



**UNIVERSITA' DI PISA**  
**Dipartimento di Biologia**

Corso di Laurea magistrale in  
Biologia Applicata alla Biomedicina

**TESI DI LAUREA**

**“EFFETTI DELLA 3-IODOTIRONAMINA  
(T<sub>1</sub>AM) SUL TESSUTO NERVOSO”**

**Relatore :**

Dott.ssa Sandra Ghelardoni

**Candidata:**

Giulia Giannini

Anno Accademico 2015-2016

*Ai miei genitori,  
a mio fratello.*

# INDICE

<b>1.INTRODUZIONE</b> .....	3
<b>1.1. Struttura delle tironamine</b> .....	4
<b>1.2. Biosintesi e metabolismo di T<sub>1</sub>AM</b> .....	5
<b>1.2.1 Metabolismo delle tironamine</b> .....	6
<b>1.3. Recettori delle tironamine</b> .....	7
<b>1.4. Concentrazioni endogene</b> .....	8
<b>1.5. Trasporto intracellulare della T<sub>1</sub>AM</b> .....	9
<b>1.6. Trasporto della T<sub>1</sub>AM a livello di circolo ematico</b> .....	10
<b>1.7. Effetti della T<sub>1</sub>AM</b> .....	11
<i>1.7.1. Effetti sulla termogenesi</i> .....	11
<i>1.7.2. Effetti endocrini</i> .....	12
<i>1.7.3. Effetti metabolici</i> .....	12
<i>1.7.4. Effetti sul sistema cardiaco</i> .....	13
<b>2. T<sub>1</sub>AM E SISTEMA NERVOSO CENTRALE</b> .....	14
<b>2.1. LTP (Long term potentiation)</b> .....	15
<i>2.2. Recettore metabotropico del glutammato</i> .....	17
<i>2.3. Recettori AMPA</i> .....	18
<i>2.4. Recettori NMDA</i> .....	19
<i>2.5. Vie di trasduzione del segnale coinvolte nell'LTP</i> .....	21
<i>2.5.1. Adenosina monofosfato ciclico (cAMP)</i> .....	21

2.5.2. Proteina chinasi calcio-calmodulina dipendente ( <i>CaMKII</i> )....	22
2.5.3. Proteina chinasi C ( <i>PKC</i> ).....	23
2.5.4. Extracellular signal-regulated kinase ( <i>ERK</i> ).....	23
2.5.5. cAMP response element-binding protein ( <i>CREB</i> ).....	25
2.6. Sirtuina 1 ( <i>SIRT1</i> ).....	26
2.7. Effetti sull'alterazione sinaptica in modelli di malattia di Alzheimer.....	27
<b>3. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>29</b>
<b>4.MATERIALI E METODI.....</b>	<b>30</b>
<i>4.1 Preparazione e conservazione della T<sub>1</sub>AM.....</i>	<i>30</i>
<i>4.2 Colture cellulari.....</i>	<i>30</i>
<i>4.2.1. Cellule e terreni utilizzati.....</i>	<i>30</i>
<i>4.2.2. Congelamento.....</i>	<i>31</i>
<i>4.2.3. Scongelamento.....</i>	<i>31</i>
<i>4.3. Saggio di proliferazione cellulare MTT assay.....</i>	<i>31</i>
<i>4.4. Estrazione proteine totali da cellule trattate.....</i>	<i>32</i>
<i>4.5. Quantificazione proteine totali con reagente di Bradford®... </i>	<i>33</i>
<i>4.6 .Western Blot.....</i>	<i>34</i>
<i>4.6.1. Elettroforesi e blotting.....</i>	<i>34</i>
<i>4.6.2. Immunorivelazione su membrana PVDF.....</i>	<i>35</i>
<i>4.7. Saggi metabolici.....</i>	<i>35</i>
<i>4.7.1. Dosaggio del glucosio.....</i>	<i>35</i>
<i>4.7.2. Dosaggio dei corpi chetonici .....</i>	<i>36</i>

<b>4.8. Uptake di T<sub>1</sub>AM</b> .....	37
<b>4.9. Analisi statistica</b> .....	37
<b>5. RISULTATI</b> .....	39
5.1. <i>Saggi di vitalità cellulare</i> .....	39
5.2. <i>Western Blot</i> .....	41
5.3. <i>Saggi metabolici</i> .....	48
5.4. <i>Uptake T<sub>1</sub>AM</i> .....	50
<b>6. DISCUSSIONE</b> .....	51
<b>7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA</b> .....	55

# RIASSUNTO

Oggetto di studio di questa tesi è la 3-iodotironamina ( $T_1AM$ ), un ormone di natura endogena che è stato ipotizzato derivare dalla decarbossilazione e deiodinazione dell'ormone tiroideo tiroxina ( $T_4$ ).

Vari studi in vivo ed in vitro hanno dimostrato che  $T_1AM$  è in grado di indurre importanti effetti funzionali, quali : ipotermia, inotropismo negativo , bradicardia, e riduzione del quoziente respiratorio (rapporto tra  $CO_2$  prodotta e  $O_2$  consumato), indice questo di uno shift del metabolismo energetico da un catabolismo prevalentemente glucidico, ad un catabolismo prevalentemente lipidico.

Recenti studi sul sistema nervoso centrale in modelli animali indicano effetti migliorativi della memoria e dell'apprendimento dopo somministrazione di  $T_1AM$ . I meccanismi d'azione coinvolti però non sono ancora noti. Con questa tesi, quindi, sono stati approfonditi gli effetti della  $T_1AM$  sul tessuto nervoso.

Come modello sperimentale in vitro di tessuto nervoso è stata utilizzata una linea cellulare tumorale mista di neuroblastoma di topo e glioma di ratto (NG108-15) e a queste cellule sono state applicate le varie tecniche di coltura cellulare, proteomica e biologia molecolare.

In particolare sono state studiate le vie di trasduzione del segnale associate al sistema glutammatergico, il principale sistema coinvolto nel meccanismo del potenziamento a lungo termine (LTP), andando a valutare l'espressione di recettori e pattern di segnalazione e le loro modifiche in seguito alla somministrazione di dosi differenti di  $T_1AM$ .

L'espressione proteica è stata studiata mediante la tecnica Western blot, mettendo in evidenza proteine come la chinasi attivata dalla calcio calmodulina (CaMKII), la chinasi regolata da segnali extracellulari (ERK), la proteina chinasi C (PKC), il recettore TAAR1, il recettore NMDA ed altre proteine come CREB (cAMP response binding protein) e la sirtuina 1 (SIRT1), tutte maggiormente coinvolte nella plasticità sinaptica e nella formazione della memoria.

Visti i dati di esperimenti svolti in questo laboratorio su linee cellulari di tessuto epatico, che evidenziano una variazione del metabolismo dovuta alla somministrazione di  $T_1AM$ , anche su questo modello neurale è stato messo a confronto il consumo di glucosio e di corpi chetonici.

Infine, analizzando dati preliminari di studi sulla malattia di Alzheimer, secondo i quali  $T_1AM$  sembrerebbe revertire l'effetto negativo del peptide  $\beta$ -amiloide sull'LTP, anche a questo modello cellulare sono stati somministrati  $T_1AM$  e  $\beta$ -amiloide per verificare l'effetto combinato.

# ABSTRACT

The object of study of this thesis is the 3-iodotironamina ( $T_1AM$ ), an endogenous hormone which has been speculated to derive from decarboxylation and deiodination of thyroid hormone thyroxine ( $T_4$ ).

Various *in vivo* and *in vitro* studies have shown that  $T_1AM$  is able to induce important functional effects, such as hypothermia, negative inotropy and bradycardia, and reduction of the respiratory quotient (ratio between  $CO_2$  produced and  $O_2$  consumed), this as an index of a shift of the metabolism energy from a predominantly carbohydrate catabolism, to a predominantly lipid catabolism.

Recent studies on the central nervous system in animal models indicate ameliorative effects of memory and learning after administration of  $T_1AM$ . The mechanisms of action involved, however, are not yet known. So with this thesis the effects of  $T_1AM$  on nervous tissue were examined.

As an experimental *in vitro* model of neural tissue it has been used a mixed line of cancer cells of mouse neuroblastoma and rat glioma (NG108-15) and on these cells were applied the various cell culture techniques, proteomics and molecular biology.

In particular we studied the ways of signal transduction associated with the glutamatergic system, the main system involved in the mechanism of the phenomenon of Long-term potentiation (LTP), to evaluate the expression of specific receptors and signalling patterns and their changes after the administration of different doses of  $T_1AM$ .

Protein expression was investigated by Western blot technique, highlighting proteins like: kinase activated by calcium calmodulin (CaMKII), extracellular signal-regulated kinase (ERK), the protein kinase C (PKC), the  $TAAR_1$  receptor, the NMDA receptor and other proteins such as CREB (cAMP response binding protein) and sirtuin 1 (SIRT1), all more involved in synaptic plasticity and memory formation.

Previous data of experiments carried out in this laboratory on cell lines of liver tissue show a change of metabolism due to the administration of  $T_1AM$ , so also on this neural model was compared the consumption of glucose and ketone bodies.

Finally, by analyzing preliminary data from studies on Alzheimer's disease, according to which  $T_1AM$  would seem revert the negative effect of  $\beta$ -Amyloid peptide on LTP, also in this cellular model we administered  $T_1AM$  and  $\beta$ -amyloid to verify the combined effect.

# 1. Introduzione

Con il termine tironamine (TAM) si intende un insieme di composti endogeni, correlati all'ormone tiroideo, dal punto di vista sia strutturale sia metabolico, che ha iniziato ad essere oggetto di studio negli anni '50.

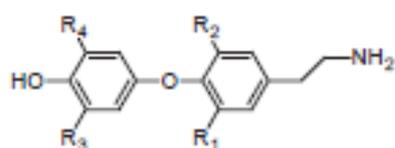
La principale forma circolante nota dell'ormone tiroideo era la tiroxina ( $T_4$ ), ma si ipotizzava una sua conversione in un'altra molecola prima di un suo effetto a livello dei tessuti periferici. A supporto vi erano infatti alcune evidenze sperimentali, quali ad esempio l'esistenza di un ritardo tra la somministrazione di  $T_4$  e una variazione rilevabile della velocità del metabolismo basale, ed anche una maggiore risposta nell'uomo alla 3,5,3'-triiodotironina ( $T_3$ ). [1]

Si cominciarono a sintetizzare analoghi della tiroxina, per cercare di individuare la forma attiva dell'ormone, e l'attenzione si rivolse alle tironamine. In particolare risultò che la triiodotironamina era il composto con maggiore attività.

Lo studio però era principalmente incentrato sull'individuazione dell'ormone tiroideo attivo e la ricerca delle tironamine negli anni venne abbandonata.

Nel 2004 il gruppo di lavoro del Prof. Scanlan (OHSU, Oregon) riprese le ricerche, in collaborazione con il prof. Zucchi (Università di Pisa) e collaboratori,[2] ed essi sintetizzarono nove iodotironamine, per le quali scoprirono un ruolo come potenziali ligandi di una classe di recettori di membrana associati a proteine G, chiamati TAARs (trace amine-associated receptors) nel ratto. In particolare, utilizzando molecole sintetiche come standard nella cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa in tandem, dimostrarono che la 3-iodotironamina ( $T_1AM$ ) era presente in cervello, fegato e cuore di ratto e a concentrazioni nanomolari era l'agonista più potente del recettore TAAR1.

La sua somministrazione esogena in ratti e topi era inoltre in grado di determinare effetti quali riduzione della temperatura corporea e dell'attività contrattile cardiaca. [2] Cominciarono quindi a considerare la  $T_1AM$  come un nuovo messaggero chimico.

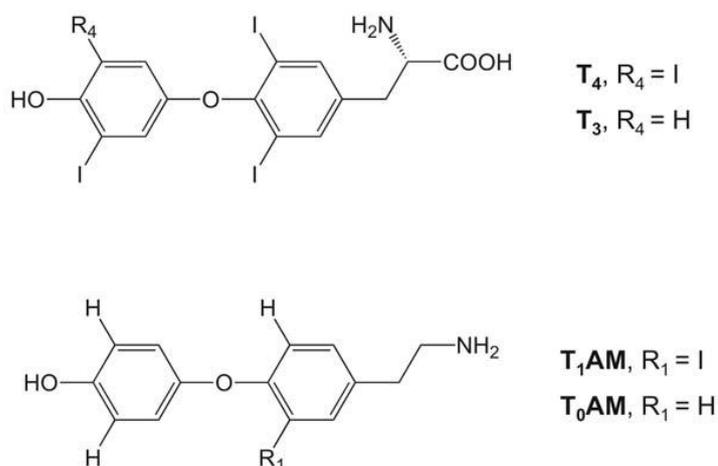


Thyronamine	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	EC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	
					rTAR1	mTAR1
T <sub>1</sub> AM	I	H	H	H	14	112
3,3'-T <sub>2</sub> AM	I	H	I	H	41	-1,000
T <sub>2</sub> AM	I	I	H	H	56	371
T <sub>3</sub> AM	I	I	I	H	87	>1,000
T <sub>0</sub> AM	H	H	H	H	131	-1,000
3'-T <sub>1</sub> AM	H	H	I	H	-1,000	>1,000
3',5'-T <sub>2</sub> AM	H	H	I	I	>1,000	>1,000
rT <sub>3</sub> AM	H	I	I	I	>1,000	>1,000
T <sub>4</sub> AM	I	I	I	I	>1,000	>1,000

**Fig 1: Nomenclatura e struttura delle 9 tironamine sintetizzate. [2]**

## 1.1 Struttura delle tironamine

Le tironamine vengono in generale indicate con la sigla TxAM, dove x indica il numero di atomi di iodio presenti nella molecola. La loro struttura differisce da quella della tiroxina, soltanto per l'assenza del gruppo carbossilico -COOH (Fig.2) e per la presenza di un numero diverso di atomi di iodio.[3]



**Fig 2: Struttura Tiroxina (T<sub>4</sub>) e T<sub>1</sub>AM [3]**

## 1.2. Biosintesi e metabolismo di T<sub>1</sub>AM

La via di sintesi ad oggi non è ancora stata completamente chiarita, ma si ritiene che la decarbossilazione degli ormoni tiroidei avvenga dopo una eliminazione del gruppo amminico da parte di un'amminotrasferasi o di un'aminossidasi, con produzione di derivati dell'acido tiropiruvico o dell'acido tiroacetico. [4]

Tuttavia non è da escludere che la decarbossilazione possa avvenire prima della deaminazione, dando così origine alle tironamine.

Ad oggi, la decarbossilazione delle tironine è attribuita all'enzima ornitina decarbossilasi, (ODC).[5]

La biosintesi delle tironamine prosegue e si completa con la rimozione di uno o più atomi di iodio, catalizzata dagli enzimi deiodinasi. [6]

Piehl e collaboratori, nel 2008, [7] hanno dimostrato che le tironamine sono substrati efficienti delle tre deiodinasi Dio1, Dio2 e Dio3, ma la selettività delle deiodinasi per le iodotironamine è differente da quelle per le iodotironine, infatti per esempio, T<sub>4</sub>AM non è un substrato di Dio1 e Dio2 e non può essere deiodinato a T<sub>3</sub>AM, mentre è un ottimo substrato di Dio3 ed è rapidamente deiodinato a rT<sub>3</sub>AM. T<sub>4</sub> invece è trasformata in T<sub>3</sub> tramite Dio1 e Dio2 e in rT<sub>3</sub> tramite Dio3.

rT<sub>3</sub>AM è in seguito deiodinato in maniera sequenziale dagli isoenzimi Dio1 e Dio2, fino a generare T<sub>1</sub>AM, descrivendo così una possibile via di sintesi di T<sub>1</sub>AM.

Questo percorso sintetico è supportato da alcuni esperimenti effettuati in vitro, ma non esistono prove dirette in vivo che T<sub>1</sub>AM sia un metabolita di T<sub>4</sub> e non si conoscono ancora chiaramente le relazioni tra T<sub>1</sub>AM e l'ormone tiroideo in vivo.

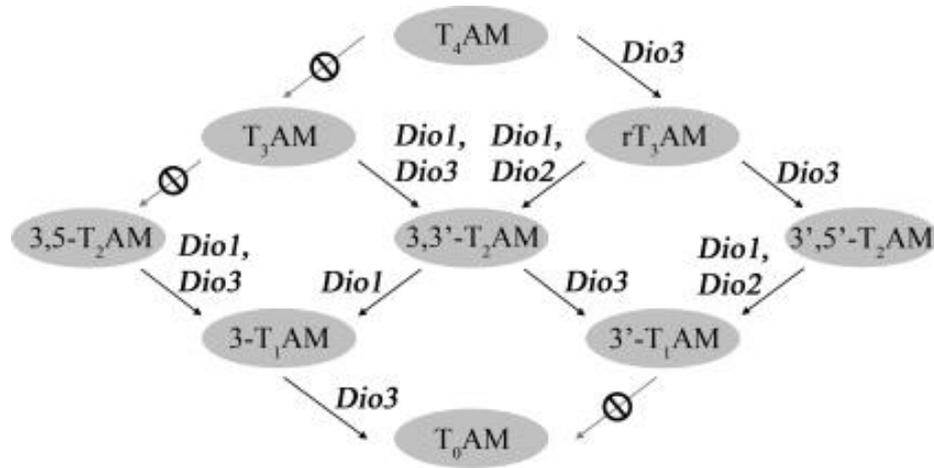


Fig. 3: Via di sintesi ipotetica della T<sub>1</sub>AM [7].

### 1.2.1 Metabolismo delle tironamine

Vi sono diverse vie attraverso le quali vengono metabolizzate le iodotironamine.

Oltre alla deiodinazione, possono essere substrato delle sulfotransferasi (SULT), enzimi in grado di catalizzare la solfatazione di numerosi composti endogeni [8].

Questa via è stata ipotizzata come meccanismo per la loro deattivazione e per la regolazione dei loro effetti fisiologici.

In particolare è stato visto che T<sub>0</sub>AM, T<sub>1</sub>AM, and T<sub>3</sub>AM sono substrati di sulfotrasferasi di fegato umano, soprattutto dell'isoforma SULT1A3 [8].

Una significativa attività sulfotransferasica è stata riscontrata inoltre in cuore e cervello. È noto che nell'uomo, nel topo e nel ratto, il tessuto cardiaco e cerebrale sono bersagli dell'azione di T<sub>1</sub>AM [9] e questo rafforza l'ipotesi che l'azione delle sulfotransferasi (SULT) sull'attività di T<sub>1</sub>AM possa causare una attenuazione e quindi una regolazione degli effetti da esso indotti.

Il gruppo amminico delle tironamine può essere anche ossidato da amminossidasi, in particolare, dalle monoamminaossidasi (MAO) o da una particolare aminossidasi semicarbazide-sensibile, la benzilaminossidasi (Bz-SSAO), con formazione di aldeide, che può essere ulteriormente ossidata ad acido carbossilico da un altro enzima, la aldeide deidrogenasi (ALDH).[10]

L'effetto di questi enzimi è quindi la trasformazione di tironamine in acidi tiroacetici e questo potrebbe rappresentare un altro meccanismo di deattivazione, simile alla solfatazione. [11]

### 1.3. Recettori delle tironamine

I recettori delle tironamine non sono stati ancora identificati in maniera inequivocabile, ma, vista la similarità strutturale delle tironamine con gli ormoni tiroidei e le ammine biogene, è stato ipotizzato che queste potessero interagire con i recettori nucleari degli ormoni tiroidei e con quelli delle ammine biogene.

