

MARKER DI DIFFERENZIAMENTO METANEFRICO ESPRESSI IN CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI UMANE

F. Bianchi^{1,2}, G. La Manna¹, S. Cantoni², C. Cavallini², M.P. Scolari¹, C. Ventura², S. Stefoni¹

¹Istituto di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Ospedale "S. Orsola", Istituto di Cardiologia-INBB, Università degli Studi, Bologna

²Istituto di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Ospedale "S. Orsola", Laboratorio di Biologia Molecolare e Ingegneria delle Cellule Staminali, Istituto di Cardiologia-INBB, Università degli Studi, Bologna

Expression of metanephric differentiation markers in human mesenchymal stem cells

Stem cells are a potential source for the regeneration of many tissues, including damaged kidneys. The present study describes the adoption of hyaluronic-butyrac acid monoesters (HB) to induce expression of nephrogenic genes by mesenchymal cells isolated from human placental membranes. HB at a concentration of 1 mg/mL induces chromatin opening and increases the expression of the observed markers (cadherin 11, CD24, RAR-alpha, stearyl-CoA desaturase 2, 14-3-3 θ, Ewing sarcoma homolog.). These results open new routes toward cell regeneration after kidney injury. (G Ital Nefrol 2009; 26 (Suppl. S45): S64-8)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Differentiation agents, Stem cells, Human mesenchymal stem cells, Foetal membranes

PAROLE CHIAVE:

Agenti differenzianti, Cellule staminali, Differenziamento cellulare, Membrane fetali

✉ Indirizzo dell'Autore:

Dr.ssa Francesca Bianchi
Laboratorio di Biologia Molecolare e Ingegneria delle Cellule Staminali
Istituto di Cardiologia-INBB
Università degli Studi
Ospedale "S. Orsola-Malpighi",
Pad. 21
Via Massarenti, 9
40138 Bologna
e-mail: francibi@alice.it

INTRODUZIONE

Nonostante i continui miglioramenti nel trattamento del danno renale, le malattie renali croniche e l'insufficienza renale terminale sono considerate ancora oggi tra le più importanti emergenze mediche.

In questo contesto, è sempre maggiore l'interesse rivolto alla ricerca di approcci terapeutici alternativi, come la terapia cellulare. L'idea alla base della terapia cellulare consiste nel coadiuvare il processo fisiologico di riparo attraverso il trapianto di cellule esogene che siano strutturalmente e funzionalmente congruenti alla logica tissutale renale. La possibilità di disporre di cellule staminali in grado di rigenerare il danno renale rappresenterebbe una prospettiva molto importante per la prevenzione e la terapia di eventuali danni renali.

Il destino delle cellule staminali è fisiologicamente determinato sia da regolatori interni che dall'ambiente

extracellulare. Ottenere tramite specifiche metodiche di induzione uno specifico differenziamento cellulare sarebbe essenziale non solo per i possibili usi terapeutici, ma anche per chiarire i meccanismi molecolari che intervengono nello sviluppo.

A tale scopo abbiamo recentemente sviluppato, monoesteri di acido ialuronico e butirrico (HB), ed esteri misti dell'acido ialuronico con l'acido butirrico e l'acido retinoico (HBR). Il razionale alla base della sintesi delle molecole è basato sull'attività dei singoli componenti: l'internalizzazione della molecola attraverso il legame dell'acido ialuronico al suo recettore CD44 e le successive modificazioni epigenetiche mediate dal butirrato, che determina l'apertura della cromatina con conseguente aumento dell'accessibilità dei fattori di crescita al DNA, e dell'acido retinoico, che potenzia la trascrizione genica.

In questo studio abbiamo usato cellule staminali

mesenchimali (MSC) isolate da membrane fetali di placenta a termine (FMhMSCs), come fonte alternativa di MSC, e abbiamo indagato se l'esposizione ad HB o HBR potesse indurre il differenziamento di queste cellule in progenitori renali o endoteliali.

MATERIALI E METODI

Cellule

Le cellule staminali mesenchimali utilizzate derivano da placente a termine di madri donatrici sane operate con sezione cesaria con procedure approvate dal comitato etico. Tutti i campioni sono ottenuti con consenso informato.

