

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIA
FARMACEUTICHE**



TESI DI LAUREA

**IL G PROTEIN-COUPLED ESTROGEN RECEPTOR (GPER)
AGISCE COME RECETTORE PER L'ALDOSTERONE?
STUDIO DI INTERAZIONE TRA ALDOSTERONE E GPER.**

RELATORE: DOTT.SSA LAURA ACQUASALIENTE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORRELATORE: DOTT.SSA BRASILINA CAROCCIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA

LAUREANDO: FRANCESCO CALLEGARIN

ANNO ACCADEMICO: 2021/2022

INDICE

ABSTRACT	6
INTRODUZIONE	9
1.0 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE (RAAS)	9
2.0 ALDOSTERONE	11
2.1 Produzione dell'aldosterone	12
2.2 Meccanismo molecolare	13
3.0 IPERTENSIONE	14
4.0 ALDOSTERONISMO PRIMARIO (PA)	17
4.1 Fisiopatologia	17
4.2 Screening e Diagnosi	18
4.3 Trattamento	20
5.0 FORME FAMILIARI DI ALDOSTERONISMO PRIMARIO	21
7.0 RECETTORE ACCOPPIATO A PROTEINA G (GPCR)	22
7.1 Meccanismo molecolare dei GPCR	22
7.2 Recettore per gli estrogeni accoppiato a proteina G (GPER)	23
7.3 Meccanismo molecolare del GPER	24
8.0 GPER E SINTESI DI ALDOSTERONE	26
8.0 EFFETTI GENOMICI E NON GENOMICI DELL'ALDOSTERONE	29
11.0 ANALISI DI DOCKING	32
12.0 RISONANZA PLASMONICA DI SUPERFICIE	33
12.1 Meccanismo dell' SPR	33
12.2 GPER e SPR	35
OBIETTIVO DELLO STUDIO	37
MATERIALI E METODI	38
1.0 MOLECULAR DOCKING	38
2.0 SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR)	39
3.0 COLTURE CELLULARI	41
3.1 Semina ed espansione	41
4.0 TRASFEZIONE	42
5.0 ESTRAZIONE RNA	42
5.1 Misura della concentrazione di RNA	43

5.2 Retrotrascrizione.....	45
5.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	45
6.0 ESTRAZIONE PROTEICA.....	48
7.0 IMMUNOPRECIPITAZIONE.....	49
8.0 ELETTROFORESI E WESTERN-BLOT.....	50
RISULTATI.....	52
1.0 ANALISI DI DOCKING.....	52
2.0 IMMOBILIZZAZIONE GPER E STUDIO DI INTERAZIONE.....	56
3.0 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI GPER TRAMITE RT-PCR E IMMUNOBLOTTING.....	60
4.0 ISOLAMENTO E PURIFICAZIONE DEL GPER MEDIANTE IMMUNOPRECIPITAZIONE.....	63
DISCUSSIONE.....	66
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	69
BIBLIOGRAFIA.....	70

ABSTRACT

Steroid-hormone action in the classical view is mediated by intracellular receptors: the hormone–receptor complex binds to DNA to activate or repress transcription of target genes. However, all classes of steroid hormones can additionally act through non-genomic mechanisms and thereby change physiological processes. In contrast to genomic steroid actions, these non-genomic effects are characterized with rapid onset.

G protein-coupled oestrogen receptor (GPER) was identified and recognised as a membrane receptor that mediates the rapid effects of 17 β -estradiol. GPER belongs to the large family of 7-transmembrane domain G protein-coupled receptors and has been reported to couple with both G_s and G_{i/o} proteins.

Non-genomic effects of aldosterone on various target organs and cells have been described, i.e., vascular smooth muscle cells and endothelial cells, skeletal muscle cells, kidney cells and zona glomerulosa cells. Recently, it was reported that these rapid non-genomic effects of aldosterone are mediated by its interaction with GPER. However, it is unclear if this effect is through an interaction between the aldosterone signalling, involving mineralocorticoid receptor, and GPER or if aldosterone can directly activate GPER.

Aim. We investigated if aldosterone directly interacts with GPER.

Materials and methods. We performed a Docking Analysis to predict the binding site between aldosterone and GPER. Surface Plasmon Resonance (SPR) experiments were performed on a BIAcore-X100 instrument to monitor the interaction between aldosterone and GPER. GPER, commercially available, was covalently immobilized on a CM5 sensor chip using an amine-coupling chemistry. Ten concentrations of aldosterone were injected on sensor GPER-chip and the dissociation constant (K_d) was obtained. 17 β -estradiol was used as positive control for the experiments as it is a well know ligand for GPER. To obtain overexpression of GPER protein with post-transcriptional modification (i.e. glycosylation) to be used in functional tests, HEK293 cells were transfected with GPER plasmid. GPER transfection was obtained with electroporation using Nucleofection® Technology. GPER expression after transfection was investigated with qRT-PCR and Western Blot. Immunoprecipitation with a specific antibody against GPER was performed to isolate specifically GPER.

Results. Docking analysis showed that aldosterone can interact with GPER, and this interaction involves a transmembrane portion of the receptor. The specific amino acid sequences identified were 137-FFLTWMSF-144 and 168-SCGLIWMS-176. The aldosterone-GPER binding site identified with docking analysis was like that for 17 β -estradiol were 133-YSSVFFLTWMS-143 and 167-LSCGLIWM-174. SPR confirmed the interaction aldosterone-GPER with a K_d = 0,902 \pm 0,230 μ M. Comparable affinity between 17 β -estradiol and GPER was obtained (K_d = 0,818 \pm 0,273 μ M). After GPER-transfection, high levels of GPER gene were found in HEK293 (+ 600-fold vs non-transfected cells). Finally, we obtained the purification and isolation of GPER by immunoprecipitation, this was confirmed by the presence of only one specific band at expected molecular weight in immunoblot analysis.

Conclusions. These data are of enormous interest as they for the first time showed that aldosterone can directly interact with GPER. Despite this, other tests are necessary with glycosylated-GPER obtained by transfection of HEK293 cells, to finally prove this interaction.

INTRODUZIONE

1.0 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE (RAAS)

Il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) è una complessa cascata enzimatico-proteica che, attraverso la generazione di mediatori cellulari, regola la pressione arteriosa tramite il controllo del riassorbimento di acqua ed elettroliti a livello renale. Numerosi sono i componenti di tale sistema: coinvolge organi (cuore, rene, fegato, polmone e cervello), enzimi (prorenina, renina, enzima di conversione dell'angiotensina (ACE)), e peptidi (angiotensinogeno, angiotensina I e angiotensina II). L'angiotensina II è l'effettore biologico del sistema renina-angiotensina-aldosterone ed esercita i suoi effetti attraverso il legame con specifici recettori accoppiati alle proteine G: il recettore AT1 e il recettore AT2 (1).

L'enzima limitante della cascata enzimatica che porta alla produzione di angiotensina II è l'enzima proteolitico renina che converte l'angiotensinogeno, prodotto a livello epatico e presente in circolo, ad angiotensina I. L'angiotensina I è convertita ad angiotensina II mediante una reazione catalizzata dall'ACE.

La renina è sintetizzata, accumulata e secreta a livello delle cellule mioepiteliali dell'apparato iuxtaglomerulare del nefrone. La secrezione della renina è regolata dall'azione di barocettori e chemocettori. In particolare, i barocettori, recettori neurosensoriali che rispondono a variazioni pressorie del sistema cardiovascolare, mediante un meccanismo di *feedback* negativo, riducono il rilascio di renina in risposta ad un aumento della pressione arteriosa; i chemocettori, situati lungo il tubulo distale del nefrone, invece, aumentano la secrezione di renina in seguito all'aumento della concentrazione di Na⁺ nel tubulo prossimale renale.

L'ACE è una glicoproteina ad elevato peso molecolare (135 000-150 000 Dalton) prodotta principalmente a livello dell'endotelio vascolare di polmoni e reni. Dalla via biosintetica principale mediata dall'ACE, il decapeptide angiotensina I viene proteolizzato nell'octapeptide angiotensina II.

L'angiotensina II media i suoi effetti sul sistema cardiovascolare attraverso il legame con il recettore AT1 e il recettore AT2. Il recettore transmembranario AT1, accoppiato a proteine G, è implicato nelle principali azioni fisiopatologiche dell'angiotensina ed è espresso a livello delle cellule muscolari lisce delle arteriole, del rene, della zona glomerulosa del surrene, del fegato, del polmone, del cervello, del cuore e dell'utero. Agisce attraverso un meccanismo trasduzionale che coinvolge il fosfatidilinositolo difosfato (PIP2), con formazione di IP3 e liberazione di Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico. Il legame dell'angiotensina II con i recettori AT1 promuove vasocostrizione arteriolare, ritenzione idrosalina, liberazione di aldosterone (Figura 1) (2,3). Tali effetti possono provocare danno endoteliale con aumento della risposta infiammatoria vasale e aterosclerosi.

Il recettore AT2, anch'esso associato a proteine G, è espresso a livello del surrene, dell'utero, del cervello, dei tessuti mesenchimali (feto), dei cardiomiociti, delle cellule endoteliali e dei fibroblasti. Il suo meccanismo di trasduzione si esplica attraverso una riduzione dei livelli di guanosina monofosfato ciclico (GMPc). È stato dimostrato che l'attivazione del recettore AT2 determini effetti sul sistema vascolare opposti a quelli mediati dal recettore AT1. Si può osservare, infatti, un suo ruolo nella vasodilatazione attraverso la formazione di prostaglandina I2 (PGI2), prostaglandina E2 (PGE2) e ossido nitrico (NO), che contribuiscono alla riduzione della pressione arteriosa e al miglioramento della funzione cardiaca (4).

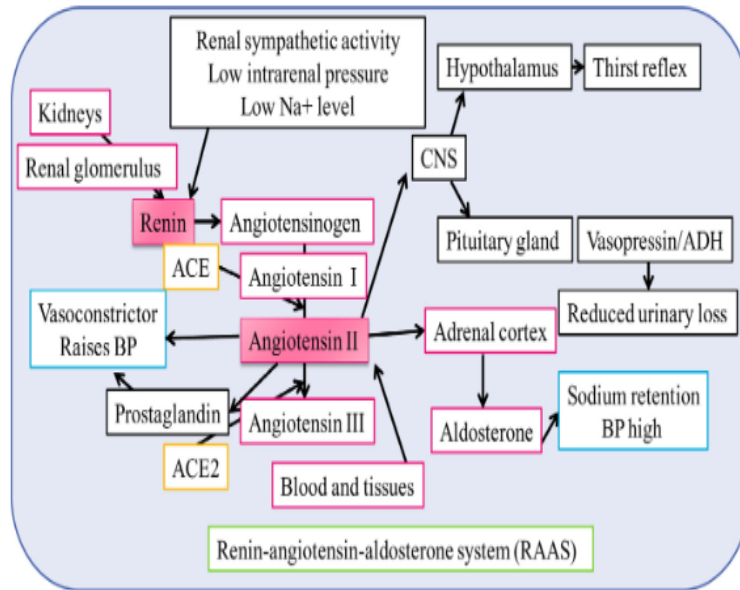


Figura 1. Meccanismo chiave del sistema RAAS (Tratto da Seema Patel et al.) (4)

2.0 ALDOSTERONE

L'aldosterone, il mineralcorticoide più conosciuto, isolato per la prima volta nel 1953, ha un'attività fondamentale nella regolazione del volume dei fluidi extracellulari e degli scambi elettrolitici. Esso è secreto a livello dei surreni, i quali sono istologicamente suddivisi in due porzioni: la corticale e la midollare. La corticale è a sua volta suddivisa in tre aree distinte per struttura e funzione: la zona glomerulosa, la zona fascicolata e la zona reticolare. Ciascuna zona è deputata alla secrezione di diversi tipi di ormoni steroidei, in particolare la zona glomerulosa è responsabile della secrezione degli ormoni mineralcorticoidi. Sono diversi i fattori in grado di modulare la produzione di aldosterone, come l'adrenalina, polipeptidi vasoattivi, serotonina, ouabaina, peptide natriuretico atriale (ANP), dopamina, eparina e adrenomedullina (5,6). L'aldosterone viene sintetizzato a partire dall'anello peri-idro-fenantrene del colesterolo, precursore comune di tutti gli ormoni steroidei. La principale fonte di colesterolo nell'organismo sono le lipoproteine circolanti nel sangue, ma il surrene in piccola parte è anche in grado di sintetizzare colesterolo de novo a partire dall'acetil-Coenzima-A.

2.1 Produzione dell'aldosterone

Il primo passaggio per la sintesi dell'aldosterone prevede la conversione del colesterolo in pregnenolone tramite l'idrossilazione degli atomi C₂₀ e C₂₂ e la rimozione della coda carboniosa su C₂₀ ad opera dell'enzima CYP11A1 che si trova all'interno del mitocondrio. Il colesterolo è trasportato dal citoplasma all'interno del mitocondrio mediante riarrangiamento del citoscheletro e specifici trasportatori mitocondriali posti tra la membrana esterna e la membrana interna. I mitocondri e il loro corretto funzionamento sono, quindi, fondamentali per la sintesi degli ormoni steroidei. Il pregnenolone può intraprendere poi tre vie biosintetiche distinte, sebbene, tra esse, in parte concatenate, che lo trasformeranno in cortisolo (glucocorticoide), aldosterone (mineralcorticoide) o testosterone (androgeno). Le tappe per la conversione del pregnenolone in aldosterone richiedono gli enzimi 3-beta-idrossisteroide-deidrogenasi, 21β-idrossilasi (CYP21A1), 11β-idrossilasi (CYP11B1) e aldosterone sintetasi (CYP11B2).

L'enzima specifico della biosintesi dell'aldosterone è il CYP11B2, esso viene espresso nei mitocondri delle cellule della zona glomerulosa e media la conversione di 11-deossicorticosterone in corticosterone, poi 18-idrossi-corticosterone e infine, aldosterone. I principali regolatori della sintesi sono angiotensina II (Ang II), i livelli di potassio extracellulare e l'ormone adrenocorticotropo (ACTH). La produzione di aldosterone può essere regolata in modo acuto (in pochi minuti) attraverso l'aumento dell'espressione e della fosforilazione della proteina StAR, o cronicamente (da ore a giorni) mediante l'aumento dell'espressione degli enzimi steroidogenici, principalmente CYP11B2 (7). L'Ang II regola la sintesi di aldosterone attivando i recettori accoppiati a proteina G AT1R (angiotensin type 1 receptor) che promuovono correnti di calcio innalzando rapidamente la sua concentrazione intracellulare. In dettaglio, l'interazione dell'Ang II con il recettore AT1 promuove l'attivazione della fosfolipasi C che idrolizza il fosfatidilinositolo 4,5- bisfosfato (PIP₂) che genera i secondi messaggeri inositolo 1,4,5-trisfosfato (IP₃) e il diacilglicerolo (DAG). L'inositolo 1,4,5-trisfosfato innesca la secrezione di aldosterone provocando un aumento transitorio della concentrazione del calcio citosolico (Ca²⁺) e l'attivazione della protein-chinasi calcio/calmodulina dipendente (CaMK); mentre il diacilglicerolo stimola la protein chinasi C che regola i livelli della proteina StAR attraverso l'attivazione dei fattori di trascrizione CREB (cAMP response element-binding) e AP-1 (activator protein-1). Pertanto, l'attivazione del recettore dell'angiotensina di tipo 1 stimola sia le fasi iniziali che tardive della sintesi di aldosterone, le quali includono la fosforilazione della proteina StAR e l'espressione degli enzimi steroidogenici (8). L'angiotensina II regola sia l'influsso di calcio nelle cellule della zona glomerulare attraverso i canali del calcio di tipo T ed L, che il movimento del calcio intra-citoplasmatico; pertanto, l'aumento delle concentrazioni di calcio citosolico portano all'attivazione dei complessi protein-

chinasi Calcio/Calmodulina dipendenti. Il diacilglicerolo induce l'inibizione del canale del potassio TASK (TWICK-related acid sensitive K⁺) il quale normalmente serve per mantenere il potenziale di membrana a riposo (9).

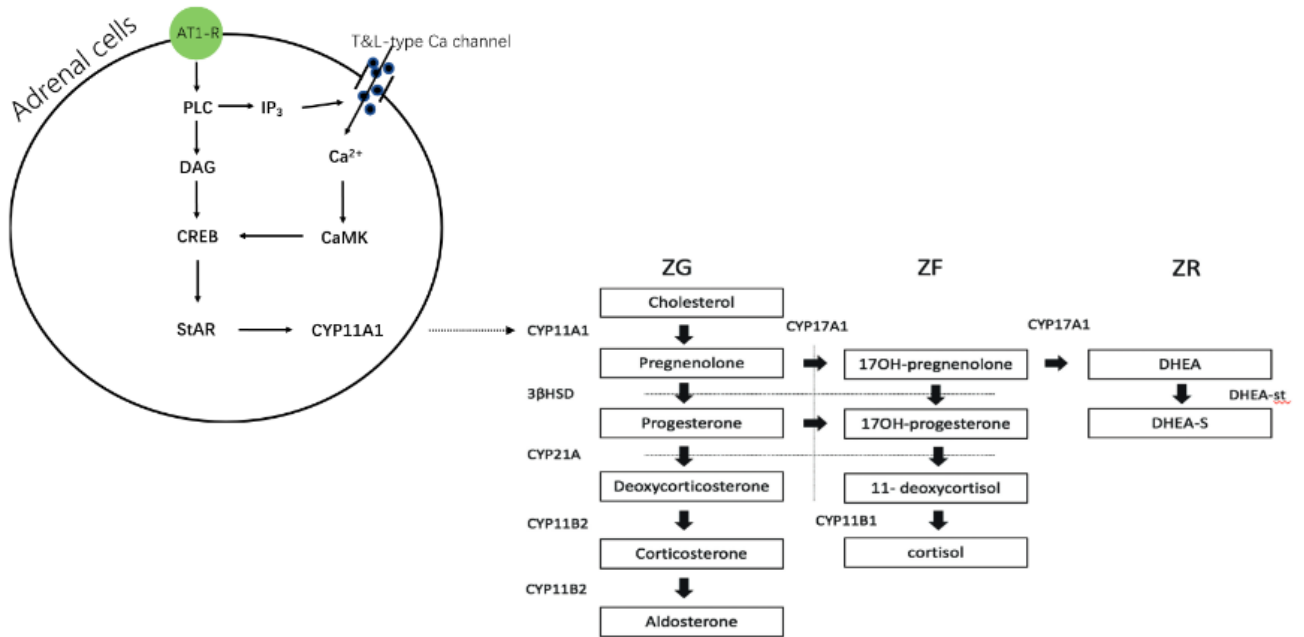


Figura 2. Meccanismo molecolare di biosintesi dell'aldosterone (Tratta da Gao Xin et al.) (9)

2.2 Meccanismo molecolare

L'aldosterone esercita i suoi effetti attraverso il legame con il recettore dei mineralcorticoidi (MR). Il recettore mineralcorticoido è localizzato all'interno del citoplasma delle cellule perché l'aldosterone è un ormone lipofilo in grado di attraversare la membrana cellulare. In seguito alla formazione del complesso aldosterone-MR, quest'ultimo migra nel nucleo e lega specifiche sequenze di DNA per iniziare la trascrizione dei geni delle proteine target (10). Il MR è espresso dall'epitelio del tubulo distale renale, dal muscolo liscio, dall'endotelio, dai cardiomiociti e dai neuroni dell'ippocampo. Principale organo target degli effetti dell'aldosterone è il rene, in quanto regolatore degli equilibri idroelettrolitici. A

livello del tubulo contorto distale e del dotto collettore l'aldosterone stimola l'aumento del riassorbimento di Na^+ attraverso l'incremento dell'espressione dei canali del sodio e del potassio, ATP dipendenti, a livello delle membrane cellulari. I canali del sodio sono localizzati a livello luminale e permettono al sodio di diffondere passivamente a livello delle cellule principali grazie alla differenza di potenziale transepiteliale di -50 mV. Il gradiente è mantenuto dalla sodio-potassio ATPasi a livello basolaterale trasportando sodio a livello ematico e potassio a livello intracellulare. Grazie ai canali del potassio presenti sul lato luminale, viene garantita la diffusione passiva a livello extracellulare, in corrispondenza del lume renale e contemporaneamente il sodio permea a livello cellulare. L'effetto finale è un assorbimento di sodio dal lume, e quindi anche di acqua. Tutto ciò è necessario per il raggiungimento dello scopo finale, ovvero incrementare l'osmolarità nel sangue (Figura 3) (11).