In realtà il legame con i recettori degli ormoni tiroidei è stato escluso mediante esperimenti specifici, quindi i derivati decarbossilati dell'ormone tiroideo sono sempre stati considerati come metaboliti inattivi. [12]

Meyer e Hesch nel 1983 avanzarono l'ipotesi che le tironamine si potessero legare a recettori di membrana accoppiati a proteine G; essi determinarono l'influenza di alcune iodotironamine sul legame del [3H]-diidroalprenololo, uno specifico ligando dei recettori  $\beta$ -adrenergici. [13]

T<sub>2</sub>AM e T<sub>0</sub>AM mostrano una bassa affinità, mentre T<sub>3</sub>AM spiazza il diidroalprenololo con una K<sub>i</sub> nell'ordine di 5  $\mu$ M.

T<sub>3</sub>AM, 3,5-T<sub>2</sub>AM e T<sub>0</sub>AM si legano ai recettori  $\beta$ -adrenergici, ma non attivano la via di trasduzione del segnale basata su cAMP; prevengono invece la produzione di cAMP indotta dal [3H]-diidroalprenololo.

Gli effetti funzionali di queste interazioni sono però dubbi in quanto in cellule HEK293 esprimenti i recettori dopaminici D1 o  $\beta$ 2-adrenergici e trattate con T<sub>0</sub>AM o T<sub>1</sub>AM non mostrano alcun cambiamento nella concentrazione di cAMP, anche con trattamenti a concentrazioni superiori a 10  $\mu$ M. [14]

Una scoperta molto importante in questo ambito è stata fatta nel 2007 da Grandy e collaboratori. [15] I ricercatori infatti, hanno dimostrato che T<sub>1</sub>AM è in grado di interagire con un recettore appartenente ad una classe di recettori accoppiati a proteine G, chiamato TAAR1 (*trace amine-associated receptor-1*) con affinità nanomolare.

L'espressione di TAAR1 in cellule eterologhe induce la produzione di cAMP dopo esposizione prolungata a p-tiramina e  $\beta$ -fenilettilamina, ma non alle classiche ammine biogene come dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina ed istamina.

Dato che p-tiramina e  $\beta$ -fenilettilamina sono presenti in bassissime concentrazioni nelle cellule dei vertebrati ed appartengono ad una classe di composti denominate oligoamine ("*trace amines*"), il nuovo recettore fu originariamente denominato "*trace amine receptor*".

Esperimenti successivi dimostrarono come il genoma di ratto, topo, scimpanzé ed uomo include diversi geni che codificano per recettori simili al TAAR1, che hanno una sequenza polipeptidica unica (NSXXNPXX[YH]XXX[YF]XWF), utilizzata come marker della nuova famiglia di recettori. [16]

Dato che una chiara risposta ad oligoamine è stata dimostrata solo per due recettori, il nome è stato modificato in “*trace amine-associated receptors*”.

Nel genoma sia umano sia dello scimpanzé sono presenti 9 geni che codificano per 9 sottotipi di TAARs (TAAR1-TAAR9), [16] mentre nel genoma di ratto e di topo sono state identificate forme aggiuntive di TAARs (geni paraloghi), che sono varianti dei 9 sottotipi base.

Zucchi e collaboratori, mediante Real Time PCR hanno riscontrato la presenza di trascritti per recettori TAAR in diversi organi del corpo. [17]

Data la similarità strutturale tra le iodotironamine e le altre ammine biogene, è stata testata l'ipotesi che le iodotironamine potessero essere agonisti di TAAR1.

È stata studiata la risposta di cellule HEK293 esprimenti TAAR1, trattate con diverse iodotironamine ed è stato visto un aumento della concentrazione di cAMP. T<sub>1</sub>AM in particolare è risultata essere il composto con attività maggiore (EC<sub>50</sub>=14 nM), seguita da T<sub>2</sub>AM (EC<sub>50</sub>=41 nM), T<sub>3</sub>AM (EC<sub>50</sub>=56 nM) e T<sub>0</sub>AM (EC<sub>50</sub>=131 nM). Questo supporta il legame tra la iodotironamina ed il recettore TAAR1.

## 1.4. Concentrazioni endogene

Dopo la scoperta che T<sub>1</sub>AM è un composto endogeno, molta attenzione è stata posta alla determinazione dei suoi livelli nel sangue e nei tessuti, parametro importante per valutare i suoi effetti fisiologici.

I primi dati derivano dagli studi di Scanlan e collaboratori [2], che nel 2004 utilizzando la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS-MS) hanno identificato la molecola nel cervello di ratto.

Indicazioni della presenza di T<sub>1</sub>AM sono state ottenute in seguito anche nel tessuto cardiaco, nel siero e in numerosi organi di ratto (cuore, fegato, muscolo scheletrico, cervello, stomaco, polmone e rene), nel sangue umano e nel fegato di topo. [9]; [18]; [20]; [21].

Per identificare la T<sub>1</sub>AM endogena si opera un confronto con il corrispondente composto sintetico contenente quattro atomi di deuterio sulla catena laterale etilamminica, che viene usato come standard interno.

Questo ha permesso di identificare le concentrazioni della molecola nei vari tessuti ed in particolare:

- nei tessuti di ratto, la T<sub>1</sub>AM è presente con valori dell'ordine delle sub-picomoli per grammo, che corrispondono ad una concentrazione media di 1nM;
- a livello del tessuto cardiaco di ratto la molecola ha una concentrazione di 60 pmol/g, che corrisponde a circa 70 nM. [18]
- nel sangue di criceto, invece, la concentrazione risulta di 1.7 nM.[19]

Saba e collaboratori hanno indicato concentrazioni sieriche dell'ordine di 0,3 nM, con un approccio di tipo LC/MS/MS [9], mentre Hoefig e collaboratori hanno misurato concentrazioni di T<sub>1</sub>AM sieriche di 66 nM con tecniche immunologiche. [20]

Quindi tecniche bioanalitiche differenti hanno mostrato risultati differenti.

## 1.5. Trasporto intracellulare della T<sub>1</sub>AM

Le ammine biogene, quali dopamina, serotonina e norepinefrina, hanno trasportatori di membrana, per questo è stata supposta l'esistenza di simili trasportatori anche per T<sub>1</sub>AM.

È stato condotto uno studio su varie linee cellulari per indagare l'uptake di T<sub>1</sub>AM, mediante uno screening con RNAi, che ha suggerito un meccanismo di trasporto che porta ad un accumulo intracellulare di T<sub>1</sub>AM. Il bersaglio d'indagine erano i trasportatori dei soluti SLC (*solute carrier*), e le cellule sono state incubate sia con T<sub>1</sub>AM marcato (<sup>125</sup>I-T<sub>1</sub>AM), sia con un eccesso di non marcato. [22]

Se si varia la concentrazione di T<sub>1</sub>AM non marcato, durante gli esperimenti di uptake, si osserva una inibizione dose-dipendente dell'uptake della molecola radiomarcata, con un EC50 di circa 7.7 μM nelle cellule HeLa. Il fatto che si abbia un'inibizione dell'uptake da parte della forma non marcata, suggerisce che si tratti di un meccanismo specifico per alcune tironamine e distinto da quello delle classiche monoammine, dell'ormone tiroideo e di altri ioni organici.

Inoltre questi dati indicano che il trasporto di T<sub>1</sub>AM avviene in diversi tipi di cellule e coinvolge meccanismi di trasporto facilitato.

Per quanto riguarda le altre tironamine, con l'eccezione di T<sub>4</sub>AM, gli stessi ricercatori hanno osservato una riduzione dose dipendente dell'uptake di T<sub>1</sub>AM in presenza di tutte le tironamine, suggerendo una competizione per l'uptake. Le iodotironamine che hanno una efficacia minore in questo senso sono rT<sub>3</sub>AM, T<sub>0</sub>AM e 3',5'-T<sub>2</sub>AM, mentre la 3,3'-T<sub>2</sub>AM sembra ridurre l'uptake di T<sub>1</sub>AM radiomarcata in misura comparabile alla T<sub>1</sub>AM non marcata.

L'uptake di T<sub>1</sub>AM è guidato anche dal pH, infatti un aumento di pH ne causa un aumento e questo sta ad indicare che il trasporto sia guidato da un flusso protonico dall'interno della cellula verso l'esterno.

È stato poi necessario determinare se l'uptake dipendesse da ioni sodio e cloruro, ed esperimenti sono stati condotti con tamponi privi di questi ioni, ed è stato osservato che i livelli di uptake rimangono praticamente invariati, a dimostrazione del fatto che il trasporto è sodio/cloruro indipendente.

Tutto ciò suggerisce che si tratti di un trasporto passivo.

Per identificare i trasportatori di membrana in grado di compiere l'uptake della T<sub>1</sub>AM sono stati effettuati esperimenti di competizione con i substrati tipici per le maggiori classi di trasportatori. Nessun effetto di inibizione è stato notato né in presenza di dopamina, serotonina, norepinefrina, né in presenza di triiodotironina, suggerendo che la T<sub>1</sub>AM è captata all'interno della cellula con un meccanismo diverso da quello di questi composti.

Studi successivi hanno indicato che i trasportatori putativi per T<sub>1</sub>AM possono essere carriers di diversa natura, sia SLC, sia non SLC.[22]

## **1.6. Trasporto della T<sub>1</sub>AM a livello di circolo ematico.**

Scanlan e collaboratori nel 2012 hanno dimostrato che T<sub>1</sub>AM si ritrova nel circolo ematico soprattutto legata a proteine. [23]

In particolare sembra legarsi in maniera specifica e con alta affinità ad una componente proteica delle lipoproteine a bassa densità, l'apolipoproteina B-100 (apo-B100).

Questo legame potrebbe essere implicato anche nel trasporto all'interno delle cellule bersaglio e potrebbe essere esplicativo della discrepanza di livelli di T<sub>1</sub>AM ematici riscontrata utilizzando i due tipi di approccio diversi menzionati prima.

Per eseguire una LC/MS/MS è necessaria infatti una fase preliminare di purificazione dei campioni, che non viene richiesta invece nel saggio immunologico; quindi è possibile che la fase di purificazione non sia in grado di

liberare T<sub>1</sub>AM dal legame con l'apoB100 e che quindi con la LC/MS/MS si possa quantificare solo la T<sub>1</sub>AM circolante nella sua forma libera.

## **1.7. Effetti della T<sub>1</sub>AM**

Gli effetti prodotti dalla T<sub>1</sub>AM sono vari, tra questi sono noti:

- Effetti sulla termogenesi
- Effetti endocrini
- Effetti metabolici
- Effetti sul sistema cardiaco
- Effetti sul sistema nervoso

### **1.7.1 Effetti sulla termogenesi**

La prima osservazione sperimentale degli effetti funzionali della T<sub>1</sub>AM fu la profonda ipotermia indotta da una somministrazione intraperitoneale nel topo (20-50 mg/kg). Entro 30 minuti dall'iniezione si ha una riduzione della temperatura corporea di circa 8°C, che si mantiene per un lasso di tempo compreso tra le 6 e le 12 ore. I topi diventano inattivi, ma i riflessi vengono conservati e l'abbassamento della temperatura corporea non è associato a risposte omeostatiche compensatorie, quali il brivido e la piloerezione.[2]

La T<sub>0</sub>AM produce effetti simili anche se mostra un decimo dell'efficacia rispetto alla T<sub>1</sub>AM. Le dosi di T<sub>1</sub>AM e T<sub>0</sub>AM richieste per ottenere un effetto pari al 50% della stimolazione massima sono rispettivamente 59 e 178 µmol/kg. Quindi la loro potenza relativa è simile a quella mostrata nell'attivazione del TAAR1.

### 1.7.2 Effetti endocrini

Un primo effetto endocrino attribuito alle tironamine risale al 1984, quando fu descritto che T<sub>3</sub>AM inibisce la secrezione di prolattina nelle colture di cellule pituitarie. [24] L'effetto venne attribuito ad un'interferenza con il sistema adrenergico, ma non sono state testate altre iodotironamine e la loro interazione con i TAARs espressi nella ghiandola pituitaria ed il cui coinvolgimento non può essere escluso.

Nel 2007 Regard e collaboratori [25] dimostrarono che T<sub>1</sub>AM è in grado di modulare la secrezione di insulina; infatti l'iniezione intraperitoneale di 50mg/Kg di T<sub>1</sub>AM in topi, porta ad un aumento dei livelli di glucosio nel sangue e ad una diminuzione dei livelli di insulina.

I ricercatori hanno attribuito questo effetto alla stimolazione da parte di T<sub>1</sub>AM dei recettori adrenergici  $\alpha$ 2A accoppiati a proteine G<sub>i</sub>, che è inibita dalla yolimbina, (antagonista di questi recettori) ed è assente in topi transgenici con delezione dei recettori  $\alpha$ 2A, o in seguito ad espressione selettiva nelle cellule  $\beta$ 2 di subunità catalitiche della tossina della pertosse, un noto inibitore del segnale delle proteine G<sub>i</sub>/O.

Invece, in linee cellulari di insulinoma che sovraesprimono il gene del TAAR1, il trattamento con T<sub>1</sub>AM aumenta la secrezione di insulina.

In seguito a queste osservazioni, alla T<sub>1</sub>AM è stato attribuito il ruolo di stimolatore della secrezione di insulina via TAAR1 e di inibitore della secrezione via recettori  $\alpha$ 2A.

### 1.7.3 Effetti metabolici

In alcuni mammiferi di piccola taglia, l'ipotermia può essere associata all'abbassamento del metabolismo, che produce uno stato noto come torpore.[19]

Per questo motivo è sembrato interessante studiare gli effetti metabolici della T<sub>1</sub>AM. Sia nel topo che nel criceto, la T<sub>1</sub>AM produce come già detto, entro alcuni minuti, una sostanziale diminuzione della temperatura corporea. Questo effetto è associato alla diminuzione del consumo di ossigeno ed a una riduzione del quoziente respiratorio (rapporto tra CO<sub>2</sub> prodotta e O<sub>2</sub> consumato). La diminuzione del quoziente respiratorio è un indice dell'aumentata ossidazione di acidi grassi, che comporta un quoziente respiratorio di circa 0.7, rispetto a quella del glucosio, che comporta un quoziente respiratorio di circa 0.9.

Quindi la T<sub>1</sub>AM produce uno spostamento di scelta di substrato metabolico preferenziale da carboidrati ad acidi grassi.

Questo fatto è sostenuto anche dall'osservazione che il trattamento con la T<sub>1</sub>AM induce l'insorgenza di chetonuria ed una significativa perdita di massa grassa.

Gli effetti metabolici sono più prolungati rispetto agli effetti ipotermici, dato che il quoziente respiratorio risulta ancora ridotto dopo 24 ore.

#### **1.7.4. Effetti sul sistema cardiaco**

Oltre all'ipotermia, l'iniezione intraperitoneale di T<sub>1</sub>AM nei topi determina l'insorgenza di bradicardia reversibile.[2]

Nel 2007 Chiellini e collaboratori [18], durante perfusioni su cuore lavorante di ratto e su cuore isolato, hanno osservato che l'aggiunta di T<sub>1</sub>AM o di T<sub>0</sub>AM al buffer di perfusione è in grado di produrre entro 30 secondi una diminuzione dose-dipendente di flusso aortico, gittata cardiaca, pressione e frequenza cardiaca, mentre il flusso coronarico non si modifica.

Questo effetto si mantiene per almeno 50 minuti e può essere revertito cambiando il buffer di perfusione.

Gli effetti di T<sub>1</sub>AM sono opposti a quelli degli ormoni tiroidei, essa infatti ha sul cuore effetti inotropi e cronotropi negativi (riduzione della contrattilità e della frequenza cardiaca).

Sono stati in seguito valutati gli effetti di T<sub>1</sub>AM sui livelli cardiaci di cAMP, ma i suoi livelli restano invariati e la risposta funzionale a T<sub>1</sub>AM non è influenzata dalla tossina della pertosse, escludendo così il coinvolgimento delle proteine G<sub>s</sub> o G<sub>i</sub>. [18]

Inibitori della proteina chinasi C, della proteina chinasi calcio-calmodulina dipendente, delle MAP chinasi, e della fosfatidilinositolo-3-chinasi sono risultati inefficaci, mentre i cambiamenti emodinamici sono molto potenziati dalla genisteina, un inibitore delle tirosina chinasi, ed attenuati dal vanadato, un inibitore delle tirosina fosfatasi.

Visti questi risultati, è stato ipotizzato che la T<sub>1</sub>AM moduli lo stato di fosforilazione di residui di tirosina, ed esperimenti di Western Blot con anticorpi antifosfotirosina hanno confermato la defosforilazione di alcune proteine nelle frazioni microsomiali e citosoliche, tuttavia, l'identità di queste proteine resta tutt'ora sconosciuta.[18]

## 2. T<sub>1</sub>AM e sistema nervoso centrale

L'azione di T<sub>1</sub>AM è stata investigata anche a livello del tessuto nervoso, dove è stata originariamente identificata e caratterizzata.

Data la sua similarità strutturale con i neurotrasmettitori monoamminergici, è stato ipotizzato che T<sub>1</sub>AM potesse interagire con i trasportatori delle monoammine.

Dagli studi condotti è stato osservato che T<sub>1</sub>AM è in grado di inibire i trasportatori di dopamina e norepinefrina, impedendone così il riassorbimento a livello neurale, riconoscendole quindi un ruolo come neuromodulatore.[26]

Snead e collaboratori nel 2007 [27] hanno dimostrato che T<sub>1</sub>AM è in grado di inibire il trasporto delle monoammine sia a livello vescicolare, sia attraverso la membrana plasmatica. Questa inibizione è risultata specifica per le catecolamine, infatti non è stata osservata nei confronti dei trasportatori della serotonina.

È stato osservato anche un effetto neuroprotettivo di T<sub>1</sub>AM, infatti una iniezione intraperitoneale di 50mg/Kg in un modello murino per l'infarto cerebrale, si è dimostrata in grado di ridurre l'area interessata dall'infarto.[28] Ed è un effetto legato anche all'ipotermia, infatti scompare quando la temperatura ritorna a valori normali.

Inoltre sono stati effettuati studi a livello del locus coeruleus (LC), il maggior centro di controllo adrenergico del sistema nervoso centrale (SNC), che hanno mostrato come microiniezioni di T<sub>1</sub>AM nel LC attivino in modo dose dipendente i neuroni di questa regione con un E<sub>50</sub> di 2,7 µM. Queste evidenze hanno portato a considerare T<sub>1</sub>AM come un bloccante adrenergico endogeno a livello del sistema noradrenergico centrale.[29]

I neuroni noradrenergici del LC sono attivati in risposta a stimoli "d'allarme" sia interni che esterni e rilasciano noradrenalina, causando di conseguenza un generale aumento del tono adrenergico.

