo di dicembre, una debole positività delle cellule cromaffini alla PNMT. La fig. 15c mostra l'assenza di marcatura nel controllo

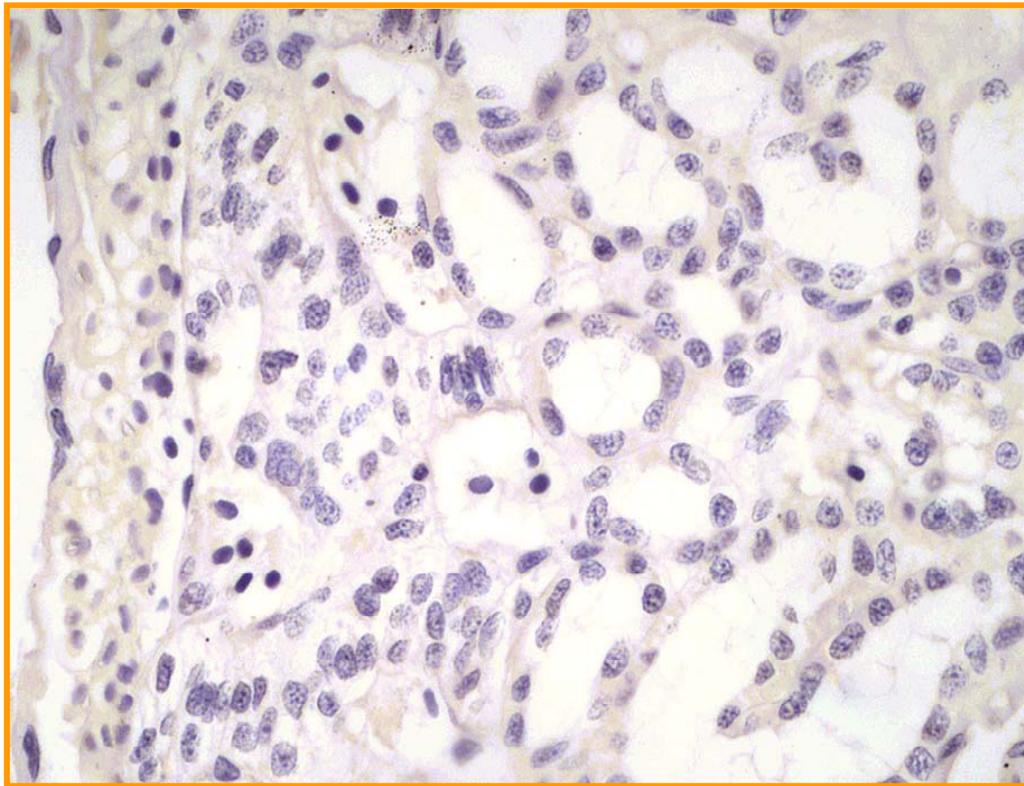


Fig. 16: Immagine di M.O.; Tecnica di immunocitochimica, in entrambi i periodi il tessuto a steroidi appare negativo.

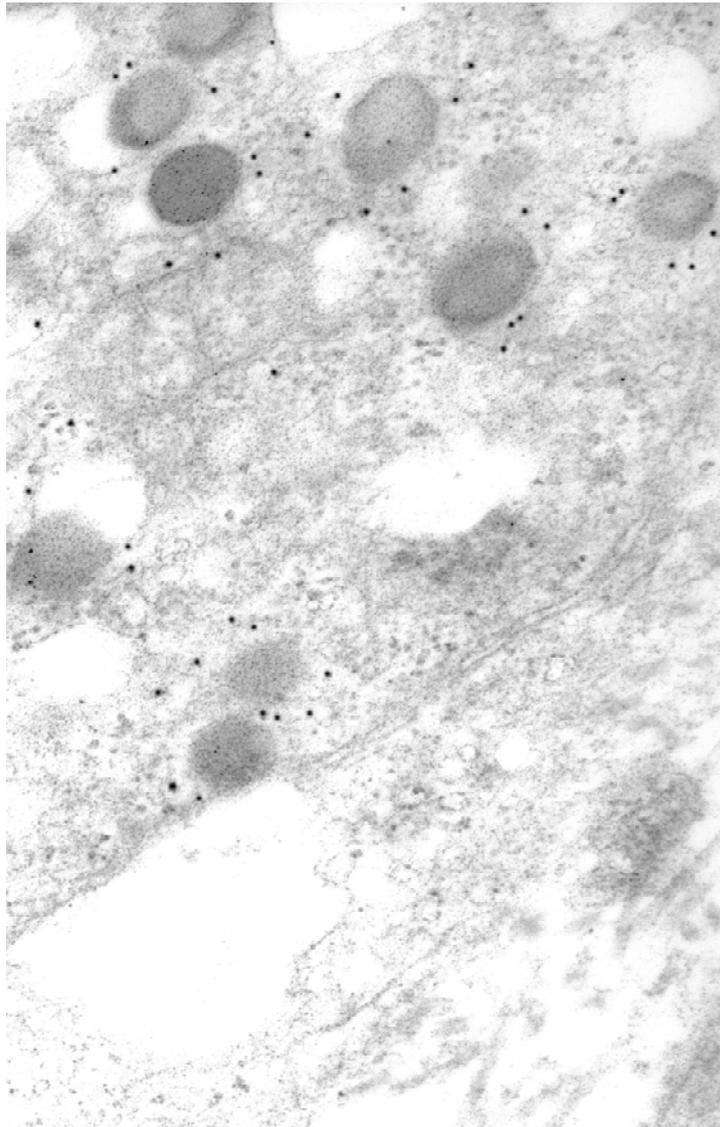


Fig. 17: Immagine di M.E.; Tecnica di Igold, la foto mostra, nel mese di marzo, una marcatura abbondante localizzata nel citoplasma ed intorno ai granuli prevalentemente di adrenalina (A).

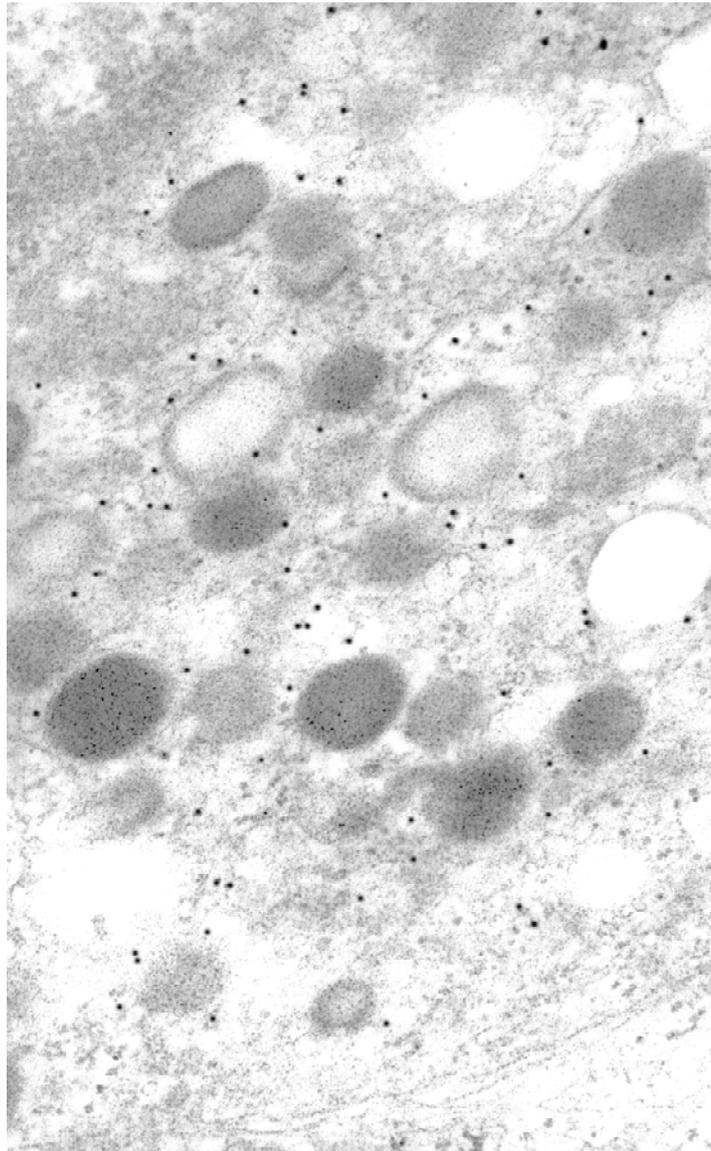


Fig. 18: Immagine di M.E.; Tecnica di Igold, la foto mostra, nel mese di marzo, una marcatura abbondante localizzata nel citoplasma ed intorno ai granuli prevalentemente di adrenalina (A).

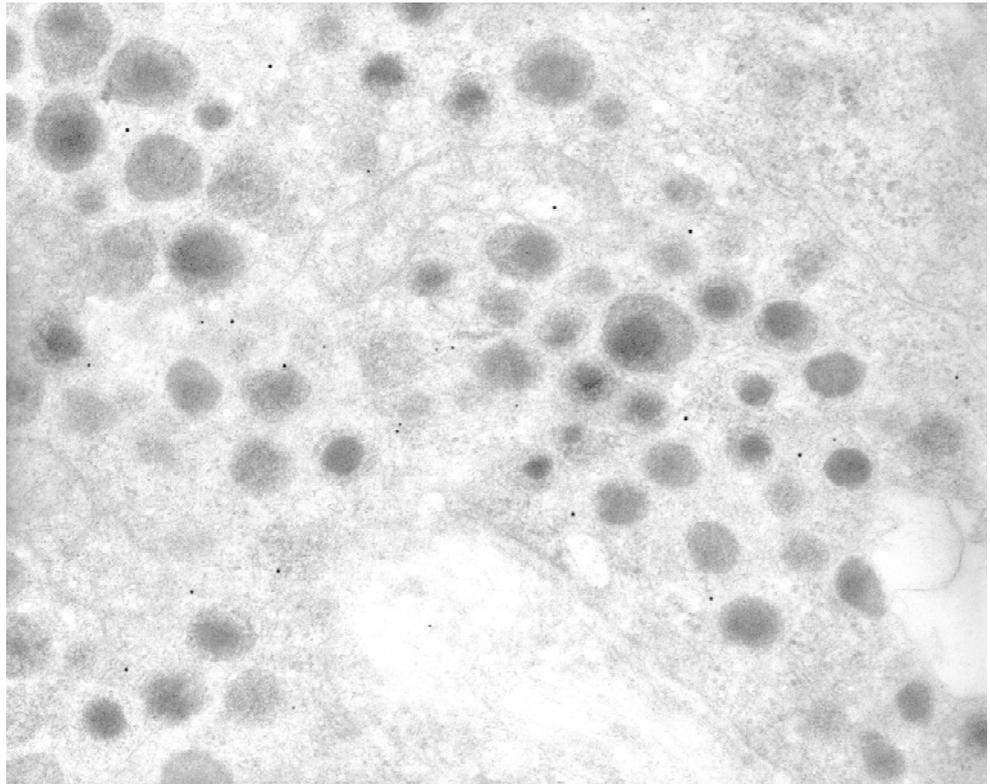


Fig. 19: Immagine di M.E.; Tecnica di Igold, a dicembre si può osservare una scarsa marcatura localizzata nel citoplasma ed intorno ai granuli.

