

**XV SESSIONE COMUNICAZIONI – RICERCA DI BASE
SALA CABIRIA**

Sabato, 11 Ottobre 2008 – ore 11.15-12.25

POTENZIALE MECCANISMO DI DANNO OSSIDATIVO DEL DNA NEL DIABETE: INATTIVAZIONE DELLA TUBERINA E DOWNREGOLAZIONE DELL'ENZIMA DI RIPARAZIONE DEL DNA OGG1

Simone S.^{1,2}, Gorin Y.¹, Abboud H.E.¹, Schena F.P.², Habib S.L.¹

¹George O'Brien Kidney Research Center, Department of Medicine, University of Texas Health Science Center, Division of Nephrology, San Antonio, United States; ²Department of Emergency and Transplantation, University of Bari, Policlinico, Bari

Introduzione. Lo Stress ossidativo contribuisce alla patogenesi delle complicanze in corso di diabete mellito, quali la nefropatia diabetica. Le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) possono danneggiare il DNA, inducendo modificazioni ossidative come l'8-ossi-deossiguanina (8-oxodG). Recenti studi hanno dimostrato un aumento dei livelli dell'8-oxodG nei leucociti e nelle urine di pazienti microalbuminurici con diabete di tipo I e II. L'enzima di riparazione del DNA, che riconosce e scinde l'8-ossi-dG, è l'8-ossi-dG-DNA glicosilasi (OGG1). OGG1 è regolato dalla tuberina, un prodotto del gene oncosoppressore TSC-2 coinvolto nella via redox-dipendente di trasduzione del segnale insulinico PI-3k/Akt/mTor.

Scopi. Studiare *in vivo* ed *in vitro* il meccanismo attraverso cui, in presenza di elevate concentrazioni di glucosio, i ROS inducono un aumento di 8-ossi-dG ed il ruolo della fosforilazione della tuberina e di OGG1 in questo processo.

Materiali e metodi. Studi *in vivo* È stato indotto un diabete di tipo I in 6 ratti Long Evans, con iniezione endovenosa di streptozotocina. In un gruppo controllo di 6 ratti è stato somministrato buffer citrato in dose equivalente. Gli animali sono stati sacrificati dopo 4 settimane: il tessuto corticale renale è stato utilizzato per analisi biochimiche e per l'isolamento di cellule primarie epiteliali tubulari prossimali (RPTE). Studi *in vitro* Cellule epiteliali tubulari prossimali immortalizzate murine SV-40 (MCT) e RPTE sono state poste in coltura e trattate con Glucosio (25 mM), perossido d'idrogeno (H₂O₂) e/o inibitori di PI-3K e Akt per differenti tempi. La produzione intracellulare di ROS è stata valutata mediante fluorescenza (DCF) attraverso microscopia confocale o misurata con un lettore multiplastra di fluorescenza. I livelli di 8-ossi-dG sono stati misurati mediante immunostochimica e HPLC analisi. L'espressione proteica dell'OGG1 e la fosforilazione della tuberina e di Akt sono state studiate mediante analisi immunoblot.

Risultati. Nella corticale renale dei ratti diabetici l'aumentata fosforilazione di Akt si associa ad un incremento della fosforilazione della tuberina, riduzione dell'espressione proteica di OGG1 ed accumulo di 8-ossi-dG. L'esposizione delle cellule RPTE e delle MCT al Glucosio causa un rapido aumento dei ROS, che correla con la fosforilazione di Akt e della tuberina e con la downregolazione di OGG1. L'inibizione di PI-3K e Akt riduce significativamente la fosforilazione della tuberina e ripristina l'espressione proteica di OGG1. Infine, il processo di fosforilazione di Akt e della tuberina ed il decremento di OGG1, indotti da H₂O₂, sono inibiti dall'antiossidante N-Acetilcisteina.

Conclusioni. La fosforilazione della tuberina e la downregolazione di OGG1, attraverso l'attivazione redox-dipendente di Akt, giocano un ruolo chiave nel danno ossidativo del DNA in corso di diabete.

1

sione coordinata potrebbe indicare l'esistenza di uno o più target comuni. A tal proposito, è particolarmente interessante sottolineare che dall'analisi computazionale con l'algoritmo miRANDA, è emerso che la maggior parte dei geni target dei miRNA modulati nelle linee RCC è coinvolta nei processi di crescita e apoptosi cellulare.