Un altro studio è stato condotto per verificare gli effetti di T<sub>1</sub>AM sui fenomeni di formazione della memoria e sull'apprendimento. [30]

Iniezioni i.c.v. di T<sub>1</sub>AM in topi hanno mostrato un potenziamento della capacità di apprendimento e memoria, una diminuzione della soglia del dolore a stimoli termici ed una stimolazione della curiosità. Quindi gli studi hanno cominciato ad essere condotti nell'ottica di considerare T<sub>1</sub>AM come un nuovo regolatore positivo dei processi di acquisizione di memoria e dell'apprendimento. Questo aspetto può avere importanti implicazioni nel trattamento di disturbi della memoria associati a patologie neurodegenerative.

## 2.1. LTP (Long term potentiation).

Un processo implicato nella formazione della memoria e nell'apprendimento è il cosiddetto potenziamento a lungo termine (LTP). [31]

Questo fenomeno consiste in un aumento a lungo termine dell'intensità di trasmissione a livello sinaptico, che si traduce in un aumento dell'ampiezza della corrente postsinaptica eccitatoria (EPSC). Dopo una serie di brevi impulsi ad alta frequenza, l'ampiezza della risposta sinaptica aumenta e può essere mantenuta in vivo a questi alti livelli per giorni o settimane. È importante che la stimolazione sia ad alta frequenza perché è necessario che uno stimolo sia accoppiato ad una concomitante depolarizzazione della cellula postsinaptica, ed in tale meccanismo è coinvolto il sistema glutammatergico.

Questi cambiamenti nella forza di una sinapsi sono frequenti durante l'apprendimento e la formazione della memoria, nei quali si verificano adattamenti in risposta ad uno stimolo, che consistono in modifiche delle connessioni funzionali all'interno dei circuiti neuronali.

Per apprendimento si intende il meccanismo con cui nuove informazioni vengono acquisite, mentre per memoria, il mantenimento di queste informazioni nel tempo.

Si distingue una memoria esplicita, che dipende dall'integrità del lobo temporale e di certe strutture diencefaliche, quali l'ippocampo e la corteccia entorinale ed una memoria implicita, che invece include forme associative di memoria, come il condizionamento classico e forme non associative come l'abitudine, ed è basata sull'integrità di cervelletto e gangli basali.

Un'altra distinzione è da farsi tra memoria a breve termine, che dura per alcune ore, e memoria a lungo termine, che persiste per molti giorni o anche più a lungo.

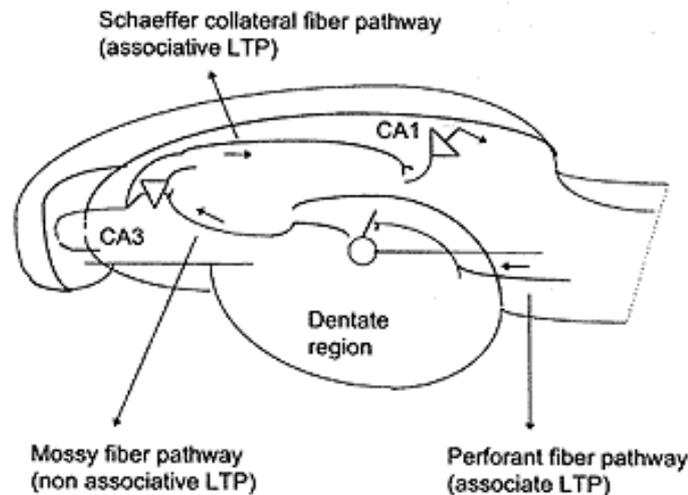
A livello cellulare la creazione di una memoria a lungo termine è associata con l'espressione genica, la sintesi de novo di proteine e la formazione di nuove connessioni sinaptiche; mentre la memoria a breve termine è indipendente da tutto ciò.

E' stato fatto un parallelo con l'LTP, in quanto è stato mostrato che questo consta di diverse fasi, che coinvolgono altrettanti meccanismi molecolari: una fase precoce (E-LTP), che dura 2-3 ore, indipendente dalla sintesi proteica, ma dipendente da modificazioni covalenti di varie proteine già presenti nella cellula e dalla mobilitazione delle proteine verso la sinapsi; mentre una più duratura, (L-LTP) che dura diverse ore in vitro e settimane in vivo e richiede la sintesi di nuove proteine.

L'LTP è evidente a livello di ippocampo, dove si possono distinguere tre distinte classi di connessioni sinaptiche: assoni della corteccia entorinale hanno sinapsi con cellule granulari del giro dentato; assoni designati come fibre muschiose

(*mossy fibers*) di queste cellule granulari, sinaptano con cellule piramidali della regione CA3 ed infine cellule piramidali della regione CA3 sinaptano con i neuroni CA1 e formano la via collaterale Schaffer. [32]

I neuroni CA1 situati a livello ippocampale proiettano alla corteccia entorinale e post-entorinale, e queste vie hanno un ruolo in molte forme di apprendimento e memoria. [33]



**Fig 4: Struttura ippocampo [32].**

Numerosi studi hanno identificato un ruolo essenziale dell'ippocampo nella memoria spaziale e della maggior parte delle aree della corteccia per le vari tipologie di memoria, per esempio la memoria visiva, la memoria uditiva e quella tattile. [34]

Un altro fattore importante è la plasticità sinaptica, implicata nella creazione delle connessioni sinaptiche durante lo sviluppo, ma anche nell'adulto. È noto infatti che la formazione della memoria dipende da cambiamenti nell'efficienza sinaptica, che permettono il rafforzamento delle connessioni tra neuroni.

Si è cercato di comprendere il meccanismo con cui il rafforzamento delle connessioni sinaptiche può essere raggiunto e un buon modello è proprio quello del potenziamento a lungo termine LTP.

La prima descrizione completa di LTP risale al 1973, ad opera di Bliss e Lomo, [35] i quali osservarono che treni di stimolazioni ad alta frequenza causavano un aumento di efficienza nella trasmissione sinaptica nelle cellule del giro dentato dell'ippocampo.

Fu chiaro fin da subito che i cambiamenti sinaptici alla base di certe forme di memoria e apprendimento potevano essere simili a quelli che occorrono durante l'LTP.

Le caratteristiche dell'LTP, ossia cooperatività, associazione, specificità nell'input e durata, sono state identificate come base per l'ipotesi che l'LTP possa essere un substrato biologico per almeno alcune forme di memoria. [36]

Altre evidenze sono a supporto di questo:

- l'LTP è più facilmente dimostrabile nell'ippocampo e in aree cerebrali coinvolte nell'apprendimento e memoria
- l'attività ritmica che dà inizio all'LTP ricorda il ritmo tetanico che viene registrato nell'ippocampo durante il comportamento esplorativo [37]
- inibitori dell'LTP bloccano anche l'apprendimento ippocampale
- molti cambiamenti biochimici che avvengono durante l'LTP si osservano anche durante l'acquisizione della memoria.

Importanti osservazioni sull'instaurarsi dell'LTP furono fatte nei primi anni '80 ed una in particolare diede inizio alla comprensione della cascata di meccanismi cellulari innescati da una stimolazione tetanica. Si osservò che l'LTP nella regione CA1 dell'ippocampo, veniva inibito dall'antagonista dell' N-metil-d-aspartato (NMDA), acido 2-amino 5-fosfonopentanoico (AP5) [38] e che l'attivazione del recettore NMDA porta ad un afflusso di calcio attraverso canali ligando e voltaggio sensibili.[39]

L'evento che porta all'induzione dell'LTP sembra essere proprio l'afflusso di calcio nella spina postsinaptica tramite l'attivazione di recettori NMDA e l'inibizione di questi recettori blocca l'LTP.

Quest'attivazione è necessaria anche per l'induzione dell'LTP nell'amigdala [40], nella corteccia visiva e in quella prefrontale [41] ed è esplicativa delle proprietà di questo fenomeno.

Infatti l'attivazione del recettore porta all'apertura del canale del calcio ad esso associato, quando ha legato il glutammato e quando la membrana postsinaptica è depolarizzata.

## **2.2. Recettore metabotropico del glutammato**

Il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale. Viene sintetizzato mediante il ciclo degli acidi tricarbossilici sia nei

neuroni sia nelle cellule gliali e nei neuroni anche dal ciclo del glutammato-glutammina, ed è in seguito accumulato in vescicole per un successivo rilascio. [42] Una volta rilasciato, diffonde nello spazio intersinaptico e raggiunge la membrana postsinaptica, dove si lega ai suoi recettori. Questi si distinguono in “ionotropici” e “metabotropici”. I recettori ionotropici formano canali ionici di membrana permeabili ai cationi mono- e bivalenti ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) e sono a loro volta suddivisi in recettori AMPA, NMDA e kainato, dal nome del ligando farmacologico che li attiva selettivamente.

I recettori metabotropici sono accoppiati a proteine G e formano una famiglia di 8 sottotipi (denominati mGlu1-8). Al primo gruppo appartengono i recettori mGlu1 e mGlu5 e a loro attivazione produce la formazione di inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG), due secondi messaggeri che rispettivamente promuovono il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  dai depositi intracellulari ed attivano la protein chinasi C (PKC).

I sottotipi recettoriali del secondo gruppo (mGlu2, mGlu3) e del terzo gruppo (mGlu4, mGlu6, mGlu7, mGlu8) sono sempre accoppiati a proteine  $G_i$  e la loro attivazione produce una riduzione della concentrazione intracellulare di cAMP.

I recettori AMPA ed i recettori NMDA sono i principali artefici dell'induzione dell'apprendimento associativo e della formazione della memoria.

La prima indicazione di un possibile ruolo del recettore metabotropico del glutammato nell'LTP fu nel 1991, con l'osservazione che l'agonista acido 1,3-ciclopentanodicarbossilico (ACPD) aumentava l'LTP [43] e l'effetto è stato visto dipendere dai cambiamenti calcio dipendenti e dall'attivazione della proteina chinasi C (PKC).

### **2.3. Recettori AMPA**

L'importanza dei recettori AMPA nella trasmissione sinaptica eccitatoria è nota da tempo ed è stato osservato che cambiamenti nell'attività di questi recettori possono contribuire significativamente al meccanismo dell'LTP. Una trasmissione sinaptica basale tramite il glutammato è mediata largamente dalla conduttanza dei recettori AMPA, che dà origine ad un EPSC. [31]

Questi recettori formano canali permeabili al  $\text{Na}^+$  ed impermeabili al  $\text{Ca}^{2+}$  per la presenza di una particolare subunità recettoriale (denominata GluR2) che contiene un residuo di arginina carico positivamente nella porzione del recettore che forma la parete del canale ionico. L'espressione dei recettori AMPA nella membrana postsinaptica è il primo requisito per l'espressione dell'LTP.

La scoperta iniziale che ha suggerito che il recettore postsinaptico per il glutammato viene modulato nell'espressione dopo l'induzione dell'LTP, deriva

dall'analisi di cambiamenti associati all' LTP nella sensibilità di neuroni CA, nei confronti di ligandi del recettore per il glutammato.

I dati mostrano un piccolo aumento dopo l'induzione dell'LTP, che suggerisce un aumento della sensibilità o del numero dei recettori correlato ad esso. [44]

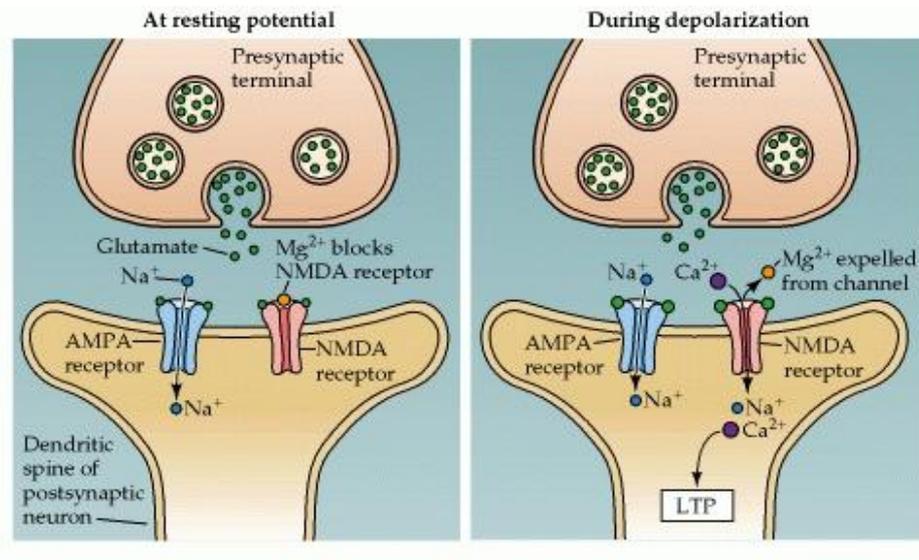
Si dimostrò in seguito che alcune sinapsi erano funzionalmente silenti, a causa della mancanza di recettori AMPA, nonostante la presenza di recettori NMDA [45],[46]. Inoltre, quando venivano stabilite singole connessioni tra assoni CA3 e cellule CA1 piramidali, solo gli NMDA generavano correnti eccitatorie postsinaptiche (EPSCs) in cellule piramidali CA1, anche se lo stimolo che porta all'LTP risiede in una risposta generata dai recettori AMPA.

Questo è stato interpretato come un'evidenza che i recettori AMPA erano inseriti nella membrana postsinaptica dopo l'induzione dell'LTP.

## **2.4. Recettori NMDA**

I recettori NMDA sono permeabili al  $Ca^{2+}$ , ma la loro attività è tonicamente inibita dagli ioni  $Mg^{2+}$ , che vengono intrappolati all'interno del canale ionico. L'attivazione di questi recettori è resa possibile dalla depolarizzazione di membrana, che rimuove gli ioni  $Mg^{2+}$  dal canale ionico. La stimolazione dei recettori AMPA inoltre attiva le tirosine chinasi della famiglia SRC che fosforilano e aumentano la conduttanza al calcio del recettore NMDA.

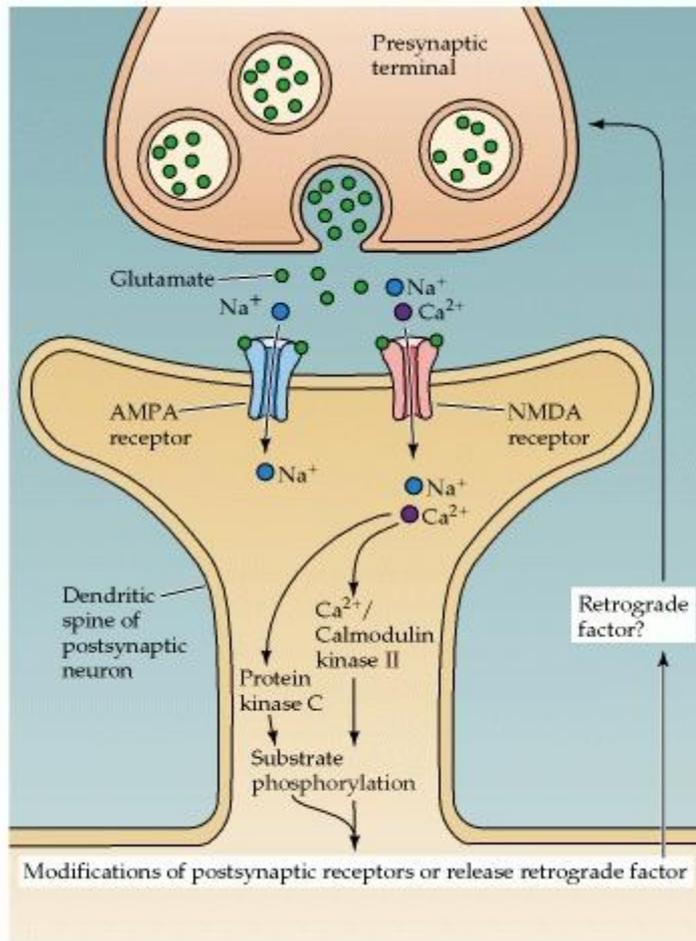
È stato dimostrato che l'attivazione dei recettori NMDA ha un ruolo essenziale nell'acquisizione della memoria spaziale. I primi dati apparirono nel 1986, quando Morris et al [47] trovarono che bloccando il recettore con AP5 la memoria spaziale era inibita. Questo AP5 inibiva anche l' LTP, suggerendo una sovrapposizione tra il meccanismo con il quale l'LTP è sostenuto e il consolidamento della memoria. Tsien et al. [48] ottennero gli stessi risultati, generando topi knock out per il recettore NMDA nelle cellule CA1 e riportarono che questo topo mostrava un'alterazione della memoria spaziale, mentre quella non spaziale era intatta e questo associato ad un deficit nell'LTP.



**Fig 5: Induzione dell'LTP [52]**

Dopo che venne stabilito che l'aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  nella cellula postsinaptica, come conseguenza dell'attivazione del recettore NMDA, era un fattore critico per l'induzione dell'LTP, l'attenzione si rivolse all'analisi degli eventi cellulari che seguono a questo incremento.

Un altro meccanismo di induzione della LTP è mediato dai recettori metabotropici, che a differenza di quelli ionotropici possono localizzarsi sia a livello postsinaptico che presinaptico. Le fosfolipasi C, attivate da questi recettori scindono i fosfolipidi di membrana per formare diacilglicerolo (DAG) e inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3); il DAG modula l'attività del canale attraverso una PKC mentre l'IP3 mobilita il  $\text{Ca}^{2+}$  dai depositi intracellulari favorendone il rilascio.



**Fig 6: meccanismo dell'LTP [52]**

## **2.5. Vie di trasduzione del segnale coinvolte nell'LTP**

### **2.5.1. Adenosina monofosfato ciclico (cAMP)**

Molti studi hanno indicato che l'LTP dipende da una cascata di segnali cellulari che sono stimolati da un aumento nella concentrazione intracellulare di cAMP. Un suo aumento porta all'attivazione della proteina chinasi cAMP dipendente (PKA), che porta alla fine all'attivazione di fattori di trascrizione, quali CREB.

È stato visto che la concentrazione di cAMP e l'attivazione della PKA sono aumentati dopo l'induzione dell'LTP. [49]

L'attivazione di protein chinasi A (PKA), protein chinasi C (PKC) e protein chinasi  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina dipendente di tipo II (CaMKII), produce la fosforilazione di residui di serina e treonina dei recettori AMPA, che divengono maggiormente attivi e maggiormente espressi sulle membrane. Ciò determina una maggiore risposta nei confronti dello stimolo condizionato, che viene dunque "identificato" rispetto agli stimoli afferenti e quindi "memorizzato".

Questi nuovi recettori AMPA aumentano la risposta della cellula postsinaptica al rilascio del glutammato, aumentano la forza della trasmissione sinaptica, fino a quando si mantiene l'LTP.

### **2.5.2. Proteina chinasi calcio-calmodulina dipendente (CaMKII)**

Tra le prime scoperte, una importante fu l'osservazione che l'entrata di calcio portava all'attivazione della CaMKII. [50]

Questa è una delle proteine più rappresentate nei neuroni (l'1-2% delle proteine totali). La sua espressione maggiore si ritrova nella porzione postsinaptica, e ne esistono circa 30 isoforme, con due principali tipi di subunità: CaMKII $\alpha$  e CaMKII $\beta$ .

