



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

Scuola di Dottorato di Ricerca in Biologia e Medicina della Rigenerazione

Indirizzo: Endocrinologia Comparata

XX° Ciclo

**Co-individuazione delle isoforme di mRNA
per il recettore dei mineralcorticoidi (MR)
e dell'enzima 11 β -idrossisteroide deidrogenasi
in cellule e tessuti umani atipici, rispondenti all'aldosterone.
Studio particolareggiato in pazienti affetti da iperaldosteronismo
primitivo e ricerca di mutazioni nel gene MR in una famiglia
con diagnosi di pseudo-ipoaldosteronismo.**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Supervisore: Ch.mo Prof. Lorenzo Colombo

Dottoranda: Dr.ssa Donatella Pellati

31 gennaio 2008

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	4
ABBREVIAZIONI	7
1. INTRODUZIONE	
1.1 L'ALDOSTERONE	9
<u>Sintesi, rilascio e principali funzioni dei mineralcorticoidi</u>	
<u>L'aldosterone e lo <i>stress</i> ossidativo</u>	14
1.2 IL RECETTORE DEI MINERALCORTICOIDI (MR)	16
<u>Azioni genomiche dell'aldosterone nei classici tessuti bersaglio</u>	20
<u>Azioni dell'aldosterone nei tessuti non epiteliali</u>	22
1.3 IPERALDOSTERONISMI	25
<u>Sindrome di Conn</u>	
1.4 PSEUDO-IPOALDOSTERONISMI E MUTAZIONI CORRELATE	27
2. OBIETTIVO	31
3. MATERIALI E METODI	33
3.1 ISOLAMENTO DI SPERMATOZOI UMANI DA LIQUIDO SEMINALE	
3.2 IMMUNOFLUORESCENZA PER L'IDENTIFICAZIONE DI MR	
IN SPERMATOZOI UMANI	34
3.3 ISOLAMENTO DI LEUCOCITI MONONUCLEATI (LMN) DA SANGUE	
PERIFERICO	35
3.4 RT-PCR PER L'ANALISI DELLE VARIANTI DEI TRASCritti PER hMR E PER	
LA 11 β -IDROSSISTEROIDE-DEIDROGENASI (11 β -HSD) 1 E 2 IN CELLULE	
E TESSUTI UMANI NORMALI E PATOLOGICI	37
<u>Raccolta dei campioni di tessuto, estrazione, purificazione dell'RNA totale</u>	
<u>e reazioni di RT</u>	
<u>RT-PCR per l'individuazione di isoforme di messaggero per hMR</u>	39
<u>RT-PCR per l'individuazione degli mRNA per la 11β-HSD di tipo 1 e 2</u>	41

<u>Sequenziamento dei prodotti di RT-PCR</u>	43
3.5 SEQUENZIAMENTO DEL GENE hMR IN UNA FAMIGLIA CON PSEUDOIPOALDOSTERONISMO DI TIPO I	44
<u>Estrazione di DNA genomico da sangue intero, PCR e sequenziamento</u>	
4. RISULTATI	46
<u>Il MR in spermatozoi e in leucociti mononucleati umani</u>	
<u>Co-espressione di isoforme del messaggero per hMR e per 11β-HSD in LMN e in surrene di pazienti affetti da sindrome di Conn</u>	49
<u>Espressione delle varianti di mRNA per hMR e del gene 11β-HSD2 nella laringe umana: un nuovo tessuto atipico rispondente all'aldosterone</u>	53
<u>Analisi del gene hMR in una famiglia con pseudo-ipoaldosteronismo di tipo I</u>	55
5. DISCUSSIONE	56
6. BIBLIOGRAFIA	60

RIASSUNTO

L'aldosterone, oltre a regolare il bilancio elettrolitico Na^+/K^+ ed osmotico a livello degli epitelii polarizzati del rene, del colon, delle ghiandole salivari e sudoripare, svolge numerosi effetti pleiotropici, interagendo con il recettore dei mineralcorticoidi (MR). Quest'ultimo si lega quasi con la stessa affinità agli ormoni glucocorticoidi, in modo particolare al cortisolo, il quale circola nel plasma ad una concentrazione fino a 1000 volte superiore a quella dell'aldosterone. Nei classici tessuti bersaglio dell'aldosterone, la specificità dell'azione in senso mineralcorticoide è garantita dalla presenza e attività dell'enzima 11β -idrossisteroide-deidrogenasi di tipo 2 (11β -HSD2), che catalizza in modo univoco la conversione del cortisolo in cortisone, impedendone l'interazione con il MR.

Il MR umano (hMR), è codificato da un gene che mappa nel cromosoma 4 ed è costituito da 8 esoni codificanti a partire dall'esone 2, tradotti in un'unica proteina recettoriale di 984 aminoacidi. L'esone 1, non tradotto, è presente nelle due isoforme 1α e 1β , che, a seguito di uno *splicing* alternativo, originano due isoforme di mRNA (hMR α e hMR β). Delle due isoforme di messaggero, hMR β sembra essere espressa solo in alcuni tessuti o tipi cellulari. A partire dal 2001 sono state descritte altre due varianti del messaggero per lo hMR, definite hMR $\Delta 5$ e hMR $\Delta 5,6$, prive dell'esone 5 o degli esoni 5 e 6, rispettivamente. I messaggeri hMR Δ , inizialmente individuati soprattutto nel rene, codificano per due recettori privi di parte o di tutto il dominio che lega l'aldosterone (LBD) e sono ampiamente espressi in vari tessuti, dove agiscono come fattori di trascrizione indipendenti dal ligando.

Nel mio lavoro di ricerca ho inizialmente dimostrato, con reazioni di amplificazione dei prodotti di retro-trascrizione (RT-PCR), che anche gli spermatozoi umani, isolati da liquido seminale esprimono, seppure in modo meno marcato rispetto ai linfomonociti, il recettore dell'aldosterone. Questo dato rilevante è stato confermato dall'immunofluorescenza, che mostra una distribuzione del recettore nella porzione mediana della testa e nella coda dello spermatozoo. Ne conseguirebbero importanti implicazioni sulla motilità spermatica, in relazione all'eventuale presenza di aldosterone nell'ambiente in cui viene a trovarsi lo spermatozoo stesso.

Numerose prove scientifiche dimostrano che l'azione specifica dell'aldosterone, mediata dall'interazione con il MR, a seguito dell'attivazione di numerosi geni, può indurre a livello cardiaco, renale e nell'endotelio vasale, la sintesi di varie sostanze pro-infiammatorie che, in situazioni patologiche caratterizzate da un eccesso cronico di

mineralcorticoidi, possono portare a fibrosi nei medesimi distretti. Poiché è noto che il processo infiammatorio è preceduto da una massiva infiltrazione di linfomonociti (LMN) nel sito interessato, nella mia ricerca ho analizzato, mediante RT-PCR, l'espressione delle varie isoforme dello hMR, sia in LMN di pazienti affetti da aldosteronismo primitivo, sia in alcuni campioni di tessuto corticosurrenale normale e tumorale in pazienti sottoposti a surrenalectomia monolaterale per la presenza di un adenoma di Conn. Ho riscontrato, in merito, una diversa espressione dell'isoforma hMR β , rispetto a hMR α tra i campioni di tessuto e i LMN dei medesimi pazienti, se paragonata a quella del tessuto renale di controllo e ai LMN di volontari sani. Ho infatti dimostrato che il messaggero hMR β è meno espresso, tra tutti i campioni analizzati, nel tessuto dell'adenoma del corticosurrene secernente aldosterone (APA). Nei campioni suddetti abbiamo verificato, con reazioni di RT-PCR, la co-presenza di entrambi i messaggeri per l'enzima 11 β -idrossisteroide-deidrogenasi di tipo 1 e 2 (11 β -HSD 1 e 2). Un dato interessante è emerso dall'espressione del gene 11 β -HSD2; quest'ultimo, infatti, che non è espresso nei LMN di soggetti normali, lo è in modo non trascurabile nelle cellule ematiche di buona parte dei pazienti iperaldosteronemici presi in considerazione, così come risulta espresso, in modo più marcato rispetto ai LMN, nel corticosurrene sano e tumorale. Questi risultati, se confermati in un significativo numero di pazienti, potrebbero costituire un dato aggiuntivo di tipo prognostico predittivo sulla presenza di un iperaldosteronismo primario.

In questo lavoro di ricerca ho in seguito analizzato l'espressione dei geni, fino a qui descritti, nel tessuto normale prelevato da cinque distretti della laringe umana. Anche in questo caso ho dimostrato l'espressione di entrambe le isoforme hMR α e hMR β , analogamente al gene 11 β -HSD2, e queste ultime evidenze sperimentali ci hanno indotto a considerare un altro tessuto che risponde all'aldosterone con modalità genomica, mediata dal recettore. Il significato di tale riscontro sarà oggetto di studi futuri.

Il MR umano è notoriamente interessato ad un certo numero di mutazioni che possono coinvolgere quasi tutti gli esoni codificanti, provocando una patologia trasmessa come carattere autosomico dominante, definita pseudo-ipoaldosteronismo di tipo I (PHA I), essendo caratterizzata dalla stessa sintomatologia tipica di una carenza di aldosterone, che invece è prodotto in eccesso. L'analisi del gene hMR che ho eseguito nell'ultima parte di questo lavoro di ricerca in una famiglia con un neonato affetto dalla patologia congenita appena descritta, non ha rilevato significative variazioni nucleotidiche che coinvolgono le

porzioni codificanti di alcun esone. Ritengo pertanto che si possa trattare della variante della stessa malattia congenita, che interessa i canali del sodio nei tubuli renali.

ABSTRACT

The steroid hormone aldosterone, that normally controls the urinary Na^+/K^+ balance, and the osmolarity in the kidney, colon, salivary and sweat glands epithelial tissues, exerts also many different effects, by binding to the mineralocorticoid receptor (MR). This receptor binds both aldosterone and glucocorticoids (mostly cortisol) with approximately the same affinity. However, cortisol has a 1000-fold higher concentration in plasma than that of aldosterone. In its classical target tissues, the mineralocorticoid selectivity mainly depends on the enzymatic activity of the type 2 11β -hydroxysteroid dehydrogenase (11β -HSD2), which converts cortisol into inactive cortisone, a corticosteroid that doesn't bind to the MR. The human MR gene (hMR) maps on chromosome 4 and contains 8 coding exons, with the start of the open reading frame (ORF) in the exon 2, which gives a 984 aminoacid product. The untranslated exon 1, which exists in the two isoforms 1α and 1β , may give rise, by alternative splicing, to the hMR α and hMR β mRNA variants. The hMR β seems to be expressed only in some tissues and cell types.

In 2001, two other hMR mRNA variants were described and they were called hMR Δ 5 and hMR Δ 5,6, because they lack the exon 5 or both exons 5 and 6, respectively. The hMR Δ transcript isoforms, first detected in the kidney, encode for a receptor which lack a fragment or the whole LBD domain, and they are both widely expressed among tissues, where they act as transcription factors that do not depend upon the ligand aldosterone.

In this work, I first demonstrated, by RT-PCR assays, the expression of hMR gene in spermatozoa, even though, in these cells, it was less detectable than in human mononuclear leukocytes (LMN). These important data were confirmed by immunofluorescence, in which the hMR protein was detectable in the middle piece and in the tail of the spermatozoa. These results may provide useful insight into mechanisms that can modify sperm motility in the presence of aldosterone in the milieu.

It is well known, from the scientific literature, that the activation of a number of genes, consequently to the specific MR-aldosterone interaction, may lead to the synthesis of some pro-inflammatory substances, in the heart, kidney, and in the vascular endothelium. In primary hyperaldosteronism, the presence of high aldosterone plasma levels may finally cause fibrosis in the same districts. The first steps of the inflammatory processes are characterized by a massive invasion of LMN, so, in the present research, I analyzed, by RT-PCR reactions, the expression of hMR gene variants in LMN from patients with Conn syndrome, and in both the normal adrenal cortex tissue, and in the adjacent adenoma

producing aldosterone (APA) samples. I demonstrated a variable expression of the hMR β isoform, in comparison with the hMR α variant, which is homogeneously detectable in all the analyzed samples, and it was found that the hMR β mRNA was less expressed in the APA tissues, than in the normal adrenal tissue and in the LMN of the same patients.

In the same samples, I also verified the co-expression of mRNA for both the type 1 and 2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD 1 and 2). A very interesting outcome from this step of my study was the demonstration of the 11 β -HSD type 2 expression in LMN of most of the patients with primary aldosteronism, while the same mRNA was not detectable in LMN from healthy volunteers. These important results, if they are confirmed in a significantly greater number of patients, would provide more information in order to predict the presence of a primary aldosteronism itself.

In this work, I also analyzed, by RT-PCR, the expression of the above mentioned genes in five normal tissue samples from human larynx. Even in this case, the hMR α , hMR β and the 11 β -HSD type 2 mRNAs were all detectable in the larynx tissue, and so this can be considered as a novel tissue specifically responsive, in a genomic manner, to aldosterone by its interaction with MR. The meaning of this result will be investigate in the future.

Many human diseases depend upon a number of important mutations in almost all the hMR exons, causing type I pseudo-hypoaldosteronism (PHA I), which mimics the absence of aldosterone, even if it is synthesized in a great amount. In the last period of my work, I investigated the hMR gene for mutations in each exon, in a family with PHA I, composed by a newborn, that was identified as the case-control, and their parents. Since no important nucleotide substitutions was revealed in the analyzed coding regions, this family is probably affected by the renal variant of the above mentioned diseases, where the mutations involve the gene encoding for the epithelial sodium channels subunits in the kidney.

ABBREVIAZIONI

11β-HSD	11 β -idrossisteroide deidrogenasi (<i>11β-idroxysteroyde dehydrogenase</i>)
ACE	enzima che converte l'angiotensina I (<i>Angiotensin Converting Enzime I</i>)
ACTH	ormone adrenocorticotropo, corticotropina (<i>AdrenoCorticoTropic Hormone</i>)
ADH	ormone antidiuretico (<i>AntiDiuretic Hormone</i>)
APA	adenoma del corticosurrene secernente aldosterone (<i>Aldosterone Producing Adenoma</i>)
DBD	dominio di legame al DNA (<i>DNA Binding Domain</i>)
DOC	desossicorticosterone
GRE	elementi responsivi ai glucocorticoidi (<i>Glucocorticoid Responsive Elements</i>)
hMR	recettore umano dei mineralcorticoidi (<i>human Mineralocorticoid Receptor</i>)
LBD	dominio di interazione con il ligando (<i>Ligand Binding Domain</i>)
LDL	lipoproteine a bassa densità (<i>Low Density Lipoproteins</i>)
LMN	linfomonociti (<i>Mononuclear Leukocytes</i>)
MIM	carattere mendeliano ereditabile nell'uomo (<i>Mendelian Inheritance in Men</i>)
MR	recettore dei mineralcorticoidi (<i>Mineralocorticoid Receptor</i>)
mRNA	RNA messaggero (<i>messenger RNA</i>)
NADH	nicotinamide-adenina-dinucleotide
NADPH	nicotinamide-adenina-dinucleotide-fosfato
NO	ossido di azoto
NTD	dominio N-terminale (<i>N-Terminal Domain</i>)
PAI-1	inibitore dell'attivatore del plasminogeno tipo 1 (<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>)
PBS	tampone fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PHA	pseudo-ipoaldosteronismo (<i>PseudoHypoAldosteronism</i>)
PRA	attività della renina plasmatica (<i>Plasmatic Renin Activity</i>)
RAAS	sistema renina-angiotensina-aldosterone (<i>Renin-Angiotensin-Aldosterone System</i>)
ROS	specie reattive dell'ossigeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
rRNA	RNA ribosomiale (<i>ribosomal RNA</i>)
RT	trascrizione inversa (<i>Reverse Transcription</i>)
RT-PCR	reazione di polimerizzazione dei prodotti di retro-trascrizione (<i>Retrotranscription-Polymerase Chain Reaction</i>)
SNP	polimorfismi di un singolo nucleotide (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
TAE	TRIS-Acetato-EDTA (<i>TRIS-Acetate-EDTA</i>)
TGF-β	fattore trasformante di crescita β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)

1. INTRODUZIONE

1.1 L'ALDOSTERONE

Sintesi, rilascio e principali funzioni dei mineralcorticoidi

L'aldosterone fu isolato per la prima volta nel 1953 da Simpson e Tait da ghiandole surrenali bovine e l'anno successivo ne fu descritta la struttura chimica. Negli anni a seguire, una serie di studi eseguiti con l'utilizzo di radioisotopi, portarono ad investigare i meccanismi di azione e di regolazione dell'aldosterone e nel 1956 Giroud e collaboratori dimostrarono che questo steroide è sintetizzato nella zona glomerulare del surrene [Williams JS e Williams GH, 2003]. L'aldosterone nell'uomo è il principale ormone ad attività mineralcorticoide ed è oggi assodato che viene sintetizzato esclusivamente nella zona glomerulosa della corteccia surrenale. Questa porzione della corticale del surrene è l'unica ad essere priva dell'enzima 11β -idrossilasi, necessario alla sintesi del cortisolo, mentre possiede l'enzima aldosterone sintasi (Figura 1).

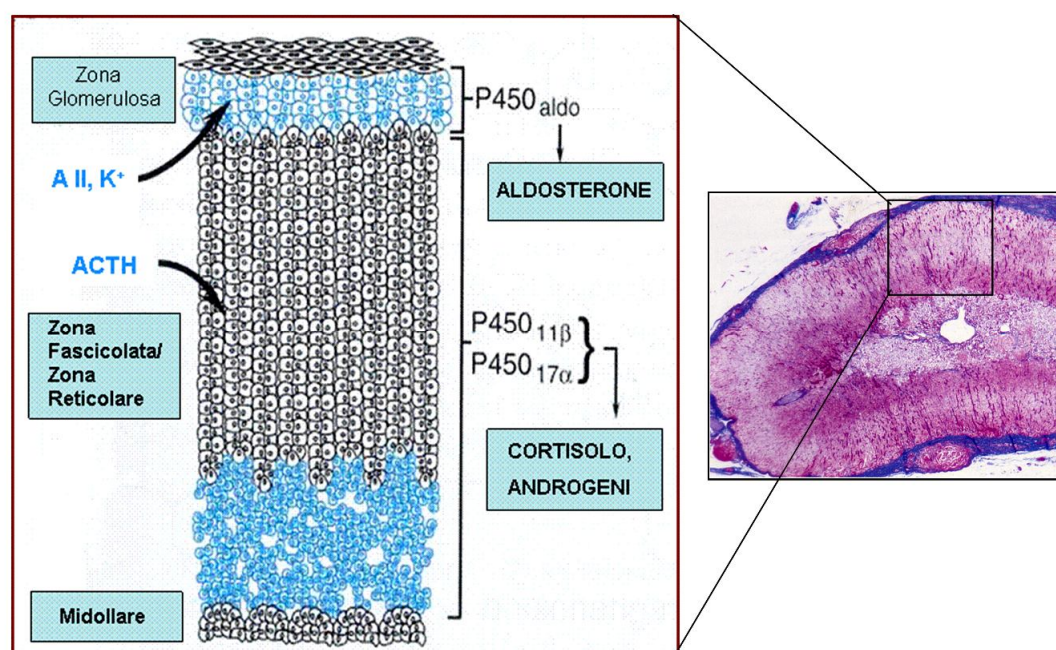


Figura 1. Rappresentazione schematica delle tre zone istologiche del corticosurrene umano e gli steroidi ivi sintetizzati. A destra, preparato istologico di surrene umano *in toto*.

