



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Mediche, cliniche e sperimentali.

INDIRIZZO: Scienze Nefrologiche

CICLO: XXII

Heparanase e rene.

Regolazione e ruolo dell'heparanase a livello tubulare e
nella nefropatia diabetica.

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Angela D'Angelo

Supervisore : Ch.mo Prof. Giovanni Gambaro

Dottorando : Dott.ssa Valentina Masola

RIASSUNTO

L'heparanase (HPSE) sta emergendo come un importante fattore nel complesso sistema delle nefropatie proteinuriche e perciò diversi autori hanno suggerito che questo enzima possa essere responsabile della riduzione dell'heparan solfato (HS) nella membrana basale glomerulare nel corso della nefropatia diabetica (ND). Attualmente sono disponibili poche informazioni riguardo l'espressione, la regolazione e il ruolo dell'heparanase nelle cellule epiteliali del tubulo prossimale (PTEC) in particolare nel diabete.

In questo studio è stato dimostrato che questo enzima è un mediatore chiave nell'omeostasi delle PTEC nell'ambiente diabetico e può svolgere un ruolo nella patogenesi della ND. È stato evidenziato che l'heparanase è espressa costitutivamente nelle PTEC suggerendo che essa svolga un ruolo fisiologico in queste cellule. La sovra-espressione dell'heparanase è mediata da alcuni fattori tipici della ND, quali l'albumina e i prodotti di avanzata glicazione (AGE), ma non dall'alto glucosio. L'albumina e gli AGE portavano alla sovra-espressione dell'heparanase attraverso la via PI3K/AKT.

L'albumina e particolarmente gli AGE causano una significativa riduzione dell'HS. Al fine di discriminare gli effetti dovuti alla sovra-espressione dell'heparanase da quelli causati direttamente dall'albumina e dagli AGE abbiamo generato una linea cellulare (HK2) stabilmente silenziata per l'heparanase. Nelle cellule HPSE-silenziate l'HS è significativamente aumentato rispetto alle cellule HK2 wt e il trattamento con albumina e AGE non ha prodotto effetti suggerendo che nelle PTEC i livelli di HS dipendono dalla regolazione dell'heparanase.

È inoltre emerso che i livelli di HS non sono regolati solamente dall'attività endoglicosidica dell'heparanase ma anche dalla regolazione del core proteico dei proteoglicani dell'HS. Infatti, il core proteico del sindecano-1 e la sua espressione genica sono ridotte nelle cellule tubulari wt trattate con albumina ed AGE mentre nelle cellule HPSE silenziate questi mediatori non riescono ad indurre alcuna modulazione del sindecano-1. Nelle cellule HPSE-silenziate, inoltre, il sindecano-1 risulta significativamente incrementato sia a livello di trascrizione genica che della relativa espressione proteica rispetto alle cellule wt. Ulteriori dati confermano che l'heparanase è coinvolta nelle vie di trasduzione del segnale dell'FGF-2.

È stato poi verificato che esiste una correlazione fra heparanase e metalloproteasi (MMP), infatti nelle cellule HPSE silenziate questi enzimi di degradazione della matrice extracellulare risultano ridotti sia a livello di espressione genica che di attività. Anche le MMP risultano incrementate dalla stimolazione con albumina e AGE ma in maniera indipendente dall'heparanase.

Inoltre il Sulodexide, un farmaco comunemente usato nel trattamento della ND e che è risultato efficace nel ridurre la proteinuria, è effettivamente un buon inibitore dell'heparanase con un IC_{50} di 50 μ g/ml.

Infine è stato osservato che l'attività plasmatica dell'heparanase risulta aumentata in pazienti con nefropatie, specialmente in pazienti con rigetto di trapianto, rispetto a soggetti sani. Al fine di evidenziare l'utilità di questi valori come marcatori di qualche condizione nefropatica dovranno essere correlati ad altri parametri di funzionalità renale.

In conclusione, si ritiene di avere dimostrato un ruolo attivo dell'heparanase nei meccanismi di danno e patogenesi della ND.

ABSTRACT

Heparanase (HPSE) is an interesting player in the arena of proteinuric disease and several investigators proposed that this enzyme is responsible for heparan sulphate (HS) reduction in glomerular basement membrane in diabetic nephropathy (DN). However, few data are available about HPSE expression, regulation and role in proximal tubular epithelial cells (PTEC), particularly in diabetes.

In this study we demonstrate that this molecule is a key mediator in homeostasis of PTEC in diabetic milieu possibly playing a role in the DN pathogenesis.

We showed that HPSE is constitutively expressed in PTEC suggesting that it has a physiological role. HPSE is up-regulated by mediators involved in DN such as albumin and glycated albumin (AGE), but not by high-glucose. Albumin and AGE-induced HPSE up-regulation is PI3K/AKT dependent.

Albumin and especially AGE cause a significant decrease in HS staining. In order to investigate the effects derived from HPSE up-regulation and distinguish from those caused directly by albumin and AGE we generated a HK2 PTEC line stably silenced for HPSE. In HPSE silenced cells, HS was significantly increased respect to HK2 wt cells and treatment with albumin or AGE had no effect suggesting that in tubular cells, HS levels depend on HPSE regulation. We also discovered that HS levels aren't regulated only by the cleaving activity of the endoglycosidase HPSE but also from the regulation of HSPG core proteins. In fact, Syndecan-1 core protein and mRNA expression were down-regulated by albumin and AGE in w.t. tubular cells while in HPSE silenced cells they failed to induce any Syndecan-1 modulation. Moreover in untreated HPSE silenced cells, Syndecan-1 is up-regulated at both gene transcription and protein expression in comparison with w.t. cells. Preliminary data also indicate that HPSE is involved in the regulation of FGF-2 signaling.

We have also verified that exist a correlation between heparanase and metalloproteinases (MMP), in fact in HPSE-silenced cells these extracellular matrix degrading enzymes results down-regulated both at gene transcription and activity levels in comparison with wt cells. MMPs are also up-regulated by albumin and AGE stimulation in a heparanase-independent way.

In conclusion, we showed that HPSE is implicated in different mechanisms possibly involved in the tubulointerstitial damage of the DN.

We have also confirmed that Sulodexide, a drug commonly used in DN treatment which is effective in reducing proteinuria, is a potent heparanase inhibitor with a IC_{50} of 50 μ g/ml.

Finally, we observed that heparanase plasma activity is up-regulated in nephropatic patient, especially in transplant rejection, respect to healthy subjects. These data must be related to other parameter of kidney functionality to recognize heparanase activity as a useful marker of nephropathy.

ABBREVIAZIONI

AGE prodotti di avanzata glicazione
BSA albumina sierica bovina
DS dermatan solfato
ECM matrice extracellulare
FBS siero fetale bovino
FGF Fibroblast Growth Factor
FITC fluoresceina isotiociano
FMH Fast-moving heparin
GAPDH proteina gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi
GAG glicosaminoglicani
HK2 linea cellulare Human-Kidey 2
HS heparan solfato
HSPG proteoglicani dell'HS
HPSE heparanase
MBG membrana basale glomerulare
MFI intensità media di fluorescenza
MMP metalloproteasi della matrice
ND nefropatia diabetica
O.D. densità ottica
PBS tampone fosfato
PCR reazione a catena della polimerasi
PI3K fosfatidilinositolo-3-kinasi
PG proteoglicani
PTEC cellule epiteliali del tubulo prossimale
shRNA short hairpin RNA
TGF- β 1 Transforming Growth Factor- β 1

INTRODUZIONE

1. La matrice extracellulare.

La matrice extracellulare (ECM) è un complesso macromolecolare sintetizzato localmente e presente in ogni tessuto. Esistono varie forme di ECM e le diverse caratteristiche dipendono dalla composizione dalle proteine secrete e dai polisaccaridi. Le due forme principali sono la matrice interstiziale che è un gel amorfo tridimensionale sintetizzato da cellule di origine mesenchimale (fibroblasti) e la membrana basale che è prodotta dagli epitelii. Una volta si pensava che la funzione dell'ECM fosse solo quella di supporto inerte alle cellule che costituiscono i tessuti. Ora invece è chiaro che l'ECM interviene nel comportamento delle cellule regolandone la sopravvivenza, lo sviluppo, la migrazione, la proliferazione, la forma e la funzione. L'ECM inoltre agisce da tampone contro i cambiamenti di pH, mantiene l'idratazione dei tessuti e, in alcune situazioni, svolge funzioni particolari agendo da barriera fisica alla migrazione delle cellule (come la membrana basale dei vasi) o da filtro molecolare altamente selettivo (come la membrana basale glomerulare). L'ECM è composta da proteine fibrose, fra cui i collagени, elastina, fibronectina e laminina che le conferiscono elasticità, le quali sono immerse in una sostanza fondamentale amorfa di polisaccaridi della classe dei glicosaminoglicani (GAG) che di solito si trovano legati covalentemente a proteine a formare i proteoglicani (PG). Il gel di glicosaminoglicani garantisce una rapida diffusione di ormoni, sostanze nutritive e metaboliti fra le cellule e la circolazione sanguigna. Molte proteine della matrice inoltre aiutano le cellule ad ancorarsi nelle appropriate posizioni.