La chinasi agisce come una proteina "interruttore", una volta attivata dalla proteina calcio/calmodulina, che funziona da sensore dei livelli di calcio intracellulari, l'enzima può autofosforilarsi, un evento che fa persistere l'attività della CaMKII anche dopo che i livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  ritornano ai livelli basali.

Studi su topi mutanti, nei quali l'attivazione persistente della CaMKII è inibita da una mutazione nel sito di fosforilazione e porta a deficit nella memoria e nell'apprendimento, mostrano che l'attivazione di questo enzima è necessaria per innescare l'LTP e certe forme di apprendimento. [51]

Una volta attivata dall'entrata di  $\text{Ca}^{2+}$ , la CaMKII trasloca dal citoplasma alla zona di densità postsinaptica, tramite diffusione semplice ed interazione con i recettori NMDA.

### **2.5.3. Proteina chinasi C (PKC).**

Un' importante Ser/Thr chinasi è la proteina chinasi C (PKC). Questa proteina è una chinasi monomeric, attivata dal secondo messaggero diacilglicerolo (DAG) e dal  $Ca^{2+}$ . Il DAG causa una traslocazione della proteina chinasi C dal citosol alla membrana, dove lega il  $Ca^{2+}$  e la fosfatidilserina, un fosfolipide di membrana. Questi eventi permettono la rimozione dell'inibizione della PKC e questa è in grado di fosforilare varie proteine substrato, tra cui i recettori AMPA, causandone un aumento nel loro numero nella membrana. [52]

Viene stimolata anche la liberazione di un fattore retrogrado diffusibile, quale ad esempio NO, che va ad agire a livello dell'elemento presinaptico, che contribuisce all'aumento di fusione delle vescicole contenenti glutammato. [52]

### **2.5.4. Extracellular signal-regulated kinase (ERK).**

Tra le conseguenze di un aumento di concentrazione del cAMP, c'è anche l'attivazione della proteina chinasi ERK. [53]

Questa proteina appartiene alla famiglia delle proteine chinasi attivate da mitogeni MAPK, un'importante ed altamente conservata famiglia di proteine serina/treonina chinasi, associati a recettori di membrana. Questa famiglia di proteine è composta da tre tipi di chinasi: MAPK chinasi chinasi (MAPKKK), MAPK chinasi (MAPKK) e MAPK, le cui attivazioni portano ad una cascata di segnalazione cellulare. [54]

L'attivazione della via delle MAPK è regolata da fattori di crescita, ormoni, mitogeni e segnali di stress cellulare, e lo stimolo viene trasmesso dalla superficie della cellula al nucleo.

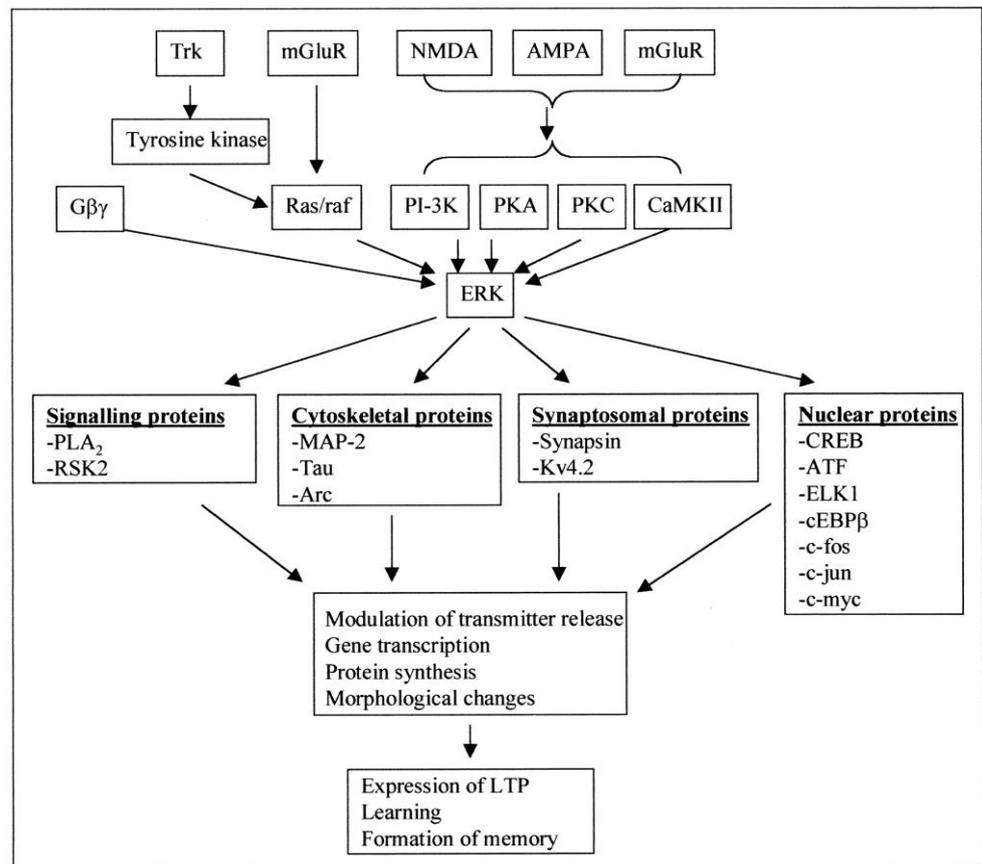
La via di ERK media il signalling intracellulare del recettore tirosina chinasi TrK. Neurotrofine come il fattore di crescita nervoso (NGF), il fattore neurotrofico cerebrale (BDNF), si legano al recettore TrK e causano l'attivazione della cascata intracellulare del segnale. Studi con inibitori delle MAPK e con topi ko per ERK1 hanno mostrato che l'attivazione di ERK1 regola proteine sinaptiche e promuove la formazione di nuove spine dendritiche ed ha un ruolo positivo nell'induzione e mantenimento dell'LTP.

Per mantenere un parallelo tra memoria ed LTP, è stato trovato che l'inibizione di ERK bloccava sia la memoria gustativa, sia l'LTP nella corteccia insulare. [55]

Anche l'LTP nella corteccia visiva è stato dimostrato dipendere dall'attivazione di ERK. [56]

Molte evidenze dimostrano inoltre che l'attivazione di ERK ha un ruolo nell'instaurarsi della memoria a lungo termine; infatti inibitori di ERK causano difetti in questo tipo di memoria, mentre non influiscono sulla memoria a breve termine.[57].

Le conseguenze dell'attivazione di ERK includono un ampio spettro di segnalazioni cellulari. Tra i suoi substrati ci sono infatti le proteine del citoscheletro MAP-2 e Tau; le proteine nucleari c-Myc, c-fos, e c-jun; Elk-1; CREB; C/EBP $\beta$  (CREB/Elk binding protein); ATF-2 e la proteina del segnale fosfolipasi A<sub>2</sub>. [31]



**Fig 7: Attivazione della via di ERK.[31]**

### 2.5.5. cAMP response element-binding protein (CREB).

Uno degli effettori a valle di ERK è CREB (*cAMP response element binding protein*).[31]

L'attivazione di ERK porta indirettamente all'attivazione di CREB tramite l'azione della chinasi RSK2, che insieme ad altre chinasi recluta la CBP (*CREB binding protein*).

Per quanto riguarda l'LTP, studi iniziali hanno mostrato che topi mutanti, che mancavano dell'isoforma  $\alpha$  e  $\delta$  di CREB, esibivano un LTP attenuato ed inoltre, inibitori di ERK, che inibivano l'LTP, avevano un effetto negativo anche su CREB. [58]

ERK può essere vista come un punto di convergenza di segnali di diverse proteine chinasi attivate come conseguenza dell'induzione dell'LTP [59]; ma anche CREB può essere un punto chiave, in quanto è stato visto attivare a valle PKA, PKC e CaMKII.

Un ruolo di CREB è stato visto anche come importante fattore di trascrizione nella formazione della memoria. La fosforilazione di CREB infatti è stata vista incrementare nell'ippocampo e nella corteccia entorinale di ratto.[60]

Un accoppiamento importante è quello tra la fosforilazione di CREB e la sintesi proteica, infatti è stato visto che l'attivazione di CREB è uno step essenziale nella cascata di segnalazione che porta alla formazione di nuove spine dendritiche, uno dei primi target degli input sinaptici associati alle modificazioni morfologiche che si vedono durante l'LTP.[61]

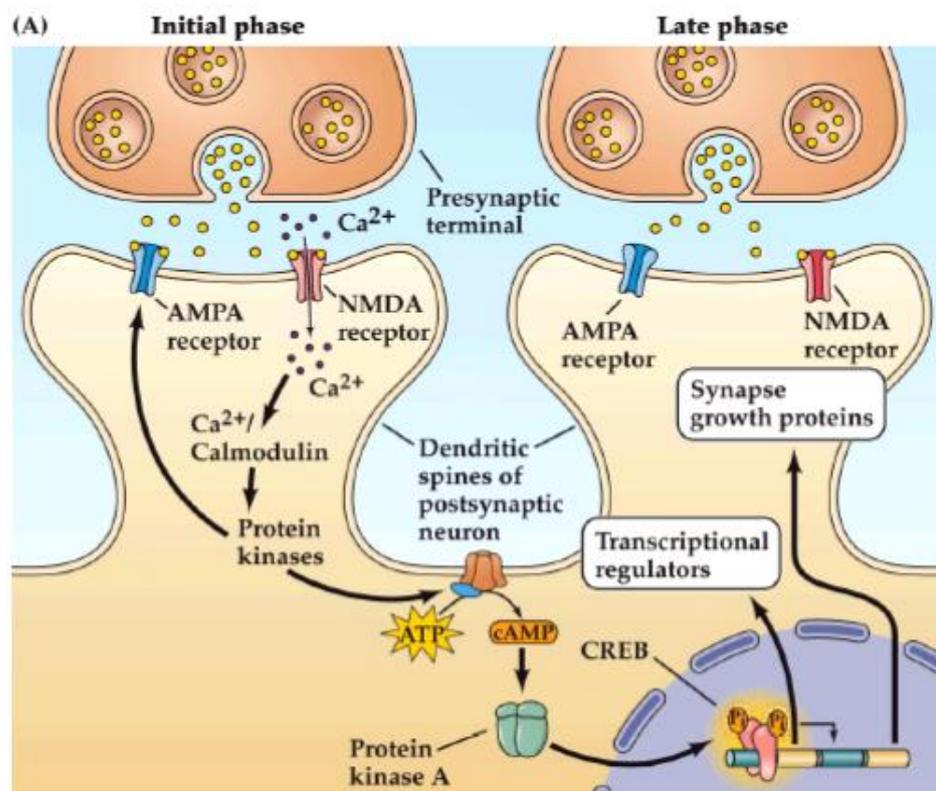


Fig 8: Fasi dell'LTP. (1)

## 2.6. SIRTUINA 1 (SIRT1).

La SIRT1 è una proteina che si può ritrovare sia nel nucleo che nel citoplasma e regola il metabolismo di diversi tessuti e in particolare a livello nervoso ha una funzione neuroprotettiva [62]. SIRT1, come tutti i membri della famiglia delle sirtuine, richiede la nicotinammide adenina dinucleotide ( $\text{NAD}^+$ ), per la sua attività deacetilasi.[63]

La dipendenza di SIRT1 dal  $\text{NAD}^+$ , collega strettamente la sua attività al livello energetico della cellula; essa infatti è indotta sia dalla restrizione calorica sia dall'esercizio fisico [64], ed ha un importante ruolo nella regolazione dell'omeostasi dei lipidi e del glucosio.[64]

Numerose sono le molecole che si è scoperto avere un ruolo nell'attivazione della SIRT1, una di queste molecole attivatorie o STACs (*SIRT1-activating compounds*) è il resveratrolo.

Il resveratrolo (3, 5, 4'-triidrossistilbene) è un polifenolo naturalmente presente in e prodotta da molte piante e una piccola parte può essere trovata anche nell'uva, nel vino rosso e nelle bacche di gelso. [65] Nel 2003 Howitz et al. [65] identificarono il resveratrolo come una piccola molecola in grado di attivare la sirtuina 1, (SIRT1).

Non è chiaro se il resveratrolo attivi direttamente SIRT1, o tramite la proteina chinasi AMP dipendente (AMPK.) [66]

AMPK e SIRT1 hanno entrambi un ruolo cruciale nell'omeostasi energetica e la loro attività è strettamente correlata.

Recenti studi in vitro hanno mostrato gli effetti neuroprotettivi del resveratrolo nei confronti della malattia di Alzheimer, mentre in vivo, iniezioni i.c.v. di resveratrolo per una settimana, in topi, hanno portato ad un incremento della memoria a lungo termine e dell'induzione dell'LTP. Questi effetti venivano meno in topi ko per SIRT1.[67]

Inoltre dimostrarono che, dopo trattamento con resveratrolo in colture di ippocampo, i livelli di miR-134 e 124 erano down regolati, questo associato ad un aumento di BDNF.

Insieme al risultato che la proteina CREB è aumentata nell'ippocampo di topi trattati con resveratrolo, questi dati suggeriscono che il resveratrolo agisce tramite un *pathway* miR-CREB-BDNF, per aumentare la memoria e l'apprendimento e che una dieta ricca di resveratrolo potrebbe avere effetti benefici nel preservare le funzioni cognitive.

## **2.7. Effetti su alterazioni della funzione sinaptica in modelli di malattia di Alzheimer.**

La deposizione di placche amiloidi è una delle principali caratteristiche istopatologiche della malattia di Alzheimer. Esse contengono peptidi derivanti dall'idrolisi parziale della proteina precursore dell'amiloide APP (*Amyloid Precursor Protein*). L'aumento del rilascio di peptidi amiloidogenici in forma solubile è considerato il primo evento nel processo che porta alla formazione di placche nello spazio extracellulare, e particolare il peptide formato da 42 residui amminoacidici,  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ), è considerato il più neurotossico. La malattia può essere inoltre caratterizzata da grovigli neurofibrillari intracellulari formati

dalla proteina iperfosforilata tau, perdita di sinapsi e neurodegenerazione a carico di regioni cerebrali critiche per la memoria.

Gli oligomeri A $\beta$  sono in grado di inibire il fenomeno dell'LTP nell'ippocampo e nella corteccia entorinale, che svolge un ruolo essenziale nei processi cognitivi come memoria e apprendimento ed è una delle aree precocemente interessate dalla patologia Alzheimer [68], [69].

Sono in corso studi condotti da un gruppo di ricerca dell'istituto di Neuroscienze del CNR, che hanno lo scopo di valutare gli effetti protettivi di T<sub>1</sub>AM nei confronti dei deficit sinaptici indotti dal peptide A $\beta$ , sia dopo trattamento esogeno, sia utilizzando il modello murino di AD. Da questi studi sembrerebbe che T<sub>1</sub>AM abbia un ruolo protettivo, revertendo le disfunzioni indotte dal peptide A $\beta$  e questo effetto potrebbe derivare dall'interazione di T<sub>1</sub>AM con i recettori TAARs. [ Origlia, dati non pubblicati].

### 3. Scopo della tesi

Inizialmente abbiamo valutato con test di vitalità cellulare, la risposta delle cellule NG108-15, una linea cellulare mista di neuroblastoma di topo e glioma di ratto, ai trattamenti con dosi differenti di T<sub>1</sub>AM sia a breve (1-2h), sia a lungo termine (24h).

In studi precedenti T<sub>1</sub>AM ha mostrato effetti migliorativi nei confronti dei fenomeni di apprendimento e memoria ed un processo implicato in questi è il potenziamento a lungo termine o LTP.

Utilizzando il nostro modello cellulare di tessuto nervoso abbiamo valutato la variazione dell'espressione, in seguito a trattamento con T<sub>1</sub>AM, delle proteine che costituiscono la via di segnalazione cellulare attivata dopo induzione dell'LTP.

Inoltre, partendo da dati preliminari, che mostrano come T<sub>1</sub>AM sembri revertire l'inibizione indotta dal peptide  $\beta$ -amiloide sul LTP, siamo andati a somministrare T<sub>1</sub>AM a tempi e dosi differenti e in associazione ad esso, il peptide  $\beta$ -amiloide, per verificare l'azione combinata.

Somministrazioni di T<sub>1</sub>AM sono state fatte anche in associazione con varie concentrazioni di resveratrolo, il quale ha funzione di attivatore della sirtuina1 (SIRT1), una deacetilasi implicata nella regolazione dell'espressione genica e con funzioni neuroprotettive.

## **4. Materiali e metodi**

### **4.1 Preparazione e conservazione della T<sub>1</sub>AM**

La T<sub>1</sub>AM è stata disciolta in dimetilsolfossido (DMSO), in modo da ottenere una concentrazione di 10mM. Da questa soluzione stock sono state preparate tutte le altre diluizioni utilizzate. I trattamenti alle cellule sono stati effettuati generalmente con soluzioni di T<sub>1</sub>AM a concentrazioni di 0,1-1-10µM per 4h e 24h.

### **4.2 Colture cellulari**

#### **4.2.1. Cellule e terreni utilizzati**

Per questi studi è stata utilizzata la linea cellulare NG108-15, una linea mista di neuroblastoma di topo e glioma di ratto. È stata scelta questa linea, in quanto rappresentativa non solo della componente propriamente neurale, ma anche dell'insieme di cellule gliali, che danno supporto ai neuroni; quindi si tratta di un modello esemplificativo di una struttura nervosa quasi completa.

Le cellule sono state coltivate all'interno di un incubatore con il 5% di CO<sub>2</sub> ed a una temperatura costante di 37°C. È stato utilizzato un mezzo di crescita specifico DMEM high glucose ( glucosio 4.5mg/ml), addizionato con il 10% (v/v) di FBS, piruvato 1 mM, penicillina 100 U/ml, e streptomina 100 µg/ml. Per il trattamento delle 24h è stato utilizzato lo stesso mezzo addizionato con T<sub>1</sub>AM o DMSO per il controllo. Per il trattamento delle 4h è stato utilizzato un mezzo DMEM base, senza rosofenolo e addizionato con glutammina 4 mM, 0.25 mg/ml di glucosio, 3-idrossibutirrato di sodio 100 µM, sodio piruvato 2 mM, penicillina 100 U/ml, e streptomina 100 µg/ml, in modo da simulare una condizione di digiuno.

#### **4.2.2. Congelamento**

Le cellule vengono staccate dalla plastica della fiasca di coltura che viene poi bloccata con un' aliquota di mezzo addizionato con FBS. Si procede con la conta delle cellule, che vengono poi opportunamente diluite e trasferite in aliquote da 500 µl in apposite cryovials (massimo 1 milione di cellule per cryovial). A questo punto vengono aggiunti 500µl di criomezzo (*Cryoprotective Freezing Medium, Lonza*) per il congelamento e le vials trasferite in isopropanolo a -80°C e successivamente in azoto liquido.

#### **4.2.3. Scongellamento**

Le cellule vengono prelevate dal contenitore dell'azoto liquido ed immediatamente scongelate secondo questa procedura:

la cryovial viene fatta scongelare in bagno a 37°C, dopo di che il contenuto viene trasferito in una falcon da 15ml contenente circa 8ml di terreno di coltura preriscaldato a 37°C.

