



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Istituto di Anatomia Patologica

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

**Scuola di Dottorato di Ricerca in
Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali**

Indirizzo: Scienze Nefrologiche

XXI ciclo

**SIGNALING CELLULARE DELL'ANGIOTENSINA II
MEDIATO DAI RECETTORI AT2. RELAZIONE CON LA
REGOLAZIONE DEL TONO VASCOLARE E CON IL
RIMODELLAMENTO CARDIOVASCOLARE. STUDIO NEL
MODELLO SPERIMENTALE DELLA SINDROME DI
BARTTER/GITELMAN.**

Direttore della scuola: Ch.mo Prof. Antonio Tiengo
Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Angela D'Angelo
Correlatore: Dr. Lorenzo A. Calò

Dottoranda: Silvia Schiavo

2 Febbraio 2009

INDICE

Riassunto	4
Summary.....	8
1. Introduzione.....	12
2. Sistema Renina-Angiotensina	13
2.1. Signaling dell'Angiotensina II via recettore AT1	14
2.2. Signaling dell'Angiotensina II via recettore AT2	18
2.3. Ipertensione e Infiammazione	19
2.3.1. Ikb, subunità inibitoria di NF-κB	21
2.3.2. p66 ^{shc} e stress ossidativo	22
2.4. Ipertensione e Rimodellamento Cardiovascolare: la via della MAPK.....	25
2.4.1. Extracellular Regulated Kinase	26
2.4.2. Regolazione della via della MAPK: MKP-1	27
2.4.3. MKP-1 e recettore AT2	28
3. Sistema ACE2/Ang 1-7/Mas	30
3.1. Angiotensin Convertin Enzime 2	32
3.2. Angiotensina 1-7	34
3.3. Mas, recettore dell'Angiotensina 1-7	35
4. Le sindromi di Bartter e Gitelman.....	37
4.1. Sindromi di Bartter e Gitelman e signaling dell'Angiotensina II.....	40
4.2. Sindromi di Bartter e Gitelman e infiammazione.....	43
5. Scopo del lavoro	44
6. Pazienti e Metodi.....	46
6.1. Pazienti	46
6.2. Metodi.....	49
6.2.1. Separazione delle cellule mononucleate da sangue.....	49
6.2.2. Colture primarie di fibroblasti	49
6.2.3. Stimolazione delle colture di fibroblasti.....	50
6.2.4. Determinazione del lisato proteico	51
6.2.5. Determinazione della concentrazione di proteine	51
6.2.6. Separazione elettroforetica delle proteine e trasferimento su membrana di nitrocellulosa	52
6.2.7. Formazione e visualizzazione degli immunocomplessi	52
6.2.8. Quantificazione dell'espressione proteica.....	54
6.2.9. Estrazione dell'RNA	54
6.2.10. Quantificazione ed integrità di RNA.....	55
6.2.11. Retrotrascrizione ed amplificazione mediante RT PCR.....	55
6.2.12. Visualizzazione dei prodotti di PCR	56
6.2.13. Quantificazione dell'espressione genica	57
6.2.14. Analisi statistica.....	57
7. Risultati.....	58

7.1.	Valutazione dell'espressione proteica di AT2 in fibroblasti cutanei di pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman e di Soggetti normotesi di controllo.....	58
7.2.	Valutazione dell'attivazione di ERK1/2, dell'espressione proteica di Ikb e dell'espressione genica di p66 ^{shc} in cellule mononucleate del sangue di pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman e di soggetti normotesi di controllo	59
7.3.	Valutazione dell'espressione proteica di MKP-1 e dell'attivazione di ERK1/2 indotte da Ang II con e senza preincubazione con PD123319 in fibroblasti cutanei di pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman e di Soggetti normotesi di controllo	60
7.4.	Valutazione dell'espressione proteica di ACE2 e di Ang 1-7 in cellule mononucleate del sangue di pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman, di pazienti Ipertesi e di Soggetti normotesi di controllo.....	63
8.	Discussioni e Conclusioni.....	65
	Bibliografia	70
	Ringraziamenti.....	Errore. Il segnalibro non è definito.

Riassunto

Il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) svolge un ruolo fisiopatologico fondamentale nell'ipertensione, che è il principale fattore di rischio per le patologie cardiovascolari.

L'ipertensione arteriosa, il signaling dell'Angiotensina II (Ang II), lo stress ossidativo, l'infiammazione, la via della MAPK e il sistema dell'ossido nitrico (NO) sono infatti strettamente legati da interazioni multiple che indicano che Ang II è integrata in un meccanismo omeostatico capace di regolare sia le funzioni vascolari che la struttura vascolare.

L'angiotensina II ha effetti pleiotropici che sono mediati dall'attivazione di meccanismi di signaling cellulare che trasducono segnali a breve e lungo termine (Griendling et al, 1997; Dzau, 2001). I primi coinvolgono proteine G monomeriche ed eterotrimeriche, la fosfolipasi C γ e la fosfolipasi D e sono responsabili della maggior parte dei ben noti effetti emodinamici ed endocrini dell'Angiotensina II. I secondi sono invece responsabili dei processi di rimodellamento cardiovascolare che portano all'aterosclerosi, all'insufficienza cardiaca ed all'insufficienza renale attraverso la modulazione dello stato ossidativo ed infiammatorio della cellula (Griendling et al, 1997; Dzau, 2001). L'Ang II infatti, induce stress ossidativo incrementando l'attività della NADH/NADPH ossidasi con conseguente iperproduzione di superossido (O $_2^-$) (Griendling et al, 1997; Dzau, 2001). Nell'ipertensione arteriosa, lo sbilanciamento dei sistemi che regolano il tono vascolare, da un lato, e lo stato ossidativo a favore della produzione di radicali liberi dell'ossigeno, dall'altro, contribuirebbero al rimodellamento cardiovascolare che all'eterosclerosi ed all'insufficienza cardiaca e renale (Griendling et al, 1997; Dzau, 2001).

L'Ang II media le sue azioni biologiche attraverso il legame a due distinti recettori legati alla membrana cellulare, i recettori AT1 ed i recettori AT2 (De Gasparo et al, 2000). La maggior parte delle azioni biologiche dell'Angiotensina II, compresa la contrazione della cellula muscolare liscia vascolare, la crescita e l'infiammazione, sono mediate attraverso il legame con i recettori AT1. Evidenze recenti indicano che il recettore AT2 controbilancia questi effetti inducendo vasodilatazione, inibendo la crescita cellulare e l'infiammazione e mediando effetti antiipertrofici ed antiapoptotici (De Gasparo et al, 2000; Volpe et al, 2003; Stoll et al, 2001; Zhou et al, 2008; Yamamoto et al, 2008). L'effetto vasodilatante mediato dai recettori AT2 (Tsutsumi et al, 1999; Carey et al, 2001; Carey et al, 2000) è mediato dal sistema bradichinina/NO/cGMP, mentre la sua azione antirimodellamento è mediata dalla attivazione di fosfatasi che defosforilano la ERK1/2 (Fischer et al, 1998). Il blocco dei

recettori AT1 con bloccanti dei recettori AT1 dell'Angiotensina II fa aumentare notevolmente la concentrazione plasmatica di Ang II che si rende così disponibile per lo stimolo dei recettori AT2 e questa azione, peraltro, potrebbe contribuire alla loro attività antiipertensiva.

Recentemente è emerso un ruolo importante per l'enzima ACE2, un omologo dell'enzima di conversione dell'angiotensina II (ACE); ACE ed ACE2 sono responsabili rispettivamente della produzione dell'angiotensina II e dell'angiotensina 1-7 (Ang 1-7), un potente vasodilatatore, noto per avere effetti biologici opposti a quelli dell'Ang II (Ferrario et al, 1997; Iyer et al, 1998; Santos et al, 2007). A causa delle azioni opposte dell'Ang 1-7 e dell'Ang II, l'attività dell'ACE2 può determinare l'omeostasi della pressione arteriosa (Ferrario et al, 1997; Iyer et al, 1998; Santos et al, 2007), tanto che l'espressione genica e proteica di ACE2 sono marcatamente ridotte nei ratti ipertesi (Crackower et al, 2002) e nelle disfunzioni cardiache, vascolari e renali (Zisman et al, 2003; Ishiyama et al, 2004; Tikellis et al, 2006). L'ACE2 svolge quindi un ruolo di protezione d'organo associato all'ipertensione e alle sue complicanze (Ferreira et al, 2008).

Una condizione clinica sovrapponibile a quella indotta dal blocco cronico del recettore AT1 si verifica nelle Sindromi di Bartter e Gitelman, malattie genetiche caratterizzate da ipokalemia, deplezione di sodio, attivazione del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAAS), con aumentati livelli plasmatici di Ang II e aldosterone, ma normo-ipotensione, ridotte resistenze periferiche ed iporesponsività agli agenti pressori (Calò et al, 2000). Negli studi effettuati su questi pazienti dal nostro gruppo di lavoro, si è dimostrato che il signaling a breve termine dell'Ang II via recettori AT1 è ridotto (Calò et al, 2003; Calò et al, 2001; Calò et al, 2004; Pagnin et al, 2004; Calò et al, 2005; Calò et al, 2005; Pagnin et al, 2005; Davis et al, 2006; Semplicini et al, 2006). La ridotta sensibilità agli effetti dell'Ang II mediati da questi recettori nei pazienti con Sindrome di Bartter e Gitelman, li rende un modello sperimentale umano ideale per la valutazione dei meccanismi cellulari e molecolari mediati dai recettori AT2.

Lo scopo dei nostri studi è stato quello di utilizzare questo modello per poter studiare il segnale mediato dai recettori AT2, prendendo in considerazione inizialmente la via a lungo termine mediata dall'Ang II, analizzando il processo di infiammazione, direttamente collegato allo stress ossidativo e il conseguente processo di rimodellamento cardiovascolare. In particolare, dopo aver escluso anomalie dell'espressione del recettore AT2 in pazienti con Sindrome di Bartter e Gitelman, abbiamo valutato "ex vivo", su cellule mononucleate del sangue che su fibroblasti ottenuti da biopsie cutanee lo stato di proteine correlate all'infiammazione, quali: IκB, la subunità inibitoria di NF-κB, fattore di trascrizione nucleare chiave nelle patologie

infiammatorie e fibrotiche; p66^{shc}, proteina adattatrice coinvolta nella risposta allo stress ossidativo e ERK1/2, target a valle del recettore AT1 e principalmente coinvolto nel rimodellamento cardiovascolare. Inoltre, abbiamo esplorato direttamente il processo di rimodellamento, valutando l'attivazione della ERK1/2 confrontandola con lo stato di espressione della MKP-1. Questa fosfatasi è attivata dalla stimolazione del recettore AT2 dell'Ang II e la sua attivazione defosforila e quindi inattiva le ERK1/2. Per provare definitivamente il ruolo del recettore AT2 in questo meccanismo, gli stessi esperimenti sono stati effettuati in presenza o meno di PD123319, un bloccante del recettore AT2. Abbiamo poi utilizzato i pazienti con sindrome di Bartter e Gitelman per valutare i livelli di ACE2 e Ang 1-7 rispetto ai soggetti sani normotesi ed ai pazienti con ipertensione essenziale per valutare l'espressione proteica di questi due parametri.

I risultati del nostro studio hanno evidenziato che l'attivazione indotta da Ang II di ERK1/2 nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman rispetto ai controlli sani non è significativamente differente (9.02 ± 5.8 unità densitometriche verso 8.04 ± 4.45 u.d) a conferma della presenza nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman di un blocco endogeno del signaling dell'Ang II via recettore AT1. Non sono state riscontrate differenze significative nell'espressione genica di p66shc (0.65 u.d. \pm 0.08 verso 0.64 u.d \pm 0.09) nei pazienti con sindrome di Bartter e Gitelman rispetto ai controlli sani che conferma in questi pazienti, pur in presenza di elevati livelli di Ang II, un ridotto stato ossidativo. La valutazione dell'espressione proteica di I κ B ha invece dimostrato un aumento significativo nei pazienti rispetto ai controlli (1.75 ± 0.69 u.d. verso 0.67 u.d \pm 0.31). La maggior espressione di I κ b indica infatti una ridotta attivazione di NF- κ B e una ridotta trascrizione dei geni coinvolti nell'infiammazione locale e sistemica da esso mediata.

Inoltre l'incubazione dei fibroblasti dei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman con Ang II ha mostrato un più rapido declino nella fosforilazione di ERK1/2 rispetto ai controlli. Era presente infatti un picco di espressione di MKP-1 corrispondente al punto di massima inibizione di ERK1/2 non osservato nei controlli. La preincubazione di PD123319, un bloccante dei recettori AT2, aboliva l'osservato l'incremento di MKP-1, suggerendo che MKP-1 è nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman tra i più importanti effettori nell'alterazione della fosforilazione di ERK1/2 e confermando quindi in questi pazienti la presenza ed il coinvolgimento del signaling dell'Ang II via recettore AT2.

I livelli di ACE2 in pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman (1.59 ± 0.63 unità densitometriche) sono risultati significativamente aumentati sia rispetto ai soggetti sani (0.98 ± 0.45 ; $p=0.021$) che ai pazienti ipertesi (1.06 ± 0.24 unità densitometriche; $p=0.022$), mentre tra i soggetti sani ed i pazienti ipertesi non sono state riscontrate significative differenze. Anche i livelli di Ang 1-7 nei pazienti con

sindromi di Bartter e Gitelman (2.26 ± 1.18 unità densitometriche) risultavano significativamente aumentati sia rispetto ai pazienti ipertesi (0.72 ± 0.28 unità densitometriche; $p=0.005$) che ai soggetti sani (1.12 ± 0.48 unità densitometriche; $p=0.018$). Infine si è riscontrato una correlazione tra i livelli di ACE2 e Ang 1-7 solo nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman.

I risultati di questo studio uniti a quelli ottenuti in precedenza dal nostro gruppo sui pazienti affetti da sindrome di Bartter e Gitelman contribuiscono a dare una interpretazione razionale del meccanismo fisiopatologico che lega infiammazione, ipertensione e sue complicanze a lungo termine come il rimodellamento cardiovascolare e l'aterosclerosi nell'uomo, sottolineano il ruolo critico svolto dall'Ang II nel controllo di processi di biologia vascolare in generale e confermano in un modello umano di iporeattività vascolare, la presenza del signaling dell'Angiotensina II mediato dai recettori AT2. Inoltre questi risultati supportano il ruolo della stimolazione dei recettori AT2 nell'azione terapeutica dei bloccanti dei recettori AT1 dell'Angiotensina II. L'aumento dei livelli di ACE2 e Ang 1-7 riscontrati in una condizione clinica di ridotta reattività vascolare come in questi pazienti sono in favore di un ruolo per ACE2 ed Ang 1-7 nella fisiopatologia dell'ipertensione arteriosa (Tikellis et al, 2006) e suggeriscono un loro coinvolgimento nel determinismo della ridotta iporeattività vascolare e rimodellamento cardiovascolare di questi pazienti.

Poiché infine i pazienti con sindrome di Bartter e Gitelman sono l'immagine speculare dell'ipertensione arteriosa, i dati sottolineano ancora una volta l'utilità di questo modello umano per lo studio di meccanismi biochimici cellulari che sono coinvolti nella fisiopatologia cardiovascolare.

Summary

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) plays a central pathophysiological role in hypertension, which is a major risk factor for cardiovascular disease. Hypertension, Angiotensin II signalling (Ang II), oxidative stress, inflammation, MAPK pathway and nitric oxide system (NO) are closely linked by multiple interactions that suggest Ang II is integrated in a homeostatic mechanism system that regulates both vascular function and structure.

Angiotensin II has pleiotropic effects mediated by the activation of short- and long-term signalling mechanisms (Griendling et al, 1997; Dzau, 2001). The first involve monomeric and heterotrimeric G proteins, phospholipase C (PLC)- β , leading to most of the well known haemodynamic and endocrine effects of Ang II such as vascular smooth muscle contraction, the latter cause cardiovascular remodelling, atherosclerosis and heart failure mostly through modulation of the cell oxidative and inflammation state. In fact, Ang II induces oxidative stress via upregulation of NADH/NADPH oxidase, the major superoxide (O_2^-)-generating enzyme, with consequent O_2^- overproduction (Griendling et al, 1997; Dzau, 2001). In hypertension, the imbalance of vascular tone regulation and the overproduction of ROS contribute to cardiovascular remodelling, atherosclerosis and renal and cardiac damage (Griendling et al, 1997; Dzau, 2001).

Biological actions of Ang II are mediated through two distinct different receptors linked to the cell membrane, the AT1R and AT2R (De Gasparo et al, 2000). Most of the effects of Ang II are mediated via the AT1R while AT2R stimulation has been suggested to counteract many actions mediated by AT1R through the induction of vasodilation, antiproliferation and apoptosis but the role of AT2R in these processes remains to be completely elucidated (De Gasparo et al, 2000; Volpe et al, 2003; Stoll et al, 2001; Zhou et al, 2008; Yamamoto et al, 2008; Tsutsumi et al, 1999; Carey et al, 2001; Carey et al, 2000). However, stimulation of this receptor evokes pathways that involve tyrosine or serine/threonine phosphatases. Three such AT2R-associated phosphatases, that interact with the ERK1/2 pathway have been identified: mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) protein phosphatase 2A (PP2A) and SH2 domain-containing phosphatase (SHP-1) (Fischer et al, 1998). The blocking of AT1 receptors by AT1 receptor blockers II greatly increases the plasma concentration of Ang II, which could be available for the stimulation of AT2 receptors and this action could contribute to their antihypertensive activities.

Angiotensin-converting enzyme (ACE) and its homologue ACE2 are responsible for the production of Angiotensin II (Ang II), potent vasopressor and Ang-(1-7), a

potent vasodilator, respectively (Ferrario et al, 1997). Because of the opposing actions of Ang 1-7 and Ang II, ACE2 activity may determine blood pressure homeostasis (Ferrario et al, 1997; Iyer et al, 1998; Santos et al, 2007). In fact ACE2 mRNA and protein are markedly reduced in hypertensive rats (Crackower et al, 2002). ACE2's pathophysiological relevance is supported by its altered expression in cardiac, vascular and renal dysfunctions, by the deleterious effects of ACE2 gene deletion on the cardiovascular and renal systems (Zisman et al, 2003; Ishiyama et al, 2004; Tikellis et al, 2006) as well as the increased plasma, kidney and heart Ang II levels found in ACE2 knockout mice. Together, these data indicate that ACE2 plays a protective role in organs directly related to hypertension and associated diseases (Ferreira et al, 2008).

A clinical condition of chronic blockade of AT1 receptor occurs in Bartter's and Gitelman's syndromes, an example of endogenous Ang II AT1R antagonism. Bartter's and Gitelman's syndromes, caused by gene defects in specific kidney transporters and ion channels, present a puzzling clinical picture characterized by hypokalemia, sodium depletion, activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), with increased plasma levels of Ang II and aldosterone and yet normo/hypotension, reduced peripheral resistance and hyporesponsiveness to pressor agents (Calò et al, 2000). Therefore, we have proffered these patients as a good system to explore the signaling pathways responsible for mediating the signaling of Ang II based on the results of an extensive series of studies that have provided mechanistic explanations for these patients vascular hyporeactivity (Calò et al, 2003; Calò et al, 2001; Calò et al, 2004; Pagnin et al, 2004; Calò et al, 2005; Calò et al, 2005; Pagnin et al, 2005; Davis et al, 2006; Semplicini et al, 2006). Along with these findings has come the recognition that Bartter's and Gitelman's syndromes offer a means to explore the mechanisms responsible for maintenance/controlling vascular tone and cardiovascular remodeling involved in the Ang II signaling mediated by AT2 receptors.

The aim of our study was to try to understand the signal mediated by AT2 receptor, initially considering the Ang II long-term signaling to explore inflammation, related to oxidative stress and cardiovascular remodelling using this human model. The current study in fact, evaluated in our cohort of Bartter's and Gitelman's patients the levels of ERK1/2, I κ B, the inhibitory subunit of NF- κ B, and p66^{shc}, adaptor protein involved in the response to oxidative stress.

The study also explored in fibroblasts from Bartter's and Gitelman's patients in comparison with fibroblasts from healthy subjects the mechanisms regulating the Ang II induced ERK1/2 stimulation by examining the response of MKP-1, which is stimulated by the activation of AT2R and whose protein expression has been shown to correlate with ERK1/2 activation. The effect of PD123319, an AT2R blocker, on the

time course of MKP-1 expression and ERK1/2 phosphorylation was also tested by preincubating the cells with 1 μ M PD123319 for 30 minutes. We have also used Bartter's and Gitelman's patients to evaluate the levels of both ACE2 and Ang 1-7 and compared that with those of healthy subjects and essential hypertensive patients still using a molecular biology approach.

The results showed that Ang II induced phosphorylation of ERK1/2 was not different between Bartter's and Gitelman's patients and controls: 9.02 densitometric units (d.u.) \pm 5.8 vs 8.04 d.u. \pm 4.45, $p=0.89$, n.s., pointing toward an unchanged activation of ERK1/2 in Bartter's and Gitelman's patients. p66^{shc} gene expression was also unchanged in patients with Bartter and Gitelman's syndrome: 0.65 d.u. \pm 0.08 vs 0.64 d.u. \pm 0.09, $p=0.84$, n.s., confirming the normal oxidative status of this patients. On the contrary, the protein level of the inhibitory subunit of NF- κ B, I κ B, was significantly increased in patients with Bartter and Gitelman's syndromes: 1.75 d.u. \pm 0.69 vs 0.67 d.u. \pm 0.31, $p=0.02$, pointing toward a reduced activity of NF- κ B and therefore toward a reduced transcription of genes involved in local and systemic inflammation, which are mediated by NF- κ B activation.

We also found that the time course of ERK1/2 phosphorylation in response to Ang II in fibroblasts in cell culture differs between Bartter's and Gitelman's patients and healthy subjects. Control fibroblasts upon incubation with Ang II showed, in fact, a prolonged increase in ERK1/2 phosphorylation compared to the short duration of the increase in ERK1/2 phosphorylation seen in Bartter's and Gitelman's patients and the presence of MKP-1 peak at the same time point of the lowest phosphorylation of ERK 1/2. These results cannot be attributed to differences in AT2 receptor levels in the fibroblasts as these were shown to be similar as in control subjects. The addition of the ATR2 inhibitor, PD123319, altered the Bartter and Gitelman ERK1/2 phosphorylation response to the prolonged ERK1/2 phosphorylation increase found in the controls subjects. Moreover, PD123319 did not alter the ERK1/2 phosphorylation responses to Ang II in the fibroblasts from healthy subjects. These results confirm the presence and involvement of AT2R in the Ang II signaling in these patients.

ACE2 levels in Bartter's and Gitelman's (1.59 densitometric units (d.u.) \pm 0.63) are significantly increased compared to both healthy subjects (0.98 d.u. \pm 0.45; $p=0.021$) and hypertensive patients (1.06d.u. \pm 0.24; $p=0.022$), while in healthy subjects and hypertensive patients no significant difference is observed. Ang1-7 levels parallel ACE2 results and differ between groups ($p= 0.002$; Anova). Ang 1-7 levels in Bartter and Gitelman (2.26 d.u. \pm 1.18) are significantly increased compared to hypertensive patients (0.72 d.u. \pm 0.28; $p=0.005$) and healthy subjects (1.12 d.u. \pm 0.48, $p=0.018$), while the difference in hypertensive patients and healthy subjects

only approaches statistical significance ($p=0.066$). Finally ACE2 and Ang 1-7 levels were directly correlated only in Bartter's and Gitelman's patients.

In conclusion, the findings of the current study together with those derived from our earlier studies on Bartter and Gitelman syndromes contribute to give further insights into the pathophysiological mechanisms linking inflammation, hypertension and long term complications such as cardiovascular remodelling and atherogenesis in humans, stress the critical role played by Ang II signaling in biology vascular control and confirmed in a human model of vascular hyporeactivity, the role of Ang II signalling by AT2 receptors.

The current study's findings also suggest that in addition ACE2 and Ang1-7 may take part in the mechanisms responsible for the reduced vascular hyporeactivity and cardiovascular remodeling in these patients.

The results here presented further confirm the nature of Bartter and Gitelman syndromes as a mirror image of hypertension and thereby bolster the utility of Bartter and Gitelman patients as a model system to explore mechanisms involved in cardiovascular pathophysiology.

1. Introduzione

L'ipertensione è una delle malattie a più larga diffusione ed il maggiore fattore di rischio per patologia cardiovascolare che costituisce la principale causa di molte malattie invalidanti quali l'angina pectoris, l'infarto miocardico, l'ictus cerebrale, la nefropatia e la retinopatia. Essa è, infatti, determinante per lo sviluppo dell'aterosclerosi e del danno d'organo cerebrale, cardiaco e renale (Linee guida ESH).

Un importante fattore che contribuisce alle disfunzioni vascolari nell'ipertensione è lo stress ossidativo che induce infiammazione del tessuto vascolare associato con la migrazione delle cellule proinfiammatorie, l'aumento dell'espressione di geni proinfiammatori redox-sensibili, accumulo di proteine e fibrosi (Wilcox, 2002). Questi processi sono alla base del rimodellamento cardiovascolare indotto a lungo termine dall'ipertensione arteriosa. Essi includono l'aumento della crescita delle cellule muscolari lisce vasali, ed alterazioni strutturali causate dagli effetti a lungo termine delle proteine vasocostrittrici tra cui il più importante è l'Angiotensina II (Johns, 2000).

L'angiotensina II gioca un ruolo cruciale nell'induzione dei processi correlati all'instaurarsi dell'ipertensione arteriosa, attraverso il suo segnale sia a breve (stimolazione della contrazione della muscolatura liscia vasale) che a lungo termine, (induzione della crescita cellulare, aumento dei costituenti della matrice extracellulare, induzione della migrazione cellulare e dell'infiammazione). La sua importanza è dimostrata dalla provata efficacia di farmaci che, attraverso il loro meccanismo d'azione, riducono la produzione di Angiotensina II o modulano negativamente il segnale che essa trasduce (ACE inibitori e bloccanti del recettore AT1 dell'Angiotensina II)(Atlas, 2007).

Anche se negli ultimi anni molte informazioni ci sono giunte da studi sulla traduzione del segnale dell'angiotensina II alle cellule, i processi biochimici che mediano le anomalie nel segnale cellulare nell'ipertensione continuano a rimanere non ancora completamente chiarite. Indagare quindi sui meccanismi che regolano questi processi a livello cellulare e molecolare, potrebbe fornirci informazioni più complete sul meccanismo d'azione dei farmaci in uso e anche fornirci nuove strade per possibili terapie innovative.

2. Sistema Renina-Angiotensina

Nello studio dell'ipertensione arteriosa e delle sue complicanze a lungo termine, un ruolo chiave è rappresentato dal sistema renina-angiotensina.

Il Sistema Renina-Angiotensina (RAS) è una complessa cascata enzimatico-proteica che, attraverso la generazione di mediatori cellulari, gioca un ruolo importante nel controllo della pressione sanguigna e del tono vascolare e nella omeostasi idrosalina e del volume plasmatico regolando le funzioni renali (Atlas, 2007). La renina è un enzima proteolitico depositato nelle cellule iuxtaglomerulari del rene, rilasciato dalle cellule granulari del glomerulo in risposta a vari stimoli come una riduzione della pressione arteriosa, diuretici o bassa concentrazione di sodio che comportano una riduzione del volume sanguigno circolante, stimoli da parte del sistema nervoso ortosimpatico o altri stimoli anche di natura patologica. Oltre che in questa sede, la renina e tutte le altre componenti del sistema possono essere sintetizzate in maniera comunque regolata, in numerosi altri tessuti dell'organismo, dove sono stati identificati e caratterizzati sistemi renina-angiotensina locali o tissutali, provvisti di un completo apparato enzimatico-proteico (Rüster, 2006).