Le ghiandole surrenali dei mammiferi, come evidenziato in Figura 1, sono istologicamente diversificate in una zona corticale esterna, che produce ormoni corticosteroidi e in una zona midollare interna, che sintetizza catecolamine. Una densa capsula fibrosa riveste ciascuna ghiandola e fornisce un supporto esterno alla rete di collagene che sostiene le cellule secretorie. Queste ultime si organizzano in una zona glomerulosa, situata sotto la capsula, con le cellule secretorie organizzate in aggregati

rotondeggianti, una zona intermedia fascicolata, con cellule disposte in cordoni paralleli ed una zona interna reticolare, costituita da piccole cellule disposte in modo irregolare. A ciascuno strato cellulare corrisponde una suddivisione di tipo funzionale, caratterizzata dalla sintesi dei vari corticosteroidi (Figura 1). Nei vertebrati non mammiferi, il tessuto interrenale (corticosurrene nei mammiferi) e il tessuto cromaffine (corrispondente alla midollare), non sono così ben organizzati a formare una ghiandola distinta disposta sopra i reni. Nei ciclostomi, ad esempio, le cellule interrenali rimangono separate dalle cellule cromaffini, come avviene negli elasmobranchi, nei quali il tessuto interrenale forma ghiandole distinte ai margini dei reni. Negli anfibi, rettili e uccelli, i due tessuti sono tra loro frammisti, mentre solamente nei mammiferi essi sono contigui, con la componente cromaffine situata nella medulla e quella steroidogenica nella corteccia. Solamente negli amnioti le ghiandole surrenali formano due strutture distinte localizzate in vicinanza ai reni [Kardong, 2005].

La prima tappa della steroidogenesi consiste nella conversione del colesterolo in pregnenolone, per azione dell'enzima P450_{scc}, nella membrana mitocondriale interna della cellula steroidogenica [Molina, 2004].

Il colesterolo, a sua volta, può derivare (per circa l'80%) dalle lipoproteine circolanti a bassa densità (LDL), in grado di attraversare agevolmente la membrana citoplasmatica interagendo con i recettori specifici, o dal cosiddetto deposito citoplasmatico steroidogenico delle medesime cellule. Il colesterolo viene poi rilasciato dalle LDL in seguito all'azione dell'enzima colesterolo esterasi. Una volta libero nel citoplasma, questo precursore dei corticosteroidi deve attraversare entrambe le membrane mitocondriali e raggiungere il sito necessario alla sua conversione in pregnenolone (Figura 2). Questa tappa limitante la velocità di sintesi degli ormoni steroidei è mediata dalla proteina StAR (*Steroid Acute Regulatory Protein*) [Nussey e Whitehead, 1999].

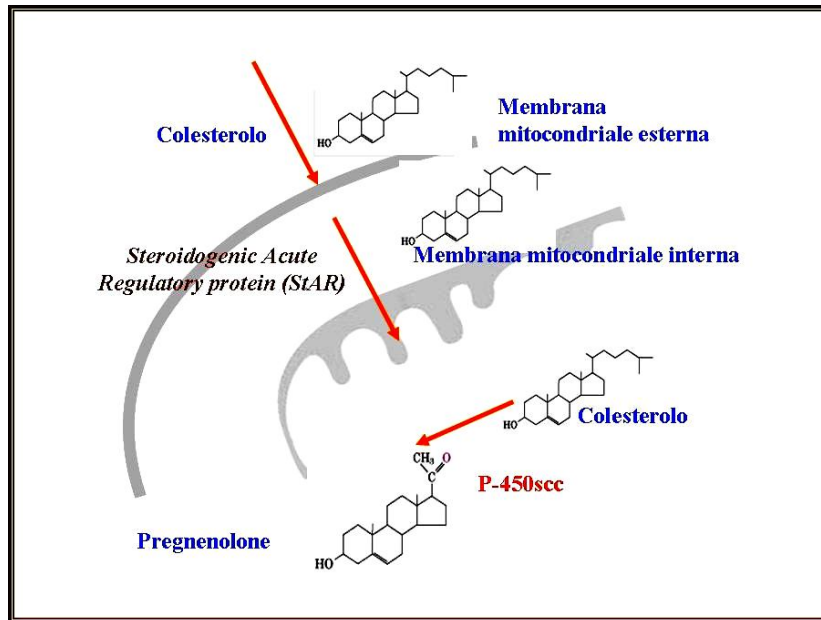


Figura 2. Schema delle prime tappe della steroidogenesi a livello mitocondriale.

Nella zona glomerulosa della corticale del surrene il pregnenolone è convertito in progesterone, per l'azione della 3 β -idrossisteroide deidrogenasi e, a seguire (Figura 3) vengono sintetizzati l'11-deossicorticosterone (DOC), per azione dell'enzima 21-idrossilasi, il corticosterone, il 18-OH corticosterone ed infine l'aldosterone [Greenspan e Strewler, 2000; Molina, 2004].

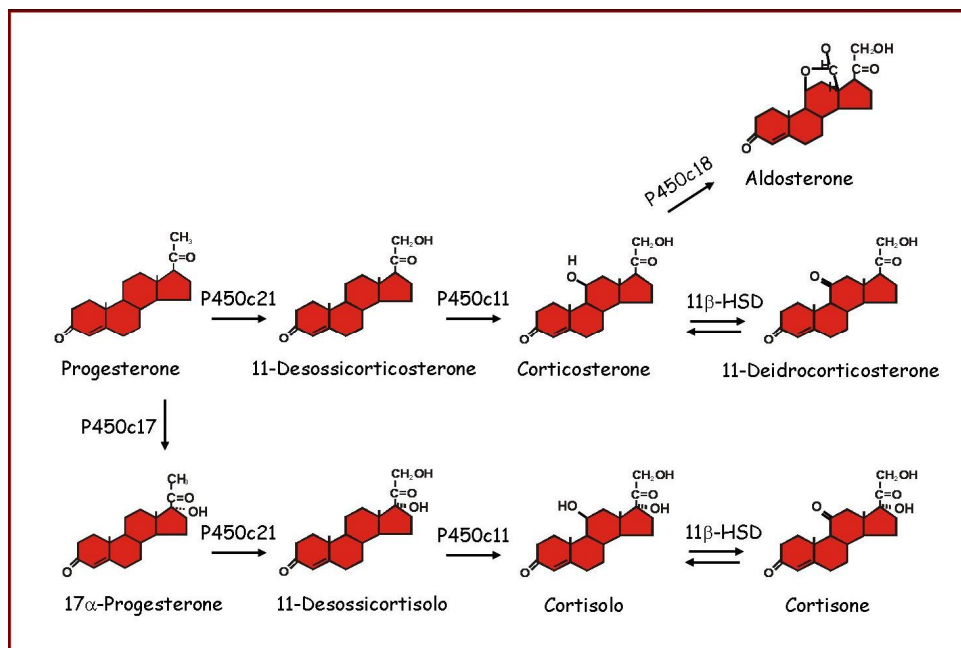


Figura 3. Disegno schematico delle principali tappe biochimiche che portano alla sintesi dei mineralcorticoidi (parte superiore dello schema) e dei glucocorticoidi (schema inferiore), a partire dal precursore comune progesterone.

L'enzima aldosterone sintasi, presente nelle cellule della glomerulosa, appartiene alla famiglia dei citocromi P450, è ubicato nella membrana interna mitocondriale e catalizza tre importanti passaggi di metil-ossidazione e di ossidazione che si verificano in successione. L'enzima P450c18, è codificato dal gene CYP11B2, originato dalla duplicazione del gene CYP11B, la cui controparte (CYP11B1) codifica per l'enzima P450c11 [Colombo et al., 2006]. Tra i due solo il P450c18 è in grado di eseguire una selettiva 11 β idrossilazione del DOC, dando il corticosterone, sottoposto ad una seconda idrossilazione al carbonio 18, con sintesi del 18-idrossicorticosterone, che viene infine ossidato, sempre al carbonio in posizione 18, ad aldosterone (Figura 3).

I principali stimoli che regolano la sintesi e il rilascio di aldosterone nella zona glomerulosa sono l'angiotensina II e l'aumento della concentrazione extracellulare di ioni K⁺; svolgono un ruolo secondario, in merito, il sodio, il calcio, il magnesio, la dopamina e l'ormone adrenocorticotropo (ACTH). Quest'ultimo costituisce invece uno degli stimoli principali per la sintesi dei glucocorticoidi dalla zona fascicolata del corticosurrene. Nel caso dell'aldosterone, solamente in situazioni patologiche quali l'iperaldosteronismo primitivo, in cui si ha una soppressione della sintesi di angiotensina II, questo mineralcorticoide può risentire dell'influsso delle variazioni circadiane dell'ACTH. Nel complesso la secrezione di aldosterone è sottoposta ad una regolazione di tipo *feed-back*, messa in atto dal sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS). Tale sistema coinvolge direttamente le cellule dell'apparato iuxtaglomerulare del glomerulo renale, in grado di secernere renina, in risposta ad una diminuzione del Na⁺ ematico, rilevata nel capillare afferente del glomerulo stesso. La renina così prodotta agisce sull'angiotensinogeno, un polipeptide prodotto dal fegato, trasformandolo nel decapeptide angiotensina I. Quest'ultima, a sua volta è idrolizzata in angiotensina II dall'enzima di conversione dell'angiotensina I (ACE), sintetizzato soprattutto a livello polmonare. L'angiotensina II, tramite il legame con i recettori specifici AT₁ e AT₂, presenti negli endoteli vasali, nella glomerulosa, e a livello cerebrale, induce una vasocostrizione periferica, stimola l'aumento dell'aggregazione piastrinica, della matrice extracellulare, l'adesione dei monociti, il rilascio di adrenalina da parte del sistema nervoso simpatico e di noradrenalina nella midollare dei surreni, la sintesi di NO, di prostaglandine e l'apoptosi. La stessa angiotensina II, d'altro canto, inibisce il rilascio di renina, di prolattina e di ADH. In ultima analisi l'aldosterone viene rilasciato quando si verifica una riduzione effettiva del volume ematico intravascolare, cui consegue una diminuzione della pressione di perfusione renale, registrata dall'apparato iuxtaglomerulare, assieme ad una eventuale riduzione della

natriemia, con conseguente produzione di renina e attivazione della cascata di reazioni che infine portano alla sintesi di angiotensina II [Molina, 2004].

Complessivamente la quantità di aldosterone rilasciato è marcatamente inferiore a quella dei glucocorticoidi: i livelli plasmatici di aldosterone, infatti, sono in media 0,006-0,01 µg/dL contro i livelli di cortisolo pari a 13,5 µg/dL. L'aldosterone circola per lo più legato all'albumina, a differenza degli steroidi prodotti dalla zona fascicolata, i quali circolano in forma coniugata con la globulina legante gli steroidi. La quota libera di aldosterone ammonta a circa il 30-50% della quota plasmatica totale, pertanto questo mineralcorticoide è caratterizzato da un'emivita relativamente breve, dell'ordine di 15-20 minuti. A livello epatico viene metabolizzato e trasformato, per circa il 40%, in tetraidroaldosterone, mentre il 5-10% dell'aldosterone secreto nelle urine è metabolizzato nel rene a derivato 18-glucuronide. In condizioni fisiologicamente normali, una piccola quantità di aldosterone (circa l'1%) viene escreta tal quale nell'urina e come tale può essere dosata. Con un'assunzione giornaliera di sale sodico di 100-150 mmol, nell'uomo la secrezione giornaliera di aldosterone varia tra 50 mg e 250 mg [Nussey e Whitehead, 1999].

L'aldosterone svolge un ruolo primario nel controllo del bilancio elettrolitico e fu caratterizzato inizialmente sulla base dei suoi effetti mineralcorticoidi sul rapporto Na^+/K^+ a livello urinario. Questo steroide, infatti, nei tipici tessuti e organi bersaglio, regola il riassorbimento di sodio e la secrezione di K^+ ; l'acqua segue la direzione degli ioni Na^+ per osmosi, mantenendo in tal modo l'omeostasi pressoria dell'individuo. La secrezione e le azioni fisiologiche dell'aldosterone sono sottoposte ad un controllo a *feed back* negativo: lo steroide risponde positivamente a seguito di una diminuzione della volemia e ad un aumento di K^+ e interviene negativamente in caso di aumento della volemia e di una diminuzione di K^+ [Nussey e Whitehead, 1999]. L'aumento della secrezione di potassio indotta dall'aldosterone è particolarmente evidente a livello urinario, nelle feci, nel sudore e nella saliva [Funder, 2005a]. L'importanza dell'aldosterone nell'omeostasi pressoria nell'uomo è particolarmente evidente, se si considera che tutte le forme ipertensive dovute a mutazioni di tipo mendeliano sono da imputare a segnali aberranti di tale steroide, o all'aumento dell'attività dei suoi effettori finali [Lifton et al., 2001; Funder, 1997].

L'aldosterone e lo stress ossidativo

Per *stress* ossidativo si intendono gli effetti indotti nella cellula dall'aumento eccessivo dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Tali molecole, quando sono prodotte in normali quantità fisiologiche nel citoplasma cellulare e nei mitocondri, svolgono la funzione di secondi messaggeri; un aumento della loro sintesi o una diminuita efficienza dei meccanismi adottati dalle cellule per eliminarne l'eccesso, possono innescare reazioni di ossidazione che danneggiano le membrane cellulari, le proteine e gli acidi nucleici.

La produzione delle ROS è un meccanismo a cascata, che inizia con la produzione dell'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$) da parte di vari enzimi, fra i quali un ruolo importante svolge la NADPH ossidasi, espressa in svariati tipi cellulari in diverse isoforme. Questo complesso enzimatico consiste in alcune sub-unità associate alla membrana (gp90^{phox}, Nox-1, Nox-4, implicate nel trasferimento degli elettroni, e p22^{phox}) ed in altre (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e Rac1) localizzate nella forma inattiva nel citoplasma, per traslocare poi, una volta attivate, a livello della membrana cellulare, interagendo in tal modo con le diverse componenti enzimatiche ivi normalmente presenti [Miyata et al., 2005].

Negli ultimi cinque anni, alcuni dati dalla letteratura medica scientifica [Calò et al, 2004] hanno dimostrato che nell'adenoma surrenalico secernente aldosterone, patologia in cui l'aldosterone è prodotto in eccesso (iperaldosteronismo primario), l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1), la p22^{phox} (sub unità dell'enzima NADPH ossidasi) e il fattore trasformante di crescita β (TGF β), mostrano un netto incremento sia dell'espressione genica, sia della sintesi della proteina corrispondente.

Un eccesso di aldosterone induce quindi uno stato di *stress* ossidativo che porta a un fenotipo pro-infiammatorio e pro-fibrotico in numerosi tessuti bersaglio, tra i quali figurano soprattutto il cuore, i reni e i vasi sanguigni [Ahokas et al., 2003]. In queste sedi l'aldosterone aumenta l'espressione e la sintesi del collagene di tipo I, oltre ai suddetti fattori considerati come tipici marcatori dello *stress* ossidativo, regolando in tal modo la fibrinolisi, l'ipertrofia e il rimodellamento della muscolatura liscia dei vasi, del tessuto renale e del miocardio [Robert et al., 1995; Ngarmukos e Grekin, 2001; Sun et al., 2002].

Probabilmente anche *in vivo* tale effetto è mediato dal recettore dei mineralcorticoidi, poiché sostanze come l'eplerenone e altri antagonisti del recettore riducono l'infiammazione delle coronarie e la conseguente fibrosi interstiziale, sia nel modello animale che nell'uomo [Pitt et al., 2003; Funder, 2004].

L'aldosterone dimostra di svolgere un ruolo importante sia in alcune disfunzioni sia nel rimodellamento degli endoteli, esplicando la sua azione diretta sulle cellule non-epiteliali della parete dei vasi e del cuore e indirettamente aumentando l'effetto dell'angiotensina II [Funder et al., 2004].

1.2 IL RECETTORE DEI MINERALCORTICOIDI (MR).

La regolazione della risposta all'aldosterone in un determinato tessuto dipende in modo primario dal livello di espressione dell'MR, il quale esplica la sua azione modulatrice sui geni bersaglio, agendo come fattore di trascrizione dipendente dal ligando. Topi *knockout* per il gene MR, infatti, mostrano iponatremia, iperpotassiemia e marcata attivazione del sistema RAAS; i *knockout* omozigoti muoiono entro le prime due settimane di vita e il recettore per i glucocorticoidi (GR) sembra poter sopperire, almeno in parte, alla mancata attività del MR [Berger et al., 1998; Berger et al., 2000]. Sono stati recentemente ottenuti nuovi modelli cellulari mediante oncogenesi mirata, da utilizzare nel tentativo di chiarire almeno parzialmente i complessi meccanismi regolativi che intervengono nella trasduzione dei segnali in risposta ai mineralcorticoidi nei processi fisiologici sia normali che patologici [Le Menuet et al., 2001; 2004; Zennaro e Lombes, 2004].

Il gene che codifica per il recettore dei mineralcorticoidi (MR) appartiene al gruppo C della superfamiglia dei recettori nucleari. Nel 1999 questo gene nell'uomo (hMR) è stato catalogato con la sigla NR3C2 dal *Nuclear Receptor Nomenclature Committee*. Il gene NR3C2 (AH006913; NM_000901), clonato a partire dal 1987 da Arriza e collaboratori, mappa nel cromosoma 4, nella banda 4q31.1. Il corrispondente gene murino (Nr3c2 in *Mus musculus*) mappa nel cromosoma 8, mentre il gene del recettore per i mineralcorticoidi nel ratto (nr3c2 in *Rattus norvegicus*), è localizzato in 19q11. Il gene MR umano (hMR) ha una lunghezza complessiva di circa 400 kb e consta di 8 esoni, tradotti a partire dall'esone 2 [Arriza et al., 1987].

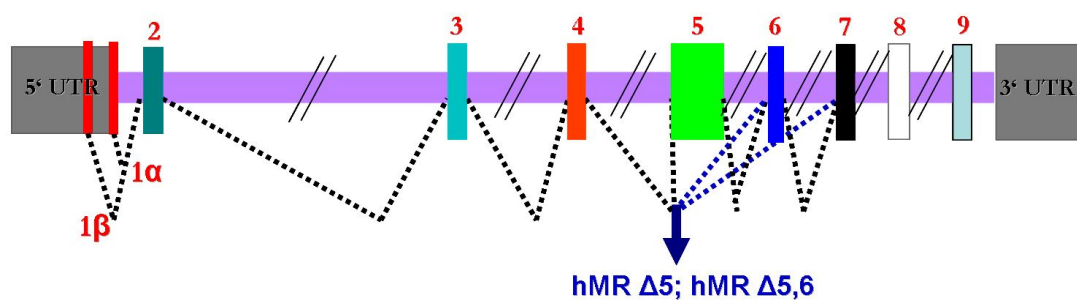


Figura 4. Rappresentazione schematica del gene che codifica per il MR nell'uomo. Sono indicati tutti gli esoni e gli introni con i rispettivi siti di *splicing* (linee punteggiate), inclusi quelli che originano le varie isoforme dell'mRNA.

L'esone 1, non tradotto, è presente nelle due isoforme 1α e 1β, ciascuna affiancata al 5' da una diversa regione promotrice (P1 e P2, rispettivamente). Entrambe le isoforme del

primo esone, originano un diverso mRNA (hMR α e hMR β), a seguito di uno *splicing* alternativo (Figura 4).

Le forme hMR α e hMR β sono state caratterizzate, sia *in vitro*, che *in vivo*: il promotore P1 è il promotore più forte tra i due, pertanto hMR α sembra essere espresso in tutte le cellule bersaglio dell'aldosterone, mentre P2, il promotore più debole, è attivo solo in alcuni tipi cellulari e dal tipo di distribuzione spaziale limitata si ritiene che esso abbia un ruolo durante le prime fasi dello sviluppo embrionale [Zennaro et al., 1996; Zennaro et al., 1997; Le Menuet et al., 2000]. Entrambe le isoforme mRNA α e β del gene hMR, comunque, originano un'unica proteina recettore che consta di 984 aminoacidi (NP_000892), in quanto l'ORF (*Open Reading Frame*) inizia dall'esone 2. A partire dal 2001, Zennaro e collaboratori hanno descritto due nuove varianti di mRNA per lo hMR, definite hMR Δ 5 e hMR Δ 5,6, essendo deficitarie dell'esone 5 o degli esoni 5 e 6, rispettivamente. Entrambe queste isoforme derivano da un fenomeno di *skipping exon* che coinvolge o il solo esone 5, oppure gli esoni 5 e 6 contemporaneamente. Il messaggero hMR Δ 5,6 codifica per una proteina di 75 kDa, che è priva della regione "cerniera" (*hinge*) e del dominio che lega l'aldosterone (LBD, Figura 5). Entrambe le forme hMR Δ 5 e hMR Δ 5,6 sono ampiamente espresse in vari tessuti umani e nei corrispondenti murini, dove agiscono come fattori di trascrizione indipendenti dal ligando, in grado comunque di modulare sia la funzione dello hMR stesso, sia la funzione del recettore per i glucocorticoidi (GR). Tra le cellule, queste varianti di mRNA particolarmente espresse nel rene, sono state individuate anche in leucociti mononucleati (LMN) [Zennaro et al., 2001].