A questo punto la falcon viene centrifugata a 1000 rpm per 5 minuti; il sovrantante viene aspirato ed il pellet risospeso in 10ml di terreno di coltura caldo ed infine trasferito in una fiasca per colture cellulari. La fiasca viene posta all'interno dell'incubatore.

### **4.3. Saggio di proliferazione cellulare MTT assay**

Il saggio di proliferazione cellulare mediante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) è un metodo per la determinazione del tasso di crescita delle cellule. Questo test si basa sulla riduzione intracellulare dei sali di tetrazolio da parte dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi (SDH) in cristalli di un prodotto di colore bluastro, denominato formazano. La reazione può avvenire solo nelle cellule metabolicamente attive e il valore della densità ottica (OD), ottenuta mediante lettura spettrofotometrica, può essere correlata al quantitativo di cellule vitali presenti.

Le cellule vengono seminate in piastre da 96 pozzetti con una densità compresa fra 5000-10000 cellule per pozzetto e vengono trattate con T<sub>1</sub>AM in un range di concentrazioni tra 0,5 nM e 20 μM, o con T<sub>1</sub>AM (0,1-1-10μM) e β-amiloide (200 nM) e lasciate ad incubare per 24h.

Nel controllo viene aggiunto solo DMSO. Dopo le 24h, una soluzione di MTT (Sigma-Aldrich®) in quantità di 5mg/ml in Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (Sigma-Aldrich®) viene dispensata 10 μl per pozzetto e lasciata incubare 4 ore a 37°C al buio, in quanto molecola fotosensibile.

Al termine delle 4h ai pozzetti vengono aggiunti 100 μl di una soluzione di SDS 100mg/ml, disciolto in HCl 0.01M e le piastre lasciate ad incubare a 37°C per 18 h.

La vitalità cellulare viene determinata mediante misurazione dell'OD a 570 nm utilizzando il lettore ELISA Microplate Reader Model 680 (Bio-Rad®).

#### **4.4. Estrazione proteine totali da cellule trattate**

Inizialmente si prepara la soluzione di lysis buffer (composizione in tabella).

Le cellule vengono seminate in lastre da 6 pozzetti, ad una concentrazione di 300000 cellule per pozzetto; vengono fatti i trattamenti con T<sub>1</sub>AM da solo a varie concentrazioni (0,1-1-10μM) o in associazione con β-amiloide o resveratrolo e lasciate incubare a 37°C per 24 h. A fine trattamento, il mezzo trattato viene aspirato, le lastre vengono lavate rapidamente con 1 ml di PBS per pozzetto e poste a congelare a -80 °C.

Al momento della lisi, le lastre vengono prese dal -80°C e ad ogni pozzetto vengono aggiunti 50μl di lysis buffer. Successivamente le cellule vengono staccate meccanicamente con uno scraper, recuperate e sonicate per trenta secondi circa. Infine l'estratto viene centrifugato per dieci minuti a 14000 rpm in centrifuga refrigerata ed il sovrnatante recuperato e congelato a -80°C.

	<b>Conc finale</b>
Tris-HCl pH 7.5	20mM
NaCl	150mM
EDTA	1mM
Igepal CA630	1%
EGTA	1mM
Na pirofosfato	25mM
3-glicerofosfato	1mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1mM
NaF	20mM
Cocktail inibitori proteasi (Sigma-Aldrich®)	12,5%
PMSF	1mM

**Tabella 1 : Composizione del lysis buffer**

#### **4.5. Quantificazione proteine totali con reagente di Bradford ®**

Si tratta di un metodo colorimetrico basato sull'uso del Coomassie Brilliant BlueG-250 (CBBG) (Bio-Rad®), capace di legarsi alle proteine a livello dei residui di arginina, triptofano, tirosina, istidina e fenilalanina. Tale legame è possibile solo per amminoacidi in forma anionica, con un'assorbanza massima registrabile a 595 nm (blu).

È necessario innanzitutto costruire una retta di taratura concentrazione/assorbanza, preparando degli standard con una proteina purificata a concentrazione nota.

In questo caso è stata usata la BSA (albumina di siero bovino) a concentrazione di 0.93 mg/ml ed i valori di concentrazione per singolo campione incognito sono stati ottenuti per interpolazione.

Dopo aver agitato i campioni ed aver atteso che il reagente si leghi alle proteine estratte, viene misurata l'assorbanza a 595nm mediante uno spettrofotometro (Jask 550-V).

## **4.6 .Western Blot**

### **4.6.1. Elettroforesi e blotting**

Per l'elettroforesi sono stati utilizzati gel precast Bio-Rad<sup>®</sup> di tipo TGX<sup>™</sup>.

Questi gel contengono un peptide alogenato, che, previa attivazione con UV, permette di rivelare le proteine totali sia post elettroforesi (sul gel) che post blottaggio (sulla membrana) mediante fluorescenza.

Questo ci ha consentito sia di valutare l'efficienza del blottaggio, sia di normalizzare i risultati in rapporto al totale delle proteine blottate, evitando di utilizzare una proteina housekeeping.

I campioni vengono inizialmente preparati in modo da ottenere la stessa concentrazione proteica per tutti, effettuando opportune diluizioni con H<sub>2</sub>O poi vengono addizionati con loading buffer (Sigma<sup>®</sup>, Sample Buffer Laemli <sup>™</sup>), quindi vengono posti in un Termomixer (Eppendorf<sup>®</sup>) e lasciati a denaturare a 70°C per 10 minuti. Dopo questo passaggio gli estratti proteici vengono caricati sul gel precast e fatti correre utilizzando una vasca di elettroforesi dedicata ed un alimentatore (Bio-Rad<sup>®</sup> PowerPac<sup>™</sup>) a 200V per 1 ora. Al termine della corsa, l'involucro in plastica del gel viene aperto ed il gel estratto e posto all'interno del transilluminatore (Bio-Rad<sup>®</sup> ChemiDoc<sup>™</sup> XRS<sup>+</sup>) per l'attivazione agli UV. Nel frattempo, si procede all'attivazione della membrana in PVDF per il blottaggio. La procedura consiste in un primo passaggio di 15 secondi in metanolo, un secondo passaggio di circa 2 minuti in H<sub>2</sub>O demineralizzata ed un terzo di 10 minuti in transfer buffer. A questo punto, membrana e gel attivati vengono sistemati all'interno del "sandwich" e messi nella camera di blottaggio dedicata. Il blottaggio viene fatto a 100V per 30 minuti, avendo cura di mantenere sotto controllo la temperatura. Terminato il blottaggio, la membrana viene posta nel transilluminatore per accertarsi che il blottaggio sia avvenuto in modo corretto ed efficiente. Una volta che la membrana è ben asciutta, si può procedere all'incubazione con anticorpi, oppure può essere conservata a -20°C.

#### **4.6.2. Immunorivelazione su membrana PVDF**

L'utilizzo della membrana in PVDF (Millipore® Immobilon-P™) permette di utilizzare un protocollo molto più veloce di quello classicamente utilizzato con le membrane in nitrocellulosa.

Se la membrana in PVDF è congelata, si lascia a temperatura ambiente in modo da farla scongelare ed asciugare dall'eventuale condensa presente. Per velocizzare il passaggio è possibile immergere la membrana in metanolo per 15 secondi.

A questo punto si prepara un'opportuna quantità di una soluzione di low fat milk al 5% in T-TBS allo 0.04% che viene poi aliquotata in falcon. In queste aliquote vengono diluiti l'anticorpo primario ed il secondario, secondo le specifiche del venditore. Una volta asciugata la membrana la si immerge nella soluzione con l'anticorpo primario e si lascia incubare in agitazione per un'ora. Passato questo tempo, si procede con 3 lavaggi in TBS da 10 minuti ciascuno, dopodiché si ricopre la membrana con la soluzione contenente l'anticorpo secondario. Si incuba nuovamente il tutto per 30 minuti mantenendo in agitazione ed al termine si fanno 3 lavaggi con TBS.

Per concludere, si ricopre la membrana con una soluzione di sviluppo (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate Millipore ) e si lascia ad incubare per 5 minuti, per procedere poi all'esposizione ed alla rivelazione in chemiluminescenza (Bio-Rad® ChemiDoc™ XRS<sup>+</sup>).

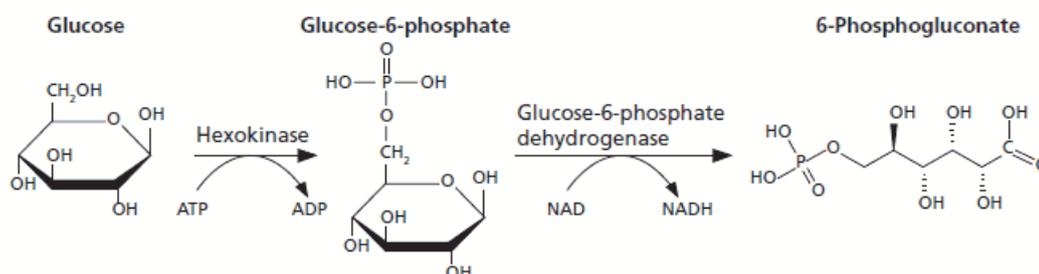
L'immagine acquisita viene analizzata con un software di analisi di immagine dedicato (Bio-Rad® Image Lab™).

### **4.7. Saggi metabolici**

#### **4.7.1. Dosaggio del glucosio**

Per la quantificazione del glucosio presente nel mezzo utilizzato per le colture cellulari, è stato utilizzato un saggio colorimetrico basato su un kit commerciale (Sigma-Aldrich). Tale kit sfrutta la fosforilazione del glucosio a glucosio-6-fosfato (G6P), in una reazione catalizzata dall'enzima esochinasi che richiede la presenza di ATP. Il G6P può essere successivamente ossidato a 6-fosfogluconato

in presenza di  $\text{NAD}^+$  in una reazione catalizzata dall'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (Fig. 9). Durante questa ossidazione, una quantità equimolare di  $\text{NAD}^+$  viene ridotta a  $\text{NADH}$  con conseguente aumento dell'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 340nm che è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio.



**Fig 9: Schema relativo alla reazione sfruttata dal saggio per il dosaggio del glucosio.**

#### 4.7.2. Dosaggio dei corpi chetonici

Il  $\beta$ -idrossibutirrato, noto anche come 3-idrossibutirrato, è un corpo chetonico sintetizzato a livello del fegato dall'ossidazione degli acidi grassi e trasportato ai tessuti periferici per essere utilizzato come fonte energetica.

La formazione dei corpi chetonici, chetogenesi, è elevata quando i livelli plasmatici di glucosio calano. I neuroni si adattano ad utilizzare i corpi chetonici come substrato energetico in condizioni di digiuno prolungato.

Per dosare il  $\beta$ -idrossibutirrato è stato utilizzato il beta-hydroxybutirate assay kit (Sigma-Aldrich). In questo saggio la concentrazione di  $\beta$ -idrossibutirrato è determinata mediante una reazione enzimatica, che porta all'ossidazione del 3-idrossibutirrato ad acetoacetato, catalizzata dall'enzima 3-idrossibutirrato deidrogenasi. In concomitanza il cofattore  $\text{NAD}^+$  è ridotto a  $\text{NADH}$ . Il  $\text{NADH}$  reagisce con un detector colorimetrico, portando alla formazione di un prodotto con un'assorbanza a 450 nm, proporzionale alla quantità di  $\beta$ -idrossibutirrato presente.

## 4.8. Uptake di T<sub>1</sub>AM

Le cellule vengono seminate in piastre da 24 pozzetti e vengono trattate con concentrazioni di T<sub>1</sub>AM pari a 1 e 10  $\mu$ M ed incubate per 0, 60, 240 minuti o 24 h. Il mezzo trattato viene prelevato dai pozzetti ai tempi stabiliti e congelato per essere poi analizzato con un'analisi HPLC/MS/MS. Subito dopo il prelievo del mezzo, il pozzetto viene lavato con 300  $\mu$ l di PBS e la piastra viene congelata a -20°C per essere poi lisata.

Estrazione dei mezzi di coltura: i campioni vengono scongelati da -20°C e viene aggiunto 1 ml di metil-t-butil etere (MTBE) per 500 $\mu$ l di mezzo; si agitano vigorosamente fino alla formazione di un'emulsione e si lasciano separare le due fasi.

Si centrifugano i campioni per separare completamente le due fasi e la fase organica si raccoglie in Eppendorf. Questi passaggi si ripetono per tre volte, poi si evapora l'estratto raccolto sotto flusso di azoto a 40 °C e si stoccano i campioni a secco a -20 °C.

Al momento dell'analisi ogni campione è ricostituito con 100  $\mu$ l di una miscela di metanolo (MeOH)/H<sub>2</sub>O 30:70; si agitano per 10 minuti, si trasferiscono in lastre da 96 pozzetti e si iniettano 10 $\mu$ l.

Lisati: si scongela la piastra, si aggiungono 100  $\mu$ l NaOH 0.1M per pozzetto e si attendono 15 minuti. Si neutralizzano con 10  $\mu$ l di HCl 1M, si aggiungono 300  $\mu$ l di MeOH e si trasferiscono i lisati in Eppendorf. Si centrifugano, si trasferisce il sovrantante in Eppendorf nuove e si evaporano sotto flusso di azoto a 40 °C.

Si congelano i campioni a secco e al momento dell'analisi si ricostituiscono con 100 $\mu$ l di una miscela di MeOH/H<sub>2</sub>O 30:70, si agitano per 10 minuti, si trasferiscono in una lastra da 96 pozzetti e si iniettano 10  $\mu$ l.

La cromatografia con metodo HPLC è eseguita con lo strumento Agilent Infinity 1290, mentre lo spettrometro di massa è SCIEX API 4000 triplo quadrupolo.

## 4.9. Analisi statistica

I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM di almeno 2-3 esperimenti indipendenti. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate tramite ANOVA, con soglia di significatività statistica fissata a P<0.05. Per l'analisi dei dati e

l'elaborazione dei grafici è stato usato il software GraphPad Prism versione 6.0 per Windows ( GraphPad Software, San Diego, CA).

I campioni della spettrometria di massa sono analizzati con il software Analyst 1.6.2. (SCIEX).

# 5. Risultati

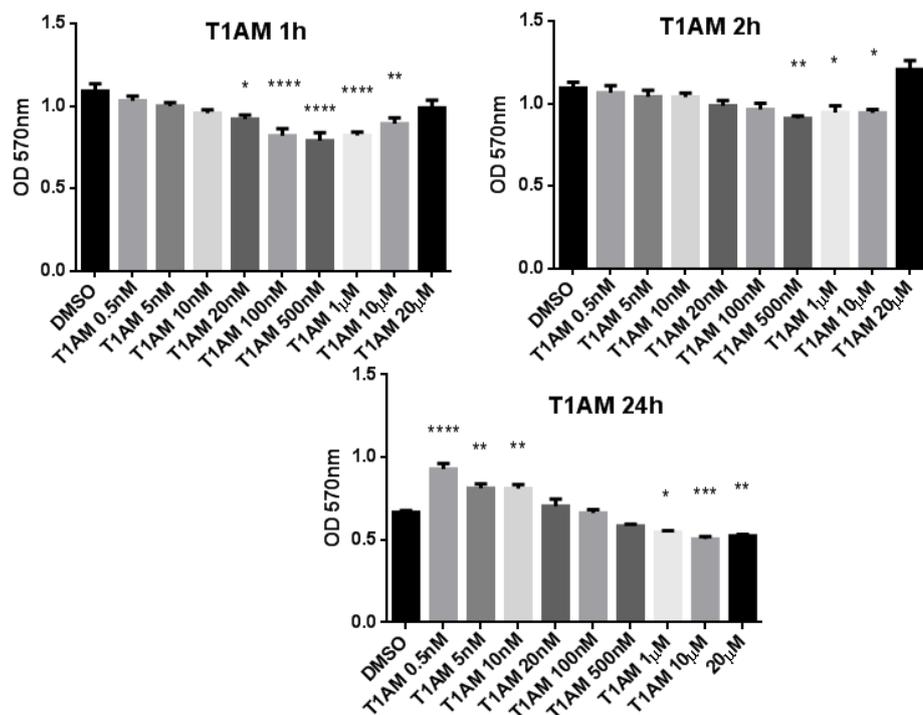
## 5.1. Saggi di vitalità cellulare

È stata valutata mediante il test MTT la variazione nella vitalità cellulare della linea NG108-15 trattata con T<sub>1</sub>AM a tempi brevi (1h-2h) e a tempi più lunghi (24h). (Fig 10)

Dopo 1 h di trattamento con T<sub>1</sub>AM le cellule mostrano una significativa riduzione della loro vitalità a concentrazioni nel range compreso tra 20nM e 10μM.

Dopo 2h le cellule mostrano una riduzione significativa della loro vitalità cellulare a concentrazioni di T<sub>1</sub>AM tra 500nM ed 10μM.

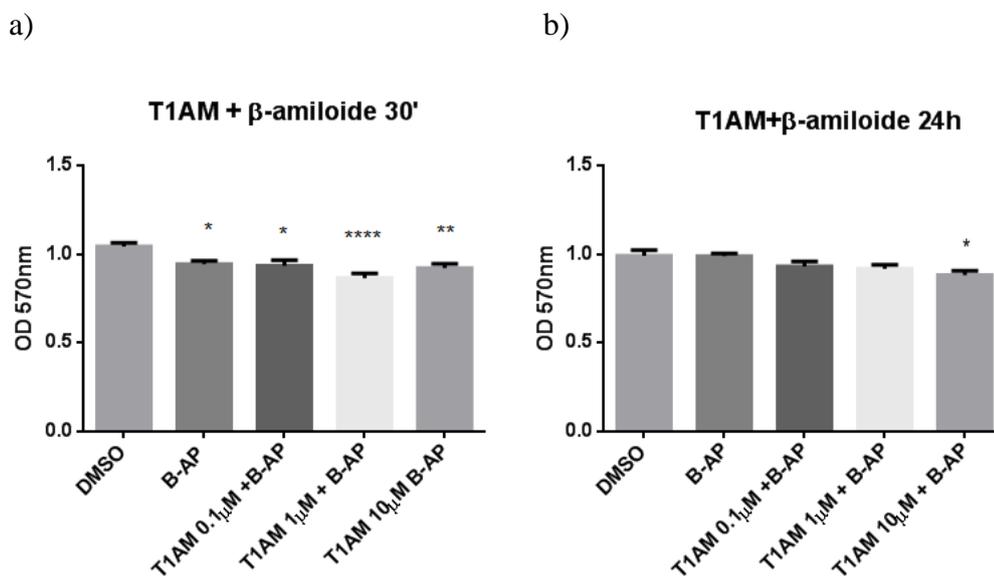
Dopo 24h le cellule hanno mostrato un aumento significativo della vitalità cellulare alle concentrazioni di T<sub>1</sub>AM da 0,5nM a 10nM e una riduzione significativa della vitalità cellulare, alle concentrazioni di T<sub>1</sub>AM da 1 μM a 20μM.