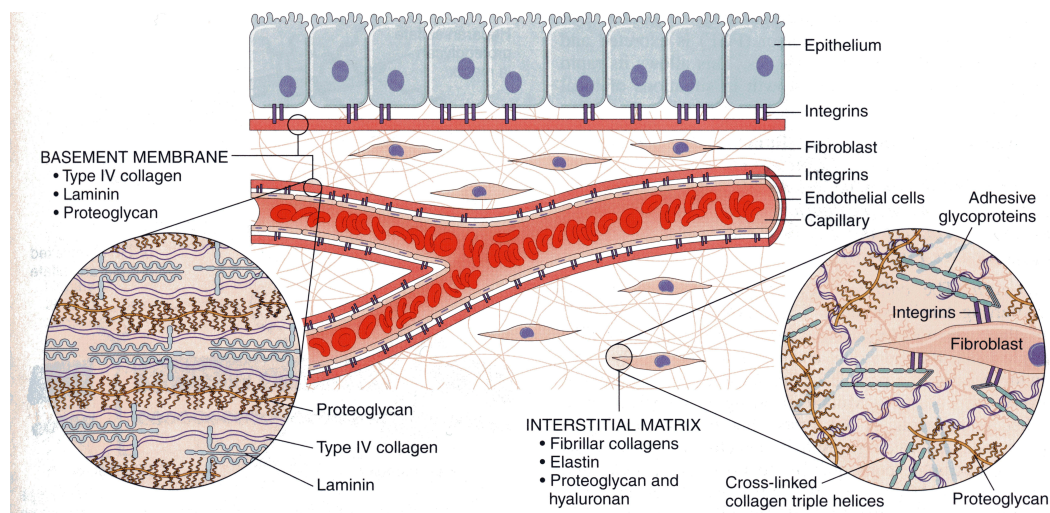


Fig.1: Tessuto connettivo sottostante ad un epitelio. Si distinguono due tipologie di ECM: la membrana basale prodotta dalle cellule stesse dell'epitelio e la matrice interstiziale prodotta principalmente dai fibroblasti. La membrana basale e la matrice interstiziale differiscono sia per la presenza di diversi componenti sia per il rapporto fra le proteine fibrose e la sostanza fondamentale.

2. I glicosaminoglicani e i proteoglicani.

I glicosaminoglicani sono catene polisaccaridiche non ramificate, formate da unità disaccaridiche ripetute. Uno zucchero dei disaccaridi è l'N-acetilglucosammina o N-acetilgalattosamina e il secondo di solito è un acido uronico (acido glucuronico o acido iduronico). I principali GAG sono: lo ialuronano, il dermatan solfato, il condroitin solfato (CS), il chetaran solfato e l'heparan solfato (HS) e si distinguono in base ai tipi di zuccheri, ai legami fra essi, al numero e alla posizione dei gruppi solfato.

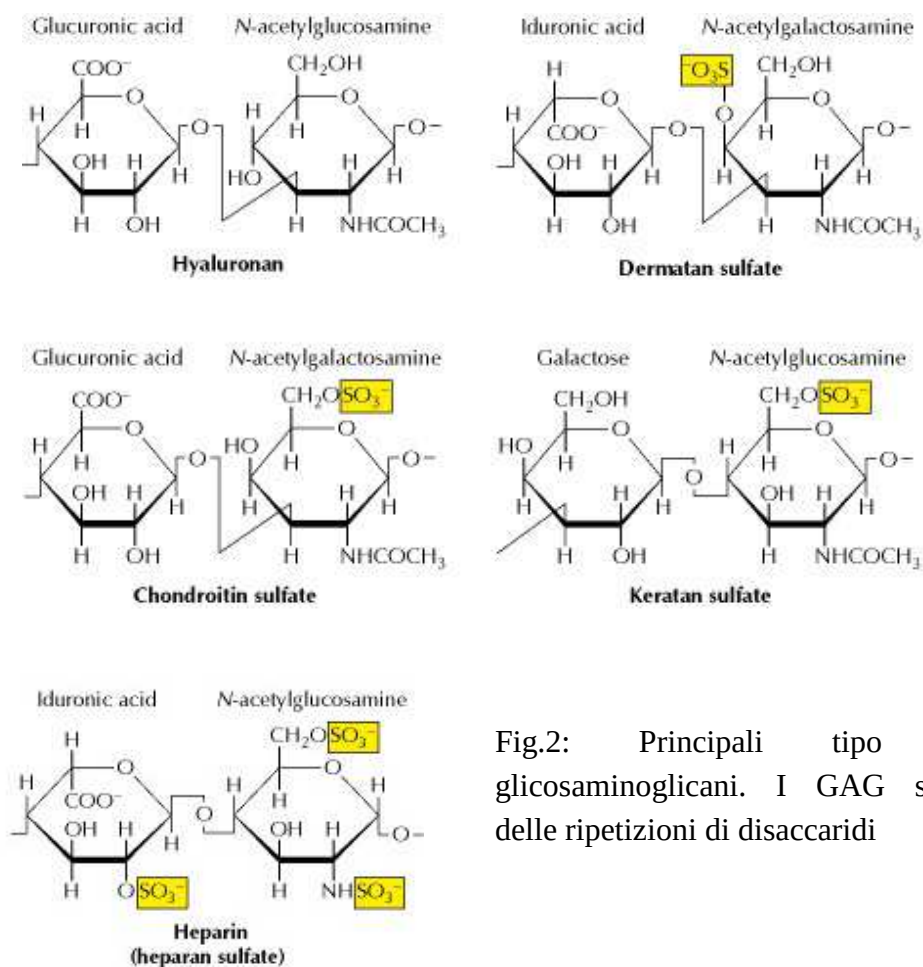


Fig.2: Principali tipo di glicosaminoglicani. I GAG sono delle ripetizioni di disaccaridi

Poiché sono ricchi di gruppi solfato e carbossilici i GAG hanno una carica altamente negativa. Le catene dei GAG sono troppo rigide per piegarsi come le proteine e tendono quindi ad assumere delle conformazioni molto estese e formano gel anche a basse concentrazioni. Le loro cariche negative attirano inoltre cationi osmoticamente attivi, come Na^+ , che richiamando acqua conferendo turgore e resistenza alla compressione all'ECM e garantiscono così il supporto meccanico.