Sembra infatti che l'MR tronco interagisca con diversi co-attivatori capaci di aumentare il suo potenziale di trascrizione. Rispetto allo hMR *wild-type* il messaggero della forma hMR Δ 5,6 è espresso in modo nettamente superiore nel rene, non solo umano, ma anche murino; sembra dunque che l'espressione dell'MR Δ 5,6 sia ben conservata nella scala evolutiva, almeno dal topo all'uomo [Zennaro et al., 2001].

Nel 2004 Pascual-Le Tallec e collaboratori [Pascual-Le Tallec et al, 2004] hanno dimostrato anche l'esistenza di due isoforme della proteina recettoriale umana: MRA e MRB, di 107 e di 105,4 kDa, rispettivamente. Queste forme del recettore derivano dall'utilizzo alternativo di due *Kozak consensus sites* (del tipo A/GxxATGG, dove x indica un nucleotide qualunque), localizzati nel dominio N-terminale della proteina hMR (NTD, in figura 5) e codificanti gli aminoacidi Met 1 e Met 15, rispettivamente. Questo tratto

proteico, che include i primi 15 aminoacidi dell'NTD, è quello evolutivamente più conservato, dai pesci teleostei all'uomo.

Sostanzialmente la proteina MR è costituita da tre porzioni (Figura 5): un dominio N-terminale (NTD) coinvolto nella attivazione della trascrizione genica, una porzione mediana (DBD) che contiene i siti di legame a specifiche sequenze del DNA bersaglio, e il dominio C-terminale (LBD) che contiene sequenze aminoacidiche necessarie per l'interazione con il mineralcorticoide. In particolare, la porzione compresa tra gli aminoacidi 804 e 874 dell'LBD è cruciale per la specificità di legame dell'aldosterone [Rogerson et al., 1999].

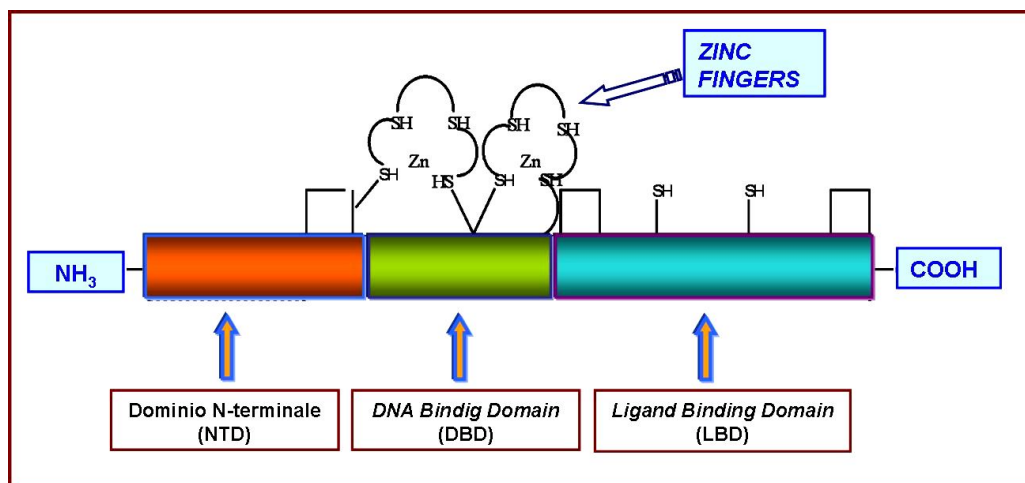


Figura 5: struttura schematica della proteina hMR, con indicata la suddivisione nei tre domini funzionali.

Similmente a quanto accade per le varianti nel dominio N-terminale dei recettori degli altri steroidi, in condizioni normali e patologiche, si ritiene che anche le forme MRA e MRB del recettore per i mineralcorticoidi possano avere un ruolo attivo nella patogenesi di malattie come lo pseudo-ipoaldosteronismo (PHA) di tipo I, o in alcune forme di resistenza all'aldosterone [Zennaro e Lombés, 2004; Pascual Le-Tallec et al., 2004; Sartorato et al., 2004].

Questo è tanto più probabile, quanto più si pensa all'importanza che nella porzione N-terminale ha la struttura secondaria ad α elica compresa tra l'aminoacido in posizione 13 e quello in posizione 27 della molecola recettoriale. L'isoforma MRB, priva dei primi 15 aminoacidi, possiede un' α elica trunca e questo cambiamento strutturale sembra avere un ruolo essenziale nel determinare la minore capacità di MRB, rispetto ad MRA, di *trans*-attivare i promotori sensibili all'aldosterone [Pascual Le-Tallec et al., 2004].

In assenza del ligando il MR si trova prevalentemente nel citoplasma a formare un complesso proteico con la *Heat Shock Protein 90* (HSP 90), che mantiene inattivo il recettore. Il legame con l'aldosterone altera la conformazione del recettore, provocandone il distacco dall'HSP 90. In tal modo viene esposto il sito coinvolto nella dimerizzazione del recettore e nel legame con il DNA bersaglio, una volta traslocato nel nucleo; in altri termini il legame con il ligando attiva il MR. Questo recettore attivato si lega nel DNA ai *glucocorticoid response elements* (GRE), che consistono in sequenze esameriche palindrome, spaziate da tre nucleotidi. Fino ad oggi nei geni bersaglio dell'aldosterone non sono stati identificati dei *response elements* specifici per i soli mineralcorticoidi [Rogerson et al., 2003].

Il recettore per i mineralcorticoidi ha una sequenza proteica altamente omologa a quella del recettore per i glucocorticoidi (GR); infatti questi due recettori hanno una specificità di legame marcatamente sovrapponibile. Entrambi legano il cortisolo e il corticosterone, ma solo MR lega l'aldosterone con elevata affinità. Si ritiene in proposito che i geni MR e GR si siano originati da un comune gene ancestrale, esistente prima comparsa della molecola di aldosterone. Quest'ultima si sarebbe evoluta per legarsi ed attivare solo il recettore per i mineralcorticoidi che comunque ha mantenuto la sua affinità, seppure bassa, anche per i glucocorticoidi; sostanze come lo spironolattone e l'esplerenone, infatti, che si legano al MR, bloccando l'azione dell'aldosterone, non interagiscono con il GR con altrettanta affinità [Rogerson et al., 2003; Rogerson et al 2004].

Azioni genomiche dell'aldosterone nei classici tessuti bersaglio

La specificità d'azione di tipo genomico dell'aldosterone può essere regolata a vari livelli che portano alla risposta finale, inclusa l'espressione tessutale del MR, il suo legame con il ligando, i siti di legame al DNA, o l'attivazione di fattori che ne modulano la trascrizione. La complessa rete di bersagli cellulari e molecolari dell'aldosterone ne spiega tuttavia i molteplici effetti, che vanno al di là della semplice omeostasi idro-salina e pressoria dell'organismo. Negli epitelii polarizzati del rene, dell'intestino, delle ghiandole salivari e sudoripare, considerati i classici tessuti bersaglio dell'azione dell'aldosterone, oltre alle subunità della Na^+/K^+ ATPasi e ai canali apicali per il sodio, ubicati negli epitelii (ENaC), infatti, sono stati identificati vari geni attivati nella risposta primaria indotta dall'aldosterone e dai mineralcorticoidi in genere (Figura 6). Tra questi figurano i geni per le chinasi sieriche *Sgk*, inducibili dai glucocorticoidi e il gene *Ki-Ras*, probabilmente implicati nelle prime fasi del trasporto di Na^+ mediato dall'aldosterone, nonché il fattore indotto dagli ormoni corticosteroidi (CHIF) [Spindler et al., 1997; Bhargava et al., 2001; Booth et al., 2002].

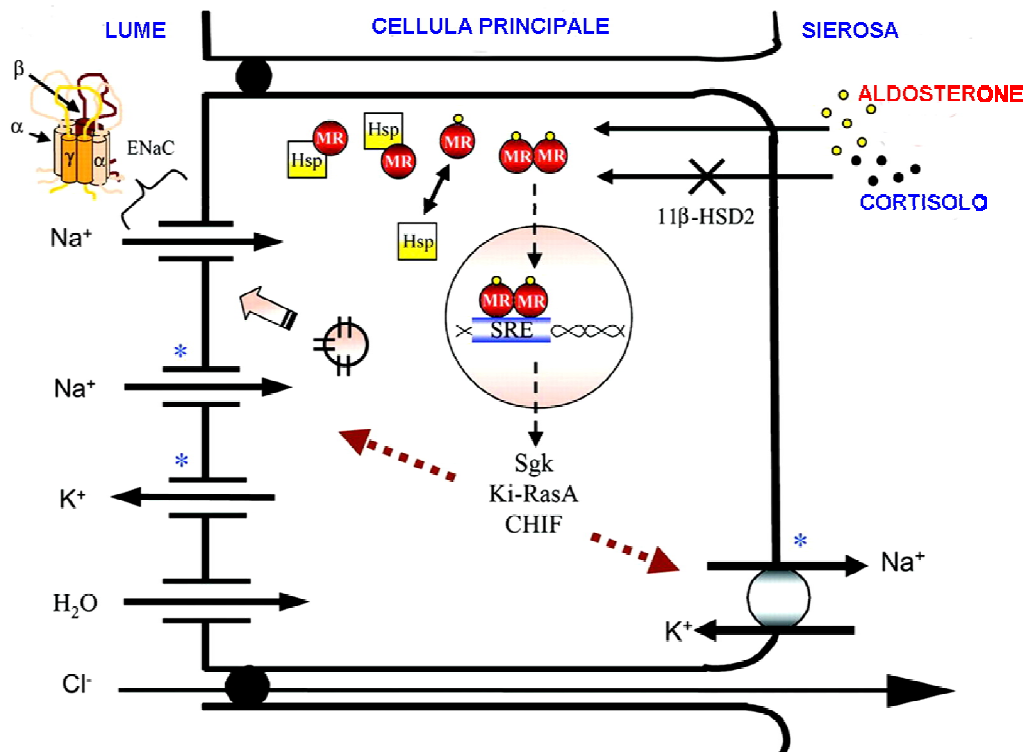


Figura 6. Schema riassuntivo delle azioni genomiche dell'aldosterone nelle cellule epiteliali. Gli asterischi indicano gli effettori dell'aldosterone coinvolti nel riassorbimento di Na^+ e nella secrezione di potassio K^+ . Hsp= Heat Shock Protein; SRE= steroid response element; CHIF= Corticosteroid Hormone-Induced Factor. [Booth et al., 2002, modificato].

Tenendo presente gli effetti pleiotropici mediati dal recettore dei mineralcorticoidi e la sua elevata affinità anche per i glucocorticoidi, il meccanismo che regola la specificità cellulare di questo recettore è fondamentale per la risposta finale di tipo genomico. Nei tessuti epiteliali sopra citati, tipici *target* dell'aldosterone, la specificità di interazione di tale mineralcorticoide con il MR è assicurata dalla presenza in questi siti dell'enzima 11 β -idrossisteroide deidrogenasi di tipo 2 (11 β -HSD2), il quale converte i glucocorticoidi circolanti, circa 100 volte più abbondanti dell'aldosterone, nell'11 deidro-derivato, inattivo [Booth et al., 2002]. Tale differenza quantitativa tra mineralcorticoidi e glucocorticoidi è nettamente maggiore della differenza di affinità di legame all'MR che l'aldosterone ha rispetto ai glucocorticoidi. I glucocorticoidi circolanti, inoltre, sono per la maggior parte legati alle proteine plasmatiche, a differenza dell'aldosterone che circola maggiormente allo stato libero e, mentre il MR sembra strettamente confinato ai tessuti *target* dell'aldosterone, il recettore dei glucocorticoidi (GR) è ubiquitario.

In numerosi studi è stata dimostrata la co-localizzazione, nei tessuti bersaglio dell'aldosterone, del recettore dei mineralcorticoidi e della 11 β -HSD2.

La specificità d'interazione tra l'aldosterone e il MR in un determinato tessuto, pertanto, è determinata, oltre che dalla presenza e attività dell'enzima 11 β -HSD2, anche dal fatto che, quando il MR è legato al solo mineralcorticoide, aumenta la sua capacità *trans*-attivante nei confronti dei geni bersaglio, facendo assumere al recettore una conformazione più stabile di quanto non avvenga a seguito del suo legame con il cortisolo, ad esempio [Funder, 2005b]. Sembra inoltre accertato che il MR attivato sia in grado di interagire con alcune molecole che fungono da co-attivatori, in corrispondenza dei *glucocorticoid response elements* (GRE) nel DNA bersaglio, non essendo tuttora noti gli elementi del DNA che rispondono in modo specifico ai mineralcorticoidi [Rogerson et al., 2004; Funder, 2005a]. In ultima analisi, rimane ancora molto da chiarire riguardo la serie di meccanismi attivati per modulare la risposta mediata dal recettore dell'aldosterone, nei vari tessuti bersaglio [Fuller e Young, 2005; Pascual-Le Tallec e Lombès, 2005].

Azioni dell'aldosterone nei tessuti non epiteliali

La complessa rete di bersagli cellulari e molecolari dell'aldosterone e la regolazione dei suoi molteplici effetti in vari tessuti, sono mediati principalmente dall'interazione con il MR, il quale esplica un'azione modulatrice sui geni bersaglio, agendo come fattore di trascrizione dipendente dal ligando, come schematizzato in Figura 7 [Booth et al. 2002; Stockand, 2002].

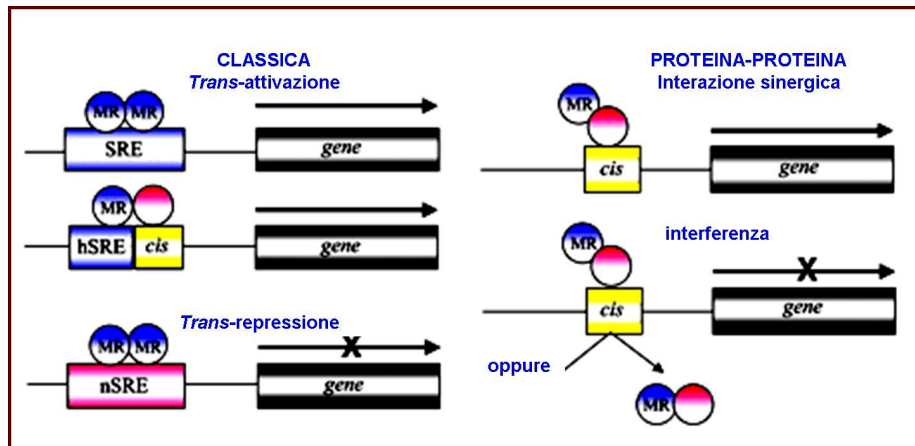


Figura 7. Schema dei meccanismi d'azione molecolari dell'aldosterone. A sinistra sono indicati i meccanismi molecolari classici di regolazione genica dell'aldosterone, sulla trascrizione dei geni bersaglio, mentre a destra sono indicati altri meccanismi, scoperti di recente, di controllo della trascrizione degli *Steroid Response Elements* (SRE), che dipendono da interazioni proteina-proteina [modificato da Booth et al., 2002].

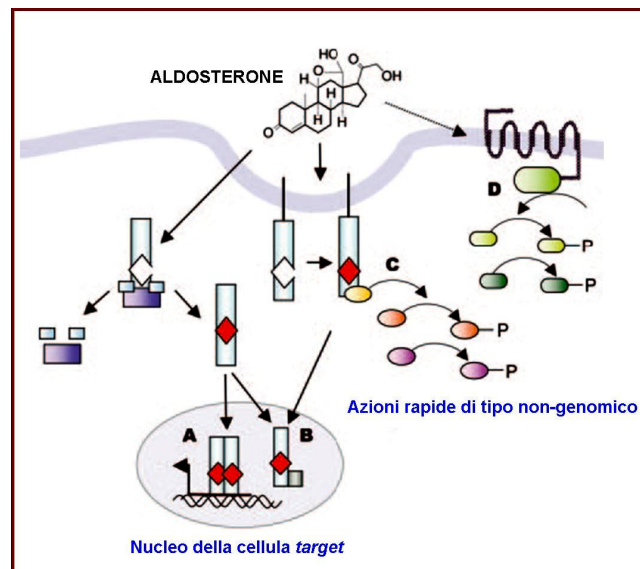


Figura 8. Rappresentazione schematica dei possibili meccanismi con cui l'aldosterone media le sue azioni nella cellula bersaglio. La classica via genomica implica un'interazione del recettore (azzurro chiaro) con il ligando (rombi rossi) e il successivo legame con sequenze specifiche del DNA (HRE, *Hormone Response Elements*) è schematizzata in A. In B è indicata l'interazione con un fattore di trascrizione HRE-indipendente. In C sono schematizzati gli effetti rapidi dell'aldosterone, mediati dal MR o da un putativo recettore *trans*-membrana (D), con conseguente attivazione, a valle, della cascata di fosforilazioni [modificato da Fuller eYoung, 2005].

L'aldosterone, mediante tale interazione, regola anche diverse funzioni cellulari, con meccanismi di risposta rapida, di tipo non genomico [Losel e Wehling, 2003; Fuller e Young, 2005; Funder, 2005a], come si vede in Figura 8.

È ormai noto che il MR possiede un'elevata omologia proteica con il GR; questi due recettori steroidei, infatti, hanno una specificità di legame marcatamente sovrapponibile, pertanto il meccanismo che regola la specificità cellulare del MR è fondamentale per la risposta finale di tipo genomico dell'aldosterone [Funder, 2005b]. Quest'ultimo tipo di risposta, almeno nei tessuti epiteliali tipicamente *target* dei mineralcorticoidi, è assicurata dalla presenza, in questi siti, dell'enzima 11 β -idrossisteroide-deidrogenasi (11 β -HSD). Tale enzima esiste nelle due isoforme 11 β -HSD1 e 11 β -HSD2, che catalizzano la conversione dei glucocorticoidi inattivi, come il cortisone, nelle forme attive, come il cortisolo, e *vice versa*, rispettivamente. In particolare, come precedentemente descritto, l'isoforma 11 β -HSD2 converte il cortisolo circolante, da 100 a 1000 volte più abbondante dell'aldosterone, nel suo deidro-derivato inattivo e numerosi studi hanno dimostrato la co-localizzazione del MR e della 11 β -HSD2 nei tipici siti *target* dell'aldosterone, cosa che garantisce un'attivazione specifica di tipo mineralcorticoidi del MR [Booth et al., 2002; Pascual-Le Tallec e Lombès, 2005].

Il MR è stato individuato, in tempi relativamente recenti, anche in cellule non epiteliali, quali i neuroni dell'ipotalamo e dell'ippocampo, i cardiomiociti e gli adipociti [Zennaro et al., 1998; Wickert et al., 2000, Pearce et al., 2003].

Sebbene sia ben documentata l'espressione del MR nel cuore e nelle arterie, rimangono ancora da chiarire i meccanismi molecolari mediante i quali il complesso MR-aldosterone regola le funzioni cardiovascolari [Lombes et al., 1995; Ngarmukos and Grekin, 2001]. Dello stesso periodo sono anche degli studi volti a dimostrare che un accumulo di linfomonociti sta alla base della fibrosi cardiaca e che, un'esacerbazione dell'effetto dell'aldosterone, porta ad un'eccessiva incorporazione di sodio in tessuti atipici [Ahokas et al., 2003].

Le cellule ematiche circolanti sono ampiamente utilizzate in studi *ex vivo* sui meccanismi fisiopatologici dell'ipertensione e del rimodellamento tessutale. In particolare viene studiata l'importanza del fenomeno di infiltrazione di leucociti mononucleati (LMN) nello sviluppo del danno nel tessuto del soggetto iperteso. Armanini, Wehling e collaboratori hanno dimostrato, già a partire dagli anni '80 [Armanini et al., 1985b; Wehling et al., 1987;

Wheling et al., 1989], che anche nei LMN è presente il recettore dei mineralcorticoidi; in queste cellule l'aldosterone normalmente controlla la concentrazione di Na^+ e di K^+ intracellulare, ma è anche in grado di aumentare la produzione di PAI-1 e di p22^{phox} , tra i vari *markers* di stress ossidativo, con un meccanismo indipendente dall'angiotensina II e inibito dal canrenone [Calò et al., 2004].