**Fig 10: Variazione nella vitalità cellulare della linea NG108-15, trattata con T<sub>1</sub>AM a tempi di 1h, 2h e 24h.**

(\* indica  $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ); ( n=6-8 per gruppo).

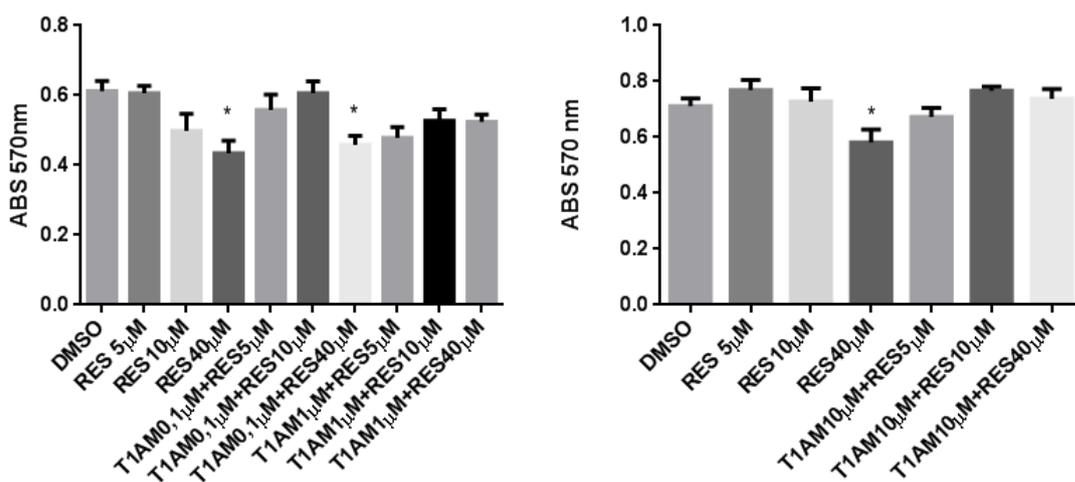
Le cellule sono state in seguito trattate con  $\beta$ -amiloide sia per tempi brevi (30 minuti), sia per tempi più lunghi (24h). Il trattamento è stato ripetuto anche in associazione con T<sub>1</sub>AM, per verificare l'effetto combinato ed è stata valutata la vitalità cellulare. Questa risulta essere ridotta significativamente in presenza della sola  $\beta$ -amiloide e nell'associazione tra essa e T<sub>1</sub>AM dopo 30 minuti di incubazione (Fig.11a), ma non dopo 24 h, dove solo l'associazione con T<sub>1</sub>AM 10  $\mu$ M mostra un significativo effetto citotossico (Fig: 11b).



**Figg 11 (a), (b): Variazione della vitalità cellulare in seguito a trattamenti con T<sub>1</sub>AM e  $\beta$ -amiloide. (\* indica  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ); (n=6-8 per gruppo).**

Infine al trattamento con T<sub>1</sub>AM è stato associato anche quello con il resveratrolo ed è stata valutata la vitalità cellulare. Il resveratrolo 40  $\mu$ M risulta essere citotossico per questa linea cellulare, con una riduzione della vitalità cellulare di circa il 30% rispetto al controllo. L'azione del resveratrolo sembra essere attenuata dalla T<sub>1</sub>AM, ma solo ad alte concentrazioni (1-10  $\mu$ M).

## T1AM e RESVERATROLO

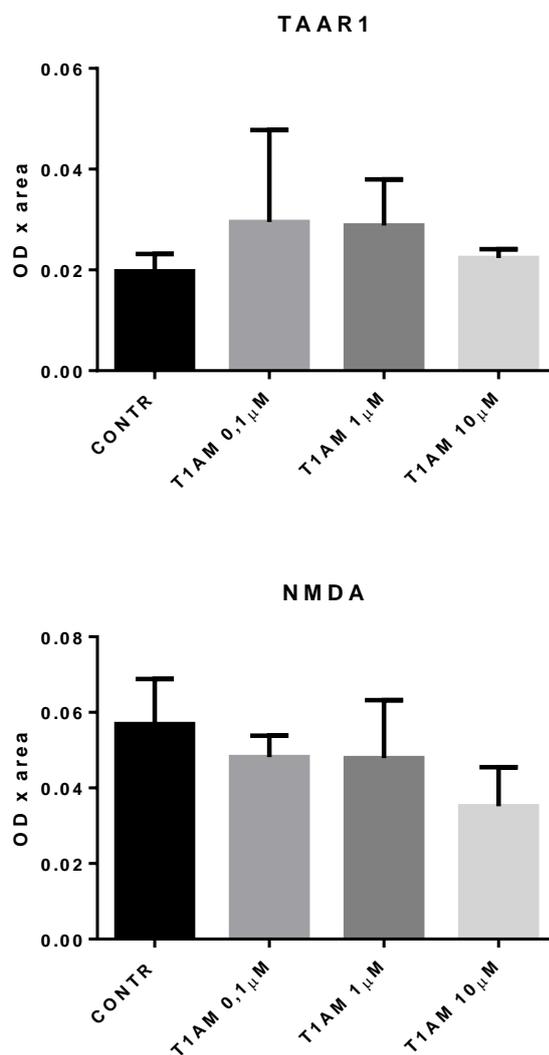


**Fig 12: Variazione della vitalità cellulare in seguito a trattamento con T<sub>1</sub>AM e resveratrolo. (\*p<0,05).**

## 5.2. Western Blot

È stata valutata mediante Western Blot la variazione nell'espressione delle principali proteine che vengono attivate nella via di trasduzione del segnale coinvolta nel potenziamento a lungo termine (LTP), in cellule NG108-15, dopo trattamento con T<sub>1</sub>AM. In base ai risultati dei test di vitalità cellulare, sono state scelte tre concentrazioni rappresentative degli effetti di T<sub>1</sub>AM: 0,1 μM, che non mostra un effetto citotossico, 1 μM e 10 μM, che sono invece concentrazioni che inducono una riduzione della vitalità cellulare.

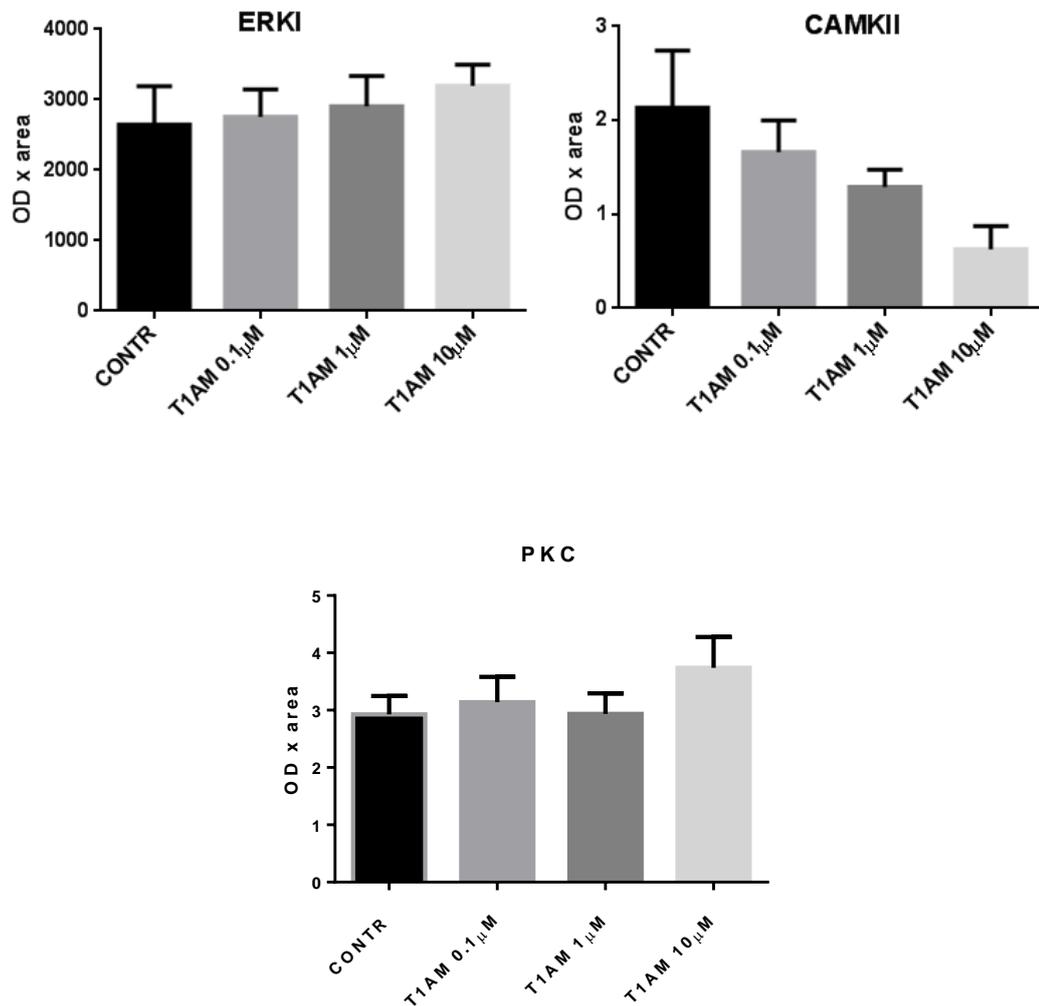
Innanzitutto sono stati caratterizzati a livello qualitativo il principale recettore per il T<sub>1</sub>AM, TAAR1, ed uno dei primi recettori all'inizio della via glutammatergica dell' LTP, il recettore NMDA, le cui espressioni non sono modificate dal trattamento con T<sub>1</sub>AM. ( Fig.13)



**Fig 13: Variazione dell'espressione proteica del recettore TAAR1 e del recettore NMDA in seguito a trattamento con T<sub>1</sub>AM per 24 h. (n=3-4 per gruppo).**

Poi è stata valutata l'espressione delle proteine ERK1, PKC, CaMKII, dopo trattamento con T<sub>1</sub>AM per 4h.

Il trattamento con la T<sub>1</sub>AM per 4h non risulta modificare l'espressione delle tre proteine, anche se si registra una diminuzione non significativa della CaMKII alla concentrazione di T<sub>1</sub>AM 10μM. (Fig.14)

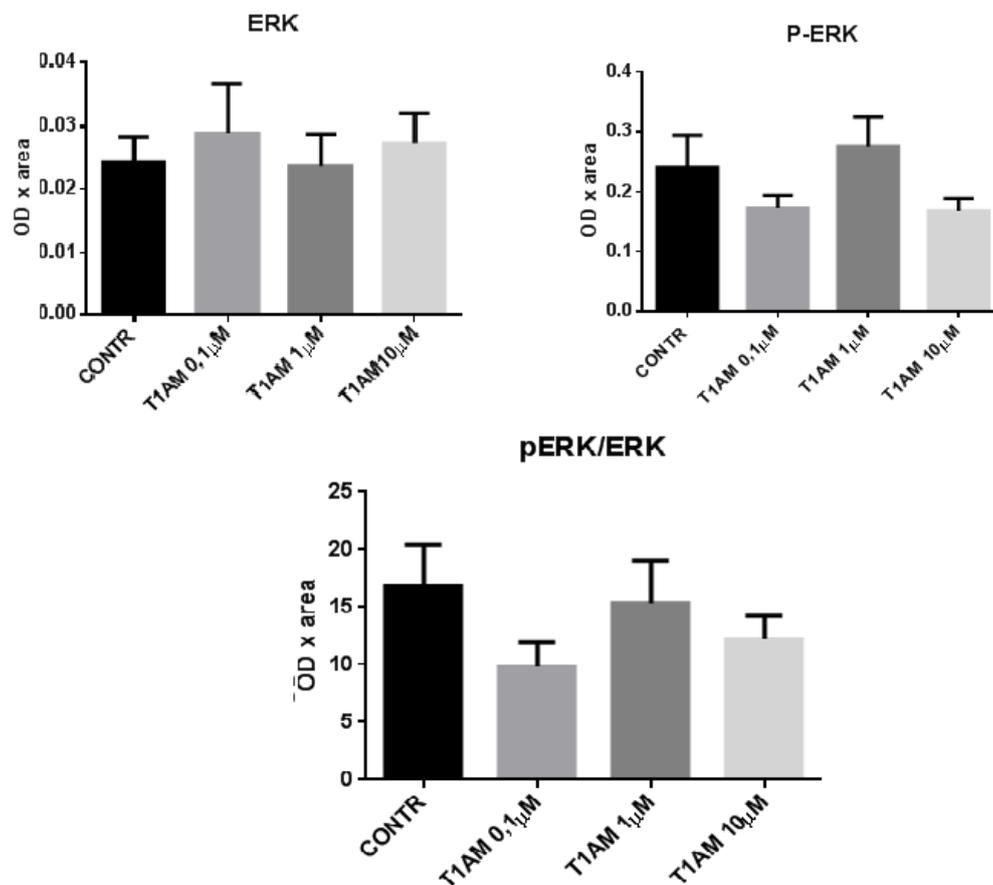


**Fig 14: Variazione dell'espressione proteica delle principali proteine coinvolte nella via del segnale dell'LTP in seguito a trattamento con T<sub>1</sub>AM per 4h.(n=4 per gruppo).**

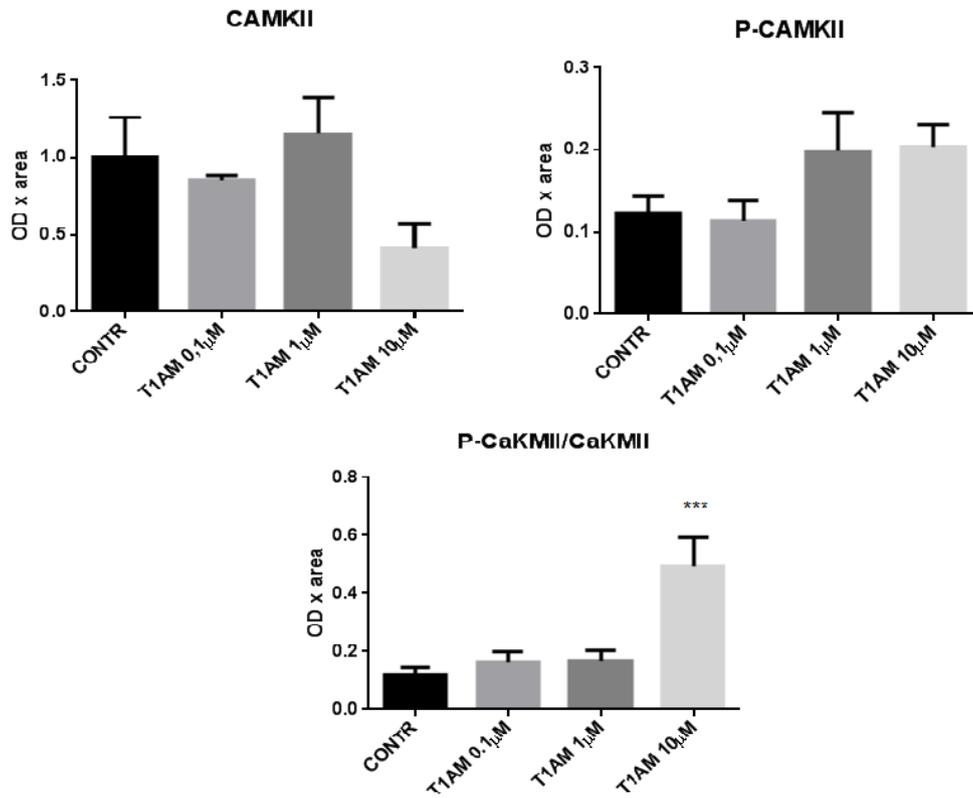
I trattamenti con T<sub>1</sub>AM sono stati ripetuti a 24h e anche in seguito a questi è stata valutata la variazione nell'espressione delle proteine ERK, CaMKII, PKC, SIRT1 e CREB.

Infine è stata analizzata l'attivazione della fosforilazione delle proteine p-ERK e p-CaMKII ed il rapporto tra la forma fosforilata e quella totale.

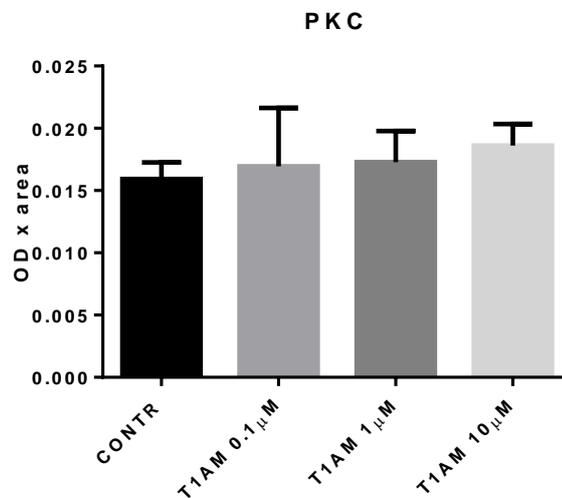
Come mostrato nelle figure 15-16-17, la T<sub>1</sub>AM non altera né l'espressione totale, né la fosforilazione della ERK, a nessuna concentrazione, mentre induce un aumento significativo (4 volte maggiore) della fosforilazione della CaMKII a concentrazioni di T<sub>1</sub>AM 10 μM. La PKC non subisce variazioni.