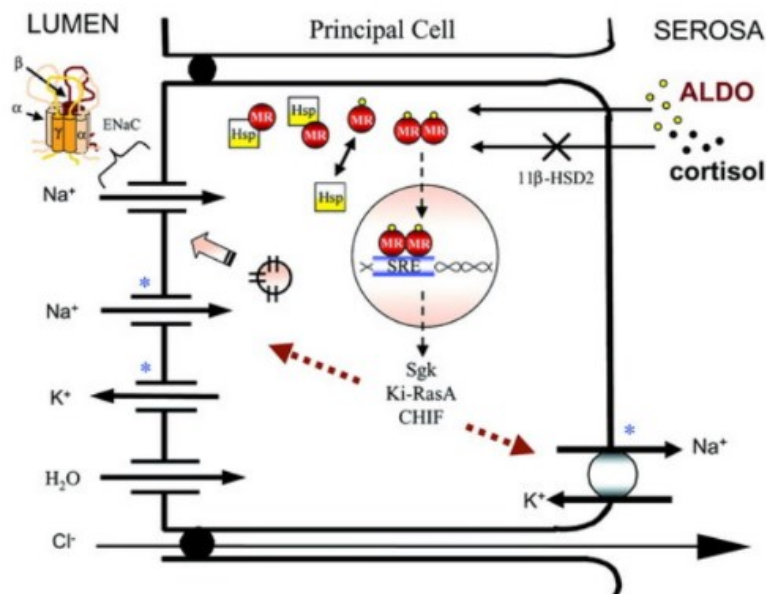


Figura 3: modello dell'azione genomica dell'aldosterone in cellule epiteliali. (Tratto da Booth et al.) (11)

3.0 IPERTENSIONE

Si definisce ipertensione arteriosa un innalzamento della pressione arteriosa con un valore di pressione sistolica a riposo mediamente pari o superiore a 140 mmHg e di pressione diastolica a riposo mediamente pari o superiore a 90 mmHg. Nella popolazione in generale la sua prevalenza è intorno al 30-45%, ma tende a crescere costantemente con l'aumentare dell'età. Nell'Ovest Europa si dimostra una

tendenza alla riduzione, mentre nell'est Europa si nota un chiaro incremento. Nonostante ciò, la maggioranza dei pazienti (95%) soffre di ipertensione cosiddetta idiopatica o dall'eziologia sconosciuta, mentre solo il 5% dei casi riguarda ipertensione la cui eziologia è conosciuta. Da un punto di vista prettamente diagnostico, la metodica più utilizzata è la misurazione della pressione a livello dell'arteria brachiale. Le più recenti linee guida raccomandano, come valori ottimali della pressione sistolica, di non superare i 140 mmHg in tutti i pazienti. Solamente nei pazienti con problematiche a livello renale e proteinuria il limite subisce un abbassamento a 130 mmHg. Inoltre, nei pazienti più anziani ma con età inferiore agli 80 anni è raccomandata una pressione sistolica tra i 150 e 160 mmHg. Per quanto riguarda la pressione diastolica, questa dovrebbe essere mantenuta al di sotto dei 90 mmHg in tutti i pazienti, ad eccezione dei pazienti diabetici dove si preferisce abbassare il limite al di sotto degli 85 mmHg (12). Inoltre, l'ipertensione arteriosa può essere classificata in primaria e secondaria.

Nella maggior parte dei casi, circa l'80-95%, l'ipertensione è primaria o essenziale, non esiste una causa precisa, identificabile e curabile. Esistono però delle condizioni o fattori di rischio che possono predisporre allo sviluppo di ipertensione, fra questi: fattori genetici o fisiologici, alterazioni patologiche, fattori ambientali e comportamentali (stress, fumo, obesità) o un eccessivo consumo di sale. Nel restante 5-10% dei casi, invece, l'ipertensione è la conseguenza di disturbi ormonali, patologie congenite o acquisite che interessano i reni, i surreni, i vasi arteriosi, il cuore, e per questo viene definita ipertensione secondaria. In questi casi, l'individuazione e la rimozione delle cause, ovvero la cura della malattia di base, si accompagna alla normalizzazione dei valori pressori (13). A differenza dell'ipertensione arteriosa essenziale, che classicamente interessa la popolazione adulta, l'ipertensione secondaria interessa anche soggetti più giovani e spesso si caratterizza per valori di pressione più alti e più difficilmente controllabili con la terapia farmacologica. Una diagnosi accurata di ipertensione endocrina fornisce l'opportunità di offrire una cura chirurgica o di ottenere un'ottima risposta clinica mediante una terapia farmacologica personalizzata.

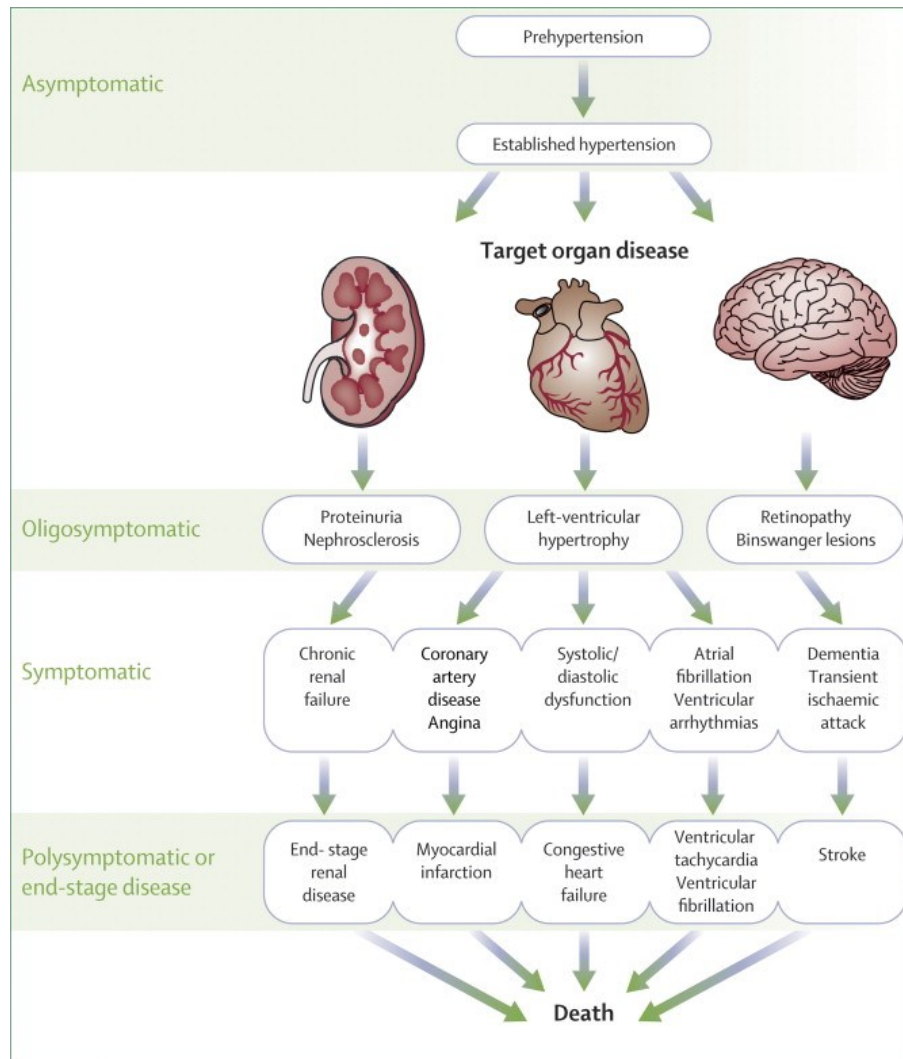


Figura 4: Range degli eventi cardiovascolari dalla preipertensione al danno d'organo. (Tratta da Franz H Messerli et al.) (13)

4.0 ALDOSTERONISMO PRIMARIO (PA)

L'iperaldosteronismo primario (PA, primary aldosteronism) è caratterizzato da un'eccessiva produzione di aldosterone, totalmente o parzialmente autonoma dal sistema Renina-Angiotensina. Il PA è la forma più comune di ipertensione secondaria. Come per la sopracitata ipertensione essenziale, anche nel caso del PA sono evidenti varie conseguenze a livello cardiaco, arterioso e renale. Nonostante tali possibili complicanze, l'aldosteronismo primario è molto difficile da diagnosticare, soprattutto a causa della capacità di mimare l'ipertensione essenziale (14).

Clinicamente la classificazione più utile del PA prevede la distinzione tra le forme correggibili chirurgicamente e le forme non correggibili chirurgicamente. Da un punto di vista fisiopatologico il PA è causato da una produzione autonoma di aldosterone da parte del surrene, che nella maggioranza dei casi è attribuibile all'adenoma produttore aldosterone (APA) o all'iperplasia surrenalica bilaterale. La maggioranza dei casi di PA sono sporadici e circa il 6% dei pazienti è affetto da una forma familiare di tale patologia (15).

4.1 Fisiopatologia

Nell'aldosteronismo primario la secrezione dell'aldosterone è in parte indipendente dalla renina e dall'angiotensina II e in alcuni casi non è presente ipokalemia. In assenza dell'angiotensina II il riassorbimento di sodio a livello del tubulo prossimale è diminuito e, conseguentemente, un elevato flusso urinario e sodico è in grado di giungere a livello del nefrone distale, aldosterone-sensibile. Di fronte a ciò, l'interazione aldosterone-MR (*mineralcorticoid receptor*) induce l'incremento del riassorbimento di sodio mediato dai classici canali ENaC e al contempo, per mantenere l'elettroneutralità a livello delle urine, viene garantita l'escrezione di potassio e ioni idrogeno. Chiaramente il riassorbimento di sodio è accompagnato dal riassorbimento di acqua con il risultato di un'espansione isotonica del volume che incrementa l'iperfiltrazione glomerulare (16).

A livello vascolare tutto ciò si traduce in un incremento della pressione arteriosa giungendo all'ipertensione. Inoltre, elevate concentrazioni di aldosterone a livello vascolare stimolano la produzione di citochine pro-infiammatorie come la cicloossigenasi-2, il TNF α , la NADPH ossidasi e proteine chemotattiche per i monociti. Tutte queste molecole inducono stress ossidativo che determina disfunzione endoteliale e rimodellamento vascolare. Quest'ultimo determina vasocostrizione e quindi, aumento del post-carico, nonché stiffness arteriosa.

Questi fattori emodinamici si ripercuotono sul cuore che si ritrova a lavorare con un aumento del precarico e del post-carico. Il mantenimento di elevati regimi pressori si traduce a livello cardiaco in ipertrofia del ventricolo sinistro, fibrosi

perivascolare, sofferenza ischemica dei cardiomiociti, alterato ventricular-vascular coupling e disfunzione diastolica. L'aumento di suscettibilità all'ischemia e la fibrosi perivascolare aumentano il rischio di fibrillazione atriale. Esistono inoltre, degli effetti diretti dell'aldosterone a livello cardiaco che contribuiscono al rimodellamento cardiaco: esso promuove l'ipertrofia dei cardiomiociti, l'infiammazione e l'attivazione di processi di fibrosi.

I meccanismi fisiopatologici e molecolari che portano allo sviluppo dell'APA e che determinano l'ipersecrezione dell'aldosterone sono tuttora sconosciuti. In numerosi pazienti affetti da APA, lo sviluppo della Next Generation Sequencing (NGS) ha permesso l'identificazione di mutazioni somatiche e germinali nei geni che codificano per i canali ionici e per le proteine che regolano il potenziale di membrana delle cellule della zona glomerulare; ciò potrebbe far pensare ad un loro possibile ruolo chiave nella biologia di questi tumori. Alcune mutazioni, come KCNJ5, CACNA1D e CCL2 portano ad un guadagno di funzione, mentre altre, come ATP1A1 e ATP2B3 causano una perdita della funzione. In generale, si pensa che essi promuovano l'espressione di CYP11B2 e la biosintesi di aldosterone attraverso un aumento dei livelli del calcio intracellulare, anche se mediante differenti meccanismi (17).

4.2 Screening e Diagnosi

Ad oggi si ritiene opportuno eseguire uno screening per iperaldosteronismo primario nei pazienti ipertesi, i quali, a causa delle seguenti condizioni, presentano una maggiore probabilità a priori di avere PA:

- ipertensione resistente;
- ipertensione sisto-diastolica >150/100 mmHg;
- ipokaliemia spontanea o indotta da diuretici;
- riscontro incidentale di una massa a livello surrenalico;
- apnee ostruttive notturne;
- familiarità per PA e/o ipertensione in età giovane o evento cerebrovascolare in giovane età;
- fibrillazione atriale non spiegabile altrimenti;
- evidenza di danno d'organo da ipertensione (microalbuminuria, malattia renale cronica, disfunzione diastolica, ipertrofia del ventricolo sinistro) superiore a quello che ci si aspetterebbe a fronte dei valori pressori del paziente (18).

La diagnosi di PA richiede la dimostrazione di bassi livelli di renina e livelli inappropriatamente elevati di aldosterone. Il test informativo più rapido e semplice da effettuare è il calcolo del rapporto tra la concentrazione di aldosterone e la concentrazione di renina, ovvero l'Aldosterone-Renin Ratio (ARR). Per calcolare la

concentrazione di renina ad oggi si utilizza la Concentrazione diretta di renina attiva (DRC).

Prima di eseguire il test è necessario considerare alcuni possibili confondenti, come l'ipokaliemia (riduce i livelli di aldosterone generando falsi negativi) o l'assunzione di diuretici (aumentano i livelli di renina e se causano ipokaliemia abbassano i livelli di aldosterone). I valori di ARR non devono essere valutati come una variabile qualitativa, bensì quantitativa, in modo da stratificare meglio i pazienti e inserirli in un corretto algoritmo diagnostico come riportato in figura 5 (14).

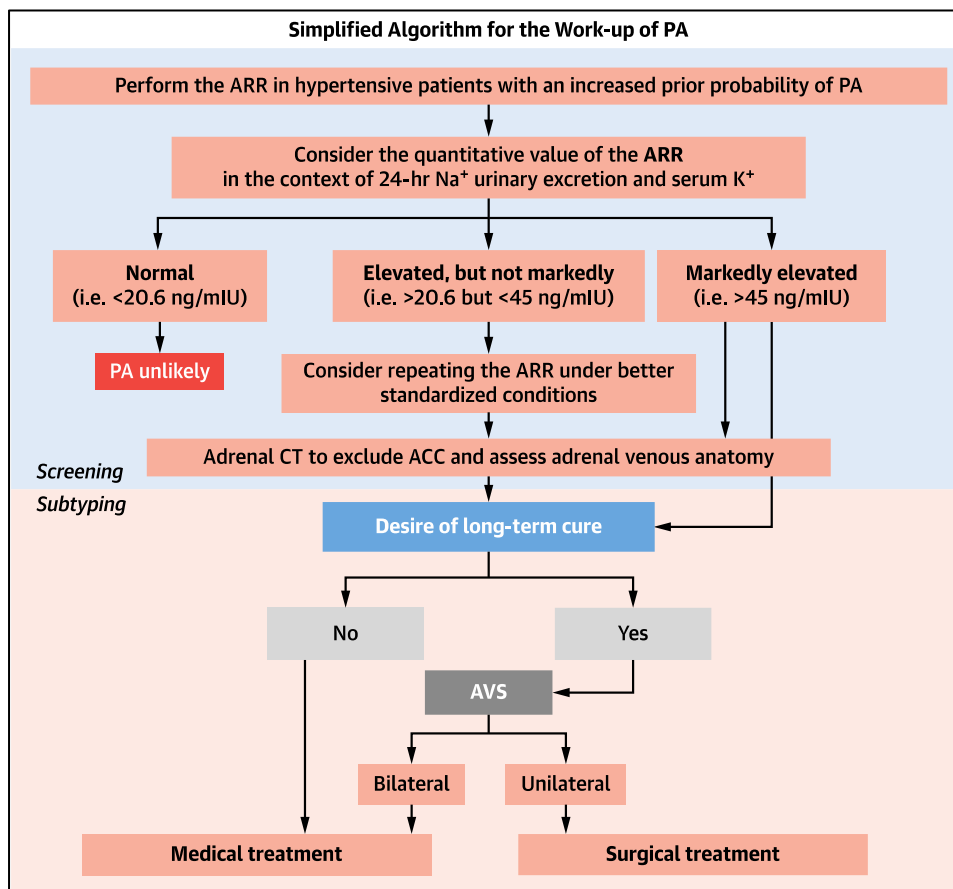


Figura 5. Schema diagnostico per il PA. (Tratto da Rossi GP.) (14)

Step successivo per i soggetti che presentano valori elevati di ARR è l'esecuzione di una tomografia computerizzata (TC), utile per escludere la presenza di carcinoma e fornire un supporto per l'esecuzione dell'AVS (prelievo venoso dalle vene surrenaliche). Se la TAC mostra un singolo nodo ipodenso, con il resto delle ghiandole omolaterali e controlaterali che appaiono lisce e non espanse, al paziente è allora diagnosticato un adenoma surrenalico isolato. Il corpo della ghiandola e le

protuberanze laterali sono tendenzialmente più sottili a livello del lato sinistro rispetto al lato destro rendendo così più difficile diagnosticare l'adenoma corticale destro isolato. La maggioranza degli APA ha un diametro inferiore ai 20 mm (Figura 6). Inoltre, la TC non è molto informativa per distinguere le forme laterali da quelle unilaterali: il 22% delle forme unilaterali risultano negative alla TC, pertanto, basandosi solamente sulla TC non verrebbero sottoposti a intervento curativo 1/5 dei pazienti; inoltre il 25% delle forme unilaterali, secondo la TC, si rivelano invece, bilaterali o unilaterali controlaterali all'AVS (19).

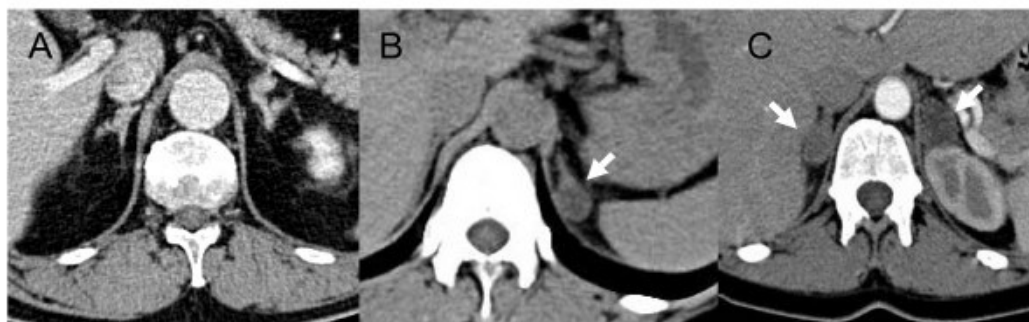


Figura 6: Tomografia computerizzata in tre pazienti con PA (Tratto da: Laurence Amar et al.) (19)

Per tipizzare correttamente la forma di PA, infatti, è necessario sottoporre il paziente ad AVS, procedura interventistica miniinvasiva che prevede di incannulare la vena surrenalica per dosare in maniera precisa i valori di aldosterone e cortisolo. Tipizzare il paziente ha lo scopo di definire il corretto approccio terapeutico e dunque, le forme di PA, nella pratica clinica, vengono distinte in base alla loro resecabilità, in forme chirurgicamente non curabili e forme chirurgicamente curabili (19).

4.3 Trattamento

Nel caso in cui l'aldosteronismo primario è dovuto all'APA, il trattamento ritenuto ottimale è di tipo chirurgico. La surrenectomia laparoscopica unilaterale condotta da un chirurgo esperto è l'approccio chirurgico principale, i pazienti richiedono una sola notte in regime di ricovero e sono in grado di ritornare al lavoro in 7-10 giorni. A causa però della presenza di micronoduli oltre all'APA primario, si procede con la rimozione dell'intera ghiandola. Anche da un punto di vista economico tale trattamento è meno dispendioso di una terapia a lungo termine.

Il trattamento elettivo di tipo farmacologico è consigliato in presenza di iperplasia bilaterale e prevede l'impiego di anti-mineralcorticoidi accompagnato sempre da

controllo del peso corporeo, evitando il consumo di tabacco, incentivando l'esercizio fisico e una dieta a basso consumo di sale. Nello specifico lo spironolattone è stato approvato dall'FDA negli anni '60 ed è ritenuto il farmaco principale nel trattamento dell'aldosteronismo primario. La posologia d'impiego prevede un dosaggio iniziale di 12,5-25 mg/die per poi incrementare la dose a 400 mg se necessario.

L'eplerenone è un antagonista competitivo e selettivo dei recettori mineralcorticoidi, approvato dall'FDA nel 2003 per il trattamento dell'ipertensione essenziale. Rispetto allo spironolattone, l'eplerenone ha lo 0,1% di affinità di legame con i recettori androgenici e meno dell'1% di affinità di legame ai recettori progestinici. L'eplerenone dovrebbe essere somministrato due volte al giorno a causa della sua breve emivita, con un dosaggio iniziale di 25 mg due volte/die. Alcuni studi di potenza hanno dimostrato che l'eplerenone è il 25-30% meno potente in confronto allo spironolattone. In pazienti con forme di iperaldosteronismo familiare di tipo I, un trattamento cronico con un dosaggio fisiologico di glucocorticoidi corregge l'ipokalemia e normalizza la pressione sanguigna (20).

5.0 FORME FAMILIARI DI ALDOSTERONISMO PRIMARIO

Anni fa sono state descritte due forme di iperaldosteronismo familiare (FH): FH-I è stata la prima forma di FH ad essere stata associata ad uno specifico difetto genetico, mentre l'FH-II riguarda tutti gli altri casi. Una terza forma, associata ad ipertensione severa e ipokalemia si è evidenziata nel 2008. L'*FH-I* è caratterizzata da ipertensione severa nell'infanzia o nell'adolescenza, causata da un gene chimerico costituito dalla fusione di due regioni coinvolte nell'espressione degli enzimi alla base del pathway di sintesi dell'aldosterone e del cortisolo. La formazione di tale gene chimerico promuove un'inappropriata regolazione della biosintesi dell'aldosterone ad opera dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e inoltre, l'aldosterone stesso viene prodotto a livello della zona fascicolata.

L'*FH-II* è la forma più comune di iperaldosteronismo familiare con una prevalenza del 1,2-6% in adulti con aldosteronismo primario. Nel 2018, nel primo caso di FH-II è stata identificata una mutazione in CLCN2 alla base dell'espressione del canale del cloro ClC-2. Questo ha evidenziato cambiamenti in alcune proprietà del canale, con un sostenuto efflusso di cloro dalla cellula, alla base della depolarizzazione di membrana, dell'attivazione del signaling del calcio e un incremento dell'espressione di CYP11B2 con un conseguente incremento nella produzione di aldosterone. L'*FH-III* è stata descritta come una forma severa di ipertensione refrattaria ai trattamenti medici con associata una elevata ipokalemia. È stata evidenziata una mutazione in KCNJ5 che codifica per il canale del potassio GIRK4 e a livello istologico è stato riportato un ingrossamento delle ghiandole surrenaliche oltre che ad una perdita della compartimentazione tipica dell'organo e ad

un'eccessiva produzione dell'aldosterone sintasi e conseguentemente di aldosterone (15).