Dal momento che antagonisti del recettore dell'aldosterone, come è appunto il canrenone, inducono un miglioramento della disfunzione endoteliale e una riduzione dell'attività della NADH/NADPH ossidasi, si pensa che lo stesso aldosterone possa avere un ruolo importante nel promuovere la sintesi di sostanze ossidanti nei vasi sanguigni, sia del distretto renale, che cardiaco [Brown et al., 2000; Rocha et al., 2002; Sun et al., 2002].

1.3. IPERALDOSTERONISMI

Sindrome di Conn

Nel 1986 Armanini e collaboratori [Armanini et al., 1986], in uno studio che riguardava il livello di affinità e di capacità di legame del MR, dimostrarono una diminuzione in senso numerico di questi recettori nei LMN di pazienti affetti da sindrome di Conn (iperaldosteronismo primitivo), rispetto ai soggetti normali.

Dal punto di vista clinico, l'eccesso di aldosterone è un'evenienza più frequente della carenza di questo mineralcorticoide e si associa ad una gamma di gravi conseguenze cardiovascolari. L'aspetto classico derivante da un eccesso di aldosterone è evidente nell'aldosteronismo primitivo, descritto per la prima volta nel 1954 da Conn, da cui il nome di sindrome di Conn. I soggetti affetti da tale sindrome hanno un'elevata pressione sanguigna e generalmente sono resistenti alle usuali terapie anti-ipertensive. Si verifica un aumento della volemia, a seguito di una massiva ritenzione di sodio, mentre si riduce il contenuto ematico di potassio [Connell e Davies, 2005]. L'aldosteronismo primario è dovuto, in circa la metà dei casi, a iperplasia bilaterale idiopatica della corticale del surrene, mentre nel restante numero dei casi esso è imputabile ad un adenoma surrenalico che produce aldosterone (APA), il quale si presenta macroscopicamente come evidenziato in Figura 9 [Mattsson e Young, 2006].

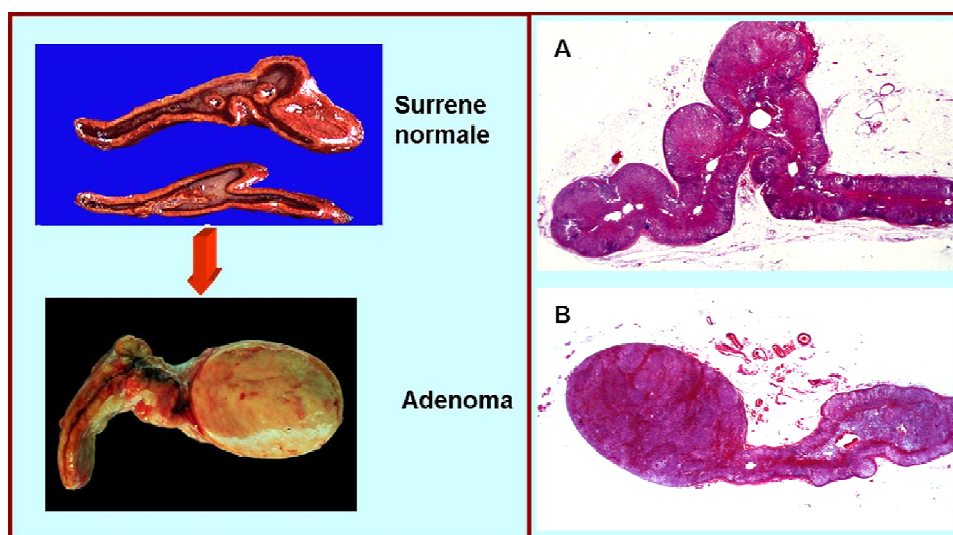


Figura 9. Preparati macroscopico (a sinistra) e istologico (a destra) di surrene umano normale (A) e di un surrene con un adenoma corticale ben evidente (B).

Recenti studi, eseguiti su vasta scala geografica [Mulatero et al., 2006], hanno dimostrato che circa il 10% dei soggetti affetti da ipertensione secondaria sono caratterizzati da un eccesso di aldosterone, pertanto la diagnosi di aldosteronismo primitivo

rappresenta una vera sfida per il clinico, a maggior ragione nei casi in cui la concentrazione del potassio ematico è normale [Mattsson e Young, 2006].

Recenti acquisizioni in merito hanno quindi indotto i clinici a considerare come parametro indicativo della presenza di iperaldosteronismo primario il rapporto aldosterone plasmatico/attività reninica in ortostatismo [Armanini et al., 2007]. È ragionevole supporre, comunque, che in tutti questi casi l'aldosterone sia il responsabile della pressione elevata e dei conseguenti danni tissutali, a carico soprattutto del sistema cardiovascolare.

La rimozione dell'APA, inoltre, porta alla completa remissione dei sintomi o comunque ad un notevole miglioramento. Numerose difficoltà sono tuttavia riscontrabili anche oggi nell'ambito della diagnosi definitiva di una sindrome di Conn e nell'individuazione dell'APA, soprattutto per le dimensioni spesso trascurabili di questi tumori, che non sempre sono visibili mediante tomografia computerizzata [Connell e Davies, 2005; Mattsson e Young, 2006].

1.4. PSEUDO-IPOALDOSTERONISMI E MUTAZIONI CORRELATE

Un qualunque difetto regolativo nel sistema di risposte biologiche attivato dal complesso aldosterone-recettore dei mineralcorticoidi (hMR), si manifesta nell'uomo con diverse patologie di rilievo, quali la resistenza ai mineralcorticoidi, vari disordini neuronali, l'ipertensione endocrina e problemi cardiovascolari [De Kloet et al., 1998; Lifton et al., 2001; Pitt, 2004; Zennaro e Lombes, 2004].

Le carenze di aldosterone possono essere classificate di tipo primitivo, secondario o essere raggruppate nell'ambito degli pseudo-ipoaldosteronismi. L'ipoaldosteronismo primitivo, o malattia di Addison, è conseguente alla distruzione del tessuto cortico-surrenalico, dovuto a infezioni, a danno tessutale diretto o a reazioni autoimmuni. Altre condizioni che portano ad una diminuita produzione di aldosterone sono determinate da disordini genetici, responsabili di alterazioni che coinvolgono l'intera ghiandola surrenale, come l'iperplasia lipoidea, l'ipoplasia surrenalica congenita o l'adrenoleucodistrofia. Analoghe conseguenze hanno anche le malattie genetiche che alterano tappe determinanti nella sintesi del mineralcorticoide (*deficit* dell'enzima 21-idrossilasi e della 3 β -idrossisteroide deidrogenasi). Negli ipoaldosteronismi primitivi l'attività della renina plasmatica (PRA) è caratteristicamente elevata. In altri casi il *deficit* di aldosterone è dovuto ad una insufficienza renale, con carenza dello stimolo che normalmente induce la sintesi di questo ormone nella glomerulosa del corticosurrene, la quale è perfettamente funzionante; sinonimo dell'ipoaldosteronismo secondario, infatti, è ipoaldosteronismo iporeninamico [Molina, 2004].

Con il termine pseudo-ipoaldosteronismo (PHA) si definisce un gruppo eterogeneo di malattie che si manifestano con una secrezione marcatamente elevata di aldosterone ed una soppressione di renina plasmatica. Quest'ultima non viene quasi del tutto secreta, per l'aumento della ritenzione renale di sodio, conseguente la presenza in eccesso di mineralcorticoidi endogeni o esogeni, oppure ad un eccesso di sostanze ad azione simil-aldosteronica (ad esempio il principio attivo della liquirizia), o a disfunzioni che coinvolgono i tubuli renali. Queste situazioni patologiche sono clinicamente individuabili per la presenza di ipertensione fin dalla nascita, ipopotassiemia e alcalosi metabolica, nonché per l'insensibilità all'aldosterone [Molina, 2004].

Nel 1997 [Ursula Khunle] il termine "pseudo-ipoaldosteronismo" veniva definito come l'insieme di almeno tre diverse sindromi cliniche, classificabili come tipo I, tipo II e tipo III. Tutti e tre i tipi di pseudo-ipoaldosteronismo sono accomunati da sintomi dovuti a resistenza ai mineralcorticoidi. In questa prima classificazione, lo PHA-I era considerato

una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva, dovuta a mutazioni che coinvolgono i geni codificanti le subunità (α , β e γ) dei canali epiteliali del sodio (ENaC), inattivandoli. Gli ENaC svolgono un ruolo primario nel trasporto Na^+ nell'epitelio del tubulo distale del rene (Figura 10) e nel tratto terminale dell'intestino [Oh and Warnock, 2000].

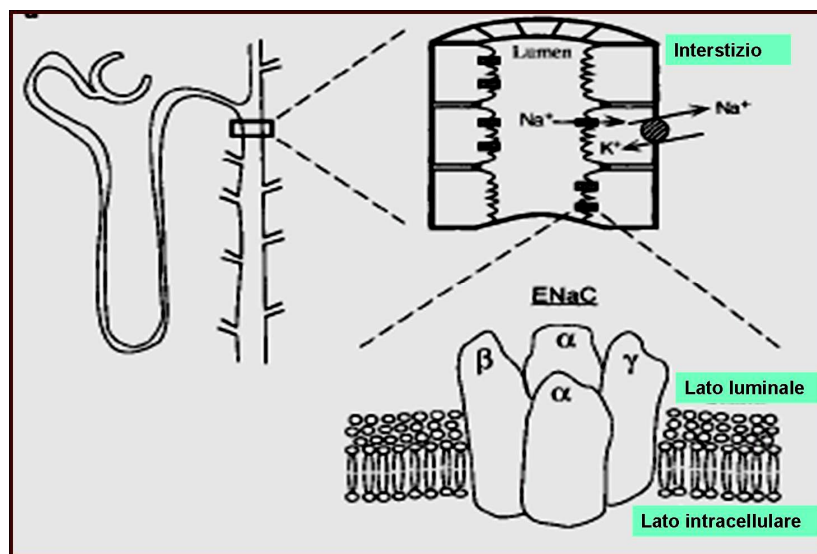


Figura 10. Rappresentazione schematica della dislocazione e della struttura dei canali epiteliali del sodio (ENaC) nel tubulo collettore del rene. Modificato da Oh and Warnock, 2000.

Nel 1985 Armanini [Armanini et al., 1985a] e collaboratori avevano dimostrato che nello pseudo-ipoaldosteronismo vi è una marcata carenza di recettori per i mineralcorticoidi e in seguito [1998] Geller e collaboratori individuarono delle mutazioni di tipo *frame-shift* presenti in eterozigoti, in grado di portare alla sintesi di una proteina recettoriale tronca. Trasmesse come caratteri autosomici dominanti, queste mutazioni determinano una severa perdita di sali alla nascita, con ipotensione, nonostante i livelli marcatamente elevati di aldosterone plasmatici, iperpotassiemia e acidosi metabolica.

Nel 2002, dopo l'individuazione di varie mutazioni coinvolgenti il gene hMR, la classificazione degli PHA è stata dunque rivista e tale rimane fino ad oggi [Bonny and Rossier, 2002], mantenendo sempre lo schema di raggruppamento in tre tipi diversi, dettato dalla Khunle nel 1997. Tutte queste sindromi rimangono comunque accomunate dalle manifestazioni cliniche e dalle caratteristiche chimico-diagnostiche sopra descritte.

Il PHA di tipo I comprende, a sua volta, due entità distinte, sulla base dei geni coinvolti, della modalità di trasmissione delle mutazioni e sulla manifestazione fenotipica della patologia. Sono inclusi in questo gruppo le patologie dovute a mutazioni nei tre geni

codificanti gli ENaC, di cui si è accennato, trasmissibili come caratteri autosomici recessivi. Le diverse mutazioni coinvolgenti il gene hMR, trasmesse con modalità autosomica dominante sono responsabili dell'altro sottotipo di pseudo-ipoaldosteronismi.

Il PHA di tipo II è invece caratterizzato da una notevole eterogeneità fenotipica e solo cinque anni fa si sono individuate le cause molecolari di questa patologia. Sono state infatti individuate mutazioni o delezioni in due membri della famiglia WNK delle serin-treonin chinasi (WNK1 e WNK4), ma il meccanismo patogenetico in grado di portare al fenotipo clinico deve essere ancora delucidato.

Il tipo III di pseudo-ipoaldosteronismo, infine, è secondario a diverse patologie renali o coinvolgenti altri organi, come le ghiandole sudoripare o l'intestino, in caso di ampie resezioni.

In figura 11 sono indicate alcune delle mutazioni missenso identificate in determinati esoni del gene hMR, responsabili di tipiche forme autosomiche dominanti di PHA di tipo I [Pascual-Le Tallec e Lombès, 2005].

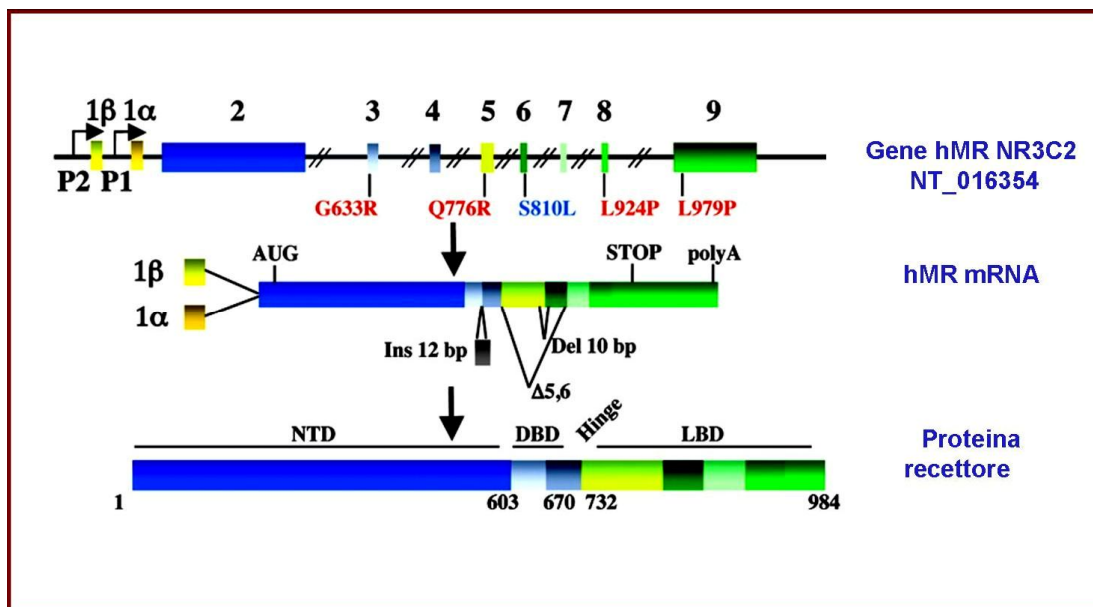


Figura 11. Schema riassuntivo della struttura del gene hMR, con indicati i due esoni alternativi 1α e 1β, i corrispondenti promotori (P1 e P2, rispettivamente) e le risultanti isoforme di mRNA. In basso è indicata schematicamente la proteina tradotta. Nel gene sono evidenziate alcune più frequenti mutazioni missenso: **G633R**, **Q776R**, **L924P**, **L979P**, responsabili dello PHA1 e la mutazione **S810L**, caratteristica dell'ipertensione da iperattività del MR (modificato da Pascual-Le Tallec e Lombès, 2005).

Dal 2003 ad oggi, sono state studiate, dal punto di vista genetico, una quindicina di famiglie con PAH di tipo 1 (MIM# 177735), causato da una mutazione genetica trasmessa come carattere autosomico dominante. Sono state individuate mutazioni puntiformi in

quasi tutti gli otto esoni codificanti del gene hMR [Sartorato et al., 2003; Sartorato et al., 2004, Geller et al., 2006; Pujo et al., 2007].

In particolare Sartorato e collaboratori [Sartorato et al., 2003], durante lo studio di 14 famiglie con una forma di PHA 1 autosomica dominante e sporadica, hanno individuato due mutazioni che provocano un *frame-shift* nell'esone 2 e una mutazione nonsense nell'esone 4, che porta alla sintesi di una proteina recettoriale tronca, e alcune mutazioni missenso negli esoni 3, 5 e 9 del gene hMR. L'anno successivo, lo stesso gruppo di ricerca ha confermato altre mutazioni missenso negli esoni suddetti in una famiglia tedesca. Dal 2006 a oggi [Geller et al., 2006; Pujo et al., 2007], la ricerca di mutazioni è stata estesa ad altri membri delle famiglie precedentemente analizzate e sostanzialmente sono state confermate le varie mutazioni riscontrate negli anni precedenti, inclusa una mutazione di un sito accettore di *splicing*, riguardante l'esone 5 del MR. A queste ultime si sono aggiunte due mutazioni missenso nell'esone 6 e una variazione nucleotidica nel sito donatore di *splicing* dell'esone 8. Allo stato attuale sono riportate, infine, una serie di variazioni di singoli nucleotidi, classificati come polimorfismi (SNP), elencati e continuamente aggiornati nel sito <http://www.ensembl.org/>.

OBIETTIVO

Le basi di partenza del nostro studio sono stati i risultati ottenuti, a partire dalla seconda metà degli anni '80, da Armanini, Wehlig e collaboratori [Armanini et al., 1985b; Wehlig et al., 1987; 1989], i quali hanno evidenziato, mediante saggi radio-recettoriali, la presenza di recettori dell'aldosterone in linfomonociti umani. Partendo da questi presupposti, abbiamo voluto confermare anche mediante RT-PCR l'esistenza del messaggero per il recettore hMR nel medesimo modello cellulare, e in spermatozoi umani. Successivamente, il disegno di RT-PCR atte a dimostrare la presenza delle varie isoforme note per il messaggero MR, ci ha indotti ad analizzare il *pattern* di tali isoforme nei medesimi tipi cellulari, per verificare se ci fossero variazioni di tipo basale anche in individui sani. Lo scopo è stato poi quello di vedere se una simile variabilità nell'espressione delle isoforme di mRNA per hMR riguardasse anche i LMN di pazienti affetti da un iperaldosteronismo primario (sindrome di Conn). In più, in coloro che avevano sviluppato un adenoma del corticosurrene secernente aldosterone (APA), si è pensato di estendere in parallelo le nostre analisi al tessuto tumorale e al surrene normale adiacente. In tale stato patologico, caratterizzato da un continuo eccesso di aldosterone circolante, con conseguente aumento della pressione sanguigna nel soggetto affetto, si è voluto verificare se la prevista *down* regolazione dell'espressione del recettore per l'aldosterone riguardasse solo una o alcune delle isoforme hMR finora individuate.

In parallelo il nostro obiettivo è stato quello di associare, nei medesimi campioni, anche l'analisi di espressione mediante RT-PCR dei geni per la 11 β -HSD di tipo 1 e 2. Si voleva verificare se negli stessi pazienti tale enzima, notoriamente espresso nel corticosurrene normale e negli APA, fosse espresso anche nei LMN dei pazienti con sindrome di Conn. In particolare il nostro obiettivo era quello di verificare se il messaggero della 11 β -HSD 2, non dimostrabile nei LMN di individui sani, fosse invece rilevabile nei pazienti analizzati, così da ottenere, accanto ad un quadro delle isoforme di hMR, un'eventuale dato sull'espressione di questo enzima nei LMN dei pazienti in oggetto. Il tutto veniva progettato e ottimizzato al fine di ottenere un rapido e aggiuntivo dato prognostico predittivo di queste forme di iperaldosteronismo, che, per una conferma definitiva, necessitano di esami diagnostici invasivi e non sempre di facile esecuzione. Una volta eseguito uno *screening* dei suddetti parametri di espressione genica, l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di analizzare un tessuto che non rientra tra i classici bersagli dell'aldosterone, ma che è noto comunque essere reattivo nei confronti di sostanze con

effetto analogo, quali l'acido 18- β glicerritinico, principio attivo della liquirizia, nonché a diversi corticosteroidi, in modo particolare al cortisone, frequentemente utilizzato nel trattamento terapeutico nell'edema della glottide [Mortensen e Woo, 2006].