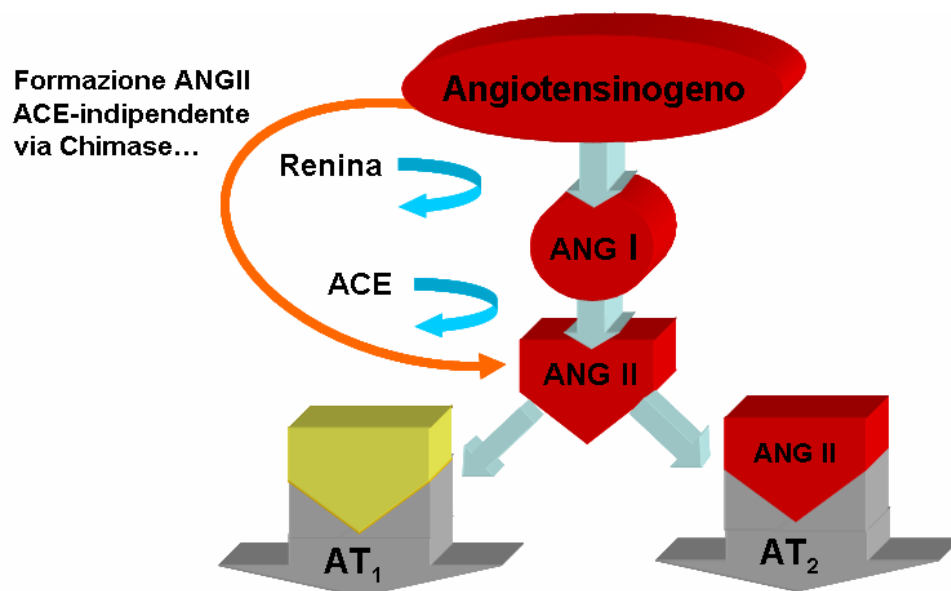


Figura 2.1 Diagramma del Sistema Renina-Angiotensina con i passaggi enzimatici dall'angiotensinogeno fino al legame dell'Angiotensina II con i suoi principali recettori AT₁ e AT₂.

La sua azione proteolitica è in grado di scindere l'angiotensinogeno, un peptide prodotto a livello epatico, in un decapeptide inattivo, l'Angiotensina I (Ang I). Quest'ultimo passa alla forma attiva grazie ad un altro enzima proteolitico, l'enzima di conversione dell'Angiotensina II (ACE) prodotto a livello dell'endotelio dei capillari dove converte l'Angiotensina I (decapeptide) in Angiotensina II (Ang II, octapeptide), un potente vasocostrittore in grado di determinare un aumento delle resistenze totali periferiche e della pressione arteriosa e che è il principale effettore del RAS (Rüster, 2006).

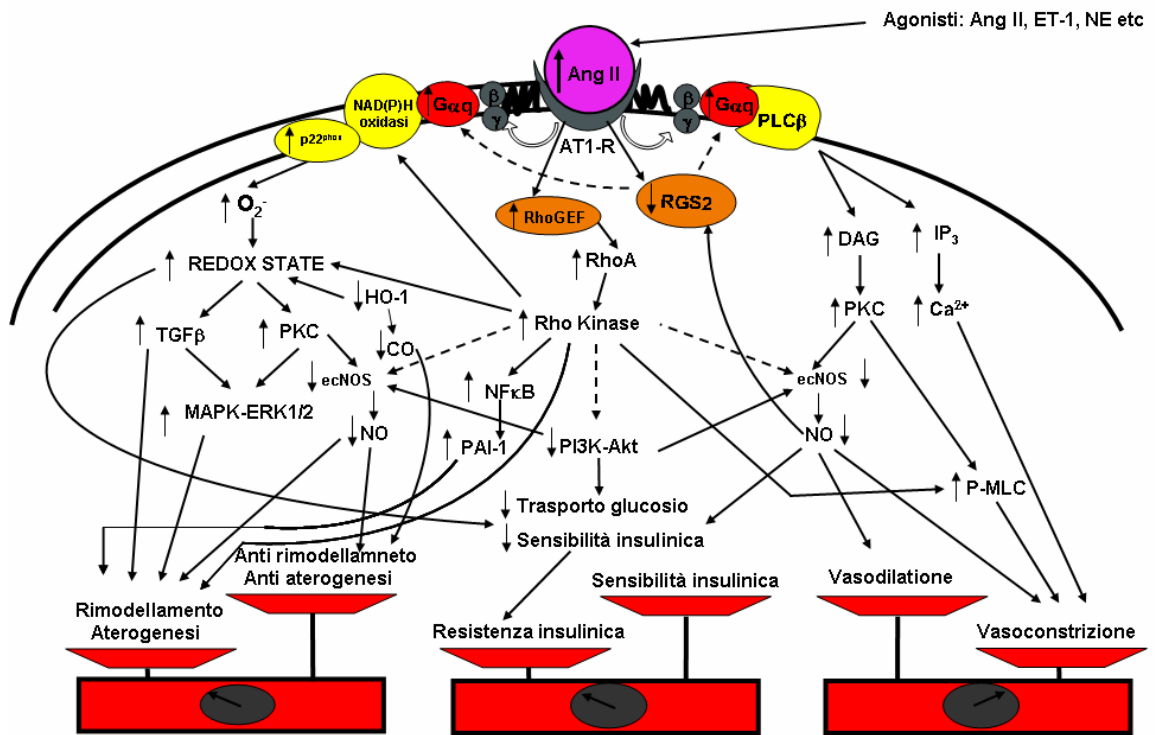
L'ACE, oltre a scindere l'Ang I in Ang II, ha un'altra importante funzione, degrada cioè la bradichinina in frammenti inattivi. La bradichinina deriva dal chimosinogeno attraverso l'azione della callicreina e ha un ruolo opposto a quello dell'Ang II in quanto produce vasodilatazione attraverso la produzione di prostaglandine e di monossido d'azoto (NO) e inibisce la proliferazione della muscolatura liscia vasale (Fleming, 2006).

Recentemente si è attribuito all'angiotensina II, oltre alla funzione emodinamica, anche un'azione di fattore di crescita e proprietà citochiniche (Skultetyova et al, 2007). A livello cellulare l'Ang II modula la contrazione, la crescita cellulare, la differenziazione e l'apoptosi; può favorire la produzione di altre citochine, l'espressione di molecole di adesione e il conseguente richiamo di cellule di infiammazione, la chemiotassi, l'attivazione dei macrofagi, la crescita dei fibroblasti e la sintesi delle proteine della matrice extracellulare attivando il processo di rimodellamento tissutale. Presenta quindi azione proinfiammatoria e stimola la produzione di numerosi fattori di crescita come PDGF, PDGFR, recettori per l'insulina e vasocostrittori come ET-1 (Skultetyova et al, 2007). Media inoltre il rilascio dell'aldosterone, è implicata nella produzione di specie reattive all'ossigeno (ROS) e interagisce con il sistema dell'ossido nitrico. Altri enzimi, oltre all'ACE, prendono parte alla trasformazione della Angiotensina I in Angiotensina II; fra questi la più importante via ACE indipendente è la via della chimasi presente nel cuore e negli estratti di tessuti vascolari dove questo enzima è responsabile per l'80% della produzione di Ang II (Hirakata et al, 1990).

2.1. Signaling dell'Angiotensina II via recettore AT1

L'Ang II esplica le sue azioni di regolazione delle funzioni e della struttura vascolare, attraverso il legame a due distinti recettori legati alla membrana cellulare, i recettori AT1 (AT1R) e i recettori AT2 (AT2R)(Swärd et al, 2003). L'AT1R appartiene alla superfamiglia di recettore con 7 domini transmembrana accoppiati a proteina G con un classico sistema di secondi messaggeri che mediano un signalling a breve

termine che comprende i ben noti effetti emodinamici ed endocrini mediati da Ang II e uno a lungo termine cioè i processi di rimodellamento cardiovascolare essenzialmente attuati attraverso la modulazione dello stato ossidativo della cellula.



Calò LA and Pessina AC, *J Hypertens* 2007

Figura 2.2 Schema del signalling intracellulare dell'angiotensina II mediato dal recettore AT1 in un soggetto iperteso dove sia il segnale a breve termine che quello a lungo termine sono attivati comportando rispettivamente vasocostrizione e rimodellamento cardiovascolare; inoltre è attivata la via della RhoA/RhoKinasi che si inserisce anche nel segnale del metabolismo del glucosio comportando nell'iperteso resistenza insulinica.

Il signalling a breve termine coinvolge proteine G eterotrimeriche che attivano la fosfolipasi C (PLC), che media la maggior parte dei noti effetti emodinamici ed endocrini dell'ormone tra cui la contrazione della muscolatura liscia vasale. In particolare la stimolazione dell'Ang II attiva due proteine G facenti parte della famiglia delle Gq, la Gq e la G₁₁, importanti per l'aumento della concentrazione del Ca²⁺ intracellulare. Solo la subunità α della proteina Gq trasduce il segnale alla PLC_β per generare inositolo trifosfato (IP₃) e diacil glicerolo (DAG) (Mironneau et al, 1995). L'IP₃ è un importante stimolatore di rilascio del Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico (Berridge et al, 1993; Davis et al, 1999); è generato dall'idrolisi enzimatica dei fosfolipidi di membrana contenenti inositolo. La reazione è catalizzata appunto dalla

PLC β . La produzione dell'IP3 è accompagnata dalla produzione di DAG, un attivatore della protein-chinasi-C (PKC). L'IP3 stimola il rilascio di calcio dai depositi intracellulari (Davis et al, 1999; Somlyo et al, 1985), mentre il DAG rimane nella membrana, dove attiva la PKC. La PKC attiva la contrazione della muscolatura liscia vasale intervenendo in più meccanismi, tra i quali l'alterazione della sensibilità al calcio intracellulare.

Questi processi sono controbilanciati dall'attività vasodilatatoria e antiproliferativa del sistema del monossido d'azoto (NO). L'NO è prodotto attraverso la NO sintetasi costitutiva endoteliale (ecNOs) che catalizza la conversione di L-arginina in L-citrullina (Palmer et al, 1988). Questo enzima lega la calmodulina in modo calcio dipendente e può essere attivata da stimoli che aumentano la concentrazione del calcio libero intracellulare (Marsden et al, 1993). L'NO diffonde nella muscolatura liscia vasale dove riduce il tono vascolare attraverso il suo effetto sul Ca²⁺ intracellulare. Il monossido d'azoto, infatti, attiva la Guanilato ciclasi che produce cGMP che attraverso l'attivazione della G-kinasi riduce la produzione di IP3, attiva l'estrusione del Ca²⁺ tramite pompe Ca²⁺-ATPasiche, defosforila la chinasi della catena leggera della miosina, riduce i livelli di calcio e porta quindi ad una vasodilatazione (Clementi, 1998; Moncada et al, 2002).

D'altro canto, gli effetti cellulari mediati dal segnale a lungo termine dell'Ang II causano rimodellamento cardiovascolare, aterosclerosi e danni cardiaci, modulati dallo stato ossidativo cellulare (Wilcox et al, 2002; Touyz, 2000; Dzau et al, 2001). L'Ang II aumenta infatti lo stress ossidativo via attivazione della NADH/NAPDH ossidasi, la fonte maggiore di O₂⁻, che comporta conseguentemente un aumento di questa specie reattiva all'ossigeno (Griendling et al, 2000). L'attivazione della p22^{phox}, una subunità di 22 KDa del citocromo b₅₅₈, inclusa nella NADH/NADPH ossidasi, svolge un ruolo chiave nella produzione dell' O₂⁻. Questi processi coinvolgono inoltre l'induzione di effettori correlati allo stress ossidativo come il transforming growth factor β (TGF β)(Nath et al, 1998) e la PKC che attiva a sua volta altre chinasi relative allo stress ossidativo come la mitogen-activated protein kinase (MAPKs) (Haurani et al, 2007), che comportano l'attivazione di segnali coinvolti nel rimodellamento cardiovascolare e nell'aterosclerosi.

Anche questo processo è controbilanciato dall'attività sia del sistema del NO che dell'heme oxygenase-1 (HO-1), che sono entrambi protettivi nei confronti dello stress ossidativo (Maines et al, 2000) e regolati da stimoli dipendenti e indipendenti dallo stato ossidativo (Immenschuh et al, 2000), alcuni dei quali portano a

vasodilatazione attraverso appunto l'induzione di HO-1 che comporta la produzione di monossido di carbonio (CO) che ha effetti vasodilatatori.

In aggiunta alle proteine eterotrimeriche, altre proteine G monomeriche di piccolo peso molecolare sono coinvolte nella traduzione del segnale dell'Ang II e nel controllo del tono vasale, come Ras, RhoA e Raf. Queste proteine sono attivate dal legame di GTP che permette a queste proteine di influenzare altre proteine effettrici (Ali et al, 1994). Possono indurre ad esempio la stimolazione di MAPKs e l'aumento della sensibilità al calcio intracellulare, direttamente o dopo stimolazione di agonisti (Force et al, 1998). Un ruolo particolare è rappresentato da RhoA, che insieme alla RhoKinasi, una serin/treonin chinasi stimolata dalla stessa RhoA, costituisce un sistema che svolge un ruolo importante nell'ipertensione e nel rimodellamento cardiovascolare (Fukata et al, 2001; Swärd et al, 2003). Questo sistema infatti modula lo stato di fosforilazione della catena leggera della miosina II, principalmente attraverso l'inibizione della miosina fosfatasi e inoltre contribuisce alla sensibilizzazione al calcio (Fukata et al, 2001; Swärd et al, 2003), contribuendo alla patogenesi dell'ipertensione e dell'arteriosclerosi (Fukata et al, 2001; Masumoto et al, 2001). L'attivazione della Rho Kinase è inoltre cruciale per l'induzione dell'espressione genica dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1 (PAI-1) (Takeda et al, 2001), un noto fattore profibrotico che è coinvolto nella citochinesi, nella migrazione cellulare e nell'invasione cellulare (Swärd et al, 2003). Queste caratteristiche suggeriscono che il sistema RhoA/RhoKinasi rappresenti un link tra il segnale a breve e quello a lungo termine dell'Ang II. C'è inoltre un possibile coinvolgimento della Rho kinasi nel metabolismo del glucosio con induzione di resistenza insulinica che caratterizza gli individui ipertesi. Questo sistema può inoltre essere stimolato anche da specie reattive all'ossigeno (Jin et al, 2004).

Il segnale di traduzione delle proteine accoppiate a proteina G sono regolate da proteine (RGS) che agiscono da attivatori GTPasici per la subunità Ga e inoltre possono competere con il legame di effettori come la PLC (Force et al, 1998; Hollinger et al, 2002; Zhong et al, 2001). In particolare il ruolo di RGS-2, che regola il segnale mediato da Ang II, ha un'importanza cruciale; infatti è stato osservato che topi Knockout per questo enzima presentano ipertensione (Heximer et al, 2003) ed un malfunzionamento di questa proteina può contribuire a causare o mantenere l'ipertensione essenziale (Nath et al, 1998).

2.2. *Signaling dell'Angiotensina II via recettore AT2*

Il recettore dell'angiotensina II AT2 scoperto più recentemente, nel 1993 (Kambayashi et al, 1993), (AT2R) è, come l'AT1R, un recettore a 7 domini transmembrana accoppiato a proteina G con 34% di omologia con la sequenza aminoacidica di AT1R. L'Ang II con meno affinità si lega con AT2 il cui signalling è ancora sotto studio, ma da evidenze recenti si ipotizza che i segnali mediati da questo recettore controbilancino gli effetti mediati dal recettore AT1; sono infatti implicati nell'antiproliferazione, nella differenziazione cellulare, nei segnali antiapoptotici, nella rigenerazione neuronale; possono indurre vasodilatazione e inibire il segnale implicato nel processo infiammatorio ed hanno quindi un ruolo omeostatico di controbilanciare un eccesso di stimolazione di AT1 (De Gasparo et al, 2000; Volpe et al, 2003; Stoll et al, 2001; Zhou et al, 2001; Yamamoto et al, 2008).

L'effetto vasodilatante mediato dai recettori AT2 è stato descritto (Tsutsumi et al, 1999; Carey et al, 2001; Carey et al, 2000) ed è stato dimostrato "in vitro" che è mediato dal sistema bradichinina/NO/cGMP, ma il più importante segnale del recettore AT2 coinvolge l'attivazione di differenti fosfatasi (Tsuzuki et al, 1996) che giocano un ruolo fondamentale nel prevenire o bloccare, la crescita cellulare. Si è osservato infatti che l'AT2 inattiva la extracellular regulated kinase (ERK1/2) in differenti tipi cellulari. Questa inibizione è mediata attraverso l'attivazione di fosfatasi come la protein phosphatase 2A (PP2A), la mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) (Tsuzuki et al, 1996; Yamada et al, 1996) e la SH2 domain-containing phosphatase (SHP-1) (Hiroi et al, 2001). Poiché NO è il principale fattore antiaterogeno della parete vascolare e la ERK1/2 l'ultimo effettore della via della MAPK che è il meccanismo a capo del rimodellamento, la stimolazione dei recettori AT2 risulta di primaria importanza sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Il blocco dei recettori AT1 con bloccanti specifici fa infatti aumentare notevolmente la concentrazione plasmatica di Ang II che si rende così disponibile per lo stimolo dei recettori AT2 e questa azione potrebbe contribuire alla loro attività antiipertensiva. Un aumento dell'espressione di AT2R si verifica in corso di blocco dei recettori AT1 (Cosentino et al, 2005) ed il blocco di AT1 può smascherare la potenziale attività vasodilatante di AT2. Recentemente, infatti, Casentino e Coll (Cosentino et al, 2005) hanno dimostrato in vitro in ratti ipertesi una risposta vasodilatante mediata da AT2 smascherata appunto dal blocco dei recettori AT1 con losartan, bloccante del recettore AT1. L'attivazione del sistema NO/cGMP mediato dalla stimolazione di AT2 è responsabile dell'inibizione del sistema RhoA/RhoKinas e dell'attivazione di protein chinasi cGMP dipendenti regolando la fosforilazione della catena leggera della miosina ed inducendo così la vasodilatazione

in condizioni associate ad attivazione dei recettori AT2 come quelle che si verificano in corso di blocco cronico di AT1 (Sauzeau et al, 2000; Gudi et al, 2002).

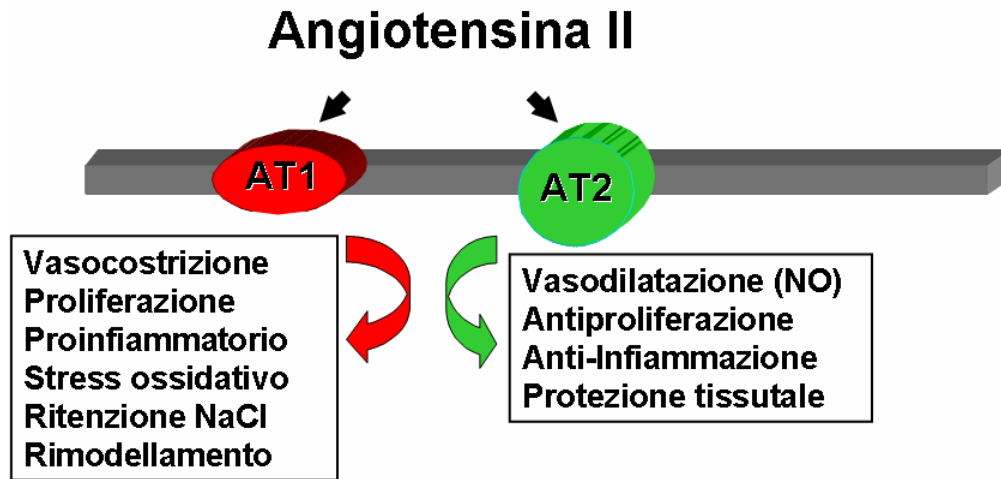


Figura 2.3 Confronto degli effetti mediati dall'Angiotensina II dal recettore AT1 rispetto al recettore At2.

2.3. Ipertensione e Infiammazione

Recentemente è stato attribuito un ruolo fondamentale all'infiammazione nella fisiopatologia dell'ipertensione e delle sue complicanze a lungo termine come l'arteriosclerosi; questo fatto è evidenziato dalla sovraespressione ed aumentata produzione di mediatori infiammatori associati allo sviluppo ed alla progressione di queste patologie dato che un aumento delle loro concentrazioni plasmatiche è predittivo del verificarsi della patologia (Calò et al, 2007; Hansson, 2005; Pauletto et al, 2006).

I markers infiammatori in questione includono citochine come molecole di adesione intercellulari (ICAM) e molecole di adesione cellulare vascolare (VCAM), proteine chemotattiche come MCP-1, i fattori di trascrizione intracellulare come l'NF-κB, fattori di crescita, interleuchine, integrine e selectine, alcuni dei quali sono risultati essere correlati con il segnale indotto da Ang II via recettore AT1 (Savoia et al, 2007; Savoia et al, 2006; Das et al, 2005; Karin et al, 2000). Al fine di determinare il coinvolgimento e il ruolo critico giocato dall'infiammazione e dall'Ang II nella patogenesi di un ampio spettro di patologie cardiovascolari e renali, è stata largamente studiata la relazione tra infiammazione e Ang II. Infatti, l'incremento locale o tissutale della formazione di Ang II in organi target induce infiammazione (Indurtti et al, 2005; Griendling et al, 2003; Touyz, 2003) e l'Ang II è essa stessa una

potente citochina proinfiammatorie e un fattore di crescita. Ci sono inoltre evidenze che dimostrano che l'Ang II attiva NF- κ b (Indurtti et al, 2005; Griendling et al, 2003; Touyz, 2003), il fattore chiave della trascrizione nucleare nelle patologie infiammatorie e fibrotiche e la sua attivazione permette di trascrivere numerosi geni infiammatori, incluso l'interleuchina 6 (IL-6), TNF- α e TGF- β (Tham et al, 2002; Ruiz-Ortega et al, 2002). In aggiunta l'Ang II attiva la NADPH ossidasi (Lassegue et al, 2004) che aumenta le specie reattive all'ossigeno inducendo lo stress ossidativo, strettamente correlato all'induzione di uno stato infiammatorio (Griendling et al, 2003; Touyz, 2003; Nathan, 2002; Himmelfarb, 2004). L'Ang II inoltre stimola la produzione di PAI-1 (Vaughan et al, 1995) che contribuisce allo stato protrombotico e alla formazione del palque aterosclerotico.

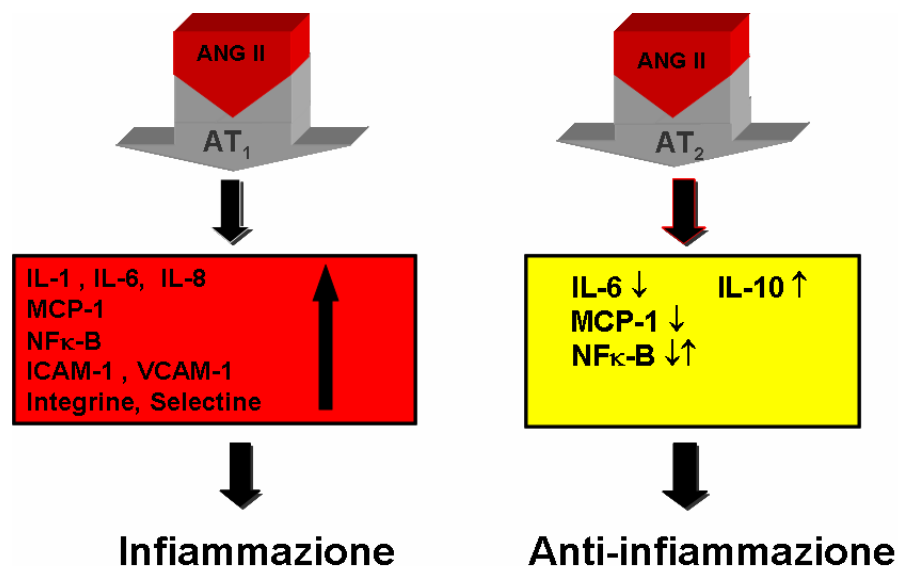


Figura 2.4 Segnali mediati dal recettore AT1 e dal recettore AT2 inerente al processo infiammatorio.

L'attivazione dei recettori AT2 invece induce una diminuzione di fattori proinfiammatori, determinando quindi minori livelli plasmatici di IL-6, di MCP-1 e di NF κ B e un aumento di produzione dell'IL-10, citochina antinfiammatoria (Suzuki et al, 2003).

Tali dimostrazioni hanno fatto ipotizzare che l'utilizzo dei bloccanti dei recettori AT1 dell'Ang II, favorendo il legame dell'ANG II ai recettori AT2, abbia anche un effetto antinfiammatorio e positivo nei confronti del rimodellamento cardiovascolare e dell'aterogenesi (Carmine et al, 2007), ma i meccanismi intracellulari attraverso i quali si esplica questa azione sono ancora da chiarire. Alcuni fattori legano direttamente l'infiammazione e il segnale dell'Ang II.

2.3.1. I κ B, subunità inibitoria di NF- κ B

Nei processi biologici coinvolti nell'infiammazione, un ruolo di risalto è costituito dall'attivazione della NF- κ B.

Esso controlla l'espressione di geni coinvolti in molte risposte fisiologiche critiche, come l'adesione cellulare, la differenziazione cellulare, l'apoptosi e soprattutto la risposta infiammatoria immunitaria e di fase acuta, ma anche la risposta acuta allo stress ossidativo (Bowie et al, 2000; Ghosh et al, 1998; Pahl, 1999).

Nella maggior parte dei tipi cellulari, NF- κ B è presente nel citoplasma in una forma inattiva mediante l'associazione con una o più proteine di I κ B inibitrici (I κ B α , - β , - γ , - δ , - ϵ , - ζ , p105, P100 e BCL-3) (Whiteside et al, 1997). La stimolazione con citochine proinfiammatorie come l'Ang II determina l'attivazione della chinasi multisubunità, IKK, che fosforila I κ B esponendolo al legame con il complesso proteosomico che lo degrada. I dimeri di NF- κ B sono così liberi di traslocare nel nucleo e attivare la trascrizione di alcuni (Czyz, 2005).

La sua attivazione ad esempio dà il via alla trascrizione di IL-6, TNF α , TGF β , ICAM, VCAM e MCP1 (De Winther et al, 2005), geni coinvolti nell'infiammazione locale e sistemica, quindi NF- κ B svolge un ruolo centrale in patologie cardiovascolari e nel rimodellamento.

La fosforilazione e la degradazione di I κ B hanno ricevuto grande attenzione, in quanto rappresenta la fase principale per la regolazione del complesso NF- κ B (Karin et al, 1999). L'attività della I κ B chinasi (IKK) risiede in un complesso ad alto peso molecolare, contenente almeno due subunità chinasi, IKK α e IKK β , e un modulatore (chiamato IKK γ , NEMO, o IKKAP). In determinate condizioni, una quarta molecola, chiamata IKAP, è stata trovata associata con il complesso IKK, ma la sua funzione non è nota. Dopo la stimolazione della cellula da parte di agenti come il tumor necrosis factor α (TNF α) o l'interleuchina-1 (IL-1), o l'Ang II il complesso IKK è attivato da chinasi a monte attraverso la fosforilazione di specifici residui serinici nel dominio di attivazione di ciascuna subunità di IKK. Tra le possibili chinasi a monte citiamo NIK, RIP, e IRAK e soprattutto MEKK (Karin, 1999) che è una chinasi compresa nella via della MAPKs, attivata da Ang II e coinvolta anch'essa nel rimodellamento cardiovascolare attraverso l'attivazione di ERK1/2. Il complesso IKK attivato può quindi fosforilare I κ B su due residui di serina (Ser 32 e 36 nelle I κ B umane) critiche nel dominio N-terminale regolatorio. La fosforilazione di I κ B serve da segnale per la sua degradazione da parte del proteosoma 26S (Fuchs et al, 1999). In questo modo l'NF- κ B è libero di entrare nel nucleo.