7.0 RECETTORE ACCOPPIATO A PROTEINA G (GPCR)

I recettori accoppiati alle proteine G (GPCR) sono una superfamiglia di recettori transmembrana che giocano un ruolo fondamentale da un punto di vista sia fisiologico, che fisiopatologico nel mediare una serie di processi biochimici in risposta a vari agonisti. Sicuramente, in ambito prettamente farmacologico, possono essere considerati come target per numerosi farmaci. Tali recettori sono costituiti da 7 domini transmembrana (7TMRs) che trasducono il segnale tramite proteine G eterotrimeriche leganti nucleotidi guaninici. La proteina G associata al recettore è una proteina trimerica costituita dalle subunità α , β e γ ; soltanto la subunità α ha però, attività GTPasica, ossia solo questa subunità riesce a idrolizzare il GTP trasformandolo in GDP e ad attivare la via di signalling. In tutti i GPCRs, il GTP è legato attraverso un complesso con il Mg^{2+} , che è coordinato con un ossigeno di un gruppo fosfato nella subunità beta del recettore e con un altro ossigeno, presente in un gruppo fosfato nella subunità gamma (21). Esistono quattro famiglie recettoriali classificate come G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ e $G_{12/13}$ in base all'omologia di sequenza tra più di 21 diversi isotipi di $G\alpha$ codificati da 16 diversi geni.

7.1 Meccanismo molecolare dei GPCR

Il recettore inattivo è associato a un complesso proteico che comprende la subunità $G\alpha$ (con attività GTPasica) legata sia al dimero $G\beta\gamma$ e sia a GDP. Per attivare la proteina è necessario che il recettore leghi il corrispondente ormone o neurotrasmettitore: questo legame cambia la forma del recettore stesso che si lega alla proteina G inattiva sul lato interno della membrana. Questo legame porta la proteina G a far in modo che il GDP venga fosforilato a GTP (guanosina trifosfato); l'idrolisi del GTP comporta un'instabilità della struttura della proteina G stessa, conducendo alla dissociazione della subunità $G\alpha$ dal dimero $G\beta\gamma$. La subunità alfa (associata adesso al GTP) si sposta sulla membrana finché non attiva gli effettori del caso, come l'adenilato ciclasi (che avvia la produzione di cAMP) o i canali ionici, come quelli per il calcio e per il potassio, che poi potranno attivare secondi messaggeri al fine di far avanzare il messaggio cellulare. Tra gli enzimi attivati ci sono adenilato ciclasi, fosfodiesterasi e fosfolipasi; i secondi messaggeri generati possono essere quindi, oltre al cAMP, anche l'inositolo trifosfato o il Ca^{2+} (22).

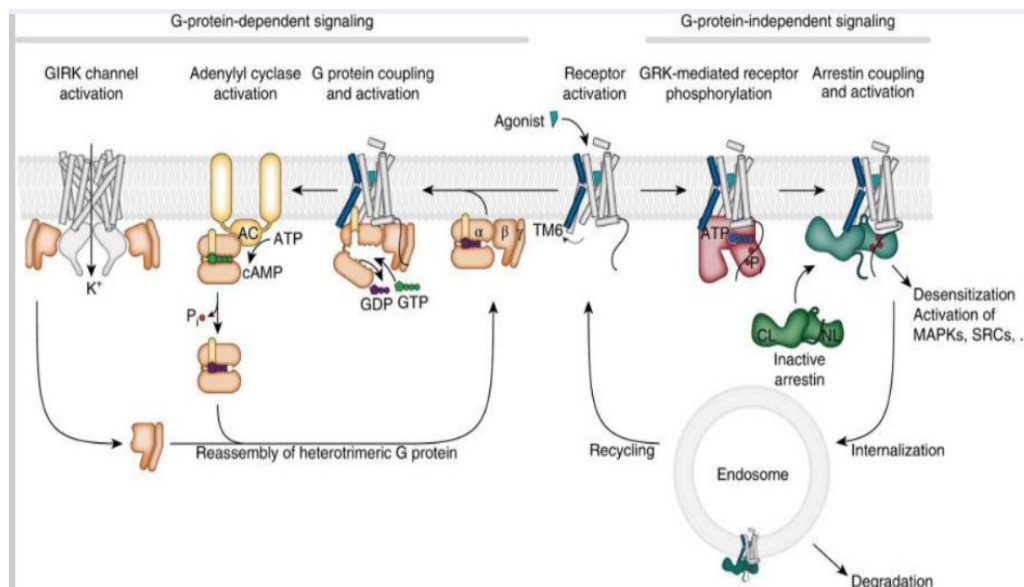


Figura 7: *Trasduzione del segnale in GPCR*
(Tratta da Hilger et al.) (22)

7.2 Recettore per gli estrogeni accoppiato a proteina G (GPER)

Il recettore per gli estrogeni accoppiato a proteina G (GPER) è stato identificato negli anni '90, quando diversi gruppi di ricerca lo hanno clonato nel tessuto vascolare e tumorale e denominato inizialmente GPR30. Era considerato un recettore orfano in quanto era nota la sua struttura e la localizzazione, ma non il suo ligando endogeno. Nel 2005 è stato identificato come recettore in grado di legare gli estrogeni a livello della membrana cellulare e di espletare gli effetti rapidi degli estrogeni ed è stato ridenominato GPER da parte dell'International Union of Pharmacology (23).

La localizzazione subcellulare del GPER è stata a lungo dibattuta; *Revankar e coll.* hanno osservato che il recettore GPER si localizza nel reticolo endoplasmatico, con parziale presenza anche nell'apparato del Golgi e nella membrana nucleare (24). Diversamente lo studio di *Thomas P e coll.* ha mostrato la presenza di GPER sulla membrana cellulare in cellule SKBR3 e HEK293: questo dato risulta essere in linea con la localizzazione, a livello della membrana cellulare, della maggior parte dei recettori accoppiati alle proteine G (25). Recentemente *de Valdivia e coll.* grazie all'utilizzo di tre diversi anticorpi specifici verso il dominio N-terminale, non solo hanno riportato l'espressione del GPER a livello del reticolo endoplasmatico, della membrana cellulare e delle vescicole di endocitosi, ma soprattutto hanno

dimostrato come la glicosilazione a livello dell'Asn-44 sia critica per la maturazione del GPER a livello della membrana cellulare (26).

7.3 Meccanismo molecolare del GPER

Per quanto riguarda il meccanismo molecolare e le funzioni biologiche di GPER, esse variano in relazione al tipo di cellula e alla localizzazione: ad esempio, GPER localizzato nei vasi sanguigni induce vasodilatazione e riduzione della pressione. (27)GPER ridurrebbe la pressione arteriosa anche riducendo l'attività del sistema renina-angiotensina (28).

L'iperpressione di GPER è stata osservata in molti tipi di cellule tumorali. Alcuni studi suggeriscono che l'attivazione di GPER favorisca la crescita tumorale, promuovendone la proliferazione, la differenziazione e la resistenza ai farmaci in alcuni carcinomi polmonari, della tiroide, della vescica e del cavo orale (29). Il GPER, come detto, lega l'ormone femminile 17β -estradiolo (E2) ed è responsabile di alcuni suoi effetti rapidi non genomici come la vasodilatazione dovuta ad aumento della sintesi di ossido nitrico nelle cellule endoteliali (30)(31). Per individuare gli effetti mediati dall'attivazione del GPER, separandoli da quelli dati dall'azione degli estrogeni sui recettori nucleari $ER\alpha$ e $ER\beta$, è stato sviluppato un agonista selettivo di questo recettore, il G-1 (1-[4(6-bromobenzo [1,3] dioxol-5yl)-3a, 4, 5, 9b-tetrahydro-3H-cyclopenta-[c]quinolin-8-yl]-ethanone).

Il GPER è coinvolto anche nella regolazione del tono vascolare e nell'omeostasi di lipidi e glucosio, anche se, ancora, non sono del tutto chiari tutti i suoi ligandi. In seguito al legame col suo ligando il GPER va incontro a un cambiamento conformazionale che termina con il distacco dal recettore della subunità $G\alpha$ dalle subunità $G\beta\gamma$, questo porta all'attivazione intracellulare della fosfoinositide-3-kinasi (PI3K), un enzima coinvolto in diversi meccanismi cellulari come crescita e proliferazione cellulare. Questo fenomeno determina l'aumento del cAMP e degli ioni calcio intracellulari, di conseguenza si ha aumento della produzione del cAMP nei mitocondri, evento calcio-dipendente. Un altro signaling che può essere attivato da GPER porta alla transattivazione dell'EGFR e coinvolge i recettori non tirosin chinasi della famiglia Src. La stimolazione del GPER attiva le metalloproteasi e induce il rilascio di eparina legante l'EGF che a sua volta lega e attiva l'EGFR con la conseguente attivazione di ERK1 e ERK2. Oltre al meccanismo appena discusso i GPER regolano anche l'attività trascrizionale attraverso il meccanismo di segnalazione che coinvolge cAMP, ERK e PI3K. In tal caso i geni regolati dal GPER includono FOS che codifica per c-FOS, generando un eterodimero con varie altre proteine per formare il fattore di trascrizione AP-1 (Figura 9) (32).

È stato, inoltre, dimostrato che il GPER è coinvolto sia in meccanismi pro- che antiproliferativi e apoptotici. Allorquando i ERs nucleari sono espressi, l'attivazione del GPER porta ad una inibizione della proliferazione, mentre quando le cellule sono ERs negative, l'attivazione del GPER porta ad un aumento della proliferazione. L'attività antiproliferativa è stata studiata nel caso del carcinoma adrenocorticale in cui si è visto che il G-1 inibiva la crescita cellulare sia in vitro su cellule H295R, sia in vivo. Il trattamento di cellule tumorali con l'agonista G-1 ha portato a un significativo arresto nella proliferazione tempo-dipendente di queste cellule;

tuttavia, silenziando il GPER l'azione antiproliferativa del G-1 si è ridotta solo parzialmente. Il trattamento con G-1 provoca un accumulo delle cellule in fase G2, aumentano le cicline B1 (CCNB1), evento associato al fenomeno apoptotico.

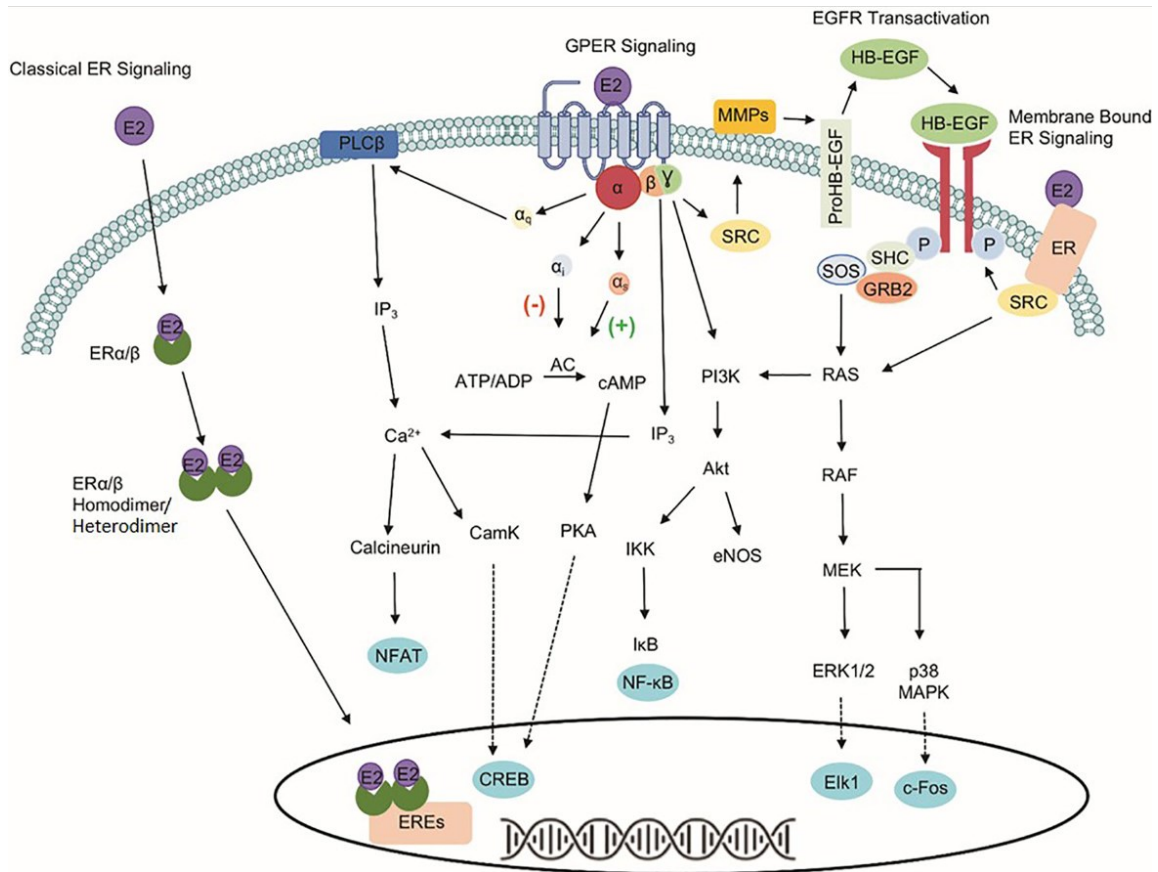


Figura 8. Overview del meccanismo molecolare mediato da GPER (Tratto da DeLeon C et al.) (32)

8.0 GPER E SINTESI DI ALDOSTERONE

L'espressione di GPER e dei recettori nucleari per gli estrogeni ($ER\alpha$ e $ER\beta$) è stata indagata nella ghiandola surrenalica normale, nell'adenoma produttore aldosterone e nella linea cellulare di carcinoma surrenalico HAC15. Il GPER e l' $ER\beta$ risultano essere i recettori maggiormente espressi nella ghiandola surrenalica, in particolare GPER è il recettore più espresso nell'APA. Le cellule HAC15 esprimono tutti i recettori ERs e sono state utilizzate dal gruppo di ricerca per indagare il ruolo dei diversi recettori nella sintesi di aldosterone. In seguito a trattamento delle cellule HAC15 con 17β -estradiolo, l'espressione del gene CYP11B2 non variava. Se, però, il trattamento con 17β -estradiolo era preceduto da pre-incubazione con un antagonista di $ER\beta$, l'espressione del gene CYP11B2 aumentava. Analogamente, quando le cellule HAC15 venivano stimulate con l'agonista del GPER G1, l'espressione di CYP11B2 non aumentava, mentre quando le cellule erano pretrattate con un antagonista di $ER\beta$ e poi stimulate con G1 l'espressione genica di CYP11B2 aumentava significativamente. Questo effetto era bloccato se le cellule venivano pretrattate con G-15, un antagonista di GPER. Questi dati ottenuti nella linea cellulare HAC15 suggeriscono un ruolo fondamentale di GPER nella regolazione della sintesi dell'aldosterone (33).

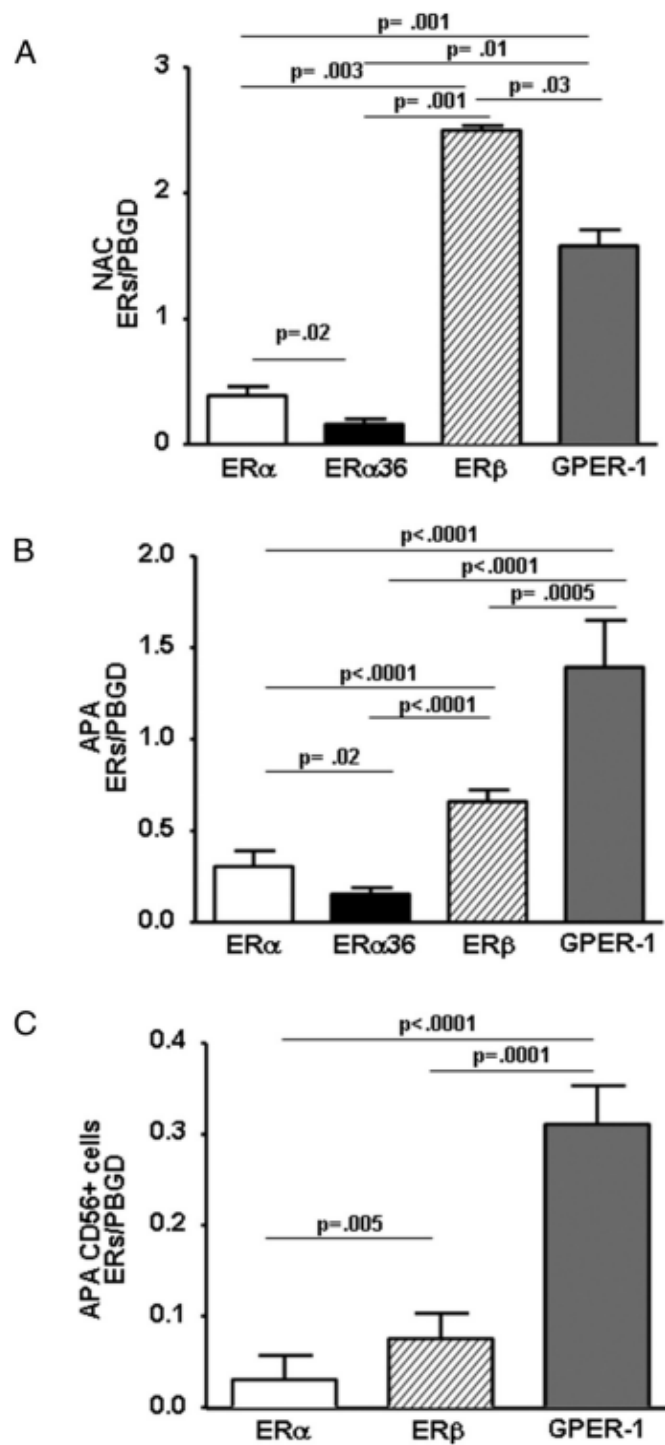


Figura 9: Espressione dei diversi sottotipi recettoriali attraverso RT-PCR in NAC (A), APA (B) e CD56+ da diversi APA (C). (Tratta da Carocchia et al.) (33)

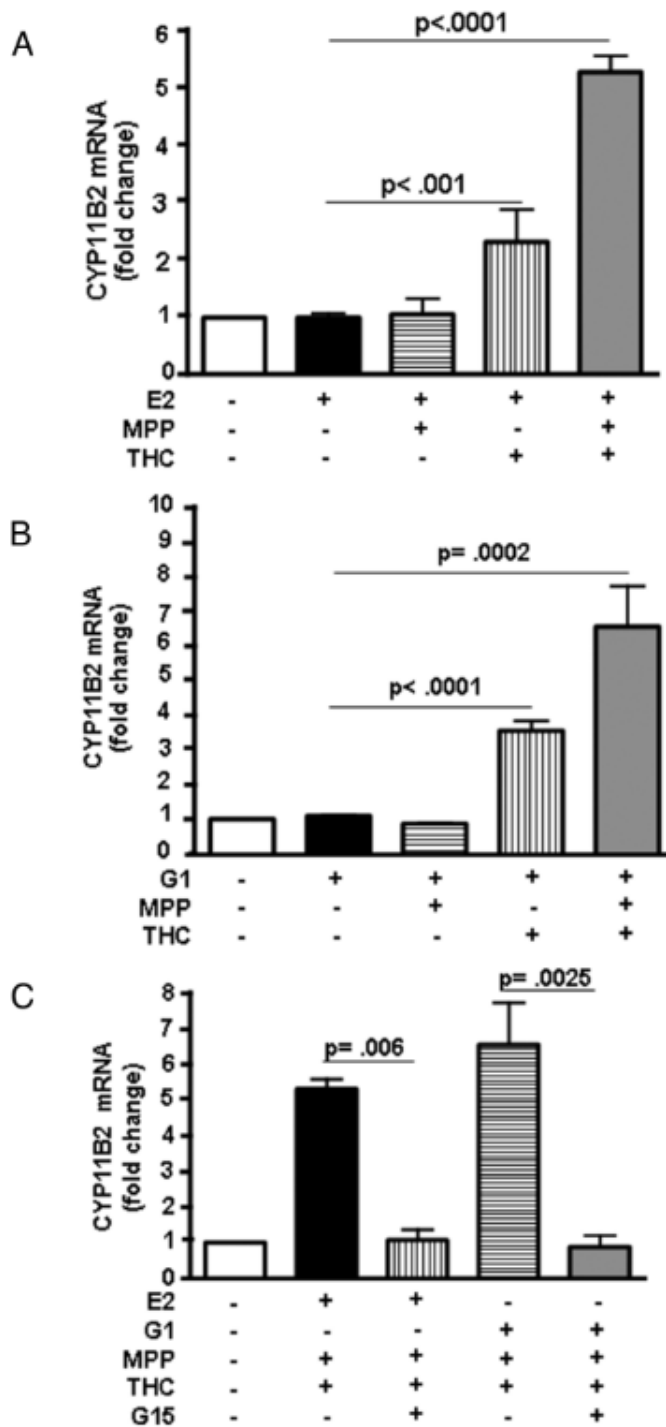


Figura 10. Variazione dei livelli di espressione di CYP11B2 a seguito di stimolazione con 17β -estradiolo e i principali agonisti e antagonisti del recettore ER2 e GPER. (Tratta da Carocchia et al.) (33)

8.0 EFFETTI GENOMICI E NON GENOMICI DELL'ALDOSTERONE

Nei classici modelli meccanicistici dell'aldosterone il primo step è il suo ingresso a livello citosolico attraverso un classico processo di diffusione. Successivamente, viene promossa l'interazione con il recettore mineralcorticoide e, grazie al conseguente rilascio delle heat shock proteins (HSPs), viene garantita la traslocazione del complesso a livello nucleare, legandosi a specifiche regioni del DNA che contengono elementi mineralcorticoidi responsivi. Tale interazione innesca la trascrizione genica e i primi effetti si possono osservare in 30-60 minuti dal rilascio di aldosterone. Di grande impatto è stata la scoperta, più di 50 anni fa, della capacità dell'aldosterone di mediare i propri rapidi effetti attraverso una via non genomica. Proprio per il profilo completamente differente dagli effetti genomici prima citati, è plausibile pensare che possano essere promossi da recettori differenti dai classici nucleari, come recettori transmembrana (34).