Eccetto lo ialuronano, tutti i GAG sono legati covalentemente a proteine e in questa forma prendono il nome di proteoglicani. Il core proteico viene prodotto nel reticolo endoplasmatico e poi nell'apparato del golgi vi vengono assemblati i GAG. In particolare il legame avviene fra un tetrasaccaride di collegamento che si lega ad una serina del nucleo proteico

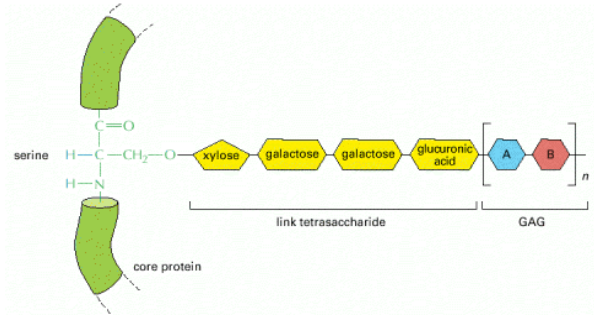


Fig.5: Collegamento fra una carena di GAG e il core proteico in una molecola di proteoglicano

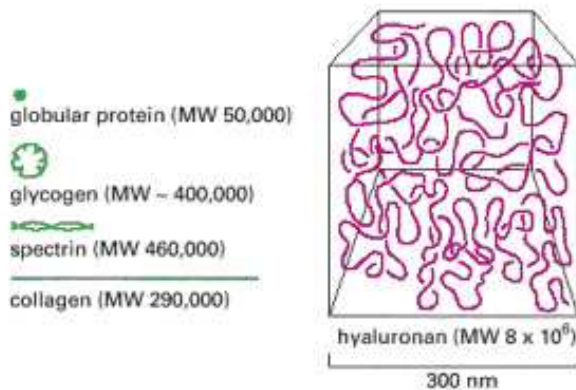


Fig.3: Rappresentazione delle dimensioni e dei volumi occupati da diverse macromolecole. Sono mostrate alcune proteine e una molecola di ialuronano idrato.

3. I proteoglicani dell'HS.

Esistono tre grandi famiglie di proteoglicani dell'HS (HSPG):

- Gli HSPG di membrana sono i sindecani, i betaglicani e CD44v3,
- Gli HSPG secreti nella matrice extracellulare sono perlecano, collagene XVIII e agrin.
- Gli HSPG ancorati alla membrana mediante fosfatidilinositolo sono chiamati glicipani

Diversi tipi cellulari producono HS e i principali enzimi che intervengono nella sua sintesi sono glicosiltransferasi, sulfotransferasi ed epimerasi.

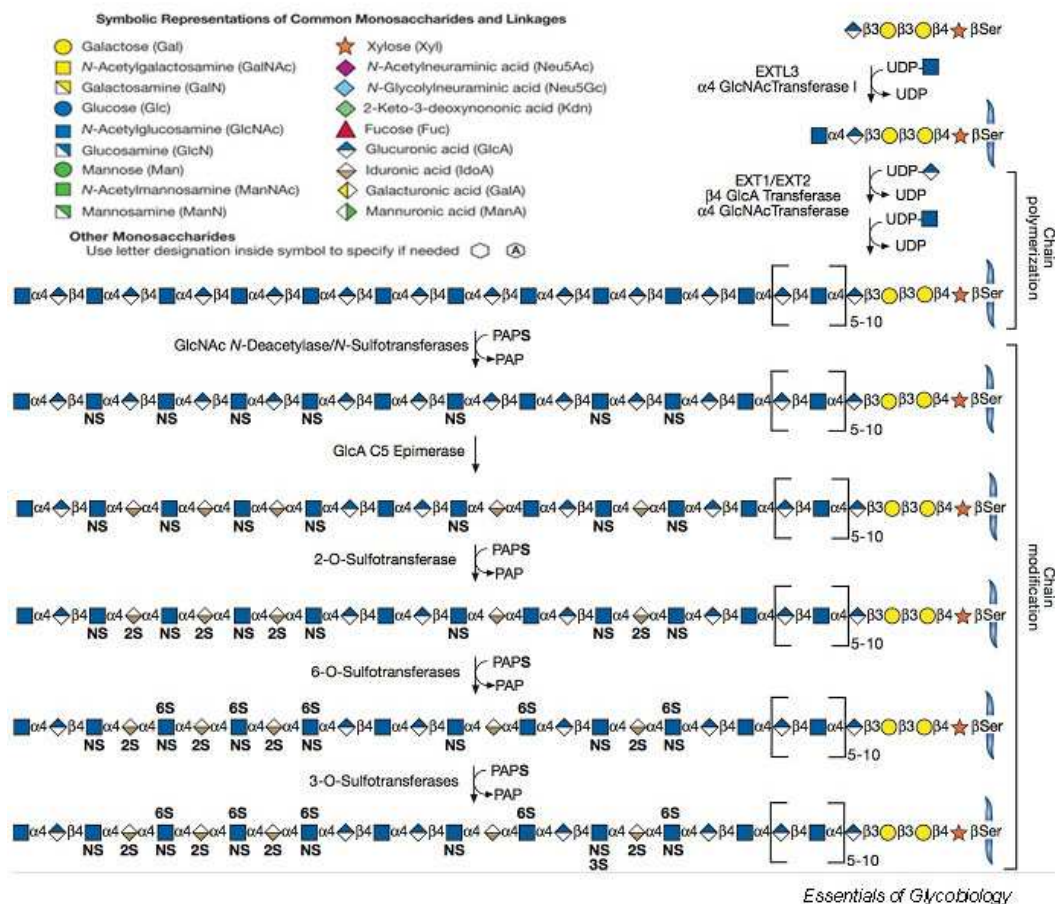


Fig.4: La biosintesi dell'HS coinvolge la copolimerizzazione di N-acetilglucosamina e residui di acido uronico a cui seguono una serie di modificazioni come la solfatazione e l'epimerizzazione dell'acido glucuronico ad acido iduronic.

Gli HSPG svolgono molteplici funzioni (vedi illustrazione nell'immagine successiva)

- Interagiscono con il collagene aiutando l'organizzazione strutturale dei tessuti
- Intervengono nell'organizzazione delle membrane basali, ne regolano la permeabilità e forniscono un substrato alle cellule epiteliali.
- Nelle vescicole di secrezione hanno un ruolo nell'impacchettamento dei granuli e mantengono le proteasi in uno stato attivo.
- Regolano l'attività di proteasi e loro inibitori; in particolare gli HSPG possono controllare l'attività di una proteina secreta in vari modi: immobilizzandola e limitandone il raggio d'azione, bloccandone stericamente l'attività, garantendone il rilascio ritardato o proteggendola dalla degradazione.
- Possono legare citochine, chemochine, fattori di crescita e morfogeni proteggendoli dalla degradazione. Queste interazioni forniscono un deposito di fattori di regolazione che possono essere liberati in seguito a degradazione della matrice
- Possono fungere da co-recettori per diversi recettori tirosin-chinasici di vari fattori di crescita. Sono capaci di abbassarne la soglia di attivazione o regolare la durata della stimolazione.

- Gli HSPG di membrana possono agire da recettori di membrana e regolare la distribuzione dei ligandi.
- Gli HSPG di membrana cooperano anche con le integrine e altri recettori di adesione cellulare al fine di facilitare le interazioni cellula-cellula, la motilità e la migrazione

Date queste molteplici proprietà gli HSPG intervengono inoltre nella regolazione di diverse attività biologiche come la coagulazione, la difesa dell'ospite e la cicatrizzazione.