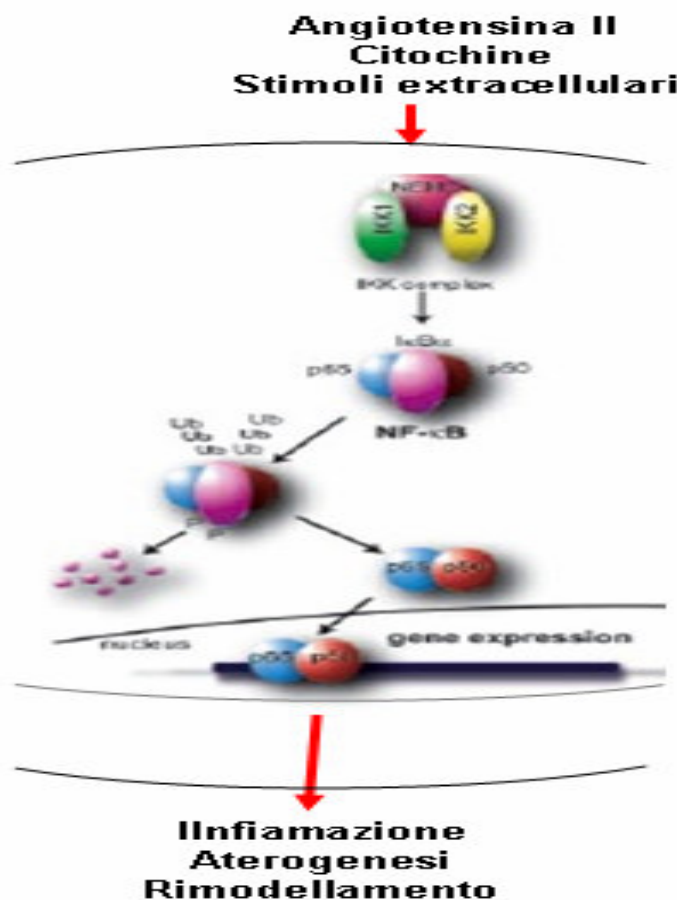


Figura 2.5 Regolazione dell'attivazione di NF-κB. Stimoli extracellulari quali l'Angiotensina II inducono fosforilazione di IKK che attiva un complesso proteosomico. Questo complesso degrada IκB e quindi permette ad NF-κB di traslocare dal citoplasma al nucleo.

La valutazione dei livelli di IκB ci può quindi dare informazioni sullo stato infiammatorio che caratterizza il modello che stiamo studiando, in quanto alti livelli di IκB possono indicare una sua mancata degradazione e quindi uno stato inattivato di NF-κB ed un'inibizione della trascrizione di fattori proinfiammatori ad esso direttamente correlato (Karin et al, 2000).

2.3.2. p66^{shc} e stress ossidativo

Nelle risposte correlate allo stress ossidativo e quindi allo stato infiammatorio ad esso correlato, un ruolo importante è stato recentemente attribuito alla proteina p66^{shc}. Infatti, topi knock-out per p66^{shc} mostrano resistenza allo stress ossidativo,

paragonati ai topi wild type (Migliaccio et al, 1999), mostrano anche una riduzione dell'ossidazione delle LDL plasmatiche e delle lesione aterogeniche precoci confermando p66^{shc} come potente induttore dei meccanismi sensibili all'ossidazione (Napoli et al, 2003). L'induzione di p66^{shc}, infatti, aumenta la disponibilità intracellulare di ROS che, di conseguenza, altera il grado di danno ossidativo. Inoltre, cellule knock-out per p66^{shc} mostrano una riduzione dell'apoptosi indotta dallo stress ossidativo, che viene ripristinata dalla sovraespressione di p66^{shc}.

Oltre ai siti di fosforilazione tirosinica, p66^{shc} contiene anche differenti siti di fosforilazione in serina/treonina. In particolare, il sito Ser36 è posizionato nel dominio unico CH2 di p66^{shc}. Studi recenti hanno dimostrato che la fosforilazione in Ser36 di p66^{shc} è responsabile della regolazione della produzione di specie reattive all'ossigeno intracellulari (Nemoto et al, 2002).

Differenti gruppi di ricerca hanno studiato il meccanismo d'azione tramite il quale p66^{shc} agisce come effettore di stress ossidativo.

I primi a spiegare l'azione pro-ossidante di p66^{shc} sono stati Nemoto e Finkel (Nemoto et al, 2002). Questi autori hanno dimostrato che la fosforilazione di p66^{shc} causa l'inattivazione di FOXO3a, un fattore trascrizionale che coinvolto nell'espressione di geni codificanti per enzimi antiossidanti (superossido dismutasi mitocondriale (MnSOD) e catalasi). Nei fibroblasti di topi wild-type, la stimolazione con insulina o perossido d'idrogeno porta ad un rapido e significativo aumento della fosforilazione di FOXO3a e quindi ad una sua traslocazione nel citoplasma con conseguente inattivazione della sua attività di fattore trascrizionale. Tale fosforilazione e conseguente inattivazione di FOXO3a non si osserva in topi knock-out per p66^{shc} in seguito a stimolazione con agenti pro-ossidanti. Pertanto, questi autori, attribuiscono l'azione pro-ossidante di p66^{shc} al fatto che questa proteina inducendo la riduzione della trascrizione di enzimi antiossidanti favorisce fortemente la progressione del danno indotto dalle specie reattive all'ossigeno (Fig.2.6).

Un'altra spiegazione del meccanismo d'azione di p66^{shc} è stata proposta da Giorgio e collaboratori (Giorgio et al, 2005). Questi autori hanno dimostrato che l'attività pro-apoptotica di p66^{shc} è dovuta al fatto che p66^{shc} ossida il citocromo C e genera perossido d'idrogeno a livello mitocondriale con conseguente apoptosi cellulare.

La fosforilazione in Ser36 di p66^{shc} è richiesta per conferire un aumento della suscettibilità allo stress ossidativo ed è stato visto che la PKC è responsabile di questa fosforilazione in risposta a ROS. In questo contesto, dato il suo ruolo nel segnale dello stress ossidativi, p66^{shc} partecipa alla patogenesi del rimodellamento vascolare associato ad ipertensione indotto da alterato equilibrio dello stato ossidativi ed infiammatorio (Trinei et al, 2002).

p66^{shc} è quindi una proteina adattatrice coinvolta nella risposta allo stress ossidativo in quanto è attivata da segnali di stress ossidativo ed è essa stessa produttrice di specie reattive all'ossigeno (ROS); inoltre media l'apoptosi partecipando così alla patogenesi delle malattie vascolari (Camici et al, 2007). Un collegamento diretto tra Ang II e p66^{shc} è già stato dimostrato dall'effetto protettivo che si osserva nei topi knock-out per questa proteina nei confronti di danno al miocardio indotto dall'Ang II stessa (Graiani et al, 2005).

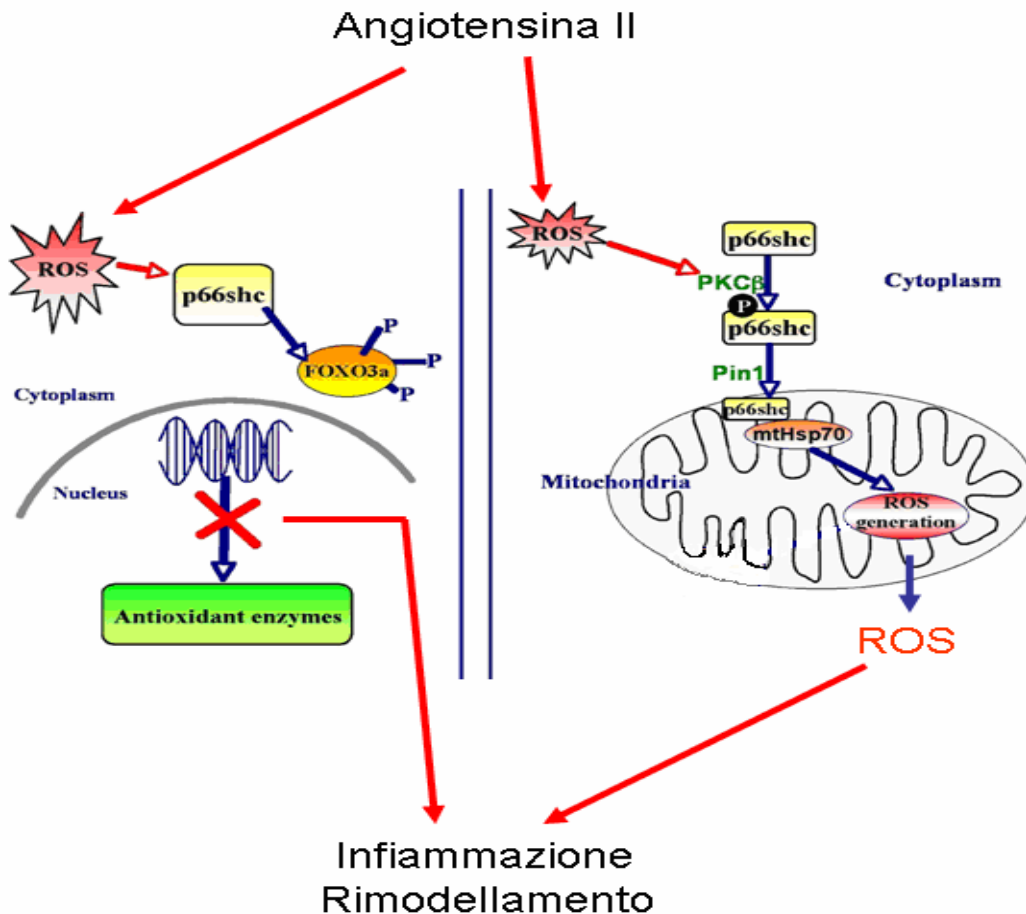


Figura 2.6 Possibile meccanismo d'azione di p66^{shc} indotto da Ang II. Figura a sinistra: l'induzione dell'attivazione di p66^{shc} da parte di stimoli ossidanti, induce la fosforilazione del fattore di trascrizione FOXO3A e la sua traslocazione a livello citoplasmatico impedendo, quindi, la produzione di enzimi antiossidanti (Remoto et al, 2002). Nella figura a destra: p66^{shc} trasloca dal citoplasma al mitocondrio in seguito a fosforilazione in Ser36 mediata dalla PKCβ. A livello del mitocondrio p66^{shc} esplica la sua azione di enzima ossidante disaccoppiando la catena di respirazione mitocondriale e determinando la produzione di acqua ossigenata (Pinton et al, 2007).

2.4. Ipertensione e Rimodellamento Cardiovascolare: la via della MAPK

Il segnale a lungo termine dell'Angiotensina II, lo stress ossidativo e lo stato infiammatorio correlato, sono dei meccanismi che intervengono direttamente nell'instaurarsi e nell'evolversi del processo di rimodellamento cardiovascolare, che sfocia poi in aterosclerosi e danno d'organo.

L'evento biochimico che interviene nel rimodellamento in genere è la via delle MAP Kinasi (Muslin, 2008).

Le MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) sono una famiglia di serin-treonin chinasi espresse in tutte le cellule eucariotiche, nelle quali svolgono un ruolo fondamentale in numerosi processi cellulari tra cui la proliferazione, il differenziamento, l'infiammazione, la risposta allo stress ossidativo, l'apoptosi e la trasformazione.

Le MAPK sono attivate per fosforilazione in seguito a diversi stimoli extracellulari (citochine, fattori di crescita, neurotrasmettitori o ormoni) o all'adattamento a condizioni di stress ambientale (irradiazione da raggi ultravioletti, shock termico, antiossidanti, inibitori di sintesi proteica o cambio della osmolarità di membrana (Robinson et al, 1997).

Le MAPK vengono rapidamente attivate attraverso una cascata enzimatica costituita da un modulo di tre chinasi sequenziali (Raman et al, 2007):

1. MKKK (MAP Kinase Kinase Kinase);
2. MKK (MAP Kinase Kinase) MEK;
3. MAPK.

Le MAPK più importanti sono:

- ERK (Extracellular Signal Regulated Protein Kinase) che, con le sue isoforme ERK1 e ERK2, è tra le proteine appartenenti alla famiglia delle MAPKinasi quella maggiormente coinvolta nel differenziamento e nella proliferazione cellulare. ERK1 e ERK2 sono proteine ubiquitariamente espresse, stimolate da fattori di crescita o agenti differenziativi e determinano l'attivazione di fattori di trascrizione e altre proteine chinasi;
- p38 e JNK/SAPK (Jun NH2-terminal e Kinase/Stress-Activated Protein Kinase), sono proteine presenti in diversi tipi cellulari e implicate nelle risposte a condizioni di stress ambientale, infiammazione e apoptosi. I membri di entrambe le famiglie sono attivate dai lipopolisaccaridi, citochine proinfiammatorie, TNF- α (Tumor Necrosis Factor), raggi ultravioletti e farmaci chemioterapici antitumorali.

Tali vie di traduzione del segnale regolano molte attività biologiche, come la proliferazione cellulare, la differenziazione, la progressione e la sopravvivenza del ciclo cellulare.

Il segnale intracellulare dell'Angiotensina II si lega alla via della MAPK in quanto attraverso il legame con il suo recettore AT1 va ad attivare per fosforilazione l'extracellular signal regulated Kinase (ERK1/2). È stato infatti dimostrato in vivo nel topo che la somministrazione acuta di Ang II stimola l'attivazione cardiovascolare e renale di MAPK (Wu et al, 2004; Lyall et al, 1992; Hamaguchi et al, 1998).

2.4.1. Extracellular Regulated Kinase

Tra le vie di MAPK, quella più descritta nei mammiferi è quella che coinvolge le chinasi ERK1/2 (Extracellular Signal Regulated Protein Kinase). Queste chinasi sono importanti in fenomeni di crescita e differenziamento cellulare, in diversi tipi cellulari. Le due isoforme ERK2 e ERK1, che chiameremo collettivamente ERK, hanno peso molecolare rispettivamente di 42kDa e 44kDa, e si attivano in seguito a diversi stimoli che convergono su proteine G, come Ras. L'attivazione del Ras dipende dal suo legame con il GTP. La presenza di Ras-GTP è sotto il controllo di due tipi di fattori: GEF (guanosine exchange factors) che catalizzano lo scambio del GDP per GTP su Ras, e quindi stimolano l'azione del Ras, e da fattori attivanti l'attività GTPasica di Ras (GAP) che stimolano la trasformazione del Ras-GTP in Ras-GDP, riducendo, così, l'attivazione di Ras. L'attivazione di Ras causa un'attivazione a cascata di varie chinasi, che inizia con la chinasi RAF, che a sua volta fosforila residui di serina o treonina della chinasi MEK1/2, una chinasi a doppia specificità, che fosforila sia residui di tirosina che di treonina di ERK1,2. L'attivazione di ERK1/2 da parte di MEK è straordinariamente specifica, essendo ERK l'unico substrato conosciuto di MEK (Thomas et al, 2004). La via di traduzione del segnale ERK-mediata promuove la sopravvivenza della cellula grazie a un duplice meccanismo che comprende la modifica post-translazionale e l'inattivazione di componenti della via dell'apoptosi programmata e l'aumento della trascrizione di geni implicati nella sopravvivenza cellulare.

L'extracellular regulated kinase (ERK1/2) è un potente target a valle del recettore AT1 che media fattori di trascrizione coinvolti nel rimodellamento cardiovascolare agendo sulla crescita, adesione, differenziazione e migrazione delle cellule vascolari e nella fibrosi traducendo il segnale dalla membrana al nucleo (Mehta et al, 2007; Papparella et al, 2005). Le specie reattive all'ossigeno sembrano svolgere un ruolo critico nel mediare questa attivazione. Una maggior responsività di questa proteina è già stata osservata in pazienti ipertesi in conseguenza ad un aumentato livello di stress ossidativo correlato ai ridotti livelli di RGS2 (regulator G-protein signalling-2), proteina regolatrice del segnale dell'Ang II (Semplicini et al, 2006).

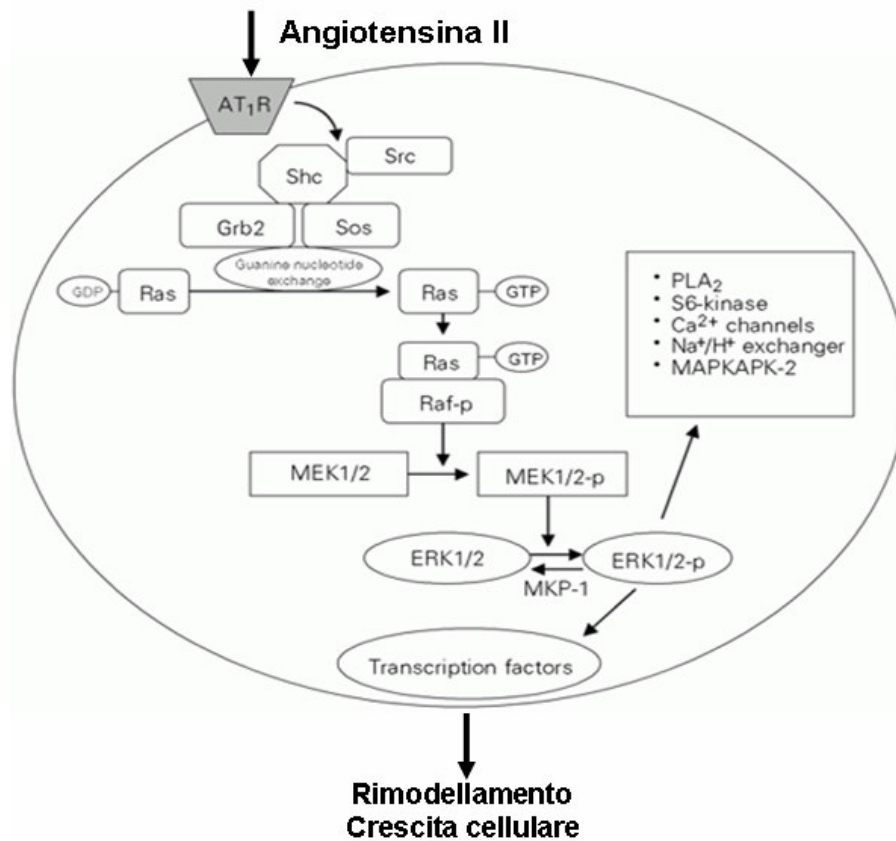


Figura 2.7 Signalling dell'Angiotensina II mediato dal recettore AT1.

2.4.2. Regolazione della via della MAPK: MKP-1

La durata e l'ampiezza dell'attivazione di questa proteina è regolata dalla densità e internalizzazione dei recettori di membrana, dall'associazione con una proteina scaffold, ma soprattutto dalla sua defosforilazione. Nei mammiferi le fosfatasi coinvolte nella defosforilazione e quindi disattivazione delle MAPK sono delle dual-specificity THR/TYR MAPK fosfatasi o MKPs. Le MKP sono una famiglia numerosa di fosfatasi con struttura comune, anche se ciascuna di esse può riconoscere e inattivare una sola classe di MAPK; ad esempio per l'inattivazione di ERK1/2 la fosfatasi coinvolta è la mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) (Tsuzuki et al, 1996; Yamada et al, 1996). La MKP-1, chiamata anche 3CH134 o CL100 PAC-1 e pVH1, è una dual specific fosfatasi che defosforila residui sia treoninici che tyrosinici di MAPKs e sembra che svolga un ruolo cruciale nel regolare la crescita e la differenziazione cellulare. Essa è fondamentale per la defosforilazione ed in attivazione delle MAPKs a livello di muscolatura liscia vasale in risposta all'Ang II. MKP-1 è espressa costitutivamente, ma la sua regolazione della trascrizione è mediata anche

dallo stress ossidativo, da citochine o fattori di crescita. Questi stimoli spesso determinano l'inattivazione di MAPK attraverso un meccanismo di feed-back negativo. Ad esempio, ERK1/2, dopo attivazione da Ang II via recettore AT1, può indurre direttamente la trascrizione del gene per la MKP-1 che defosforila e inattiva la MAPK, quindi la stessa ERK1/2 (Liu et al, 1995).

La trascrizione può anche essere indotta da fattori di stress o fattori di crescita e altri stimoli esterni oppure la sua attività può essere modulata dalla stabilizzazione della proteina stessa. MKP-1 può essere fosforilata da ERK1/2 che ne causa un prolungamento dell'emivita, senza però agire sull'attività intrinseca di fosfatasi; inoltre esiste una regolazione post-trascrizionale nella quale alcune proteine rendono l' mRNA di MKP-1 più stabile e quindi maggiormente disponibile per la trascrizione (XianXi et al, 2007).

2.4.3. MKP-1 e recettore AT2

Recentemente è stato dimostrato che non solo l'attivazione di ERK1/2 via AT1 attiva un sistema di inibizione di questa stessa via con sistema a feed-back negativo, attivando essa stessa la trascrizione di MKP-1 (Liu et al, 1995), ma sembrerebbe che attraverso un signaling alternativo l'Ang II riesca a stimolare la trascrizione di MKP-1 attraverso il suo recettore AT2. Questa dimostrazione è l'ennesima conferma all'ipotesi che l'azione principale che svolge l'Ang II via recettore AT2 è quella di controbilanciare gli effetti mediati dal recettore AT1 (Fischer et al, 1998). E' stato infatti dimostrato, sia in vitro in differenti tipi cellulari che in vivo, che al recettore AT2 sono associate 3 fosfatasi che interferiscono con la via delle MAPKs: la PP2A (protein fosfatasi 2A), la SHP-1 SH2 domain-containing phosphatase e la principale MKP-1 che agisce direttamente sulla fosforilazione della ERK1/2 citosolica, cioè regola negativamente la cascata della MAPK (Hiroi et al, 2001; Fischer et al, 1998).

In cellule PC12W (Yamada et al, 1996; Horiuchi et al, 1997) e R3T3 cellule (Yamada et al, 1996), per esempio, il pretrattamento di oligonucleotidi antisenso per la mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) ha inibito l'effetto proapoptotico mediato dalla AT2R. Inoltre, nelle cellule della muscolatura liscia vascolare del ratto (VSMC), si è osservato che l'Ang II stimola l'espressione di mRNA e sintesi delle proteine di PTPase con attività selettiva per MAP chinasi (Duff et al, 1993). Un simile aumento dei livelli di mRNA di MKP-1, a seguito di attivazione di AT2R, è stata anche riportata in miociti ventricolari di ratti adulti (Fischer et al, 1998).

In accordo con questi risultati, la sovraespressione di AT2R in VSMC (Nakajima et al, 1995) ha dimostrato una inibizione della attività della MAPKs (extracellular

regulated kinase ERK1/2) mediata dai recettori AT1, che presumibilmente coinvolge l'attivazione di una particolare MKP-1. Questi risultati suggeriscono, quindi, che MKP-1 è la fosfatasi maggiormente coinvolta nella trasduzione del segnale via recettore AT2.

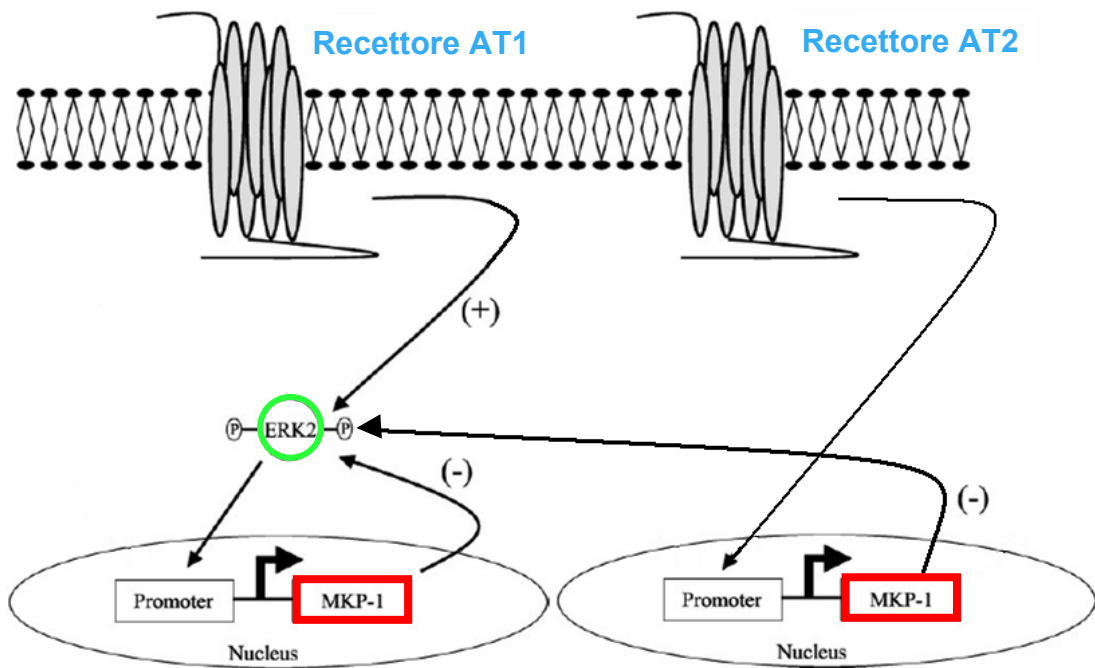


Figura 2.8 Attivazione della trascrizione della MKP-1 attraverso lo stimolo di Angiotensina II mediato dai recettori AT1 e AT2. Via recettore AT1. L'Ang II permette l'attivazione delle ERK1/2, le quali, con un meccanismo a feed-back negativo, promuovono la trascrizione di MKP-1 che defosforila la stessa ERK1/2. Via recettore AT2, l'Ang II l'attiva la trascrizione di MKP-1 attraverso un meccanismo non chiarito, ma che non coinvolge l'attivazione di ERK1/2, avendo comunque come effetto finale, la defosforilazione di questa proteina.

3. Sistema ACE2/Ang 1-7/Mas

Le nuove informazioni che si stanno ottenendo sulle vie secondarie che interessano il RAS e che ne determinano poi variazioni, ci aiutano a comprenderne il funzionamento ed eventuali anomalie che non riusciamo a spiegare con la via classica.

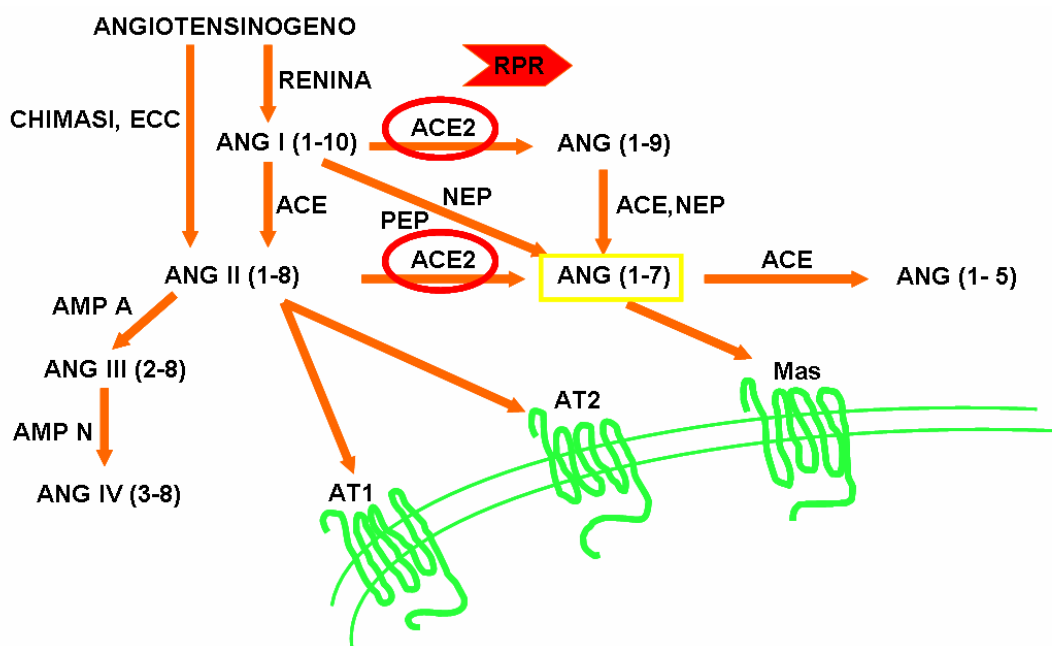


Figura 3.1 Sistemi renina-angiotensina che comprende le ultime dimostrazioni concernenti recettori e peptidi secondari all'Ang II. In particolare svolgono un ruolo fondamentale l'enzima ACE2 nella produzione del peptide Ang 1-7 e il recettore Mas che controbilancia il segnale mediato da Ang II vie recettore AT1.