Considerati gli alti livelli di espressione di GPER nella corticale della ghiandola surrenalica e negli adenomi secernenti aldosterone, poiché GPER può interagire non solo con il 17β -estradiolo, ma anche con l'aldosterone, *Caroccia e coll.* hanno indagato la possibilità che l'aldosterone possa modulare l'espressione del gene CYP11B2 e, di conseguenza, la sua produzione tramite un'interazione con GPER. Le cellule HAC15 sono state incubate con aldosterone a concentrazioni crescenti e a diversi tempi. Dopo 12 ore di stimolazione, l'aldosterone, a concentrazioni pari a 10^{-8} M e 10^{-7} M, era in grado di incrementare l'espressione di CYP11B2 e quindi, la sua sintesi. Per chiarire attraverso quale recettore l'aldosterone inducesse la sua sintesi, gli esperimenti sono stati ripetuti in presenza di canrenone, un inibitore selettivo di MR, e/o in presenza di G36, antagonista selettivo del GPER. Gli autori hanno quindi, dimostrato che l'aumento dell'espressione genica di CYP11B2 determinata dall'aldosterone avveniva attraverso un'azione svolta a livello del GPER, in quanto tale effetto non risultava essere apprezzabile in presenza del G36 e non era bloccato dal canrenone.

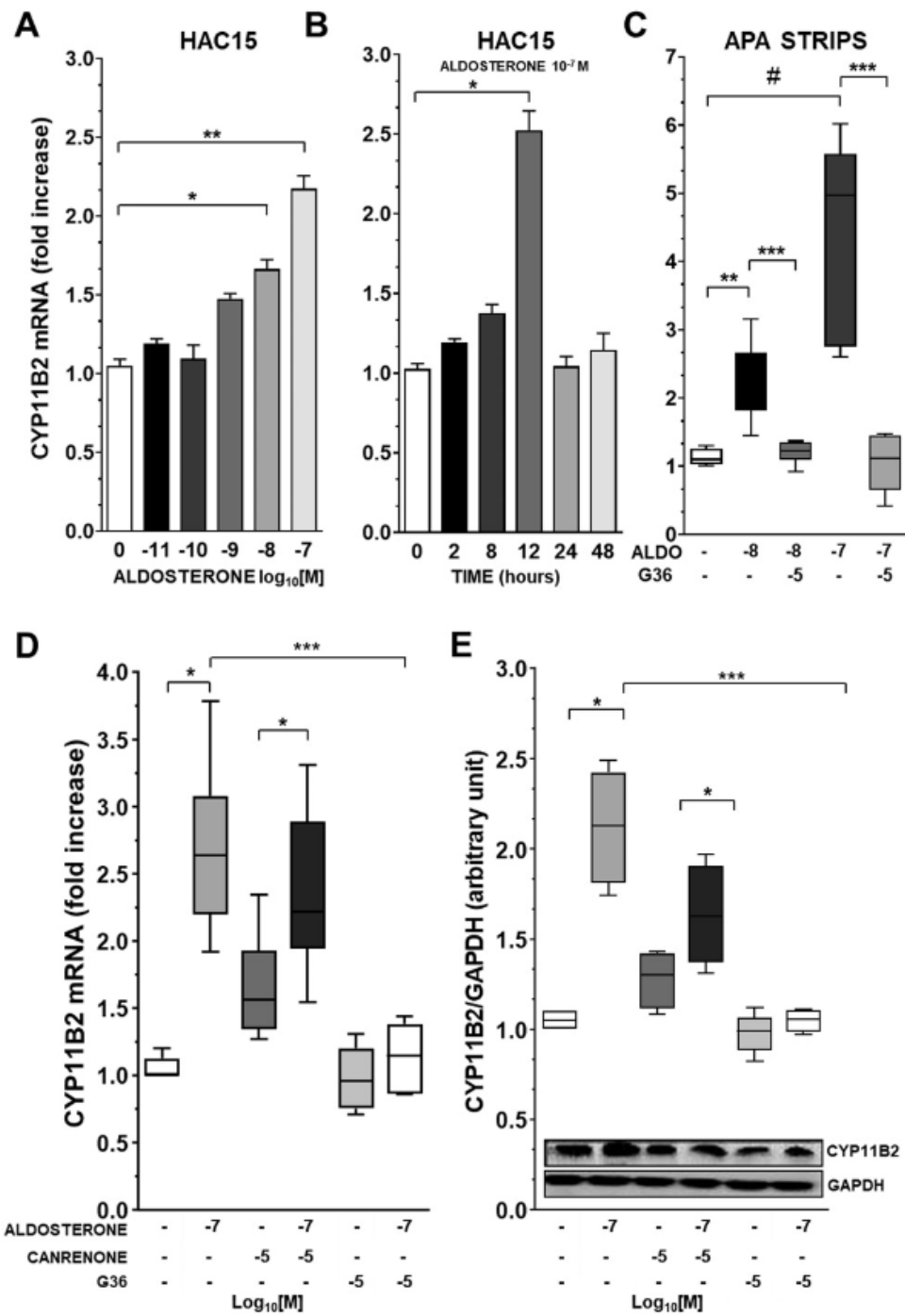


Figura 11. La stimolazione cellulare con aldosterone incrementa i livelli di espressione genica di CYP11B2. (Tratto da Caroccia et al.) (35)

Inoltre, gli autori dimostrarono che l'aldosterone era in grado di favorire l'eterodimerizzazione tra i recettori AT1R e GPER e che questa interazione tra i 2 recettori potenziava l'effetto sia dell'Ang II, che dell'aldosterone sull'espressione genica di *CYP11B2* (35).

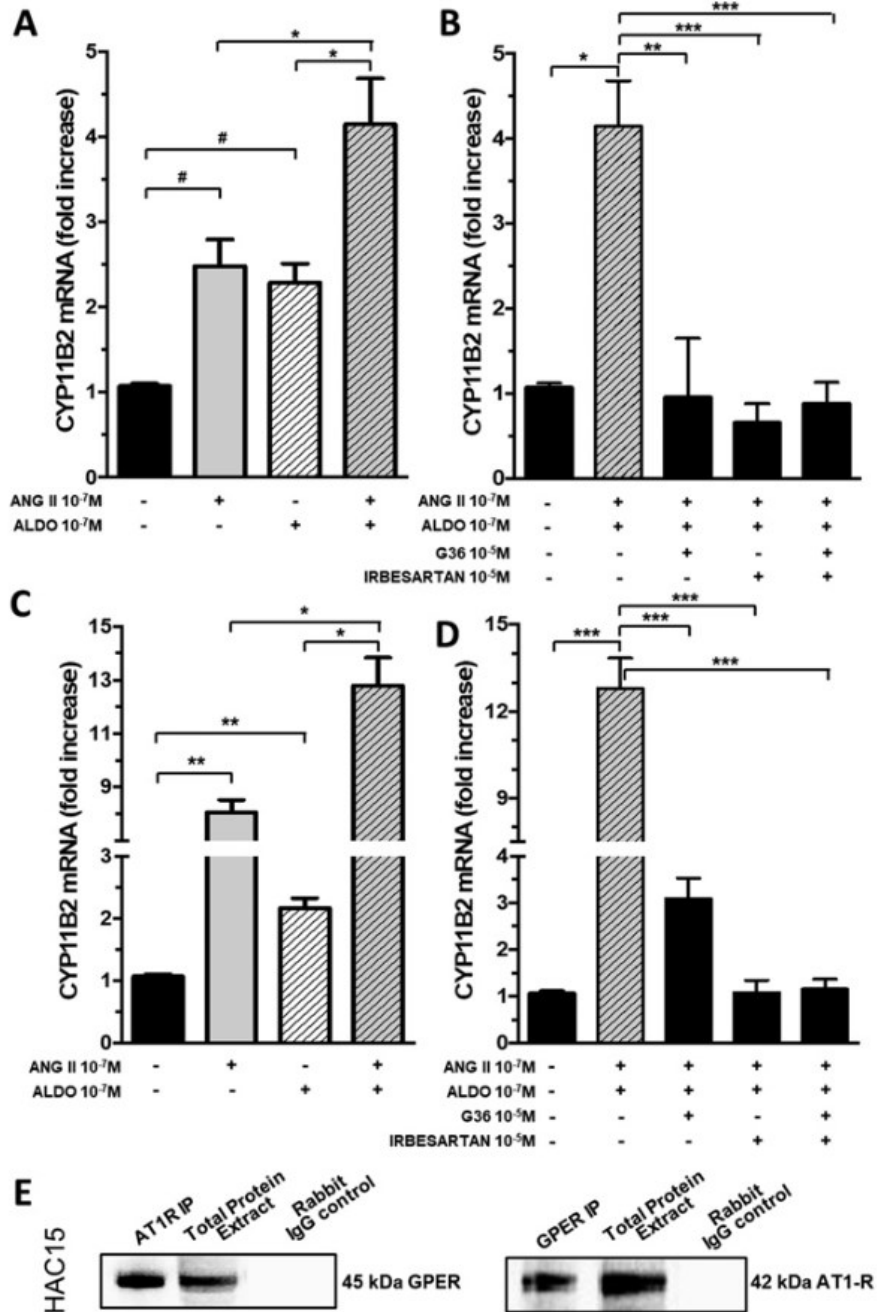


Figura 12. Livelli di espressione di aldosterone sintasi a seguito di stimolazione con aldosterone e antagonisti o agonisti per GPER e MR (Tratta da Carocchia et al.) (35)

La capacità di multimerizzazione è stata riportata anche tra MR-GPER ed EGFR-GPER grazie all'azione svolta dall'aldosterone ed è coinvolta nei meccanismi di cancerogenesi alla base del tumore al seno. Analisi empiriche a supporto evidenziarono come, in modelli cellulari in cui si operò un silenziamento nei confronti dell'espressione del GPER, vi fosse un'inibizione dell'attivazione dell'EGFR stesso (36).

11.0 ANALISI DI DOCKING

Gli studi di interazioni proteiche potenzialmente coinvolte nei processi fisiopatologici possono avvalersi oggi di innovative strategie computazionali di "docking". Tale approccio permette di predire la struttura del complesso di interazione proteina-proteina a partire dai singoli componenti, ciascuno dei quali può essere noto o essere una molecola non ancora studiata. I recenti avanzamenti algoritmici permettono in alcuni casi di produrre modelli di docking di alta qualità e perfettamente compatibili con l'ambito biologico e fisiologico. Il vantaggio non è solo andare a vedere se i ligandi occupano un preciso sito, ma fare anche una predizione di quella che può essere l'affinità del ligando per quel sito, accelerando così, anche i tempi e riducendo anche il numero degli esperimenti fisici da effettuare. Allo stesso tempo esistono altrettante sfide nell'ambito della predizione statistica, per esempio nel caso di proteine a più domini, gli approcci di docking a corpo rigido sono insufficienti quindi, si ha la necessità di accoppiare informazioni evoluzionistiche o predizioni del sito coinvolto nell'interazione. Nel dettaglio ci si focalizza sui complessi che hanno interazioni in siti importanti per la regolazione dell'attività della proteina. Per ridurre i costi tempo-macchina, in prima approssimazione si possono eliminare componenti come l'acqua o considerare ligando e proteina come dei sistemi rigidi. Fisiologicamente nessuno dei due è rigido, anzi, molto spesso, i cambi conformazionali regolano un intervento efficace da parte del ligando. Quindi si considera prima solo il ligando come flessibile e poi sia il ligando, che il recettore. Di conseguenza le metodiche di interesse vengono definite:

- metodo a corpo rigido
- metodi a ligando flessibile
- metodi a recettore flessibile

tale ordine rispecchia un aumento del lavoro necessario, perché in genere il ligando è la componente più piccola, di conseguenza tenerlo flessibile costa di più. Allo stesso tempo tenere flessibile il nostro bersaglio, potenzialmente molto grande,

costa allo stesso modo di più e il calcolo è sempre più complesso. Le informazioni che possiamo ottenere sono: come un ligando sia in grado di assumere differenti posizioni all'interno di una certa tasca, oppure su tasche diverse, o come diversi ligandi possono andare ad occupare un determinato sito. Generalmente la flessibilità o l'occupazione vengono analizzate su una zona limitata della proteina, poiché diventerebbe molto complicato lasciarla completamente libera di riarrangiarsi nello spazio. Le si lascia invece, una certa flessibilità su determinati siti di legame per ottenere predizioni più accurate. Altre problematiche che si possono incontrare sono interazioni deboli o transienti.

12.0 RISONANZA PLASMONICA DI SUPERFICIE

Gli studi di interazione possono essere svolti approfittando delle numerose tecniche tutt'ora a disposizione, tra cui ritroviamo metodi chimici, cromatografici, elettroforetici, fisici, biologici e spettroscopici. Tra i metodi fisici non si può non citare l'ultracentrifugazione analitica, la spettrometria di massa, le tecniche di scambio idrogeno-deuterio (HDX) e la calorimetria. Ciascuno di tali metodi ha i suoi vantaggi ed i suoi svantaggi, spicca soprattutto il fatto che si abbia quasi esclusivamente un risvolto qualitativo e non quantitativo come, per esempio, il calcolo del ΔG o la costante di dissociazione. I metodi spettroscopici sono probabilmente i più interessanti pur richiedendo molti accorgimenti. Per questo motivo la risonanza plasmonica di superficie (SPR) ha introdotto una vasta pletora di vantaggi negli studi di interazione. Sin dalla sua prima introduzione nel 1991 il numero di pubblicazione a riguardo è aumentato notevolmente; più del 90% degli esperimenti è svolto con Biacore, la piattaforma più comune. I sistemi Biacore hanno come principale vantaggio la possibilità di monitorare le interazioni senza l'utilizzo di un labelling. Sicuramente, di grande interesse, sono gli studi di interazione proteina-proteina, i quali consentono di capire le relazioni che intercorrono tra struttura e funzione. L'interazione molecolare per definizione è descritta da alcuni parametri, quali l'affinità e la cinetica; con i sistemi Biacore si può arrivare a conoscere qual è la dinamica di interazione e si può promuovere una quantificazione della proteina attiva nel campione e conoscerne la specificità. Da un punto di vista prettamente morfologico l'apparecchiatura di cui ci avvaliamo è caratterizzata dal presentare tre attori principali: il sensor chip, il sistema di microfluidica e, in ultimo, il sistema di risonanza plasmonica di superficie.

12.1 Meccanismo dell'SPR

Il fenomeno fisico su cui si fonda l'SPR è stato descritto nei primi anni del ventesimo secolo, essa si basa su fenomeni di riflessione della luce (37). Il sensor chip più

comune è costituito da un supporto di vetro sul quale poggia una lamina d'oro e al di sopra di quest'ultima si ritrova una matrice di destrano con gruppi carbossilici che si potranno impiegare per la conseguente derivatizzazione. La seconda componente è il sistema di microfluidica (IMC). Tali sistemi controllano la somministrazione del campione e sono miniaturizzati. I vantaggi in tal senso sono la possibilità di somministrare volumi piccoli, in quanto si ha una dispersione minima e si possono utilizzare diverse superfici sul chip. La terza componente è la risonanza plasmonica di superficie, in particolare un raggio laser di luce polarizzata incide con un determinato angolo su una superficie solida, ovvero l'oro (Figura 10). Grazie a ciò la luce trasferisce energia agli elettroni sulla superficie generando i cosiddetti plasmoni. Quest'ultimo concetto è stato proposto da Pines e Bohm nei primi anni '50 e fa riferimento all'oscillazione quantica del plasma. Essi furono di grande interesse chimico per la loro grande abilità di assorbire la luce (38). Il trasferimento di energia descritto si evidenzia con un cambio nell'angolo di riflessione, denominato angolo SPR e tale cambiamento è proporzionale a cosa si è legato sulla superficie. Nel momento in cui andiamo a immobilizzare il ligando sulla superficie del chip la massa aumenta con una conseguente variazione nell'angolo SPR e nell'indice di rifrazione. Le interazioni vengono rappresentate in forma grafica tra la risposta del segnale SPR contro il tempo (Figura 11). La relazione matematica che spiega la genesi del segnale SPR è la seguente:

$$k_{SP} = nk_0 \sin \theta,$$

dove n è l'indice di rifrazione nel mezzo e θ è l'angolo di incidenza (39). In un primo momento sul chip si ha solo il ligando e si invia inizialmente il buffer nelle medesime condizioni di quelle di interazione, generando così la linea di base. In un secondo step si invia il campione che se interagirà indurrà un incremento della massa (associazione). Nell'ultima fase si invia nuovamente il buffer per promuovere la dissociazione spontanea del ligando. Per garantire la buona riuscita della successiva analisi si opera poi una fase di rigenerazione. Grazie a tale tecnica possiamo monitorare l'interazione di interesse in tempo reale senza incidere sulle proprietà del campione che potrà essere sia colorato, che opaco. Da un punto di vista prettamente chimico esistono due approcci di immobilizzazione a livello del sensor chip: tramite legami covalenti o mediante un meccanismo di cattura. I parametri fondamentali da considerare sono il peso molecolare del ligando da immobilizzare, il numero dei possibili siti di legame, la purezza, i gruppi funzionali, il punto isoelettrico e la quantità a disposizione. L'immobilizzazione diretta prevede la genesi di legami chimici a partire dai gruppi funzionali potenzialmente derivatizzabili quali gruppi amminici, tioli, aldeidi ecc. Il secondo approccio, definito di cattura, richiede l'impiego di una molecola precedentemente immobilizzata sulla superficie come per esempio la streptavidina, nota per dare origine ad un legame ad alta affinità con la biotina.

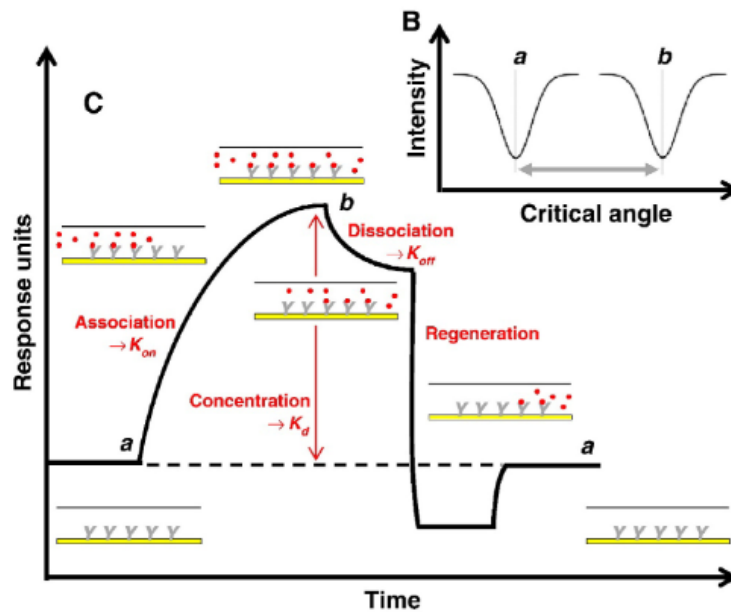


Figura 13: Esempio di sensogramma ottenuto tramite SPR. (Tratto da Kimberly A. Young, Ricardo L. Mancera.) (43)

12.2 GPER e SPR

Tra le varie opportunità che tale strumento ci dà troviamo la possibilità di operare delle analisi di affinità, di quantificazione e di specificità. Quella di principale interesse è sicuramente uno studio di interazione, che può intercorrere tra proteine, macro e micromolecole fino agli acidi nucleici. La tecnologia SPR ci dà l'opportunità di studiare le possibili interazioni che coinvolgono i GPCR, tra cui rientrano i GPER di interesse. Il primo studio a supporto di tale possibilità prevede l'impiego di una SPR bidimensionale; tipicamente la soluzione campione viene esaminata sul sensor chip precedentemente descritto sul quale immobilizziamo un anticorpo. La luce incidente induce l'oscillazione risonante a livello degli elettroni all'interfaccia tra la soluzione campione e la superficie d'oro. Quando la proteina viene immobilizzata a livello dell'anticorpo di superficie si osserverà una variazione dell'angolo SPR. Di fatto l'intensità della luce riflessa può essere presa come una misura della quantità di proteina immobilizzata. Il gruppo di ricerca in questione ha voluto impiegare l'SPR per rilevare la traslocazione della protein chinasi C (PKC) in risposta al 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA), un agonista della PKC. Una

volta garantita l'attivazione della PKC si avrà la classica traslocazione dal citosol alla membrana plasmatica e, il conseguente accumulo della PKC adiacente alla membrana, incrementerà il fenomeno della riflessione. Sicuramente, questo primo approccio aprì la strada alla possibilità di utilizzo di tale strumentazione per analizzare la cascata del segnale a partire dai recettori accoppiati alla proteina G, in particolare, nello studio in questione, si è pensato di immobilizzare direttamente la linea cellulare di HEK293 sul sensor chip in modo tale da studiare i GPCR a partire direttamente dalla superficie cellulare (Figura 14) (40). Un secondo studio, inoltre, ha potuto rendere ancora più evidente come l'SPR possa essere utilizzata per rilevare la risposta cellulare mediata dai GPCR in cellule viventi poste in coltura direttamente a livello del sensor chip. In particolare si sono utilizzate cellule CHO-K1, in grado di aderire e proliferare a livello del chip d'oro senza nessun tipo di modificazione chimica di superficie. Quello che si è evidenziato in questo caso specifico è stata una chiara risposta a livello dei recettori M2 e D2 oltre che PAFR e BLT1 (21).