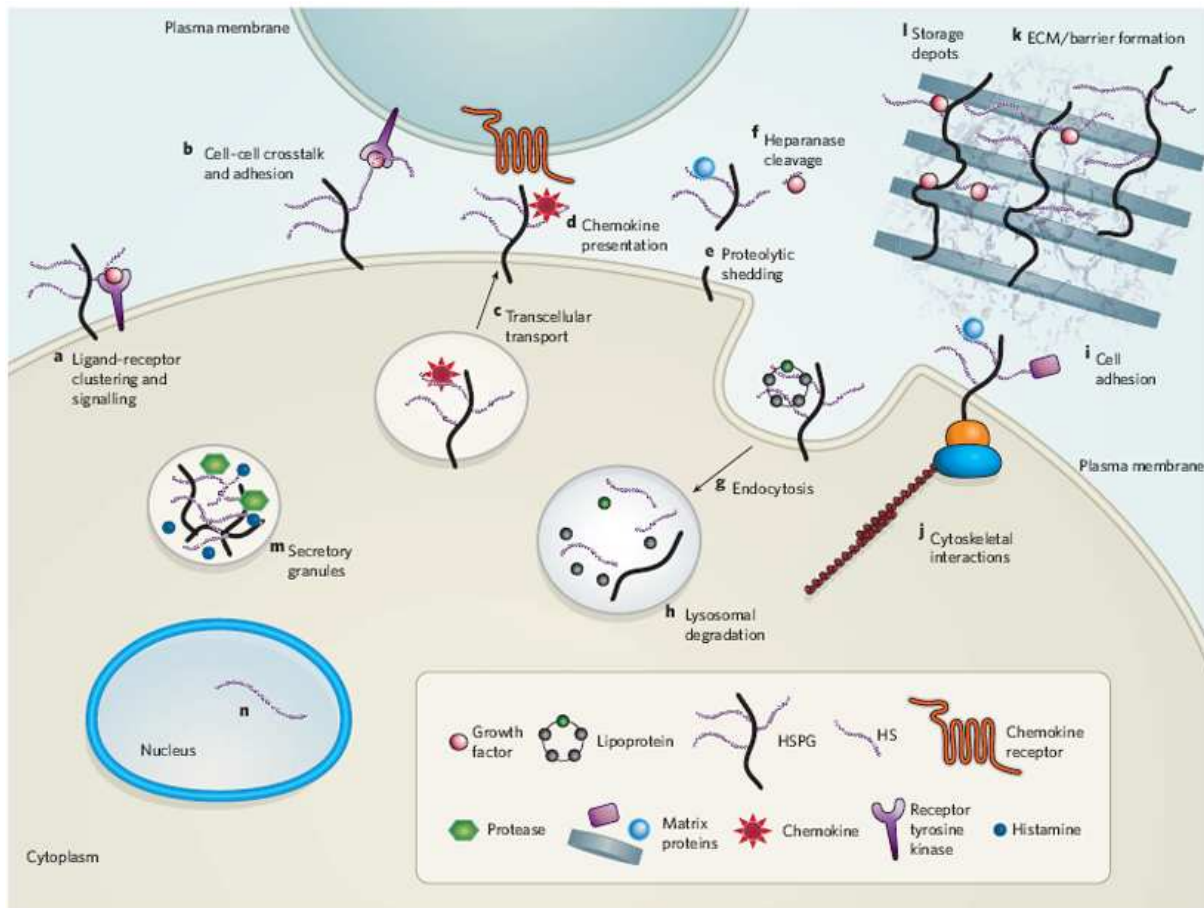


Fig.6: I proteoglicani dell'HS svolgono diversi ruoli nella fisiologia della cellula. I proteoglicani dell'HS fungono da co-recettori per fattori di crescita e i loro recettori tirosin-chinasici che possono essere presenti sia sulle cellule stesse (a) che sulle cellule adiacenti (b). Gli HSPG trasportano chemochine attraverso la cellula (c) e le presentano sulla superficie cellulare (d). Il taglio proteolitico comporta il distaccamento di sindecano e glicano dalla superficie cellulare (e) e l'heparanase è in grado di tagliare le catene dell'HS (f) liberando i fattori che vi sono legati. Gli HSPG di superficie sono attivamente endocitati (g) e possono o essere riportati sulla superficie cellulare o essere degradati nei lisosomi (h). Gli HSPG facilitano inoltre l'adesione delle cellule alla matrice extracellulare (i) e formano ponti con il citoscheletro (j). Gli HSPG secreti sono coinvolti nella formazione ed organizzazione della matrice extracellulare che costituisce una barriera fisiologica (k) e sequestrano fattori di crescita e morfogeni per un successivo rilascio (l). Gli HSPG possono stabilizzare i granuli secretori (m) e dati recenti hanno dimostrato la presenza dell'HS a livello nucleare anche se non se ne conosce ancora la funzione. (Bishop, Schuksz & Esko 2007)

Mediante le catene glucidiche, che presentano una carica fortemente negativa, i proteoglicani dell'HS possono legare una vasta gamma di molecole (vedi Tabella 1).

Cell surface	
L-selectin and P-selectin	FGF receptor
N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule)	HIP (Heparin/Heparan Sulfate Interaction Protein)
PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule)	MAC-1 (Monocyte Adhesion Molecule)

Growth factors	
HB-EGF family (Heparin Binding – Epidermal Growth Factors)	PlGF (Placenta Growth Factor)
FGF family (Fibroblast Growth Factors)	PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	TGF- β (Transforming Growth Factor- β)
HDGF (Hepatoma Derived Growth Factor)	HGF (Hepatocyte Growth Factor)

Extracellular matrix	
Collagens	Laminin
Fibronectin	Tenascin
HB-GAM (Heparin Binding Growth Associated Molecule)	Thrombospondin I and II
	Vitronectin

Cytokines/Chemokines/Morphogens	
BMP (bone morphogenetic protein)	RANTES (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted)
IL-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -10, -12 (Interleukin)	TNF- α (Tumor Necrosis Factor)
IP-10 (Interferon - γ inducible protein 10)	MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein)
CCL-2 (CC-chemokine ligand)	PF-4 (Platelet factor 4)
GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)	Hh (Sonic Hedgehog)
MCP-1, MCP-4 (Monocyte Chemoattractant Protein)	Wnt (Wingless wg)

Others	
DNA and RNA polymerases	Annexin V
Superoxide dismutase	β -amyloid protein
Cathepsins B and G	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger protein
Neutrophil elastase	

Tabella 1: Elenco delle molecole che legano HS.

Uno degli esempi più studiati è l'interazione della protrombina con uno specifico pentasaccaride dell'eparina (un tipo di HS altamente solfato). I residui glucidici interagiscono con amminoacidi carichi positivamente allineati lungo due α -eliche della proteina e il legame determina un cambiamento conformazionale che aumenta l'attività della proteina. Anche l'interazione dell'eparina e dell'HS con gli FGF e i loro recettori è stata ampiamente caratterizzata. In questo caso la catena di glicosaminoglicani funge da collegamento fra l'FGF e il suo recettore. La formazione del complesso abbassa effettivamente la concentrazione di FGF necessario per iniziare la segnalazione intracellulare e aumentarne la durata. Diversamente dal legame eparina-antitrombina, la formazione dei complessi con FGF sembra dipendere principalmente dalla distribuzione dei gruppi carichi negativamente dell'HS che da una specifica sequenza glucidica. Molte funzioni dei proteoglicani dell'HS dipendono inoltre dalle interazioni del core proteico.

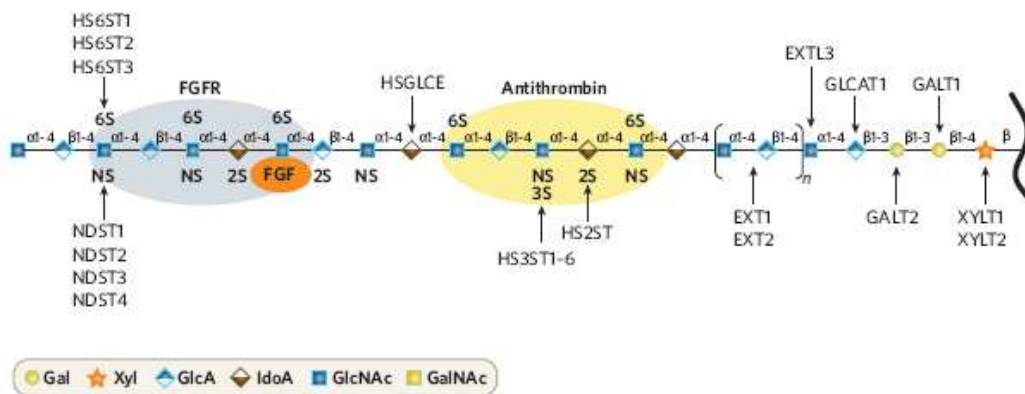


Fig.7: Rappresentazione dei siti di legame sull'HS. La distribuzione di cariche negative dei gruppi solfato e degli acidi uronici creano siti di legame per vari ligandi, inclusi fattori di crescita (come FGF), recettori (come FGFR) e inibitori di proteasi (come l'antitrombina) e molte altre proteine.