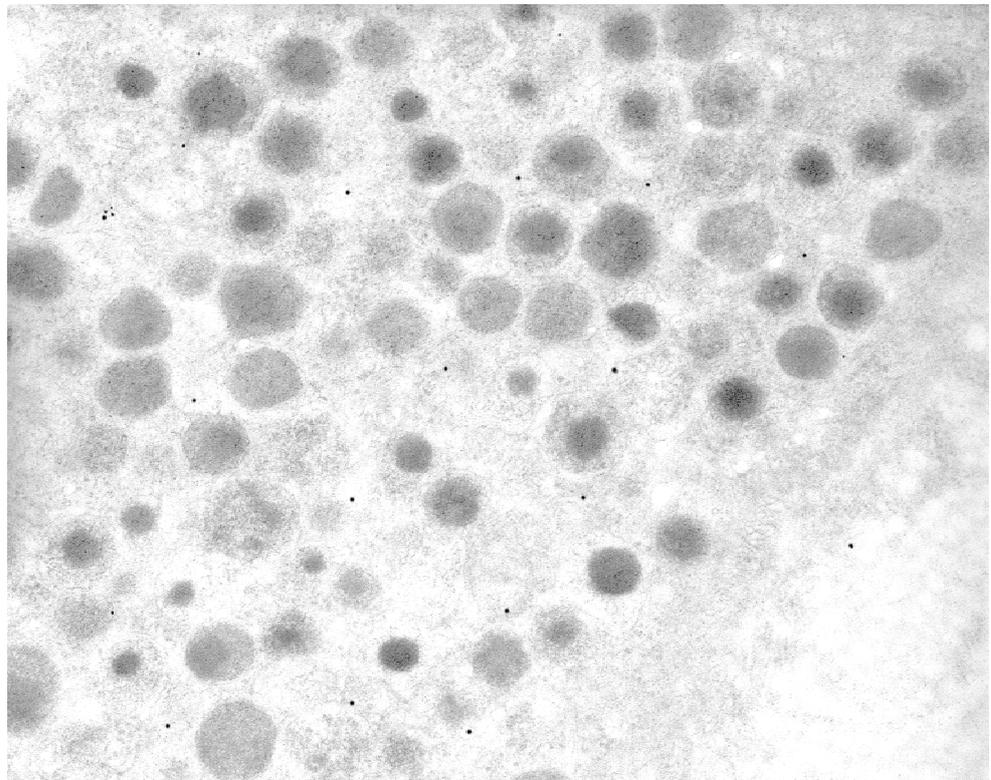
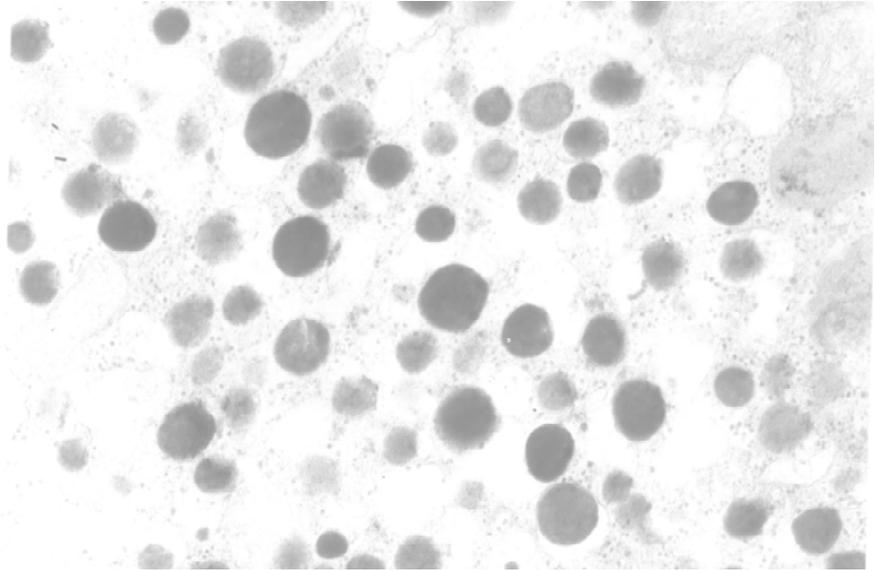


Fig. 20: Immagine di M.E.; Tecnica di Igold, a dicembre si osserva una scarsa marcatura localizzata nel citoplasma ed intorno ai granuli.

a



b

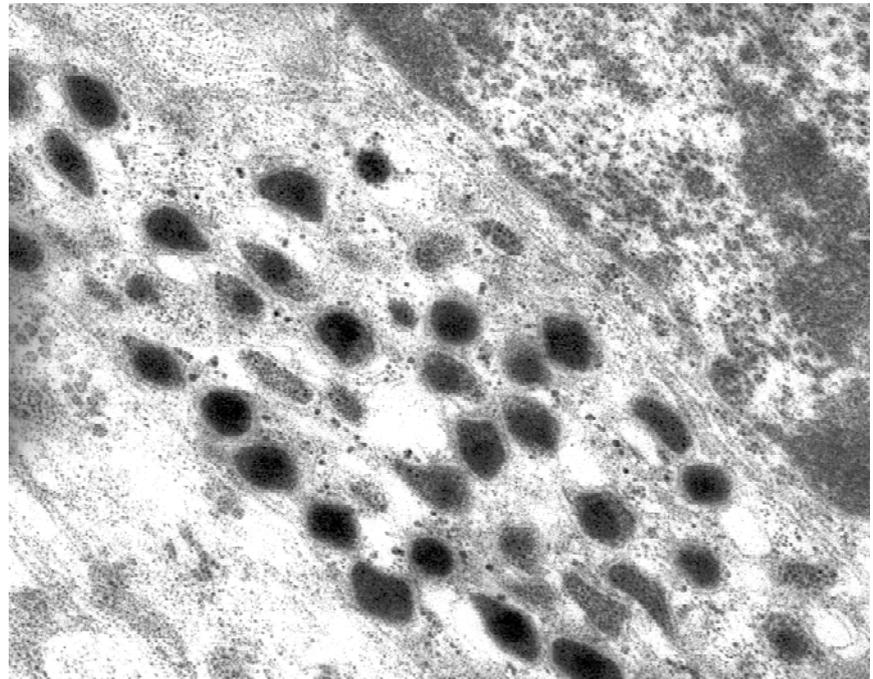


Fig. 21: Immagine di M.E.; Tecnica di Igold, la figg. 21a,b raffigurano rispettivamente dicembre e marzo. In entrambi i periodi le sezioni controllo non presentano marcatura.

Ibridazione in situ

Sia a marzo che a dicembre il tessuto cromaffine appare positivo all'mRNA per la PNMT; l'espressione tuttavia è più marcata a marzo (Fig. 22a, b; Fig. 23; Fig.24). Il tessuto a steroidi, non presenta segnale, il controllo trattato con la sonda PNMT senso non mostra segnale (Figg. 25, 26).

Relazione tra ciclo sessuale e ciclo funzionale delle cellule cromaffini

Trattamento FSH

Tessuto cromaffine

Nel mese di marzo entrambi i tipi di granuli sono presenti in quantità eguali nelle cellule cromaffini (NA: $3.88 \pm 1.03 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$; A: $3.36 \pm 1.01 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$) (Fig. 27; Tav.2) .

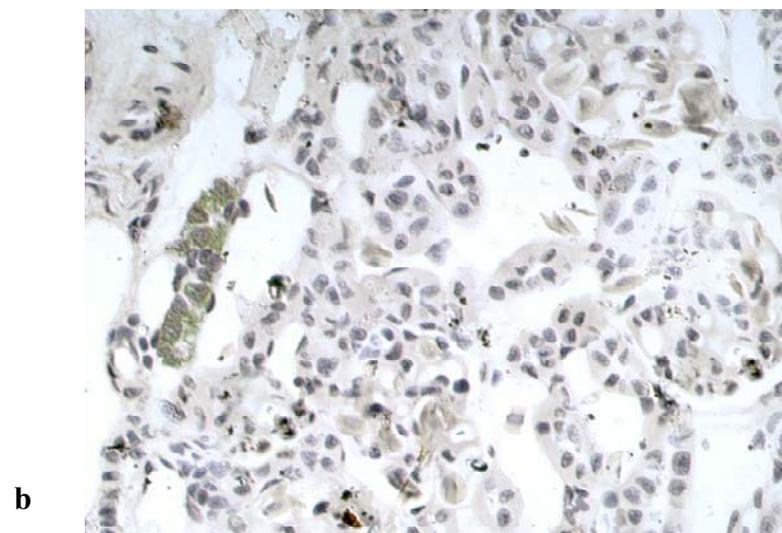
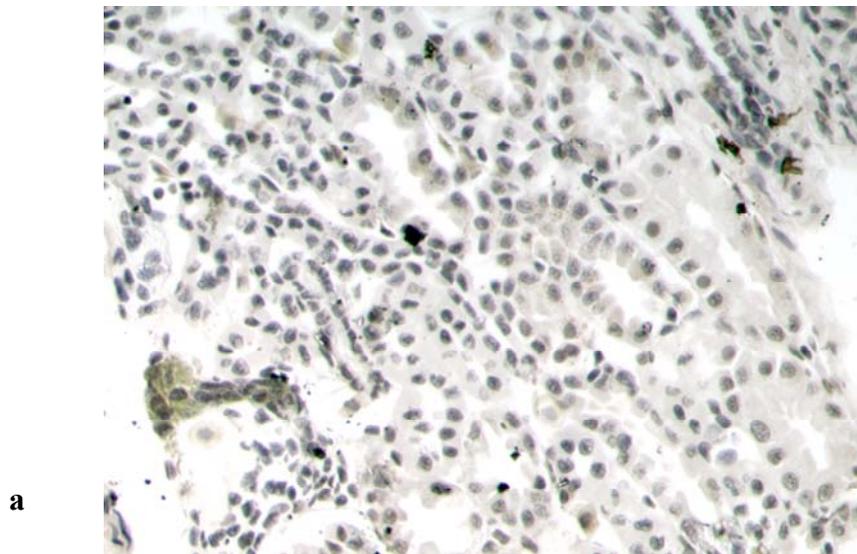


Fig. 22: Immagine di M.O.; Tecnica di ibridazione in situ. Le due foto evidenziano chiaramente una marcata espressione dell'mRNA per la PNMT nel mese di marzo.

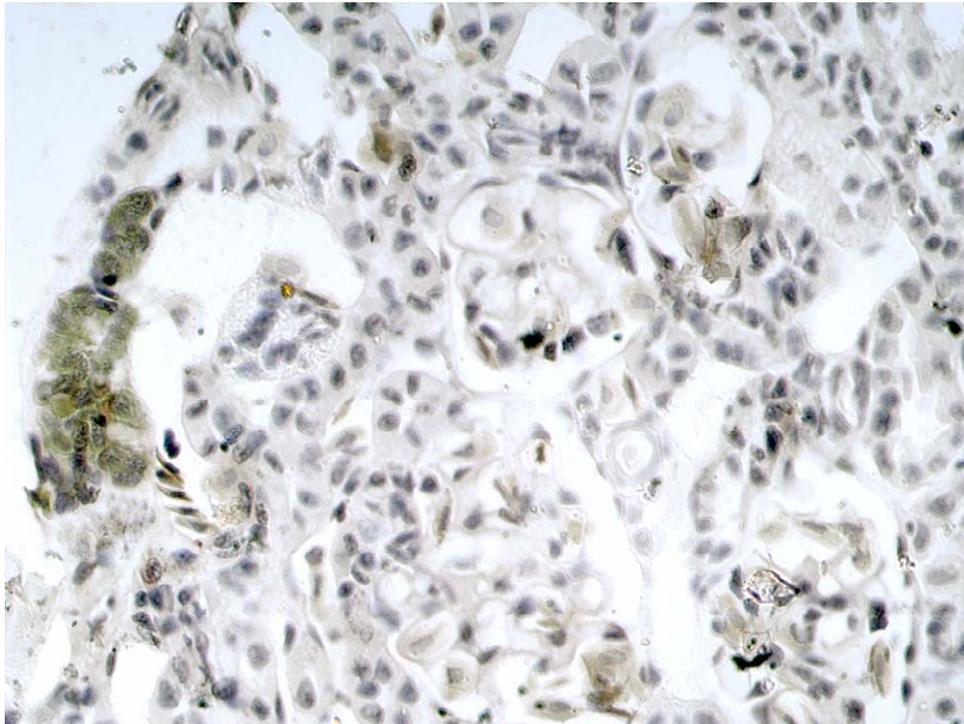


Fig. 23: Immagine di M.O.; Tecnica di ibridazione in situ.
La foto evidenzia chiaramente una marcata espressione dell'mRNA per la PNMT nel mese di marzo.