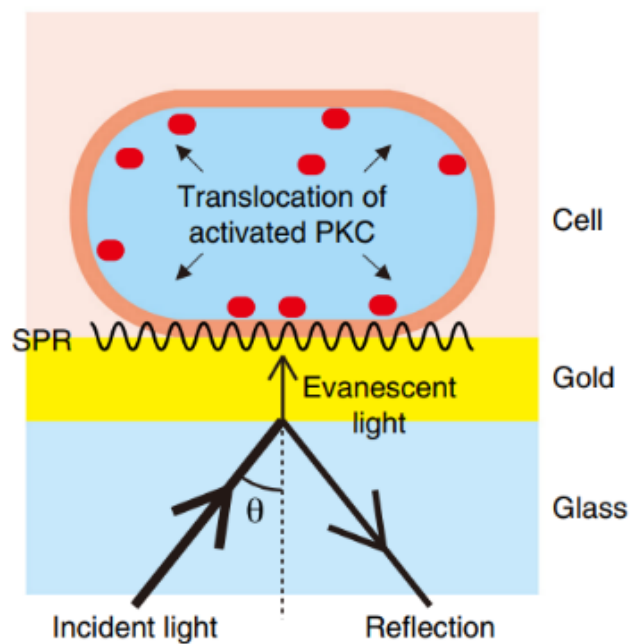


Figura 14: configurazione SPR
(adattata da Nanobe, Y et al.) (40)

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Recentemente è stata riportata la capacità degli ormoni steroidei di agire rapidamente, anche entro pochi minuti, e di indurre alcune risposte cellulari che non hanno, quindi, il tempo di poter essere mediate da proteine trascritte e sintetizzate *ex novo*, in seguito al legame degli ormoni steroidei con i classici recettori nucleari. Questi effetti così rapidi sono definiti “non genomici” e possono essere mediati dall’attivazione dell’adenilato ciclastasi, delle MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), della fosfatidilinositolo 3-chinasi e dall’aumento della concentrazione intracellulare di calcio. Il GPER è stato identificato come il recettore che media gli effetti rapidi non genomici del 17 β -estradiolo, il principale tipo di estrogeno circolante. Il 17 β -estradiolo si lega a GPER con altissima affinità promuovendo gli effetti precedentemente descritti (23). L’estradiolo non è l’unico ligando di GPER: anche estrone ed estriolo, bisfenolo A, genisteina (un isoflavone) e nonilfenolo possono attivare GPER (41).

Da molto tempo si è a conoscenza del fatto che GPER regola gli effetti rapidi dell’aldosterone; tuttavia, non è ancora stato dimostrato il legame tra aldosterone e GPER. *Gros e coll.* hanno dimostrato, ad esempio, in cellule ottenute da tessuto fresco di aorta, che aldosterone aumenta la quantità di ERK fosforilato in maniera concentrazione-dipendente quando e che questo effetto è inibito sia dagli antagonisti del recettore mineralcorticoide, sia dagli antagonisti di GPER, suggerendo così che gli effetti rapidi dell’aldosterone dipendano da più di un recettore.

Obiettivo del nostro studio è stato verificare se l’aldosterone possa interagire in maniera diretta con GPER. Il possibile legame tra aldosterone e GPER è stato indagato tramite Surface Plasmon Resonance (SPR), utilizzando come controllo positivo uno dei principali ligandi del GPER ovvero il 17 β -estradiolo.

MATERIALI E METODI

1.0 MOLECULAR DOCKING

L'analisi di chimica computazionale definita Docking molecolare consente di predire l'interazione tra aldosterone e GPER, impiegando un controllo positivo quale il 17 β -estradiolo, viene da. In particolare, si è utilizzato un software online utilizzato nella predizione delle interazioni tra entità molecolari, quali una proteina target e una piccola molecola come gli steroidi di nostro interesse. Tale servizio fornito dallo *Swiss Institute of Bioinformatics* prende il nome di SwissDock. Precedentemente al lancio del programma vi è la necessità di inserire i dati strutturali delle molecole di interesse. Non essendo disponibile la struttura cristallografica del GPER, poiché si tratta di una macromolecola ad attività recettoriale e quindi, molto complessa, la banca dati UniProt, del *National Institute of Health (NIH)*, fornisce la struttura virtuale costruita sulla base di similitudini con recettori della medesima famiglia o di famiglie affini. Al contempo, la struttura steroidea di aldosterone e 17 β -estradiolo è stata ricavata tramite un database gratuito di tutti i composti chimici presenti in commercio ed utilizzati per i cosiddetti "virtual screening"; tale servizio definito ZINC¹² è gentilmente fornito al pubblico dalla University of California, San Francisco (UCSF). Una volta ottenuti i dati di interesse questi vengono caricati in SwissDock che elabora le informazioni strutturali e di affinità e permette di fornire in breve tempo tutte le strutture e conformazioni più attendibili per ciò che concerne l'interazione molecolare di interesse. Al termine viene fornita una tabella con tutte le strutture predette, accompagnate dai valori di ΔG misurato in termini di attendibilità. L'analisi strutturale è stata fatta tramite il software Chimera, nel dettaglio si è andati ad esplorare l'interazione associata al ΔG minore, indice di maggior attendibilità. Grazie alla possibilità data da UniProt di ricavarsi informazioni sulla sequenza amminoacidica associata a ciascun dominio si sono analizzate le regioni maggiormente coinvolte nell'interazione.

2.0 SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR)

La verifica sperimentale dell'interazione tra aldosterone e GPER viene effettuata tramite utilizzo della Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR), in particolare il modello di strumento a disposizione è stato Biacore X100 (*Cytiva™*). Inizialmente si devono evidenziare le migliori condizioni di interazione scegliendo il pH opportuno, tale operazione viene definita *pH scouting*. Il primo set di studi si è effettuato utilizzando il GPER disponibile in commercio preparato in germe di grano (AbCam (ab152434)), alla concentrazione di 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ovvero 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ed in quantità pari a 2 μg . Avendo a disposizione un volume totale di 100 μL si è deciso di ridurre la quantità di GPER da utilizzare pari a 4 μL , ovvero ad una concentrazione pari a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Operativamente il *pH scouting* ha richiesto l'utilizzo 10 mM ammonio acetato a tre diversi valori di pH pari a 4,0-4,5-5,0, eliminando gli estremi pari a 3,5 e 5,5 così da ridurre il quantitativo di GPER da utilizzare. In particolare, si sono allestite tre Eppendorf con 45 μL di ammonio acetato a pH 4,0-4,5-5,0. A ciascuna Eppendorf vengono poi tolti 4 μL ed aggiunti 4 μL del GPER. Il *pH scouting* prevede anche la preparazione del regeneration buffer per ripristinare le condizioni iniziali, quest'ultimo consiste in una soluzione 50 mM di NaOH. Vengono quindi posizionate sul rack di raccolta, seguendo l'ordine indicato dal software, le tre Eppendorf contenenti il ligando da immobilizzare che verranno poi iniettate in ordine sequenziale. Una volta effettuato il *pH scouting* e accertato che il valore migliore risulta essere quello pari a pH 4,0 si può procedere all'immobilizzazione del ligando di interesse, ovvero il GPER, sul sensor chip. Per l'immobilizzazione del GPER si è utilizzato l'approccio definito di *immobilizzazione diretta*, in particolare si sono sfruttati i chip CM5 (*Cytiva™*). Essi rappresentano la prima scelta per ciò che concerne l'immobilizzazione mediante sfruttamento della chimica delle ammine. I chip in questione sono costituiti da una matrice di destrano carbossimetilato covalentemente legato ad una sottile lamina d'oro; di conseguenza, si potranno sfruttare i gruppi amminici esposti sulla superficie della proteina. La fase di pre-concentrazione del ligando avviene mediante l'instaurarsi di interazioni elettrostatiche con la superficie e affinché questa risulti essere efficace è necessario che il pH di lavoro si trovi tra la pK_a della superficie e il punto isoelettrico (pI) del ligando (Figura 15).

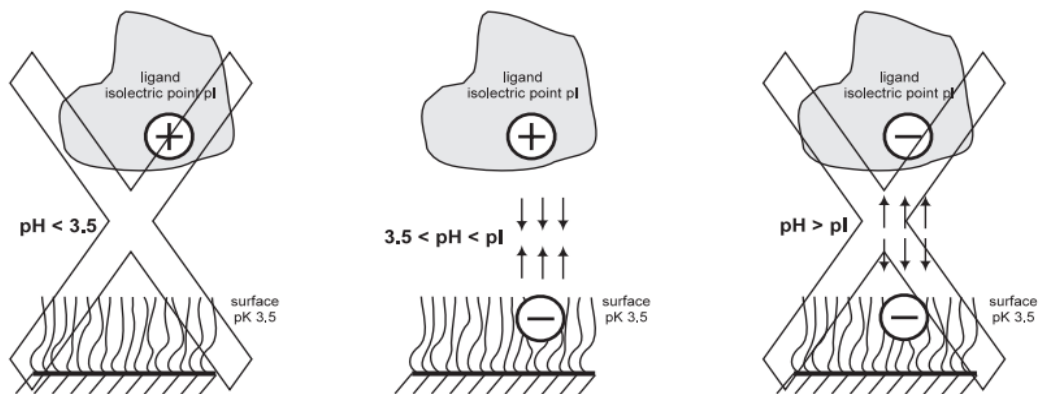


Figura 15. Il ligando viene immobilizzato sulla superficie del chip attraverso interazioni elettrostatiche quando il pH si trova tra il punto isoelettrico del ligando e la pK_a della superficie. Se il pH è troppo basso o troppo alto, il ligando non verrà immobilizzato. (Tratto da: <https://timothyspringer.org/files/tas/files/biacore3000-sensorsurface.pdf>)

Nel nostro caso specifico abbiamo a disposizione GPER ad una concentrazione tale da richiedere una immobilizzazione manuale. Il primo step è rappresentato dalla fase di attivazione chimica dei gruppi carbossilici sulla superficie tramite N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodimide cloridrato (EDC) e N-idrossisuccinimide (NHS). Il secondo step viene definito di coupling, dove il ligando interagisce con i gruppi carbossilici precedentemente attivati, in particolare, sfruttando la chimica delle ammine, si dovrebbe promuovere la formazione di stabili legami ammidici con gli aminoacidi basici sulla superficie proteica. La terza e ultima fase è rappresentata dall'inattivazione, in cui la succinimide che non ha reagito con il ligando viene sostituita con etanolamina. Il valore numerico tale da descrivere la capacità di legame con la superficie è dato da R_{max} :

$$R_{max} = \frac{\text{analita MW}}{\text{ligando MW}} \times R_L \times S_m$$

con R_L = livello di immobilizzazione e S_m = rapporto stechiometrico.

Una volta allestita la procedura di immobilizzazione del GPER si procede all'analisi dell'interazione ligando-analita. Il primo test di interesse prevede l'impiego di aldosterone coniugato con BSA (*Aldosterone-BSA conjugate, supplied in 0,015 M PBS, 0,15 M NaCl, pH 7.2, 0,1% NaN₃, CalBioagents™*) in modo tale da aumentare la sensibilità strumentale incrementando il peso molecolare; in quanto steroide, infatti, l'aldosterone rientra nella categoria delle piccole molecole, con un peso molecolare pari a 370,44 Da. La concentrazione a disposizione è di 7,6 mg/mL, corrispondente a 15,1 μ M. Di conseguenza, avendo la possibilità di esplorare dieci diverse concentrazioni, siamo andati ad allestire dieci soluzioni diluite dalla stock madre partendo da 0,1 μ M per poi procedere serialmente a 1 μ M. Una volta effettuato il test mediante impiego di aldosterone-BSA si può procedere all'iniezione di estradiolo-BSA (*β -Estradiol 6-(O-carboxymethyl)oxime: BSA, Sigma Aldrich™*). In particolare, si porta il liofilizzato in soluzione aggiungendo 1 mL di PBS per ottenere così una concentrazione di 1 mg/mL corrispondente esattamente a 15,1 μ M. Di conseguenza anche per quest'ultimo si andrà ad esplorare un range di concentrazioni da 0,1 μ M a 1 μ M. Per verificare che l'interazione in questione non sia da attribuire alla BSA, ma esclusivamente alla proteina, si è prevista l'iniezione della sola BSA esplorando sempre lo stesso range di concentrazioni appena descritto, da 0,1 μ M a 1 μ M.

3.0 COLTURE CELLULARI

3.1 Semina ed espansione

Per la produzione del recettore GPER è stata utilizzata la linea cellulare human kidney embryonic (HEK) 293, cellule epiteliali in grado di crescere in adesione, utilizzate sin dagli anni '70 in esperimenti di trasfezione. Le cellule HEK293 sono state coltivate in terreno di coltura DMEM/F-12 (1:1) (1X) + GlutaMAX™ -I (*Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture Ham, ThermoFisher Scientific®*) al quale sono stati aggiunti Fetal Bovine Serum (FBS 10%) e una miscela di antibiotici (1%), e mantenute a 37°C, in presenza di CO₂ al 5%. Le cellule sono state seminate in flask T-75 e il terreno di coltura è stato cambiato ogni 48 ore.

4.0 TRASFEZIONE

Una volta raggiunta la confluenza del 70-80%, le HEK293 sono state trasfettate con un plasmide che codifica per GPER. Dopo aver aspirato il mezzo, è stato effettuato un lavaggio con DMEM/F-12 senza FBS e, una volta rimosso, è stata aggiunta la tripsina (Trypsin-EDTA solution™, 0,25%, sterile-filtered, BioReagent, 2,5 g porcine trypsin e 0,2 g EDTA, 4Na per litro di Hank's Balanced Salt Solution con rosso fenolo, Sigma-Aldrich®) lasciando in incubazione per 3-4 minuti a 37°C. Una volta assicuratosi che le cellule si siano staccate, è stato aggiunto terreno completo (DMEM/F-12 addizionato con FBS) così da inattivare la tripsina. Le cellule sono state poi trasferite in una Falcon da 50 mL e centrifugate a 1.000 rpm per 5 minuti. Il pellet è stato risospeso in terreno completo e le cellule sono state contate con il Cell Counter Automated. Per mantenere la coltura cellulare, 4×10^6 di cellule sono state trasferite in una flask T-75. Le altre cellule sono state utilizzate per la trasfezione. Sono state preparate due Eppendorf, ciascuna contenente 4×10^6 di cellule che sono state risospese in 100 μ L di buffer di trasfezione (Kit R, Cell Line Nucleofactor™ Kit R, Lonza Scientific®): in una eppendorf è stato aggiunto un 1 μ g del plasmide pcDNA3.1+ da 5,4 Kb in cui è stata inserita la sequenza genica codificante per GPER (*Homo sapiens G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1), transcript variant 4, GenScript®*), mentre la seconda è stata usata come controllo. Le cellule sono, quindi, esposte a brevi ed intensi impulsi elettrici con lo strumento Nucleofactor™ 2b Device (Lonza®) che inducono un riarrangiamento dei fosfolipidi della membrana cellulare e la conseguente formazione di pori transitori. Questo processo rende la membrana plasmatica cellulare temporaneamente e reversibilmente permeabile a molecole che non sarebbero in grado di attraversarla naturalmente, come il plasmide utilizzato. Le cellule trasfettate sono state poi seminate in flask per 48 ore.

5.0 ESTRAZIONE RNA

L'estrazione degli RNA totali dalle HEK293 si è operata tramite utilizzo di Roche RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). Le cellule sono state risospese in Phosphate Buffer Saline (PBS) e lisate aggiungendovi tampone di lisi, avvalendosi poi di Vortex per garantire una migliore omogeneizzazione. La soluzione è stata così caricata su colonna contenente una membrana in grado di legare in modo specifico solo ed esclusivamente RNA. La colonnina è stata centrifugata per 15 secondi a 10000 rpm a temperatura ambiente per poi eliminare l'eluato. Per promuovere una corretta decontaminazione da DNA genomico è stata aggiunta DNasi lasciando incubare per circa 30 minuti. La colonnina è stata poi sottoposta a ripetuti lavaggi con Wash Buffer I e II, centrifugata a secco per 1-2 minuti a 12000 rpm e trasferita in una

nuova Eppendorf da 1,5 mL precedentemente siglata. Quindi, sono stati aggiunti 30-35 μ L di Elution Buffer centrifugando per 1 minuto a 12000 rpm e raccogliendo così l'eluato contenente RNA che verrà conservato adeguatamente a -80°C.

5.1 Misura della concentrazione di RNA

La quantificazione e il controllo qualità è avvenuto tramite Nanodrop® (*NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer, ThermoScientific™*) a lunghezze d'onda tra 280/230 nm. Diverse applicazioni biologiche richiedono analisi quantitative e qualitative di acido nucleico, come RNA, partendo da volumi di campione minimi. I nanofotometri come quello utilizzato offrono la possibilità di determinare le concentrazioni del campione con volumi di submicrolitro senza la necessità di cuvette. Inoltre, a causa della riduzione della lunghezza del percorso ottico, i campioni vengono diluiti automaticamente rispetto alle misurazioni standard della cuvetta. La procedura prevede la pulizia delle superfici ottiche superiori e inferiori del sistema pipettando 2-3 μ L di Elution Buffer sulla superficie ottica inferiore, si procede dunque con la misura del bianco, ovvero con la taratura dello strumento pipettando 1 μ L di Elution Buffer. Dopodiché si pone 1 μ L del campione di RNA e si chiude delicatamente il braccio, per poi dare un apposito comando al programma affinché venga eseguita la misurazione a 260 nm ed il conseguente calcolo della concentrazione (Figura 16).

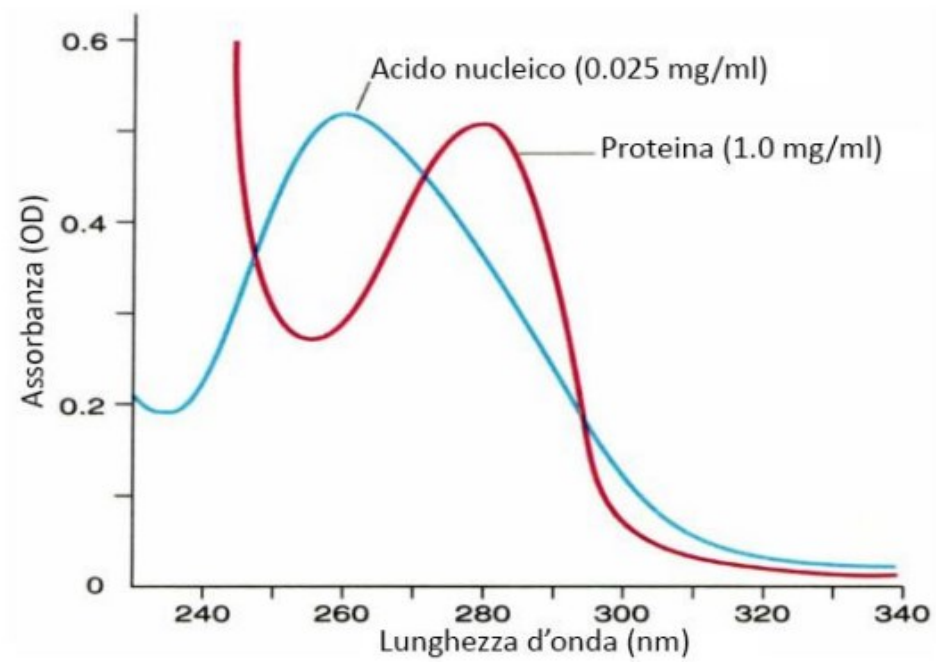


Figura 16. Spettro tipico degli acidi nucleici e delle proteine. La massima assorbanza per gli acidi nucleici è in corrispondenza di 260 nm, mentre per le proteine è di 280 nm. (Adattata da <http://www.bmscience.net/blog/analisi-delle-proteine-tramite-spettrofotometria/>)

Tramite questa tipologia di analisi è possibile, inoltre, ricavare un'indicazione sulla qualità dei campioni estratti e purificati. Per esempio, il rapporto tra le assorbanze 260/280 deve essere circa 1,8 per il DNA e circa 2,0 per l'RNA. Rapporti inferiori indicano la presenza di proteine, fenolo o altri fattori contaminanti che assorbono fortemente intorno a 280 nm. Un'ulteriore stima della purezza dell'acido nucleico è il "rapporto di purezza" tra le assorbanze 260/230, il quale deve essere compreso tra 1,8 e 2,2. Rapporti inferiori ai valori attesi indicano che la tecnica di estrazione e purificazione dell'acido nucleico richiede un'ottimizzazione.