La placenta viene digerita con tripsina-EDTA (Sigma) allo 0.25%. Successivamente il sovrantante viene eliminato e il tessuto residuo viene sottoposto ad una seconda digestione con tripsina-EDTA allo 0.25%, 10 U/mL di DNaseI (Invitrogen) e collagenasi allo 0.1% in (Sigma-Aldrich). Il sovrantante ottenuto viene neutralizzato con siero fetale bovino (FBS-Calbiochem) e centrifugato a 1500 rpm per 10 minuti. Il pellet cellulare viene risospeso in 5 mL di terreno di coltura contenente DMEM, FBS al 20%, penicillina (10 U/mL) e streptomicina (100 mg/mL). Le cellule vengono seminate in fiasche da 25 cm² e lasciate in coltura a 37 °C al 5% di CO₂. Le cellule non edrenti vengono rimosse dopo una settimana e il terreno (con 10% di FBS) viene cambiato ogni 4 giorni.

Analisi citofluorimetrica

Le cellule sono state staccate con EDTA-tripsina (0.05%) e incubate con 1 µg/10⁶ cellule di per 40 minuti a 4 °C al buio. Gli anticorpi usati sono: CD105 (Chemicon), CD73, CD90, CD29, CD166, CD14,

TABELLA I - PERCENTUALE DI ESPRESSIONE ANTIGENICA DELLE FMHMSCS. LE FMHMSCS SONO POSITIVE PER CD73, CD105, CD29, CD166, CD44 E NEGATIVE PER CD14, CD34, CD45

Antigene	hFM-MSC
CD73	95±4
CD105	96±3
CD29	98±1
CD166	95±2
CD44	98±2
CD14	0
CD34	0
CD45	0

CD34, CD44, CD45 (Becton Dickinson).

Per l'analisi citofluorimetrica, effettuata con lo strumento FACSAria (Becton Dickinson), sono stati acquisiti 10000 eventi per saggio e l'analisi è stata eseguita col software FACSDiva.

Test funzionali di differenziamento *in vitro*

È stato indotto un differenziamento adipogenico e osteogenico utilizzando il *Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Kit* e *Mesenchymal Stem Cell Adipogenesis Kit* (Chemicon) e condrogenico utilizzando *hMSC Mesenchymal Stem Cells Chondrocyte Differentiation Bullekit* (Lonza) a cui è stato aggiunto TGFβ3 (20 µg/µL).

Gene Expression

Per indurre il differenziamento è stato aggiunto al terreno di coltura HB a concentrazioni di 1 g/L, 1.5 g/L, 2 g/L e 3 g/L e le cellule sono state lasciate in coltura