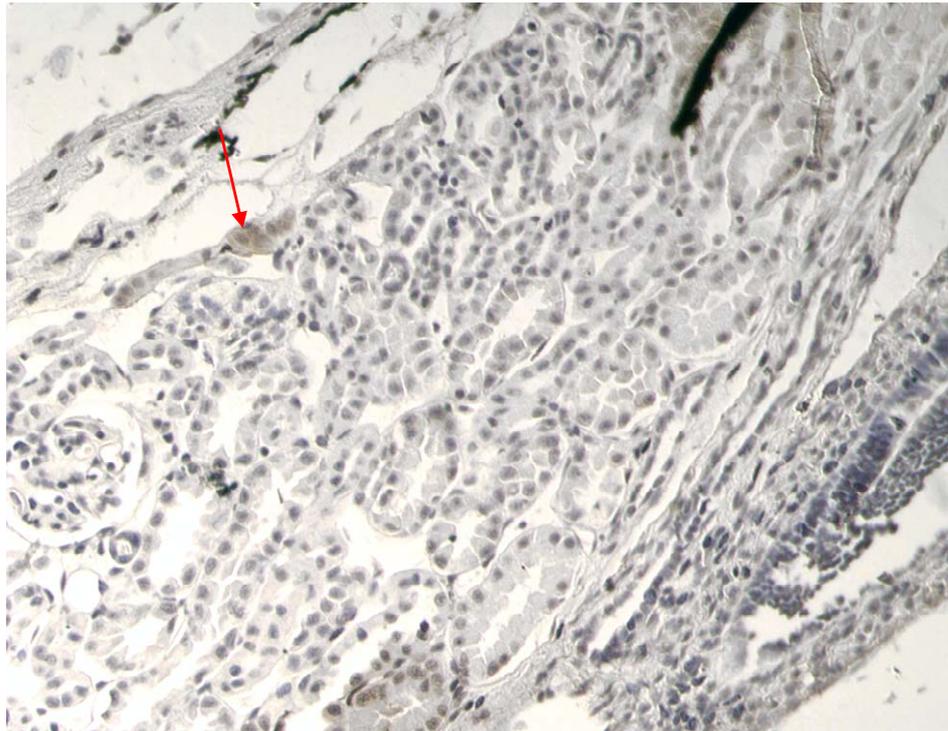


Fig. 24: Immagine di M.O.; Tecnica di ibridazione in situ. La foto evidenzia una debole espressione dell'mRNA per la PNMT nel mese di dicembre.

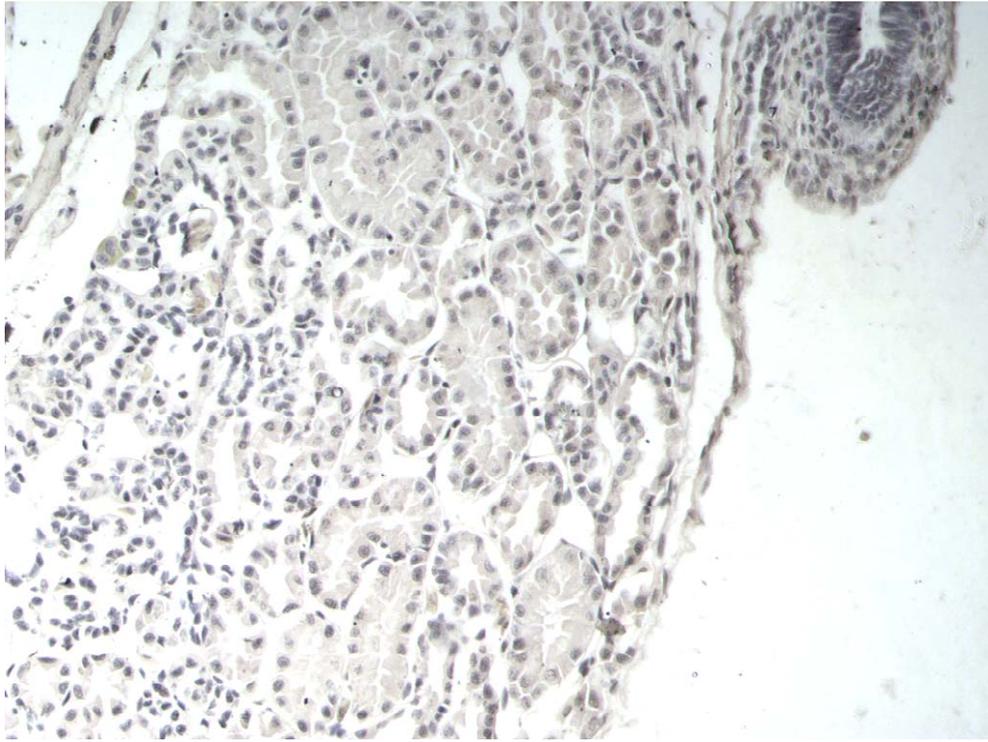


Fig. 25: Immagine di M.O.; Tecnica di ibridazione in situ. La foto evidenzia un tessuto a steroidi privo di segnale.

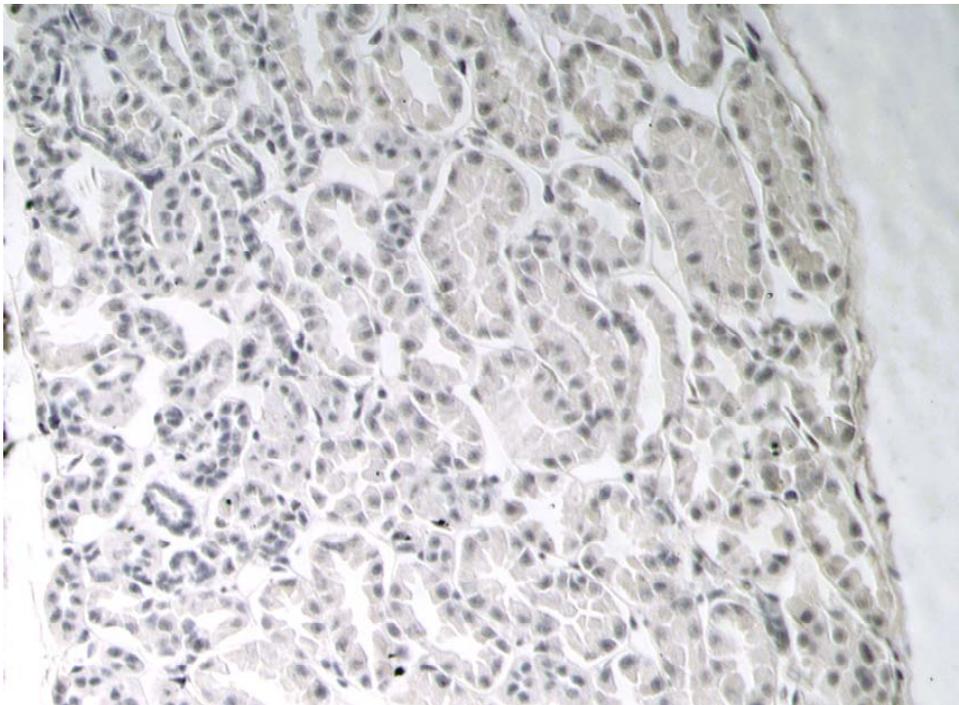


Fig. 26: Immagine di M.O.; Tecnica di ibridazione in situ. La foto evidenzia un controllo trattato con la sonda PNMT senso privo di segnale.

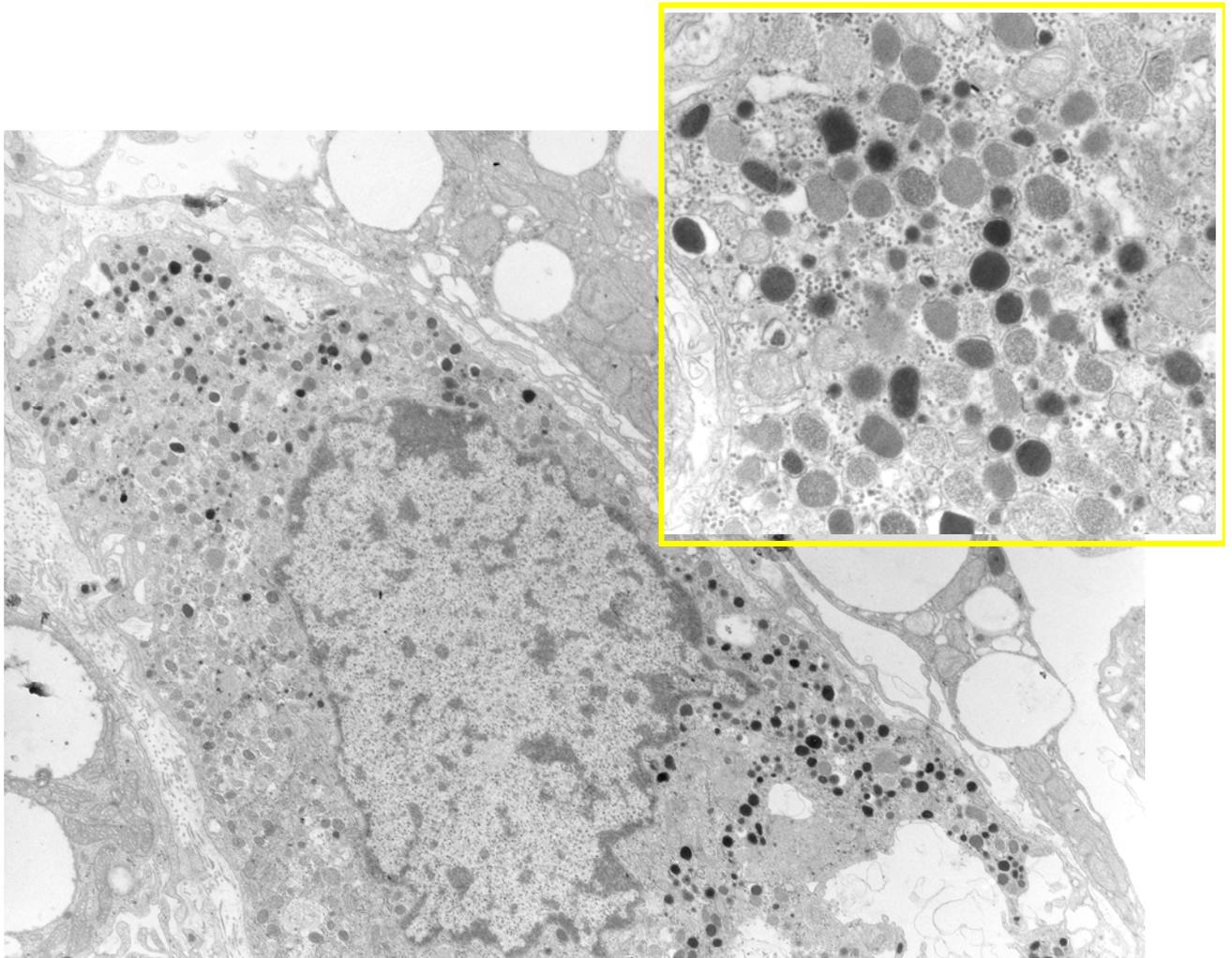


Fig. 27: Immagine al TEM; controllo marzo, entrambi i tipi di granuli cromaffini sono presenti in ugual quantità.

La somministrazione di FSH non altera in maniera significativa, nelle cellule cromaffini, la quantità totale di granuli (da $7.20 \pm 1.50 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$ nei carrier a $6.50 \pm 1.33 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$); tuttavia si osserva un forte aumento dei granuli NA (da $3.89 \pm 1.02 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$ dei carrier-injected a $6.30 \pm 1.30 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$) e una notevole diminuzione dei granuli A (da $3.36 \pm 1.01 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$ dei carrier-injected a $0.24 \pm 0.40 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$), che aumenta il rapporto tra i due tipi di granuli da 1.0/1 a 26.2/1 (Fig. 28) (Tav. 2).

Negli esemplari controllo di dicembre, le cellule cromaffini contengono prevalentemente granuli di NA (NA: $7.54 \pm 1.38 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$; A: $0.18 \pm 0.10 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$) (Fig. 29) (Tav.2). In seguito a somministrazione di FSH, si osservano modifiche a carico del tessuto adrenocromaffine, nelle cui cellule appare fortemente diminuito il numero totale di granuli cromaffini (da $7.72 \pm 1.60 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$ dei carrier-injected a $4.35 \pm 1.13 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$) (Fig. 30a,b) (Tab.2). La diminuzione riguarda principalmente i granuli

di NA, il cui contenuto è significativamente diminuito (da $7.55 \pm 1.48 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$ dei carrier-injected a $4.20 \pm 1.10 \text{ gr}/\mu\text{m}^2$) mentre non si osservano variazioni di rilievo per i granuli di A (Tav.2).