5.2 Retrotrascrizione

La reazione di retrotrascrizione è una tecnica attraverso la quale l'RNA messaggero viene retrotrascritto in una molecola di DNA complementare (cDNA) impiegato come stampo nella reazione di amplificazione quale la PCR. Nel processo di retrotrascrizione (RT), l'enzima trascrittasi inversa catalizza la sintesi di una molecola di DNA a singolo filamento complementare all'RNA stampo. La retrotrascrizione è stata condotta utilizzando *iScriptSupermix (Bio-Rad™)*. In seguito alla lettura della concentrazione di RNA in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, è stato retrotrascritto 1 μg di RNA. Per il calcolo del volume di RNA da prelevare affinché vi siano contenuti 1 μg di RNA è stata utilizzata la seguente formula:

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) \text{ di RNA} = \frac{[\text{conc RNA } \mu\text{g}/\mu\text{L}]}{1000}$$

A tale volume è stata aggiunta *iScript Supermix 5X* (contenente l'enzima trascrittasi inversa) ed una quantità di H_2O tale da raggiungere un volume finale pari a 20 μL . La reazione di RT è stata realizzata tramite impiego di termociclatore *Delphi 1000™ Thermal Cycler (Oracle BioSystems™)*

5.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

La Polymerase Chain Reaction (PCR) è una reazione di amplificazione del DNA, ossia una reazione a catena che utilizza la DNA polimerasi. Anche in questo caso si sfrutta l'elevatissima efficienza dell'enzima di incorporazione di nucleotidi e l'elevata specificità. I campi di applicazione vanno dal clonaggio del DNA per il sequenziamento, per diagnosi delle malattie ereditarie, al rilevamento e diagnosi di malattie infettive. La reazione di amplificazione si suddivide nello specifico in 4

diversi step quali l'*inizializzazione* che avviene intorno ai 98°C per promuovere una corretta attivazione della polimerasi; la fase di *denaturazione termica* a 95°C per denaturare il cDNA; la fase di *annealing* a 54°C per garantire la corretta ibridazione tra i singoli filamenti di DNA e i primer; la fase di *elongation* in cui si rialimenta la temperatura fino a 72°C per consentire la corretta incorporazione dei dNTP. Tale tecnica di PCR classica, essendo qualitativa, non permette di correlare la quantità di prodotto finale con la quantità di DNA stampo presente inizialmente, perché nella fase finale l'efficienza della reazione può essere variabile. Al contrario la Real-Time PCR permette di ottenere un dato quantitativo, monitorando il prodotto di amplificazione sotto forma di fluorescenza emessa da opportune sonde incorporate nella reazione in modo proporzionale alla quantità di DNA prodotto. Inoltre, viene registrato il numero di cicli di amplificazione necessari per ottenere una determinata quantità di molecole di DNA. Considerando che per ciascun ciclo vi è un raddoppio delle molecole di DNA, è possibile calcolare in maniera molto accurata il numero di molecole della sequenza target presenti inizialmente nel campione. Il principale parametro di valutazione è il cosiddetto Cycle Thresold (Ct) value, il numero di cicli di amplificazione affinché la reazione generi un determinato segnale di fluorescenza. Il Ct value rispecchia la concentrazione iniziale di DNA template. Il Ct diminuisce linearmente all'aumentare della quantità di prodotto di amplificazione presente nel campione e quindi, fornisce una stima del livello di espressione del gene in esame. La normalizzazione del dato avviene mediante confronto con il Ct value che descrive l'espressione di un gene di riferimento, definito *housekeeping*, ovvero la porfobilinogeno deaminasi (PBGD), la cui espressione è stabile. Tale metodica di normalizzazione prende il nome di metodo Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), inizialmente si procede a normalizzare il valore medio del Ct per il gene in esame con il valore medio del Ct di PBGD, calcolandone la differenza (ΔCt). Successivamente, si confronta il ΔCt calcolato nelle cellule trasfettate e il ΔCt delle cellule non trasfettate utilizzate come controllo, calcolando così il $\Delta\Delta Ct$. Infine, si procede con il calcolo di $2^{-\Delta\Delta Ct}$ per poter rilevare se il gene di interesse è sovra-espresso o sotto-espresso rispetto al controllo, ovvero alle cellule non trasfettate. Nel dettaglio la RT-PCR è stata eseguita utilizzando CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System™ lavorando in duplicato. La scelta degli oligonucleotidi è stata effettuata sulla base delle sequenze specifiche di DNA codificante il gene di interesse disponibili nelle banche dati internazionali (NCBI, National Centre for Biotechnology information, www.ncbi.nlm.nih.gov). La comparazione e l'allineamento delle sequenze genomiche si è testato mediante impiego del programma Blast® (Basic Local Alignment Search Tool). Poi, tramite l'impiego del programma Primer3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>), sono state progettate le coppie di oligonucleotidi senso e antisenso, queste si sono scelte con lunghezza di almeno 20 bp. Le sequenze dei primers utilizzate per lo studio sono riportate nella *Tabella 1*.

Gene		Sequenze Primer 5'-3'
GP	Forward	5'-GTT CCT CTC GTG CCT CTA CA-3'
	Reverse	5'-GCA GGA AGA GCG ACA TGA AG-3'
PBG	Forward	5'-TGC CCT GGA GAA GAA TGA AG-3'
	Reverse	5'-AGA TGG CTC CGA TGG TGA-3'

Tabella 1. Codici delle sequenze dei primers per i geni analizzati in questo studio.

Il protocollo di amplificazione prevede che ciascun pozzetto della piastra sia costituito da:

- 1X SsoFast™ EvaGreen® Supermix (contenente dNTPs, Sso 7d Fusion Polymerase, MgCl₂, EvaGreen dye, stabilizers)
- 200 nM Primer Forward
- 200 nM Primer Reverse
- 100 ng cDNA
- H₂O per raggiungere un Volume totale di 20 µL.

Terminata la reazione di PCR i campioni sono stati conservati in freezer a -20°C (Figura 17)

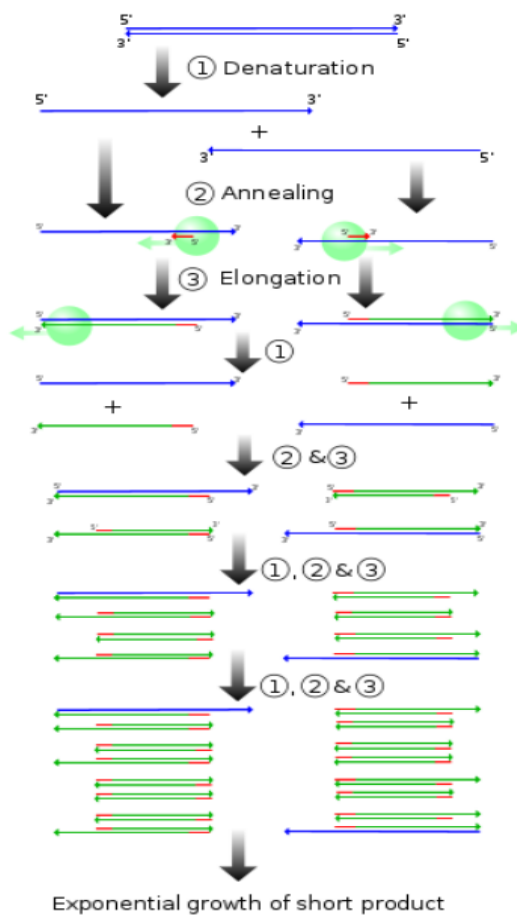


Figura 17. Fasi della reazione di PCR: 1) Denaturazione; 2) Appaiamento dei primer (annealing); 3) Sintesi. In verde è evidenziato l'enzima DNA-polimerasi mentre catalizza la sintesi del frammento di DNA che si vuole amplificare, procedendo in direzione 5'-3'.

6.0 ESTRAZIONE PROTEICA

L'estrazione proteica viene garantita attraverso l'impiego del tampone RIPA, addizionato con gli inibitori delle proteasi (Roche Diagnostics™) e inibitori delle fosfatasi (Roche Diagnostics™).

Le cellule trasfettate e coltivate nelle flask, sono state staccate con la tripsina, trasferite in falcon da 15 mL e centrifugate come descritto sopra. I pellet sono stati quindi risospesi in buffer RIPA, vortexati e sonicati per favorire la rottura delle membrane e quindi, l'estrazione proteica, e congelati a -20°C per 24 ore. I campioni vengono poi scongelati e centrifugati a 4°C, 13.000 rpm per 10 minuti, permettendo

alle proteine di restare in sospensione, separate dal resto dei residui cellulari precipitati nel pellet. È stata poi eseguita la quantificazione proteica mediante test della BCA il cui meccanismo chimico si basa sulla presenza in soluzione di Cu (II), tartrato di potassio e acido bicinconinico. Le proteine tendono a formare un complesso di coordinazione con il Cu (II) riducendolo a Cu (I); l'acido bicinconinico, un reagente altamente cromogenico, darà origine ad un complesso viola con il Cu (I), assorbendo a 562 nm e, attraverso la misurazione dell'assorbanza, si potrà ottenere l'effettiva concentrazione delle proteine totali. Previa preparazione della retta di taratura utilizzando note concentrazioni di BSA si procede al caricamento di una piastra da 96 pozzetti nei quali è aggiunto un volume di 200 µL del reagente di lavoro e 10 µL di ciascun campione, inclusa la retta di taratura e il solo tampone di estrazione (RIPA). La piastra viene incubata in stufa a 37°C per 30 minuti. La lettura avverrà utilizzando l'apposito strumento di lettura della piastra EnSight (*EnSight™, Multimode Plate Reader, PerkinElmer®*).

7.0 IMMUNOPRECIPITAZIONE

L'immunoprecipitazione è la tecnica scelta per isolare il GPER partendo da un estratto grezzo proteico proveniente da cellule HEK293. Il sistema prevede l'immobilizzazione dell'anticorpo specifico contro GPER su una resina di agarosio, utilizzando come spaziatore il Dissucinimidil suberato, estere dell'N-idrossisuccinimide a otto atomi di carbonio. Tale reagente omobifunzionale è in grado di riconoscere e reagire con ammine primarie a pH 7-9 formando legami ammidici stabili. La resina coniugata viene incubata con l'estratto contenente la proteina di interesse con lo scopo di ottenere un complesso ad alta affinità antigene-anticorpo. L'eluizione della proteina di interesse avviene tramite rottura del legame ammidico mediante trattamento con tampone di eluizione. L'immunoprecipitazione è stata eseguita utilizzando *Pierce® Crosslink Immunoprecipitation Kit (Thermo Scientific™)*. Seguendo le istruzioni come da protocollo, inizialmente si è coniugato l'anticorpo specifico anti-GPER (gentilmente sviluppato e donato dal Prof. Celso Gomez Sanchez) alla colonnina di agarosio fornita da kit. È stato poi aggiunto Pierce protein A/G Plus Agarose alla colonna previa agitazione ed effettuato un primo lavaggio con Couling Buffer 1X preparato a partire da Coupling Buffer 20X. Inserendo l'apposito tappo di chiusura della porzione inferiore della colonna si procede all'aggiunta di una soluzione costituita dall'anticorpo anti-GPER, acqua e coupling Buffer 20X così da ottenerne una concentrazione finale 1X. La colonna è stata posta in agitazione per circa 4 ore per facilitare la coniugazione. Terminato il tempo di incubazione, rimuovendo il tappo inferiore, la colonnina è stata centrifugata a 3000 rpm per 1 minuto a 4°C e l'eluato è stato conservato per verificare l'effettiva coniugazione dell'anticorpo. Per lo step successivo di crosslinking dell'anticorpo legato mediante opportuno spacer, è stato solubilizzato il DSS (disuccinimidil suberato) in DMSO per ottenere una soluzione 25 mM, successivamente diluita 1:10, sempre in DMSO per ottenere una

concentrazione finale di 2,5 mM. Alla colonna a cui è stato coniugato l'anticorpo sono stati quindi, aggiunti coupling buffer 20X, DSS 2,5 mM e acqua MilliQ. Dunque, la colonnina è stata posta in agitazione per circa un'ora per permettere la corretta reazione di crosslinking. Successivamente, è stato aggiunto l'Elution Buffer e, dopo centrifugazione, è stato conservato l'eluato per poter effettuare la verifica dell'avvenuto crosslinking. È stato poi eseguito un duplice lavaggio con Elution Buffer e con IP Lysis/Wash Buffer (Figura 18). Terminata la procedura di coniugazione e crosslinking dell'anticorpo con DSS si è proceduto all'immunoprecipitazione del GPER. Una volta rimosso il medium di coltura, le cellule HEK293 sono state lavate con il Coupling Buffer 1X al quale è stato poi aggiunto IP Lysis/Wash Buffer e sono state incubate a 4°C per 5 minuti. Il lisato è stato poi trasferito in provetta, centrifugato a circa 13.000 g per 10 minuti e il surnatante è stato raccolto per effettuare la quantificazione proteica mediante BCA. Prima di procedere con l'immunoprecipitazione GPER-guidata, 1 mg di lisato proteico è stato aggiunto su una colonna di Control Agarose Resin Slurry e incubato a temperatura ambiente per 1 ora in continua agitazione. L'eluato raccolto previa centrifugazione si aggiunge direttamente alla colonna precedentemente allestita e si aggiunge una quantità di IP Lysis/Wash Buffer tale da raggiungere un volume finale di circa 300 µL. Bloccata opportunamente la porzione inferiore della colonna e chiusa con opportuno tappo a vite e Parafilm, la colonnina è poi incubata per tutta la notte in agitazione a 4°C. Terminato il tempo di incubazione, questa viene centrifugata conservando l'eluato per confermare di aver raccolto esclusivamente il GPER e non aver eluito anche parte dell'anticorpo legato. Si procede così ad una serie di lavaggi con IP Lysis/Wash Buffer e Conditioning Buffer 1X preparato partendo da una soluzione 100X. Dovendo utilizzare il GPER immunoprecipitato per effettuare un test funzionale, quale quello di interazione è stato necessario aggiungere TRIS 1M a pH 9,5 così da neutralizzare il pH acido indotto dall'elution buffer. È stato poi aggiunto Elution Buffer e ottenuto un primo eluato attraverso centrifugazione; in seguito, è stato aggiunto nuovamente l'Elution Buffer ed è stato lasciato il campione a temperatura ambiente per 5 minuti raccogliendo l'eluato finale che contiene GPER. L'isolamento esclusivo del GPER è stato, quindi, verificato mediante Western Blot.

8.0 ELETTROFORESI E WESTERN-BLOT

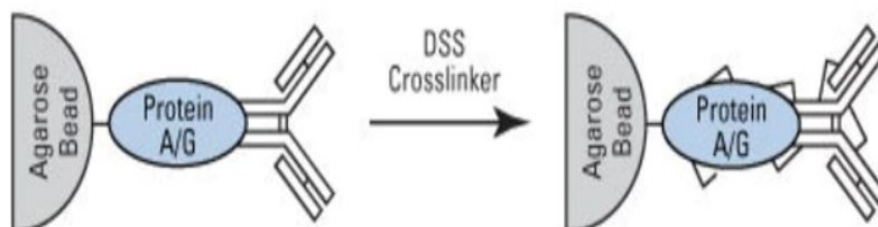


Figura 18. *Crosslinking dell'anticorpo legato alla resina mediante Disuccinimidil suberato (DSS).* (Adattata da <https://www.thermofisher.com/it/en.html>)

L'immunoblotting per GPER è stato eseguito allestendo un protocollo ad hoc. Sono stati usati 10 µg di proteine estratte sia da cellule trasfettate, che da cellule di controllo (non trasfettate), per verificare l'effettiva iperproduzione di GPER rispetto al controllo. Le proteine sono state denaturate con NuPage Sample Reducing Agent (10X, Thermo Scientific™, Milano, Italia) e NuPage LDS Sample Buffer (4X, Thermo Scientific, Milano, Italia) e poste a 95°C per 5 minuti. I campioni sono stati, successivamente, separati in un gel all'8% di poliacrilammide ed elettrotrasferite in membrana di PVDF (BioRad Laboratories, United States) precedentemente attivata in metanolo. In seguito, la membrana è stata bloccata per 1 ora a temperatura ambiente, in agitazione, con 1% di latte in TRIS 0,005M pH 7,4 – 0,05% Tween (TRIS-T). La membrana è stata posta in incubazione a 4 °C tutta la notte con anticorpo anti-GPER diluito 1/750 (gentilmente sviluppato e donato dal Prof Celso Gomez Sanchez) in TRIS-T. Dopo lavaggi in TRIS-T la membrana è stata incubata per 1 ora con anticorpo secondario "antimouse" (Agilent Dako™) dopo di che l'intensità delle bande è stata misurata con ATOM UVITEC (Uvitec, Milano, Italia). Le immagini si sono analizzate con Nine Alliance Program (Uvitec). Per la quantificazione di GPER, i dati densitometrici sono stati normalizzati sull'espressione dell'housekeeping GAPDH (Sigma Aldrich™, Milano, Italia). In particolare, la membrana è stata incubata con anticorpo primario anti-GAPDH 1:1500 in T-PBS tutta la notte a 4°C e il giorno successivo, dopo lavaggi in T-PBS, per 1 ora con anticorpo secondario "anti-rabbit" (Agilent Dako™), specifico per il GAPDH in T-PBS. La procedura appena descritta è stata utilizzata anche per verificare l'accuratezza della procedura di immunoprecipitazione, in particolare sono stati caricati 15 µL dell'eluato ottenuto dall'immunoprecipitazione delle cellule HEK293 trasfettate e non trasfettate, oltre che dei diversi lavaggi richiesti per verificare l'avvenuto isolamento del GPER.

RISULTATI

1.0 ANALISI DI DOCKING

Il docking molecolare è un'analisi di chimica computazionale che attraverso simulazione al computer ci consente di predire la conformazione di un complesso recettore-ligando. Abbiamo utilizzato il docking molecolare per indagare la possibile interazione tra aldosterone e GPER. Il 17 β -estradiolo, un ligando noto del GPER, è stato utilizzato come controllo positivo per la nostra simulazione. Lo studio computazionale è stato condotto mediante software online *SwissDock*, in cui sono stati considerati come ligandi di interesse per GPER l'aldosterone e il 17 β -estradiolo (Figura 1.1). L'analisi strutturale di GPER è stata effettuata tramite il software Chimera, attraverso il quale è stata ricavata la sequenza amminoacidica del GPER. La conformazione di GPER scelta è quella a cui risulta essere associato il ΔG minore. In dettaglio, la conformazione che è stata statisticamente calcolata essere la più probabile nell'interazione con aldosterone presenta un $\Delta G = -8,88$ Kcal/mol e un valore di *full fitness* pari a -1497,02 Kcal/mol. Conoscendo quindi la struttura di GPER, è stato chiaro dall'analisi di docking molecolare che la porzione di recettore coinvolta nell'interazione con l'aldosterone corrisponde a un α -elica transmembrana. Tale analisi hanno, quindi, permesso di evidenziare a livello di struttura le regioni maggiormente coinvolte nell'interazione e di individuare poi a quali segmenti amminoacidici queste corrispondessero.

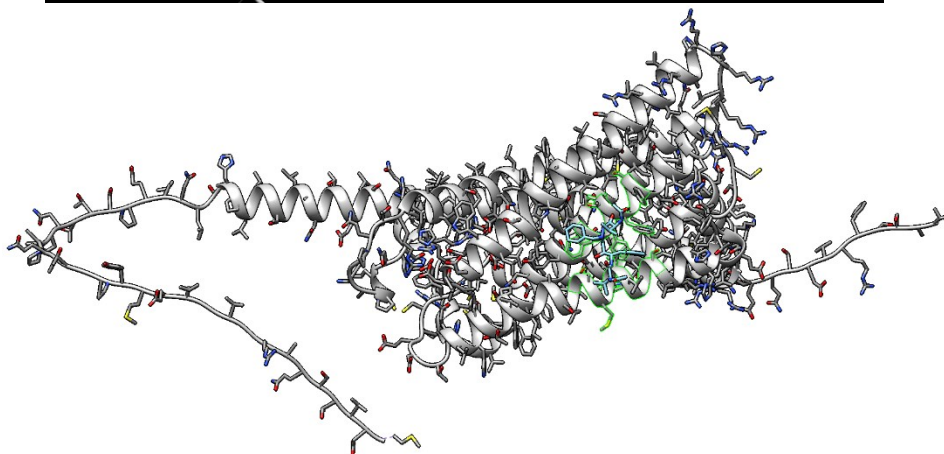


Figura 1.1. Immagini ottenute attraverso il software Chimera relative all'interazione più plausibile tra GPER e aldosterone, calcolata in funzione del ΔG minore. In verde si è voluta evidenziare la regione maggiormente coinvolta nell'interazione con l'analita.

Di seguito è riportata la sequenza amminoacidica di GPER dove sono stati evidenziati in giallo le regioni coinvolte nell'interazione con lo scheletro steroideo dell'aldosterone:

```
MDVTSQARGVGLEMYPGTAQPAAPNTTSPENLSXPLLGTALANGTGELSEXQQYVIGLFLSCL  
YTIFLPIGFVGNILILVVNISFREKMTIPDLYFINLAVADLILVADSLIEVFNLXERYDYIAVLCTFMS  
LFLQVNMYSV FFLTWMSF DRYIALARAMRCSLFRTKXXARL SCGLIWMAS VSATLVPFTAVXL  
QXTDEACFCFADVREVQWLEVTLGFIVPFAIIGLCYSLIVRVLRAXRXRGLRPRRQKALRMILAV  
VLVFFVCWLPENVFISVXLLQRTQPGAAPCKQSFRXAXPLTGXIVNLAAFSNSCLNPLIYSFLGETF  
RDKLRLYIEQKTNLPALNRFCAALKAVIPDSTEQSDVRFSSAV
```

L'analisi di docking molecolare è stata ripetuta utilizzando come ligando il 17 β -estradiolo noto come ligando naturale per GPER (Figura 1.2).

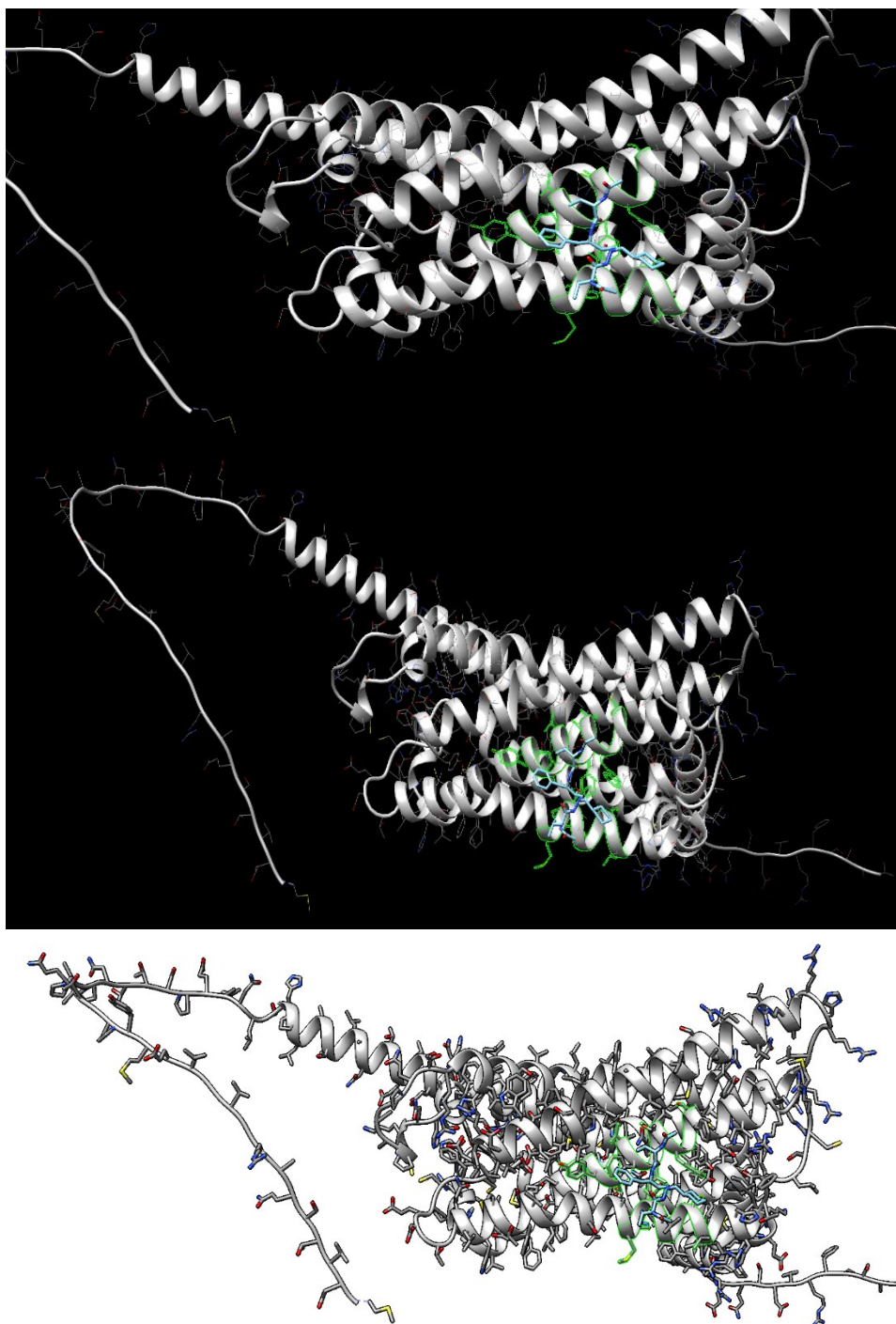


Figura 1.2. Immagini ottenute attraverso il software Chimera relative all'interazione più plausibile tra GPER e 17 β -estradiolo, calcolata in funzione del ΔG minore. In verde si è voluta evidenziare la regione maggiormente coinvolta nell'interazione con l'analita.