4. I Sindecani.

I sindecani sono una famiglia di proteoglicani dell'HS costituiti da un core proteico con ancorate catene di HS. I vertebrati hanno quattro geni dei sindecani che codificano altrettante proteine: sindecano-1(SDC1), -2, -3 e -4. A volte il sindecano-1 e il sindecano-3 presentano anche catene di dermatan o condroitin solfato.

L'espressione dei sindecani mostra una distribuzione spazio-temporale anche se praticamente tutte le cellule esprimono uno o più membri della famiglia dei sindecani. Il sindecano-1 è il principale sindecano delle cellule epiteliali incluso l'endotelio vascolare, il sindecano-2 è presente principalmente nelle cellule muscolari lisce, neuronali o mesenchimali, il sindecano-3 è il principale sindecano del sistema nervoso mentre il sindecano-4 è espresso in maniera diffusa ma a livelli più bassi degli altri.(Alexopoulou, Multhaupt & Couchman 2007)

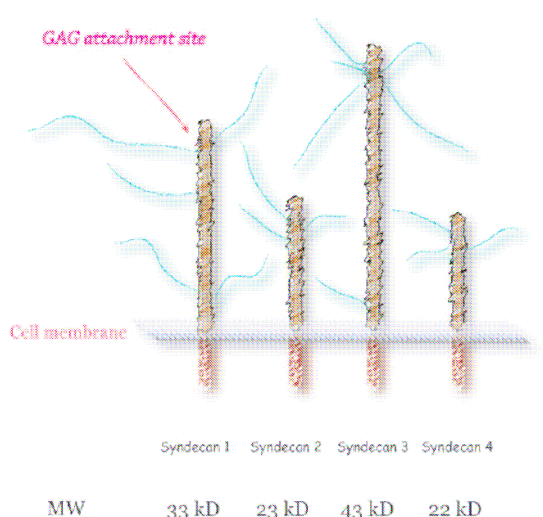


Fig.8: Rappresentazione della struttura dei sindecani nei vertebrati.

Ogni sindecano è composto da un breve dominio citoplasmatico, un singolo dominio transmembrana (TM) e un dominio extracellulare con attaccate da tre a cinque catene di HS o condroitin solfato. Il dominio transmembrana è altamente conservato e una breve sequenza ad esso adiacente presenta un'alta affinità per l'autoassociazione, che nel caso del sindecano-4 è stato dimostrato essere necessaria per l'attivazione della protein chinase C- α (PKC- α). Il dominio citoplasmatico è diviso in tre regioni: due regioni conservate (C1 e C2) e una regione variabile (V). Il dominio C1 immediatamente adiacente alla membrana plasmatica è uguale in tutti i sindecani, è coinvolto nella dimerizzazione e lega diverse proteine intracellulari come ezrin, tubulina, Src chinasi e cortactina. Il dominio conservato C2 contiene un dominio di legame tipo PDZ che può interagire con specifiche molecole. Il dominio V è altamente eterogeneo; la regione variabile del sindecano-4 include un sito di legame PIP2 coinvolto nella dimerizzazione e nell'attivazione della PKC- α . (Tkachenko, Rhodes & Simons 2005). Le caratteristiche del dominio extracellulare dipendono dalle molecole di HS o CS che come descritto in precedenza interagiscono con una varietà di altre molecole. Tutti e quattro i sindecani possono esistere in una forma solubile perché essi possono subire un taglio proteolitico a livello del dominio transmembrana e il dominio extracellulare può essere così rilasciato nell'ambiente extracellulare (shedding). Lo shedding è una proprietà unica dei sindecani ed è un processo altamente regolato che risulta essere stimolato in certe condizioni infiammatorie. È stato dimostrato che lo shedding dei sindecani avviene ad opera delle metalloproteasi (MMP); sono risultate particolarmente attive la MMP2, la MMP9 e MMP14.

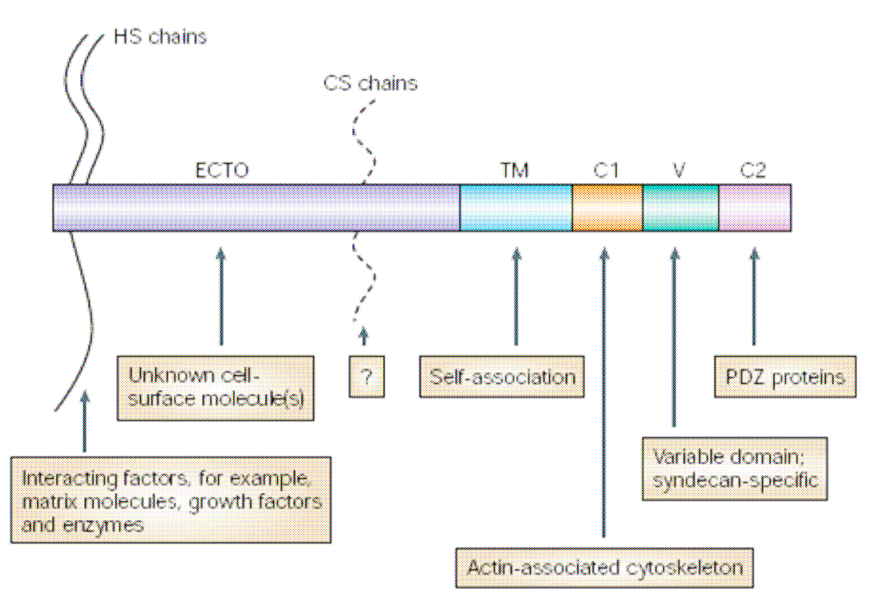


Fig. 9: Struttura del core proteico dei sindecani e sue possibili interazioni. (Couchman 2003)

Il sindecano-1 è un importante regolatore delle interazioni cellula-cellula e cellula-ECM. Il suo silenziamento in cellule epiteliali risulta nella perdita della polarità cellulare e determina la riduzione dei livelli di E-caderina sulla superficie cellulare indicando un suo coinvolgimento durante lo sviluppo o i processi di cicatrizzazione. Il sindecano-1 è implicato anche nella regolazione dell'infiammazione favorendo la formazione di un gradiente di chemochine che provoca la migrazione dei macrofagi attraverso gli epiteli e gli endoteli.

5. Heparanase.

a. Struttura genica, sintesi e processamento.

L'heparanase (HPSE) è un endo- β -D-glucuronidasi che taglia le catene dell'HS a livello di un limitato numero di siti specifici intra-catena, generando frammenti di circa 5-7 kDa. La struttura minima richiesta per il riconoscimento enzima-substrato è rappresentata dal trisaccaride glucosammina-acido glucuronico-glucosammina, l'efficienza della reazione è più elevata quando l'enzima si lega ad un substrato di dimensioni maggiori. Sono inoltre importanti al fine del riconoscimento enzima-substrato anche i gruppi solfato.

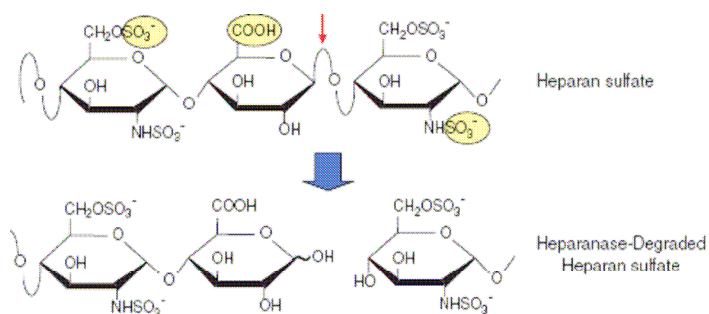


Fig.10: Attività enzimatica di degradazione dell'HS da parte dell'heparanase. La freccia rossa indica il sito di taglio dell'enzima, tra l'acido D-glucuronico e l'N-acetilglucosammina; i gruppi solfato sono cerchiati in giallo (Simizu, Ishida & Osada 2004).