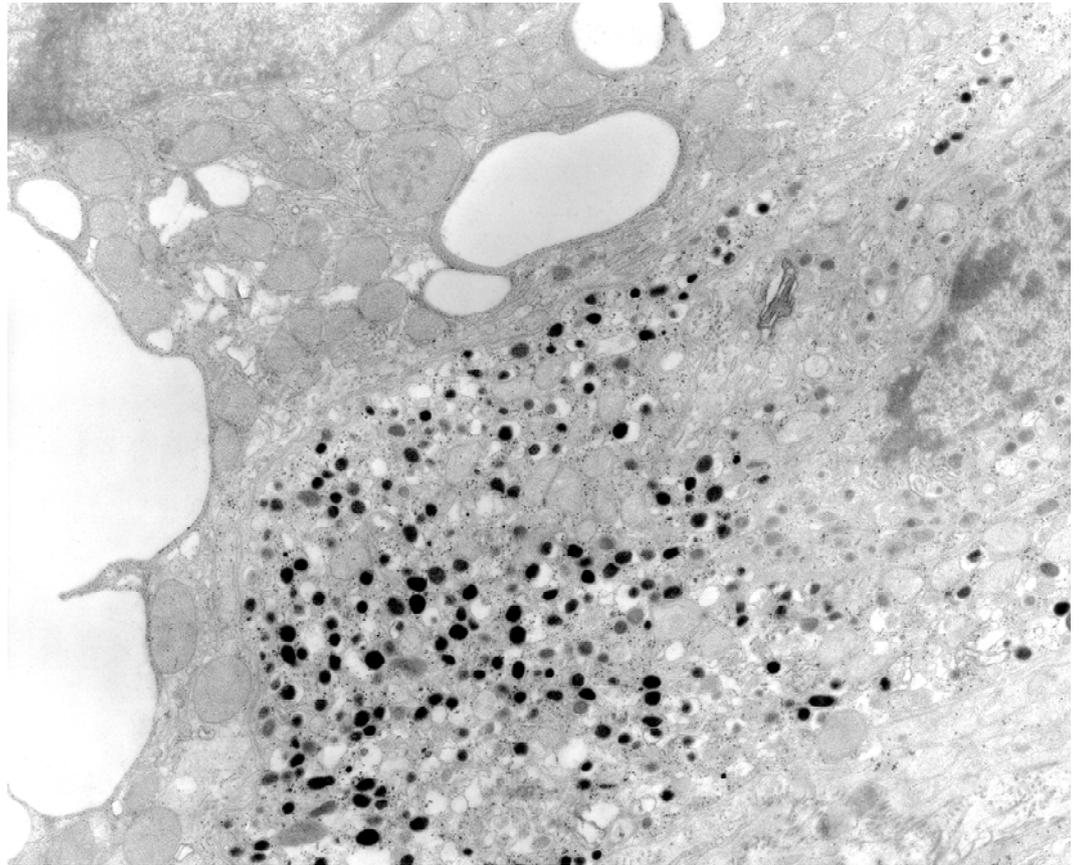


Fig.28: Immagine al TEM; trattato FSH marzo, la quantità totale dei granuli cromaffini non viene modificata in maniera significativa, tuttavia si osserva una notevole diminuzione dei granuli ad adrenalina (A).

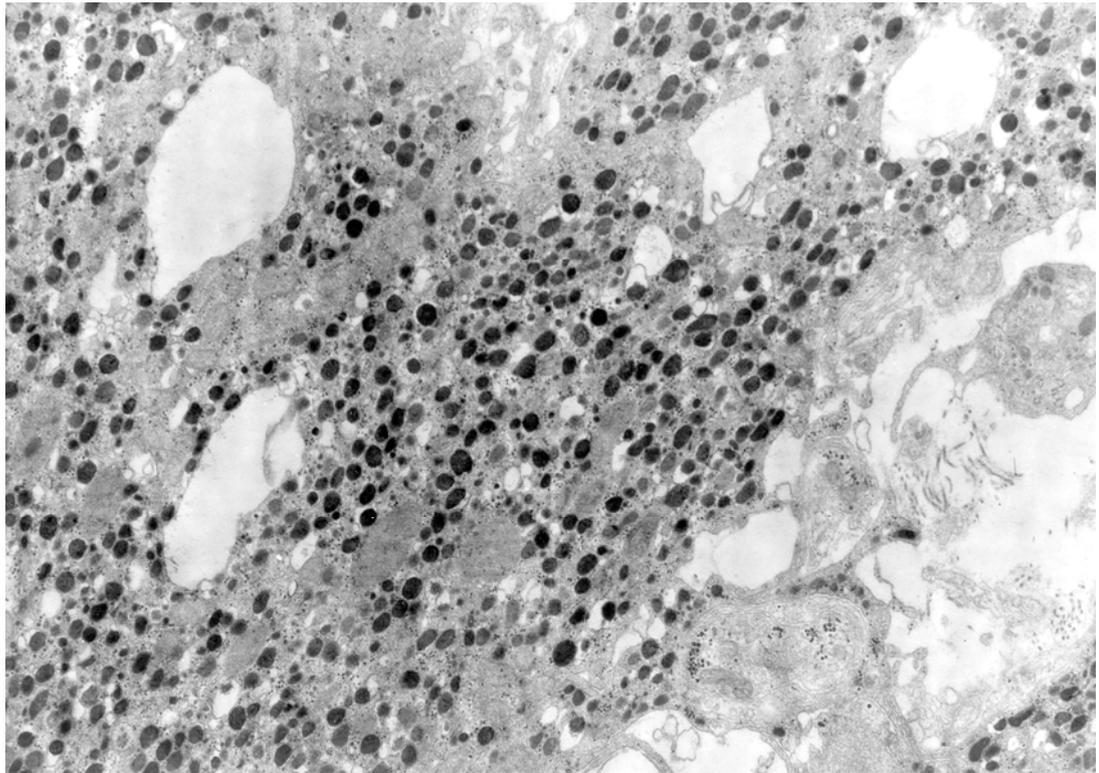


Fig.29: Immagine al TEM; controllo dicembre, le cellule cromaffini contengono prevalentemente granuli a noradrenalina (NA).

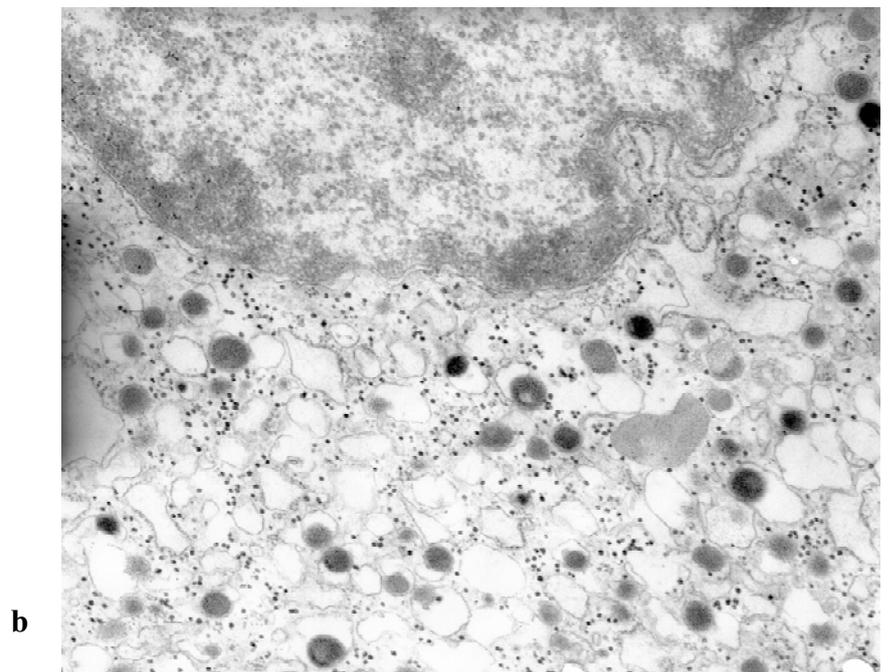
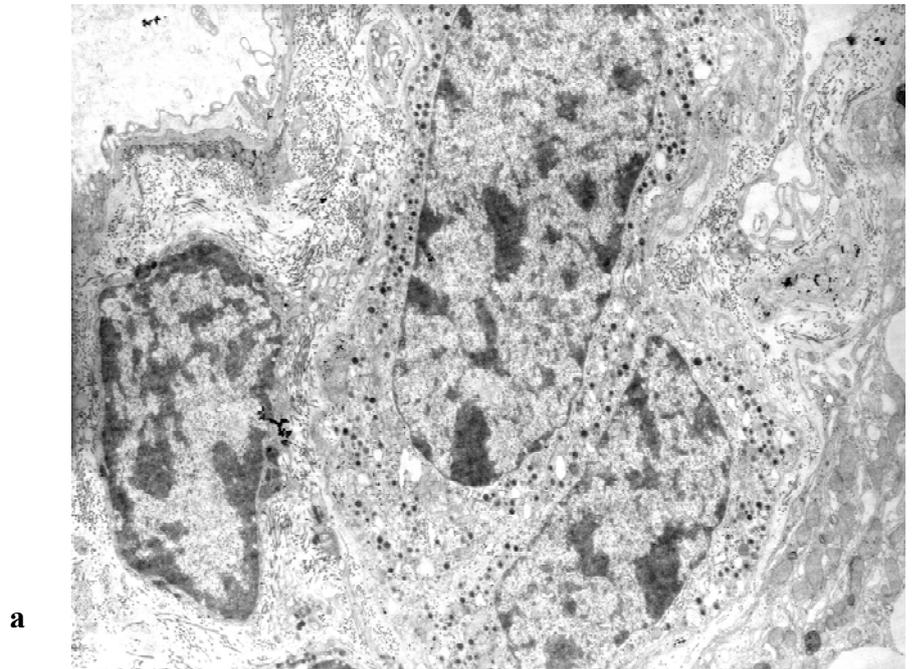


Fig.30: Immagine al TEM; trattato FSH dicembre, le cellule cromaffini (fig. 29a) presentano una forte diminuzione del numero totale dei granuli cromaffini. Diminuzione significativa riguardante principalmente i granuli a noradrenalina (NA). A maggiore ingrandimento (fig. 29b) si osserva un citoplasma vuoto da granuli.

Analisi Ormonale

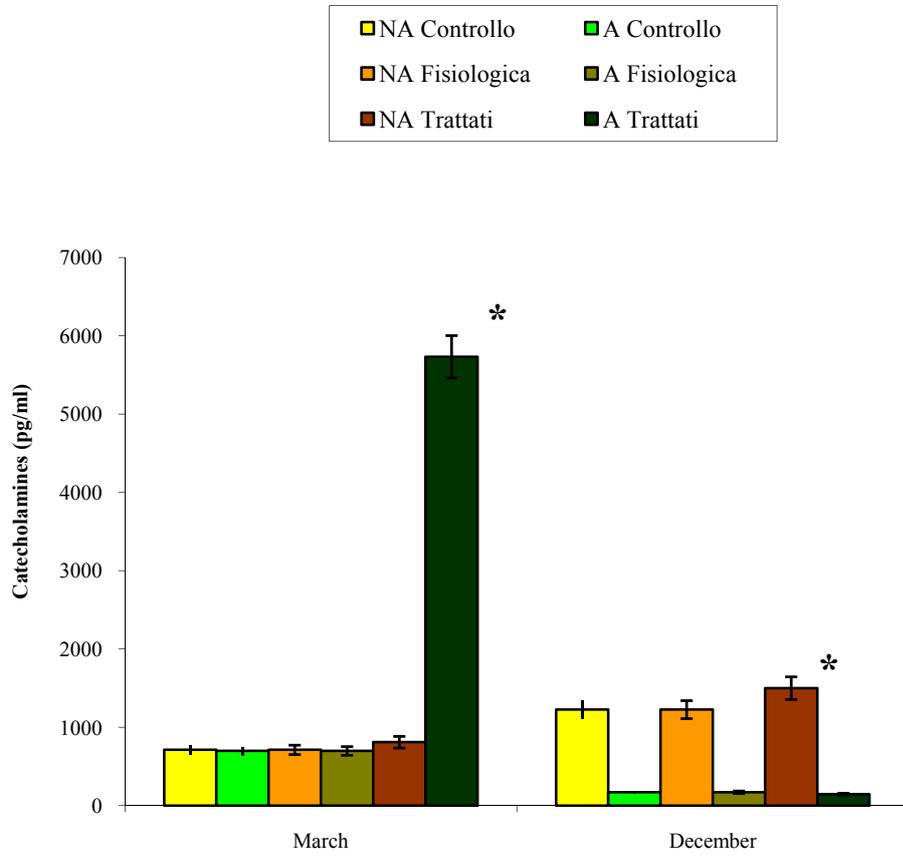
Per quanto concerne le concentrazioni sieriche di adrenalina e noradrenalina, nel mese di Marzo il trattamento con FSH determina un forte aumento del livello di adrenalina (A), mentre a Dicembre si osserva un aumento della concentrazione sierica di noradrenalina (NA) (Fig.31).