Si sono pertanto analizzati, come sopra descritto, campioni di tessuto mucoso della laringe, prelevato da cinque siti differenti, al fine di dimostrare che anche questo può essere annoverato tra i tessuti atipici, finora non indagati, rispondenti all'aldosterone con modalità di tipo genomico, tramite l'interazione con il MR e le relative isoforme. Inoltre, per evidenziare che anche in queste sedi tessutali umane la risposta fosse specificamente di tipo mineralcorticoide, si è ritenuto utile indagare in parallelo l'espressione del gene 11 β -HSD di tipo2.

3. MATERIALI E METODI

3.1 ISOLAMENTO DI SPERMATOZOI UMANI DA LIQUIDO SEMINALE.

La raccolta del liquido seminale è stata eseguita seguendo il protocollo stabilito dall'Organizzazione Mondiale di Sanità (OMS), che prevede l'astinenza dall'eiaculazione nei 3/5 giorni precedenti l'esame. Come da protocollo adottato presso l'Unità Operativa di Endocrinologia, sezione Andrologia, di Padova, si procedeva all'analisi del liquido seminale entro 30 min dalla raccolta in contenitori sterili. Una volta accertato che i campioni rientravano nei parametri di normalità previsti dall'OMS (volume non inferiore a 2 mL, pH compreso tra 7,2-7,8, conta degli spermatozoi superiore a $20 \times 10^6/\text{mL}$, motilità maggiore del 25% alla seconda ora, normale morfologia in almeno il 30% delle cellule, assenza di leucociti, fluidificazione del liquido seminale), gli spermatozoi sono stati isolati mediante centrifugazione in gradiente di Percoll. Con questa modalità di isolamento e purificazione, dato il numero trascurabile di linfociti eventualmente contaminanti, i campioni cellulari potevano essere successivamente utilizzati sia per analisi in immunofluorescenza, sia per reazioni di RT-PCR. In particolare, utilizzando tubi a 15 mL, si stratificavano 2,5 mL di una soluzione di Percoll al 40% in RPMI 1640 (Invitrogen, Milano) sopra una soluzione all'80% di Percoll, sempre in RPMI 1640, privo di L-glutamina. I campioni di sperma, eventualmente diluiti con lo stesso tampone fino ad un volume di 4 mL, venivano quindi cautamente aggiunti al gradiente. I campioni venivano poi centrifugati a $750 \times g$ per 20 min, a 25-27 °C e senza sistema frenante. Gettato il soprannatante, il sedimento di spermatozoi veniva sospeso in 2 mL di RPMI 1640, quindi si centrifugava come sopra per 10 min, con freno. Si eseguiva un secondo lavaggio degli spermatozoi isolati e il precipitato, disperso con 1 mL di RPMI 1640 veniva numericamente analizzato per la seconda volta, al fine di verificare la buona resa della procedura di isolamento. Si separavano le cellule in diverse aliquote, delle quali una veniva sospesa in 1mL di *TRIzol Reagent* (Invitrogen, Milano) e tenuta a -80°C.

3.2 IMMUNOFLUORESCENZA PER L'IDENTIFICAZIONE DI MR IN SPERMATOZOI UMANI.

Alcune aliquote di spermatozoi isolati dal liquido seminale come sopra descritto (10 μL di una sospensione contenente $1 \times 10^6/\text{mL}$ spermatozoi) venivano strisciate ciascuna su di un vetrino portaoggetti, lasciate asciugare a temperatura ambiente e poi fissate in acetone a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ per 30 min. I campioni fissati su vetrino venivano lasciati ad asciugare per 5 min a temperatura ambiente, quindi si eseguivano due lavaggi in tampone PBS (GIBCO, Milano) di 3 min ciascuno.

Sempre operando a temperatura ambiente, un vetrino veniva pre-incubato per 30 min uno con un eccesso di aldosterone (5 μM), un secondo vetrino con RU-486, un antagonista dell'aldosterone che non interagisce con il MR, un terzo vetrino veniva a contatto contemporaneamente con l'aldosterone e l'RU-486 e un quarto vetrino veniva lasciato con il solo campione fissato tal quale. L'utilizzo di aldosterone, che lega specificamente il MR e del suo antagonista RU-486 ci è servito a dimostrare la specificità di legame al MR dell'anticorpo primario utilizzato. Il vetrino contenente il campione tal quale, veniva allestito in doppio, per avere un corrispettivo controllo negativo. Seguiva un'incubazione di tutti i campioni, eccetto il controllo negativo, per 2 h, con un anticorpo monoclonale di topo anti -idiotipo (1:200 in 1X PBS; H10E, Vinci-Biochem, Brescia), che riconosce il sito di legame dell'aldosterone nel MR umano [Lombes et al., 1989]. Si eseguivano altri due lavaggi dei vetrini con PBS e si incubavano per 1 h con l'anticorpo secondario (anticorpo di pecora anti IgG di topo), coniugato con rosso di rodamina (1:200 in 1X PBS; 100 μL per ciascun vetrino). Dopo due lavaggi di 5 min in PBS, i vetrini venivano trattati per 1 min con una soluzione 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di 14'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), sostanza fluorescente che visualizza in blu i nuclei cellulari. Infine, dopo tre lavaggi dei vetrini in 1X PBS, i risultati venivano elaborati con immagini digitali ottenute al microscopio a fluorescenza.

3.3 ISOLAMENTO DI LEUCOCITI MONONUCLEATI (LMN) DA SANGUE PERIFERICO.

Per gli studi di espressione delle diverse isoforme dei geni hMR e del gene 11 β -HSD di tipo 1 e 2 nelle cellule ematiche mononucleate, sono stati utilizzati 20 mL di sangue intero contenente eparina (15-25 U/mL). L'eparina non contrasta con le successive reazioni delle polimerasi e permette di mantenere inalterate le proprietà del plasma e delle cellule per tutto il tempo necessario al trasporto dal punto del prelievo al laboratorio. I campioni ematici sono stati raccolti e processati allo stesso modo, sia che provenissero da volontari sani consenzienti, sia che fossero prelevati dai pazienti affetti da sindrome di Conn, previa firma del consenso informato, sia da pazienti che venivano sottoposti a surrenalectomia nel medesimo giorno del prelievo, grazie alla collaborazione del Dr. Maurizio Iacobone, presso la Chirurgia Endocrina del Policlinico Universitario di Padova. I pazienti afferivano all'Unità di Endocrinologia dell'Istituto di Semeiotica Medica. In tutti i casi elencati, l'isolamento dei linfomonociti (LMN) è stato ottenuto mediante centrifugazione del sangue periferico in gradiente di *Ficoll Paque* (Amersham Pharmacia Biotech, Milano), il quale sfrutta la diversa densità delle cellule mononucleate rispetto agli eritrociti e ai granulociti polimorfonucleati, che si ritrovano sul fondo della provetta dopo centrifugazione (Figura 12). Il sangue, opportunamente diluito con terreno RPMI 1640, veniva accuratamente stratificato in rapporto 1:3 sopra uno strato di *Ficoll* contenuto in un tubo da 50 mL per ogni campione, evitandone il rimescolamento. I campioni sono stati quindi centrifugati, senza sistema frenante, per 30 min a 800 x g e a 20°C e, dopo la rimozione del plasma sovrastante, l'anello di LMN che si forma all'interfaccia con il *Ficoll* è stato accuratamente aspirato con pipetta Pasteur sterile e trasferito in un tubo da 15 mL.

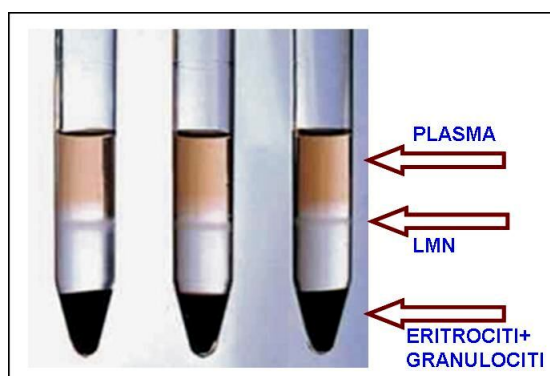


Figura 12. Stratificazione delle componenti del sangue intero dopo centrifugazione in gradiente di *Ficoll Paque*. La freccia indica l'anello di LMN visibile all'interfase.

Si aggiungevano 5 mL di RPMI 1640 e si eseguiva una seconda centrifugazione per 10 min a 800 x g, con freno. Il precipitato di LMN veniva lavato con 5 mL dello stesso tampone e centrifugato per 5-10 min alla medesima velocità. Risospesi i campioni in 1 mL di RPMI 1640 e trasferiti in provette sterili da 2 mL, si effettuava la conta dei LMN al microscopio ottico (10 µL della sospensione cellulare), utilizzando una camera di *Neubauer*, dopo colorazione dei nuclei con *Methyl violetto*. La resa finale era mediamente di 500.000 LMN/mL di sangue intero.

La sospensione cellulare, centrifugata a 850 x g per 5 min, veniva infine lisata con 1 mL di *TRIZol Reagent* e tenuta a -80°C per le successive analisi di biologia molecolare.

3.4 RT-PCR PER L'ANALISI DELLE VARIANTI DEI TRASCritti PER hMR E PER LA 11 β -IDROSSISTEROIDE-DEIDROGENASI (11 β -HSD) 1 E 2 IN CELLULE E TESSUTI UMANI NORMALI E PATOLOGICI.

Raccolta dei campioni di tessuto, estrazione, purificazione dell'RNA totale e reazioni di RT.

Sono stati inizialmente reclutati, previo consenso informato, 5 soggetti sani e 5 pazienti affetti da iperaldosteronismo primitivo, afferenti all'Unità di Endocrinologia di Padova. A questi si sono successivamente aggiunti 6 pazienti (dei quali cinque erano donne) con sindrome di Conn, sottoposti a surrenalectomia unilaterale presso l'Unità di Chirurgia Endocrina del Policlinico Universitario di Padova (Dr. Maurizio Iacobone). Per i pazienti affetti da iperaldosteronismo primitivo, venivano prima raccolti i dati clinici per confermare la diagnosi (prima dell'intervento di asportazione dell'APA, le pazienti avevano una pressione arteriosa media 150/95; l'aldosterone plasmatico in ortostatismo era compreso tra 50 ng/dL e 250 ng/dL, con valori di normalità di 3-32 ng/dL; l'attività reninica plasmatica (PRA) in ortostatismo era attorno a 0,5 ng/mL/24h, con valori di normalità 1,3-5,2 ng/ml/24h, ed un rapporto tra aldosterone plasmatico e PRA in ortostatismo variabile tra 100 e 500 ng/dL). Per tutti i soggetti, si sono raccolti e separati, mediante centrifugazione in gradiente di *Ficoll*, i LMN da 20 mL di sangue periferico contenente eparina. Tutti i campioni di tessuto analizzati (inclusi i campioni di tessuto laringeo normale, distante da una lesione carcinomatosa, che ci sono stati forniti dall'Unità di Otorinolaringoiatria del Policlinico di Padova, Dr. Ragona), al momento del prelievo sono stati raccolti in *vial* da congelamento, ciascuna contenente 1 mL di *RNAlater* (Ambion) e tenuti a -20 °C fino al momento dell'estrazione dell'RNA totale.

L'RNA totale è stato estratto e purificato sia dai LMN, sia dai tessuti, utilizzando la metodica suggerita dal protocollo *TRIzol Reagent* (Invitrogen, Milano), cui venivano apportate opportune modifiche, in relazione al tipo di campione trattato. Per quanto concerne i campioni di tessuto corticosurrenale normale e l'APA, venivano utilizzati 50-70 μ g ad ogni estrazione di RNA. Come da metodica, tutte le centrifugazioni venivano eseguite a +4 °C e, dopo l'aggiunta di un uguale volume di isopropanolo alla fase liquida accuratamente recuperata dalla precedente centrifugazione in cloroformio e trasferita in nuove provette sterili da 1,5 mL, la precipitazione dell'RNA totale veniva eseguita lasciando i campioni per circa 1 h a -20 °C. Dopo ulteriore centrifugazione a 12.000 x g e a +4 °C, veniva gettato il soprannatante e si eseguiva un lavaggio in 500 μ L di etanolo al 75%, centrifugando i campioni per 5 min a 7.500 x g, sempre a +4 °C. Gettato nuovamente

il soprannatante per inversione, l'etanolo rimanente veniva lasciato asciugare sotto cappa chimica di aspirazione, quindi l'RNA totale veniva sospeso in 50 μL di H_2O sterile e libera da RNAsi. Un'aliquota di 2 μL dell'RNA totale così ottenuto veniva misurato allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm, e veniva tenuto in considerazione anche il rapporto tra la lettura a 260 nm e quella a 280 nm, spettro di assorbimento tipico delle proteine. Per le successive reazioni di RT, venivano utilizzati 2 μg dei campioni aventi un rapporto 260 nm/280 nm superiore a 1,7. Per ciascun campione di RNA totale veniva anche eseguita una verifica qualitativa mediante elettroforesi di un'aliquota di 2 μL in gel di agarosio all'1% in tampone 0,5 X TAE, addizionato di 5 μL di una soluzione di bromuro di etidio al 10% in peso/volume. Per i campioni che mostravano due bande nette corrispondenti agli RNA ribosomiali 18S e 28S (Figura 13), si procedeva alle reazioni di retrotrascrizione (RT), come di seguito descritto.

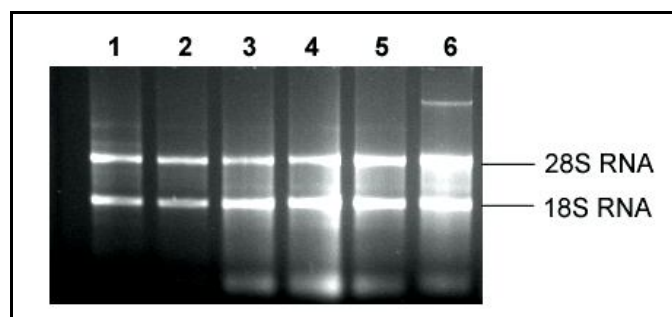


Figura 13. Campioni di RNA totale estratto da LMN (corsia 6) e da tessuto surrenale (corsie da 1 a 5), qualitativamente testati mediante elettroforesi in gel di agarosio, contenente bromuro di etidio.

Le reazioni di RT sono state condotte in un termociclatore 2700 GeneAmp PCR System (Applied Biosystems). Venivano utilizzati 2 μg di RNA totale per reazione, in un volume finale di 20 μL , contenente i *random* esanucleotidi, forniti dal *kit Reverse Transcription System* (Promega, Milano), che prevedeva l'enzima M-MLV murino come trascrittasi inversa.

Dopo un pre-riscaldamento dell'RNA, opportunamente diluito, a 70 $^{\circ}\text{C}$ per 10 min, si aggiungeva la miscela di reazione, contenente 10 U dell'enzima M-MLV e 4 U di enzima *RNasin*, anch'esso fornito dal *kit* Promega e utile ad evitare il più possibile la degradazione dell'RNA totale nelle fasi preliminari dell'RT. La reazione veniva condotta a 42 $^{\circ}\text{C}$ per 60 min, seguita da un riscaldamento a 90 $^{\circ}\text{C}$ per 5 min, necessario per l'inattivazione degli enzimi utilizzati.

RT-PCR per l'individuazione di isoforme di messaggero per hMR

Tutti i *primer* sono stati disegnati sulle sequenze dei vari mRNA analizzati, utilizzando il programma *Primer3*, disponibile nel *Web*. Nel disegno degli oligonucleotidi specifici si immettevano nel programma alcuni parametri comuni a tutti, in modo da uniformare il più possibile le modalità di esecuzione delle diverse PCR a partire dalle stesse quantità di cDNA. In particolare: la lunghezza scelta per ciascun *primer* era compresa tra 20 e 25 nucleotidi; si impostava una differenza massima di 5 °C tra le temperature di *melting* dei *primer* senso e antisenso; si limitava la ricerca ai *primer* aventi una complementarità al 3' non superiore alle 3 basi nucleotidiche, in modo da evitare al massimo la formazione di dimeri di *primer* durante le reazioni di polimerizzazione.

Sono stati inizialmente disegnati due *primer* atti a riconoscere un tratto specifico del cDNA del gene hMR (M16801). In particolare si è scelto il *primer* senso complementare ad un tratto posto all'estremo 5' dell'esone 2 codificante e il *primer* antisenso complementare al tratto di cDNA posto a cavallo tra l'esone 3 e l'esone 4, in modo da evitare il più possibile la contemporanea amplificazione di DNA genomico residuo. Lo stesso tratto del cDNA di hMR codifica per la porzione N-terminale del recettore, la parte meno conservata e altamente specifica del MR.

Sono stati quindi disegnati gli oligonucleotidi specifici per la contemporanea individuazione delle isoforme tronche dell'mRNA del gene MR (hMR Δ 5 e hMR Δ 5,6), che la dottoressa Maria Cristina Zennaro, della Facoltà di Medicina Xavier Bichat di Parigi aveva a suo tempo individuato in vari tessuti umani (rene, cuore, cervello). Tali *primer* sono stati scelti in un tratto dello hMR mRNA (NM_000901) comprendente gli esoni dal 4 al 7, inclusi, i quali codificano per l'intera porzione LBD legante l'aldosterone, conservata tra i mammiferi e l'uomo [Zennaro et al., 2001]. Gli amplificati ottenuti con l'utilizzo dei *primer* disegnati come sopra descritto differivano di poco nella lunghezza di ciascun amplificato, rispetto a quelli ottenuti da Zennaro e collaboratori (664 bp per lo hMR *wild type*, 313 bp per la hMR Δ 5 e 192 bp per l'isoforma hMR Δ 5,6).

Le sequenze dei *primer* che fornivano i tre amplificati sopra citati erano:

- hMR 4-7 F: 5'-ATGTGCTGGAAGAAATGATTG-3';
- hMR 4-7 R: 5'-GAACTGAAGGCTGATTTGGTG-3'.

Sono stati poi disegnati *primer* per mettere a punto una RT-PCR atta a individuare, in due reazioni distinte le isoforme hMR α o hMR β . Per l'isoforma hMR α si è considerato un tratto al 5' dell'mRNA di hMR che includeva l'intero esone non tradotto 1 α , come da

sequenza depositata in *NCBI GenBank* (NM_000901), partendo dalla quale veniva costruito anche il tratto corrispondente all'esone 1 β , seguito dalla stessa porzione del 5' mRNA di hMR α , in modo da sfruttare il medesimo *primer reverse* per entrambe le PCR (Tabella 1).

RT-PCR per l'individuazione degli mRNA per la 11 β -HSD di tipo 1 e 2

Anche in questo caso, il disegno dei *primer* specifici è stato fatto sulle sequenze umane dell'mRNA per la 11 β -HSD 1 e 2, depositate nella *NCBI GenBank* (NM_181755 e NM_000196, rispettivamente) mediante il programma *Primer3*, impostando i parametri sopra descritti. Per la 11 β -HSD 1 i *primer* coprivano un tratto del gene (M68487) compreso tra gli esoni 4 e 5. Parimenti venivano disegnati i *primer* impiegati per l'amplificazione del cDNA di due geni costitutivi considerati come controlli interni della qualità della reazione di retrotrascrizione e successiva amplificazione; si utilizzavano nello specifico il cDNA per la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH, NM_002046), e un frammento di 265 bp del 18S rRNA (AB193747).

Tabella 1. Elenco dei *primer* utilizzati con l'indicazione delle specifiche temperature di *annealing* (Ta) nella PCR e della lunghezza degli amplificati.

RNA	Sequenza <i>primer</i>	Amplificato (bp)	Ta (°C)
hMR	F: 5'- GCTTTGATGGTAACTGTGAAGG-3' R: 5'- TGTGTTGCCCTTCCACTGCT-3'	471	60
hMR α	F: 5'-GGATGTGGTTGGATTTAGGG-3' R: 5'-GCTTCCTTGTTGGTTCTGCT-3'	483	58
hMR β	F: 5'-TATCATCCTCTCCATCCTCACC-3' R: 5'-GCTTCCTTGTTGGTTCTGCT-3'	548	58
11HSD1	F: 5'-ACCACATCACCAACACTTCTTTGA-3' R: 5'-AACACAGAGAGTGATTGATACATTGA-3'	298	55
11HSD2	F: 5'-GGGCCTATGGAACCTCCAA-3' R: 5'-GACCCACGTTTCTCACTGACTCT-3'	134	57
GAPDH	F: 5'-GGGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' R: 5'-AGCAGAGGGGGCAGAGATGAT-3'	375	62
18S rRNA	F: 5'-TCGAATGTCTGCCCTATCAAGT-3' R: 5'-AGACTTGCCCTCCAATGGATC-3'	265	58

Per ciascuna PCR veniva anche allestito un controllo negativo, contenente acqua sterile in luogo del cDNA, al fine di individuare eventuali contaminazioni da precedenti reazioni. Le reazioni di PCR venivano eseguite in un termociclatore 2700 GeneAmp PCR System (Applied Biosystems, Monza). Il cDNA ottenuto dalle varie reazioni di retrotrascrizione dell'RNA totale estratto da cellule e tessuti, veniva amplificato mediante PCR condotte in un volume finale di reazione di 25 μ L che conteneva: Tris-HCl 10 mM,

pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ ad una concentrazione variabile tra 1,5 e 2 mM, a seconda della reazione specifica, dNTP 0,2 mM ciascuno, 0,2 μM di ciascun oligonucleotide specifico e 1,25 U di *Taq* DNA polimerasi (Promega, Milano).