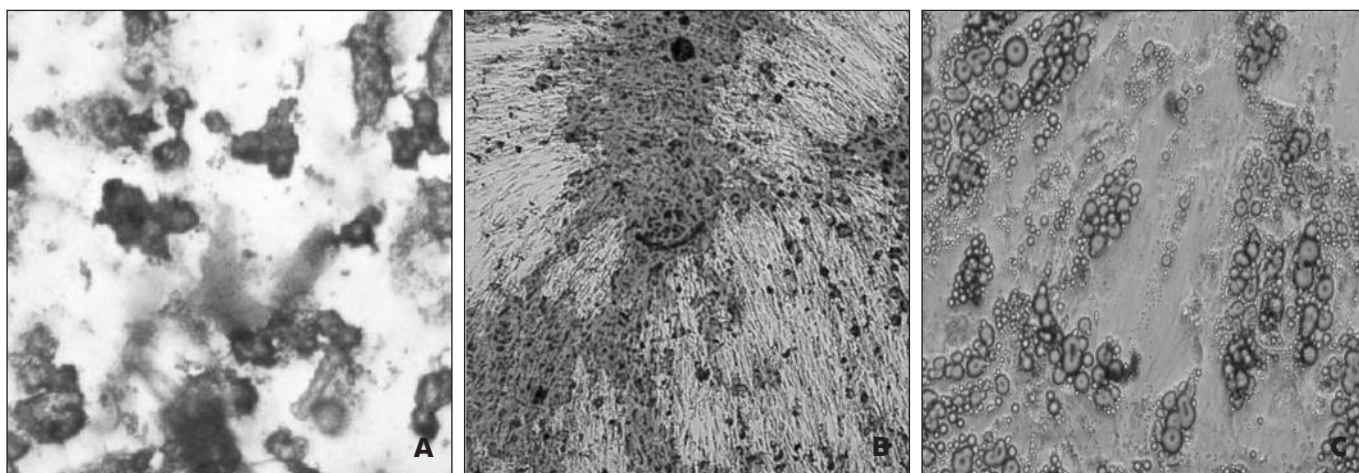


Fig. 1 - Differenziamento condrogenico (A), osteogenico (B) e adipogenico (C).

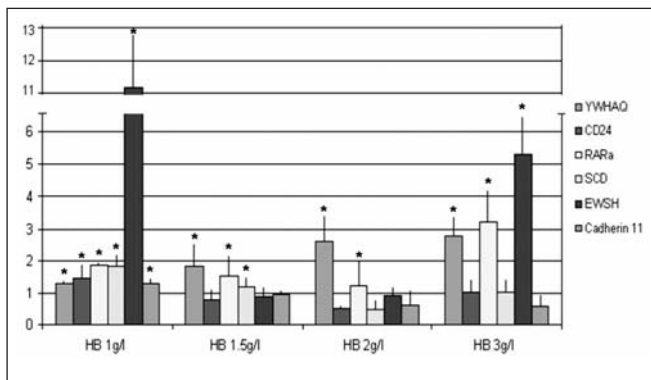


Fig. 2 - Il trattamento con 1 mg/mL HB risulta essere il più efficace nel determinare un aumento dei livelli di espressione genica dei marker metanefrici analizzati ($p < 0.05$).

per 7 giorni. Lo stesso procedimento è stato ripetuto per HBR. Ogni esperimento è stato replicato tre volte. L'RNA è stato isolato con Trizol (Invitrogen) in accordo alle istruzioni del produttore. Il cDNA è stato sintetizzato in un volume di reazione di 21 μ L a partire da 1 μ g di RNA totale con SuperScript III RT (Invitrogen). Per valutare l'espressione genica di CD24, Cadherin 11, EWSH, RAR- α , SCD, YWHAQ, sono stati usati 20 ng di cDNA per l'analisi in *real-time* RT-PCR (*Lightcycler system*, Roche Diagnostics) condotta utilizzando il SYBR Green FastStart kit (Roche Diagnostics).

Differenziamento endoteliale

È stato effettuato un saggio su Matrigel (ECM gel E1270, Sigma) per valutare la capacità delle cellule di allinearsi e formare strutture capillari. Sono state seminate 1×10^3 cellule su Matrigel in ogni pozzetto di una piastra da 96 pozzetti e incubate a 37 °C. Le cellule sono state risospese in terreno di coltura basale o addizionato di HB 1 mg/mL. La formazione di strutture capillari è stata osservata al microscopio ottico a partire dalle due ore successive alla semina, e ad intervalli regolari durante le successive 24 ore.

Analisi dei dati

Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato un test ANOVA, assumendo un valore di probabilità inferiore a 0.05 come limite di significatività.

RISULTATI

L'analisi citofluorimetrica delle FMhMSCs ha confermato un profilo mesenchimale (Tab. I), e la coltura, con i terreni di coltura specifici, ha determinato un differenziamento in osteociti, condrociti e adipociti (Fig. 1), dimostrando la natura mesenchimale della popolazione