Tessuto a steroidi

La morfologia delle cellule a steroidi appare simile in entrambi i periodi esaminati: il citoplasma è ricco di vacuoli lipidici, numerosi sono i mitocondri, ben sviluppato l'apparato del Golgi ed il reticolo endoplasmatico liscio. I valori del rapporto lipidi/citoplasma sono simili: 0.50 a dicembre e 0.30 a marzo (Fig. 32) (Tav.2).

A Marzo, nelle cellule a steroidi degli esemplari trattati con FSH, si evidenzia una forte diminuzione del contenuto lipidico (da 0.29 dei carrier-injected a 0.07 dei trattati), (Fig. 33a) mentre a Dicembre le cellule a steroidi rispondono al

*



* Significativamente differenti dai valori dei trattati con soluzione fisiologica

Fig. 31

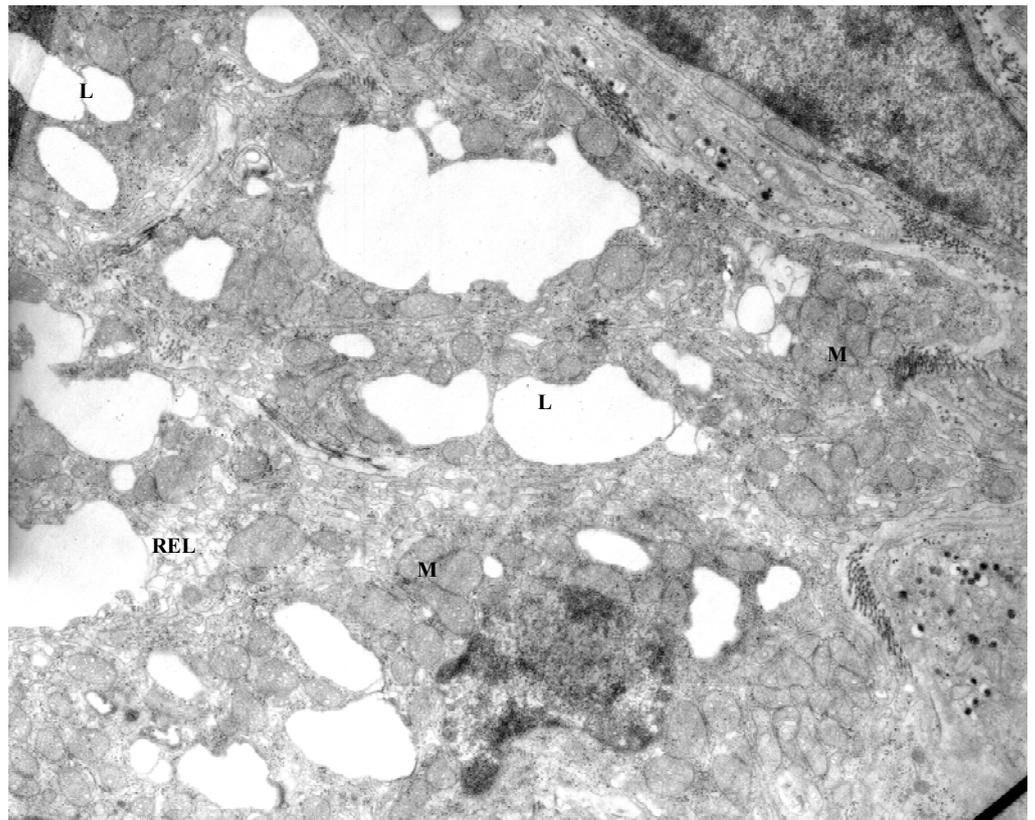


Fig.32: Immagine al TEM; controllo dicembre – marzo, le cellule a steroidi presentano una morfologia simile in entrambi i periodi: un citoplasma ricco di vacuoli lipidici (L), mitocondri (M) ed il reticolo endoplasmatico liscio (REL).

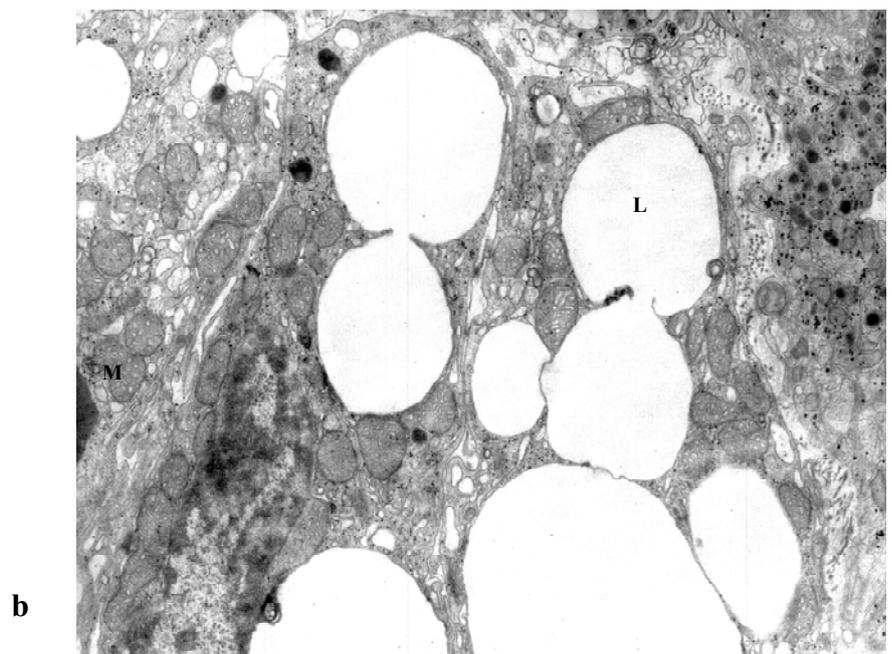
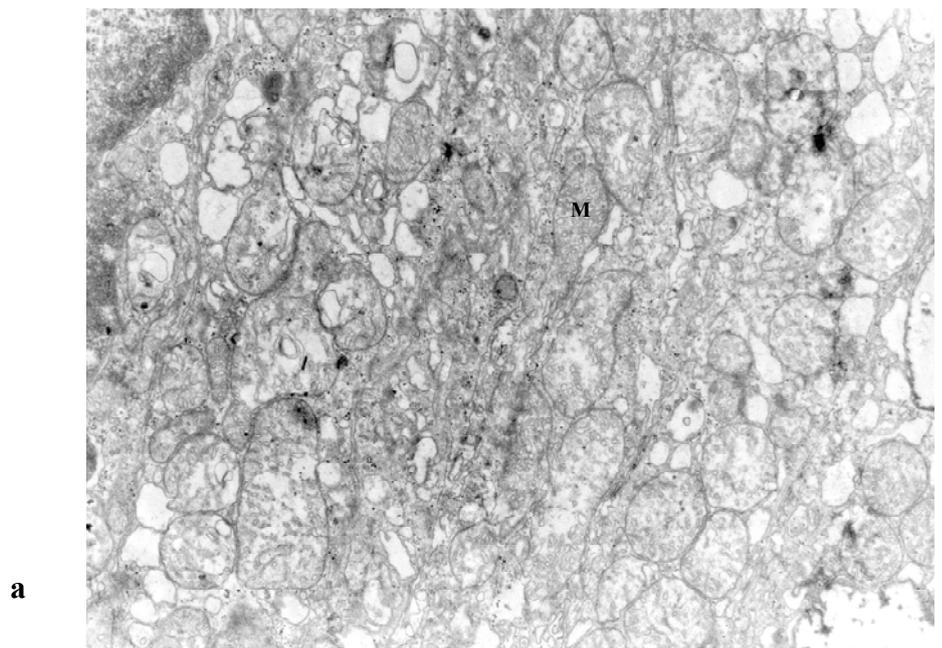


Fig.33: Immagine al TEM; la fig. 33a, trattato FSH marzo, mostra cellule a steroidi fortemente svuotate a causa di una notevole diminuzione del contenuto lipidico. Il trattato FSH dicembre (fig. 33 b), mostra cellule a steroidi con un forte aumento del contenuto lipidico.

TABLE 2. *Media ± SE dei diversi parameri valutati in esemplari controllo e trattati.*

	Granuli cromaffini/μm^2	NA gr/μm^2	A gr/μm^2	rapportoNA/A	Lip/cyt. ratio
Marzo					
Controllo	7.21 ± 1.58	3.88 ± 1.03	3.36 ± 1.01	1.0/1	0.30
Controllo fisiologico	7.20 ± 1.50	3.89 ± 1.02	3.36 ± 1.01	1.0/1	0.29
FSH	6.50 ± 1.33	6.30 ± 1.30●	0.24 ± 0.40●	26.2/1	0.07◆
Dicembre					
Controllo	7.72 ± 1.60	7.54 ± 1.38	0.18 ± 0.10	41.8/1	0.50
Controllo fisiologico	7.72 ± 1.61	7.55 ± 1.48	0.17 ± 0.10	41.9/1	0.50
FSH	4.35 ± 1.13●	4.20 ± 1.10●	0.15 ± 0.11	28.0/1	0.80●

● Valori nei gruppi trattati significativamente ($P < 0.05$) diversi dai valori controllo.

◆ Valori nei gruppi trattati significativamente ($P < 0.001$) diversi dai valori controllo.

trattamento con FSH con un aumento del contenuto lipidico (da 0.50 dei carrier-injected a 0.80 degli esemplari trattati (Fig. 33b) (Tav.2).

Analisi Ormonale

Per quanto concerne l'esame dei livelli sierici dei corticosteroidi a Marzo, dopo trattamento con FSH, si osserva un notevole incremento dei livelli sierici sia di aldosterone che di corticosterone; a Dicembre, invece, il trattamento con FSH non determina variazioni significative dei livelli di entrambi gli ormoni (Fig. 34). Non si osservano differenze significative tra gli esemplari controllo non trattati e quelli trattati con soluzione fisiologica.

Analisi della sequenza dell'mRNA per la PNMT

Espressione e sequenziamento genico

La ghiandola interrenale di *T. carnifex* è di dimensioni molto ridotte, presenta un peso di ~ 3.5 mg ed inoltre è dislocata sotto forma di isolotti dispersi nel rene; tutto ciò ha creato notevoli difficoltà nel momento in cui si è cercato di effettuare l'estrazione di RNA totale.

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il metodo classico guanidina isotiocianato in gradiente di cesio (Chirwin, J.M. et al., 1979); questo metodo pur essendo ottimale per la qualità del materiale estratto, richiede però una grossa quantità di tessuto di partenza. Infatti l'estrazione ha richiesto la raccolta di 64 ghiandole interrenali per ottenere una quantità di RNA totale di 682 µg di discreta qualità (Fig. 35 a) ad una concentrazione di 1.82 µg/µl.

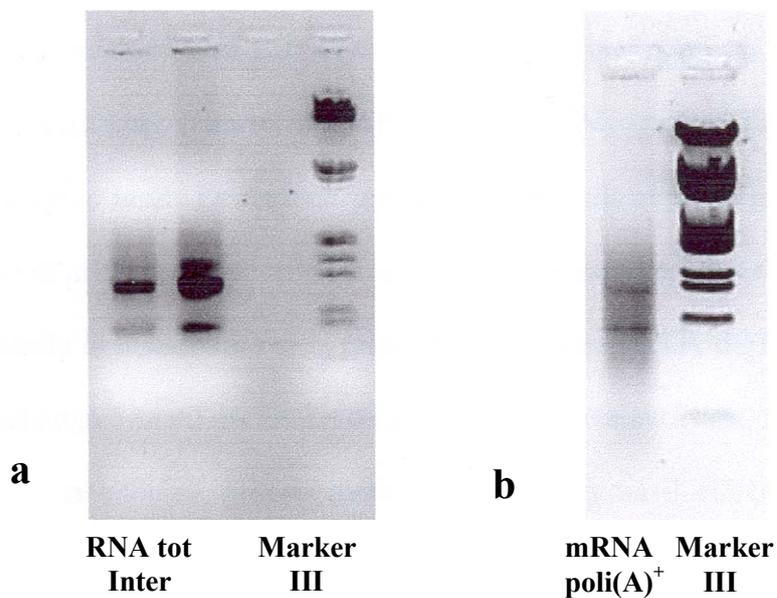


Fig. 35: Gels di agarosio all'1% di RNA estratti dalla ghiandola interrenale di *Triturus carnifex*. L'RNA totale (fig. 35a) estratto dalla ghiandola interrenale di *Triturus carnifex* mediante tecnica guanidina-isotiocianato, utilizzando una concentrazione di 1.82 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, in cui sono visibili le bande tipiche dell'RNA totale 28S, 23S e 5S. La fig. 35b mostra l'mRNA estratto da RNA totale della ghiandola interrenale ad una concentrazione di 0,24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Questo RNA totale è stato quantitativamente sufficiente per permettere l'estrazione di mRNA. Dall'RNA totale è stato possibile estrarre l'mRNA poli(A)⁺ utilizzando il kit della Stratagene (Poly(A) Quik mRNA isolation kit) il quale richiede almeno 400 µg di RNA totale.