Conclusioni. I risultati preliminari di questo studio dimostrano, per la prima volta, che 45 miRNA sono significativamente modulati nell'RCC e che tale espressione differenziale, così come quella dei rispettivi geni target, potrebbe mediare importanti processi cellulari alla base dei meccanismi patogenetici del carcinoma renale.

RUOLO DEI microRNA NEL CARCINOMA RENALE A CELLULE CHIARE (RCC)

Servedio V.², Gigante M.¹, Schirinzi A.¹, Cavalcanti E.³, Gigante M.¹, Gesualdo L.¹, Ranieri E.¹
¹Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Foggia, Foggia; ²Centro di Ricerca Interdipartimentale "Bioagromed", Università degli Studi di Foggia, Foggia; ³DETO, Università degli Studi di Bari, Bari

Introduzione e obiettivi. I microRNA (miRNA) costituiscono una grande famiglia di geni regolatori e non codificanti, formata da corte sequenze di RNA di 19-25 nucleotidi che si legano a siti parzialmente complementari degli RNA messaggero target regolandone la loro stabilità e traduzione. Recenti studi hanno dimostrato che i microRNA possono controllare la crescita, la differenziazione e l'apoptosi cellulare; infatti, in diversi tipi di tumori l'espressione di alcune di queste piccole molecole regolatrici è alterata, permettendo alle cellule tumorali di crescere in maniera incontrollata. Non esistono ancora dati sull'eventuale ruolo dei microRNA nel carcinoma renale a cellule chiare (RCC), per cui lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare l'espressione di 180 microRNA in differenti linee cellulari di RCC al fine di dimostrarne un loro coinvolgimento nella patogenesi del carcinoma renale e di individuare eventuali geni target.

Metodi. L'RNA totale è stato estratto da due linee cellulari di RCC (RCC-5 and RCC-1) e da una linea di Cellule Epiteliali Tubulari Prossimali (PTEC) e retrotrascritto utilizzando il kit cDNA Archive. Successivamente, ciascun microRNA è stato amplificato mediante Real-Time PCR utilizzando specifiche sonde TaqMan. L'analisi dei Ct è stata realizzata mediante uno studio di espressione relativa utilizzando il miR-let-7a per la normalizzazione dei dati.

Risultati. L'analisi di espressione ha permesso di identificare un gruppo di 45 miRNA differenzialmente espressi nelle linee RCC rispetto alla linea PTEC: 13 miRNA sono risultati down-regolati e 14 miRNA up-regolati. Il fold-change osservato tra le linee cellulari di RCC rispetto alle linee di PTEC è risultato compreso tra -3.39 e -1.08 Log₁₀ (0.0004-0.083 RQ) per i miRNA down-regolati e tra 0.43 e 1.91 Log₁₀ (2.70-82.36 RQ) per i miRNA up-regolati. I miRNA più significativamente modulati sono risultati: miR-183, 191, 199a, 199a*, 199s, 205, 299, 320, 323, 328, 330, 339, 370 (down-regolati) e miR-15a, 19a, 29b, 30e, 96, 106a, 130b, 135a, 141, 301, let-7i, 181a, 181b, 182 (over-espressi). Alcuni geni codificanti per miRNA modulati nelle linee di RCC mappano in specifiche regioni cromosomiche, suggerendo un forte legame tra la loro espressione tumore specifica e alcune anomalie del DNA. In questo studio, è stata riscontrata una significativa modulazione dei microRNA miR-299, miR-323, miR-370, miR-135a e miR-191 che mappano nelle regioni cromosomiche 14q32.31 and 3p21.2, frequentemente riarrangiate nel carcinoma renale.