La *Taq* DNA polimerasi veniva attivata a 94 °C per 5 min, seguivano 37 cicli di reazione, con ogni ciclo che prevedeva una fase di 30 sec di denaturazione, seguita da 30 secondi ad una temperatura specifica per l'appaiamento dei *primer* utilizzati (Tabella 1) e dalla fase di estensione a 72 °C per altri 30 sec.

Nel'ultimo ciclo la fase di estensione veniva prolungata a 7 min ed infine un'aliquota di 5 μL dei prodotti di PCR veniva esaminata mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1,5% in tampone 0,5 X TAE, addizionato di 5 μL di una soluzione al 10% di bromuro di etidio.

Sequenziamento dei prodotti di RT-PCR.

I vari prodotti di RT-PCR sono stati di volta in volta sequenziati per verificarne la specificità con i messaggeri presi in esame.

La purificazione dei campioni amplificati è stata fatta con l'utilizzo di colonnine munite di filtro, tipo *Microcon 100Y* (Millipore), mediante una prima centrifugazione a 1.200 x g per 15 min del campione diluito con 100 µL di H₂O sterile. Seguiva una seconda centrifugazione alla medesima velocità per 5 min, dopo l'aggiunta di 20 µL di H₂O sterile alle stesse colonnine, le quali venivano inserite in nuovi tubi di raccolta, in posizione ribaltata rispetto alla fase precedente.

Inizialmente sono state verificate anche le sequenze di alcuni amplificati in RT-PCR per l'individuazione delle isoforme hMRΔ5 e hMRΔ5,6. Nei casi in cui erano ben visibili, i due frammenti di lunghezza maggiore (664 bp e 313 bp) venivano purificati da gel di agarosio utilizzando il *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Milano), seguendo la metodica suggerita nel *kit*.

Prima di procedere al sequenziamento automatico, come di seguito descritto, un'aliquota di 2 µL dei prodotti purificati veniva sottoposta ad elettroforesi in gel di agarosio contenente bromuro di etidio, e le specifiche bande visibili nel gel erano quantificate rispetto ad uno standard di DNA, con l'utilizzo del programma *Quantity One*. In tal modo si utilizzava la quantità ottimale di amplificato nella successiva reazione di sequenza.

Le reazioni di sequenza sono state fatte utilizzando il kit *ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Core* (Applied Biosystems, Monza, Italy) e le successive reazioni di elettroforesi capillare venivano completate in un sequenziatore automatico ABI PRISM 377, versione 2.1.1. I risultanti cromatogrammi di sequenza, analizzati con il programma *Bio Edit*, erano sottoposti ad un'accurata ricerca dell'omologia con messaggeri oggetto del presente studio, utilizzando il programma *Basic Blast*, disponibile nel *web* al sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

3.6 SEQUENZIAMENTO DEL GENE hMR IN UNA FAMIGLIA CON PSEUDOIPOALDOSTERONISMO DI TIPO I

Estrazione di DNA genomico da sangue intero, PCR e sequenziamento

Il Dr. Radetti, che opera presso l'Unità Operativa di Endocrinologia dell'Ospedale di Bolzano, ha clinicamente individuato una famiglia con pseudo-ipoaldosteronismo di tipo I (PHAI), composta da madre (27 anni), padre (36 anni) e figlio di due mesi, identificato come probando. Come richiestoci, si è proceduto al sequenziamento di tutti gli esoni codificanti il gene hMR nel probando e nei genitori. I campioni di sangue intero, anticoagulato con eparina, sono stati aliquotati, all'arrivo, in provette da 1,5 mL ciascuna. Dopo avere utilizzato 200 µL di ciascun campione di sangue, le rimanenti aliquote venivano tenute a -20 °C, per eventuali successive estrazioni di DNA genomico.

Il DNA genomico è stato isolato e purificato utilizzando il kit *QIAmp DNA blood Mini Kit* (Qiagen), che prevede l'uso di colonnine munite di membrana e l'incubazione iniziale del campione con proteinasi K (10 µL di una soluzione 10 ng/mL). Il DNA così ottenuto, eluito con 100 µL di H₂O sterile, è stato quantificato allo spettrofotometro a 260 nm, misurando anche il rapporto di assorbanza 260/280.

Le coppie di *primer* sono state disegnate mediante il programma *Primer3* sulla sequenza dell'intero gene per hMR (NT_016354), mantenendo i parametri fin qui descritti, eccetto per la lunghezza massima consentita per gli oligonucleotidi, maggiore di 5 nucleotidi rispetto ai *primer* utilizzati nelle reazioni di RT-PCR, per garantirne la maggiore specificità di appaiamento compatibilmente con le opportune condizioni di stringenza delle varie reazioni di PCR. Trattandosi di DNA genomico, oltre all'intera regione codificante di ciascun esone del gene hMR, venivano amplificati almeno 50 nucleotidi sia al 5' che al 3', così da comprendere i siti di *splicing* ed eventuali siti regolatori in *cis* di questi ultimi e si è fatto in modo da ottenere amplificati di lunghezza variabile tra 400 bp e 660 bp, per poterli agevolmente sequenziare.

Ogni reazione di PCR veniva eseguita in un volume finale di 25 µL, con l'impiego di un termociclatore *2700 GeneAmp PCR System* (Applied Biosystems). Per ogni reazione di PCR si utilizzavano 2 µL in una miscela di reazione contenente: Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM ciascuno, 0,2 µM di ciascun oligonucleotide specifico e 1,25 U di *Taq* DNA polimerasi (Promega, Milano). La polimerasi veniva attivata a 94 °C per 5 min, seguivano 40 cicli di reazione, con ogni ciclo che prevedeva una fase di 30 sec di denaturazione, seguita da 30 secondi ad una temperatura specifica per ciascuna coppia di *primer* utilizzata e dalla fase di estensione a 72 °C per altri 30 sec.

Nel'ultimo ciclo la fase di estensione veniva prolungata a 10 min ed infine un'aliquota di 5 μ L dei prodotti di PCR veniva esaminata mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1,5% in tampone 0,5 X TAE, addizionato di 5 μ L di una soluzione al 10% di bromuro di etidio.

Una volta messe a punto le diverse reazioni di PCR, venivano purificati e sequenziati solamente gli amplificati che davano una banda netta, come mostrato in Figura 14.

Tutti gli esoni sequenziati venivano analizzati con l'*NCBI Blast*, per confermarne l'identità con le corrispondenti sequenze del gene hMR depositate nel *web*. Successivamente gli stessi amplificati di ciascun membro della famiglia sottoposta allo studio, assieme alle sequenze degli esoni depositati in banca dati e ai tratti sequenziati provenienti da volontari sani, sono state confrontate tra loro utilizzando programma *ClustalW Sequence Alignment*, al fine di individuarne eventuali differenze nucleotidiche.

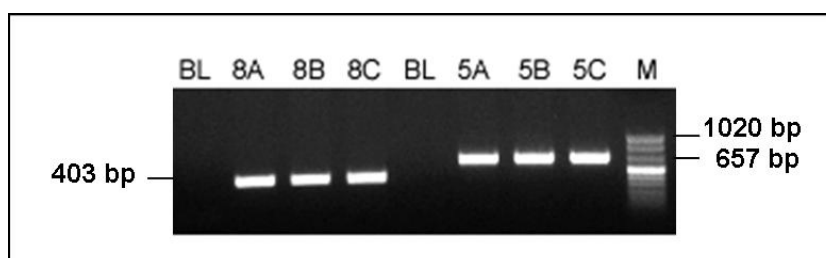


Figura 14. Elettroforesi in gel d'agarosio dei prodotti di PCR per gli esoni 8 (403 bp) e 5 (657 bp) del gene hMR, sottoposti a purificazione e successivo sequenziamento automatico. Corsie 8A, 8B, 8C= esone 8 della madre, del probando e del padre, rispettivamente; corsie 5A, 5B e 5C= esone 5 degli stessi soggetti. M=DNA *Molecular Weight Marker*. BL=controllo negativo con H₂O.

RISULTATI

Il MR in spermatozoi e in leucociti mononucleati umani

L'iniziale messa a punto di specifiche reazioni di RT-PCR ci hanno permesso di dimostrare che il gene MR è effettivamente ben espresso nei linfociti mononucleati (LMN) di soggetti sani, dal cui cDNA si otteneva un amplificato atteso di 471 paia di basi (Figura 15). Tale frammento è stato sequenziato per confermarne, mediante il *NCBI Blast*, l'identità con il messaggero per il recettore umano oggetto dei nostri studi (#M16801).

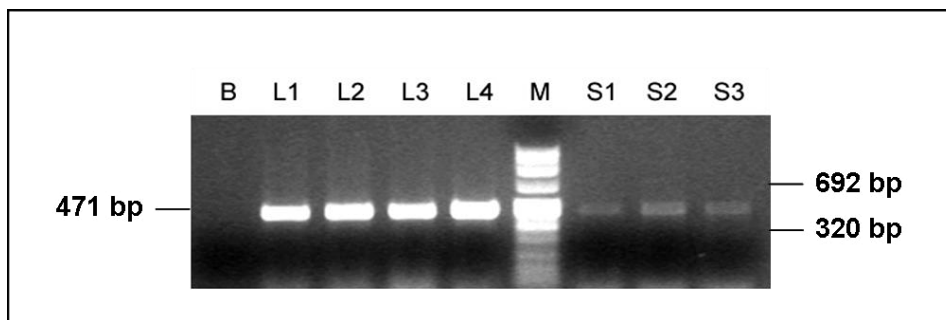


Figura 15. Elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di RT-PCR eseguita con *primers* specifici per hMR in campioni di cDNA sintetizzato da linfociti mononucleati (L1-L4) e da spermatozoi umani (S1-S3), isolati da individui diversi. L'amplificato atteso è di 471 paia di basi. M=DNA *Molecular Weight Marker VIII*, Roche Diagnostics. B=controllo negativo.

Come si evince dalla Figura 15, il gene hMR, seppure in minore quantità, è espresso anche negli spermatozoi umani, per i quali le reazioni RT-PCR hanno rivelato la presenza di un amplificato specifico di 471 paia di basi, avente una sequenza analoga a quella ottenuta per gli amplificati da LMN visibili sempre in Figura 15 (corsie L1-L4). Come controllo interno di espressione in questo caso è stato utilizzato il prodotto di RT-PCR dell'mRNA per GAPDH [Fiore et al., 2006], come descritto nei materiali e metodi (dati non mostrati).

Questi primi risultati sull'espressione del gene hMR in spermatozoi umani sono stati successivamente confermati mediante immunofluorescenza specifica per la proteina recettore, che, come si vede in Figura 16, è ubicata nella porzione intermedia della testa e a livello della coda dello spermatozoo (Figura 16b). Nel controllo negativo (Figura 16a), che non è stato messo a contatto con l'anticorpo primario specifico, sono visibili in blu solamente le teste degli spermatozoi, per l'effetto del colorante fluorescente di contrasto 14'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

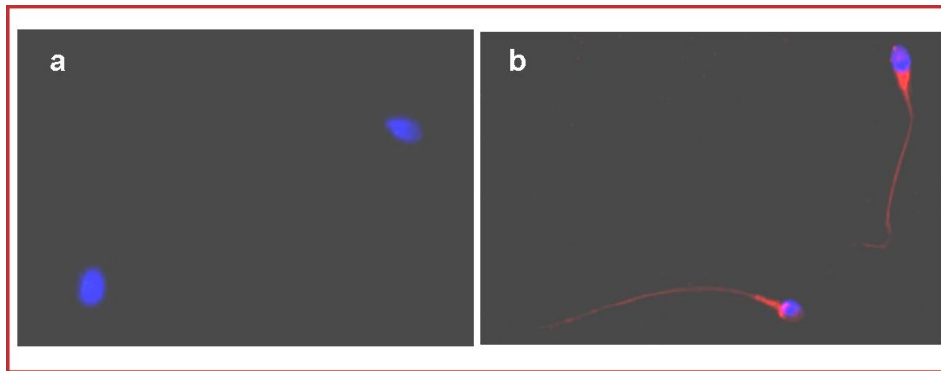


Figura 16. Immunofluorescenza su striscio di spermatozoi umani. A sinistra (a) il controllo negativo evidenzia solamente i nuclei degli spermatozoi in blu (DAPI), mentre sulla destra (b) il MR appare in rosso per la reazione con l'anticorpo secondario coniugato con rosso di rodamina.

Conseguentemente ai risultati appena descritti abbiamo iniziato un'analisi delle isoforme dello hMR mRNA, sia in linfomonociti (Figura 17) che in spermatozoi (Figura 18) umani, isolati da alcuni soggetti volontari sani.

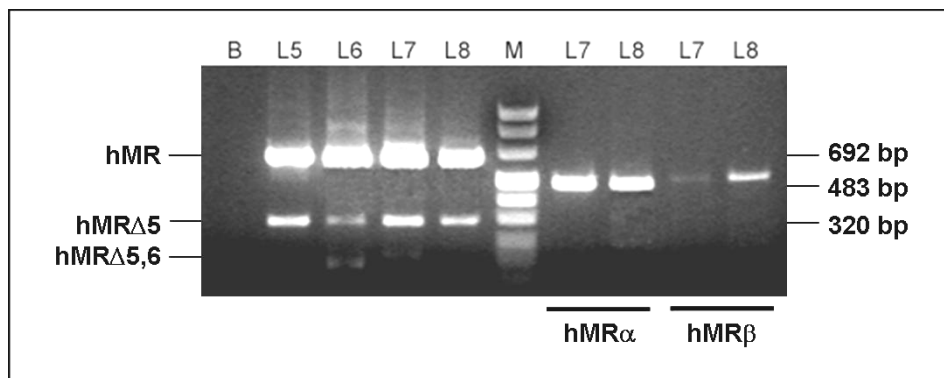


Figura 17. Elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di tre RT-PCR eseguite utilizzando *primers* specifici per hMR *wild type* e per le isoforme Δ (corsie L5-L8) e specifici per hMR α e hMR β (corsie L7-L8) in campioni di cDNA sintetizzato da LMN umani, isolati da quattro volontari sani. Gli amplificati attesi sono di 664 bp, 313 bp e 192 bp per hMR *wild type*, hMR Δ 5 e hMR Δ 5,6, rispettivamente e di 483 bp e 548 bp, per hMR α e hMR β , rispettivamente. M=DNA *Molecular Weight Marker VIII*, Roche Diagnostics. B=controllo negativo.

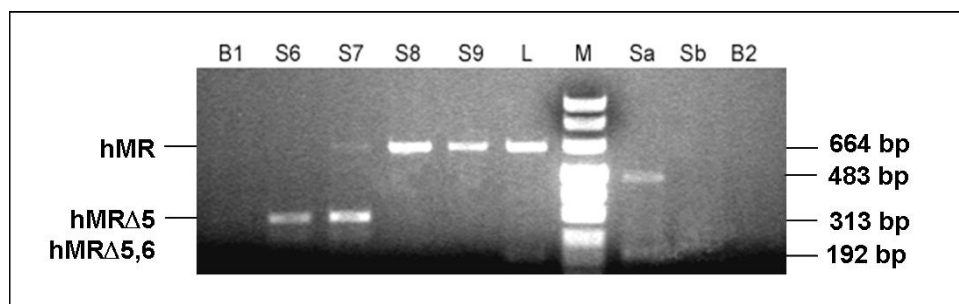


Figura 18. Elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di tre RT-PCR eseguite utilizzando *primers* che co-amplificano hMR *wild type* (664bp) ed entrambe le isoforme Δ (313 bp e 192 bp, corsie S6-S9) e specifici per hMR α e hMR β (484 bp e 548 bp, corsie Sa e Sb, rispettivamente), in campioni di cDNA di spermatozoi umani, isolati da individui diversi. L=campione di LMN di controllo; M=DNA *Molecular Weight Marker VIII*; B1 e B2=controlli negativi.

Da queste RT-PCR è emersa l'evidenza di una variabilità individuale relativa al *pattern* di espressione delle varie isoforme di mRNA dell'hMR, particolarmente evidente nei LMN, ma che è visibile anche negli spermatozoi umani isolati da individui sani (Figura 18).

Co-espressione di isoforme del messaggero per hMR e per 11 β -HSD in LMN e in surrene di pazienti affetti da sindrome di Conn.

Dalle figure 19 e 20 si evince come, sia nei campioni di LMN e nel tessuto surrenale con adenoma secernente aldosterone analizzato, sia nei LMN isolati da soggetti sani, sono ben evidenziabili i prodotti di RT-PCR dello hMR *wild type* (Figura 19) e dell'isoforma hMR α (Figura 20).

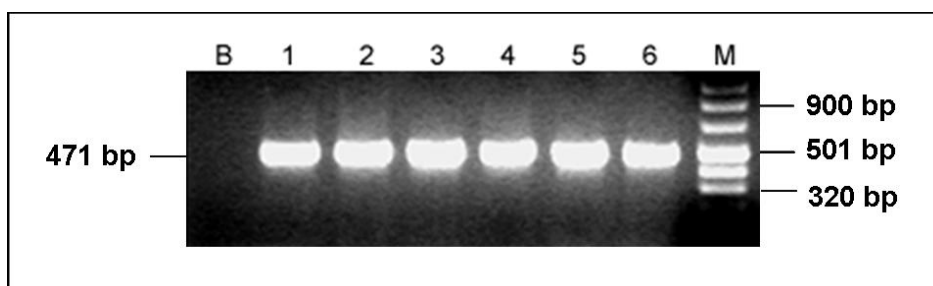


Figura 19. Elettroforesi in gel d'agarosio dei prodotti di RT-PCR per hMR (471 bp) di alcuni campioni rappresentativi. B=controllo negativo; corsia 1= tessuto surrenale tumorale di una paziente con APA; corsia 2= LMN isolati dalla stessa paziente; corsia 3= LMN isolati da una paziente affetta da iperaldosteronismo primitivo; corsie 4 e 5= LMN isolati da due soggetti sani; corsia 6= controllo positivo (biopsia di rene). M=DNA Molecular Weight Marker VIII.

Tutti gli amplificati per il messaggero dello hMR e delle due isoforme hMR α e hMR β , mostrati nelle figure 19, 20 e 21, sono stati sequenziati, da un lato per verificarne l'identità con il messaggero dei geni in esame, mediante l'*NCBI Blast*, dall'altro per individuare all'interno dei tratti di cDNA amplificato eventuali variazioni della sequenza nucleotidica, rispetto ai campioni di tessuto e ai LMN normali di riferimento. L'analisi delle sequenze dei frammenti specifici di cDNA indicati nelle Figure 20 e 21 non ha comunque evidenziato la presenza di differenze nucleotidiche tra i soggetti sani e i pazienti iperaldosteronemici.