Sono stati infatti recentemente identificate molti nuovi componenti del RAS come l'Ang III che è prodotta da Ang II grazie ad idrolisi da parte della AMINOPEPTIDASI A che a sua volta può essere metabolizzata in Ang IV da AMINOPEPTIDASE N. Il primo metabolita, Ang III rimane un peptide attivo che ha affinità molto simile all'Ang II per AT1 e AT2, e soprattutto nel sistema nervoso centrale gioca un ruolo nell'ipertensione (Song et al, 1999) quindi è un vasocostrittore attivo il 25% rispetto all'Ang II, inoltre aumenta l'espressione di fattori di crescita come TGF- β e di proteina della matrice extracellulare come la fibronectina con intervento quindi nel rimodellamento e nell'aterosclerosi. L'Ang IV sembra essere invece un peptide vasorilassante per la sua capacità di attivare l'enzima eNOs, con conseguente aumento di NO, ma interviene

anche come agente proliferativo attraverso il legame con il recettore AT4 (Toda et al, 2007).

Il peptide Ang 1-9 è poco conosciuto, è espresso in concentrazione molto bassa, e legandosi in modo competitivo all'ACE, inibisce la produzione di Ang II da Ang I e aumenta l'azione della bradikina, che non venendo degradata da ACE, può legarsi al suo recettore β_2 , aumentando quindi la concentrazione di NO, con i suoi conseguenti effetti vasodilatatori; inoltre interviene nella regolazione delle piastrine (Kramkowski et al, 2006).

Uno dei peptici più interessanti è ANG 1-7 che per lungo tempo è stato considerato un peptide inattivo, ma che recentemente è considerato un membro biologicamente attivo del RAS che agisce in modo opposto rispetto all'Ang II (Atlas, 2007). L'Ang 1-7 può formarsi direttamente dall'Ang I in modo ACE indipendente, attraverso l'azione di endopeptidasi; inoltre l'Ang 1-7 può essere prodotta anche da Ang 1-9 grazie all'azione di ACE.

A sua volta poi l'Ang 1-7 viene degradata dall'ACE in un peptide non attivo, l'Ang 1-5. L'importanza che il peptide Ang 1-7 si è ricavato nel meccanismo regolatorio del RAS è avvalorato dalle recenti scoperte riguardanti l'enzima ACE2, omologo dell'ACE, che è il principale responsabile della formazione di questo peptide agendo su Ang II e il recettore Mas specifico per Ang 1-7 (Atlas, 2007).

Questo nuovo quadro del RAS ci presenta un meccanismo complesso con un numero maggiore di elementi che mediano azioni diverse che si controbilanciano: uno vasocostrittore/proliferativo nel quale il ruolo principale è dato da Ang II (asse ACE/Ang II/AT1) e uno vasodilatatore/antiproliferativo dove invece il maggior effetto è l'Ang 1-7 (asse ACE2/Ang 1-7/Mas) che in condizioni fisiologiche si equilibrano. Ogni variazione del sistema comporterà un riassetamento ad un nuovo equilibrio che riguarderà ogni elemento del RAS per il collegamento che esiste fra ognuno (Raz et al, 2007).

Questo controbilanciamento si può definire in termini di enzimi in quanto l'enzima ACE spinge verso la produzione di Ang II, mentre ACE2 verso una maggior concentrazione di Ang 1-7 partendo dallo stesso precursore Ang I o attraverso la degradazione/inattivazione di Ang II. Inoltre a sua volta ACE agisce su Ang 1-7 per neutralizzarlo a peptidi inattivi; ACE degrada la bradichinina, mentre ACE2 non agisce su questo substrato, anzi è una via di stimolo della stessa.

C'è poi un equilibrio tra peptidi ovvero Ang II contro Ang 1-7 perché mediano azioni opposte. E infine un equilibrio/bilanciamento in termini di recettori dove il recettore AT1 sotto stimolo di Ang II media azioni opposte al recettore AT2 attivato sempre da Ang II e soprattutto al recettore Mas sotto stimolo di Ang 1-7.

Questo bilanciato sistema mantiene l'equilibrio tra i due bracci del RAS in normotensione, ogni sbilanciamento risulterà in ipotensione o ipertensione e le complicazione ad esse collegate (Raz et al, 2007; Wysocki et al, 2000).

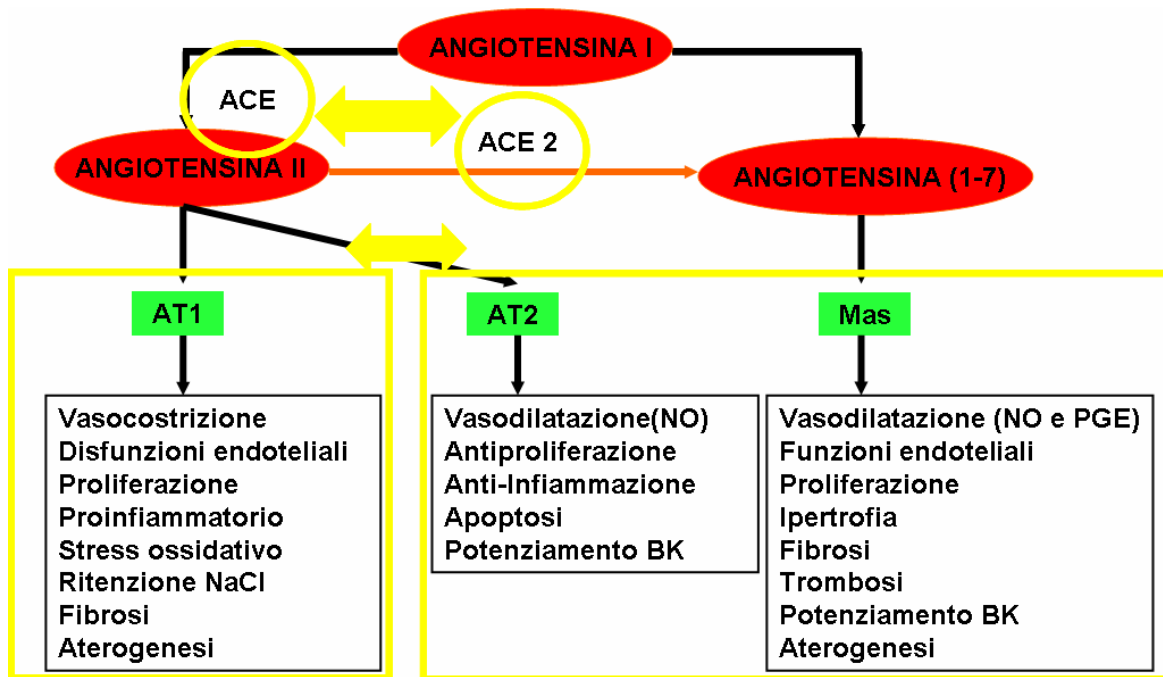


Figura 3.2 Bilanciamento dei due assi, ACE/Ang II/AT1 e ACE2/Ang 1-7/Mas più il segnale mediato da Ang II via recettore AT2, che regolano il sistema renina-angiotensina e gli effetti che essi mediano.

3.1. *Angiotensin Convertin Enzime 2*

L'Angiotensin Convertin Enzime 2 (ACE2) è l'enzima chiave della produzione di Ang 1-7 che media importanti azioni opposte all'Ang II.

Questo enzima è stato scoperto nel 2000 da due differenti gruppi di ricerca che simultaneamente e con tecniche diverse lo hanno clonato e individuato (Tipnis et al, 2000; Donoghue et al, 2000).

Come l'ACE, ACE2 è una metalloproteasi che pesa attorno ai 120 kDa, è costituito da 80 aa e ha 40% di omologia con ACE; è una glicoproteina integrale di membrana con sito catalitico nello spazio extracellulare che metabolizza i peptidi circolanti, ma a differenza dell'ACE, taglia un singolo residuo aminoacidico invece che

due (Santos et al, 2008). L'ACE2 abbiamo visto è in grado di agire sia sull'Ang I per formare Ang 1-9 grazie alla proteolisi di un aminoacido, ma anche e soprattutto su Ang II a formare Ang 1-7, 400 volte più attivo su questo substrato rispetto al primo (Lambert et al, 2007). L'ACE2 è in grado di agire anche su altri substrati, ma non la bradichinina come avviene per l'ACE e questo sottolinea ancora una volta l'azione controbilanciante rispetto alla via dell'Ang II via recettore AT1.

Può agire invece su des-ARG-Bradichinina, un membro del sistema kininogeno-kinino che lega B₁, recettore che media infiammazione, quindi l'ACE2 inibisce questo processo (Santos et al, 2008).

Altro importante substrato dell'ACE2 è l'apelin-13, peptide che causa vasocostrizione, perciò l'azione finale è di vasodilatazione.

Questo enzima è presente nei macrofagi, nelle cellule endoteliali e muscolari, nel sistema cardiovascolare, nei testicoli, nei reni e soprattutto nel cuore. Interessante è l'osservazione di un'aumentata espressione in alcune condizioni patologiche come l'ipertensione, dopo danno cardiaco o soprattutto dopo blocco del RAS con ACE inibitori e bloccanti del recettore AT1, le terapie maggiormente usate nell'ipertensione.

La rilevanza fisiopatologica dell'ACE2 è supportata dall'espressione alterata che si riscontra nelle disfunzioni cardiache, vascolari e renali (Zisman et al, 2003; Ishiyama et al, 2004; Tikellis et al, 2006), dai deleteri effetti della delezione del gene ACE2 nel sistema cardiovascolare e renale (Crackower et al, 2002; Oudit et al, 2006), come dagli aumenti plasmatici, renali e cardiaci dei livelli di Ang II osservati nei topi Knockout per ACE2 (Crackower et al, 2002). Insieme, questi dati, indicano che l'ACE2 gioca un ruolo di protezione d'organo associato all'ipertensione e alle patologie che da essa derivano (Ferreira et al, 2008). In aggiunta, ACE2 è localizzato nel tubulo distale e prossimale e nei glomeroli (Li et al, 2008; Ye et al, 2004; Ye et al, 2006) e sembra giocare un ruolo chiave nelle funzioni renali specialmente in condizioni patologiche e la delezione del gene ACE2 conduce allo sviluppo di glomerulosclerosi con deposito di collagene di tipo I e II e fibronectina ed aumento di albuminuria nel topo (Oudit et al, 2006). Inoltre, i livelli di ACE2 sono alterati nel rene di diabetici (Ye et al, 2004; Ye et al, 2006; Tikellis et al, 2003; Wysocki et al, 2006) e in altre patologie renali (Lely et al, 2004).

3.2. *Angiotensina 1-7*

Per lungo tempo l'Ang 1-7, scoperto negli anni '70, è stato considerato un peptide inattivo, fino all'esperimento di Schiavone nel 1988 che infuse l'Ang 1-7 nel cervello canino e osservò aumenti di vasopressina (Schiavone et al, 1988). Subito si pensò che fosse un agente vasocostrittore, ma negli anni successivi quando gli studi su questo peptide si sono intensificati, sono venute alla luce azioni che a tutti gli effetti sembrano controbilanciare quelli osservati per Ang II via recettore AT1.

Ang 1-7 viene prodotta direttamente dall'idrolisi dell'AngII mediante l'enzima ACE2 o indirettamente dall'Ang 1-9 che viene convertita in Ang 1-7 dall'ACE. A causa delle azioni opposte dell'Ang 1-7 e dell'Ang II, l'attività dell'ACE2 può determinare l'omeostasi della pressione sanguigna (Ferrario et al, 1997; Iyer et al, 1998; Santos et al, 2007), tanto che l'espressione genica (mRNA) e proteica di ACE2 sono marcatamente ridotti nei ratti ipertesi (Crackower et al, 2002).

Nel tessuto vascolare l'Ang 1-7 si forma dall'Ang I e dall'Ang II, in modo ACE2 dipendente. La sua azione vasodilatante è infatti endotelio dipendente. L'Ang 1-7 può stimolare la produzione di NO, di prostaglandine e di fattori vasorilassanti derivanti dall'endotelio in vivo (Katovich et al, 2008).

Nel 2006, Sampaio e i suoi colleghi osservarono le basi molecolari per il rilascio di NO Ang 1-7-dipendente grazie all'attivazione di eNOs via PI3K/Akt (Sampaio et al, 2006). L'azione vasodilatante di Ang 1-7 è dovuta anche al legame che si osserva con il segnale della bradikina (Carvalho et al, 2007) endotelio dipendente, azioni che infatti sono bloccate da antagonisti del recettore B2 della bradikina (Lopes et al 2004). L'Ang 1-7 potenzia infatti gli effetti vasodilatatori di bradikina in molte specie (Fernandes et al, 2001; Maia et al, 2004).

Si è riscontrato anche un'effetto di riduzione della produzione di specie reattive all'ossigeno, e quindi un ruolo di controbilanciamento del segnale a lungo termine dell'Ang II; riduce infatti l'anione superossido prevenendo l'attivazione della NADPH ossidasi che è la sorgente maggiore di ROS promuovendo disfunzioni endoteliali, espressione di geni proinfiammatori e costituzione di matrice extracellulare (Benter et al, 2007; Polizio et al, 2007).

Sono stato osservati anche effetti antiproliferativi di Ang 1-7 nelle cellule muscolari lisce vasali dove il peptide (Tallant et al, 2003) inibisce la crescita vascolare con la produzione di prostaglandine mediante eventi intracellulari che includono produzione di cAMP e riduzione di stimolo di ERK1/2 indotto da Ang II. I maggiori effetti sono a livello cardiaco, dove l'Ang 1-7 presenta degli effetti cardioprotettivi (Mercuri et al, 2008), previene il rimodellamento diminuendo la ipertrofia e la fibrosi, e in cellule HUVEC è stato osservato un decremento di PAI-1 (Yoshida et al, 2002), mentre in

vivo si osserva un effetto antitrombotico, mediato da una minor aggregazione piastrinica (Kucharewicz et al, 2002).

Tra gli effetti mediati dalla produzione di No via Ang 1-7, è stata dimostrata una inibizione dell'angiogenesi in vivo, effetto bloccato da inibitori del recettore per Ang 1-7, a dimostrare il legame diretto (Machado et al, 2001).

Gli effetti antiinfiammatori sono dovuti alla diminuzione di produzione di ROS, ma anche all'inibizione di COX-2 Ang 1-7 mediata in cardiocellule (Albrecht, 2007) e all'attivazione di TGF β .

3.3. Mas, recettore dell'Angiotensina 1-7

Nel 2003 è stato scoperto il recettore Mas, codificato dall'oncogene mas1, e identificato come recettore specifico per Ang 1-7, dimostrato sperimentalmente in topi Knockout per Mas che non rispondono ad Ang 1-7 (Santos et al, 2003).

Mas è espresso nell'endotelio, nel cuore, nei testicoli, nei reni e nel cervello. Questo recettore è un recettore legato a proteina G, e sebbene il suo signaling non sia stato ancora completamente chiarito, l'utilizzo del suo bloccante A-779 ha reso possibile l'identificazione di un suo ruolo in alcune azioni dell' Ang 1-7.

E' stato osservato, ad esempio, una dipendenza dallo stimolo di questo recettore Mas da parte di Ang 1-7 nella produzione di NO nell'endotelio, attraverso PI3K/Akt che fosforila la eNOs attivandola (Sampaio et al, 2006). Un chiaro legame tra Mas e il rilascio di NO è stato per la prima volta descritto da Pinheiro et al (2004) che osservarono che sia Ang 1-7 che l'agonista AVE 0991 del Mas, determinavano un aumento di concentrazione di NO in cellule CHO trasfettate con il recettore Mas. Questo effetto è bloccato dall'antagonista A-779 del Mas, ma non dagli antagonisti dei recettori AT1 e AT2 (Pinheiro et al, 2004). E' stato dimostrato che un'altra azione che dipende dal legame tra Ang 1-7 e il suo recettore Mas è quella di attivare la fosfolipasi-A2 che determina il rilascio dell'acido arachidonico con conseguente produzione di prostaglandine (Lopes et al, 2004).

L'azione antiproliferativa sembra, invece, essere derivante dall'inibizione della via della MAPKs, con conseguente minor fosforilazione di ERK1/2, come dimostrato in cardiomiociti di ratto, in cellule della muscolatura liscia vasale e in cellule tubulari (Tallant et al, 2005; Machado et al, 2000). Questo stesso effetto è stato dimostrato da cellule CHO e COS trasfettate con recettore Mas (Santos et al, 2003).

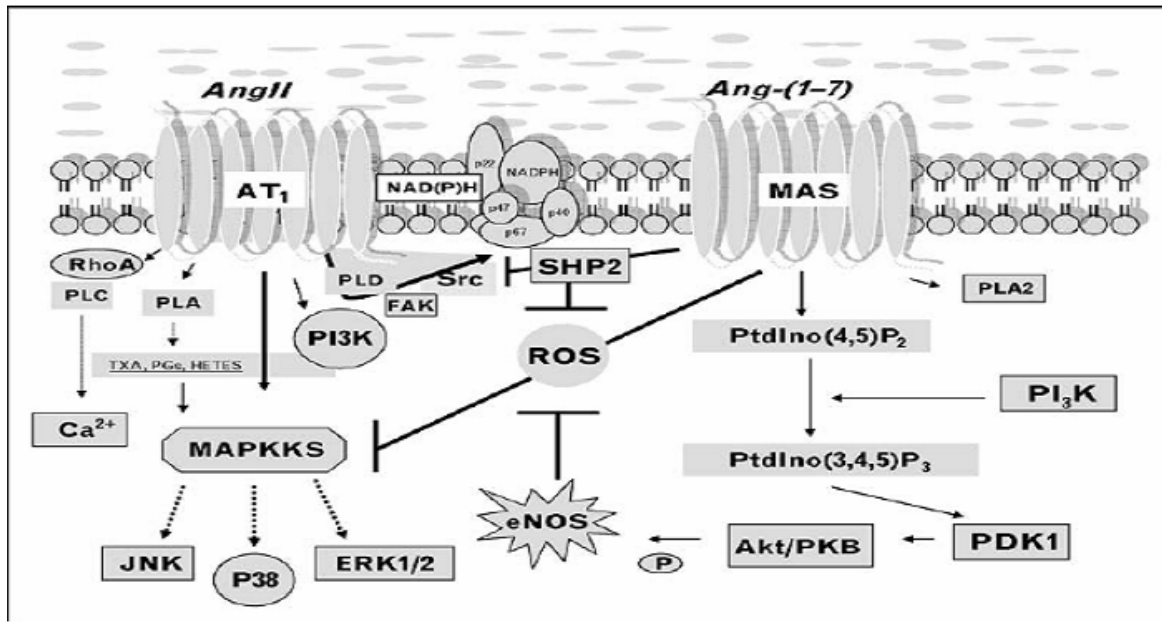


Figura 3.3 Signaling dell'Angiotensina 1-7 via recettore Mas finora conosciuto.

4. Le sindromi di Bartter e Gitelman

Le tubulopatie ereditarie sono delle patologie a base genetica che prevedono un danno sulla funzionalità del trasporto tubulare. Infatti l'espressione genica di alcune proteine come trasportatori o canali ionici è modificata con conseguente variazione di attività delle stesse. I disordini tubulari renali ereditari sono generalmente trasmessi come carattere autosomico o X-linked e possono essere di tipo dominante o recessivo.

La sindrome di Bartter e la sindrome di Gitelman sono appunto tubulopatie ereditarie caratterizzate da ipocalemia, normale o bassa pressione arteriosa, maggior escrezione urinaria di potassio e alcalosi metabolica ipocloremica, sintomi che si manifestano nell'infanzia in tempi diversi a seconda della sindrome (Maarten et al, 2004; Calò et al, 2005; Calò et al, 2006). Recentemente è stata dimostrata la presenza di mutazioni in sei geni corrispondenti ad altrettanti trasportatori e canali ionici responsabili di queste patologie che distinguono i vari tipi di sindromi.

La sindrome neonatale di Bartter o di tipo I è causata da mutazione di NKCC2 tradotto dal gene SLC12A1, un cotrasportatore di sodio, potassio e cloro espresso nella membrana cellule apicali nel tubulo ascendente dell'ansa di Henle (TAL) che fisiologicamente riassume il 30% di sodio (Kleta, 2006).

Nella sindrome classica di Bartter o di tipo 2 invece il difetto è localizzato nel canale del potassio voltaggio dipendente ROMK (causa è mutazione nel gene KCNJ1) localizzato sempre nella membrana della cellule apicali del TAL. Questo canale è anche espresso nel dotto collettore corticale (CCD) (Kleta, 2006; Watanabe et al, 2006). Nel TAL il flusso del potassio attraverso questo canale è necessario per l'attività del NKCC2; infatti se il ROMK non trasporta fuori dalla cellula il potassio, il cotrasportatore NKCC2 non ha la "pompa" per trasportare all'interno lo stesso potassio assieme al sodio e al cloro. Nella sindrome di Bartter di tipo III è causata invece da una mutazione a livello del gene CLCNKB che codifica per un canale del cloro, il ClC-Kb espresso nella membrana delle cellule basolaterali del TAL, nel tubulo convoluto distale, nel tubulo connettore e in altre parti. Questo canale gioca un ruolo nel transito del cloro attraverso la membrana basolaterale ed è responsabile del riassorbimento del sodio-cloro nel TAL (trasporta dalla cellula all'urina il cloro) perciò trovo un eccesso di cloro nelle urine e volume urinario maggiore (Kleta, 2006; Watanabe et al, 2006; Naesens et al, 2004).

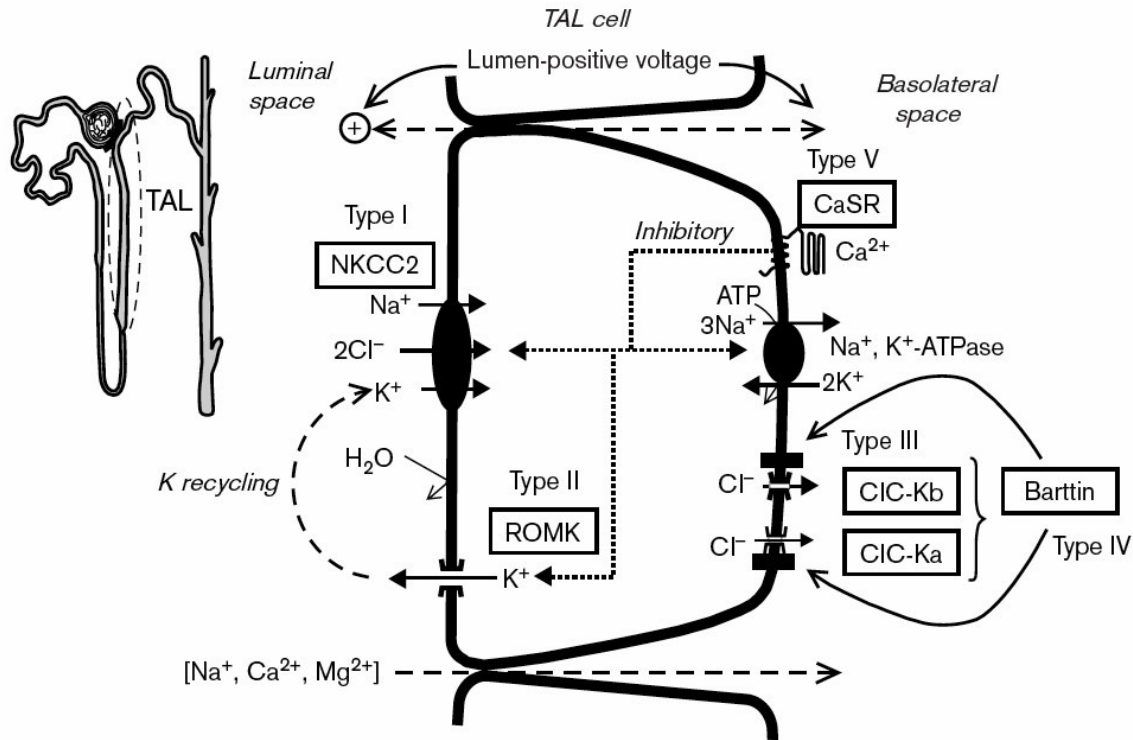


Figura 4.1 Schematizzazione delle 5 mutazioni riscontrate per la sindrome di Bartter e i relativi canali o proteine che subiscono una modificazione della attività.

Recentemente è stata evidenziata un'ulteriore mutazione nel gene *BSND* che identifica una diversa sindrome di Bartter, quella di tipo IV. Questo gene codifica per "barttin" che è una proteina espressa nella membrana basolateral del TAL e in altre zone come nella coclea. Questa proteina è una subunità-b del CIC-Kb che è necessaria per il delivery alla membrana plasmatici e per la sensibilità di questo canale (Naesens et al, 2004).

La sindrome di Gitelman invece è causata da una mutazione del gene *SLC12A3* che codifica per il cotrasportatore sodio-cloro renale sensibile alle tiazidi NCCT espresso nella membrana apicale del tubulo distale convoluto. Questo trasportatore è responsabile del riassorbimento del sodio nel tubulo distale (responsabile del 7% del filtrato totale di sodio) (Knoers et al, 2008; Naesens et al, 2004).

Anche molecole che inibiscono questi trasportatori possono causare questi tipi di sindromi.

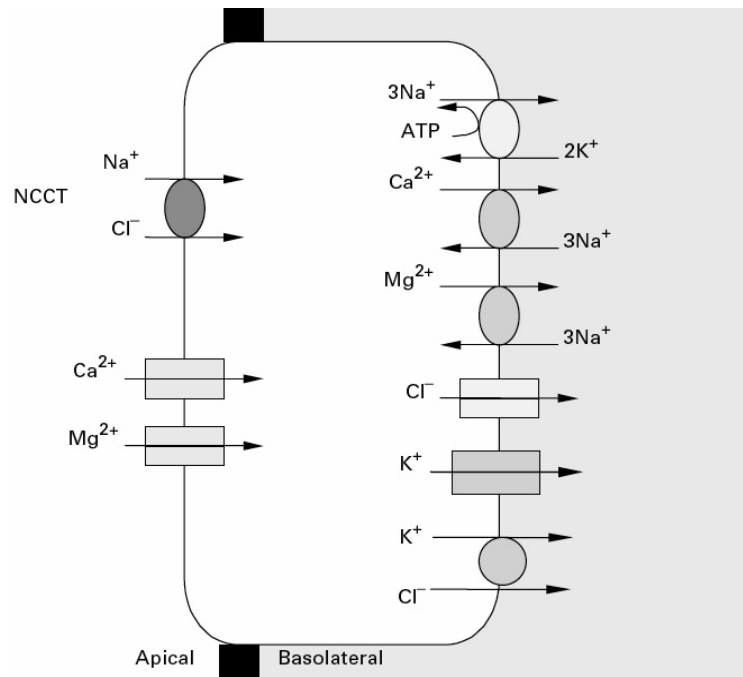


Figura 4.2 la Sindrome di Gitelman è causata dalla perdita di funzione del cotrasportatore del sodio-cloro NCCT.

Da poco è stata definita anche la sindrome di Bartter di tipo V dovuta ad una mutazione del CaSR (Calcio sensitive receptor della membrana basolaterale) che si attiva inibendo nel TAL il trasporto di cloro e sodio mediato dal ROMK (Naesens et al, 2004).

In questi pazienti si è riscontrata un'attivazione del RAS con aumento di livelli plasmatici di Ang II e alti livelli di aldosterone, condizioni cliniche tipiche dell'ipertensione arteriosa. Nonostante queste evidenze, gli individui affetti da questa patologia sono normo o ipotensi, presentano ridotte resistenze periferiche e iporesponsività agli agenti pressori.

SINDROME DI BARTTER	SINDROME DI GITELMAN
<p>Ipocalemia Alcalosi metabolica Attivazione del RAS Alti livelli di ANGI Alti livelli di Aldosterone Riduzione delle resistenze periferiche Normo-ipotensione</p>	<p>Ipocalemia Alcalosi metabolica Attivazione del RAS Alti livelli di ANGI Alti livelli di Aldosterone Riduzione delle resistenze periferiche Normo-ipotensione</p> <p>Ipocalciuria Ipomagnesemia Sintomi meno evidenti rispetto a Bs</p>

Figura 4.3 Caratteristiche cliniche delle Sindromi di Bartter e Gitelman.