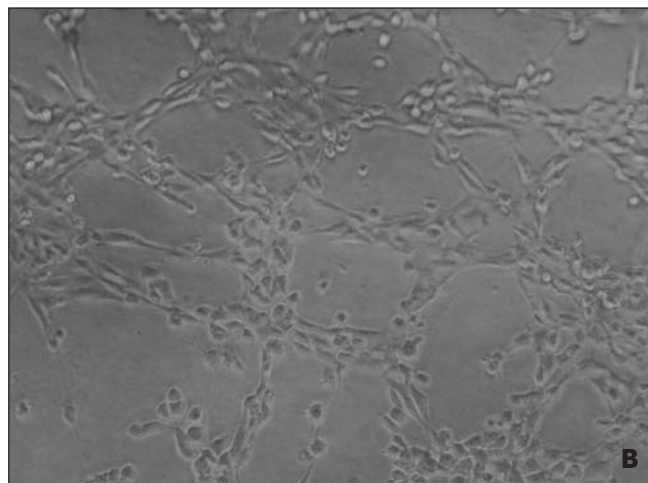
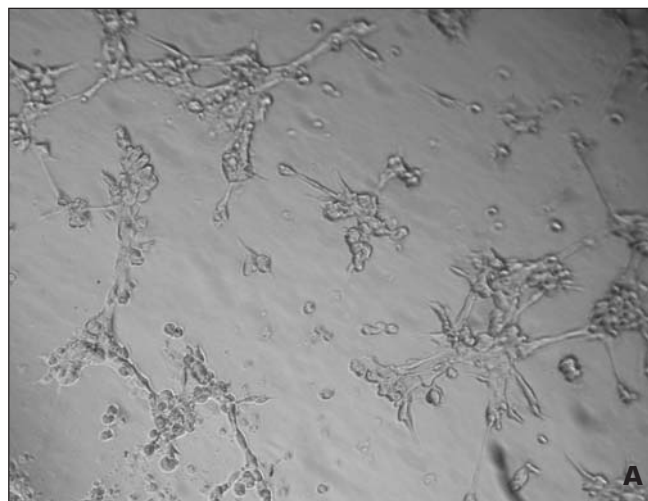


Fig. 3 - A) Organizzazione in strutture tubulari delle cellule non trattate, seminate in terreno semisolido dopo 8 ore; B) Cellule pretrattate con HB (1mg/mL) mostrano un'aumentata formazione di capillari dopo 4 ore.

ne isolata. In particolare la presenza del recettore dell'acido ialuronico CD44 in più del 98% delle cellule, rafforza il razionale per l'uso degli esteri sintetizzati.

Dopo trattamento con HB o HBR, abbiamo analizzato la trascrizione dei geni espressi ai primi stadi di differenziamento nefrogenico, a livello del mesenchima metanefrico. I risultati rivelano che l'uso di HBR non aumenta l'espressione genica dei geni in esame dopo 7 giorni (dati non mostrati). Questo risultato era parzialmente atteso, dato che precedenti esperimenti avevano mostrato un'azione cardiospecifica di questo estere. In ogni caso abbiamo ritenuto interessante valutare l'azione di HBR in senso neurogenico, data l'importanza del ruolo dell'acido retinoico durante lo sviluppo renale.

Al contrario il trattamento con HB ad una concentrazione di 1 mg/mL, aumenta significativamente i livelli di trascrizione di tutti i geni analizzati (Fig. 2).

Dato che il riparo endoteliale rappresenterebbe una meta importante nella prevenzione dello sviluppo di nefropatie croniche, abbiamo testato l'abilità delle FMhMSCs di differenziare in cellule endoteliali. Le FMhMSCs trattate con HB (1 mg/mL), si dimostrano in grado di migrare allinearsi in un terreno semisolido (Matrigel) formando strutture capillari già dopo 3-4 ore, a differenza delle cellule non trattate che presentano un aspetto capillare solo dopo 8 ore e in misura decisamente inferiore (Fig. 3).

CONCLUSIONI

I risultati presentati dimostrano quindi che il trattamento con HB 1 mg/mL risulta essere quello più efficace nell'aumentare i livelli di espressione dei marker metanefrici considerati, dimostrando la possibilità di utilizzare un composto chimico per modificare l'espressione genica di geni nefro-specifici. Questi risultati, unitamente all'evidenza che il trattamento è in grado di indurre anche un differenziamento endoteliale, aprono la strada a nuovi approcci nella rigenerazione cellulare in seguito a danno renale.