Anche in questo caso specifico la conformazione scelta è stata quella a cui risultava essere associato un ΔG minore, in particolare è stata selezionata la struttura del complesso con $\Delta G = -7,16$ Kcal/mol e un valore di *full fitness* pari a $-1537,76$ Kcal/mol. L'elaborazione virtuale ha permesso, come per l'analisi condotta per l'aldosterone, di evidenziare il segmento di α -elica implicato nell'interazione con GPER. Le regioni evidenziate in giallo nella sequenza amminoacidica del GPER corrispondono ai segmenti di interazione con il 17β -estradiolo individuate nell'analisi di docking molecolare:

```
MDVTSQARGVGLMYPGTAQPAAPNTTSPENLSXPLLGTALANGTGELSEXQQYVIGLFLSCLY
TIFLFIGFVGNILILVNNISFREKMTIPDLYFINLAVADLILVADSLIEVFNLXERYDDIAVLCTFMSLF
LQVNMYSSVFFLTWMSFDRYIALARAMRCSLFRTKXXARLSCGLIWMASVSATLVPFTAVXLQX
TDEACFCFADVREVQWLEVTLGFIVPFAIIGLCYSLIVRVLVRAXRXRGLRPRRQKALRMILAVVLV
FFVCWLPENVFISVXLLQRTQPGAAPCKQSFRXAXPLTGXIVNLAAFSNSCLNPLIYSFLGETFRDK
LRLYIEQKTNLPALNRFCXAALKAVIPDSTEQSDVRFSSAV
```

2.0 IMMOBILIZZAZIONE GPER E STUDIO DI INTERAZIONE

L'interazione tra GPER e aldosterone è stata indagata tramite Biacore X100. In questa analisi preliminare è stato utilizzato il recettore acquistato presso la ditta AbCam (ab152434). La quantità di GPER utilizzata è stata di $2 \mu\text{g}$ in una concentrazione di $20 \mu\text{g/mL}$. In virtù della concentrazione a disposizione abbiamo utilizzato la tecnica di immobilizzazione manuale su chip. In particolare, come si vede in figura 2.1, sono stati attivati i gruppi carbossilici di superficie mediante utilizzo di N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodimide cloridrato (EDC) e N-idrossisuccinimide (NHS). Tale step è stato ripetuto due volte in modo tale da promuovere un incremento della quantità di GPER immobilizzato. Dopo la fase di immobilizzazione, è stata utilizzata etanolamina per saturare tutte le porzioni del chip non occupate da GPER. In figura 2.1, in blu, è evidenziato l'incremento del segnale dovuto all'immobilizzazione di GPER che, seppur basso, ci ha consentito di procedere con lo studio di interazione.

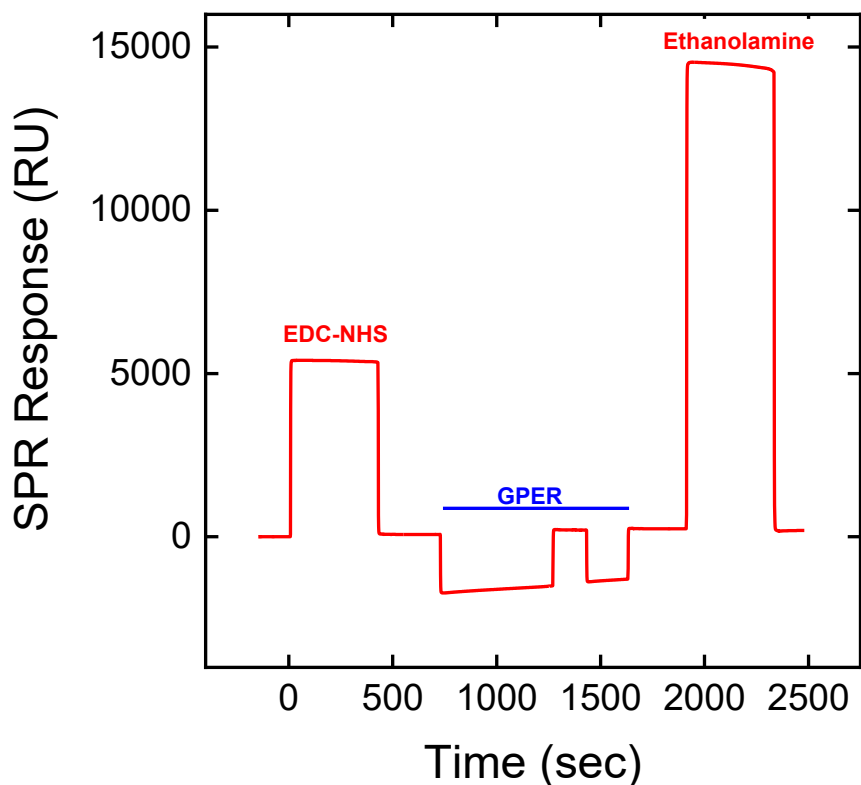


Figura 2.1. Sensogramma ottenuto attraverso procedura di immobilizzazione del GPER in cui si può notare una prima fase di attivazione dei gruppi carbossilici esposti dalla matrice di destrano mediante EDC-NHS. Il secondo step in blu indica, in due fasi, il coupling del GPER mentre il terzo step indica la saturazione dei gruppi non coniugati con etanolamina.

Dopo l'immobilizzazione di GPER su chip è stata verificata l'interazione tra GPER e 17- β estradiolo e aldosterone. In particolare, per entrambi i ligandi sono state iniettate dieci diverse concentrazioni crescenti dei ligandi. Considerate le piccole dimensioni di 17- β estradiolo e aldosterone, per aumentare la sensibilità del test abbiamo utilizzato i 2 ormoni coniugati con la BSA. Come mostrato in figura 2.2, la BSA da sola non provoca nessun segnale, invece il 17- β estradiolo, noto ligando del GPER, si lega al GPER, aumentando il segnale in maniera concentrazione-dipendente. L'aldosterone-BSA determina un andamento crescente del segnale SPR dipendente dalla concentrazione. Questi risultati, alla luce anche dei dati ottenuti dall'iniezione della sola BSA, dimostrano che l'aldosterone ed il 17- β

interagiscono con GPER. Tutti gli esperimenti sono condotti in triplicato con un errore sperimentale del 10%.

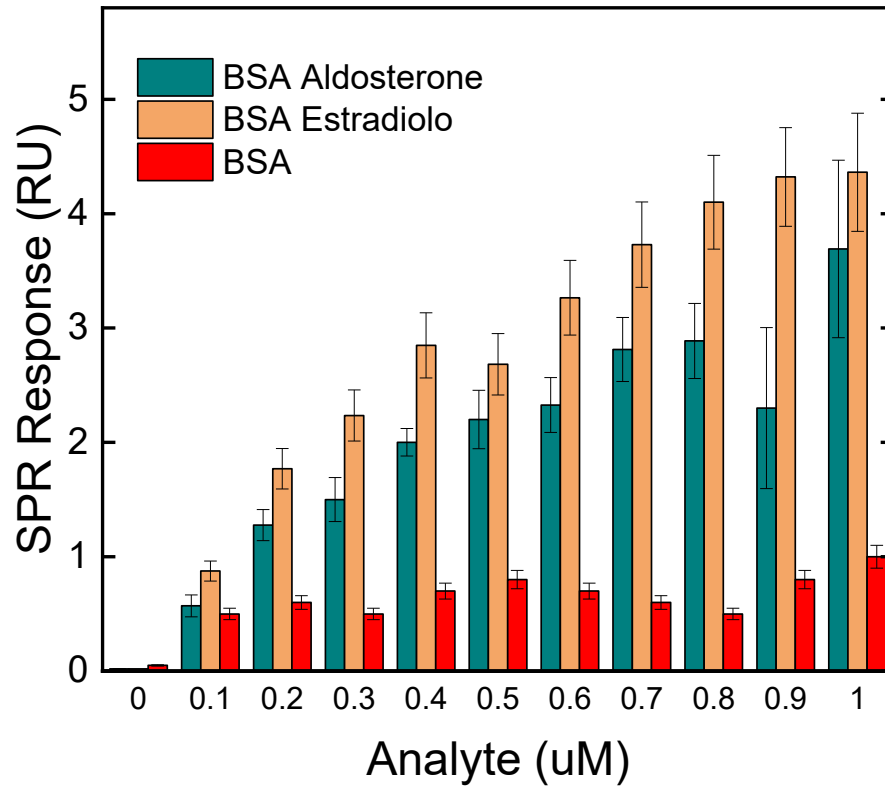


Figura 2.2. Sensogramma relativo all'iniezione di aldosterone-BSA, 17- β estradiolo-BSA e solo BSA a concentrazioni crescenti.

I dati appena illustrati sono stati poi elaborati in figura 2.3, dove il segnale SPR è riportato in funzione della concentrazione. Grazie ai dati ottenuti tramite tali analisi è stata calcolata un'affinità, in modo tale da comparare quella del ligando noto del GPER, il 17 β -estradiolo, con quella dell'aldosterone.

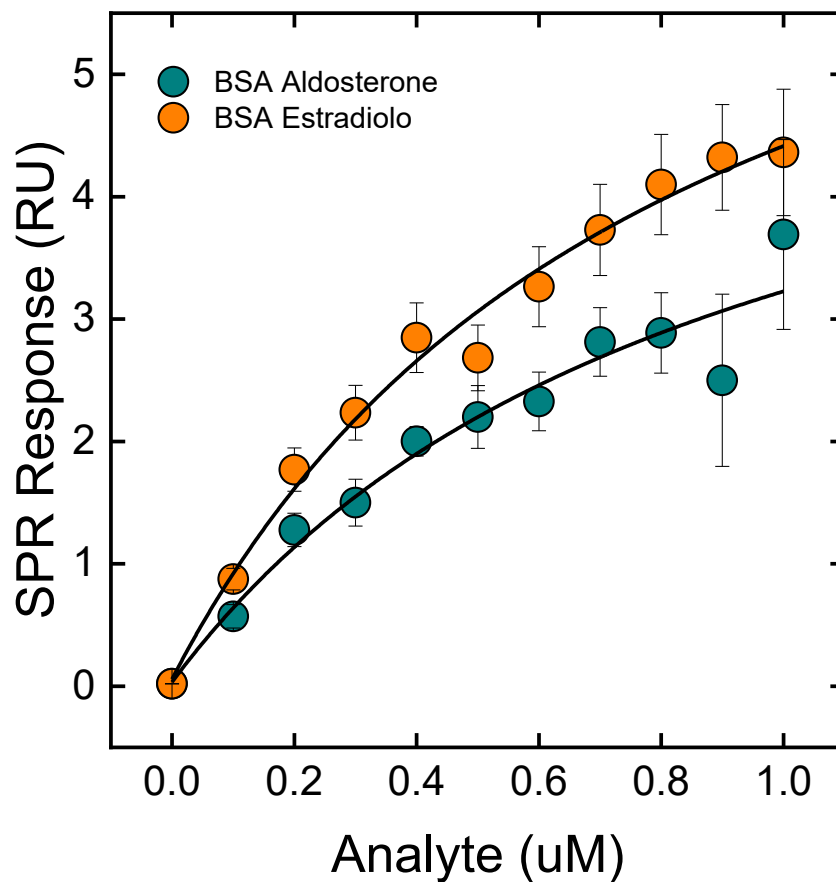


Figura 2.3. Rielaborazione del sensogramma in figura 2.2 in cui viene indicata la risposta in termini di variazione del segnale SPR per aldosterone-BSA e 17- β estradiolo-BSA a concentrazioni crescenti.

Le affinità, determinate tramite costante di dissociazione (K_d), sono state calcolate con un'equazione di *binding* semplice. È stata calcolata una $K_d = 0,902 \pm 0,230 \mu\text{M}$ per aldosterone-BSA e una $K_d = 0,818 \pm 0,273 \mu\text{M}$ per il 17- β estradiolo. Si può, quindi, ragionevolmente dire che l'aldosterone e il 17- β estradiolo sono caratterizzati da un'affinità molto simile per GPER.

3.0 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI GPER TRAMITE RT-PCR E IMMUNOBLOTTING

Tramite analisi di docking molecolare e di SPR è stato dimostrato che l'aldosterone è in grado di interagire con GPER. Le cellule HEK293 sono state così trasfettate tramite elettroporazione con un plasmide che codifica per GPER. Queste ultime verranno utilizzate per purificare la proteina GPER che ha subito le modificazioni post-trascrizionali necessarie per garantirne la corretta localizzazione ed espletare la sua funzione. Tale proteina, una volta purificata sarà utilizzata in saggi funzionali. Dopo 48 ore dalla trasfezione delle cellule HEK293 tramite elettroporazione con il plasmide per GPER, l'iperespressione genica di GPER è stata verificata tramite RT-PCR. Nelle cellule HEK293 trasfettate è stato osservato un aumento dei livelli genici di GPER di circa 600 volte rispetto alle cellule HEK293 utilizzate come controllo. Le cellule di controllo sono state trasfettate con un plasmide vuoto (Figura 3.1).

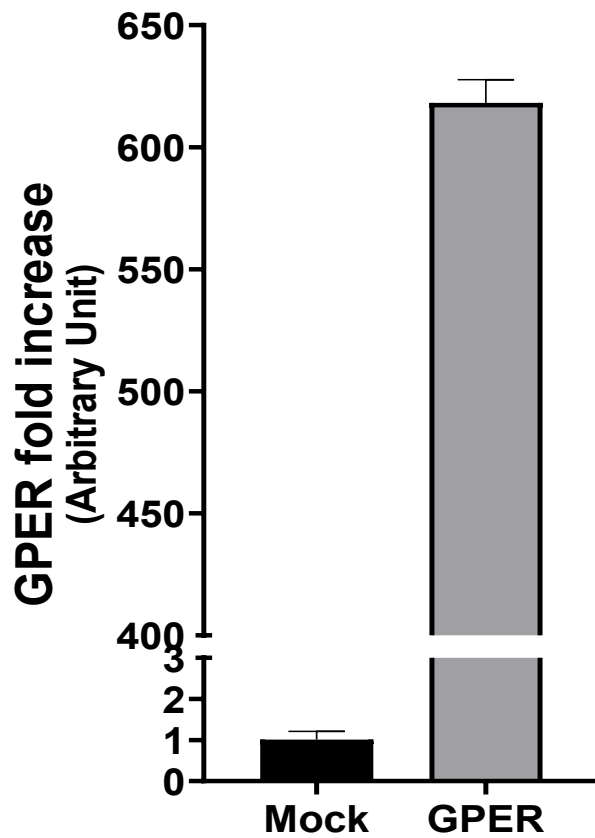


Figura 3.1. Istogramma rappresentativo dell'analisi di RT-PCR ottenuta tramite metodo $\Delta\Delta Ct$. ($\bar{x} = 7,2525$)

Per verificare che la trasfezione aumenta non solo l'espressione genica di GPER, ma anche quella proteica, dopo 48 ore di trasfezione sono stati indagati non solo i livelli genici di GPER ma anche quelli proteici tramite elettroforesi SDS-page e Immunoblotting mediante l'utilizzo di un anticorpo gentilmente sviluppato dal Prof. Gomez Sanchez in grado di riconoscere e legarsi al GPER (Figura 3.2).

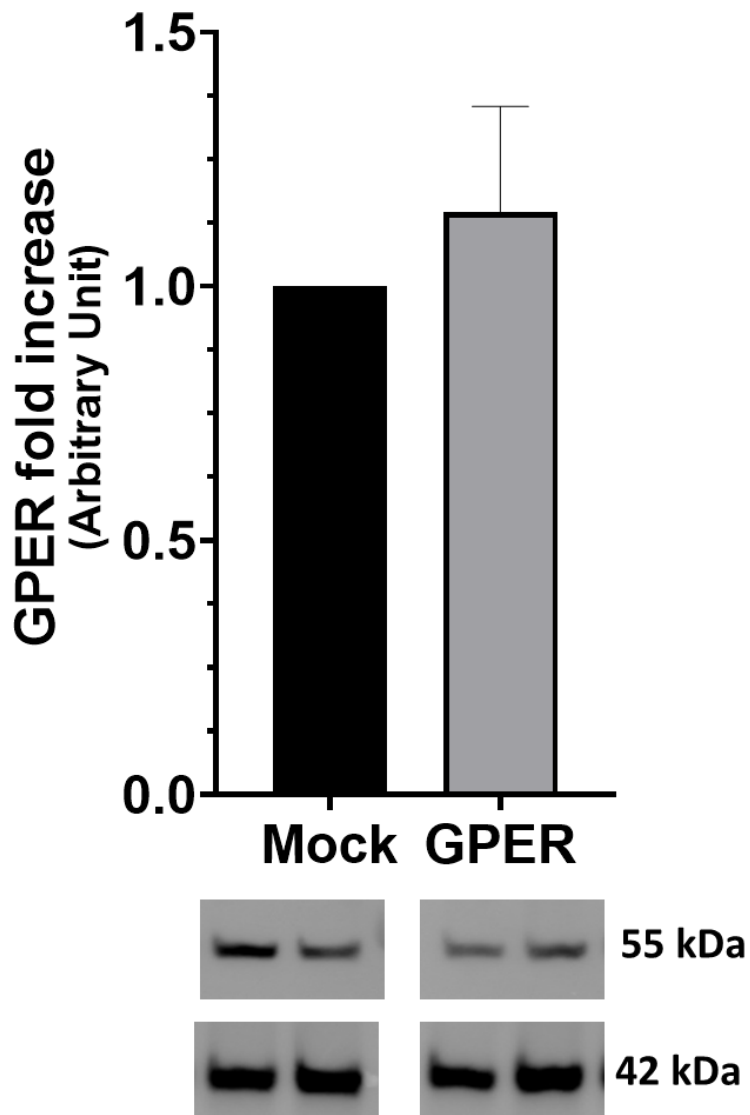


Figura 3.2. Western blot relativo all'espressione del GPER in cellule HEK293 normalizzato utilizzando GAPDH di peso molecolare inferiore.

In Figura 3.2 sono riportati i risultati ottenuti da 3 esperimenti di trasfezione. Da una prima analisi visiva si nota un dato contrastante rispetto a ciò che si è ottenuto tramite RT-PCR. In particolare, non si evidenzia una maggiore intensità a livello delle bande corrispondenti al GPER nelle cellule trasfettate. Per poter allestire un'analisi densitometrica, in modo da ottenere un dato semi-quantitativo, i livelli di espressione di GPER nelle cellule trasfettate e non- sono stati normalizzati verso

l'espressione della proteina housekeeping GAPDH. I valori ottenuti nelle cellule di controllo sono stati posti uguale a 1 e rispetto a questi valori sono stati calcolati i livelli di espressione di GPER presenti nelle cellule trasfettate. Si può, quindi, notare come, il dato significativo ottenuto tramite RT-PCR non è apprezzabile mediante immunoblotting.

4.0 ISOLAMENTO E PURIFICAZIONE DEL GPER MEDIANTE IMMUNOPRECIPITAZIONE

Per poter isolare GPER prodotto in cellule HEK293, è stato allestito un protocollo di immunoprecipitazione. Questa strategia simile ad una cromatografia per affinità ha previsto l'impiego dello stesso anticorpo anti-GPER utilizzato nel protocollo di Immunoblotting. Dopo immunoprecipitazione tramite anticorpo GPER, l'eluato ottenuto è stato analizzato per verificare che quest'ultimo contenesse esclusivamente GPER e nessun'altra proteina. È stata quindi, allestita un'analisi di Immunoblot per GPER (Figura 4.1). Per poter verificare la riuscita del processo di isolamento e purificazione del GPER mediante immunoprecipitazione, sono stati caricati in gel anche i vari passaggi di lavaggio effettuati durante l'esecuzione del protocollo stesso (indicati con W1 e W2 nella figura 4.1).