4.1. Sindromi di Bartter e Gitelman e signaling dell'Angiotensina II

Le sindromi di Bartter e Gitelman hanno sempre attratto l'attenzione dei ricercatori per questa persistente normo-ipotensione nonostante la presenza di anomalie biochimiche e ormonali tipiche dell'ipertensione arteriosa. Capire infatti come questi pazienti non sviluppino ipertensione potrebbe fornire, e ha fornito per quanto riguarda il signalling dell'Ang II via recettore AT1, chiarimenti sulle basi cellulari dell'ipertensione arteriosa.

Negli studi effettuati dal nostro gruppo su questi pazienti, abbiamo osservato che il segnale a breve termine dell'Angiotensina II, quello che media molti degli effetti emodinamici ed endocrini conosciuti del peptide inclusa la vasocostrizione, è ridotto (Calò et al, 2003). Questo correla con le ridotte resistenze periferiche, l'iporattività vascolare e la normo-ipotensione tipica dei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman.

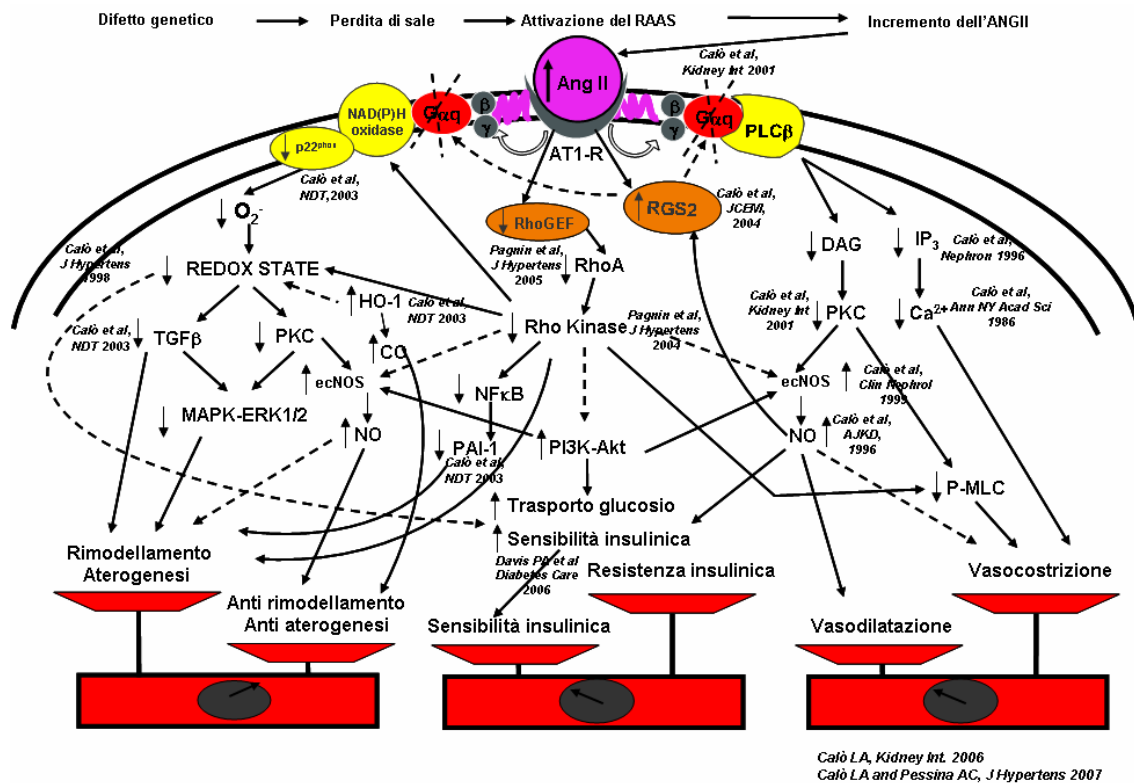


Figura 4.4 Schema del signalling intracellulare dell'angiotensina II mediato dal recettore AT1 in un soggetto affetto dalla sindrome di Bartter e Gitelman dove il segnale a breve e lungo termine, compresa l'attivazione della via della RhoA/RhoKinasi che si inserisce nel segnale del metabolismo del glucosio sono smorzati comportando in questi soggetti un segnale di antirimodellamento, sensibilità insulinica e vasodilatazione nonostante alti livelli di Ang II. Sono inoltre riportati tutti i riferimenti agli studi effettuati su questi pazienti che hanno contribuito a dare una spiegazione biologico-molecolare al segnale mediato dall'Ang II via recettore AT1 in questo modello.

In pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman, abbiamo infatti osservato nei neutrofili che la concentrazione di calcio intracellulare non si differenzia da quella di controlli sani normotesi (Di Virgilio et al, 1987). Visto che l'IP₃ è il più potente segnale per il rilascio del calcio intracellulare (Ciedel, 1984), abbiamo misurato i livelli dell'IP₃ in situazione basale e dopo stimolazione con agonista del recettore AT1 nei neutrofili di pazienti e abbiamo osservato che viene ridotto del 50% comparato ai soggetti di controllo (Calò et al, 1996). Il declino della produzione dell'IP₃ intracellulare suggerisce che il difetto della traduzione del segnale in questi pazienti sia localizzato ad alti livelli, appena successivamente al legame con il recettore. Questa ipotesi è stata supportata dall'osservazione che, oltre ai difetti del calcio e dell'IP₃, in questi pazienti è ridotta la reattività della PKC dopo stimolazione (Calò et al, 2001). Infatti, dopo il controllo di una normale densità ed affinità per il ligando dei recettori AT1 (Calò et al, 2008) e assenza di mutazioni nei recettori (Yoshida et al, 1994), l'attenzione è stata focalizzata sulla possibile presenza di anomalie a livello della

subunità α della Gq e della RGS2, proteina immediatamente a valle dell'accoppiamento dell'Ang II con il suo recettore. E' stato osservato infatti un aumento dell'espressione genica e proteica del regolatore del signaling della proteina G-2 (RGS-2) (Calò et al, 2004) e una diminuzione dell'espressione della subunità α della proteina Gq (Calò et al, 2001; Calò et al, 2002) che è responsabile della traduzione del messaggio cellulare dell'Ang II mediato dai recettori AT1.

Abbiamo anche dimostrato che nei pazienti con Sindrome di Bartter e di Gitelman il signaling a lungo termine dell'Ang II, che modula lo stato redox della cellula per determinare il rimodellamento cardiovascolare ed eterogenesi, risulta alterato. In particolare, abbiamo dimostrato che l'espressione genica di p22^{phox}, una subunità del complesso NADPH ossidasi critica per la generazione di O₂⁻, è ridotta (Calò et al, 2003). Questa ridotta espressione comporta ridotta produzione di O₂⁻, ridotta espressione genica di TGF β , ridotto livello plasmatici di perossinitrito (Calò et al, 2003), ridotta suscettibilità delle LDL all'ossidazione (Calò et al, 1998) e ad aumentato potere antiossidante del plasma (Calò et al, 2003) e suggerisce la riduzione dello stato ossidativo nei pazienti con sindrome di Bartter e di Gitelman.

Abbiamo poi recentemente dimostrato che il sistema RhoA/Rho Kinasi, strettamente coinvolto nella regolazione del tono e del remodeling vascolare, è anche ridotto in questi pazienti (Pagnin et al, 2004; Pagnin et al, 2005). Inoltre è stato descritto un aumentato livello di mRNA per la subunità endoteliale della sintesi di NO (Calò et al, 1999) assieme ad un aumentato livello urinario di metaboliti di NO (Calò et al, 1996), che indicano attivazione del sistema di NO che, unita all'inibizione del sistema RhoA/Rho Kinasi, in parallelo con l'aumento dell'espressione di heme ossigenasi-1 (Calò et al, 2003), un potente antiossidante ed antiapoptotico sotto il controllo di Akt (Calò et al, 2005) riscontrato nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman. Tutti questi risultati sono compatibili con le ridotte resistenze periferiche, l'iporeattività vascolare e la normo-ipotensione, tipiche dei pazienti con sindrome di Bartter e Gitelman.

Queste caratteristiche biochimiche e cellulari riscontrate in questi pazienti sono l'immagine speculare delle anomalie biochimiche e cellulari presenti nell'ipertensione arteriosa dove invece tutti gli eventi mediati da AT1 sono attivati.

La ridotta sensibilità agli effetti dell'Ang II mediati da AT1 riscontrata nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman li rende un modello sperimentale umano ideale per la valutazione dei meccanismi cellulari e molecolari mediati dai recettori AT2, nell'ipotesi che questa sindrome sia caratterizzata proprio da una maggior stimolazione o aumentata responsività del recettore AT2 (Calò et al, 2003).

Lo studio degli eventi biochimico-molecolari derivanti dall'attivazione del recettore AT2 in un peculiare modello umano (immagine speculare dell'ipertensione arteriosa),

potrebbe fornire utili informazioni sulle basi cellulari dell'ipertensione e maggiori informazioni sull'attività e le complicanze dei sartani, farmaci che bloccano la via mediata da AT1, ma inevitabilmente attivano quella di AT2.

4.2. Sindromi di Bartter e Gitelman e infiammazione

Studi già effettuati dal nostro gruppo hanno evidenziato che nei pazienti affetti da sindrome di Bartter e di Gitelman la concentrazione plasmatica di alcuni fattori proinfiammatori mediati da AT1 non è differente da quella di un controllo normoteso, nonostante nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman i livelli alti di Ang II siano molto elevati. In particolare in quegli studi sono state prese in considerazione la proteina C reattiva (PCR), il più sensibile e più comunemente usato indicatore infiammatorio, correlato notoriamente all'aumento di rischio cardiovascolare, le proteine della fase acuta come la siero amiloide A (SAA) e le molecole di adesione cellulare vascolare (VCAM) e intracellulare (ICAM) e la citochina relativa al processo infiammatorio IL-6, citochina infiammatoria secondaria che induce l'incremento della concentrazione plasmatica di fibrinogeno (Davis et al, 2006).

In contrasto con gli invariati livelli di SAA, IL-6 e PCR rispetto a soggetti normali sani normotesi, il tumor necrosis factor- α (TNF- α) è aumentato. L'interpretazione per questo incremento, si è basata sulla presenza di elevati livelli di NO che una caratteristica di questi pazienti (Calò et al 1999; Calò et al, 1995). L'aumento di NO è stato infatti riportato indurre incremento del TNF- α (Cauwels et al, 2005) in via compensatoria..

5. Scopo del lavoro

L'Ang II media le sue azioni biologiche attraverso il legame a due distinti recettori legati alla membrana cellulare, i recettori AT1 ed i recettori AT2 (De Gasparo et al, 2000). La maggior parte delle azioni biologiche dell'Angiotensina II, compresa la contrazione della cellula muscolare liscia vascolare, la crescita e l'infiammazione, sono mediate attraverso il legame con i recettori AT1.

Evidenze recenti indicano che il recettore AT2 controbilancia questi effetti inducendo vasodilatazione, inibendo la crescita cellulare e l'infiammazione e mediando effetti antiipertrofici ed antiapoptotici (De Gasparo et al, 2000; Volpe et al, 2003; Stoll et al, 2001; Zhou et al, 2008; Yamamoto et al, 2008). Il blocco dei recettori AT1 con bloccanti dei recettori AT1 dell'Angiotensina II fa aumentare notevolmente la concentrazione plasmatica di Ang II che si rende così disponibile per lo stimolo dei recettori AT2 e questa azione, peraltro, potrebbe contribuire alla loro attività antiipertensiva.

Una condizione clinica sovrapponibile a quella indotta dal blocco cronico del recettore AT1 si verifica nelle Sindromi di Bartter e Gitelman. Queste sindromi sono causate da specifiche anomalie geniche a livello di proteine trasportatori di ioni a livello renale o difetti genetici a livello di canali ionici, che determinano un quadro clinico caratterizzato da ipokalemia, deplezione di sodio, attivazione del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAAS), con aumentati livelli plasmatici di Ang II e aldosterone, ma normo-ipotensione, ridotte resistenze periferiche ed iporesponsività agli agenti pressori (Calò et al, 2000). Negli studi effettuati su questi pazienti dal nostro gruppo, si è dimostrato che il signaling a breve termine dell'Ang II via recettori AT1 è ridotto (Calò et al, 2003; Calò et al, 2001; Calò et al, 2004; Pagnin et al, 2004; Calò et al, 2005; Calò et al, 2005; Pagnin et al, 2005; Davis et al, 2006; Semplicini et al, 2006). La ridotta sensibilità agli effetti dell'Ang II mediata da questi recettori nei pazienti con Sindrome di Bartter e Gitelman, li rende un modello sperimentale umano ideale per la valutazione dei meccanismi cellulari e molecolari mediati dai recettori AT2.

Lo scopo dei nostri studi è stato quindi quello di utilizzare questo modello per studiare il segnale dell'Ang II mediato dai recettori AT2, prendendo in considerazione inizialmente la via a lungo termine mediata dall'Ang II, quindi analizzando il processo di infiammazione, direttamente collegato allo stress ossidativo e il conseguente processo di remodelling cardiovascolare.

In particolare dopo aver caratterizzato il livello dell'espressione del recettore AT2 in pazienti con Sindrome di Bartter e Gitelman per confermare la normale espressione in

confronto con soggetti sani normotesi di controllo, abbiamo valutato "ex vivo", utilizzando sia cellule mononucleate del sangue che fibroblasti ottenuti da biopsie cutanee lo stato di proteine correlate all'infiammazione, quali: I κ B, la subunità inibitoria di NF- κ B, fattore di trascrizione nucleare chiave nelle patologie infiammatorie e fibrotiche, p66^{shc}, proteina adattatrice coinvolta nella risposta allo stress ossidativo e ERK1/2, un potente target a valle del recettore AT1 che media il rimodellamento cardiovascolare.

Inoltre, abbiamo esplorato direttamente il processo di rimodellamento, valutando l'attivazione della ERK1/2 e confrontandola con lo stato di espressione della MKP-1 che è attivata dalla stimolazione del recettore AT2 dell'Ang II e la sua attivazione defosforila e quindi inattiva le MAPKs. Per provare definitivamente il ruolo del recettore AT2 in questo meccanismo, gli stessi esperimenti sono stati effettuati in presenza o meno di PD123319, un bloccante del recettore AT2.

Dato il recente riscontro un ruolo importante per l'enzima ACE2, un omologo dell'enzima di conversione dell'angiotensina II (ACE) responsabile della produzione di angiotensina 1-7 (Ang 1-7), un potente vasodilatatore, noto per avere effetti biologici opposti a quelli dell'Ang II (Ferrario et al, 1997; Iyer et al, 1998; Santos et al, 2007) abbiamo utilizzato i pazienti con sindrome di Bartter e Gitelman anche per valutare i livelli di ACE2 e Ang 1-7 rispetto ai soggetti sani normotesi ed ai pazienti con ipertensione essenziale.

6. Pazienti e Metodi

6.1. Pazienti

Per questi studi sono stati reclutati 12 pazienti affetti da Sindrome di Bartter e Gitelman, 7 maschi e 5 femmine dell'età compresa tra i 18-54 anni, due dei quali affetti da Sindrome di Bartter e 10 da Sindrome di Gitelman dalla nostra coorte di pazienti già convocati in studi precedenti effettuati dal nostro gruppo di lavoro. Tutti presentano una completa caratterizzazione biochimica e 7 anche l'analisi genetica, mentre 5 sono in attesa di risultati di screening genetico.

Sebbene non sia stato dimostrato, per minimizzare la possibilità che una differenza quantitativa di espressione genica tra i sottotipi di cellule mononucleate potesse influenzare l'espressione genica delle proteine correlate all'infiammazione considerate nel nostro studio, per esempio attraverso la fluttuazione del numero dei diversi sottotipi di cellule mononucleate, abbiamo verificato nei pazienti l'assenza di variazioni di conta dei monociti e dei linfociti, e anche l'assenza di evidenze cliniche di infezioni o malattie infiammatorie all'inizio dello studio e alla fine dello studio.

Nella tabella sottostante sono riportati i dati clinici e di laboratorio dei pazienti affetti da sindromi di Bartter e Gitelman e dei controlli inclusi nello studio.

	Sex	Età anni	BW (kg)	BP (mmHg)	Elettroliti del plasma (mmol/l)				Elettroliti urinari (mmol/day)				PRA (ng ANG I/ml/h)	Aldosterone (nmol/l)
					Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Ca ²⁺		
Bartter's patients														
1	F	34	54	105/70	138	2.2	96	0.92	158	36.6	192	3.6	15	0.95
2	F	26	50	110/70	138	2.7	98	0.80	200	34.2	220	3.0	8	0.76
Gitelman's patients														
1	F	54	48	120/75	138	2.3	98	0.65	259	38.4	200	1.8	17	0.58
2	M	34	62	110/70	140	2.5	98	0.60	190	30.8	220	2.0	12	0.88
3	M	37	68	110/70	138	2.3	96	0.59	297	40.8	310	2.1	14	0.70
4	M	49	70	110/70	138	3.0	98	0.54	200	81.5	239	2.0	7	0.67
5	M	29	72	110/70	139	3.0	100	0.55	190	42.5	220	2.1	6	0.70
6	M	27	66	120/70	139	2.9	99	0.68	250	36.5	282	2.7	5	0.55
7	M	47	66	120/70	139	2.9	97	0.58	190	44.3	197	1.9	5	0.82
8	F	34	62	110/70	139	3.0	98	0.65	198	43.5	220	2.2	5.8	0.67
9	F	42	67	120/70	140	2.9	98	0.64	200	78.5	210	2.1	6	0.70
10	M	18	72	120/75	139	2.9	98	0.68	200	45.4	197	2.0	6	0.75
Controlli (n=10)	12M/8F	35.6±7.2	74±6.0	128.5/82±6.2/2.6	139±1.0	4.1±0.2	99±0.97	0.99±0.2	168±16.5	52.8±4.8	179.8±19.6	4.5±0.5	0.73±0.13	0.18±0.02

Tabella 1. Dati clinici e di laboratorio dei pazienti Bs/Gs e controlli inclusi nello studio. La tabella riporta ogni singolo dato dei pazienti e la media ± deviazione standard dei controlli. BW, peso corporeo; BP, pressione sanguigna; PRA, attività plasmatici della renina. I normali valori di PRA nel plasma e di aldosterone nei nostri laboratori sono 0.2-2.8 ng Ang I/ml/h e 0.08-0.29 nmol/l, rispettivamente. I normali

valori del plasma per Na⁺, K⁺, Cl⁻, Mg⁺⁺ sono 136-145, 3.5-5, 96-108 e 0.65-1.05 mmol/l, rispettivamente. I normali valori escretori urinari di Na⁺, K⁺, Cl⁻ e Ca⁺⁺ sono 40-220, 25-125, 110-250 and 2.5-7.5 mmol/al giorno, rispettivamente.

Nella tabella sottostante invece, sono riportati i risultati dello screening genetico per i pazienti con sindrome di Gitelman.

Identificazione della mutazione SLC12A3 nei pazienti con sindromi Gitelman

Pazienti	Esoni	Mutazioni al nucleotide	Omo-eterozigosi	Effetti predittivi sulla proteina
1	23	2736G---->A	omozigosi	Arg904Gln
2	22 23	2579C---->T 2736G---->A	eteroziosi eteroziosi	Arg852Cys Arg904Gln
3	15 18	1950G---->A 2246G---->A	eteroziosi eteroziosi	Arg642His o proteina troncata nel sito SLC12A3 Gly741Arg
4	22 23	2579C---->T 2736G---->A	eteroziosi omozigosi	Arg852Cys Arg904Gln
5	22 23	2579C---->T 2736G---->A	eteroziosi eteroziosi	Arg852Cys Arg904Gln

Tabella 2. Dati dello screening genetico ottenuti per 5 dei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman.

Come gruppo di controllo abbiamo scelto 10 soggetti sani normotesi con caratteristiche comparabili per sesso ed età al gruppo di pazienti (5 maschi e 5 femmine dell'età compresa tra i 24 e 56 anni) presi dallo staff del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Padova.

Sono stati inoltre valutati 10 pazienti, 5 maschi e 5 femmine di età media di 39.6 ± 11.2 affetti da ipertensione essenziale di stadio 1 non trattati, selezionati dalla coorte di pazienti dell'Unità di Ipertensione di Padova del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale (Clinica Medica 4).

I pazienti sono stati scelti sulla base dei seguenti criteri: relativa giovane età, non fumatori, mancanza di altre malattie come diabete, malattia ostruttiva polmonare cronica, infarto cardiaco, cancro e con fistola artero-venosa o accessi vascolari e

assenza di ricoveri ospedalieri negli ultimi 6 mesi. Tutti i partecipanti allo studio hanno dato il loro consenso informato. Nessuno dei pazienti e dei controlli sono sottoposti a terapia farmacologiche nelle ultime due settimane prima dello studio, fatta eccezione di supplemento di potassio per i pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman. Tutti i soggetti si sono astenuti dal mangiare, bere alcool o caffeina nelle 12 ore antecedenti allo studio; inoltre tutti consumano una normale dieta italiana che contiene approssimativamente 150 mmol di sodio al giorno.

In particolare, per la valutazione dell'espressione proteica del recettore AT2, nei fibroblasti cutanei come modello sperimentale, abbiamo utilizzato 10 pazienti (9 Gitelman e 1 Bartter) e i 10 controlli sani normotesi. Per la valutazione dell'espressione proteica di ERK1/2 e phosphoERK1/2 e I κ b e dell'espressione genica di p66^{shc} sono stati utilizzati tutti i pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman e tutti i controlli (nelle cellule mononucleate da sangue). Per lo studio dell'espressione proteica di ERK1/2 ed MKP-1 nei fibroblasti, sono invece stati utilizzati 5 pazienti, 2 maschi e 3 femmine, di età compresa tra 18-54 (1 Bartter e 4 Gitelman) dalla coorte di pazienti e 5 controlli sani normotesi, 2 maschi e 3 femmine, età 43.2±10.6. Infine, nella valutazione dell'espressione proteica di ACE2 e Ang 1-7 nei linfomonociti sono stati reclutati 10 pazienti, 6 maschi e 4 femmine, uno affetto da Sindrome di Bartter e 9 da Sindrome di Gitelman, 10 soggetti sani normotesi e 10 pazienti affetti da ipertensione essenziale.

6.2. Metodi

6.2.1. Separazione delle cellule mononucleate da sangue

Dopo separazione del plasma da 30 ml di sangue intero anticoagulato con EDTA, ottenuta per centrifugazione a 200xg per 10 minuti a 20°C, la separazione dei linfo-monociti è stata effettuata in gradiente utilizzando Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Svezia). Sopra una soluzione di opportuna densità e forza osmotica formata da Ficoll, agente polimerico aggregante gli eritrociti, e diatrizzato sodico, è stato stratificato il sangue intero anticoagulato con EDTA. Il sistema a due fasi è stato quindi centrifugato a 400xg per 30 minuti a 20°C. Alla popolazione linfo-monocitaria recuperata è stata aggiunta una soluzione isotonica per effettuare i lavaggi. La sospensione è stata centrifugata a 100 g per 10 minuti a 20°C. Quest'ultima operazione è stata ripetuta due volte prima di essere lisata per l'ottenimento della frazione proteica e l'estrazione dell'RNA totale.

6.2.2. Colture primarie di fibroblasti

Per ottenere colture primarie di fibroblasti dalla coorte di pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman e dai controlli, si effettua una piccola biopsia cutanea sulla superficie anteriore del braccio sinistro in anestesia locale con cloruro d'etile. Appena eseguita la biopsia, il tessuto viene deposto in una capsula petri sterile e tagliato in 30-40 piccoli pezzi ai quali è aggiunta qualche goccia di Nutrient Mixture F-10 HAM medium in HEPES buffer), 100U/mL penicillina, 100ug/mL streptomicina e 4mmol/L glutamina supplementato con 20% fetal bovine serum (FBS) per evitare che si secchino. Con una siringa sterile, gli espianti vengono trasferiti nelle fiasche da 25 cm² (circa 8 per fiasca) dove sono lasciati asciugare per circa un minuto per favorire l'adesione delle cellule alla fiasca e successivamente coperti con alcune gocce di medium con FBS al 20%. Dopo circa mezz'ora si aggiunge 1 ml di medium sul fondo della fiasca per mantenere il giusto grado di umidità.

In circa 2-3 giorni si possono distinguere i fibroblasti che crescono attorno all'espianto e quindi vengono aggiunti 5 ml di medium 10% FBS con estrema delicatezza per evitare il distacco degli espianti. Il medium viene cambiato ogni 3-4 giorni.

Quando il fondo della fiasca risulta completamente coperto di fibroblasti si procede al distacco delle cellule con tripsina; questo procedimento permette anche di

eliminare l'eventuale inquinamento da cheratinociti che possono formarsi dall'espianto dato che questo tipo di cellule non ha la capacità di aderire nuovamente alla fiasca. Dopo aver aspirato il medium, le cellule ancora adese alla fiasca vengono lavate un paio di volte con 5 ml di PBS e vengono aggiunti 0.5 ml di tripsina. Quando la tripsina comincia ad agire si nota che le cellule, dalle forma allungata che assumono quando sono adese, passano ad una forma arrotondata e dando dei piccoli colpi alla fiasca si facilita il loro distaccamento. Per non danneggiare le cellule, questo deve avvenire entro 15 minuti, dopo i quali vengono aggiunti 10 ml di medium al 10% FBS per bloccare l'azione della tripsina. Le cellule sono poi divise nel numero più adeguato di fiasche. Le cellule di tutti i pazienti e soggetti di controllo vengono congelate al secondo passaggio al fine di ottenere uniformità di condizioni tra i diversi esperimenti. Dopo aver staccato le cellule dalla fiasca come sopra descritto e centrifugate a 1000 g/min per 10 minuti per eliminare il surnatante, il pellet di cellule viene risospeso in 3 ml di medium contenente FBS al 40%, glutammina al 2%, penicillina/streptomina all'1% e dimetilsolfossido (DMSO) al 10%. La sospensione cellulare viene quindi divisa in vials da congelamento e posizionata in cryobox che permettono un congelamento lento e graduale delle cellule (un 1°C al minuto) quando posizionato a -80°C. Il giorno successivo le vials vengono stoccate in azoto liquido. Con questo procedimento sono state congelate tutte le linee cellulari di fibroblasti dei pazienti e dei controlli che potranno essere scongelate e messe in coltura in qualsiasi momento, ottenendo uniformità di condizioni tra un soggetto e l'altro.

6.2.3. Stimolazione delle colture di fibroblasti

Per procedere con gli esperimenti sono state scongelate le vials di cellule passando il più velocemente possibile dalla temperatura di -80°C a quella di 37°C in Medium di coltura (Nutrient Mixture F-10 HAM medium in Hepes buffer, 100U/mL penicillina, 100ug/mL streptomina e 4mmol/L glutammina supplementato con 10% fetal bovine serum), per poi essere seminate in fiasche 75 cm² e incubate a 37°C.

Per mettere a punto i protocolli sperimentali per la valutazione dell'espressione proteica mediante western blotting di AT2, ERK1/2 ed ERK1/2 fosforilata e MKP-1, sono state scongelate cellule sia di controllo che di pazienti, seminate in fiasche 75 cm² e incubate a 37°C.

Quando le fiasche raggiungono la confluenza, si può procedere alla stimolazione mediante aggiunta nel terreno di coltura di Ang II 250 nM con tempi di incubazione pari a zero, 2 minuti, 30 e 60 minuti. Gli stessi saggi sono stati effettuati

con preincubazione di PD123319 1 μ M per 30 minuti, un potente bloccante selettivo del recettore AT2, sia nei fibroblasti dei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman che nei controlli. Allo scadere del tempo di incubazione, il terreno viene aspirato e si procede alla determinazione del lisato proteico.

6.2.4. Determinazione del lisato proteico

Per ottenere un estratto totale di proteine, i linfo-monociti isolati dal sangue intero anticoagulato con EDTA, sono state lisati, con uno specifico buffer di lisi: il RIPA Buffer (Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5.0 mM, Niaproof 1.5%, Na₃VO₄ 1.0 mM, SDS 0.1%). Al momento dell'uso sono stati addizionati gli inibitori delle proteasi (Roche Diagnostic, New Jersey USA) e Fenil-Metil-Sulfonil Fluoride (PMSF, 1 mM).