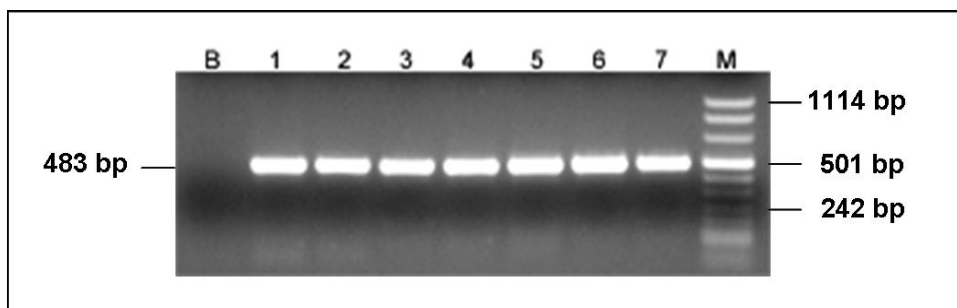


Figura 20. Elettroforesi in gel d'agarosio dei prodotti di RT-PCR per hMR α (483 bp) di alcuni campioni rappresentativi. B= controllo negativo; corsie 3 e 6= LMN di due pazienti con APA; corsie 1 e 4= tessuto corticosurrenale normale, adiacente l'adenoma, delle medesime pazienti; corsie 2 e 5= tessuto surrenale tumorale delle stesse pazienti; corsia 7= controllo positivo (biopsia di rene). M= DNA Molecular Weight Marker VIII.

Dall'analisi in RT-PCR delle isoforme hMR α e hMR β , come mostrato nelle figure 20 e 21, è risultato evidente che hMR β (Figura 21), a differenza di hMR α (Figura 20), è espressa in modo disomogeneo tra i vari campioni di tessuto oggetto del nostro studio e i LMN provenienti da due pazienti che hanno sviluppato un adenoma del corticosurrene secernente aldosterone (Figura 21). In questo caso, come controllo interno di espressione si è considerato l'amplificato di un tratto di 265 paia di basi del 18S rRNA, come mostrato in figura 21.

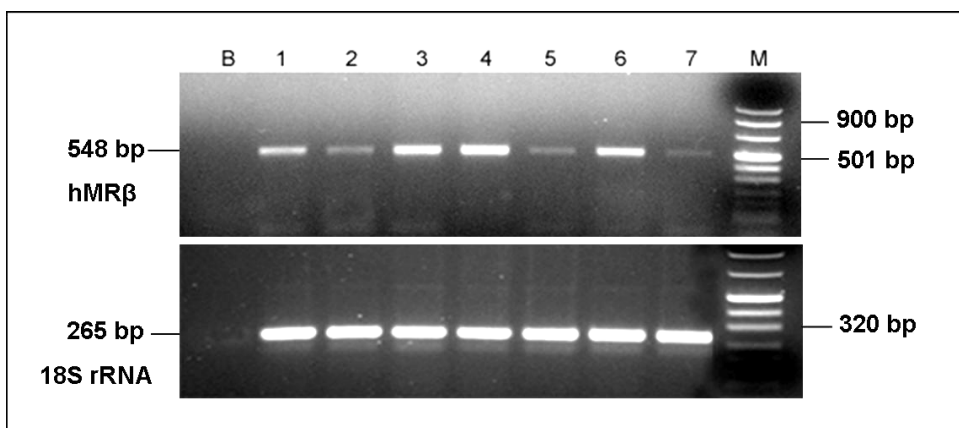


Figura 21. Elettroforesi in gel d'agarosio dei prodotti di RT-PCR per hMR β (parte superiore, 548 bp) e corrispondente controllo interno di espressione 18S rRNA (parte inferiore della figura, 265 bp) degli stessi campioni rappresentativi mostrati in Figura 20. B= controllo negativo. MW=DNA Molecular Weight Marker VIII, Roche Diagnostics.

Poiché sembra evidente una *down*-regolazione di questa isoforma di mRNA, soprattutto nel tessuto surrenale neoplastico (Figura 21, corsie 2 e 5), abbiamo sequenziato anche tutti gli amplificati attesi di 548 bp, per verificare la possibile presenza di variazioni nucleotidiche nella regione del cDNA di hMR β comprendente l'intero esone 1 β e un tratto a valle, che appartiene al 5'-UTR del messaggero. Abbiamo tuttavia riscontrato, nei campioni finora analizzati, solo una variazione nucleotidica, presente in omozigosi o in eterozigosi, verosimilmente assimilabile ad uno SNP (*single nucleotide polymorphism*), dal momento che è presente anche nel tessuto corticosurrenale normale, tumorale e nei leucociti mononucleati di alcuni pazienti.

Come mostrato in Figura 22, la variabilità d'espressione è nel complesso risultata più evidente, tra gli iperaldosteronemici in relazione ai soggetti normali, nel *pattern* individuale relativo alle due isoforme Δ di mRNA del gene in oggetto, rispetto al *wild type*. In questo caso, data la co-amplificazione delle tre isoforme del cDNA, abbiamo potuto sequenziare solo i due amplificati di lunghezza maggiore (664 bp e 313 bp), previa

purificazione da gel di agarosio. L'analisi delle sequenze ci è servita come verifica della specificità di queste reazioni di RT-PCR.

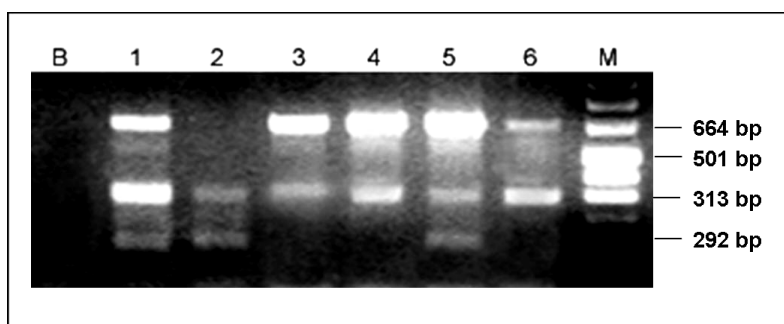


Figura 22. Prodotti di RT-PCR per la co-individuazione di mRNA dello hMR *wild type* (664 bp), hMRA5 (313 bp) e hMRA5,6 (192 bp) di alcuni campioni rappresentativi. B= controllo negativo; corsia 1= tessuto surrenale tumorale di una paziente con un APA; corsia 2= LMN della stessa paziente; corsia 3= LMN isolati da una paziente affetta da iperaldosteronismo primitivo; corsie 4, 5 e 6= LMN isolati da soggetti sani. MW=DNA Molecular Weight Marker VIII.

Mediante altre RT-PCR, abbiamo nel contempo analizzato anche l'espressione dei geni che codificano per le due isoforme dell'enzima 11 β -HSD1 e 11 β -HSD2 nella corteccia surrenale, e nei LMN dei pazienti sopra citati (Figure 20 e 21), affetti da aldosteronismo primitivo, conseguente alla presenza di un APA.

Per quanto concerne il messaggero per la 11 β -HSD1, dopo RT-PCR si evidenziava in tutti i campioni un amplificato atteso di 298 bp (Figura 23), mentre la reazione di RT-PCR per la 11 β -HSD2, forniva un amplificato atteso di 134 bp (Figura 24).

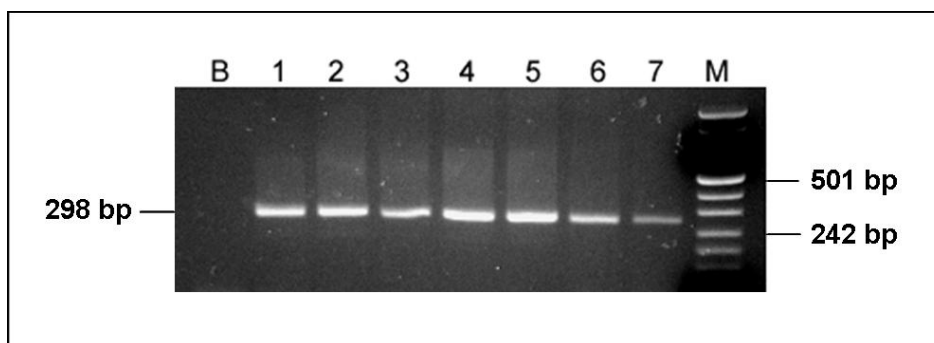


Figura 23. Elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di RT-PCR per 11 β -HSD1 (298 bp) di alcuni campioni rappresentativi. Corsie 1, 4= corticosurrene normale, adiacente all'APA; corsie 2, 5= APA; corsie 3, 6= MNL di pazienti con APA; corsia 7= controllo positivo (biopsia di rene sano). MW=DNA Molecular Weight Marker VIII. B=controllo negativo.

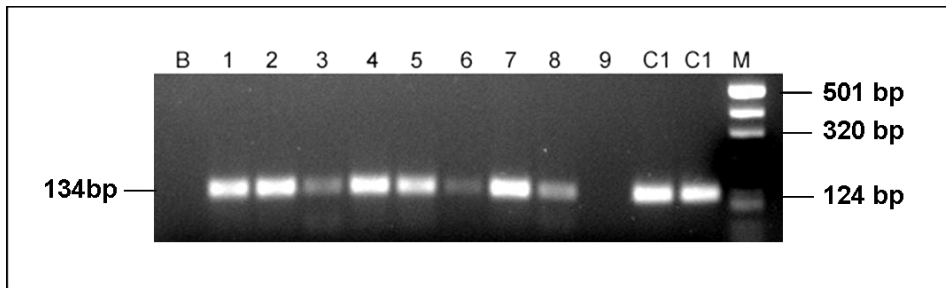


Figura 24. Prodotti di RT-PCR per 11 β -HSD2 (134 bp) di alcuni campioni rappresentativi. B= controllo negativo; corsie 1, 4 e 7= corticosurrene normale adiacente all'APA; corsie 2, 5 e 8= APA; corsie 3, 6 e 9= MNL di pazienti con APA; corsie C1 e C2= biopsie di rene sano.

Come controllo positivo di espressione di entrambi i messaggeri per la 11 β -HSD di tipo 1 e 2, in questi campioni di surrene e di adenoma secernente aldosterone, abbiamo utilizzato del tessuto renale umano sano, pre-impianto, impiegato anche in alcuni lavori della letteratura riguardanti l'espressione del medesimo enzima nel surrene umano [Albertin et al., 2002].

Espressione delle varianti di mRNA per hMR e del gene 11 β -HSD2 nella laringe umana: un nuovo tessuto atipico rispondente all'aldosterone.

Durante l'ultimo anno del Dottorato di ricerca abbiamo analizzato i trascritti per hMR e delle sue isoforme in alcune biopsie della laringe e della glottide umana, provenienti dall'Unità di Otorinolaringoiatria del Policlinico Universitario di Padova. Abbiamo associato alla ricerca dell'mRNA per le isoforme dello hMR l'analisi degli mRNA della 11 β -HSD di tipo 1 e 2, eseguendo delle RT-PCR in modo particolare su campioni di tessuto dell'ipoglottide, della falsa corda vocale, delle corde vocali, dell'ipoglottide e dell'aritenoido. Questi vari frammenti di tessuto sono stati asportati lontano dalla lesione, da un paziente di sesso maschile dell'età di 69 anni che aveva sviluppato un carcinoma squamoso della laringe. L'esame istologico dei campioni tissutali ne ha confermato la normale morfologia.

I risultati relativi all'espressione del gene hMR nei suddetti campioni di laringe sono illustrati in Figura 25.

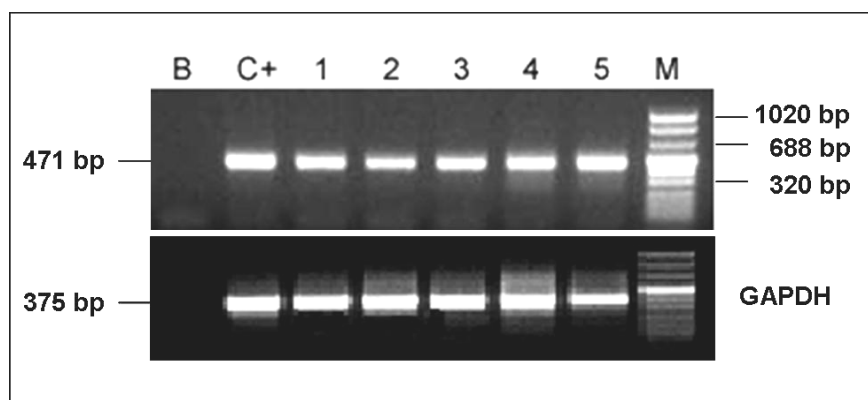


Figura 25. Prodotti di RT-PCR per hMR (471 bp) e per GAPDH (375 bp, gel inferiore) di campioni di laringe umana. B= controllo negativo; C+= controllo positivo (biopsia di rene sano pre-impianto); corsia 1= mucosa dell'ipoglottide; corsia 2= mucosa della falsa corda; corsia 3= aritenoido; corsia 4= mucosa dell'epiglottide; corsia 7= mucosa della corda vocale. M= DNA *Molecular Weight Marker VIII*, Roche Diagnostics.

Come controllo interno di espressione, anche in questo caso abbiamo considerato il gene *housekeeping* che codifica per la gliceraldeide-fosfato deidrogenasi (GAPDH), già da noi utilizzato come controllo di espressione nel dimostrare la presenza di hMR negli spermatozoi umani [Fiore et al., 2006].

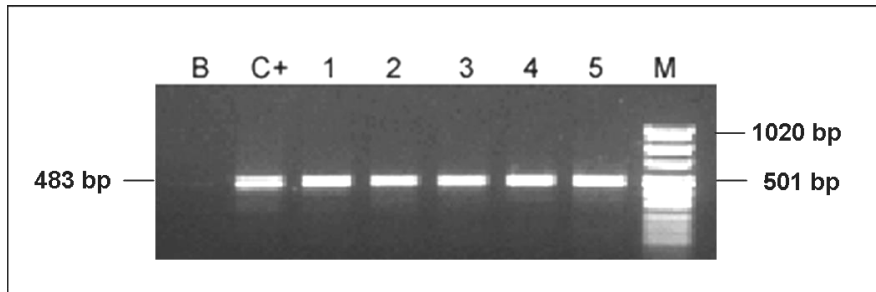


Figura 26. Elettroforesi in gel d'agarosio dei prodotti di RT-PCR per hMR α (483 bp) degli stessi campioni in figura 25, con il medesimo ordine di caricamento. B= controllo negativo; C+= controllo positivo; M= DNA Molecular Weight MarkerVIII.

Nelle Figure 26 e 27 sono mostrati i risultati delle reazioni di RT-PCR per l'analisi dei trascritti per hMR α e per l'isoforma di mRNA hMR β , rispettivamente, negli stessi campioni di laringe elencati in Figura 24.

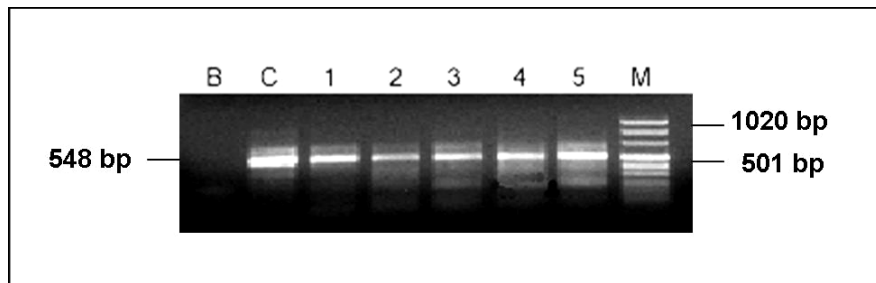


Figura 27. Elettroforesi in gel d'agarosio dei prodotti di RT-PCR per hMR β (548 bp) dei campioni mostrati in figura 24, caricati nel medesimo ordine. B= controllo negativo; C= controllo positivo; M= DNA Molecular Weight MarkerVIII.

Nei medesimi campioni di tessuto laringeo, anche l'enzima 11 β -HSD 2 sembra essere uniformemente espresso (dato non mostrato).

Analisi del gene hMR in una famiglia con pseudo-ipoaldosteronismo di tipo I

Dopo avere disegnato e messo a punto le reazioni di PCR specifiche per gli otto esoni codificanti del gene hMR, partendo dal DNA genomico, abbiamo sequenziato tali esoni nel probando ed in entrambi i genitori. La specificità delle sequenze è stata confermata mediante il *NCBI Blast* e abbiamo allineato le sequenze di ciascun esone tra loro e con le rispettive sequenze depositate nel *web* in *GenBank*, per individuare eventuali mutazioni o variazioni anche di singoli nucleotidi.

In tal modo abbiamo potuto confermare l'assenza di mutazioni all'interno dei tratti esonici codificanti. Abbiamo invece evidenziato la presenza, nello stato di omozigosi o di eterozigosi, di due varianti nucleotidiche ubicate nelle porzioni intro-esoniche al 5' e al 3', in relativa vicinanza ai siti di *splicing* degli esoni 4 e 8 del gene hMR (Figura 28).

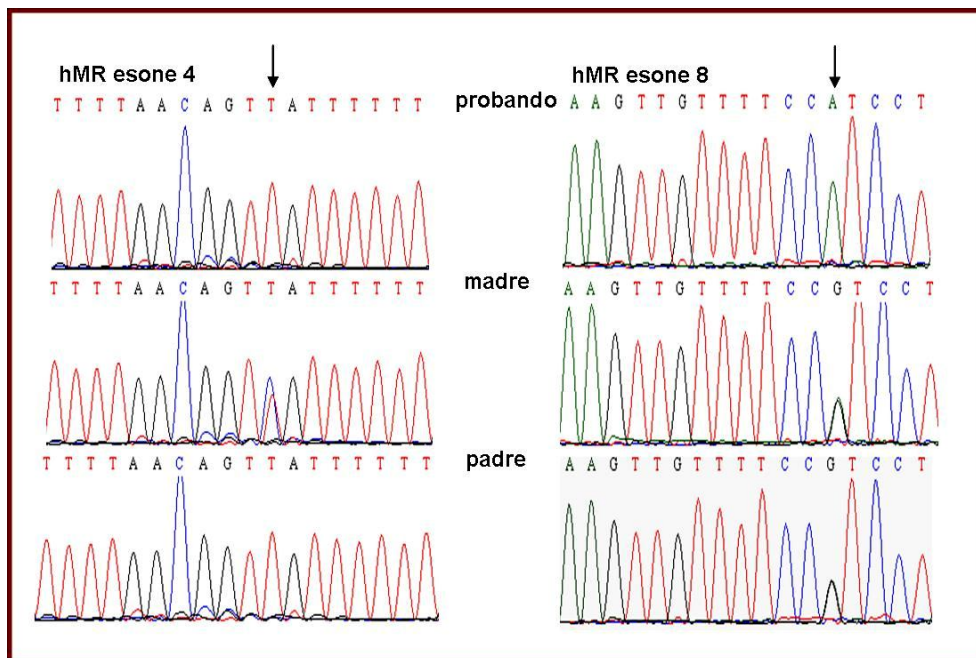


Figura 28. Tratti significativi dei cromatogrammi relativi alle sequenze degli esoni 4 e 8 dello hMR nei tre componenti di una famiglia con pseudo-ipoaldosteronismo. Con la freccia sono indicati i due nucleotidi che variano in omozigosi o in eterozigosi tra i membri della stessa famiglia.

DISCUSSIONE

Partendo dal presupposto che il recettore per i mineralcorticoidi fosse presente nelle cellule ematiche mononucleate, un dato che era già emerso dai saggi di tipo radio-recettoriali condotti da Armanini e collaboratori tra il 1985 e il 1987 [Armanini et al., 1985b; 1986; Wehling et al., 1987], all'inizio del nostro lavoro di ricerca, abbiamo confermato tale dato mediante reazioni di RT-PCR eseguite nei linfomonociti (LMN) di volontari sani. Nel contempo abbiamo dimostrato che anche negli spermatozoi isolati dal liquido seminale, sebbene in minore quantità rispetto ai campioni di LMN di riferimento (Figura 15), le reazioni di RT-PCR per un tratto specifico di 471 paia di basi del messaggero per lo hMR, davano una banda ben evidenziata in gel di agarosio. La presenza dello hMR anche in questo tipo di cellule è stata confermata mediante immunofluorescenza (Figura 16), il che ci ha permesso di concludere, in una pubblicazione scientifica, che lo spermatozoo è in grado di rispondere all'aldosterone eventualmente presente nell'ambiente circostante, con modalità recettore-mediata [Fiore et al., 2006]. A questo proposito è interessante notare che un eventuale eccesso di aldosterone in circolo, prolungato nel tempo, potrebbe essere responsabile di alcune disfunzioni dell'attività e funzionalità spermatica (in modo particolare della motilità), attivando una serie di reazioni conseguenti all'interazione con il MR, che possono portare anche alla sintesi in eccesso di noti *markers* di stress ossidativo, quali la p22^{phox} e il PAI-1.