Grazie a questa tecnica, è stata ottenuta una concentrazione finale di mRNA poli(A)⁺ di 0.24 µg/µl (Fig. 35 b). A questo punto ho ottenuto tutto il materiale necessario per iniziare la costruzione della libreria di cDNA.

La sintesi della prima elica di cDNA ha inizio quando la trascrizione inversa (RT), in presenza di nucleotidi e tampone, lega uno stampo ed un primer. Lo stampo è l'mRNA ed il primer è un oligonucleotide di 50 basi che presenta una particolare sequenza che protegge il sito di riconoscimento dell'enzima di restrizione Xho I ed una sequenza di 18 basi poli (dT).

Il sito di restrizione permette al cDNA finito, di essere inserito nel vettore Uni-ZAP XR (Short, J.M. et al., 1988) in senso rispetto al promotore lac Z. La regione poli (dT) si lega alla regione poli (A) al 3' dello stampo di mRNA, e l'MMLV-RT inizia a sintetizzare la prima elica di cDNA. La miscela di nucleotidi per la prima elica contiene dATP, dGTP, dTTP normali, più l'analogo 5-metil dCTP. La prima elica completa avrà così un gruppo metilico su ciascuna citosina; il gruppo metilico proteggerà il cDNA dagli enzimi di restrizione che verranno usati nei successivi passaggi di clonaggio.

L'incorporazione di 5-metil dCTP contro il dCTP normale è stato testato con la polimerasi di Klenow, la DNA polimerasi I di E. coli, la DNA polimerasi III di E. coli, la trascrittasi inversa del virus della mieloblastosi degli uccelli (AMV-RT) e con l'MMLV-RT su diversi stampi ed è stato provato essere un accettabile substrato per tutti questi enzimi.

Il kit di sintesi ZAP-cDNA della Stratagene, utilizza un linker - primer ibrido di oligo(dT) che contiene un sito di restrizione per Xho I. L'mRNA viene preparato per la sintesi della prima elica con il linker – primer e viene trascritto usando MMLV-RT e 5-metil dCTP. L'uso di 5-metil dCTP durante la sintesi della prima elica emimetila il cDNA, che viene così protetto dalla digestione operata da diverse endonucleasi di restrizione tra cui Xho I.

Inoltre, grazie alla digestione del cDNA con Xho I, solo i siti non metilati all'interno del linker – primer verranno interrotti. Il DNA emimetilato introdotto in un ospite $McrA^+ McrB^+$ andrà soggetto a digestione da parte dei sistemi di restrizione $mcrA mcrB$. Quindi, è necessario infettare inizialmente in un ospite $McrA^- McrB^-$ (ad esempio l'ospite XL1-Blue MRF'). Dopo aver introdotto la libreria nelle cellule XL1-Blue MRF', il DNA non sarà più emimetilato e può crescere in ospiti $McrA^+ McrB^+$.

Durante la sintesi della seconda elica, l'RNasi H rompe i legami dell'RNA con la prima elica di cDNA producendo una moltitudine di frammenti, che servono come primer per la DNA polimerasi I. La DNA polimerasi I usa questi

frammenti come stampo nella seconda elica di cDNA. La miscela di nucleotidi della seconda elica ha un eccesso di dCTP per ridurre la probabilità che 5-metil dCTP venga incorporato nella seconda elica. Ciò assicura che i siti di restrizione nel linker – primer siano sottoposti a digestione con enzimi di restrizione.

Le estremità disuguali della doppia elica di cDNA sono riempite con la DNA polimerasi Pfu, e gli adattatori EcoR I sono legati alle estremità nette. Gli adattatori sono composti da oligonucleotidi da 9 e 13 basi, che sono complementari all'estremità coesiva EcoR I. L'oligonucleotide 9 è fosforilato, in modo da potersi legare alle altre estremità nette disponibili in forma di cDNA e altri adattatori. L'oligonucleotide 13 è mantenuto defosforilato per prevenire che si leghi con altre estremità coesive.

Dopo che la legazione è stata completata e la ligasi è stata inattivata con il calore, anche l'oligonucleotide 13 viene fosforilato affinché avvenga la sua ligazione con i bracci del vettore. La digestione con Xho I rilascia l'adattatore EcoR I ed il linker – primer residuo dall'estremità 3' del cDNA.

Questi due frammenti sono separati su di una colonna cromatografica a gel filtrazione. Subito dopo la filtrazione sulla colonna, è stata fatta un'elettroforesi su gel di acrilammide al 4% che ha permesso di determinare la dimensione delle frazioni raccolte e di scegliere in base alla dimensione, quelle da inserire all'interno del vettore. Poiché il cDNA della PNMT isolato nei Mammiferi ha una lunghezza di ~ 900 coppie di basi, ho scelto 5 frazioni comprese tra 700 e

1200 coppie di basi, cercando di avere una buona rappresentatività delle molecole espresse all'interno della ghiandola interrenale di tritone. Queste frazioni sono state dunque processate e legate all'interno del vettore che poi è stato incapsulato ed il fago così completo è stato utilizzato per infettare delle cellule batteriche ospiti.

E' stato così possibile calcolare il titolo della libreria primaria della ghiandola interrenale che è risultato 1.5×10^7 pfu/ml. Poiché le librerie primarie sono alquanto instabili e ciò causerebbe una perdita di molecole, è stata subito fatta un'amplificazione che ha permesso di ottenere un titolo finale di 7.5×10^{10} pfu/ml. La libreria così amplificata è stata poi utilizzata per piastrare 1.6×10^5 cloni, i quali sono stati poi replicati su membrana attraverso il lifting. Questi filtri, così ottenuti, sono stati utilizzati per eseguire l'ibridazione con la sonda di PNMT di ratto opportunamente digerita e marcata.

Quindi, una volta estratto il DNA questo è stato inviato ai laboratori Primm dove è stato sequenziato (Fig. 36).

Localizzazione cellulare dell'enzima PNMT

L'utilizzo di tecniche immunocitochimiche ha consentito di evidenziare la presenza dell'enzima PNMT nelle cellule cromaffini di *Triturus carnifex*. Sia al microscopio ottico che a quello elettronico, le cellule cromaffini mostrano una marcatura più evidente nel mese di marzo, quando l'enzima PNMT si trova presumibilmente in una condizione di maggiore attività, che a dicembre, quando la quantità di adrenalina nel citoplasma delle cellule cromaffini è molto bassa, ed il grado di attività dell'enzima è presumibilmente molto ridotto.

In entrambi i periodi, è possibile riscontrare la presenza di isolate cellule cromaffini e gruppi cellulari positivi all'enzima che appare localizzato nel citoplasma delle cellule cromaffini ed intorno ai granuli secretori prevalentemente ad adrenalina. I dati bibliografici relativi alla localizzazione dell'enzima PNMT negli Anfibi sono molto scarsi e riguardano solo gli Anuri (Nagatsu et al., 1979; Wolfensberger et al., 1995) mentre mancano dati sugli Urodeli. In particolare Nagatsu et al. (1979) hanno evidenziato in *Rana catesbeiana* una positività all'enzima sia nel citoplasma delle cellule cromaffini, dove appare piuttosto scarsa, che sulla membrana di alcuni granuli ad adrenalina; in microscopia ottica, inoltre, essi riportano che la positività all'enzima è stata evidenziata solo in cellule cromaffini isolate e non in gruppi cellulari.

I risultati ottenuti in *T. carnifex* concordano con quelli riportati in *R. catesbeiana*; le differenze riscontrate potrebbero dipendere sia da differenze di specie, che dalle diverse metodologie sperimentali utilizzate. Anche negli Urodeli, pertanto, l'enzima PNMT sembra avere una localizzazione simile a quella riscontrata negli Anuri e nelle altre classi di Vertebrati.

Per quanto riguarda l'utilizzo della tecnica di ibridazione in situ, non esistono dati bibliografici relativi all'individuazione del segnale per l'mRNA per la PNMT, negli Anfibi. Tuttavia i risultati concordano con i dati ottenuti mediante tecnica immunocitochimica, rilevando la presenza dell'espressione dell'mRNA per l'enzima PNMT nelle cellule cromaffini, ed in particolare confermando una maggiore presenza dell'mRNA a marzo .

Relazione tra ciclo sessuale e ciclo funzionale delle cellule cromaffini

Per quanto concerne il trattamento sperimentale con FSH, sono state osservate variazioni a carico di entrambi i tessuti della ghiandola interrenale.

La risposta del tessuto cromaffine all'FSH è diversa nei due periodi; nel mese di marzo, quando l'enzima PNMT è in una condizione di elevata attività funzionale, l'FSH determina un aumento significativo del livello sierico di

adrenalina. Nelle cellule cromaffini, resta pressoché invariato il numero totale di granuli cromaffini mentre l'aumento del numero di granuli NA e la diminuzione dei granuli A incrementano il rapporto granuli NA/A a valori simili a quelli di esemplari estivi o invernali. Nel mese di dicembre, quando l'enzima è in una condizione di bassa attività funzionale, l'FSH induce un aumento del livello sierico di NA; nelle cellule cromaffini diminuiscono la quantità totale di granuli secretori e la quantità di granuli NA, diminuendo il valore del rapporto granuli NA/A.

Mancano dati bibliografici relativi all'effetto dell'FSH sulla ghiandola interrenale; i risultati ottenuti suggeriscono tuttavia una relazione tra il ciclo funzionale delle cellule cromaffini e il ciclo sessuale, entrambi regolati dalla temperatura (Galgano, 1942; Laforgia and Capaldo, 1991). In particolare l'FSH sembrerebbe inibire, a marzo, l'enzima PNMT.

La produzione di FSH, preposto alla regolazione della gametogenesi, inizia, in *Triturus carnifex*, ai primi di aprile, è massima in luglio – agosto e cessa del tutto o quasi ai primi di novembre (Galgano, 1942). Inoltre in questo stesso periodo (aprile – novembre) l'esame dell'attività della ghiandola interrenale evidenzia nei maschi, un progressivo aumento del livello di corticosterone, che raggiunge il picco a luglio – agosto (periodo in cui si verifica anche il picco dell'FSH) per poi diminuire nei mesi successivi, e raggiungere un nuovo picco tra dicembre e gennaio (Zerani and Gobbetti, 1993). Lavori precedenti (Capaldo

et al., 2004 b) hanno evidenziato che l'adrenalina ha un effetto inibente sul rilascio degli ormoni corticosteroidi; inoltre ricerche eseguite negli Anfibi (Moore and Orchinik, 1991) hanno evidenziato un'influenza inibente del corticosterone sul comportamento riproduttivo. Benché siano necessarie ulteriori ricerche per approfondire le relazioni tra ciclo sessuale e ciclo funzionale della ghiandola interrenale, si potrebbe ipotizzare che una parte di questa interazione risieda nell'azione inibente esercitata dall'FSH sull'enzima PNMT, con conseguente scarsa produzione di adrenalina. In questo modo, potrebbe essere favorito il rilascio di corticosterone, che potrebbe a sua volta contribuire all'inibizione del comportamento riproduttivo osservato nel periodo aprile – novembre. A parziale sostegno di quest'ipotesi vi è l'osservazione che, in corrispondenza del secondo picco di corticosterone, riscontrato a dicembre-gennaio in *T. carnifex* (Zerani and Gobetti, 1993), nelle cellule cromaffini vi è la presenza di una trascurabile quantità di adrenalina.

Per quanto concerne il tessuto a steroidi, nel mese di marzo l'FSH induce un aumento dei livelli sierici di entrambi gli ormoni, aldosterone e corticosterone e una diminuzione del rapporto lipidi/citoplasma nelle cellule a steroidi. A dicembre si osserva una diminuzione, non significativa, nei livelli di entrambi gli ormoni e un aumento del rapporto lipidi/citoplasma nelle cellule steroidogeniche.