Tagliando le catene di HS, l'heparanase partecipa alla degradazione e al rimodellamento dell'ECM (Ilan, Elkin & Vlodavsky 2006). L'espressione dell'heparanase è limitata principalmente a placenta, cheratinociri, piastrine e cellule attivate del sistema immunitario. La sua sovra-espressione è stata osservata in tutti i tumori umani esaminati e conferisce ad essi un fenotipo più invasivo. L'attività dell'heparanase è principalmente correlata con il potenziale metastatico delle cellule tumorali, dovuto all'aumentata disseminazione cellulare come conseguenza della degradazione dell'HS e del rimodellamento della matrice extracellulare. Similmente, è stato dimostrato che l'attività dell'heparanase è coinvolta nella neovascolarizzazione, nell'infiammazione e nell'autoimmunità, sostenendo la migrazione delle cellule endoteliali vascolari e delle cellule del sistema immunitario nonché nella nefropatia diabetica (Parish, Freeman & Hulett 2001). È stato dimostrato che solo un gene (HPSE-1) codifica la proteina con l'attività dell'heparanase ed è localizzato a livello del cromosoma 4q21.3; ha una lunghezza complessiva di 50 kb e contiene 14 esoni separati da 13 introni. (Vlodavsky et al. 1999). Analisi di sequenza hanno dimostrato che questo gene è altamente conservato fra uomo, ratto, topo, pollo, mollusco e zebrafish. Il cDNA dell'heparanase contiene una ORF di 1629 bp che codifica un polipeptide di 543 aminoacidi con un peso molecolare di 61.2 kDa. (Vlodavsky, Friedmann 2001). L'enzima attivo è poi costituita da un eterodimero formato da una subunità di 50kDa (Lys¹⁵⁸-Ile⁵⁴³) associata non covalentemente con un peptide di 8kDa (Gln³⁶-Glu¹⁰⁹). In base alla sequenza aminoacidica il peptide di 50kDa contiene sei possibili siti di glicosilazione, che coinvolgono i residui aminoacidici di Asparagina che sono risultati essere necessari per la secrezione dell'enzima ma non per la sua attività. Data la varietà di molecole associate all'HS sulla superficie cellulare e nell'ECM l'attività dell'heparanase e la sua biodisponibilità devono essere altamente regolate. Un controllo avviene a livello trascrizionale ma poi prosegue a livello post-traduzionale in un insieme di eventi che prendono il nome di

processamento dell'enzima. Anche la localizzazione cellulare e i meccanismi di secrezione intervengono nella regolazione.

L'enzima viene sintetizzato in una forma pre-pro che viene processata ad una forma inattiva di 65kDa (pro-enzima) e questo avviene in seguito della rimozione del peptide segnale di indirizzamento al reticolo endoplasmatico (Met¹-Ala³⁵) all'estremità N-terminale. Il pro-enzima subisce un ulteriore processamento che lo converte nella forma attiva. In particolare viene tagliato un peptide intermedio di 6 kDa (Ser¹¹⁰-Gln¹⁵⁷) ad opera della catepsina-L. L'enzima maturo attivo è un eterodimero costituito da due polipeptidi di 8 kDa (Gln³⁶-Glu¹⁰⁹) e 50 kDa (Lys¹⁵⁸-Ile⁵⁴³), uniti tra loro non-covalentemente mentre l'attività enzimatica è garantita solo dall'associazione dei due monomeri costituenti la proteina.

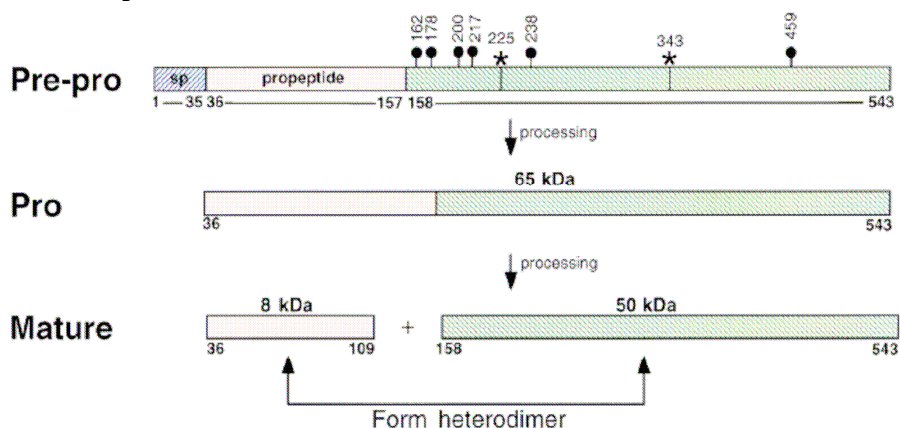


Fig.11: Struttura e processamento dell'eparanasi umana. La localizzazione dei sei siti putativi di N-glicosilazione è indicata da cerchi neri mentre quella dei residui putativi catalitici da asterischi sp, peptide segnale.

In base a studi di omologia di sequenza l'heparanase fa parte di una famiglia di glicosil-idrolasi di tipo A (GH-A). Questi enzimi utilizzano un meccanismo di catalisi acida per l'idrolisi dei legami glicosidici che richiede due residui critici, un donatore di protoni ed uno nucleofilo. Entrambi sembrano essere conservati nell'eparanasi, nelle posizioni Glu²²⁵ e Glu³⁴³ rispettivamente. Come le GH-A l'heparanase contiene un motivo di ripiegamento secondario di tipo "TIM-barrel" a cui è associata l'attività catalitica. Tale motivo è generalmente costituito di solito da 8 α -eliche alternate a 8 foglietti β paralleli lungo lo scheletro della proteina. Sei unità α/β sono presenti sia nella subunità maggiore e le rimanenti in quella minore.

La biosintesi ed il processamento dell'heparanase sono strettamente correlati alla sua localizzazione intracellulare, alla veicolazione nell'ambiente esterno ed al suo riassorbimento. La pre-pro heparanase viene trasportata al reticolo endoplasmatico, grazie al peptide segnale localizzato nella regione N-terminale. Nel reticolo il peptide viene rimosso e la proteina viene N-glicosilata.

Dal reticolo il pro-enzima passa all'apparato del Golgi dove viene internalizzato in vescicole che ne veicolano la secrezione nello spazio extracellulare. All'esterno della cellula la pro-heparanase interagisce con gli HSPG di membrana come il sindecano-1. Il complesso heparanase-HSPG subisce un'endocitosi e si accumula negli endosomi. La conversione degli endosomi in lisosomi determina un ulteriore processamento ed attivazione dell'enzima che può quindi partecipare a sua volta alla degradazione delle catene di HS all'interno del lisosoma. I lisosomi sono organelli

citoplasmatici caratterizzati da un pH acido (pH 4-5) che consente l'azione di molteplici enzimi degradativi, come nucleasi, lipasi, glicosidasi e proteasi. In particolare a questo livello agisce la catepsina L, la proteasi responsabile della completa rimozione del peptide intermedio Ser¹¹⁰-Gln¹⁵⁷ e della conseguente attivazione dell'enzima. L'heparanase è generalmente presente nei lisosomi perinucleari, dai quali viene traslocata al nucleo, dove può interferire con la trascrizione genica. Nelle cellule normali l'enzima è raramente secreto nell'ambiente extracellulare ad eccezione delle piastrine e dai mastociti, nei quali l'enzima si accumula all'interno dei granuli secretori ed è rilasciato in risposta all'attivazione delle cellule ed alla loro degranulazione. La forma latente che viene secreta può inoltre interagire con specifiche proteine che attivano delle vie di segnalazione intracellulari come AKT, p38, Src, Pyk2 e integrin che mediano effetti come la migrazione e l'adesione cellulare, l'espressione di VEGF e l'angiogenesi.