La placenta a termine si dimostra una potenziale risorsa di cellule staminali multipotenti facilmente ottenibili senza implicazioni etiche. Le proprietà tollerogeniche delle cellule mesenchimali, inoltre, rendono queste cellule strumenti d'elezione in terapia cellulare, e compatibili con efficienti protocolli terapeutici.

In conclusione, la possibilità di utilizzare una nuova molecola sintetica per indurre sia un differenziamento nefrogenico che endoteliale, potrebbe contribuire ad un successivo sviluppo della terapia cellulare in seguito a danno renale.

RIASSUNTO

La possibilità di disporre di una sorgente che ci permetta di ottenere grandi quantità di tutti i tipi cellulari dei tessuti, come quella rappresentata dalle cellule staminali,

apre nuovi scenari terapeutici per l'approccio a patologie cronico-degenerative, come le patologie renali. Un modello di differenziamento nefrogenico ed endoteliale in vitro costituirebbe quindi una buona prospettiva per la cura di tali patologie. In questo studio sono state utilizzate cellule staminali mesenchimali isolate da membrane fetali (FMhMSCs), fonte ricavabile in maniera meno invasiva rispetto alle cellule staminali mesenchimali di midollo osseo, più comunemente usate. La recente identificazione di fenotipi molecolari di progenitori renali del mesenchima metanefrico (Cadherin 11, CD 24, RAR-alpha, stearyl-CoA desaturase 2, 14-3-3 θ, Ewing sarcoma homolog), ha fornito il razionale scientifico per investigare se l'utilizzo di nuove molecole sintetiche a logica differenziativa potesse indurre un trans-differenziamento di cellule staminali mesenchimali in senso nefrogenico, valutato mediante analisi dell'espressione genica nefro-specifica.

Data l'importanza di ottenere un riparo del danno endoteliale presente in numerose patologie renali, è stata testata l'abilità vasculogenetica della popolazione isolata. Per indurre il differenziamento sono stati utilizzati monoesteri di acido ialuronico con acido butirrico (HB) ed esteri misti di acido ialuronico, butirrico e retinoico (HBR), in base alle rispettive attività di internalizzazione, mediata dal recettore CD44, dell'acido ialuronico, di apertura della cromatina da parte dell'acido butirrico e di potenziamento dell'espressione genica dell'acido retinoico.

L'HBR, che aveva precedentemente mostrato un'azione come agente differenziante in senso cardiomiogenico, ha confermato questa sua selettività di azione, non mostrando risultati positivi in senso nefrogenico, mentre il trattamento con HB, ad una concentrazione pari a 1 g/L, ha mostrato un aumento di espressione di tutti i marker in esame, dimostrando la possibilità di utilizzare un composto chimico per modificare l'espressione genica di geni nefro-specifici. Questi risultati aprono la strada a nuovi approcci nella rigenerazione cellulare in seguito a danno renale.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi

BIBLIOGRAFIA

1. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, et al. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem* 2007; 282: 14243-52.
2. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult bone marrow. *Nature* 2002; 418: 41-9.
3. Ricardo SD, Deane JA. Adult stem cells in renal injury and repair. *Nephrology* 2005; 10: 276-82.
4. Yokoo T, Ohashi T, Shen JS et al. Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogram-

- med to contribute to kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 3296-300.
5. Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 :2625-35.
 6. Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 2001; 195: 229-35.
 7. Lange C, Tögel F, Iltlich H, et al. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int* 2005; 68: 1613-7.
 8. Chen TL. Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment. *Bone* 2004; 35 :83-95.
 9. Rao MS, Mattson MP. Stem Cells and aging. Expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 713-34.
 10. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al., Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004; 22: 1338-45.
 11. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells. *BMC Dev Biol* 2007; 7:11.
 12. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007; 53: 121-7.
 13. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal. *Science* 1999; 284: 143-7.
 14. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005; 80: 836-42.
 15. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1539-46.
 16. Aggarwal S and Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, *Blood* 2005. 105, 1815-22.
 17. Bailo, M, Soncini, M, Verta E, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation* 2004; 78: 1439-48
 18. Saito T, Kuang JQ, Bittira B, Al-Khalidi A, Chiu RC. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. *Ann Thorac Surg* 2003; 76: 339-40.