Per ottenere un estratto di proteine dalle colture primarie di fibroblasti invece, dopo aver lavato 2-3 volte la fiasca con PBS 10x a 4°C, le cellule sono staccate e lisate con TRITON buffer (Tris HCl pH 7.5 20 mM, Triton X-100 1%, NaCl 140 mM, NaF 25mM, Glycerophosphate 25 mM, NaVO₄ 5 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, NaP₃O₄ (PPI) 1 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Glicerolo 10% pH 7.4) addizionato con gli inibitori delle proteasi (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e il PMSF 0.5 mM.

La soluzione contenente il *buffer* di lisi e le cellule è stata sottoposta a 3 cicli di 30 secondi di sonicazione (UP200S, Hielscher Gimbla Teltow, Germania) e 30 secondi di riposo in ghiaccio, per liberare la maggior quantità possibile di proteine. La soluzione è stata poi centrifugata a 4°C per 10 minuti a 10000xg recuperando il surnatante contenente le proteine in soluzione.

6.2.5. Determinazione della concentrazione di proteine

Il BCA Assay (Pierce, Rockford USA) è un metodo che combina la reazione del biureto (una proteina che in ambiente alcalino è capace di ridurre Cu²⁺ a Cu⁺) con la determinazione colorimetrica data dal rame rameoso che chela due molecole di acido bicinconinico.

25 μ l della soluzione contenente le proteine e la stessa quantità del tampone di lisi sono state diluite per un opportuno fattore di diluizione (1:10) con acqua DEPC. Sono state poi caricate in triplo in piastra a 96 pozzetti (Falcon, Necton Dickinson, Labware, New Jersey USA) assieme allo standard (albumina sierica bovina, BSA) a diverse concentrazioni note. Ogni pozzetto è stato riempito con 200 μ l di reagente

composto da 50 parti di reagente BCA A (sodio carbonato, sodio bicarbonato, acido bicinconinico, sodio tartrato in sodio idrossido 0,1M) e 1 parte di reagente BCA B (contenente 4% di solfato rameico). La piastra è stata successivamente incubata a 37°C per 30 minuti e letta a 540nm con spettrofotometro (Labsistem Multiscan MS). Con i valori delle concentrazioni note di albumina (standard) è stata creata una curva standard in base alla quale sono state ricavate le concentrazioni delle proteine.

6.2.6. Separazione elettroforetica delle proteine e trasferimento su membrana di nitrocellulosa

Un certo quantitativo di lisato proteico, diverso a seconda della proteina in valutazione, (vedi **Tabella 5.1**) estratto dai linfo-monociti o dai fibroblasti, viene denaturato per 5 minuti in presenza di *loading buffer* (10 mM Tris HCl, pH 6.8, 20mM DTT, 0,4% SDS (*electrophoresis grade*), 0.025% bromofenolo blu e 2% glicerolo). I campioni sono stati quindi portati a 4°C e caricati su gel di poliacrilammide, la cui percentuale variava a seconda della proteina di interesse e quindi del suo peso molecolare, rispettivamente: 10% per determinare l'espressione di AT2, Ikb, ERK1/2 e phospho ERK1/2 e MKP-1 e 8% per ACE2 e Ang 1-7.

Le proteine sono state quindi separate a 80 V per 4-5 ore in tampone di corsa così composto: Tris 25 mM, glicina 0,25M, SodioDodecilSolfato 3,47mM. Il *marker* molecolare utilizzato è *Full Range Rainbow*, RPN800 (Amersham Life Science, Inghilterra).

Le proteine separate elettroforeticamente sul gel sono state poi trasferite su membrana di nitrocellulosa (Hybond ECL, Amersham bioscience, Inghilterra) per 1 ora a 80 V in ghiaccio, usando uno specifico tampone di trasferimento a 4°C (39 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037% SDS (*electrophoresis grade*), 20% metanolo).

Le membrane di nitrocellulosa sono state quindi incubate per tutta la notte a 4°C con PBS addizionato dello 0,1% di Tween-20 (Merck Schuchardt, Germania) (tPBS) e il 5% di latte scremato in polvere (*Non Fat Dry Milk*, Nestlé).

6.2.7. Formazione e visualizzazione degli immunocomplessi

Le membrane di nitrocellulosa sono state incubate con soluzioni di anticorpi primari specifici per 3 ore a temperatura ambiente, come riportato in **Tabella 5.1**. Le membrane sono state quindi lavate 3 volte per 15 minuti a temperatura ambiente con tPBS e incubate con specifico anticorpo secondario coniugato con Horseradish Peroxidase (HRP) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi per 15 minuti

ciascuno a temperatura a ambiente, le membrane sono state incubate per 5 minuti con una soluzione chemiluminescente (soluzione preparata al momento, composta da luminolo e perossido in uguali volumi, Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford USA). Gli immunocomplessi formati sono quindi stati visualizzati a seguito di impressione su lastra radiografica (Amersham biosciences, Inghilterra) e successivo sviluppo.

Le bande corrispondenti ad ACTINA, GAPDH ed alle 7 proteine in esame prese singolarmente sono state quantificate densitometricamente per mezzo della densità pixel utilizzando il *software* NIH Image. Il rapporto tra l'espressione proteica di AT2, ACE2 e Ang 1-7 sulla β -Actina, di I κ b e MKP-1 su GAPDH, è stato utilizzato come indice dell'espressione proteica di questa proteina. Il rapporto di phospho ERK1/2 su ERK1/2 è invece utilizzato come indice di attivazione di questa proteina.

Tabella 5.1:

Proteina	Peso Molecolare	μg proteina da caricare	Anticorpo primario	Anticorpo secondario
AT2 (nei linfomonociti)	50KDa	40 μ g	(Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA)	1:5000 Anti rabbit
AT2 (nei fibroblasti)	50KDa	40 μ g	(Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA)	1:10000 Anti rabbit
Erk-1/2 (nei linfomonociti)	42/44 KDa	25 μ g	1:1000 Cell Signaling technology, USA	1:5000 Anti rabbit
phosphoErk-1/2 (nei linfomonociti)	42/44 KDa	25 μ g	1:1000 Cell Signaling technology, USA)	1:2000 Anti rabbit
Erk-1/2 (nei fibroblasti)	42/44 KDa	25 μ g	1:1000 Cell Signaling technology, USA	1:2000 Anti rabbit
phosphoErk-1/2 (nei fibroblasti)	42/44 KDa	25 μ g	1:1000 Cell Signaling technology, USA	1:5000 Anti rabbit
Iκb (nei linfomonociti)	37 KDa	25 μ g	1:1000 (Santa Cruz, Biotechnologies, CA)	1:5000 Anti rabbit

Mkp-1 (nei fibroblasti)	40KDa	30µg	1:1000 (Santa Cruz, Biotechnologies, CA)	1:5000 Anti rabbit
ACE2 (nei linfomonociti)	90KDa	80µg	1:500 (SantaCruz Biotechnologies)	1:15000 Anti rabbit
Ang1-7 (nei linfomonociti)	50KDa	50µg	1:1000 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc)	1:10000 Anti rabbit
β-Actina (nei fibroblasti)	42KDa	-		1:20000 Anti IgM
β-Actina (nei linfomonociti)	42KDa	-		1:20000 Anti IgM
GAPDH (nei linfomonociti)	36 KDa	-	(Chemicon International, Temecula, CA, USA)	1:10000 Anti mouse
GAPDH (nei fibroblasti)	36 KDa	-	(Chemicon International, Temecula, CA, USA)	1:10000 Anti mouse

Antirabbit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)

Antimouse (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)

6.2.8. Quantificazione dell'espressione proteica

Per quantificare l'espressione proteica è stata utilizzata un'analisi semiquantitativa dei prodotti di Blotting. Le bande corrispondenti alla proteina housekeeping (GAPDH e β-Actina) e alla proteina in esame sono state quantificate densitometricamente per mezzo della densità pixel utilizzando il software NIH Image.

Il rapporto tra i prodotti di blotting di ATR2 e β-Actina, di Ikb e GAPDH, di MKP-1 e GAPDH, di ACE2 e β-Actina e di Ang 1-7 e β-Actina è stato utilizzato come indice dell'espressione proteica. Il rapporto tra i prodotti di blotting di phosphoERK1/2 ed ERK1/2 è stato utilizzato come indice dell'attivazione della proteina.

6.2.9. Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA mediante RNable (miscela di isotiocianato, 2-mercaptoetanololo e fenolo) (Eurobio, Francia) prevede quattro fasi: 1. Fase di omogenizzazione: ai linfo-monociti isolati dal sangue intero anticoagulato con EDTA

sono stati rispettivamente addizionati 200 µl di RNABle (miscela di isotiocianato, 2-mercaptoetanololo e fenolo, Eurobio) per milione di cellule. Le cellule sono state contate, dopo trattamento con il colorante vitale eosina, in camera di Bürker. 2. Fase di estrazione: alla miscela contenente RNABle è stato addizionato cloroformio (Merk, Germania) in un volume pari a 1/10 del volume di RNABle. Sono effettuati 3 cicli di vortex e riposo in ghiaccio, ciascuno di 20 secondi, successivamente i campioni sono stati lasciati a 4°C per 5 minuti e quindi centrifugati a 12000xg per 15 minuti a 4°C. 3. Fase di precipitazione: la fase acquosa superiore, contenente l'RNA, è stata recuperata ed è stato addizionato un ugual volume di isopropanolo (Carlo Erba, Italia). Dopo tre cicli di 20 secondi di vortex e riposo in ghiaccio, i campioni sono stati lasciati per almeno 12 ore a -20°C. Il fondello di RNA totale è stato raccolto tramite centrifugazione a 12000xg per 15 minuti a 4°C. 4. Fase di lavaggio: dopo rimozione del surnatante, il fondello di RNA è stato lavato due volte con 1ml di etanolo (Zonin, Italia) al 70% in acqua DEPC, cioè RNAsi free, centrifugato a 12000xg per 15 minuti a 4°C.

6.2.10. Quantificazione ed integrità di RNA

Il fondello di RNA è stato solubilizzato in acqua DEPC e quantificato spettrofotometricamente mediante lettura a lunghezza d'onda di 260 nm.

La concentrazione di RNA è stata estrapolata dall'equazione di Lambert-Beer:

$$A = C/\varepsilon \cdot l$$

dove A= assorbanza a 260 nm; ε = coefficiente di estinzione molare; l= cammino ottico.

Da cui: $C = A \cdot \varepsilon \cdot l$, opportunamente moltiplicata per un fattore di diluizione (pari a 60).

Per garantire la bontà dell'estrazione, il rapporto tra A_{260}/A_{280} deve essere compreso tra 1.8 e 2.0. L'integrità dell'RNA è stata valutata mediante elettroforesi in gel di agarosio (BDH, England) all'1,4%, con il colorante etidio bromuro.

6.2.11. Retrotrascrizione ed amplificazione mediante RT PCR

La valutazione dell'espressione genica di p66^{shc} è stata effettuata mediante analisi semiquantitativa dei prodotti di RT-PCR.

Retrotrascrizione: 1 µg di RNA totale del campione in esame è stato retrotrascritto utilizzando Random Hexamers come primers e MuLV Reverse Transcriptase come trascrittasi inversa secondo il protocollo della ditta produttrice del Kit GeneAmp Core

Kit (Applied Biosystems, Roche, New Jersey USA). Come termociclatore è stato utilizzato il GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

La miscela di retrotrascrizione per 1 µg di RNA è così composta: MgCl₂ 5mM, Buffer II (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.3) 1X, dNTPs 1mM, Random Hexamers 2,5 µM, Mulv Reverse Transcriptase 1U, RNase Inhibitor 1U, H₂O DEPC q.b. a 20 µl.

Le condizioni di retrotrascrizione utilizzate sono: 10 minuti a 25°C per l'estensione dei Random Hexamers; 15 minuti a 42°C per la retrotrascrizione; 5 minuti a 99°C per la denaturazione della trascrittasi; 5 minuti a 5°C per raffreddare i campioni.

Polymerase Chain Reaction (PCR): Retrotrascritto l'mRNA presente nel campione di partenza, si è proceduto all'amplificazione solamente del cDNA del gene di interesse tramite l'utilizzo di *primers* e quindi protocolli specifici per p66^{shc} (RT-PCR in due step).

Protocollo per la p66^{phox}

Sono stati utilizzati i seguenti *primers*:

5'-CCACTACCCTGTGCTCCTTC-3' and 5'-CTGAGTCCGGGTGTTGAAGT-3'

Le condizioni di amplificazione hanno previsto per 5 µl di cDNA la formazione di una miscela (MIX-PCR) contenente: MgCl₂ 1,5 mM; Buffer II 1X, Primer senso ed antisenso 0,4 µM; AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Roche, New Jersey USA) 0,625 U; H₂O DEPC q. b. a 25µl.

I campioni sono stati posti a 94°C per 10 minuti (hot start) seguita da 30 cicli formati da 94°C per 1 minuto (denaturazione), 60°C per 1 minuto (annealing) e 72°C per 1 min (estensione). L'amplificazione è stata terminata con una fase di 7 minuti a 72°C e raffreddamento a 4°C.

Come gene di controllo è stata usata β-actina con i seguenti *primers* 5'-CAACTTTGGTATCGTGGA-3' e 5'-GTAGCCAAATTCGTTGTC-3'.

6.2.12. Visualizzazione dei prodotti di PCR

10 µl di ciascun amplificato sono stati caricati in gel di poliacrilammide (BDH, England) al 7%, separati a 160 V per 1 ora ed evidenziati con etidio bromuro. La visualizzazione dei prodotti di amplificazione è stata effettuata con lampada UV. Successivamente i gel sono stati colorati con colorazione argentea.

Come marker è stato utilizzato il Marker IX (Roche Diagnostic, New Jersey USA).

6.2.13. Quantificazione dell'espressione genica

Per quantificare l'espressione genica di p66^{shc} è stata utilizzata un'analisi semiquantitativa dei prodotti di PCR. Le bande corrispondenti a β -actina e al gene in esame sono state quantificate densitometricamente per mezzo della densità pixel utilizzando il software NIH Image. Il rapporto tra i prodotti dell'amplificazione di β -actina e p66^{phox} è stato utilizzato come indice dell'espressione genica.

6.2.14. Analisi statistica

I dati sono stati valutati con un computer Macintosh G54 (Apple Computer, Cupertino, CA) usando il pacchetto statistico Statview II (BrainPower Inc, Calabasas CA, USA). I dati sono espressi come media \pm SD e la significatività dei valori è stata analizzata con ANOVA per i valori non accoppiati, mentre per quelli accoppiati è stato usato il T-test. Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

7. Risultati

7.1. *Valutazione dell'espressione proteica di AT2 in fibroblasti cutanei di pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman e di Soggetti normotesi di controllo*

L'espressione proteica del recettore dell'Angiotensina II di tipo 2 (ATR2) non presenta differenze nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman (1.59 ± 0.86 unità densitometriche) rispetto ai soggetti sani normotesi di controllo (1.37 ± 0.90 u.d., $p=ns$) nei fibroblasti cutanei [Fig. 7.1]

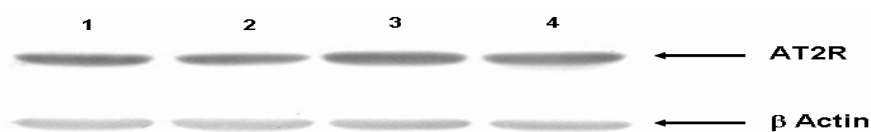


Figure 7.1: Bande rappresentative del blotting del recettore di tipo 2 dell'Angiotensina II (ATR2) da fibroblasti cutanei di 2 pazienti Bartter e Gitelman (linea 1 e 2) e di 2 controlli sani (linea 3 e 4).

7.2. Valutazione dell'attivazione di ERK1/2, dell'espressione proteica di Ikb e dell'espressione genica di p66^{shc} in cellule mononucleate del sangue di pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman e di soggetti normotesi di controllo

Il rapporto tra ERK1/2 fosforilata e ERK1/2 non risulta differente tra i pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman e controlli: 9.02 unità densitometriche (d.u.) \pm 5.8 verso 8.04 d.u. \pm 4.45, P=0.89.

Anche l'espressione genica di p66^{shc} non varia in pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman: 0.65 d.u. \pm 0.08 verso 0.64 d.u. \pm 0.09, P=0.84, confermando il normale stato ossidativo nei pazienti.

Al contrario, i livelli di espressione proteica della subunità inibitoria di NF- κ B, I κ B, è significativamente aumentata in pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman: 1.75 d.u. \pm 0.69 verso 0.67 d.u. \pm 0.31, P=0.02, dimostrando una ridotta attività di NF- κ B e di conseguenza una ridotta trascrizione dei geni coinvolti nell'infiammazione locale e sistemica, che è mediata dall'attivazione di NF- κ B [Fig.7.2].

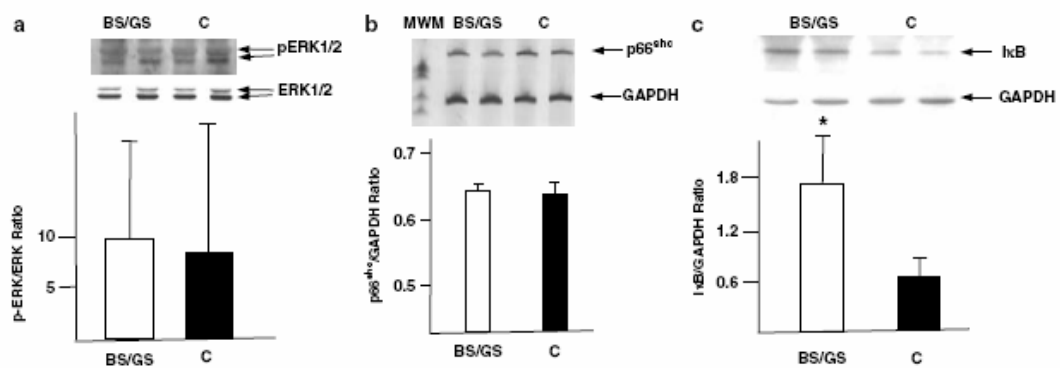


Figura 7.2 Analisi densitometrica del rapporto di ERK fosforilata su ERK (a), p66^{shc} su GAPDH (b) e I κ B su GAPDH (c) in cellule mononucleate di pazienti con Bs/Gs e controlli sani. In alto sopra i grafici sono riportati degli esempi rappresentativi di western blot di phospho ERK1/2 e ERK1/2 (a) e I κ B e GAPDH (c) e di un silver-stained gel di poliaccrilammide di p66^{shc} e GAPDH di due pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman verso due controlli. *P < 0.02.

7.3. Valutazione dell'espressione proteica di MKP-1 e dell'attivazione di ERK1/2 indotte da Ang II con e senza preincubazione con PD123319 in fibroblasti cutanei di pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman e di Soggetti normotesi di controllo

La figura 7.3 mostra il time course della fosforilazione dell'ERK1/2 indotta dall'Angiotensina II, espressa come rapporto dell' ERK1/2 fosforilata su ERK1/2 e i livelli di MKP-1, espressa come rapporto su GAPDH in fibroblasti di pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman (Pannello A) in confronto ai soggetti di controllo (Pannello B).

La fosforilazione di ERK1/2 in pazienti aumenta a 2 minuti (1.12 ± 0.06 unità densitometriche (d.u.) vs 0.62 ± 0.03 , $p < 0.002$) e poi ritorna a livelli basali a 30 e 60 minuti. La fosforilazione di ERK1/2 nei controlli aumenta a 2 minuti (1.11 ± 0.04 d.u. vs 0.56 ± 0.03 , $p < 0.002$), ma rimane elevata a 30 minuti (0.93 ± 0.03 d.u., $p < 0.005$) prima di ritornare a livelli basali.

I livelli di espressione proteica di MKP-1 mostrano nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman un significativo aumento a 30 minuti (1.31 ± 0.11 d.u. vs 0.85 ± 0.18 , $p < 0.01$) e poi ritorna a livelli basali a 60 minuti, mentre nei controlli i livelli proteici di MKP-1 non si modificano durante tutto il time course.

La figura 7.4 mostra gli effetti della preincubazione con PD123319 $1\mu\text{M}$, un bloccante di AT2R, per 30 minuti sul time course della fosforilazione di ERK1/2 indotta da Ang II e sui livelli di MKP-1, in fibroblasti di pazienti (Pannello A) in confronto ai soggetti sani (Pannello B).

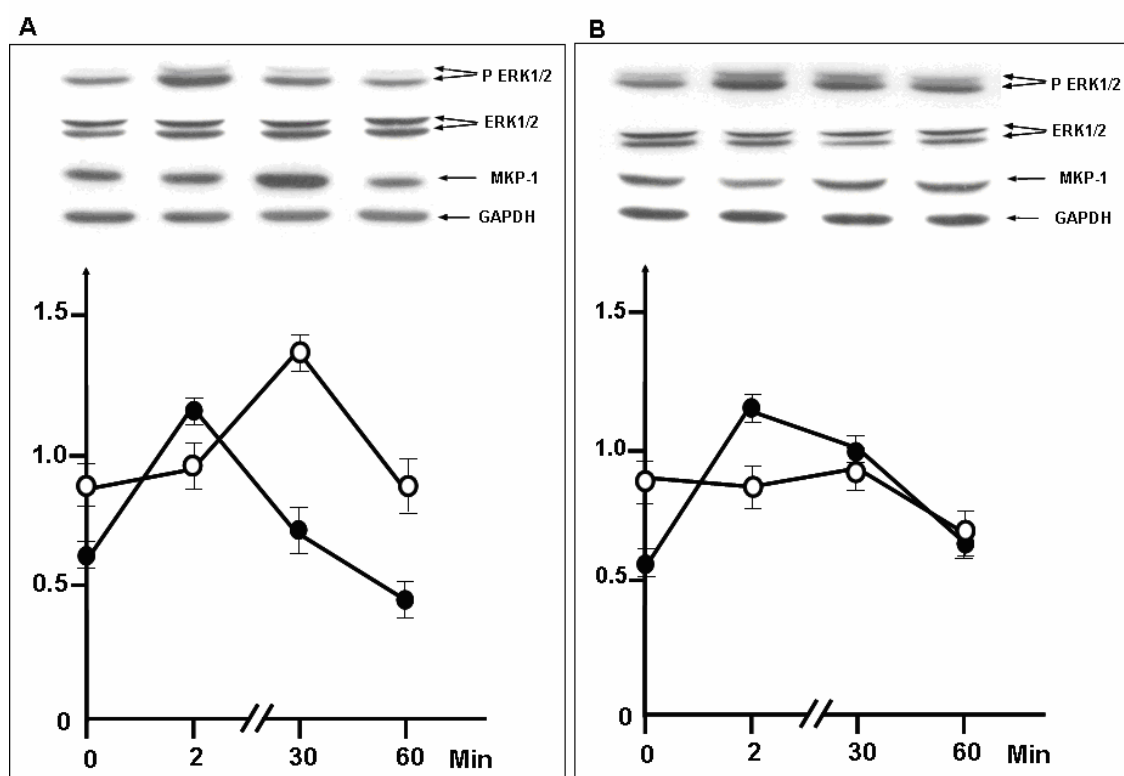


Fig. 7.3 Time course della fosforilazione di ERK1/2 indotta da Angiotensina II e livelli di espressione proteica di MKP-1, in fibroblasti di pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman (Pannello A) e in soggetti sani (Pannello B). i livelli di fosforilazione sono espressi come rapporto tra phospho ERK1/2 su ERK1/2 (●) mentre i livelli di MKP-1 come rapporto tra MKP-1 su GAPDH (○) in unità densitometriche. Sopra ad ogni pannello sono mostrati dei prodotti di western blot rappresentativi di phospho ERK1/2, ERK e di MKP-1 al time points considerato.

L'aggiunta di PD123319 abolisce la differenza tra pazienti e controlli sani nel time course della fosforilazione di ERK1/2 indotta da Ang II.

L'aumento dell'espressione proteica di MKP-1 a 30 minuti in pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman è abolito dall'aggiunta di PD123319 (0.64 ± 0.22 d.u. vs 1.31 ± 0.11 , $p < 0.03$), mentre non ha effetto sui livelli di espressione proteica di MKP-1 nei controlli.

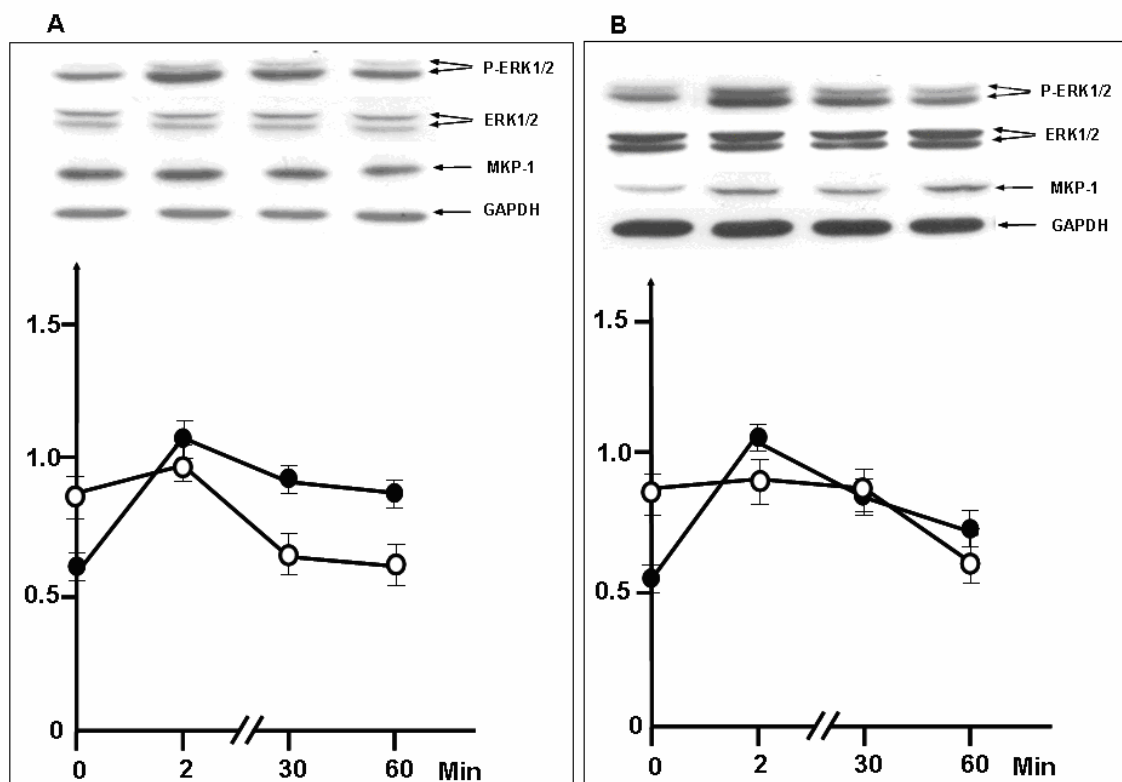


Fig. 7.4: Effetto della preincubazione con PD123319 (1 μ M) nel time course della fosforilazione di ERK-1/2 indotta da Ang II e i livelli di MKP-1, in fibroblasti di pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman (Pannello A) e soggetti sani di controllo (Pannello B). I livelli di phosphoERK1/2 sono espressi come rapporto di phospho ERK1/2 su ERK1/2 (●) mentre i livelli di MKP-1 come rapporto su GAPDH (○) in unità densitometriche.

Nella parte superiore di ogni pannello sono mostrati dei prodotti di western blot rappresentativi di phospho ERK1/2 e di MKP-1 al time points considerato.

7.4. *Valutazione dell'espressione proteica di ACE2 e di Ang 1-7 in cellule mononucleate del sangue di pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman, di pazienti Ipertesi e di Soggetti normotesi di controllo*

Dalla figura 7.5 si osserva che i livelli di ACE2 differiscono nei gruppi di soggetti considerati (Anova $p=0.014$). I livelli di ACE2 in pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman (1.59 unità densitometriche (d.u.) \pm 0.63) sono significativamente aumentati sia rispetto ai soggetti di controllo (0.98 d.u. \pm 0.45; $p=0.021$) che rispetto ai pazienti ipertesi (1.06d.u. \pm 0.24; $p=0.022$), mentre tra i soggetti sani e i pazienti ipertesi non si osservano differenze significative.