**Fig 15: Variazione dell'espressione proteica della proteina ERK1 e variazione della fosforilazione. (n=3-4 per gruppo).**

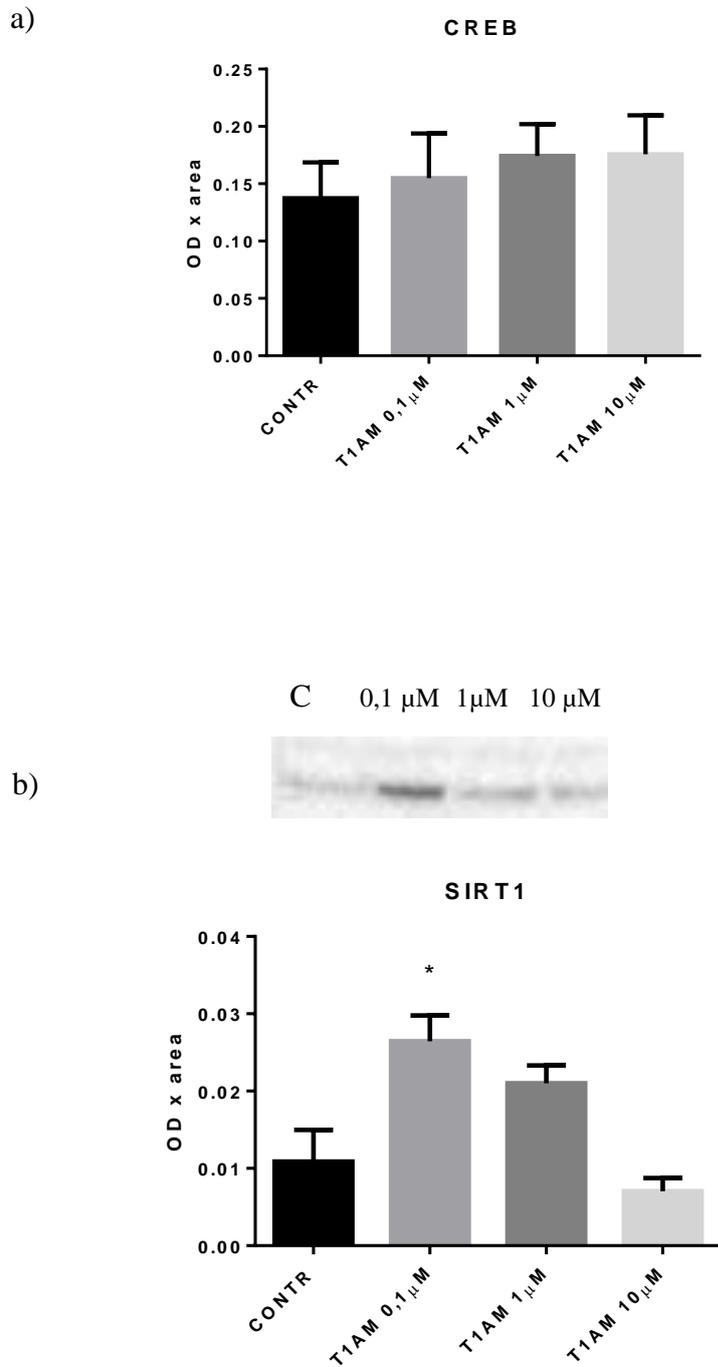


**Fig 16: Variazione dell'espressione della proteina CaMKII e variazione della fosforilazione. (\*\*\*) $p \leq 0,001$ ; n=3-4 per gruppo).**



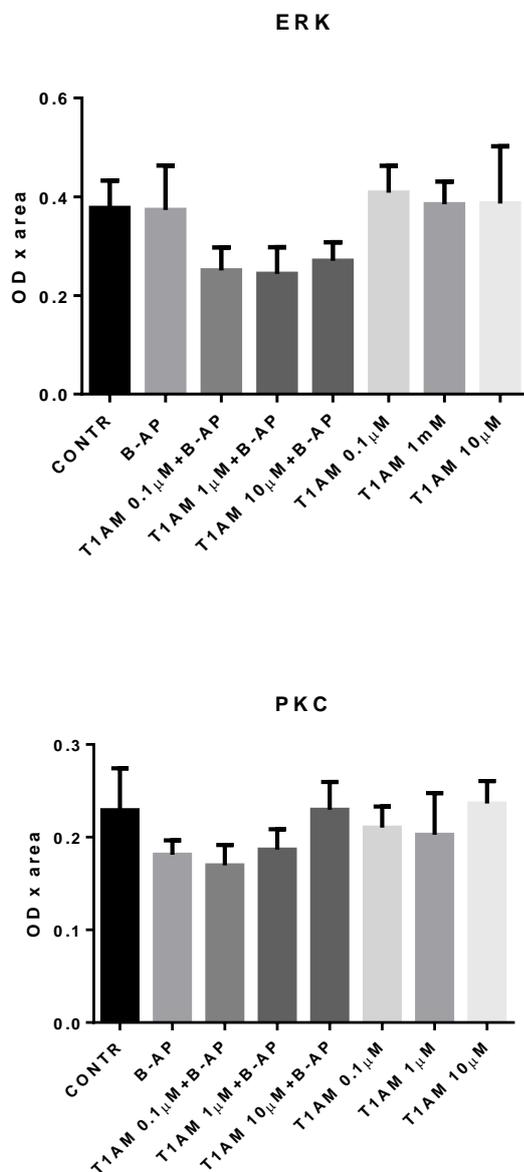
**Fig 17: Variazione dell'espressione della chinasi PKC**

Altre due proteine analizzate, che si attivano a livello nucleare, sono CREB e SIRT1. T<sub>1</sub>AM non modifica l'espressione di CREB, mentre a concentrazione 0,1µM induce un aumento significativo (2 volte maggiore) dell'espressione di SIRT1. (Figg. 18a-18b)



**Fig 18: Variazione della proteina CREB(a) e SIRT1(b). (\*p≤0,05).**

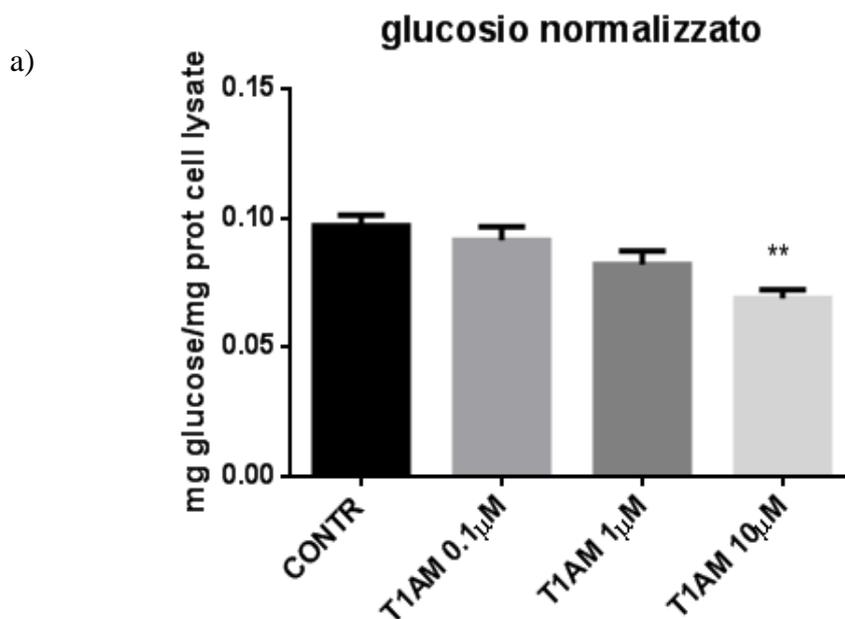
La variazione dell'espressione proteica è stata valutata anche in seguito a trattamenti con T<sub>1</sub>AM in associazione con il peptide  $\beta$ -amiloide. Come mostrato in Fig.19, il trattamento della  $\beta$ -amiloide in associazione con le varie concentrazioni della T<sub>1</sub>AM non induce significative alterazioni dell'espressione delle proteine analizzate.



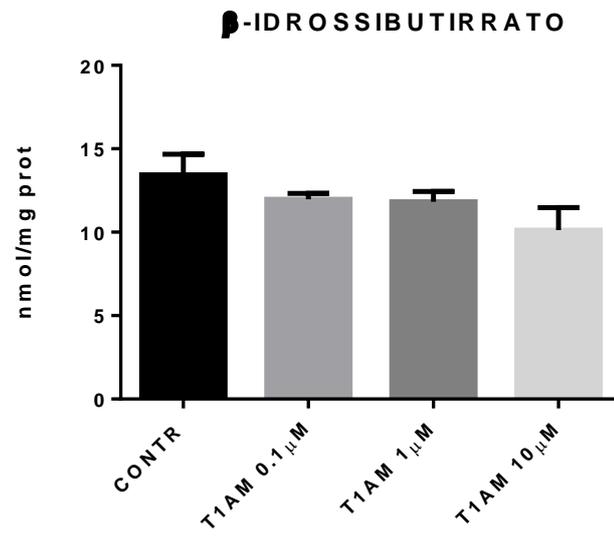
**Fig 19: Variazione dell'espressione delle proteine ERKI e PKC in seguito a trattamento con T<sub>1</sub>AM e  $\beta$ -amiloide. (n=4 per gruppo).**

### 5.3. Saggi metabolici

Vari studi hanno dimostrato che la T<sub>1</sub>AM è in grado di indurre variazioni nel metabolismo energetico. [70] Abbiamo quindi condotto un dosaggio del consumo di alcuni metaboliti energetici come glucosio e  $\beta$ -idrossibutirrato, tra i corpi chetonici quello a concentrazione maggiore nel sangue, da parte delle cellule trattate con T<sub>1</sub>AM, normalizzato con la concentrazione proteica del lisato cellulare. Abbiamo misurato la variazione di concentrazione di glucosio e di  $\beta$ -idrossibutirrato nel mezzo dopo 4 ore di trattamento con la T<sub>1</sub>AM. Come illustrato in Fig.20a, solo dopo il trattamento con T<sub>1</sub>AM 10 $\mu$ M si ottiene una riduzione di circa il 25% di glucosio nel mezzo, indicando un aumento del consumo da parte delle cellule, mentre non si riscontrano variazioni significative della concentrazione di  $\beta$ -idrossibutirrato (Fig. 20b).



b)



**Fig 20: Dosaggio del glucosio (a) e del β-idrossibutirrato (b) presente nel mezzo dopo trattamento con T<sub>1</sub>AM. (\*\* p≤0,01; n=4 per gruppo).**

## 5.4. Uptake T1AM

T1AM	1 $\mu$ M		10 $\mu$ M	
Tempo (h)	mezzo (nM)	lisato (nM)	mezzo(nM)	lisato(nM)
0	1000	0,848141	10000	0,588811
1	3,453056	1,165721	3206,294	0,359441
4	0,275362	17,85759	2,160839	0,648951
24	0,14373	30,24575	1,055944	1,811189

**Tab 2: Valutazione qualitativa della presenza di T<sub>1</sub>AM nel mezzo di coltura delle cellule NG108-15 e nei corrispondenti lisati cellulari dopo vari tempi e varie concentrazioni di trattamento.**

Come mostrato in tabella 2, i trattamenti con T1AM 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M a tempi di 0, 1h, 4h e 24h, portano ad una diminuzione della concentrazione di T<sub>1</sub>AM nel mezzo in cui sono mantenute in coltura le cellule con il trattamento corrispondente, ed un aumento della concentrazione di T<sub>1</sub>AM nei lisati cellulari, da esse derivati.

## 6. Discussione

Nel 2013 Manni et al. hanno dimostrato come la somministrazione di T<sub>1</sub>AM i.c.v. in topi fosse in grado di incrementare le capacità di apprendimento e la curiosità esplorativa. [30].

Un fenomeno alla base dell'apprendimento è il potenziamento a lungo termine (LTP). In questo processo si attiva una via di trasduzione del segnale che vede il coinvolgimento di varie proteine, tra cui il recettore NMDA, le chinasi CaMKII e PKC, la chinasi ERKI e la fosforilazione delle proteine CaMKII ed ERKI.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di indagare gli effetti di T<sub>1</sub>AM sull'espressione di alcune delle principali proteine coinvolte nella via dell'LTP, per valutare potenziali target di T<sub>1</sub>AM in una condizione basale, nell'ottica di verificare in seguito, in un modello più dinamico di tessuto completo, l'attivazione di queste proteine dopo stimolazione ad alta frequenza.

Come modello sperimentale di tessuto nervoso è stata utilizzata la linea cellulare mista di neuroblastoma di topo e glioma di ratto (NG108-15), per cercare di simulare un tessuto nervoso completo, comprendente sia la struttura neuronale vera e propria, sia le cellule gliali di supporto, ed utilizzato inoltre, di recente, come modello di studio esprime la via di trasduzione del segnale associata al processo dell'LTP. [72]

Le indagini sperimentali di questo studio hanno previsto inizialmente test di vitalità cellulare sulle cellule NG108-15 trattate con T<sub>1</sub>AM, per avere un dato preliminare degli effetti di questa molecola sulla cellula in toto.

I tempi di trattamento con T<sub>1</sub>AM per quanto riguarda la vitalità cellulare sono stati di 1-2-24h ed i risultati ottenuti sono stati i seguenti: è stata vista una riduzione significativa della vitalità cellulare dopo 1h di trattamento con T<sub>1</sub>AM a concentrazioni nel range da 20 nM a 10 µM; una riduzione significativa dopo 2h di trattamento con T<sub>1</sub>AM nel range di concentrazioni da 500nM a 10µM; un aumento significativo della vitalità cellulare dopo 24h di trattamento alle concentrazioni di T<sub>1</sub>AM da 0,5nM a 10nM e una riduzione significativa della vitalità cellulare alle concentrazioni di T<sub>1</sub>AM da 1µM a 20µM.

Visti quindi questi dati si può dire che T<sub>1</sub>AM ha un effetto citotossico sulle cellule neuronali di tipo tumorale, principalmente nel range di concentrazione che va da 500nM a 10µM, ma il meccanismo con cui si esplica questa citotossicità non è ancora noto.

In base a questi risultati, per i trattamenti successivi, sono state scelte tre concentrazioni rappresentative degli effetti di T<sub>1</sub>AM: 0,1μM, che non mostra un effetto citotossico, 1 μM e 10 μM, che sono invece concentrazioni che inducono una riduzione significativa della vitalità cellulare.

Gli esperimenti sono poi proseguiti con l'analisi mediante Western blot della variazione dell'espressione delle principali proteine coinvolte nel meccanismo del potenziamento a lungo termine (LTP) e l'attivazione della fosforilazione delle proteine CaMKII ed ERKI.

I trattamenti alle cellule sono stati fatti per tempi di 4 e 24h.

Il trattamento di 4h è stato utilizzato anche per studi metabolici, andando a dosare il consumo di glucosio e di β-idrossibutirrato da parte delle NG108-15, dopo somministrazione di T<sub>1</sub>AM, in quanto studi precedenti svolti in questo laboratorio hanno mostrato che T<sub>1</sub>AM è in grado di indurre variazioni nel metabolismo energetico [70].

I risultati, normalizzati con la concentrazione proteica del lisato cellulare, mostrano come, dopo 4h di trattamento con T<sub>1</sub>AM, solo a 10μM si ottiene una riduzione di circa il 25% di glucosio nel mezzo, indicando un aumento del consumo da parte delle cellule, mentre non si riscontrano variazioni significative della concentrazione di β-idrossibutirrato.

I risultati delle 4h inoltre, mostrano come il trattamento con T<sub>1</sub>AM non modifica l'espressione delle tre proteine ERKI, CaMKII e PKC, anche se si registra una diminuzione non significativa della CaMKII a concentrazione di T<sub>1</sub>AM 10μM.

La variazione dell'espressione è stata valutata anche in seguito a trattamenti con T<sub>1</sub>AM alle stesse concentrazioni, per un tempo di 24h.

Innanzitutto, per caratterizzare la linea cellulare, sono state valutate le espressioni del recettore del T<sub>1</sub>AM, TAAR1, e del recettore per il glutammato NMDA, che è coinvolto inizialmente nella via di segnalazione dell'LTP: il trattamento con T<sub>1</sub>AM non altera la loro espressione alle concentrazioni utilizzate.

Poi sono state valutate le proteine ERKI, p-ERKI ed il rapporto p-ERK/ERK, la CaMKII, p-CaMKII e il rapporto p-CaMKII/CaMKII e la proteina PKC.

I risultati ottenuti mostrano come T<sub>1</sub>AM a concentrazione 10μM induca un aumento di circa 4 volte rispetto al controllo, della fosforilazione della proteina CaMKII, mentre non si notano alterazioni né nella fosforilazione né nell'espressione totale della ERKI, così come della PKC.

L'aumento della fosforilazione della CaMKII potrebbe inoltre essere dovuto ad un aumento dell'autofosforilazione dell'enzima, un processo che è indipendente dall'aumento dei livelli del Ca<sup>2+</sup> ed è una forma di memoria molecolare, in quanto si mantiene anche dopo che i livelli di Ca<sup>2+</sup> diminuiscono.

Passando ad un'analisi di espressione di proteine che sono attive a livello nucleare, T<sub>1</sub>AM non influenza l'espressione di CREB, mentre a concentrazione 0,1µM induce un aumento significativo (2 volte maggiore rispetto al controllo) dell'espressione di SIRT1. Questa proteina è stata dimostrata avere un ruolo importante nello sviluppo della plasticità sinaptica e nel potenziamento a lungo termine. [71]

I trattamenti con T<sub>1</sub>AM sono stati fatti anche in associazione con il peptide β-amiloide, poiché dati preliminari di studi fisiologici hanno mostrato che T<sub>1</sub>AM ad una concentrazione 5µM sembrerebbe revertire l'effetto negativo esercitato dalla β-amiloide 200nM sull'LTP [Origlia et al, dati non pubblicati].

I risultati del saggio di vitalità cellulare mostrano una riduzione significativa della vitalità in presenza della sola β-amiloide e nell'associazione tra essa e T<sub>1</sub>AM dopo 30 minuti di incubazione, ma non dopo 24 h, dove solo l'associazione con T<sub>1</sub>AM 10 µM mostra un effetto citotossico.

Per quanto riguarda l'analisi dell'espressione proteica, il trattamento con la β-amiloide in associazione con le varie concentrazioni della T<sub>1</sub>AM, non induce significative alterazioni dell'espressione delle proteine analizzate (ERK e PKC).

I risultati da noi ottenuti si discostano dagli esperimenti preliminari, che sono stati condotti su fettine di corteccia entorinale di topo, un modello sperimentale diverso da quello utilizzato in questo lavoro di tesi.

All'inizio degli esperimenti inoltre, non si avevano dati in letteratura per quanto riguarda trattamenti con il peptide β-amiloide su questo modello cellulare.

Recentemente invece, è stato pubblicato un articolo in cui vengono fatti studi con le cellule NG108-15, [72] che vengono trattate con una quantità 50 volte maggiore di β-amiloide rispetto a quella utilizzata per questa tesi, per 12 o 24h, per ottenere il modello del morbo di Alzheimer (AD model).

Una prospettiva futura è quindi quella di ripetere gli esperimenti con questa maggiore concentrazione di β-amiloide.

Inoltre è stato notato che il trattamento con T<sub>1</sub>AM di colture neuronali di feto di topo, induce un aumento dell'espressione genica di EPHB2, un recettore dell'efrina espresso a livello post sinaptico e collegato alla via di trasduzione del segnale attivata nell'LTP (Accorroni et al, dati non pubblicati).

Nel morbo di Alzheimer l'espressione di questo recettore è fortemente sottoespressa, mentre nelle cellule NG108-15 è sovraespresso [73], portando ad una possibile giustificazione della loro resistenza al trattamento con basse concentrazioni di β-amiloide.

Sono stati iniziati esperimenti con il resveratrolo, dato che alcuni studi lo hanno indicato come una piccola molecola in grado di attivare SIRT1, una deacetilasi e che ha un ruolo neuroprotettivo. Per ora è stata valutata solo la vitalità cellulare in

seguito a trattamento con T<sub>1</sub>AM e resveratrolo, ed è stato visto che il resveratrolo a concentrazione 40µM da solo o in associazione con T<sub>1</sub>AM (in particolare con la concentrazione 0,1µM), risulta essere citotossico per questa linea cellulare, con una riduzione della vitalità cellulare di circa il 30% rispetto al controllo.

Infine, per quanto riguarda i risultati dell'uptake di T<sub>1</sub>AM da parte delle cellule, si vede una diminuzione progressiva della concentrazione di T<sub>1</sub>AM nel mezzo di coltura, dopo aver applicato i trattamenti con T<sub>1</sub>AM a concentrazioni di 1 µM e 10µM, per tempi da 0 a 24h, ed un aumento invece di questa concentrazione nei corrispondenti lisati cellulari.

In conclusione, in questa linea di cellule tumorali è stato visto che T<sub>1</sub>AM influenza la via coinvolta nel potenziamento a lungo termine (LTP), agendo in particolare sulle proteine CaMKII e SIRT1, aumentandone rispettivamente la fosforilazione e l'espressione.