Tuttavia, questi dati non escludono che l'espressione differenziale di alcuni miRNA possa dipendere dalla modulazione dei rispettivi trascritti. Infatti, alcune isoforme di miRNA down- e up-regolati sono localizzate in differenti regioni cromosomiche e la loro espres-

(segue)

RUOLO DEI RECETTORI CHEMOCHINICI CXCR4 E CXCR7 NELLA MIGRAZIONE E NELLA CAPACITÀ RIGENERATIVA DELLE CELLULE STAMINALI RENALI IN MODELLI MURINI DI INSUFFICIENZA RENALE ACUTA

Lazzeri E.¹, Mazzinghi B.¹, Ronconi E.¹, Sagrinati C.¹, Ballerini L.¹, Angelotti M.L.¹, Parente E.¹, Becherucci F.¹, Netti S.¹, Gesualdo L.¹, Lasagni L.¹, Romagnani P.¹

¹Centro di Eccellenza per la Ricerca, il Trasferimento, e l'Alta Educazione DENOthe, Università degli Studi di Firenze, Firenze; ²Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Foggia, Foggia

Introduzione. Recentemente, abbiamo dimostrato l'esistenza di una popolazione di cellule staminali renali nella capsula di Bowman di reni umani adulti, da noi denominate "adult parietal epithelial multipotent progenitors" (APEMP). Le APEMP sono caratterizzate dall'espressione dei marcatori staminali CD24 e CD133, e se iniettate in topi SCID con insufficienza renale acuta (IRA) migliorano significativamente la funzionalità renale e riducono la fibrosi tissutale contribuendo alla rigenerazione delle cellule tubulari. La migrazione delle cellule staminali verso il tessuto leso è solitamente mediata dalle chemochine. La chemochina SDF-1, attraverso l'interazione con il suo unico recettore CXCR4, svolge un ruolo critico nella migrazione delle cellule staminali di vari organi e tessuti. Tuttavia, recentemente è stato descritto un nuovo recettore di SDF-1, denominato CXCR7.

Scopo. Identificare i fattori coinvolti nella migrazione delle APEMP verso il sito del danno e nei meccanismi rigenerativi per mettere a punto strategie di terapia cellulare del danno renale.

Metodi e risultati. Dopo aver valutato l'espressione di tutti i recettori chemochinici mediante RT-PCR sulle APEMP abbiamo osservato che queste cellule esprimevano alti livelli di CXCR4 e CXCR7, sia in RNA che in proteina ed erano in grado di legare SDF-1, come dimostrato da esperimenti di binding. L'induzione di IRA con iniezione di glicerolo in topi SCID causava nel rene un aumento dell'espressione di SDF-1 in cellule endoteliali e tubulari intorno alle aree necrotiche. In topi con IRA, l'iniezione endovenosa di APEMP migliorava significativamente la funzionalità renale valutata con dosaggio sierico dell'azoto ureico e riduceva il danno tissutale renale. Tuttavia, se le APEMP venivano trattate prima dell'inoculo con anticorpi neutralizzanti anti-CXCR4 e anti-CXCR7 si riduceva significativamente il numero di APEMP reclutate a livello renale, si riduceva l'effetto benefico sulla funzionalità renale e sul ripristino dell'integrità tissutale. Per comprendere i meccanismi alla base di tali effetti, abbiamo valutato i ruoli dei due recettori nella chemiotassi, nella migrazione transendoteliale e nell'adesione a cellule endoteliali delle APEMP. La migrazione ad SDF-1 era completamente inibita solo pretrattando le APEMP con l'anticorpo anti-CXCR4 suggerendo che esso è richiesto per il reclutamento delle nostre cellule. Bloccando i due recettori con anticorpi neutralizzanti, si inibiva il processo di tras migrazione endoteliale, suggerendo che anche il recettore CXCR7 è coinvolto nella migrazione a livello endote-

(segue)

2

liale. Esperimenti di adesione su cellule endoteliali hanno poi dimostrato che il solo blocco del recettore CXCR7, e non di CXCR4, era sufficiente ad inibire il processo di adesione. Inoltre, dato che il reclutamento delle cellule staminali nel tessuto lesa è legato anche al mantenimento della sopravvivenza, abbiamo valutato se l'interazione di SDF-1 con i due recettori poteva proteggere le APEMP dall'apoptosi indotta da H₂O₂. Anche in questo caso, solo CXCR7 e non CXCR4 era responsabile della protezione delle APEMP dall'apoptosi indotta da H₂O₂.

Conclusioni. L'interazione di SDF-1 con entrambi i recettori risulta necessaria per il reclutamento delle APEMP nel rene di topi SCID affetti da IRA e per lo svolgimento della loro capacità rigenerativa. La conoscenza di tale meccanismo è di estrema importanza per la messa a punto di terapie cellulari del danno renale con cellule staminali.