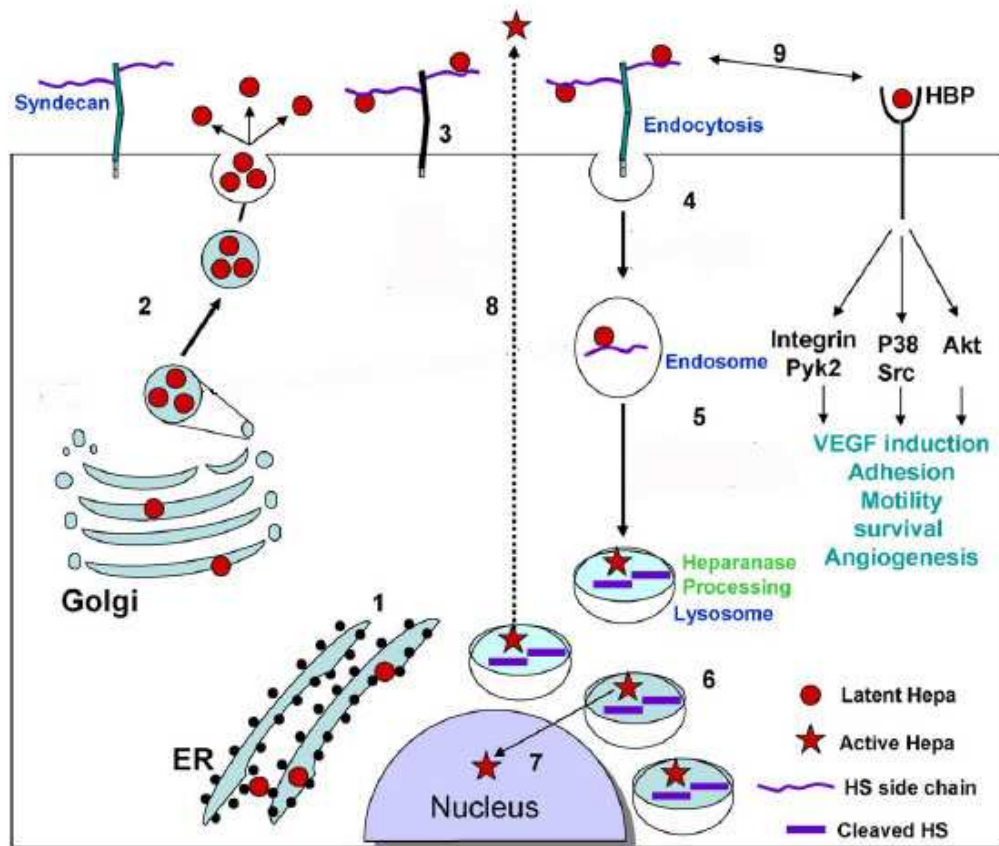


Fig.12: Rappresentazione grafica della biosintesi, del processamento e del trasporto dell'heparanase. L'enzima inattivo è sintetizzato nel reticolo endoplasmatico (ER) (1), raggiunge l'apparato del Golgi ed è secreto dalla cellula (2). Nell'ambiente extracellulare interagisce con gli HSPG (3) e viene endocitata (4). All'interno dei lisosomi la proteina è processata ed attivata nell'enzima maturo (5), che si localizza nelle vescicole perinucleari (6). L'heparanasi lisosomiale raggiunge il nucleo (7) oppure viene secreta (8). La forma inattiva può anche interagire con le "heparan binding protein" (HBP) ed attivare diverse vie del segnale (9).

Sono stati identificati alcuni residui aminoacidici critici per il legame dell'heparanasi all'HS, per la sua secrezione ed il riassorbimento nella cellula, in particolare il dominio HBD-1 ("heparin-binding

domain”) è necessario per la secrezione altrimenti la forma inattiva dell’enzima si accumula nei lisosomi e il dominio HBD-2 è necessario per il riassorbimento dall’ambiente. È altresì indispensabile la presenza dell’HS affinché l’heparanase possa essere internalizzata.

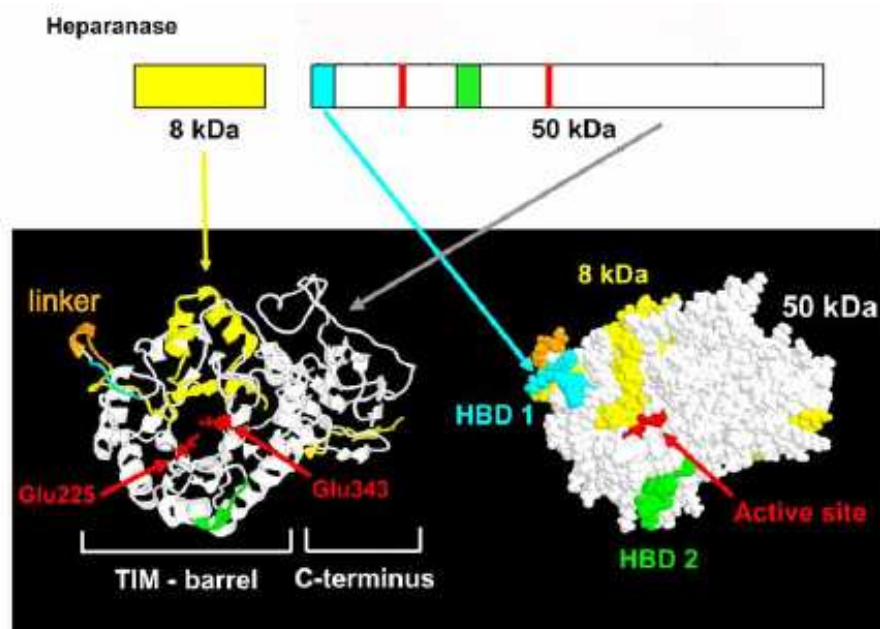


Fig.13: Struttura primaria, residui aminoacidici critici e struttura tridimensionale ipotizzata dell’heparanase. Sono evidenziate le subunità da 8 kDa (in giallo) e 50 kDa (bianco); il dominio intermedio (arancione) che verrà rimosso, i residui Glu²²⁵ e Glu³⁴³ (rosso) che costituiscono il sito catalitico e i domini HBD-1 (azzurro) e 2 (verde) .

b. Regolazione genica dell’heparanase.

Il promotore dell’heparanase è ricco in GC ed è soggetto a diverse regolazioni sia positive che negative. La metilazione di citosine del promotore è stata associata all’inattivazione del gene. Zone di estesa metilazione in “GpC islands” sono state individuate sia nel coriocarcinoma umano che in cellule di glioma del ratto in cui l’heparanase non è espressa. Il trattamento di queste cellule con agenti demetilanti determina la ricomparsa dell’espressione sia dell’mRNA che della proteina heparanase, nonché della sua attività. L’ipometilazione del promotore è invece stata associata con l’aumento di espressione dell’heparanase nel cancro alla prostata. L’espressione del gene dell’heparanase è soppressa dalla forma wt del fattore di trascrizione p53 e l’inattivazione di quest’ultimo aumenta l’espressione dell’heparanase. TNF- α (tumor necrosis factor- α) e INF- γ (interferon- γ) sono capaci di aumentare l’espressione e l’attività dell’heparanase in cellule endoteliali. È stato descritto che gli estrogeni inducono l’espressione dell’heparanase in cellule tumorali che ne esprimono i recettori visto che nella regione promotoriale dell’heparanase sono stati identificati quattro siti di risposta agli estrogeni. L’espressione dell’heparanase è inoltre regolata positivamente dall’alto glucosio nelle cellule endoteliali e nel glomerulo. Nonostante ciò, i

meccanismi molecolari responsabili della sovraespressione dell'eparanasi rimangono tuttora parzialmente sconosciuti (Nasser 2008).