Quindi la caratterizzazione molecolare e biochimica di come T<sub>1</sub>AM influenzi la via di segnalazione coinvolta nell'LTP in un modello cellulare non sottoposto a stimolazione, permette di trasferire questi stessi studi a livello di tessuto, quindi in una condizione più fisiologica, in modo da poter indurre l'LTP mediante stimolazione ad alta frequenza.

Un obiettivo futuro è quello di indagare l'azione di T<sub>1</sub>AM anche su altre proteine che sono attive in questa via di trasduzione del segnale, quali ad esempio la proteina chinasi A (PKA), fosfatasi che abbiano come substrato la p-CaMKII, proteine attive a livello nucleare quali il p-CREB, ed il recettore EPHB2 implicato in numerosi processi di sviluppo, tra cui la plasticità sinaptica, attraverso la modulazione del recettore del glutammato NMDA [73].

Ci si prospetta inoltre di ripetere i vari trattamenti utilizzando mezzi di coltura "base", meno arricchiti, adoperati per i saggi metabolici, contenenti quantità di glucosio inferiori rispetto al mezzo di crescita classico, in modo da valutare se il passaggio da un mezzo ricco di glucosio ad uno con una quantità minore possa causare uno stress a livello cellulare, stress che possa ripercuotersi sull'espressione proteica.

## 7. Bibliografia e sitografia

- [1] K. Tomita and H. A. Lardy, "Synthesis and biological activity of some triiodinated analogues of thyroxine.," *J. Biol. Chem.*, vol. 219, no. 2, pp. 595–604, 1956.
- [2] T. S. Scanlan, K. L. Suchland, M. E. Hart, G. Chiellini, Y. Huang, P. J. Kruzich, S. Frascarelli, D. A. Crossley, J. R. Bunzow, S. Ronca-Testoni, E. T. Lin, D. Hatton, R. Zucchi, and D. K. Grandy, "3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone.," *Nat. Med.*, vol. 10, no. 6, pp. 638–42, 2004.
- [3] R. Zucchi, S. Ghelardoni, G. Chiellini "Cardiac Functional Effects of 3-iodothyronamine, a New Endogenous Thyroid Hormone Derivative.," Chapter *Thyroid and Heart Failure*, pp 55-65, 2009.
- [4] S. Piehl, C. S. Hoefig, T. S. Scanlan, J. Ko: "Thyronamines—Past, Present, and Future." , *Endocrine Reviews*, vol. 32, pp. 64–80, 2011.
- [5] S. Hoefig et al: "Biosynthesis of 3-Iodothyronamine From T4 in Murine Intestinal Tissue." , *Endocrinology*, v:156, issue 11, 2015.
- [6] J. Köhrle, "Iodothyronine deiodinases.," *Methods Enzymol.*, vol. 347, no. 1998, pp. 125–167, 2002.
- [7] S. Piehl, T. Heberer, G. Balizs, T. S. Scanlan, R. Smits, B. Koksche, and J. Köhrle, "Thyronamines are isozyme-specific substrates of deiodinases.," *Endocrinology*, vol. 149, no. 6, pp. 3037–45, 2008.
- [8] C. a Pietsch, T. S. Scanlan, and R. J. Anderson, "Thyronamines are substrates for human liver sulfotransferases.," *Endocrinology*, vol. 148, no. 4, pp. 1921–7, 2007.
- [9] A. Saba, G. Chiellini, S. Frascarelli, M. Marchini, S. Ghelardoni, A. Raffaelli, M. Tonacchera, P. Vitti, T. S. Scanlan, and R. Zucchi, "Tissue distribution and cardiac metabolism of 3-iodothyronamine.," *Endocrinology*, vol. 151, no. 10, pp. 5063–5073, 2010.
- [10] G. Chiellini, S. Frascarelli, S. Ghelardoni, V. Carnicelli, S. C. Tobias, A. DeBarber, S. Brogioni, S. Ronca-Testoni, E. Cerbai, D. K. Grandy, T. S. Scanlan, and R. Zucchi, *Thyroid and Heart Failure*, vol. 21, no. 7. Milano: Springer Milan, pp: 1597–608, 2009.

- [11] W. J. L. Wood, T. Geraci, A. Nilsen, A. E. DeBarber, and T. S. Scanlan, "Iodothyronamines are oxidatively deaminated to iodothyroacetic acids in vivo.," *Chembiochem A Eur. J. Chem. Biol.*, vol. 10, no. 2, pp. 361–365, 2009.
- [12] A. Mortoglou and H. Candiloros, "The serum triiodothyronamine to thyroxine (T3/T4) ratio in various thyroid disorders and after levothyroxine replacement therapy.," *Hormones*, vol. 3, no. 2, pp. 120–126, 2004.
- [13] T. Meyer and R.-D. Hesch, "Triiodothyronamine: a badrenergic metabolite of triiodothyronine?," *Horm Metab Res*, vol. 15, no. 1, pp. 602–606, 1983.
- [14] T. S. Scanlan, K. L. Suchland, M. E. Hart, G. Chiellini, Y. Huang, P. J. Kruzich, S. Frascarelli, D. A. Crossley, J. R. Bunzow, S. Ronca-Testoni, E. T. Lin, D. Hatton, R. Zucchi, and D. K. Grandy, "3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone.," *Nat. Med.*, vol. 10, no. 6, pp. 638–642, 2004.
- [15] D. K. Grandy, "Trace amine-associated receptor 1-Family archetype or iconoclast?," *Pharmacol. Ther.*, vol. 116, no. 3, pp. 355–390, 2007.
- [16] L. Lindemann, M. Ebeling, N. A. Kratochwil, J. R. Bunzow, D. K. Grandy, and M. C. Hoener, "Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors.," *Genomics*, vol. 85, no. 3, pp. 372–385, 2005.
- [17] R. Zucchi, G. Chiellini, T. S. Scanlan, and D. K. Grandy, "Trace amine-associated receptors and their ligands," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 149, no. 8, pp. 967–978, 2006.
- [18] G. Chiellini, S. Frascarelli, S. Ghelardoni, V. Carnicelli, S. C. Tobias, A. DeBarber, S. Brogioni, S. Ronca-Testoni, E. Cerbai, D. K. Grandy, T. S. Scanlan, and R. Zucchi, "Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function.," *FASEB J.*, vol. 21, no. 7, pp. 1597–608, 2007.
- [19] L. J. Braulke, M. Klingenspor, a DeBarber, S. C. Tobias, D. K. Grandy, T. S. Scanlan, and G. Heldmaier, "3-Iodothyronamine: a novel hormone controlling the balance between glucose and lipid utilisation.," *J. Comp. Physiol. B.*, vol. 178, no. 2, pp. 167–77, Feb. 2008.
- [20] C. S. Hoefig, J. Köhrle, G. Brabant, K. Dixit, B. Yap, C. J. Strasburger, and Z. Wu, "Evidence for extrathyroidal formation of 3-iodothyronamine in humans as provided by a novel monoclonal antibody-based chemiluminescent serum immunoassay.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, no. 6, pp. 1864–72, 2011.
- [21] S. A. Hackenmueller, M. Marchini, A. Saba, R. Zucchi, and T. S. Scanlan "Biosynthesis of 3-Iodothyronamine (T1AM) Is Dependent on the Sodium-Iodide Symporter and Thyroperoxidase but Does Not Involve Extrathyroidal Metabolism of T4" *Endocrinology*, vol. 153, pp. 5659–5667, 2012.

- [22] A. G. Ianculescu, K. M. Giacomini, and T. S. Scanlan, "Identification and characterization of 3-iodothyronamine intracellular transport.," *Endocrinology*, vol. 150, no. 4, pp. 1991–1999, 2009.
- [23] G. Roy, E. Placzek, and T. S. Scanlan, "ApoB-100-containing lipoproteins are major carriers of 3-iodothyronamine in circulation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 3, pp. 1790–800, 2012.
- [24] V. Cody, T. Meyer, K. D. Dohler, R. D. Hesch, H. RoKO, and M. MarKO, "Molecular structure and biochemical activity of 3,5,3'-triiodothyronamine.," *Endocr. Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 91–99, 1984.
- [25] J. B. Regard, H. Kataoka, D. A. Cano, E. Camerer, L. Yin, Y. Zheng, T. S. Scanlan, M. Hebrok, and S. R. Coughlin, "Probing cell type-specific functions of Gi in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion.," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 12, pp. 4034–43, 2007.
- [26] A. G. Ianculescu and T. S. Scanlan, "3-Iodothyronamine (T(1)AM): a new chapter of thyroid hormone endocrinology?," *Mol. Biosyst.*, vol. 6, no. 8, pp. 1338–44, 2010.
- [27] A. N. Snead, M. S. Santos, R. P. Seal, M. Miyakawa, R. H. Edwards, and T. S. Scanlan, "Thyronamines inhibit plasma membrane and vesicular monoamine transport.," *ACS Chem. Biol.*, vol. 2, no. 6, pp. 390–8, 2007.
- [28] K. P. Doyle, K. L. Suchland, T. M. P. Ciesielski, N. S. Lessov, D. K. Grandy, T. S. Scanlan, and M. P. Stenzel-Poore, "Novel thyroxine derivatives, thyronamine and 3-iodothyronamine, induce transient hypothermia and marked neuroprotection against stroke injury.," *Stroke.*, vol. 38, no. 9, pp. 2569–76, 2007.
- [29] H.S. Gompf, J.H. Greenberg, G. Aston-Jones, A.G. Ianculescu, T.S. Scanlan, M. B. Dratman, "3-Monoiodothyronamine: The rationale for its action as an endogenous adrenergic-blocking neuromodulator.," *Brain Research.*, vol. 1351, pp: 130-140, 2010.
- [30] M. Manni, G. De Siena, A. Saba et al., "Pharmacological effects of 3-iodothyronamine (T1AM) in mice include facilitation of memory acquisition and retention and reduction of pain threshold.," *British Journal of Pharmacology*, vol. 168, pp.354-362, 2013.
- [31] M. A. Lynch, " Long-Term Potentiation and Memory.," *Physiological Reviews.*, vol. 84, n. 1, pp.87-136, 2004.
- [32] D.S. Reddy: " Preclinical and clinical behavioral paradigms for testing drugs that affect learning and memory processes.," *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 20 (3), pg 249, 1998.
- [33] SM.O'Mara, S.Commins, and M. Anderson, " Synaptic plasticity in the hippocampal area CA1-subiculum projection: implications for theories of memory". , *Hippocampus* vol 10: 447–456, 2000.

- [34]F. Schenk and RG.Morris: “Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions”. *Exp Brain Res* 58, pp:11–28, 1985.
- [35] TV Bliss and T.Lomo : “Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path”. *J Physiol* 232, pp331–356, 1973.
- [36] TV.Bliss and GL.Collingridge: “ A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus”. *Nature* 361,pp: 31–39, 1993.
- [37] YJ .Greenstein ,C. Pavlides, and J. Winson: “Long-term potentiation in the dentate gyrus is preferentially induced at theta rhythm periodicity”. *Brain Res* 438 pp: 331–334, 1988
- [38] RG.Morris, E. Anderson, GS. Lynch ,and M Baudry: “ Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an *N*-methyl-d-aspartate receptor antagonist, AP5.”, *Nature* 319, pp: 774–776, 1986.
- [39] P. Ascher and L. Nowak : “A patch-clamp study of excitatory amino acid activated channels.”, *Adv Exp Med Biol* 203,pp: 507–511, 1986.
- [40]S. Maren: “ Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory.”, *Trends Neurosci* 22, pp: 561–567, 1999.
- [41]MF. Bear, A. Kleinschmidt ,QA. Gu , and W. Singer: “ Disruption of experience-dependent synaptic modifications in striate cortex by infusion of an NMDA receptor antagonist.”, *J Neurosci* 10, pp: 909–925, 1990
- [42] A.A.Kritis , E.G.Stamoula , K.A.Paniskaki and T.D.Vavilis: “Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study.”, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9:91. doi: 10.3389/fncel.2015.00091, 2015.
- [43]N. McGuinness , R. Anwyl , and M. Rowan: “ *Trans*-ACPD enhances long-term potentiation in the hippocampus.”, *Eur J Pharmacol* 197, pp: 231–232, 1991.
- [44]SN. Davies, RA.Lester, KG. Reymann, and GL.Collingridge: “ Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation.” *Nature* 338, pp: 500–503, 1989
- [45]JT.Isaac, RA. Nicoll, and RC. Malenka: “ Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP.” *Neuron* 15, pp: 427–434, 1995.
- [46]D. Liao, NA. Hessler , and R. Malinow : “Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice.” *Nature* 375, pp: 400–404, 1995.

- [47] RG. Morris , E. Anderson, GS. Lynch , and M. Baudry : “Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an *N*-methyl-d-aspartate receptor antagonist, AP5.”, *Nature* 319, pp: 774–776, 1986.
- [48] JZ. Tsien , PT. Huerta , and S. Tonegawa : “ The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory.”, *Cell* 87, pp: 1327–1338, 1996.
- [49] Y.Huang and ER.Kandel: “Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization.” *Learn Mem* , pp: 174–82, 1994.
- [50] J. Lisman, R. Yasuda and S. Raghavachari: “ Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation” , *Nature Reviews Neuroscience*, 13, pp: 169-182, 2012.
- [51] AJ. Silva , CF. Stevens , S. Tonegawa , and Y. Wang : “ Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice.” *Science* 257, pp: 201–206, 1992.
- [52] D. Purves *Neuroscience*, capitolo 7 , ed...seconda edizione, 2001.
- [53] S. Impey , K. Obrietan , ST. Wong , S. Poser , S. Yano , G. Wayman , JC. Deloulme , G. Chan , and DR. Storm: “Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation.” *Neuron* 21, pp: 869–883, 1998.
- [54] S. Peng, Y. Zhang, J. Zhang, H. Wang and B. Ren,: “ERK in Learning and Memory: A Review of Recent Research.”, *Int. J. Mol. Sci.*, 11, pp:222-232, 2010.
- [55] M.Jones, PJ. French, TV. Bliss, and K. Rosenblum : “ Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo.” , *J Neurosci* 19, RC36, 1999.
- [56] G. Di Cristo, N. Berardi, L. Cancedda, T.Pizzorusso , E.Putignano,GM. Ratto, and L. Maffei: “Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity.”, *Science*, 292, pp: 2337–2340, 2001.
- [57] R.Walz, R. Roesler, J. Quevedo , MK. Sant'Anna, M. Madruga, C. Rodrigues, C. Gottfried , JH. Medina , and I. Izquierdo: “ Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical and limbic structures.” *Neurobiol Learn Mem* ,73, pp: 11–20, 2000
- [58] R. Bourtchuladze, B. Frenguelli, J. Blendy , D. Cioffi , G. Schutz, and AJ. Silva: “ Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein.” *Cell* 79, pp: 59–68, 1994.
- [59] S.Impey , K. Obrietan, ST. Wong , S. Poser , S.Yano , G. Wayman, JC.Deloulme , G.Chan , and DR. Storm: “Cross talk between ERK and PKA is

required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation.” *Neuron*, 21, pp: 869–883, 1998.

[60] MA.Gooney et al: “Long-term potentiation and spatial learning are associated with increased phosphorylation of TrKB and extracellular signal regulated kinase (ERK) in dentate gyrus: evidence for a role for brain-derived neurotrophic factor.”, *Behav. Neurosci*, 116, pp:455-463, 2002.

[61] DD.Murphy and M.Segal: “ Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein.” *Proc Natl Acad Sci USA* ,94, pp: 1482–1487, 1997.

[62] D. Kim et al: “SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis.”, *The EMBO Journal*, 26, pp: 3169-3179, 2007. [63] A.A. Sauve, C. Wolberger, V.L. Schramm, J.D. Boeke: “ The biochemistry of sirtuins.”, *Annu. Rev. Biochem.*, 75, pp: 435–465, 2006.

[63] A.A. Sauve, C. Wolberger, V.L. Schramm, J.D. Boeke: “ The biochemistry of sirtuins.”, *Annu. Rev. Biochem.*, 75, pp: 435–465, 2006.

[64] J. Yu, J. Auwerx: “ The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis.”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173 (Suppl. 1), pp: E10–E19,2009.

[65] K.T. Howitz, K.J. Bitterman, H.Y. Cohen, D.W. Lamming, S. Lavu, J.G. Wood, R.E. Zipkin, P. Chung, A. Kisielewski, L.L. Zhang, et al.: “ Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan”., *Nature* 425, pp: 191–196, 2003.

[66] N.B. Ruderman, X.J. Xu, L. Nelson, J.M. Cacicedo, A.K. Saha, F. Lan, Y. Ido: “AMPK and SIRT1: a long-standing partnership?”, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, pp: E751–E760, 2010.

[67] Y.N. Zhao et al: “ Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway.”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435, pp: 597-602, 2013.

[68] H.Braak, E. Braak: “Neuropathological staging of Alzheimer-related changes.”, *Acta Neuropathol.*, 82(4), pp: 239-59, 1991.

[69] I. Alafuzoff et al: “Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the BrainNet Europe Consortium.” *BrainPathol.*, 18(4), pp:484-96, 2008.

[70]S. Ghelardoni et al: “Uptake and metabolic effects of 3-iodothyronamine in hepatocytes”, *Journal of Endocrinology*, 221, pp: 101-110, 2014.

[71] J.Gao et al: “A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134” , *Nature*, 466(7310), pp: 1105–1109, 2010.

[72] Si-jun Liu et al: “Neuroprotective effect of  $\beta$ -asarone against Alzheimer’s disease: regulation of synaptic plasticity by increased expression of SYP and GluR1” , *Drug Design, Development and Therapy* ,10, pp: 1461–1469, 2016

[73] P. D. Pozniak et al: “TNF- $\alpha$ /NF-Kb Signaling in the CNS: Possible Connection to EPHB2”, *J Neuroimmune Pharmacol*, 9, pp: 133-141, 2014.

## **SITOGRAFIA**

(1) <http://bigtone.zone/home/wp-content/uploads/2013/12/ltp.png>

## RINGRAZIAMENTI

*Questo lavoro di tesi è stato svolto presso il Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica. Desidero ringraziare il Professor Riccardo Zucchi, per avermi accolta nel suo laboratorio e per avermi dato l'opportunità di conoscere da vicino l'affascinante mondo della ricerca.*

*Ringrazio di cuore la mia relatrice, la Dott.ssa Sandra Ghelardoni, per essermi stata sempre accanto, per avermi ascoltato ed insegnato con professionalità e pazienza e per essere l'esempio lampante che si può essere dei "grandi" senza perdere bontà e gentilezza.*

*Ringrazio Leonardo, che mi ha insegnato tutto, dalle pratiche più semplici alle tecniche più complesse, rispondendo sempre ai miei dubbi, facendomi capire il significato di "gioco di squadra" e trasmettendomi la sua passione per questo lavoro.*

*Grazie a Ginevra, Martina, Lorenza, Minh per aver condiviso con me la vita di laboratorio, rendendola piacevole e divertente.*

*Infine non posso non ringraziare tutte le altre persone che lavorano in questo laboratorio, ognuna delle quali mi ha accolta sempre con il sorriso ed aiutato quando ne avevo bisogno.*