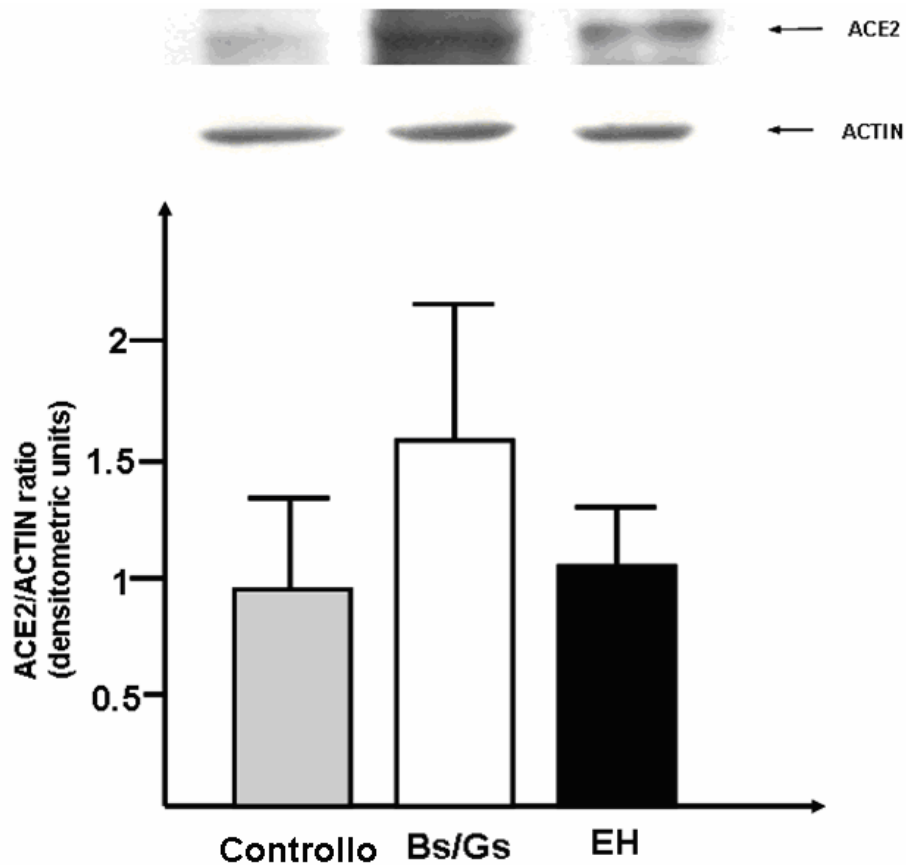


Figura 7.5 Espressione proteica di ACE2 in cellule mononucleate di pazienti con sindrome di Bs/Gs (Bs/Gs), pazienti con ipertensione essenziale (EH) e soggetti sani di controllo. Sopra il grafico sono riportati esempi di prodotti di western blot rappresentativi di ogni gruppo (Bs/Gs HE e controlli). *: $p=0.02$; •: $p=0.002$

Nella figura 7.6 si osserva che i livelli di Ang 1-7 in parallelo con i risultati di ACE2 differiscono rispetto agli altri due gruppi ($p= 0.002$; Anova). I livelli di espressione proteica di Ang 1-7 in pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman (2.26 d.u. ± 1.18) sono infatti aumentati significativamente in confronto sia ai pazienti ipertesi (0.72 d.u. ± 0.28 ; $p=0.005$) che ai soggetti di controllo (1.12 d.u. ± 0.48 , $p=0.018$), mentre le differenze tra pazienti ipertesi e soggetti sani si avvicina solo alla significanza statistica ($p=0.066$).

Diversamente dai soggetti sani normotesi e dai soggetti ipertesi, i livelli di espressione di ACE2 e Ang 1-7 nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman sono direttamente correlati ($r=0.914$, $p=0.001$).

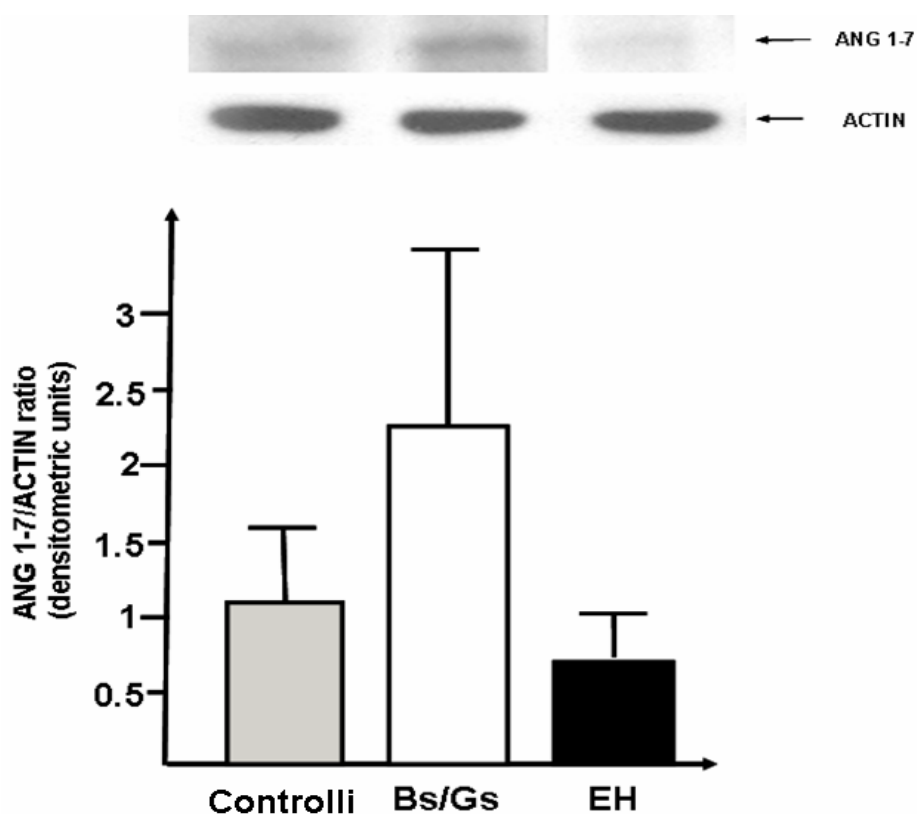


Figura 7.6 Espressione proteica di Ang 1-7 in cellule mononucleate di pazienti con sindrome di Bartter e Gitelman (Bs/Gs), pazienti con ipertensione essenziale (EH) e soggetti sani di controllo. Sopra il grafico sono riportati esempi di prodotti di western blot di Ang 1-7 rappresentativi di ogni gruppo (Bs/Gs, EH e controllii). *: $p=0.018$; •: $p=0.005$

8. Discussioni e Conclusioni

L'ipertensione arteriosa, il signaling dell'Angiotensina II (Ang II), lo stress ossidativo, l'infiammazione, la via della MAPK e il sistema dell'ossido nitrico (NO) sono strettamente legati da interazioni multiple che indicano che Ang II è integrata in un meccanismo omeostatico capace di regolare sia le funzioni vascolari che la struttura vascolare.

L'Ang II media le sue azioni biologiche attraverso il legame a due distinti recettori legati alla membrana cellulare, i recettori AT1 ed i recettori AT2 (De Gasparo et al, 2000). La maggior parte delle azioni biologiche dell'Angiotensina II, compresa la contrazione della cellula muscolare liscia vascolare, la crescita e l'infiammazione, sono mediate attraverso il legame con i recettori AT1.

Evidenze recenti indicano che il recettore AT2 controbilancia questi effetti inducendo vasodilatazione, inibendo la crescita cellulare e l'infiammazione e mediando effetti antiipertrofici ed antiapoptotici (De Gasparo et al, 2000; Volpe et al, 2003; Stoll et al, 2001; Zhou et al, 2008; Yamamoto et al, 2008). Il blocco dei recettori AT1 con bloccanti dei recettori AT1 dell'Angiotensina II fa aumentare notevolmente la concentrazione plasmatica di Ang II che si rende così disponibile per lo stimolo dei recettori AT2 e questa azione, peraltro, potrebbe contribuire alla loro attività antiipertensiva.

Una condizione clinica sovrapponibile a quella indotta dal blocco cronico del recettore AT1 si verifica nelle Sindromi di Bartter e Gitelman. Queste sindromi sono causate da specifiche anomalie geniche a livello di proteine trasportatori di ioni a livello renale o difetti genetici a livello di canali ionici, che determinano un quadro clinico caratterizzato da ipokalemia, deplezione di sodio, attivazione del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAAS), con aumentati livelli plasmatici di Ang II e aldosterone, ma normo-ipotensione, ridotte resistenze periferiche ed iporesponsività agli agenti pressori (Calò et al, 2000). In una serie di studi precedenti il nostro gruppo ha dimostrato una complessa anomalia del signaling cellulare dell'Ang II attraverso il recettore AT1 (Calò et al, 2005) e pertanto la ridotta sensibilità agli effetti dell'Ang II mediati da questi recettori nei pazienti con Sindrome di Bartter e Gitelman, li rende un modello sperimentale umano ideale per la valutazione dei meccanismi cellulari e molecolari mediati dai recettori AT2.

Lo scopo dei nostri studi è stato quindi quello di utilizzare questo modello per studiare il segnale mediato dai recettori AT2, prendendo in considerazione inizialmente la via a lungo termine mediata dall'Ang II, quindi analizzando il processo di infiammazione, direttamente collegato allo stress ossidativo e il conseguente processo

di remodelling cardiovascolare. In particolare è stato preso in considerazione lo stato di proteine correlate all'infiammazione, quali I κ B, la subunità inibitoria di NF- κ B, fattore di trascrizione nucleare chiave nelle patologie infiammatorie e fibrotiche, p66^{shc} proteina adattatrice coinvolta nella risposta allo stress ossidativo e ERK1/2, un potente target a valle del recettore AT1 che media fattori di trascrizione coinvolti nel rimodellamento cardiovascolare.

I risultati del nostro studio hanno evidenziato che nonostante gli elevati livelli di Ang II non ci sono differenze significative nell'attivazione di ERK1/2 nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman rispetto ai controlli sani a conferma che il signaling dell'Ang II via recettore AT1 nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman è smorzato. Non sono state riscontrate differenze significative nell'espressione genica di p66^{shc} nei pazienti rispetto ai controlli sani che conferma uno stato di ossidazione nella norma per questi pazienti. La valutazione dell'espressione proteica di I κ B ha invece dimostrato un aumento significativo nei pazienti rispetto ai controlli. La maggior espressione di I κ B indica una ridotta attivazione di NF- κ B e una ridotta trascrizione dei geni coinvolti nell'infiammazione locale e sistemica da esso mediata.

Se da un lato la comparabile espressione genica di p66^{shc} e l'attivazione di ERK1/2 nei pazienti con sindrome di Bartter e Gitelman rispetto ai controlli sani sottolinea ancora una volta il fatto che in questi pazienti il segnale dell'Ang II mediato dai recettori AT1 è in qualche modo smorzato, dall'altro la maggior espressione di I κ B nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman rispetto ai controlli sani sottolinea che in questi pazienti non c'è solo un blocco del segnale proinfiammatorio, ma anche un'attivazione del segnale antinfiammatorio.

Questi risultati, anche se in modo indiretto, sono a favore della possibilità che nei pazienti con sindrome di Bartter e Gitelman, caratterizzati da alte concentrazioni di Ang II e ridotto signaling cellulare mediato dal recettore AT1, l'Ang II possa svolgere la sua attività attraverso l'attivazione del recettore AT2 determinando quegli effetti da noi già dimostrati in questi pazienti come l'aumentata attivazione del sistema del NO (Calò et al, 2008), ma soprattutto una "downregulation" del sistema RhoA/Rho Kinasi (Calò et al, 2005). Rho Kinasi infatti media l'attivazione di ERK1/2 ed una riduzione del suo segnale coincide con i risultati dei nostri studi nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman (Pagnin et al, 2004; Pagnin et al, 2005).

Per avere una dimostrazione più diretta del coinvolgimento del recettore AT2, abbiamo esplorato direttamente il signaling di Ang II attraverso questo recettore valutando l'attivazione di ERK1/2 e confrontandola con lo stato di espressione della MKP-1. Questa fosfatasi è infatti attivata dalla stimolazione del recettore AT2 dell'Ang II e la sua attivazione defosforila e quindi inattiva le MAPKs. Infine, per provare

definitivamente il ruolo del recettore AT2 in questo meccanismo, gli stessi esperimenti sono stati effettuati in presenza o meno di PD123319, un bloccante del recettore AT2.

Abbiamo osservato che il time course della fosforilazione di ERK1/2 in risposta all'Ang II in colture cellulari di fibroblasti si differenzia tra i pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman e i soggetti di controllo sani normotesi. I fibroblasti dei controlli dopo incubazione con Ang II 250 nM hanno mostrato, infatti, un prolungato aumento della fosforilazione della ERK1/2 comparata alla più breve durata di incremento dell'attivazione di ERK1/2 nei pazienti con sindrome di Bartter e Gitelman.

Questi risultati non possono essere attribuiti a differenze dei livelli di espressione del recettore AT2 nei fibroblasti perché è stato osservato sperimentalmente che il loro livello era sovrapponibile tra i due gruppi in esame.

L'aggiunta dell'inibitore del recettore AT2, il PD123319, alterava la risposta in termini di fosforilazione di ERK1/2 nei pazienti Bartter e Gitelman, risultando quest'ultima prolungata come quella osservata nei soggetti di controllo. Nei soggetti di controllo invece, l'incubazione con PD123319 non altera la risposta di fosforilazione della ERK1/2. Questi risultati confermano la presenza del segnale mediato dal recettore AT2 nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman e può inoltre spiegare l'assenza delle complicazioni a lungo termine associate agli alti livelli di Ang II, come l'ispessimento medio intimale carotideo e l'ipertrofia ventricolare sinistra () che sono comuni agli stati caratterizzati da elevati livelli di Ang II come l'ipertensione, ma che non sono state trovate nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman (Calò et al, 2008; Calò et al, 2008).

Date per note le alterazioni nella fosforilazione della ERK1/2 e il fatto che MKP-1 è direttamente associata al segnale mediato dal recettore AT2 (Naesens et al, 2004), in questi studi abbiamo anche caratterizzato la risposta della MKP-1 in termini di livelli di proteina in risposta all'Ang II. MKP-1, la cui espressione è stato osservato essere correlata all'attivazione di ERK1/2 (Sun et al, 1993; Brondello et al, 1997; Brondello et al, 2000), mostra un significativo aumento a 30 minuti, in corrispondenza al decremento della fosforilazione di ERK1/2 seguita dal ritorno a livelli basali a 60 minuti nei pazienti con sindrome di Bartter e Gitelman, mentre i livelli proteici di MKP-1 nei fibroblasti di controllo non cambiano. La preincubazione con PD123319 abolisce l'incremento di MKP-1 a 30 minuti nei pazienti mentre non ha alcun effetto nei risultati ottenuti per i soggetti di controllo. In precedenti studi è già stato riportato in vitro che l'attività e l'espressione genica di MKP-1 è legata al segnale del recettore AT2 (Steckelings et al, 2005). I nostri risultati quindi sono i primi a riportare nell'uomo che il segnale mediato da AT2 controlla i livelli proteici di MKP-1. In aggiunta i nostri studi sono i primi a riportare che i livelli di espressione proteica di AT2 nei fibroblasti sono

paragonabili tra pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman rispetto ai controlli sani normotesi.

L'incremento di MKP-1 osservato nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman può spiegare la breve durata di fosforilazione di ERK1/2 trovata nei fibroblasti di questi pazienti. Il fatto che il declino della fosforilazione della ERK1/2 nei pazienti corrisponda allo stesso tempo di incremento dei livelli di espressione proteica di MKP-1 e poi che la preincubazione con PD123319 abolisca entrambi gli effetti suggerisce fortemente che l'MKP-1 è il principale effettore nell'alterare lo stato di fosforilazione dell'ERK1/2.

Recentemente è emerso un ruolo importante per l'enzima ACE2, un omologo dell'enzima di conversione dell'angiotensina II (ACE); ACE ed ACE2 sono responsabili rispettivamente della produzione dell'angiotensina II e dell'angiotensina 1-7 (Ang 1-7), un potente vasodilatatore, noto per avere effetti biologici opposti a quelli dell'Ang II (Ferrario et al, 1997; Iyer et al, 1998; Santos et al, 2007). La rilevanza fisiopatologica dell'ACE2 è supportata dall'espressione alterata che si riscontra nelle disfunzioni cardiache, vascolari e renali (Zisman et al, 2003; Ishiyama et al, 2004; Tikellis et al, 2006). Questi risultati incrementano l'evidenza che ACE2 è coinvolto nella patofisiologia dell'ipertensione (Ca et al, 2003). Studiare il ruolo dell'ACE2 in queste patologie e in quelle dove gli effetti sono mediati dall'Ang II o dall'Ang 1-7 potrebbe dare informazioni utili per identificare nuovi target di terapia (Ferreira et al, 2008; Batlle et al, 2008). Nei nostri studi abbiamo utilizzato i pazienti Bartter e Gitelman per esaminare i livelli di ACE2 e Ang 1-7. Le peculiari caratteristiche di questi pazienti consentono infatti di studiare altri aspetti del signaling dell'Ang II come, ad esempio, il sistema dell'ACE2/Ang 1-7, e i segnali che derivano da altri recettori che coinvolgono il segnale dell'Ang II come l'Ang 1-7.

I risultati da noi ottenuti mostrano che i livelli di ACE2 nei pazienti Bartter e Gitelman sono significativamente aumentati se paragonati a soggetti sani e pazienti ipertesi. Inoltre si osserva che anche i livelli di Ang 1-7 sono aumentati in pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman rispetto agli altri due gruppi.

E' ben documentata che l'attività vasodilatatrice dell'Ang 1-7 è endotelio dipendente (Santos et al, 2005) e che il suo legame può stimolare la produzione di ossido nitrico, prostaglandine o fattori di rilassamento endotelio- dipendenti (Ferreira et al, 2005; Ferrario et al, 2006). Ang 1-7 induce il rilascio di ossido nitrico attraverso il controllo di fosforilazione/defosforilazione dell'ossido nitrico sintasi (eNOS). Ang 1-7 ha anche un effetto antiproliferativo nelle cellule della muscolatura liscia vasale e blocca l'induzione della proliferazione della neointima attraverso la riduzione dell'attività dell'extracellular signal regulated Kinase (ERK1/2) (Tallant et al, 2003). Inoltre, Ang

1-7 attenua significativamente la produzione di specie reattive all'ossigeno indotte da Ang II (Santos et al, 2007; Sampaio et al, 2005).

Pertanto, l'incremento del sistema ACE2 e Ang 1-7 trovato nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman, concorda perfettamente con le caratteristiche biochimiche, emodinamiche e cliniche di questi pazienti come l'aumento dell'espressione di eNOS, l'incremento della produzione di NO (Calò et al, 2006; Calò et al, 2008; Calò et al, 1999; Calò et al, 1996) e la riduzione di stress ossidativo (Calò et al, 1998; Calò et al, 2003), la normotensione, la mancanza di rimodellamento cardiovascolare (Calò et al, 2008; Calò et al, 2008) e l'aumento della sensibilità insulinica (Davis et al, 2006). I correnti studi suggeriscono che anche ACE2 e Ang 1-7 prendono parte al meccanismo responsabile della ridotta iporeattività vascolare e rimodellamento cardiovascolare nei pazienti ipertesi.

In conclusione, i risultati del presente studio dimostrano nei pazienti con sindromi di Bartter e Gitelman la presenza del segnale mediato dal recettore AT₂ ed una attivazione del sistema ACE2/Ang 1-7 e possono aiutare a spiegare la ridotta risposta agli effetti sia a breve che lungo termine dell'Ang II in questi pazienti come il ridotto tono vascolare (Naesens et al, 2004), la ridotta regolazione del tono vascolare (Calò et al, 2006; Calò et al, 2004; Calò et al, 2002; Calò et al, 2001), il ridotto stress ossidativo (Calò et al, 2003; Calò et al, 1998) e la mancanza di rimodellamento cardiovascolare (Calò et al, 2008; Calò et al, 2008) a dispetto degli alti livelli di Ang II. Questi risultati, inoltre, aiutano a fornire una più approfondita conoscenza dei meccanismi coinvolti in quanto suggeriscono che MKP-1 è un effettore significativo nel controllo della fosforilazione della ERK1/2 e, infine, offrono un ulteriore sostegno per la proposta di un ruolo del signaling del recettore AT₂R tra gli effetti dei farmaci bloccanti il recettore AT₁ (ARBs) che vanno al di là del blocco di questo recettore.

I risultati di questo studio assieme a quelli ottenuti in precedenza dal nostro gruppo sui pazienti affetti da sindrome di Bartter e Gitelman contribuiscono a dare una interpretazione razionale del meccanismo fisiopatologico che lega infiammazione, ipertensione e sue complicanze a lungo termine come il rimodellamento cardiovascolare e l'aterosclerosi nell'uomo e sottolineano il ruolo critico svolto dall'Ang II nel controllo di processi di biologia vascolare in generale, ma anche l'importanza delle vie secondarie del RAAS Poiché inoltre i pazienti con sindrome di Bartter e Gitelman sono l'immagine speculare dell'ipertensione arteriosa, i dati sottolineano ancora una volta l'utilità di questo modello umano per lo studio di meccanismi biochimici cellulari che sono coinvolti nella fisiopatologia cardiovascolare.

Bibliografia

Abadir PM, Periasamy A, Carey RM, Siragy HM. *Angiotensin II type 2 receptor bradykinin B2 receptor functional heterodimerization*. Hypertension. 2006;48:316-322.

Albrecht D. *Angiotensin-(1-7)-induced plasticity changes in the lateral amygdala are mediated by COX-2 and NO*. Learn Mem. 2007 Mar 8;14(3):177-84.

Ali N, Agrawal DK. *Guanine nucleotide binding regulatory proteins: their characteristics and identification*. J Pharmacol Toxicol Methods. 1994 Dec;32(4):187-96. Review.

Atlas SA. *The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition*. J Manag Care Pharm. 2007 Oct;13(8 Suppl B):9-20. Review.

Battle D, Soler MJ and Wysocki J. *New aspects of the renin-angiotensin system: angiotensin converting enzyme 2 – a potential target for treatment of hypertension and diabetic nephropathy*. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2008;17:250–257.

Benter IF, Yousif MH, Dhaunsi GS, Kaur J, Chappell MC, Diz DI. *Angiotensin-(1-7) prevents activation of NADPH oxidase and renal vascular dysfunction in diabetic hypertensive rats*. Am J Nephrol. 2008;28(1):25-33.

Berridge MJ. *Inositol trisphosphate and calcium signalling*.g Nature. 1993 Jan 28;361(6410):315-25. Review.

Bowie A, O'Neill LA. *Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries*. Biochem Pharmacol. 2000 Jan 1;59(1):13-23. Review.

Brondello JM, Pouysségur J, McKenzie FR. *Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation*. Science. 1999;286:2514-2517.

Ca Yagil Y, Yagil C. *Hypothesis: ACE2 modulates blood pressure in the mammalian organism*. Hypertension. 2003; 41: 871–873.

Calò L, Cantaro S, Calabro A et al. *Endothelium-derived vasoactive substances in Bartter's syndrome*. Angiology. 1995; 46: 905–913.

Calò L, Ceolotto G, Milani M, Pagnin E, van den Heuvel LP, Sartori M, Davis PA, Costa R, Semplicini A. *Abnormalities of Gq-mediated cell signaling in Bartter and Gitelman syndromes*. Kidney Int. 2001;60:882-889.

Calò L, D'Angelo A, Cantaro S, Bordin MC, Favaro S, Antonello A, et al. *Increased urinary NO₂⁻/NO₃⁻ and cyclic GMP levels in patients with Bartter's syndrome: relationship to vascular reactivity*. Am J Kidney Dis. 1996; 27:874-879.

- Calò L, D'Angelo A, Cantaro S, Rizzolo M, Favaro S, Antonello A, Borsatti A. *Intracellular calcium signalling and vascular reactivity in Bartter's syndrome*. Nephron. 1996;72(4):570-3.
- Calò L, Davis PA, Milani M, Cantaro S, Antonello A, Favaro S, et al. *Increased endothelial nitric oxide synthase mRNA level in Bartter's and Gitelman's syndrome. Relationship to vascular reactivity*. Clin Nephrol. 1999; 51:12-17.
- Calò L, Davis PA, Semplicini A. *Control of vascular tone in the syndromes of Bartter and Gitelman*. Crit Rev Clin Lab Sci. 2000 Dec;37(6):503-22. Review.
- Calò L, Davis PA, Semplicini A. *Reduced content of alpha subunit of Gq protein content in monocytes of Bartter and Gitelman syndromes: relationship with vascular hyporeactivity*. Kidney Int. 2002 Jan;61(1):353-4.
- Calò L, Sartore G, Bassi A, Basso C, Bertocco S, Marin R, Zambon S, Cantaro S, D'Angelo A, Davis PA, Manzato E, Crepaldi G. *Reduced susceptibility to oxidation of low-density lipoprotein in patients with overproduction of nitric oxide (Bartter's and Gitelman's syndrome)*. J Hypertens. 1998 Jul;16(7):1001-8.
- Calò LA, Davis PA, Pagnin E, Schiavo S et al. *Linking inflammation and hypertension in humans: studies in Bartter's/Gitelman's syndrome patients*. J Hum Hypertens. 2007 Nov 29.
- Calò LA, Davis PA, Palatini P, Semplicini A and Pessina AC. *Urinary albumin excretion, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: study in Bartter's/Gitelman's syndromes and relevance for hypertension*. J Hum Hypertens. 2007;21:904-906.
- Calò LA, Davis PA, Semplicini A. *Bartter's/Gitelman's syndrome: a model for the relationships between hypertension, angiotensin II, oxidative stress and remodeling*. Clin Nephrol. 2003 May;59(5):393-4.
- Calò LA, Montisci R, Schiavo S, Pagnin E, Ruscazio M, Semplicini A, Pessina AC. *Absence of cardiac remodeling in a high angiotensin II state (Bartter's and Gitelman's syndromes). Implications for angiotensin II signaling pathways*. J Hypertens. 2008; 26 Suppl 1: S513 (Abstract).
- Calò LA, Pagnin E, Ceolotto G, Davis PA, Schiavo S, Papparella I, Semplicini A, Pessina AC. *Silencing regulator of G protein signaling-2 (RGS-2) increases angiotensin II signaling: insights into hypertension from findings in Bartter's/Gitelman's syndromes*. J Hypertens. 2008;26:938-945.
- Calò LA, Pagnin E, Davis PA, Sartori M, Ceolotto G, Pessina AC, Semplicini A. *Increased expression of regulator of G protein signaling-2 (RGS-2) in Bartter's/Gitelman's syndrome. A role in the control of vascular tone and implication for hypertension*. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Aug;89(8):4153-7.
- Calò LA, Pagnin E, Davis PA, Sartori M, Semplicini A, Pessina AC. *Rho kinase inhibition and vascular protection: support from studies in Bartter and Gitelman syndrome*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Apr;25(4):e34.

Calò LA, Pagnin E, Davis PA, Sartori M, Semplicini A. *Oxidative stress-related factors in Bartter's and Gitelman's syndromes: relevance for angiotensin II signalling*. Nephrol Dial Transplant. 2003 Aug;18(8):1518-25.

Calò LA, Pagnin E, Sartori M, Semplicini A, Pessina AC. *Bartter's and Gitelman's syndromes: a confirm in humans of the utility of Rho kinase inhibition for cardiovascular protection*. J Hypertens. 2005 Jun;23(6):1273-5.

Calò LA, Pessina AC, Semplicini A. *Angiotensin II signaling in the Bartter's and Gitelman's syndromes, a negative human model of hypertension*. High Blood Press Cardiovasc Prev. 2005;12:17-26.