Ricerche precedenti eseguite in *T. carnifex* (Capaldo et al., 2004a) hanno evidenziato che la somministrazione di noradrenalina stimola il rilascio degli ormoni corticosteroidi, mentre quella di adrenalina la inibisce; pertanto l'azione dell'FSH sul tessuto a steroidi (inibizione del rilascio dei corticosteroidi, a dicembre e stimolante a marzo) non sembra mediata attraverso un effetto sulle cellule cromaffini.

Analisi della sequenza dell'mRNA per la PNMT

Il lavoro eseguito mi ha permesso di sequenziare l'mRNA dell'enzima PNMT di *Triturus carnifex* e di dedurre la sequenza aminoacidica. Benché questi studi preliminari non consentano di ricostruire la sequenza nucleotidica completa del gene, tuttavia mi hanno reso possibile la comparazione tra la sequenza aminoacidica del tritone e le sequenze aminoacidiche note dei Mammiferi (Figg. 37, 38). Le zone di omologia identificate (17,26%) sono comprese nell'intervallo di coppie di basi 280-410 che sembrano contenere le zone maggiormente conservate nel corso dell'evoluzione. Benché non vi siano

informazioni sulla struttura dell'enzima PNMT, il discreto grado di conservazione fa supporre che in questo intervallo siano presenti le funzioni essenziali, più conservate della proteina.

In conclusione, i risultati attuali suggeriscono:

- 1) La localizzazione dell'enzima PNMT nelle cellule cromaffini concorda con quella riscontrata negli Anuri e nelle altre classi di Vertebrati.
- 2) L'enzima PNMT sembra sensibile ai fattori in grado di regolare il ciclo riproduttivo, come dimostrano i risultati del trattamento con FSH.
- 3) L'analisi della sequenza dell'mRNA per la PNMT di tritone suggerisce una discreta conservazione evolutiva di questa proteina.

Accordi, F. (1988) – The chromaffin cells of *Siren Lacertina* (Amphibian, Urodela): cytological characteristic and evidence of exocytosis. *J. Anat.*, 156: 169-176.

Andreoletti, G. E., Colucci, D., Vellano, C., Mazzi, V. (1984) – Annual cycle of testosterone and estradiol in the crested newt, *Triturus cristatus carnifex* Laur.. *Atti Acad. Sci. Torino*, 118: 157-164.

Andreoletti, G. E., Vellano, C., Colucci, D., Andreone, C., Mazzi, V., Fasolo, A. (1988) – Anatomical organization of CRF and AVT – like systems in the newt hypothalamus and the effects of localized lesions to the posterior hypothalamus on serum aldosterone and corticosterone. *Boll. Zool.*, 55: 261-268.

Axelrod, J. (1962) – Purification and properties of phenylethanolamine- N –methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 237: 1657-1660.

Baetge, E. E., Behringer, RR., Messing, A., Brinster, LR., Palmiter, RD. (1988) – Transgenic mice express the human phenylethanolamine- N –methyltransferase gene in adrenal medulla and retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 (10): 3648-52.

Baetge, E. E., Suh, YH., Joh, TH. (1986) – Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of bovine phenylethanolamine- N –methyltransferase: partial amino acid homology with rat tyrosine hydroxylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 (15): 5454 –8.

Batter, DK., D’Mello, SR., Turzai, LM., Hughes, HB., Joio, AE., and Kapland, BB. (1988) – The complete nucleotide sequence and structure of the gene encoding bovine phenylethanolamine- N –methyltransferase. J. Neurosci. Res., 19 (3): 367-76.

Berchtold, JP. (1975) – Observation on peroxisomes in interrenal (adrenocortical) cells of *Triturus cristatus* and *Salamandra salamandra* (Urodele, Amphibians). Cell. Tiss. Res., 162: 349-356.

Berchtold, JP. (1978) – Electron microscopic localization of 3- β – hydroxysteroid dehydrogenase and NA D - 11- ferrycynide reductase actives in Amphibian interrenal cells. Cell. Tiss. Res., 188: 143-148.

Betito, K., Diorio, J., Meaney, MJ., Boksa, P. (1992) – Adrenal phenylethanolamine- N – methyltransferase induction relation to glucocorticoid receptor dynamics: evidence that acute

exposure to high cortisol levels is sufficient to induce the enzyme. *J. Neurochem.*, 58 (5): 1853-62.

Blaschko, H. (1957) – Formation of catecholamines in the animal body. *Br. Med. Bull.*, 13: 162-165.

Bourgeois, PM., Dupont, W. et Vaillant, R. (1978) – “Noradrenaline et adrenaline chez la grenouille verte: concentrations surrenaliennes et plasmatiques dans diverses conditions experimentales”. *Annales d’Endocrinologie*, 39: 233-234.

Brownfield, MS., Poff, BC., Holzwarth, MA. (1985) – Ultrastructural immunocytochemical localization of serotonin and PNMT in adrenal medullary vesicle. *Histochemistry*, 83 (1): 41-6.

Bulbring, E. (1949) – The methylation of noradrenaline by minced suprarenal tissue. *Br. J. Pharmac.*, 4: 234-244.

Burke, W.J., Davis, J.W., Jon, T.H. (1983) – The role of compartmentalization of epinephrine in the regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase synthesis in the rat adrenal medulla. *Endocrinology*, 113: 1102-1110.

Cahill, AL., Eertmoed, AL., Mangoura, D., Perlman, RL. (1996) – Differential regulation of phenylethanolamine- N –methyltransferase expression in two distinct subpopulations of bovine chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 67 (3): 1217-24.

Capaldo, A., Gay, F., Valiante, S., Laforgia, V. and Varano, L. (2004 a) - Effect of noradrenalin administration on the interregal gland of the newt, *Triturus carnifex*: evidence of intra-adrenal paracrine interactions. *J. Morphol.* 259:33-40.

Capaldo, A., Gay, F., Valiante, S., Laforgia, V. and Varano, L. (2004 b) - Effect of adrenalin administration on the interregal gland of the newt, *Triturus carnifex*: evidence of intra-adrenal paracrine interactions. *J. Morphol.* 261:18-25.

Capaldo, A., Gay, F., Valiante, S., Varlese M.G., Laforgia, V. and Varano, L. (2004 c) - Release of aldosterone and catecholamines from the interrenal gland of *Triturus carnifex* in response to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) administration. *J. Morphol.* 262:692-700.

Carmichael, S.W. and Winkler, H. (1985) – Le cellule cromaffini dei surreni. *Le Scienze*, 206: 54-65.

Carroll, JR., Evinger, MJ., Goodman, HM., Joh, TH. (1991) – Differential and coordinate regulation of TH and PNMT mRNA in chromaffin cell cultures by second messenger system activation and steroid treatment. *J. Mol. Neurosci.*, 3 (2): 75-85.

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J. (1979) – Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem*, 18: 5294-5299.

Clark, M., Johnson, SL., Lehrach, H., Lee, R., Li, F., Marra, M., Eddy, S., Hillier, L., Kucaba, T., Martin, J., Beck, C., Wylie, T., Underwood, K., Steptoe, M., Theising, B., Allen, M., Bowers, Y., Person, B., Swaller, T., Gibbons, M., Pape, D., Harwey, N., Schuek, R., Ritter, E., Kohn, S.,

Shin, T., Jeckson, Y., Cardenas, M., Mc Cann, R., Waterston, R., Wilson, R. (1998) – Vashu Zebrafish EST Project. <http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/viewer>.

Coupland, RE. (1965) – The natural history of the chromaffin cells. London: Longmans Green.

Cryer, PF. (1992) – The adrenal medulle – in: V. H. T. James Editor, The adrenal gland, second edition, Raven Press, Ltd., NY.

Diner, O. (1967) – L'expulsion des granules de la medulla – surrenale chez le hamister. C. R. Seances Acad. Sci. D., 265: 616-619.

Dupont, W., Bourgeois, P., Vaillant, R. (1977) – Catecholamine secretion by the adrenal gland of *Rana esculenta*, interrelationship between steroidogenic and chromaffin tissue. 9th Conference European on Comparative Endocrinology, Abstract 139.

Evinger, MJ., Ernsberger, P., Regunathan, S., Joh, TH., Reis, DJ. (1994) – A single transmitter regulates gene expression through two separate mechanisms: cholinergic regulation of

phenylethanolamine- N –methyltransferase mRNA via nicotinic and muscarinic pathways. J. Neurosci., 14 (4): 2106-16.

Evinger, MJ., Ernsberger, P., Regunathan, S., Reis, DJ. (1995) – Regulation of phenylethanolamine- N –methyltransferase gene expression by imidazoline receptors in adrenal chromaffin cells. J. Neurochem., 65 (3): 988-97.

Evinger, MJ., Joh, TH. (1989) - Strain-specific differences in transcription of the gene for the epinephrine-synthesizing enzyme phenylethanolamine- N –methyltransferase. Brain Res. Mol. Brain. Res., 5 (2): 141-7.

Evinger, MJ., Park, DH., Baetge, EE., Reis, DJ., Joh, TH. (1986) – Strain-specific differences in levels of the mRNA for the epinephrine synthesizing enzyme phenylethanolamine- N –methyltransferase. Brin. Res., 387 (1): 63-73.

Evinger, MJ., Towle, AC., Park, DH., Lee, P., Joh, TH. (1992) – Glucocorticoids stimulate transcription of the rat phenylethanolamine- N –methyltransferase (PNMT) gene in vivo and in vitro. Cell. Mol. Neurobiol., 12 (3): 193-215.

Galgano, M. (1942) – L'azione ormonale delle gonadi e dell'ipofisi sul ciclo sessuale annuale degli Anfibi, in rapporto al clima. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, VII, fasc. 3: XX.

Gaudino, G., Mazzi, V. and Fasolo, A. (1983) – Immunocytochemical identification of ACTA containing cells in the hypophysis of the crested newt. *Monit. Zool. Ital. (N. S.)*, 17: 409-413.

Grassi Milano, E. and Accordi, F. (1986) – Evolutionary trends in adrenal gland of Anurans and Urodeles. *J. Morphol.*, 189: 249-259.

Gripois, D., Parvezed, H. (1972) – Simplification of the determination of PNMT. *Biochimie.*, 54(3): 413.

Hanke, W. (1978) – The adrenal cortex of Amphibian – in “ General Comparative and Clinical Endocrinology of the adrenal cortex”, vol. 2 (ed. Cester Jones and I. W. Henderson), pp. 419-495. London: Accademic Press.

Hanke, W. and Kloas, W. (1994) – Hormonal regulation of osmomineral contenting in Amphibia. *Zool. Sci.*, 11: 5-14.

Hanke, W. and Kloas, W. (1995) – Comparative aspects of regulation and function of the adrenal complex in different groups of Vertebrates. *Horm. Metab. Res.*, 27: 389-397.

Hathaway, C.B. Eppler, A. (1990) – Catecholamines, opioid peptides, and true opiates in the chromaffin cells of the eel: immunohistochemical evidence. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 79: 393-405.

Her, S., Bell, R.A., Bloom, A.K., Siddall, B.J., Wong, D.L. (1999) - phenylethanolamine- N – methyltransferase gene expression SP1 and MAZ potential for tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.*, 274 (13): 8698-707.

Hodel, A. (2001) – Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J. Neuroendocrinol.*, 13: 217-221.

Hoche, M.R., Plaetke, R., Otterud, B., Stauffer, D., Holik, J., Byerley, W.F., B...., E.E., Gershon, E.S., Lalovel, J.M., Leppert, M. (1992) – Genetic linkage of the human gene for phenylethanolamine- N –methyltransferase (PNMT), the adrenaline – synthesizing enzyme to DNA markers on chromosome 17 q 21- q 22. *Hum. Mol. Genet.*, 1 (3): 175-8.

Hökfelt, T., Johansson, O. and Goldstein, M. (1984) – Central catecholamine neurons as revealed by immunohistochemistry with special reference to adrenaline neurons. In: A. Björklund e T. Hökfelt (eds) Handbook of Chemical Neuroanatomy, vol. 2: Classical Transmitters in the CNS, pp. 157-276. Elsevier, Amsterdam.

Jiang, W., Uht, R., Bohn, MC. (1989) – Regulation of phenylethanolamine- N – methyltransferase (PNMT) mRNA in the rat adrenal medulla by corticosterone. Int. J. Dev. Neurosci., 7 (5) : 513-20.