Conseguentemente a questo risultato preliminare, abbiamo analizzato in LMN di individui sani (Figura 17) e poi negli spermatozoi isolati dal liquido seminale di volontari sani (Figura 18), anche le varianti dei trascritti per il MR. La presenza infatti delle isoforme tronche (hMRA5 e hMRA5,6) e la minore espressione di hMR β , rispetto allo hMR α , potrebbe costituire un'ulteriore indicazione di alcune importanti disfunzioni legate alla motilità dello sperma.

Questi risultati molto confortanti ci hanno quindi indotto ad indagare, in modo più approfondito, le suddette isoforme di messaggero per lo hMR in cellule come i LMN, che rappresentano un utile mezzo, facilmente reperibile, per approfondire *ex vivo* alcuni degli effetti mediati dall'aldosterone in condizioni fisiologiche normali e patologiche, evitando di dover ricorrere a improponibili biopsie. Dopo avere dimostrato una certa variabilità nel *pattern* di espressione dei vari messaggeri nelle cellule isolate da volontari sani, come sopra descritto (Figura 17) abbiamo esteso lo studio a LMN di pazienti affetti da iperaldosteronismo primario, con adenoma secernente aldosterone. Tra questi ultimi, in coloro che sono stati sottoposti a surrenalectomia per adenoma di Conn, abbiamo

analizzato anche il tessuto surrenale normale e quello tumorale, in parallelo con i leucociti dei medesimi pazienti (Figure 19, 20, 21 e 22).

A questo proposito, un'evidente *down*-regolazione dell'isoforma di mRNA hMR β sembra riguardare il tessuto surrenale tumorale (Figura 21, corsie 2 e 5), pertanto abbiamo sequenziato tutti gli amplificati attesi di 548 bp, per verificare la possibile presenza di variazioni nucleotidiche nella regione del cDNA di hMR β comprendente l'intero esone 1 β e un tratto a valle, che appartiene alla regione non tradotta 5'-UTR. Mutazioni in queste regioni potrebbero infatti giustificare, almeno in parte, la trascrizione preferenziale di hMR α , a seguito di una variazione ad esempio nei siti donatore o accettore di *splicing* che coinvolge l'isoforma hMR β . Abbiamo finora riscontrato solo una variazione nucleotidica, che, essendo ugualmente presente in omo- o in eterozigosi sia nel tessuto corticosurrenale normale, sia nel tessuto tumorale e nei leucociti mononucleati di alcuni pazienti, è verosimilmente assimilabile ad uno SNP (*single nucleotide polymorphism*). Nel complesso questi nostri dati preliminari suggeriscono come, dall'analisi dell'espressione delle diverse isoforme di MR nel corticosurrene normale, nell'APA e nei corrispettivi LMN, se estesa ad un maggior numero di pazienti iperaldosteronemici, si potranno ottenere ulteriori spiegazioni del complesso meccanismo di regolazione dell'espressione mediata dal MR, tramite fenomeni di *splicing* e in modo anche parzialmente indipendentemente dalla concentrazione di aldosterone libero. Un'interessante ulteriore variazione del *pattern* di espressione coinvolgente anche le isoforme hMR Δ , infatti, è risultato evidente tra i LMN di alcuni pazienti con APA e cellule provenienti da individui sani (Figura 22). I risultati fin qui ottenuti per il MR potranno essere corroborati anche dall'analisi in immunisto chimica dei tessuti surrenalici normali e tumorali.

È ormai noto, dalla letteratura scientifica che gli aldosteronomi, alla pari del corticosurrene normale esprimono sia il gene per la 11 β -HSD1, sia per la 11 β -HSD2; si ritiene che l'elevata concentrazione locale di prodotti intermedi degli ormoni steroidei, che caratterizza questi tumori della corticale del surrene, induca una regolazione nel senso di un'iper-attivazione di 11 β -HSD1, mentre sembra reprimere la sintesi di 11 β -HSD2, contribuendo in tal modo a intensificare la funzione steroidogenica del tessuto surrenale tumorale [Albertin et al., 2002]. Interessanti, a questo proposito, sono stati i risultati che abbiamo finora ottenuto sulla co-espressione di entrambe le isoforme del gene per l'enzima 11 β -HSD negli APA, come nell'adiacente tessuto surrenale sano (Figure 23 e 24), a confermare i dati della letteratura scientifica.

La novità del nostro studio riguarda invece l'espressione di entrambi i geni per l'enzima 11 β -HSD anche nei LMN dei pazienti affetti da sindrome di Conn presi in esame. In buona parte di questi, infatti, abbiamo dimostrato l'espressione dell'isoforma 11 β -HSD di tipo 2 (Figura 24), normalmente non rilevabile nei LMN di soggetti sani. Sarà interessante confermare questo dato importante, estendendo l'analisi di questi messaggeri in un numero più ampio di pazienti iperaldosteronemici, il che ci potrà fornire un dato prognostico predittivo di una sindrome di Conn.

Nel periodo conclusivo del nostro lavoro di ricerca, abbiamo anche individuato un nuovo tessuto in grado di rispondere all'aldosterone tramite la sua interazione con il recettore specifico. Abbiamo analizzato, sempre con reazioni di RT-PCR per le isoforme del messaggero dello hMR e per la 11 β -HSD2, dei campioni di tessuto prelevati da cinque distretti della laringe umana (Figura 25). Il tessuto della laringe e della glottide è particolarmente sensibile all'azione di vari corticosteroidi, alcuni dei quali, come il cortisone e derivati, ad esempio, sono correntemente impiegati nella terapia dell'angioedema della glottide ed in altri disordini della laringe [Mortensen e Woo, 2006]. In tutti i campioni abbiamo dimostrato che il gene hMR (Figura 25) e le sue isoforme hMR α (Figura 26) e hMR β (Figura 27), sebbene quest'ultima in modo meno marcato, sono espresse nei vari distretti laringei, dimostrando la possibilità di una risposta, in queste stesse sedi, all'aldosterone, mediata dal recettore dei mineralcorticoidi. Sembra inoltre (dati non mostrati), da queste nostre analisi preliminari, che la risposta all'aldosterone nella mucosa della laringe sia specifica nel senso mineralcorticoide, avendo anche dimostrato che nelle stesse sedi è ugualmente ben espresso il gene per la 11 β -HSD2.

In questa nostra ricerca, abbiamo infine sequenziato tutti gli esoni codificanti del gene hMR in una famiglia composta da tre unità (genitori e un figlio), per la quale è stata eseguita una diagnosi di pseudo-ipoaldosteronismo di tipo I, presso l'Azienda Sanitaria di Bolzano. Abbiamo tuttavia individuato solamente due varianti nucleotidiche presenti in omozigosi o in eterozigosi ai confini intro-esonici degli esoni 4 e 8 (Figura 28), in posizioni relativamente vicine ai siti di *splicing* (in posizione intronica -21 e -26, rispettivamente), per le quali sarà necessario valutare il peso che potrebbero avere sulla corretta sintesi dell'mRNA. Poiché comunque non abbiamo individuato alcuna importante mutazione nelle regioni codificanti dei vari esoni, è ragionevole supporre che il probando di due mesi, al quale per primo è stata fatta la diagnosi alla nascita, è in realtà affetto dalla forma di pseudo-ipoaldosteronismo che interessa i geni che codificano per le subunità dei canali epiteliali per il sodio, ubicati a livello del tubulo renale.

Anche in questa variante della patologia sopra descritta, infatti, i sintomi e i dati clinici si equivalgono [Kuhnle, 1997; Oh and Warnock, 2000].

BIBLIOGRAFIA

- Ahokas RA, Warrington KJ, Gerling IC, Sun Y, Wodi LA, Herring PA, Lu L., Bhattacharya SK, Postlethwaite AE, Weber KT.** 2003. Aldosteronism and peripheral blood mononuclear cell activation. A neuroendocrine-immune interface. *Circ Res.* **93**: e124-e135.
- Albertin G, Tortorella C, Malendowicz LK, Aragona F, Neri G, Nussdorfer GG.** 2002. Human adrenal cortex and aldosterone secreting adenomas express both 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 genes. *Int J Mol Med.* **9**: 495-498.
- Armanini D, Kuhnle U, Strasser T, Dorr H, Butenandt I, Weber PC, Stockigt JR, Pearce P, Funder JW.** 1985a. Aldosterone-receptor deficiency in pseudohypoaldosteronism. *New Eng J Med.* **313**: 1178-1181.
- Armanini D, Strasser T, Weber PC.** 1985b. Characterization of aldosterone binding sites in circulating human mononuclear leukocytes. *Am J Physiol.* **248**: E388-390.
- Armanini D, Kuhnle U, Witzgall H, Tietze U, Saule H, Schroeter C, Strasser T, Butenandt I, Bidlingmaier F, Weber PC.** 1986. The determination of mineralocorticoid receptors in human mononuclear leukocytes from patients with mineralocorticoid excess: physiological and pathological implications. *Clin Exp Hypertens A.* **8**: 781-785.
- Armanini D, Fiore C, Pellati D.** 2007. Spontaneous resolution of idiopathic aldosteronism after long-term treatment with potassium canrenoate. *Hypertension.* **50**: e69-70.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM.** 1987. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science.* **237**: 268-275.
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R, Schutz G.** 1998. Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 9424-9429.
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Greger R, Schutz G.** 2000. Mineralocorticoid receptor knockout mice: lessons on Na⁺ metabolism. *Kidney Int.* **57**: 1295-1298.
- Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, Cole TJ.** 2001. The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology.* **142**: 1587-1594.
- Bonny O, Rossier BC.** 2002. Disturbances of Na/K balance: pseudohypoaldosteronism revisited. *J Am Soc Nephrol.* **13**: 2399-2414.
- Booth RE, Johnson JP, Stockand JD.** 2002. Aldosterone. *Adv Physiol Educ.* **26**: 8-20.

- Brown NJ, Nakamura S, Ma L, Nakamura I, Donnert E, Freeman M, Vaughan DE, Fogo AB.** 2000. Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis *in vivo*. *Kidney Int.* **58**: 1219-1227.
- Brown NJ, Kumar S, Painter CA, Vaughan DE.** 2002. ACE inhibition versus angiotensin type 1 receptor antagonism: differential effects on PAI-1 over time. *Hypertension.* **40**: 859-865.
- Calò LA, Zaghetto F, Pagnin E, Davis PA, De Mozzi P, Sartorato P, Martire G, Fiore C, Armanini D.** 2004. Effect of aldosterone and glycyrrhetic acid on the protein expression of PAI-1 and p22(phox) in human mononuclear leukocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* **89**: 1973-1976.
- Colombo L, Dalla Valle L, Fiore C, Armanini D, Belvedere P.** 2006. Aldosterone and the conquest of land. *J Endocrinol Invest* **29**: 373-379.
- Connell J M C, Davies E.** 2005. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol.* **186**: 1–20.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M.** 1998. Brain Corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev.* **19**: 269-301.
- Fiore C., Sticchi D., Pellati D., Forzan S., Bonanni G., Bertoldo A., Massironi M., Calò L., Fassina A., Rossi G.P., Armanini D.** 2006. Identification of mineralocorticoid receptor in human spermatozoa. *Int J Mol Med.* **18**: 649-652.
- Fuller PJ, Young MJ.** 2005. Mechanisms of Mineralocorticoid Action. *Hypertension.* **46**: 1227-1235.
- Funder JW.** 1997. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance. *Ann Rev Med.* **48**: 231-240.
- Funder J.W.** 2004. Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation. *Mol Cell Endocrinol.* **217**: 263-269.
- Funder JW.** 2005a. Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. *Heart Failure Reviews.* **10**: 15-22.
- Funder JW.** 2005b. The nongenomic action of aldosterone. *Endocr Rev.* **26**: 313-321.
- Geller DS, Rodriguez-Soriano J, Vallo Boado A, Schifter S, Bayer M, Chang SS, Lifton RP.** 1998. Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type I. *Nat Genet.* **19**:279-281.
- Geller DS, Zhang J, Zennaro M-C, Vallo-Boado A, Rodriguez-Soriano J, Furu L, Haws R, Metzger D, Botelho B, Karaviti L, Haqq AM, Corey H, Janssens S, Corvol P, Lifton RP.** 2006. Autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1: mechanisms, evidence for neonatal lethality, and phenotypic expression in adults. *J Am Soc Nephrol.* **17**: 1429–1436.

- Greenspan FS, Strewler GJ.** 2000. *Endocrinologia Generale e Clinica. Capitolo 10: Iperensione Endocrina.*, Piccin Editore.
- Kardong KV.** 2005. *Vertebrati. Anatomia comparata, funzione, evoluzione. Ghiandola surrenale.* McGraw-Hill Editore.
- Kuhle U.** 1997. At The Cutting Edge. Pseudohypoaldosteronism: mutation found, problem solved? *Mol Cell Endocrinol.* **133**: 77-80.
- Le Menuet D, Viengchareun S, Penfornis P, Walker F, Zennaro MC, Lombes M.** 2000. Targeted oncogenesis reveals a distinct tissue-specific utilization of alternative promoters of the human mineralocorticoid receptor gene in transgenic mice. *J Biol Chem.* **275**: 7878-7886.
- Le Menuet D, Isnard R, Bichara M, Viengchareun S, Muffat-Joly M, Walker F, Zennaro MC, Lombès M.** 2001. Alteration of cardiac and renal functions in transgenic mice overexpressing human mineralocorticoid receptor. *J Biol Chem.* **276**:38911–38920.
- Le Menuet D, Viengchareun S, Muffat-Joly M, Zennaro MC, Lombes M.** 2004. Expression and function of the human mineralocorticoid receptor: lessons from transgenic mouse models. *Mol Cell Endocrinol.* **217**: 127-136.
- Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS.** 2001. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell.* **104**: 545-556.
- Lombes M, Edelman IS, Erlanger BF.** 1989. Internal image properties of a monoclonal auto-anti-idiotypic antibody and its binding to aldosterone receptors. *J Biol Chem.* **264**: 2528-2536.
- Lombes M, Alfaidy N, Eugene E, Lessana A, Farman N, Bonvalet JP.** 1995. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation.* **92**: 175-182.
- Losel R, Wehling M.** 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**: 46-56.
- Mattsson C, Young FW Jr.** 2006. Primary aldosteronism: diagnostic and treatment strategies. *Nat Clin Pract Nephrol.* **2**:198-208.
- Molina PE.** 2004. *Fisiologia Endocrina. Capitolo 6. Ghiandola surrenalica.* McGraw-Hill Editore.
- Mortensen M, Woo P.** 2006. Office steroid injections of the larynx. *The Laryngoscope.* **116**: 1735-1739.
- Mulatero P, Milan A, Fallo F, Regolisti G, Pizzolo F, Fardella C, Mosso L, Marafetti L, Veglio F, Maccario M.** 2006. Comparison of confirmatory tests for the diagnosis of primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* **91**:2618-2623.

- Miyata K, Rahman M, Shokoji T, Nagai Y, Zhang GX, Sun GP, Kimura S, Yukimura T, Kiyomoto H, Kohno M, Abe Y, Nishiyama A.** 2005. Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* **16**: 2906–2912.
- Ngarmukos C, Grekin RJ.** 2001. Nontraditional aspects of aldosterone physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **281**: E1122-1127.
- Nussey SS, Whitehead SA.** 1999. Endocrinology. An integrated approach. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Oh YS, Warnock DG.** 2000. Disorders of the epithelial Na⁺ channel in Liddle's syndrome and autosomal recessive pseudohypoaldosteronism type 1. *Exp Nephrol.* **8**: 320-325.
- Pascual-Le Tallec L, Demange C, Lombes M.** 2004. Human mineralocorticoid receptor A and B protein forms produced by alternative translation sites display different transcriptional activities. *Eur J Endocrinol.* **150**: 585-590.
- Pascual-Le Tallec L, Lombès M.** 2005. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol.* **19**: 2211-2221.
- Pearce D, Bhargava A, Cole TJ.** Aldosterone: its receptor, target genes, and actions. *Vitam Horm.* 2003 66:29–76.
- Pitt B, Stier CT Jr, Rajagopalan S.** 2003. Mineralocorticoid receptor blockade: new insights into the mechanism of action in patients with cardiovascular disease. *Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 4: 164-168.
- Pitt B.** 2004. Effect of aldosterone blockade in patients with systolic left ventricular dysfunction: implications of the RALES and EPHEBUS studies. *Mol Cell Endocrinol.* **217**: 53-58.
- Pujo L, Fagart J, Gary F, Papadimitriou DT, Claës A, Jeunemaître X, Zennaro M-C.** 2007. Mineralocorticoid receptor mutations are the principal cause of renal type 1 pseudohypoaldosteronism. *Human Mutation.* **28**: 33-40.
- Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, Sabri A, Trouve P, Wassef M, Swynghedauw B, Delcayre C.** 1995. Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension.* 26: 971-978.
- Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyani J, McMahon E.** 2002. Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology.* **143**: 4828-4836.
- Rogerson FM, Dimopoulos N, Sluka P, Chu S, Curtis AJ, Fuller PJ.** 1999. Structural determinants of aldosterone binding selectivity in the mineralocorticoid receptor. *J Biol Chem.* **274**: 36305-36311.
- Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ.** 2003. Dissecting mineralocorticoid receptor structure and function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **85**: 389-396.

- Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ.** 2004. Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Mol Cell Endocrinol.* **217**: 203-212.
- Sartorato P, Lapeyraque A-L, Armanini D, Kuhnle U, Khaldi Y, Salomon R, Abadie V, Di Battista E, Naselli A, Racine A, Bosio M, Caprio M, Poulet-Young V, Chabrolle J-P, Niaudet P, De Gennes C, Lecornec M-H, Poisson E, Fusco AM, Loli P, Lombès M, Zennaro M-C.** 2003. Different inactivating mutations of the mineralocorticoid receptor in fourteen families affected by type I pseudohypoaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**: 2508–2517.
- Sartorato P, Khaldi Y, Lapeyraque AL, Armanini D, Kuhnle U, Salomon R, Caprio M, Viengchareun S, Lombes M, Zennaro MC.** 2004. Inactivating mutations of the mineralocorticoid receptor in Type I pseudohypoaldosteronism. *Mol Cell Endocrinol.* **217**: 119-125.
- Spindler B, Mastroberardino L, Custer M, Verrey F.** 1997. Characterization of early aldosterone-induced RNAs identified in A6 kidney epithelia. *Pflugers Arch.* **434**: 323-331.
- Stockand JD.** 2002. New ideas about aldosterone signalling in epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol.* **282**: F559-576.
- Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT.** 2002. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *Am J Pathol.* **161**: 1773-1781.
- Wehling M, Armanini D, Strasser T, Weber PC.** 1987. Effect of aldosterone on sodium and potassium concentrations in human mononuclear leukocytes. *Am J Physiol.* **252**: E505-508.
- Wehling M, Kuhls S, Armanini D.** 1989. Volume regulation of human lymphocytes by aldosterone in isotonic media. *Am J Physiol.* **257**:E170-174.
- Wickert L, Selbig J, Watzka M, Stoffel-Wagner B, Schramm J, Bidlingmaier F, Ludwig M.** 2000. Differential mRNA expression of the two mineralocorticoid receptor splice variants within the human brain: structure analysis of their different DNA binding domains. *J Neuroendocrinol.* **12**:867–873.
- Williams JS, Williams GH.** 2003. 50th Anniversary of Aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**:2364–2372.
- Zennaro MC, Le Menuet D, Lombes M.** 1996. Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. *Mol Endocrinol.* **10**: 1549-1560.
- Zennaro MC, Farman N, Bonvalet JP, Lombes M.** 1997. Tissue-specific expression of alpha and beta messenger ribonucleic acid isoforms of the human mineralocorticoid receptor in normal and pathological states. *J Clin Endocrinol Metab.* **82**: 1345-1352.

- Zennaro MC, Le Menuet D, Viengchareun S, Walker F, Ricquier D, Lombès M.** 1998. Hibernoma development in transgenic mice identifies brown adipose tissue as a novel target of aldosterone action. *J Clin Invest.* **101**:1254–1260.
- Zennaro MC, Souque A, Viengchareun S, Poisson E, Lombes M.** 2001. A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action. *Mol Endocrinol.* **15**: 1586-1598.
- Zennaro MC, Lombes M.** 2004. Mineralocorticoid resistance. *Trends Endocrinol Metab.* **15**: 264-270.