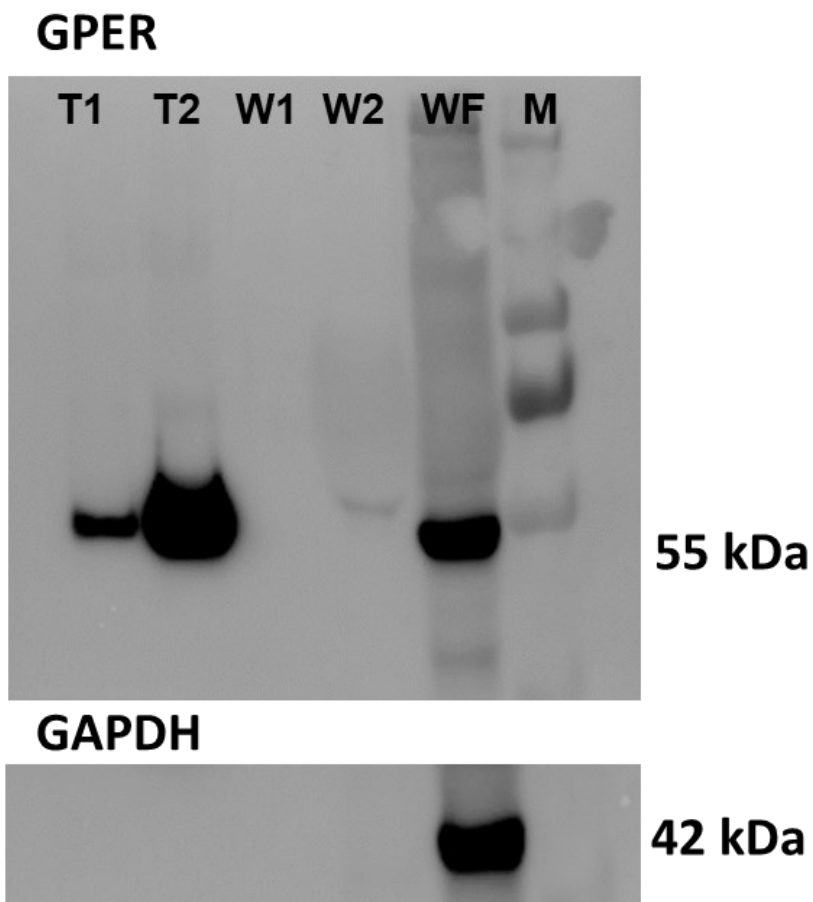


Figura 4.1. In alto, T1-T2 rappresentano gli eluati ottenuti da immunoprecipitazione a partire da cellule trasfettate. W1-W2: eluati ottenuti mediante lavaggio prima di caricare le proteine totali. WF: eluato ottenuto mediante lavaggio nello step precedente all'immunoprecipitazione. In basso è riportata la banda di Housekeeping corrispondente al GAPDH.

Dall'analisi della figura 4.1 si nota la presenza di un'unica banda intorno ai 55 KDa, ovvero il peso molecolare corrispondente al GPER, nei preparati T1 e T2, ottenuti da 2 trasfezioni diverse. Ciò suggerisce la purificazione specifica del GPER. Occorre inoltre sottolineare l'assenza di bande a livello dei lavaggi indicati in figura come W1 e W2 che sono stati condotti immediatamente dopo l'immobilizzazione dell'anticorpo. L'assenza di segnale nell'immonoblot indica che l'anticorpo anti-

GPER rimane immobilizzato alla resina. L'eluato WF corrisponde alle proteine ottenute dopo l'incubazione over night delle proteine isolate dalle cellule HEK293 che non si sono legate all'anticorpo GPER immobilizzato alla resina. In WF è presente una banda al peso molecolare atteso per GPER, come in T1 e T2, indicazione del fatto che la cattura del GPER non risulta essere completa. Come ulteriore prova e conferma della buona riuscita dei processi di immunoprecipitazione è stata indagata la presenza dell'housekeeping GAPDH nei diversi preparati proteici. Come si può notare in figura 4.1 risalta in maniera molto chiara la banda corrispondente al GAPDH esclusivamente a livello del lavaggio WF, ovvero lo step di rimozione di tutte le proteine non legate alla resina. Questo indica che la strategia di purificazione e di isolamento messa a punto è specifica, ma non sensibile. Infatti, l'assenza di segnale per GAPDH in corrispondenza dei campioni T1 e T2 suggerisce che è stata purificata solo la proteina GPER. L'esclusiva purificazione di GPER tramite immunoprecipitazione dovrà essere poi confermata tramite l'utilizzo della spettrometria di massa.

DISCUSSIONE

La capacità degli ormoni steroidei di agire rapidamente, anche entro pochi minuti, attraverso effetti definiti “non genomici”, quali l’attivazione dell’adenilato ciclasi, delle MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), della fosfatidilinositolo 3-chinasi e l’aumento della concentrazione intracellulare di calcio, è ormai nota da tempo. Il recettore a sette tratti trans-membrana GPER è stato identificato come il recettore che media gli effetti rapidi non genomici, non solo dell’estradiolo, ma anche dell’aldosterone. Tale ipotesi è supportata dagli studi condotti da Caroccia et al. (35), Rigiracciolo et al. (36), in cui la possibilità che, anche l’aldosterone, e non solo il 17β estradiolo sia un ligando per il GPER, è ottenuta tramite studi indiretti di competizione. Gli studi presenti in letteratura non chiariscono se l’aldosterone leghi direttamente il GPER o se tale interazione possa avvenire ad esempio attraverso l’interazione tra GPER e il recettore mineralcorticoide (MR), target fisiologico dell’aldosterone.

Obiettivo del mio progetto di tesi è stato indagare, quindi, se l’aldosterone possa essere in grado di riconoscere ed interagire con il GPER.

È stata, quindi, condotta un’analisi di docking molecolare, una procedura di simulazione al computer ampiamente utilizzata per predire la conformazione di un complesso recettore-ligando, dove il recettore è di solito una proteina o una molecola di acido nucleico ed il ligando è una piccola molecola, oppure un’altra proteina. Nel nostro caso sono stati indagati come ligandi 2 ormoni steroidei: il 17β estradiolo e l’aldosterone. L’analisi computazionale condotta, anche se predittiva, ha confermato la capacità dell’aldosterone di interagire con il GPER. Inoltre, ha fornito alcune informazioni fondamentali in merito alla regione recettoriale coinvolta nell’interazione GPER-aldosterone. Un’ipotesi plausibile riguardava la possibilità che l’aldosterone fosse in grado di interagire con uno dei domini extracellulari del GPER. In realtà ciò che emerge dall’analisi di docking molecolare è che le regioni maggiormente implicate nell’interazione appartengono ad alcuni domini trans-membrana. Questo è in linea con la struttura chimica dell’aldosterone in quanto questa è caratterizzata da un nucleo steroideo con una spiccata lipofilia e, di conseguenza, non sorprende il fatto che esso possa interagire maggiormente con tali domini. In dettaglio, attraverso il software ZINC¹² sono state ricavate le strutture molecolari del GPER, dell’aldosterone e del 17β -estradiolo. Grazie all’impiego di un software di Docking online quale SwissDock è stato possibile ottenere rapidamente tutte le più probabili strutture del complesso di interazione aldosterone-GPER e 17β -estradiolo-GPER. Il lavoro certosino che ne è conseguito ha previsto di selezionare quelle che sono le strutture associate al ΔG minore, indice della maggior probabilità. In particolare, per il complesso estradiolo-GPER è selezionato un $\Delta G = -7,16$ Kcal/mol e un valore di *full fitness* pari a -1537,76 Kcal/mol, mentre per il complesso aldosterone-GPER un $\Delta G = -8,88$ Kcal/mol e un valore di *full fitness* pari a -1497,02 Kcal/mol. Ciò che è emerso dalla nostra analisi è stata un’informazione di enorme interesse, ovvero il 17β -estradiolo e

l'aldosterone, in quanto steroidi caratterizzati da un certo grado di lipofilia ed essendo in grado di attraversare le membrane cellulari liberamente, possono riconoscere ed interagire maggiormente con uno dei domini α -elica transmembrana. Di conseguenza, questo escluderebbe un riconoscimento extracellulare come finora ipotizzato.

Successivamente, dopo gli incoraggianti dati ottenuti dall'analisi di docking molecolare, è stata verificata la possibilità di un'interazione diretta aldosterone-GPER utilizzando una delle migliori tecnologie tutt'ora impiegate per tale scopo, quale la Surface Plasmon Resonance (SPR). Per tale analisi preliminare è stato scelto di utilizzare il recettore GPER presente in commercio, aldosterone e 17 β -estradiolo coniugati con BSA per superare i problemi di sensibilità strumentale. Questa è stata la prima volta che l'interazione tra un recettore accoppiato a proteina G, *i.e.* GPER, e una piccola molecola lipofila, quale uno steroide come aldosterone o 17 β -estradiolo, è stata indagata tramite SPR. I risultati ottenuti sono molto interessanti in quanto, nonostante il segnale sia molto basso a causa della quantità di GPER immobilizzato, indicano come l'aldosterone sia effettivamente in grado di interagire con il GPER in maniera proporzionale all'aumentare della concentrazione utilizzata. In particolare, salta subito all'occhio come a parità di quantità, il 17 β -estradiolo si leghi con un segnale più forte rispetto all'aldosterone. Nonostante i bassi livelli di GPER immobilizzati, utilizzando una equazione di binding semplice, siamo riusciti a stabilire un'affinità calcolando una costante di dissociazione (Kd) tra i due ligandi e il GPER. Ciò ci ha permesso di comparare i due ligandi notando come l'aldosterone e il 17 β -estradiolo siano in grado di interagire con il GPER con un'affinità molto simile, nel dettaglio l'aldosterone con una $K_d = 0,902 \pm 0,230 \mu\text{M}$ e il 17 β -estradiolo con una $K_d = 0,818 \pm 0,273 \mu\text{M}$.

Questi risultati preliminari, ottenuti tramite tecniche innovative, ma altrettanto consolidate, hanno confermato l'importanza di approfondire la questione, soprattutto in virtù di uno studio condotto da Gonzalez et al. Quest'ultimo mette in luce una delle principali modifiche post-traduzionali legate al GPER, ovvero la glicosilazione, ritenuta molto importante soprattutto per ciò che concerne la transizione del recettore transmembrana attraverso il reticolo endoplasmatico fino alla membrana e la sua maturazione. Il principale sito di glicosilazione è rappresentato dall'Asn⁴⁴, in grado di incrementare il peso molecolare del recettore a valori superiori ai canonici 42 KDa. La proteina presente in commercio è stata ottenuta in un sistema wheat germ dove non è possibile che avvenga la glicosilazione delle proteine (42). Per poter chiarire se la glicosilazione possa influenzare il pathway di riconoscimento con l'aldosterone è stato allestito un protocollo di isolamento e purificazione del GPER a partire da cellule di mammifero, così da ottenere e poter lavorare con un recettore nella sua forma fisiologicamente attiva. Operativamente si è deciso di utilizzare cellule HEK293 e di transfettarle utilizzando un plasmide pcDNA3.1+ da 5,4 Kb all'interno del quale è stata inserita la sequenza genica codificante per GPER. Il mantenimento della stabilità di transfezione è avvenuto mediante utilizzo di neomicina, così da selezionare solo ed esclusivamente le cellule trasfettate. Attraverso qRT-PCR abbiamo verificato che le cellule trasfettate esprimevano alti livelli di GPER. L'espressione del gene che

codifica per GPER è 600 volte superiore nelle cellule trasfettate rispetto ai controlli. Purtroppo, gli stessi livelli di iperespressione non sono stati trovati a livello proteico. Infatti, la proteina GPER risulta solo leggermente più espressa nelle cellule trasfettate rispetto alle non trasfettate. Questo può essere dovuto alla sensibilità dei metodi analitici utilizzati, molto elevata per la tecnica di RT-PCR e minore per quanto riguarda il Western Blot. Oppure intervengono meccanismi di regolazione post-trascrizionale che impediscono una produzione maggiore della proteina. Questo punto rimane da chiarire.

Poiché anche le cellule non trasfettate presentavano buoni livelli di proteina GPER abbiamo comunque deciso di mettere a punto un protocollo di isolamento del GPER attraverso immunoprecipitazione tramite l'uso di un anticorpo diretto verso GPER. Le proteine totali sono state estratte da cellule HEK293 e incubate con resina, poi pre-condizionate con l'anticorpo verso GPER. Solo GPER è stato riconosciuto dal nostro anticorpo e dopo una serie di lavaggi è stato eluito dalla resina. La presenza di GPER nell'eluato è stata verificata tramite Western Blot e risulta evidente nell'eluato ottenuto dopo immunoprecipitazione (Fig. 4.2). Nei nostri esperimenti emerge anche che la tecnica di immunoprecipitazione non è in grado di isolare tutta la proteina presente nel campione di partenza. Infatti, nell'eluato ottenuto dopo il primo lavaggio, quando il GPER è ancora legato all'anticorpo e quindi, alla resina, come si vede nella *line* WF, è presente una banda per GPER oltre come atteso, la banda specifica per l'housekeeping GAPDH. Ma i nostri risultati dimostrano anche che il protocollo di immunoprecipitazione da noi messo a punto è specifico per GPER in quanto, nelle *line* T1 e T2 non vi è contaminazione di altre proteine come il GAPDH. Si può ragionevolmente concludere che il protocollo di immunoprecipitazione utilizzato è una tecnica affidabile e che può essere presa come riferimento per l'ottenimento del GPER così da poterlo poi impiegare per test funzionali successivi.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il presente studio ha permesso di chiarire per la prima volta grazie agli esperimenti di docking molecolare e SPR (Surface Plasmon Resonance) che l'aldosterone interagisce con il recettore a 7 tratti transmembrana GPER. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'aldosterone è in grado di riconoscere e legare il GPER con un'affinità comparabile a quella del suo ligando naturale ovvero il 17 β -estradiolo. Abbiamo, inoltre, predetto che tale interazione può avvenire a livello di una α -elica transmembrana. Rimane da chiarire se tale interazione è conservata nella proteina GPER ottenuta in cellule HEK293 che presenta le modificazioni post-trascrizionali, quali la glicosilazione, che sappiamo essere importante per la corretta maturazione ed espressione del GPER. Il protocollo di immunoprecipitazione messo a punto da noi ci consente di ottenere la proteina GPER, maturata nella sua forma fisiologica, da utilizzare in altri studi di interazione tramite SPR.

Per poter utilizzare la proteina da noi isolata tramite immunoprecipitazione con l'anticorpo fornito dal Prof. Celso Gomez Sanchez, bisogna verificare che effettivamente nell'eluato raccolto sia presente solo GPER e non un'altra proteina del medesimo peso molecolare. Per questo motivo il GPER sarà sottoposto ad analisi tramite LC-MS/MS così da ottenere un dato di sequenza. Una volta acquisita tale informazione il GPER glicosilato sarà immobilizzato su chip CM5 e sarà condotto un nuovo esperimento di SPR in presenza di concentrazioni crescenti di aldosterone.

La prospettiva futura è sicuramente quella di poter definitivamente dimostrare che l'aldosterone è un ligando del GPER e che, considerati i molteplici effetti dell'aldosterone GPER-mediati, quest'ultimo possa rappresentare un nuovo bersaglio farmacologico nell'ipertensione o nelle patologie renali dove un effetto GPER mediato dell'aldosterone è stato descritto.

BIBLIOGRAFIA

1. Nicholls MG, Robertson JIS. The renin-angiotensin system in the year 2000. *J Hum Hypertens*. 2000;14(10–11):649–66.
2. Seccia TM, Caroccia B, Gomez-Sanchez EP, Vanderriele PE, Gomez-Sanchez CE, Rossi GP. Review of Markers of Zona Glomerulosa and Aldosterone-Producing Adenoma Cells. *Hypertension*. 2017;70(5):867–74.
3. Seccia TM, Caroccia B, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Rossi GP. The Biology of Normal Zona Glomerulosa and Aldosterone-Producing Adenoma: Pathological Implications. *Endocr Rev*. 2018;39(6):1029–56.
4. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother*. 2017;94:317–25.
5. Lenzini L, Caroccia B, Seccia TM, Rossi GP. Peptidergic G Protein–Coupled Receptor Regulation of Adrenal Function: Bench to Bedside and Back Get. *Endocr Rev*. 2022;(in press).
6. Nakamura Y, Yamazaki Y, Konosu-Fukaya S, Ise K, Satoh F, Sasano H. Aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex and associated disorders. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;153:57–62.
7. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2007;292(1):82–97.
8. Mulrow PJ. Angiotensin II and aldosterone regulation. *Regul Pept*. 1999;80(1–2):27–32.
9. Gao X, Yamazaki Y, Tezuka Y, Omata K, Ono Y, Morimoto R, et al. Pathology of aldosterone biosynthesis and its action. *Tohoku J Exp Med*. 2021;254(1):1–15.
10. Gordon H, Williams. Aldosterone Biosynthesis, Regulation, and Classical Mechanism of Action. *Heart Fail Rev*. 2010;58:7–13.
11. Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Classical model of aldosterone action. *Adv Physiol Educ*. 2002;26(1):8–20.
12. Messerli FH, Williams B, Ritz E. Essential hypertension. *The Lancet*. 18 agosto 2007;370(9587):591–603.
13. Kallikazaros IE. Arterial hypertension. *Hell J Cardiol HJC Hell Kardiologike Epitheorese*. ottobre 2013;54(5):413–5.
14. Rossi GP. Primary Aldosteronism: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. dicembre 2019;74(22):2799–811.

15. Zennaro MC, Boulkroun S, Fernandes-Rosa FL. Pathogenesis and treatment of primary aldosteronism. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(10):578–89.
16. Vaidya A, Mulatero P, Baudrand R, Adler GK. The Expanding Spectrum of Primary Aldosteronism: Implications for Diagnosis, Pathogenesis, and Treatment. *Endocr Rev*. 2018;39(6):1057–88.
17. Hundemer GL, Vaidya A. Primary Aldosteronism Diagnosis and Management: A Clinical Approach. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2019;48(4):681–700.
18. Oki K, Gomez-Sanchez CE. The landscape of molecular mechanism for aldosterone production in aldosterone-producing adenoma. *Endocr J*. 2020;67(10):989–95.
19. Amar L, Plouin PF, Steichen O. Aldosterone-producing adenoma and other surgically correctable forms of primary aldosteronism. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5(1):1–12.
20. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, et al. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. maggio 2016;101(5):1889–916.
21. Chen K, Obinata H, Izumi T. Detection of G protein-coupled receptor-mediated cellular response involved in cytoskeletal rearrangement using surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron*. 2010;25(7):1675–80.
22. Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol*. 2018;25(1):4–12.
23. Barton M. Position paper: The membrane estrogen receptor GPER - Clues and questions. *Steroids*. 2012;77(10):935–42.
24. Revankar CM, Bologna CG, Pepermans RA, Sharma G, Petrie WK, Alcon SN, et al. A Selective Ligand for Estrogen Receptor Proteins Discriminates Rapid and Genomic Signaling. *Cell Chem Biol*. 2019;26(12):1692-1702.e5.
25. Thomas P, Alyea R, Pang Y, Peyton C, Dong J, Berg AH. Conserved estrogen binding and signaling functions of the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in mammals and fish. *Steroids*. 2010;75(8–9):595–602.
26. De Valdivia EG, Sandén C, Kahn R, Olde B, Fredrik Leeb-Lundberg LM. Human G protein-coupled receptor 30 is N-glycosylated and N-terminal domain asparagine 44 is required for receptor structure and activity. *Biosci Rep*. 2019;39(2):1–11.
27. Wehling M. Rapid actions of aldosterone revisited: Receptors in the limelight. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;176:94–8.
28. Feldman RD, Gros R. Rapid vascular effects of steroids - A question of balance? *Can J Cardiol*. 2010;26:22A-26A.

29. da Silva JS, Montagnoli TL, Rocha BS, Tacco MLCA, Marinho SCP, Zapata-Sudo G. Estrogen receptors: Therapeutic perspectives for the treatment of cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):1–20.
30. Hernández-Silva CD, Villegas-Pineda JC, Pereira-Suárez AL. Expression and Role of the G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPR30/GPER) in the Development and Immune Response in Female Reproductive Cancers. *Front Endocrinol.* 2020;11:1–11.
31. Fredette NC, Meyer MR, Prossnitz ER. Role of GPER in estrogen-dependent nitric oxide formation and vasodilation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;176:65–72.
32. DeLeon C, Wang DQH, Arnatt CK. G Protein-Coupled Estrogen Receptor, GPER1, Offers a Novel Target for the Treatment of Digestive Diseases. *Front Endocrinol.* 2020;11:1–8.
33. Caroccia B, Seccia TM, Campos AG, Gioco F, Kuppusamy M, Ceolotto G, et al. GPER-1 and estrogen receptor- β ligands modulate aldosterone synthesis. *Endocrinology.* 2014;155(11):4296–304.
34. Hermidorff MM, de Assis LVM, Isoldi MC. Genomic and rapid effects of aldosterone: what we know and do not know thus far. *Heart Fail Rev.* 2017;22(1):65–89.
35. Caroccia B, Seccia TM, Piazza M, Prisco S, Zanin S, Iacobone M, et al. Aldosterone Stimulates Its Biosynthesis Via a Novel GPER-Mediated Mechanism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(12):6316–24.
36. Rigracciolo DC, Scarpelli A, Lappano R, Pisano A, Santolla MF, Avino S, et al. GPER is involved in the stimulatory effects of aldosterone in breast cancer cells and breast tumor-derived endothelial cells. *Oncotarget.* 2015;7(1):94–111.
37. Beseničar M, Maček P, Lakey JH, Anderluh G. Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem Phys Lipids.* 2006;141(1–2):169–78.
38. Gieseking RLM. Plasmons: Untangling the classical, experimental, and quantum mechanical definitions. *Mater Horiz.* 2022;9(1):25–42.
39. Duan Q, Liu Y, Chang S, Chen H, Chen J hui. Surface Plasmonic Sensors: Sensing Mechanism and Recent Applications. *Sensors.* 2021;21(16):5262.
40. Nonobe Y, Yokoyama T, Kamikubo Y, Yoshida S, Hisajima N, Shinohara H, et al. Application of surface plasmon resonance imaging to monitoring G protein-coupled receptor signaling and its modulation in a heterologous expression system. *BMC Biotechnol.* 2016;16(1):1–9.
41. Prossnitz ER, Barton M. The G protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(12):715–26.

42. Harbers M. Wheat germ systems for cell-free protein expression. FEBS Lett. 2014;588(17):2762–73.