Calò LA, Pessina AC. *RhoA/Rho-kinase pathway: much more than just a modulation of vascular tone. Evidence from studies in humans*. J Hypertens. 2007;25:259-264.

Calò LA, Puato M, Schiavo S, Zanardo M, Tirrito C, Pagnin E, Balbi G, Davis PA, Palatini P and Pauletto P. *Absence of vascular remodelling in a high angiotensin-II state (Bartter's and Gitelman's syndromes): implications for angiotensin II signalling pathways*. Nephrol Dial Transplant. 2008; 23:2804-2809.

Calò LA. *Vascular tone control in humans: the utility of studies in Bartter's/Gitelman's syndromes*. Kidney Int 2006; 69:963-966.

Calò L, Davis PA, Semplicini A. *Reduced content of alpha subunit of Gq protein in monocytes of Bartter and Gitelman syndromes: relationship with vascular hyporeactivity*. Kidney Int. 2002;61:353-354.

Camici GG, Schiavoni M et al. *Genetic deletion of p66(Shc) adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Mar 20;104(12):5217-22.

Carey RM, Jin X, Wang Z, Siragy HM. *Nitric oxide: a physiological mediator of the type 2 (AT2) angiotensin receptor*. Acta Physiol Scand. 2000 Jan;168(1):65-71. Review.

Carey RM, Jin XH, Siragy HM. *Role of the angiotensin AT2 receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications*. Am J Hypertens. 2001 Jun;14(6 Pt 2):98S-102S. Review.

Carmine Savoia and Ernesto L. Schiffrin. *Angiotensin type 2 receptors in the cardiovascular system*. High Blood Press Cardiovascular Prev. 2007; 14(2): 63-68.

Carvalho MB, Duarte FV, Faria-Silva R, Fauler B, da Mata Machado LT, de Paula RD, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. *Evidence for Mas-mediated bradykinin potentiation by the angiotensin-(1-7) nonpeptide mimic AVE 0991 in normotensive rats*. Hypertension. 2007 Oct;50(4):762-7.

Cauwels A, Bultinck J, Brouckaert P. *Dual role of endogenous nitric oxide in tumor necrosis factor shock: induced NO tempers oxidative stress*. Cell Mol Life Sci. 2005 Jul;62(14):1632-40.

- Ciedel CL. *Regulation of vascular smooth muscle contraction*. Fed Proc 1984;43:2390-8.
- Clementi E. *Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis*. Biochem Pharmacol. 1998 Mar 15;55(6):713-8. Review.
- Cosentino F, Savoia C, De Paolis P, Francia P, Russo A, Maffei A, Venturelli V, Schiavoni M, Lembo G, Volpe M. *Angiotensin II type 2 receptors contribute to vascular responses in spontaneously hypertensive rats treated with angiotensin II type 1 receptor antagonists*. Am J Hypertens. 2005 Apr;18(4 Pt 1):493-9.
- Crackower MA, Sarao R, Oudit GY et al. *Angiotensin converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function*. Nature. 2002; 417: 822–828.
- Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. *Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function*. Nature. 2002;417:822–828.
- Czyz M. *Specificity and selectivity of the NFkappaB response*. Postepy Biochem. 2005;51(1):60-8. Review.
- Das UN. *Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule?* Med Sci Monit. 2005 May;11(5):RA155-162.
- Davis MJ, Hill MA. *Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response*. Physiol Rev. 1999 Apr;79(2):387-423. Review.
- Davis PA, Mussap M, Pagnin E, Bertipaglia L, Savica V, Semplicini A, Calò LA. *Early markers of inflammation in a high angiotensin II state--results of studies in Bartter's/Gitelman's syndromes*. Nephrol Dial Transplant. 2006 Jun;21(6):1697-701.
- Davis PA, Pagnin E, Semplicini A, Avogaro A and Calò LA. *Insulin signaling, glucose metabolism and the angiotensin II signaling system. Studies in Bartter's/Gitelman's syndromes*. Diabetes Care 2006; 29:469-471.
- De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. Pharmacol Rev. 2000 Sep;52(3):415-72. Review.
- De Winther MP, Kanters E et al. *Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 May;25(5):904-14.
- Di Virgilio F, Calò L, Cantaro S, Favaro S, Piccoli A, Borsatti A. *Resting and stimulated cytosolic free calcium levels in neutrophils from patients with Bartter's syndrome*. Clin Sci (Lond). 1987 Apr;72(4):483-8.
- Donoghue N, Yam PT, Jiang XM, Hogg PJ. *Presence of closely spaced protein thiols on the surface of mammalian cells*. Protein Sci. 2000 Dec;9(12):2436-45.

Duff, J.L., Marrero, M.B., Paxton, W.G., Charles, C.H., Lau, L.F., Bernstein, K.E. & Berk, B.C. *Angiotensin II induces 3CH134, a protein – tyrosin phosphatase, in vascular smooth muscle cells.* J. Biol. Chem. 1993; 268:26037 – 26040.

Dzau VJ. Theodore. *Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis.* Hypertension. 2001 Apr;37(4):1047-52.

Fernandes L, Fortes ZB, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, Catelli De Carvalho MH. *Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo.* Hypertension. 2001 Feb;37(2 Part 2):703-9.

Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. *Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7).* Hypertension. 1997; 30: 535–541.

Ferrario CM. *Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation.* Hypertension. 2006; 47:515–521.

Ferreira AJ, Raizada MK. *Are we poised to target ACE2 for the next generation of antihypertensives?* J Mol Med. 2008;86:685-690.

Ferreira AJ, Raizada MK. *Are we poised to target ACE2 for the next generation of antihypertensives?* J Mol Med. 2008;86:685-690.

Ferreira AJ, Santos RAS. *Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7).* Braz J Med Biol Res. 2005; 38:499–507.

Fischer TA, Singh K, O'Hara DS, Kaye DM, Kelly RA. *Role of AT1 and AT2 receptors in regulation of MAPKs and MKP-1 by ANG II in adult cardiac myocytes.* Am J Physiol. 1998 Sep;275(3 Pt 2):H906-16.

Fleming I. *Signaling by the angiotensin-converting enzyme.* Circ Res. 2006 Apr; 14;98(7):887-96. Review.

Force T, Bonventre JV. *Growth factors and mitogen-activated protein kinases.* Hypertension. 1998 Jan;31(1 Pt 2):152-61. Review.

Fuchs SY, Chen A, Xiong Y, Pan Z-Q and Ronai Z. *HOS, a human homolog of Slimb, forms an SCF complex with Skp1 and Cullin1 and targets the phosphorylation-dependent degradation of IkappaB and beta-catenin.* Oncogene. 1999; 18:2039 ± 2046.

Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. *Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells.* Trends Pharmacol Sci. 2001 Jan;22(1):32-9. Review.

Ghosh S, May MJ and Kopp EB. *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.* Annu. Rev.Immunol. 1998; 16:225 ± 260.

Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pelliccia G, Luzi L, Minucci S, Marcaccio M, Pinton P, Rizzuto R, Bernardi P, Paolucci F, Pellicci PG. *Electron transfer between cytochrome c and p66^{shc} generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis.* Cell. 2005; 122:221-233.

- Graiani G, Lagrasta C et al. *Genetic deletion of the p66Shc adaptor protein protects from angiotensin II-induced myocardial damage*. Hypertension. 2005 Aug;46(2):433-40.
- Griendling KK, FitzGerald GA. *Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies*. Circulation. 2003; 108: 2034–2040.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res. 2000 Mar 17;86(5):494-501. Review.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassègue B, Alexander RW. *Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts*. Hypertension. 1997 Jan;29(1 Pt 2):366-73.
- Gudi T, Chen JC, Casteel DE, Seasholtz TM, Boss GR, Pilz RB. *cGMP-dependent protein kinase inhibits serum-response element-dependent transcription by inhibiting rho activation and functions*. J Biol Chem. 2002 Oct 4;277(40):37382-93.
- Hamaguchi A, Kim S, Yano M, Yamanaka S, Iwao H. *Activation of glomerular mitogen-activated protein kinases in angiotensin II-mediated hypertension*. J Am Soc Nephrol. 1998;9:372–80.
- Hansen JL, Servant G, Baranski TJ, Fujita T, Iiri T, Sheikh SP. *Functional Reconstitution of the Angiotensin II Type 2 Receptor and Gi Activation*. Circ Res. 2000; 87:753-759.
- Hansson GK. *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med. 2005 Apr 21;352(16):1685-95. Review.
- Haurani MJ, Pagano PJ. *Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease?* Cardiovasc Res. 2007 Sep 1;75(4):679-89. Review.
- Heximer SP, Knutsen RH, Sun X, Kaltenbronn KM, Rhee MH, Peng N, Oliveira-dos-Santos A, Penninger JM, Muslin AJ, Steinberg TH, Wyss JM, Mecham RP, Blumer KJ. *Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice*. J Clin Invest. 2003 Apr;111(8):1259.
- Himmelfarb J. *Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg?* Semin Dial 2004; 17: 449–454.
- Hirakata H, Fouad-Tarazi FM, Bumpus FM, Khosla M, Healy B, Husain A, Urata H, Kumagai H. *Angiotensins and the failing heart. Enhanced positive inotropic response to angiotensin I in cardiomyopathic hamster heart in the presence of captopril*. Circ Res. 1990 Apr;66(4):891-9.
- Hiroi Y, Hiroi J, Kudoh S, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. *Two distinct mechanisms of angiotensin II-induced negative regulation of the mitogen-activated protein kinases in cultured cardiac myocytes*. Hypertens Res. 2001 Jul;24(4):385-94.
- Hollinger S, Hepler JR. *Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signalling*. Pharmacol Rev. 2002 Sep;54(3):527-59. Review.

Horiuchi, M., Hayashida, W., Kambe, T., Yamada, T. & Dzau, V.J. *Angiotensin type 2 receptor or dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis*. J. Biol. Chem. 1997; 272:19022 – 19026.

Immenschuh S, Ramadori G. *Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target*. Biochem Pharmacol. 2000 Oct 15;60(8):1121-8.

Ishiyama Y, Gallagher PE, Averill DB, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM. *Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors*. Hypertension. 2004; 43:970–976.

Iyer SN, Chappell MC, Averill DB, Diz DI, Ferrario CM. *Vasodepressor actions of angiotensin-(1–7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan*. Hypertension. 1998; 31: 699–705.

Jin L, Ying Z, Webb RC. *Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Oct;287(4):H1495-500.

Johns DG, Dorrance AM, Leite R, Weber DS, Webb RC. *Novel signaling pathways contributing to vascular changes in hypertension*. J Biomed Sci. 2000 Nov-Dec;7(6):431-43.

Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T.J. *Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition*. Biol Chem. 1993 Nov 25;268(33):24543-6.

Karin M and Delhase M. *The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling*. Semin Immunol. 2000 Feb;12(1):85-98. Review.

Karin M. *How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex*. Oncogene. 1999; 18:6867 ± 6874.

Katovich MJ, Grobe JL, Raizada MK. *Angiotensin-(1-7) as an antihypertensive, antifibrotic target*. Curr Hypertens Rep. 2008 Jun;10(3):227-32. Review.

Kleta R, Bockenhauer D. *Bartter syndromes and other salt-losing tubulopathies*. Nephron Physiol. 2006;104(2):p73-80. Review.

Knoers NV, Levtchenko EN. *Gitelman syndrome*. Orphanet J Rare Dis. 2008 Jul 30;3:22. Review.

Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczko W. *The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production*. J Physiol Pharmacol. 2006 Dec;57(4):529-39. Review.

Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczko W. *Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7)*. Hypertension. 2002 Nov;40(5):774-9.

- Kurisu S, Ozono R, Oshima T, Kambe M, Ishida T, Sugino H, Matsuura H, Chayama K, Teranishi Y, Iba O, Amano K, Matsubara H. *Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis*. Hypertension. 2003;41:99-107.
- Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ. *Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin-angiotensin system*. Biochem Pharmacol. 2008 Feb 15;75(4):781-6. Review
- Lassegue B, Griendling KK. *Reactive oxygen species in hypertension*. Am J Hypertens 2004; 17: 852–860.
- Le S, Connors TJ, Maroney AC. *c-Jun N-terminal kinase specifically phosphorylates p66ShcA at serine 36 in response to ultraviolet irradiation*. J Biol Chem. 2001; 276:48332-48336. .
- Le TH and Coffman TM. *RGS2: a “turn-off” in hypertension*. J Clin Invest. 2003;111:441-443.
- Lely AT, Hamming I, van Goor H, Navis GJ. *Renal ACE2 expression in human kidney disease*. J Pathol. 2004;204:587–593.
- Li N, Zimpelmann J, Cheng K, Wilkins JA, Burns KD. *The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1–7 by rat proximal tubules*. Am J Physiol. 2005; 288:F353–F362.
- Liu Y, Gorospe M, Yang C, Holbrook NJ. *Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity and AP-1-dependent gene activation*. J Biol Chem. 1995;270:8377.
- Lopes AG, Soares AC, Santos DP, Fernandes MS, Leão-Ferreira LR, Quintana-Gomes E, Caruso-Neves C. *PLA2/PGE2 are involved in the inhibitory effect of bradykinin on the angiotensin-(1-7)-stimulated Na(+)-ATPase activity of the proximal tubule*. Regul Pept. 2004 Jan 15;117(1):37-41.
- Loscalzo J e Welch G. *Nitric oxide and its role in the cardiovascular system*. Progr cardiovasc. 1995; 38:87-104.
- Lyall F, Dornan ES, McQueen J, Boswell F, Kelly M. *Angiotensin II increases proto oncogene expression and phosphoinositide turnover in vascular smooth muscle cells via the angiotensin II AT1 receptor*. J Hypertens. 1992;10:1463–9.
- Machado RD, Santos RA, Andrade SP. *Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001 Apr;280(4):R994-R1000.
- Machado RD, Santos RA, Andrade SP. *Opposing actions of angiotensins on angiogenesis*. Life Sci. 2000;66(1):67-76.
- Maia LG, Ramos MC, Fernandes L, de Carvalho MH, Campagnole-Santos MJ, Souza dos Santos RA. *Angiotensin-(1-7) antagonist A-779 attenuates the potentiation of bradykinin by captopril in rats* J Cardiovasc Pharmacol. 2004 May;43(5):685-91.

- Maines MD. *The heme oxygenase system and its functions in the brain*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2000 May;46(3):573-85. Review.
- Mancia G, Grassi G. *The new European Society of Hypertension/European Society of Cardiology (ESH/ESC) Guidelines*. Ther Adv Cardiovasc Dis. 2008 Feb;2(1):5-12.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. *Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene*. J Biol Chem. 1993 Aug 15;268(23):17478-88.
- Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S, Takeshita A. *Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans*. Hypertension. 2001 Dec 1;38(6):1307-10.
- Mehta PK and Griendling KK. *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol. 2007 Jan;292(1):C82-97.
- Mercure C, Yogi A, Callera GE, Aranha AB, Bader M, Ferreira AJ, Santos RA, Walther T, Touyz RM, Reudelhuber TL. *Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart*. Circ Res. 2008 Nov 21;103(11):1319-26.
- Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG. *The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals*. Nature. 1999; 402:309-313.
- Mironneau J, Macrez-Leprêtre N. *Modulation of Ca²⁺ channels by alpha 1A- and alpha 2A-adrenoceptors in vascular myocytes: involvement of different transduction pathways*. Cell Signal. 1995 Jul;7(5):471-9. Review.
- Moncada S, Higgs A. *The L-arginine-nitric oxide pathway*. N Engl J Med. 1993 Dec 30;329(27):2002-12. Review.
- Muslin AJ. *MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets*. Clin Sci (Lond). 2008 Oct;115(7):203-18. Review.
- Naesens M, Steels P, Verberckmoes R, Vanrenterghem Y, Kuypers D. *Bartter's and Gitelman's syndromes: from gene to clinic*. Nephron Physiol. 2004;96(3):p65-78. Review.
- Nakajima, M., Hutchinson, H.G., Fujinaga, M., Hayashida, W., Morishita, R., Zhang, L., Horiuchi, M., Pratt, R.E. & Dzau, V.J. (1995). *The angiotensin II type 2(AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1995; 92:10663 – 10667.
- Napoli C, Martin-Padura I, de Nigris F, Giorgio M, Mansueto G, Somma P, Condorelli M, Sica G, De Rosa G, Pelicci PG. *Deletion of the p66shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet*. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(4):2112-2116.

Nath KA, Grande J, Croatt A, Haugen J, Kim Y, Rosenberg ME. *Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor-beta1 and collagen gene expression.* Kidney Int. 1998 Feb;53(2):367-81.

Nathan C. *Points of control in inflammation.* Nature 2002; 446–452.

Nemoto S e Finkel T. *Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway.* Science. 2002; 295:2450-2452.

Oudit GY, Herzenberg AM, Kassiri Z, Wong D, Reich H, Khokha R, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM, Scholey JW. *Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis.* Am J Pathol. 2006;168:1808–1820.

Pagnin E, Davis PA, Sartori M, Semplicini A, Pessina AC, Calò LA. *Rho kinase and PAI-1 in Bartter's/Gitelman's syndromes: relationship to angiotensin II signaling.* J Hypertens. 2004 Oct;22(10):1963-9.

Pagnin E, Semplicini A, Sartori M, Pessina AC, Calò LA. *Reduced mRNA and protein content of rho guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF) in Bartter's and Gitelman's syndromes: relevance for the pathophysiology of hypertension.* Am J Hypertens. 2005 Sep;18(9 Pt 1):1200-5.

Pahl HL. *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors.* Oncogene. 1999; 18:6853 ± 6866.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine Nature.* 1988 Jun 16;333(6174):664-6.

Papparella I, Ceolotto G et al. *Angiotensin II-induced over-activation of p47phox in fibroblasts from hypertensives: which role in the enhanced ERK1/2 responsiveness to angiotensin II?* J Hypertens. 2005 Apr;23(4):793-800.

Pauletto P. and Rattazzi M. *Inflammation and hypertension: the search for a link.* Nephrol Dial Transplant. 2006 Apr;21(4):850-3.

Pinheiro SV, Simões e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, Santos RA. *Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney.* Hypertension. 2004 Oct;44(4):490-6.

Pinton P, Rimessi A, Marchi S, Orsini F, Migliaccio E, Giorgio M, Contursi C, minucci S, Mantovani F, Wieckowski MR, Del Sal G, Pelicci PG, Rizzuto R. *Protein kinase C and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66shc.* Science. 2007; 315:659-663.

Polizio AH, Gironacci MM, Tomaro ML, Peña C. *Angiotensin-(1-7) blocks the angiotensin II-stimulated superoxide production.* Pharmacol Res. 2007 Jul;56(1):86-90.

- Raman, M., Chen, W. and Cobb, M. H. *Differential regulation and properties of MAPKs*. *Oncogene*. 2007; 26, 3100–3112.
- Raz A, Gamliel-Lazarovich A, Bogner I, Strigevsky A, Keidar S. *The importance of ACE2 in regulating the cardiovascular system*. *Harefuah*. 2007 Sep;146(9):703-6, 733. Review.
- Robinson MJ, Cobb MH. *Mitogen-activated protein Kinase pathways*. *Current Opinion in Cell Biology*. 1997;9:180-186.
- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O et al. *Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney*. *Kidney Int*. 2002; 62 [Suppl 82]: 12–22.
- Rüster C, Wolf G. *Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease*. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov;17(11):2985-91. Review.
- Sampaio WO, Santos RAS, Gratton JP, et al. *Angiotensin-(1–7) negatively modulates angiotensin II in human endothelial cells*. *Hypertension*. 2005;46:820.
- Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schifffrin EL, Touyz RM. *Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways*. *Hypertension*. 2007 Jan;49(1):185-92.
- Santos RA, Ferreira AJ, Simões E Silva AC. *Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis*. *Exp Physiol*. 2008 May;93(5):519-27. Review.
- Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. *Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8258-63.
- Santos RAS and Ferreira AJ. *Angiotensin-(1–7) and the renin–angiotensin system*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2007; 16:122–128.
- Santos RAS, Ferreira AJ, Pinheiro SV, et al. *Angiotensin-(1–7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs*. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005; 14:1019–1031.
- Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. *Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle*. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21722-9.
- Savoia C and Schifffrin EL. *Inflammation in hypertension*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006 Mar;15(2):152-8.

- Savoia C and Schiffrin EL. *Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions*. Clin Sci (Lond). 2007 Jun;112(7):375-84.
- Savoia C, Tabet F, Yao G, Schiffrin E, Touyz R. *Negative regulation of Rho/Rho kinase by angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells: role in angiotensin II-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. J Hypertens. 2005; 23:1037-1045.
- Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. *Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Jun;85(11):4095-8.
- Semplicini A, Lenzini L, Sartori M, Papparella I, Calò LA, Pagnin E, Strapazon G, Benna C, Costa R, Avogaro A, Ceolotto G, Pessina AC. *Reduced expression of regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) in hypertensive patients increases calcium mobilization and ERK1/2 phosphorylation induced by angiotensin II*. J Hypertens. 2006 Jun;24(6):1115-24.
- Skultetyova D, Filipova S, Riecanaky I, Skultety J. *The role of angiotensin type 1 receptor in inflammation and endothelial dysfunction*. Recent Patents Cardiovasc Drug Discov. 2007 Jan;2(1):23-7. Review.
- Somlyo AV, Bond M, Somlyo AP, Scarpa A. *Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Aug;82(15):5231-5.
- Song L, Healy DP. *Kidney aminopeptidase A and hypertension, part II: effects of angiotensin II*. Hypertension. 1999 Feb;33(2):746-52.
- Steckelings UM, Kaschina E, Unger TH. *The AT2 receptor—A matter of love and hate*. Peptides. 2005; 26:1401-1409.
- Stoll M, Unger T. *Angiotensin and its AT2 receptor: new insights into an old system*. Regul Pept. 2001 Jun 15;99(2-3):175-82. Review.
- Sun H, Charles CH, Lau LF, Tonks NK. *MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo*. Cell. 1993; 75:487-493.
- Suzuki Y and Ruiz-Ortega M et al. *Inflammation and angiotensin II*. Int J Biochem Cell Biol. 2003 Jun;35(6):881-900.
- Swärd K, Mita M, Wilson DP, Deng JT, Susnjar M, Walsh MP. *The role of RhoA and Rho-associated kinase in vascular smooth muscle contraction*. Curr Hypertens Rep. 2003 Feb;5(1):66-72. Review.
- Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Fujii S, Kitabatake A, Shimokawa H, Takeshita A. *Critical role of Rho-kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin II-induced*

plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 May;21(5):868-73.

Tallant EA, Clark MA. *Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7)*. *Hypertension*. 2003;42:574-579.

Tallant EA, Ferrario CM, and Gallagher PE. *Angiotensin-(1-7)inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the masreceptor*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1560-H1566, 2005.

Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX et al. *Angiotensin II is associated with activation of NF-kB mediated genes and downregulation of PPARs*. *Physiol Genom*. 2002; 11: 21-31.

Thomas GM, Huganir RL. *MAPK cascade signalling and synaptic plasticity*. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Mar;5(3):173-83. Review.

Tikellis C, Cooper ME, Bialkowski K, Johnston CI, Burns WC, Lew RA, Smith AI, Thomas MC. *Developmental expression of ACE2 in the SHR kidney: a role in hypertension?* *Kidney Int*. 2006;70:34-41.

Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, CooperME *Characterization of renal angiotensin converting enzyme 2 in diabetic nephropathy*. *Hypertension*. 2003; 41:392-397.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. *A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase*. *J Biol Chem*. 2000 Oct 27;275(43):33238-43.

Toda N, Ayajiki K, Okamura T. *Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation*. *Pharmacol Rev*. 2007 Mar;59(1):54-87. Review.

Touyz RM. *Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure--implications in the pathogenesis of hypertension*. *Can J Cardiol*. 2000 Sep;16(9):1137-46. Review.

Touyz RM. *Role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension*. *Curr Hypertens Rep*. 2003; 5: 155-164.

Trinei M, Giorgio M, Cicalese A, Barozzi S, Ventura A, Migliaccio E, Milia E, Padura IM, Raker VA, Maccarana M, Petronilli V, Minucci S, Bernardi P, Lanfrancione L, Pelicci PG. *A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis*. *Oncogene*. 2002; 30;21(24):3872-8.

Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T. *Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation*. *J Clin Invest*. 1999 Oct;104(7):925-35.

- Tsuzuki S, Matoba T, Eguchi S, Inagami T. *Angiotensin II type 2 receptor inhibits cell proliferation and activates tyrosine phosphatase*. *Hypertension*. 1996 Nov;28(5):916-8.
- Undurti N Das. *Is angiotensin II an endogenous pro-inflammatory molecule?* *Med Sci Monit*. 2005; 11: 155–162.
- Vaughan DE, Lazos SA, Tong K. *Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis*. *J Clin Invest*. 1995 Mar;95(3):995-1001.
- Volpe M, Musumeci B, De Paolis P, Savoia C, Morganti A. *Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease?* *J Hypertens*. 2003 Aug;21(8):1429-43. Review.
- Wang X, Liu Y. *Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1*. *Cell Signal*. 2007 Jul;19(7):1372-82. Review.
- Watanabe S, Uchida S. *Bartter's syndrome and Gitelman's syndrome: Pathogenesis, pathophysiology, and therapy*. *Nippon Rinsho*. 2006 Feb;64 Suppl 2:504-7. Review.
- Whiteside ST and IsraeËl A. *I kappa B proteins: structure, function and regulation..* *Sem. Cancer Biol*. 1997; 8:75 ±82.
- Wieland T, Lutz S and Chidiac P. *Regulators of G protein signaling: a spotlight on emerging functions in the cardiovascular system*. *Curr Opin Pharmacol*. 2007; 7:1-7.
- Wilcox CS. *Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function*. *Curr Hypertens Rep*. 2002 Apr;4(2):160-6. Review.
- Wu R, Laplante MA, De Champlain J. *Prevention of angiotensin I induced hypertension, cardiovascular hypertrophy and oxidative stress by acetylsalicylic acid in rats*. *J Hypertens*. 2004;22:793–801.
- Wysocki J, González-Pacheco FR, Batlle D. *Angiotensin-converting enzyme 2: possible role in hypertension and kidney disease*. *Curr Hypertens Rep*. 2008;10(1):70-7. Review.
- Wysocki J, Ye M, Soler MJ, Gurley SB, Xiao HD, Bernstein KE, Coffman TM, Chen S, Batlle D. *ACE and ACE2 activity in diabetic mice*. *Diabetes*. 2006; 55:2132–2139.
- Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. *Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 9;93(1):156-60.
- Yamamoto Y, Watari Y, Brydun A, Yoshizumi M, Akishita M, Horiuchi M, Chayama K, Oshima T, Ozono R. *Role of the angiotensin II type 2 receptor in arterial remodeling after wire injury in mice*. *Hypertens Res*. 2008 Jun;31(6):1241-9.
- Ye M, Wysocki J, Naaz P, Salabat MR, LaPointe MS, Batlle D. *Increased ACE2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination?* *Hypertension*. 2004; 43:1120–1125.

Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Battle D. *Glomerular localization and expression of angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes*. J Am Soc Nephrol. 2006;17:3067–3075.

Yoshida H, Kakuchi J, Yoshikawa N, et al. *Angiotensin II type 1 receptor gene abnormality in a patient with Bartter's syndrome*. Kidney Int. 1994;46: 1505-9.

Yoshida M, Naito Y, Urano T, Takada A, Takada Y. *L-158,809 and (D-Ala(7))-angiotensin I/II (1-7) decrease PAI-1 release from human umbilical vein endothelial cells*. Thromb Res. 2002 Mar 15;105(6):531-6.

Zhong H, Neubig RR. *Regulator of G protein signaling proteins: novel multifunctional drug targets*. J Pharmacol Exp Ther. 2001 Jun;297(3):837-45. Review.

Zhou J, Xu X, Liu JJ, Lin YX, Gao GD. *Angiotensin II type 2 receptors participate in the regulation of inflammatory cytokine secretion in adult rat hypertrophied cardiomyocytes*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2008 Nov;28(11):1971-3.

Zisman LS, Keller RS, Weaver B, Lin Q, Speth R, Bristow MR, Canver CC. *Increased angiotensin-(1–7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for up regulation of the angiotensin-converting enzyme homologue ACE2*. Circulation. 2003;108:1707–1712.