Kaneda, N., Ichinose, H., Kobayash, K., Oka, K., Kishi, F., Nakazawa, A., Kurosawa, Y., Fujita, K., Nagatsu, T. (1988) – Molecular cloning of cDNA and chromosomal assignment of the gene for human phenylethanolamine- N –methyltransferase, the enzyme for epinephrine biosynthesis. J. Biol. Chem., 263 (16): 7672-7.

Kloas, W., Hanke, W. (1992) – Effects of atrial natriuretic factor on corticosteroid and catecholamine secretion by the adrenals of *Xenopus laevis*. Gen. Comp. Endocrinol., 85: 269-277.

Kobayashi, K., Sasaoka, T., Morita, S., Nagatsu, I., Iguchi, A., Kurosawa, Y., Fujita, K., Nomura, T., Kimura, M., Katsuki, M. and Nagatsu, T. (1992) – Genetic alteration of catecholamine specificity in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 (5): 1631-1635.

Laborie, C., Van Camp, G., Bernet, F., Montel, V., Dupouy, JP. (2003) – Metyrapone-induced glucocorticoid depletion modulates tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine- N – methyltransferase gene expression in the rat adrenal gland by a noncholinergic transsynaptic activation. *J. Neuroendocrinol.*, 15 (1): 15-23.

Laforgia, V., Capaldo, A. (1991) – Annual cycle of the chromaffin cells of *Triturus cristatus*. *J. Morphol.*, 208: 83-90.

Laforgia, V., Capaldo, A. (1992) – The interrenal gland of *Triturus cristatus* after insulin administration during the annual cycle. *J. Morphol.*, 211: 87-93.

Laforgia, V., Capaldo, A. (1993) – Modification induced by the antiandrogen cyproterone acetate in the adrenal gland of the newt *Triturus cristatus*. *Proc. Multinational Cong. Electron Microscopy, Parma, 13-17/09/93*, pp. 407-408.

Laforgia, V., Capaldo, A., Muoio, R. and Varano, L. (1998) – Electron immunocytochemical localization of neuropeptide Y, Leu-Enkefalina, and Somatostatina (S-14) in the interrenal gland of the newt *Triturus cristatus*. Annals of the New York Accademy of Sciences, vol. 839.

Laforgia, V., and Muoio, R. (1997) – Effect of ACTH and corticosteroids phenylethanolamine-N –methyltransferase (PNMT) expression as determined by immunocytochemical localization in the adrenal gland of the lizard *Podarcis sicula*. Ital. J. Zool., 64: 301-306.

Lee, YS., Raia, G., Tonshoff, C., Evinger, MS. (1999) – Neural regulation of phenylethanolamine- N –methyltransferase (PNMT) gene expression in bovine chromaffin cells differs from other catecolamine enzyme genes. J. Mol. Neurosci., 12(1): 53-68.

Lima, L., Soukes, TL. (1986) – Pharmacological analysis of the neurotransmitter mechanism regulating phenylethanolamine- N –methyltransferase in the adrenal gland. Biochem. Pharmacol., 35 (22): 3965-9.

Mancuso, A., Andreoletti, G. E., Colucci, D., Vellano, C. (1997) – Regulation of ACTH and MSH production Amphibians: an immunocytochemical study on autografted pituitary in *Triturus carnifex*. Ital. J. Zool., 64: 297-300.

Mastrolia, L., Gallo, V. and Monelli, H. (1976) – Cytological and histochemical observations on chromaffin cells of the suprarenal gland of *Triturus carnifex* (Urodele, Amphibian). Boll. Zool., 43: 27-36.

Mazzi, V., Colucci, D., Andreoletti, G. E., Vellano, C. (1984) – ACTH dependency of aldosterone incrition in the newt *Triturus carnifex* Laur.. Atti Accad. Sci. Torino, ICI Sci. Mat. Fis. Nat., 118: 339-343.

Mazzi, V., Vellano, C., Giunta, C. and Bona, A. (1973) – Localization of corticotropic activity in the pituitary of the crested newt. Mon. Zool. Ital. (N. S.), 7: 97-116.

Mezey, E. (1989) – Cloning of the rat adrenal medullary phenylethanolamine - N – methyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, 17 (5): 2125.

Moore, FL. and Orchinik M. (1991) – Multiple molecular actions for steroids in the regulation of reproductive behaviors. *Semin. Neurosci.* 3: 489-496.

Morescalchi, A. (1975) – Chromosome evolution in the caudate Amphibia. *Evolutionary Biology*, 8: 339-387.

Morita, K., Bell, RA., Siddall, BJ., Wong, DL. (1996) – Neural stimulation of Egr-1 messenger RNA expression in rat adrenal gland: possible relation to phenylethanolamine- N – methyltransferase gene regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 279 (1): 379-85.

Morita, S., Kobayashi, K., Hidaka, H., Nagatsu, T. (1992) – Organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding mouse phenylethanolamine- N –methyltransferase. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 13(4): 313-9.

Morita, K., Kuwada, A., Sano, A., Sakata, M., Sei, H., Morita, Y. (2001) – Semi-quantitative RT-PCR analysis of environmental influence on P450ss and PNMT mRNA expression in rat adrenal glands. *Life Sci.*, 70 (1): 73-80.

Morra, M., Leboulenger, F. and Vaudry, H. (1990) – dopamine inhibits corticosteroid secretion from frog adrenal gland in vitro. *Endocrinology*, 127: 218-226.

Nagatsu, I., Karasawa, N., Kondo, Y. and Inagaki J. (1979) – Immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase, dopamine – β – hydroxylase and phenylethanolamine- N – methyltransferase in the adrenal glands of the frog and rat by a peroxidase-antiperoxidase method. *Histochemistry*, 64 (2): 131-44.

Norris, D. O. (1996) – Vertebrate endocrinology. Third edition. Accademic Press.

Pendleton, RG., Gessner, G., Jenkins, B. (1976) – The long term effects of an inhibitor of phenylethanolamine- N –methyltransferase upon adrenal epinephrine biosynthesis. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 295 (2): 127-33.

Peyrot, A. and Vellano, C. (1967) – Histochemical investigations on some enzymes involved in steroidogenic in the interrenal gland of the crested newt. In: Enzyme Histochemistry – Simposio Antonio Boselli, pp. 1-3, Milano, 27-28 maggio.

Quaife, C.J., Hoyle, G.W., Froelick, G.J., Findley, S.D., Baetge, E.E., Behringer, R.R., Hammang, J.P., Brinster, R.L., Palmiter, R.D. (1994) – Visualization and ablation of phenylethanolamine- N – methyltransferase producing cells in transgenic mice. *Transgenic Res.*, 3 (6): 388-400.

Reid, S. G., Fritsche, R. and Jonsson, A. C. (1995) – Immunohistochemical localization of bioactive peptides and amines associated with the chromaffin tissue of five species of fish. *Cell Tissue Res.*, 280: 499-512.

Sabban, E.M., Goldstein, M., Bohn, M.C., Black, I.B. (1982) – Development of the adrenergic phenotype: increase in adrenal messenger RNA coding for phenylethanolamine – N-methyltransferase. *Proc. Natl. Acad.*, 79: 4823-4827.

Sato, F., Matsuta, M. and Hasegawa, T. (2001) – Molecular cloning of mRNA for equine phenylethanolamine- N –methyltransferase. JRA Equine Research Institute, Laboratory of

Molecular and Cellular Biology., 321-4 Tokami- Cho, Utsunomiya, Tochigi, 320-0856, Japan.

[http:// www.ncbi.nlm.gov/entrez/viewer](http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/viewer).

Schalling, M., Dagerlind, A., Brene, S., Petterson, R., Kvist, S., Brownstein, M., Hayman, SE., Mucke, L., Goodman, HM., Joh, TH., et al.. (1987) – Localization of mRNA for phenylethanolamine- N –methyltransferase (PNMT), using in situ hybridation. *Acta Physiol. Scand.*, 131 (4): 631-2.

Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J. A., Huse, W.D. (1988) – Lamda ZAP: a bacteriophage lamda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16: 7583-7600.

Suh, YH., Chun, YS., Lee, IS., Kim, SS., Cho, W., Chong, YH., Hong, L., Kim Park, CW., and Kim, CG. (1994) – Complete nucleotide sequence and tissue. Specific expression of the rat phenylethanolamine- N –methyltransferase gene. *J. Neurochem.*, 63 (5): 1603-8.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Heggins, D.G. (1997) – The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882.

Unsicker, K. (1973) - Fine structure and innervation of the avian adrenal gland. *Z. Zellforsch.*, 145: 288-416.

Unsworth, BR., Hayman, GT., Carroll, A., Lelkes, PI. (1999) – Tissue-specific alternative mRNA splicing phenylethanolamine- N –methyltransferase (PNMT) during development by intron retention. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 17 (1): 45-55.

Vellano, C., Andreoletti, G.E., Colucci, D., Andreone, C., Mazzi, V. (1990) – Does the intermediated lobe exercise an adrenocorticotropic activity in vivo in the crested newt. *Atti Acad. Sci. Torino, I. Cl. Sci. Mat. Fis.*, 124. 23-28.

Vellano, C., Colucci, D., Peyrot, A., Andreoletti, G.E., Mazzi, V. (1984) – Influenza dell'ipofisectomia e dell'ACTH sulla secrezione dell'aldosterone da parte dell'interrenale nel tritone crestato. *Boll. Zool.* 51, suppl., Cong. U.Z.I. Padova.

Vellano, C., and Peyrot, A. (1966) – Histochemical investigations on Δ 5- β - hydroxysteroid-dehydrogenase activity in the interrenal gland of *Triturus cristatus carnifex* Laur. Under normal and experimental conditions. Preliminary note. *Ricerca scientifica*, 36: 1073-1076.

Wan, DC., Marley, PD., Livett, BG. (1991) – Coordinate and differential regulation of proenkefalin A and PNMT mRNA expression in cultured bovine adrenal chromaffin cells: responses to camp elevation and phorbol esters. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.*, 9 (1-2): 135-42.

Wasserman, G.F., and Tramezzani, J.H. (1964) - Separate distribution of adrenaline and noradrenaline secreting cells in the adrenal of snakes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 3: 480-489.

Weisberg, EP., Baruchin, A., Stachowiak, MK., Stricker, EM., Zigmond, MJ., Kaplan, BB. (1989) – Isolation of a rat adrenal cDNA clone encoding phenylethanolamine- N – methyltransferase and cold-induced alterations in adrenal PNMT mRNA and protein. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 6 (2-3): 159-66.

Wolfensberger, WG., Forssmann, WE., Reinecke, M. (1995) – Localization and coexistence of atrial natriuretic peptide (ANP) and neuropeptide Y in Vertebrate adrenal chromaffin cells immunoreactive to TH, DBH dPNMT. *Cell and Tissue Res.* 280: 267-276.

Wong, DL., Lesage, A., Siddall, B., Funder, JW. (1992) – Glucocorticoid regulation of phenylethanolamine- N –methyltransferase in vivo. *FASEB J.*, 6 (14): 3310-5.

Wong, DL., Lesage, A., White, S., Siddall, B. (1992) – Adrenergic expression in the rat adrenal gland: multiple developmental regulatory mechanism. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 67 (2): 229-36.

Wong, DL., Siddall, BJ., Ebert, SN., Bell, RA., Her, S. (1998) - Phenylethanolamine- N – methyltransferase gene expression: synergistic activation by Egr-1, AP-2 and the glucocorticoid receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 61 (1-2): 154-61.

Wurtman, R. J. and Axelrod, J. (1966) – Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. *J. Biol. Chem.*, 241: 2301-2304.

Wurtman, RJ, Axelrod, J., Vesell, ES., Ross, GT. (1968) – Species difference in inducibility of pheniletanolamine –N-methyltransferase. *Endocrinol.* 82: 584-590.

Wurtman, R. J. et al., (1967) – Distribution of the adrenaline forming enzyme in the adrenal gland of a snake, *xenodon merremii*. *Nature*, 215 (103): 879-80.

Zachariassen, RD., and Newcomer, W.S. (1975) – Influence of corticosterone on the stress-induced elevation of phenylethanolamine- N –methyltransferase activity in the avian adrenal. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 25: 332-338.

Zegler, MG., Bao, X., Kennedy, BP., Joyner, A., Enns, R. (2002) – Location, development, control, and function of extraadrenal phenylethanolamine- N –methyltransferase. *Ann. NY Acad. Sci.*, 971: 76-82.

Zerani, M., and Gobbetti A. (1993) – Corticosterone during the annual reproduction cycle and in sexual behavior in the crested newt, *Triturus carnifex* . *Hormones and Behavior*, 27: 29-37.