LE CELLULE STAMINALI RENALI LOCALIZZATE NELLA CAPSULA DI BOWMAN RAPPRESENTANO PROGENITORI PODOCITARI, RIGENERANO IL DANNO GLOMERULARE E RIDUCONO LA PROTEINURIA IN UN MODELLO DI SINDROME NEFROSICA IN VIVO

Becherucci F¹, Ronconi E¹, Sagrinati C¹, Angelotti ML¹, Lazzeri E¹, Mazzinghi B¹, Ballerini L¹, Parente E¹, Lasagni L¹, Romagnani P¹
¹Centro di Eccellenza per la Ricerca, il Trasferimento, e l'Alta Educazione DENOthe, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Introduzione. Le malattie glomerulari rappresentano un'ampia gamma di sindromi cliniche caratterizzate prevalentemente da un danno podocitario che progredisce verso la glomerulosclerosi. La comprensione del meccanismo che regola la sostituzione dei podociti danneggiati permetterebbe di chiarire alcuni aspetti della riparazione e della progressione del danno glomerulare. Recentemente, abbiamo dimostrato l'esistenza di cellule staminali residenti al polo urinario della capsula di Bowman di reni umani adulti, denominate "adult parietal epithelial multipotent progenitors" (APEMP), caratterizzate dall'espressione di CD24 e CD133 e dotate di potenziale rigenerativo nei confronti delle cellule tubulari in modelli murini di necrosi tubulare acuta.

Scopo. Data la localizzazione delle APEMP al polo urinario e le loro proprietà di cellule staminali, abbiamo ipotizzato un loro ruolo anche nella rigenerazione podocitaria.

Metodi e risultati. Mediante microscopia confocale su reni umani adulti e mediante analisi FACS, abbiamo individuato l'esistenza di tre popolazioni nella capsula di Bowman: una esprimente solo i marcatori CD133 e CD24 localizzata al polo urinario (APEMP), una eterogenea esprimente sia CD133 e CD24 sia marcatori podocitari (podocalixina, sinaptopodina e CR1) localizzata tra il polo urinario e quello vascolare e una popolazione che esprime solo marcatori podocitari localizzata prevalentemente al polo vascolare della capsula in continuità con i podociti. Dopo separazione immunomagnetica di queste popolazioni dal rene totale, abbiamo osservato che quella CD133+CD24+PDX- esprimeva solo i marcatori delle APEMP e non quelli podocitari, dando origine a cloni con capacità di differenziare sia a cellula tubulare sia a cellula podocitaria se posti in opportuni medium. La popolazione CD133+CD24+PDX+ esprimeva sia i marcatori di APEMP sia i marcatori podocitari (WT1, sinaptopodina, podocalixina, GLEPP e nefrina), mostrava una limitata capacità clonogenica e di autorinnovamento, ed era in grado di differenziare solo in podocita maturo. Infine, la popolazione CD133-CD24-PDX+ esprimeva solo marcatori podocitari, non dava origine a cloni e non mostrava capacità multidifferenziativa, dimostrando di essere costituita solo da podociti maturi. Questi risultati dimostrano l'esistenza di una popolazione di cellule indifferenziate (APEMP) bipotenti, e una popolazione eterogenea di transizione con marcatori podocitari. Quindi, solo le APEMP sono state utilizzate per la riparazione del danno podocitario in topi SCID trattati con adriamicina, che pro-

(segue)

3

voca un danno cronico podocitario con insorgenza di sindrome nefrosica simile a quello presente nella glomerulosclerosi focale segmentale umana. In questo modello, le APEMP si integravano sia nelle strutture glomerulari, acquisendo marcatori podocitari (8.6±2.8% di tutti i podociti), sia a livello tubulare (6.7±1.1% di tutti i tubuli prossimali), apportando un miglioramento della funzionalità renale, riducendo significativamente la proteinuria, il rapporto albumina/creatinina urinaria e il danno sia glomerulare che tubulo interstiziale.

Conclusioni. Questi risultati dimostrano che le APEMP al polo urinario sono progenitori bipotenti in grado di rigenerare anche i podociti e suggeriscono un loro impiego in nuove strategie terapeutiche utili a rallentare o a regredire le malattie glomerulari.



4