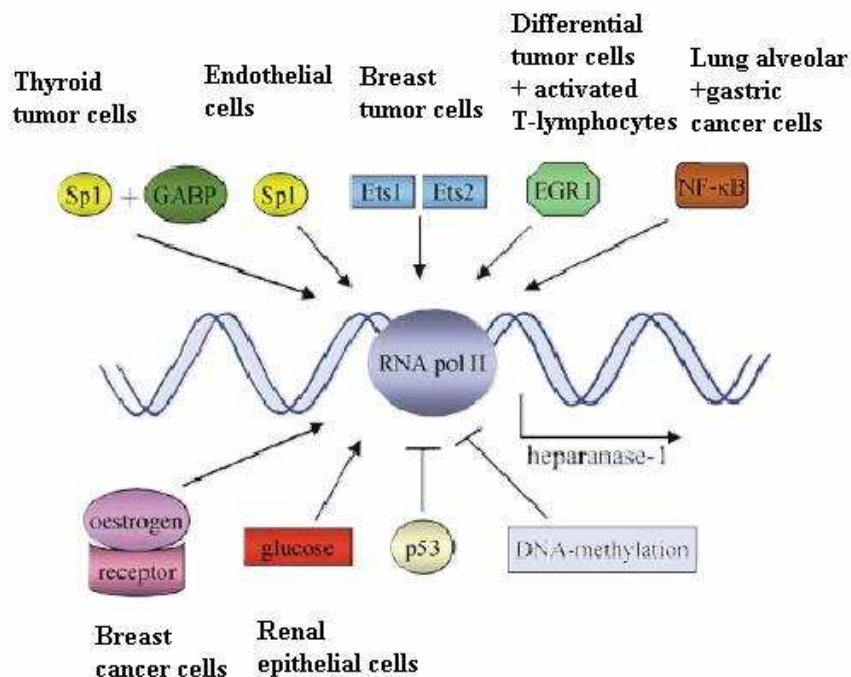


Fig.14: Regolazione dell'espressione dell'heparanase in diversi tipi cellulari. L'espressione del gene HPSE da parte dell'RNA polimerasi II è positivamente regolata da fattori di trascrizione come Sp1, GA-binding protein (GABP), Ets1, Ets2, early growth response-1 (EGR1), NF-κB, estrogeni e glucosio. L'espressione è regolata negativamente dal fattore di trascrizione p53 e dalla metilazione del DNA. (Vreys, David 2007).

c. Funzioni e proprietà dell'heparanase.

Non si conosce ancora molto riguardo al ruolo dell'heparanase nella normale fisiologia di cellule e tessuti. L'espressione dell'heparanase è limitata a pochi tessuti e come già introdotto sembra essere implicata nell'impianto dell'embrione, nei fenomeni riparativi, nella regolazione dell'HS, nel rimodellamento tissutale e nell'immunosorveglianza. La sua predominante espressione nei tumori umani la mette quindi in relazione alla progressione tumorale in base alle sue proprietà pro-invasive e pro-angiogeniche. La degradazione dei vari costituenti dell'ECM, inclusi gli HSPG, rappresenta un elemento fondamentale nei processi di invasione tumorale e metastasi. È stato infatti osservato che l'espressione dell'heparanase è aumentata in vari tumori umani :nei rabdomiosarcomi nei tumori della vescica, del pancreas, della cervice, del colon, delle ovaie, dell'endometrio, della prostata, della tiroide, del fegato, dello stomaco e della cavità orale, del cervello, nei mielomi, nelle leucemie e altri ancora. È stato inoltre rilevata sia la presenza che l'attività dell'heparanase nei plasmi di pazienti con patologie neoplastiche.(Masola et al. 2009). Diversi studi hanno confermato che l'espressione dell'heparanase correla con una ridotta sopravvivenza post-operatoria. Dati sperimentali hanno poi evidenziato che la sovraespressione dell'enzima in diverse linee cellulari tumorali le rende più metastatiche. Recentemente è stato dimostrato che l'heparanase contribuisce

al potenziale metastatico anche attraverso meccanismi indipendenti dalla sua attività enzimatica. Similmente al coinvolgimento nella disseminazione tumorale, l'heparanase può favorire la migrazione delle cellule endoteliali degradando l'HS della membrana basale. Inoltre, il rilascio di fattori trofici pro-angiogenici legati all'HS (FGF-2, VEGF) dall'ECM sostengono questo fenomeno. I frammenti di HS rilasciati dall'heparanase possono ulteriormente promuovere l'attività mitogenica dell' Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2).

d. Attività non enzimatiche dell'heparanase.

Fino a non tanto tempo fa il coinvolgimento dell'heparanase nell'invasione tumorale e nell'angiogenesi è stato attribuito all'attività di degradazione dell'HS. Studi più recenti stanno però evidenziando che la proteina heparanase può esercitare effetti indipendenti dalla sua attività. L'aumentata espressione dell'heparanase è stata messa in relazione con aumentati livelli di fosforilazione di fosfatidilinositolo-3-kinasi (PI3K) e AKT e la somministrazione esogena di heparanase in cellule endoteliali stimola la fosforilazione di AKT. Questo effetto avviene sia in presenza che in assenza di HS sulla superficie cellulare ed è indipendente dall'attività enzimatica. Questi dati suggeriscono la presenza di recettori di superficie per l'heparanase. L'heparanase è inoltre coinvolta nella regolazione genica del VEGF. L'incremento di espressione del VEGF indotto dall'heparanase correla con aumentati livelli di fosforilazione di p38 ma la sua inibizione non influenza la sovraespressione del VEGF. Questa funzione sembra invece essere mediata dalla chinasi Src che risulta anch'essa attivata dalla somministrazione esogena di heparanase anche nella forma inattiva.

e. Strategie di inibizione dell'heparanase.

Poiché la sovra-espressione dell'enzima è stata evidenziata in molti tumori umani in correlazione alla progressione tumorale, all'attiva angiogenesi e ad eventi pro-metastatici, l'heparanase è oggi considerata un eccellente bersaglio molecolare per lo sviluppo di nuove terapie contro il cancro (Vlodavsky *et al.*, 2001). Negli ultimi anni sono state messe a punto numerose strategie per inibirne sia l'espressione genica che l'attività enzimatica. L'heparanase può esser inibita a livello di pro-enzima prevenendo il suo processamento intracellulare e la sua attivazione oppure l'enzima attivo può essere inibito nell'ambiente extracellulare. Gli inibitori possono avere come bersaglio o il sito catalitico dell'enzima oppure le regioni di legame all'HS. Sono stati identificati tre motivi di legame all'HS nella sequenza aminoacidica dell'heparanase e uno di questi è un peptide che si trova all'estremità N-terminale della subunità maggiore. Il peptide (KKDC: Lys¹⁵⁸ –Asn¹⁷¹) che corrisponde a questa regione si associa fisicamente all'eparina e all'HS ed inibisce l'attività dell'heparanase. Interessanti approcci all'inibizione dell'heparanase prevedono l'uso di piccole molecole che hanno come bersaglio il sito catalitico, oppure l'impiego di anticorpi monoclonali neutralizzanti o ancora strategie di silenziamento genico. La maggior parte degli inibitori dell'heparanase fanno parte delle eparine in modo particolare delle eparine non anticoagulanti, a basso peso molecolare e con varie modificazioni. Le eparine infatti sono un analoghe all'SH e quindi costituiscono un substrato alternativo e più affine all'enzima. È stato inoltre evidenziato che la capacità di inibire l'heparanase è proporzionale al grado di solfatazione dell'eparina.

f. Heparanase e Sindecano-1.

Dati recenti indicano che le funzioni dell'heparanase sulla superficie cellulare non sono limitate alla degradazione dell'HS o al rilascio dei fattori trofici che esso sequestra. L'heparanase infatti influenza il metabolismo dei sindecani in una maniera che coinvolge la loro dimerizzazione, shedding e potenzialità mitogena. L'heparanase inoltre influenza le cascate del segnale modificando la fosforilazione di specifiche protein chinasi e la trascrizione genica ad esse associata. Questa funzione HS-indipendente sembra essere mediata da un recettore di superficie non ancora identificato. L'overespressione del sindecano-1 inibisce la proliferazione indotta da FGF-2 ma in certe situazioni l'heparanase può convertire i frammenti extracellulari sheddati di sindecano-1 da inibitori ad attivatori del segnale dell'FGF-2 (Kato et al. 1998b). Questa reazione rende capace l'FGF-2 di interagire con il sindecano-4 che ne favorisce il signalling. Dati recenti hanno anche messo in correlazione la distribuzione intracellulare del sindecano-1 sia con l'heparanase che con FGF-2. Diversi lavori hanno dimostrato che l'ecologia del sindecano-1 sulla superficie cellulare è regolata da diversi enzimi di degradazione della matrice fra cui heparanase e diverse metalloproteasi (MMP2, 9, 7, 14) (Zong et al. 2009) (Fux et al. 2009). L'heparanase interagisce con i sindecani a causa del loro contenuto in HS. Questa interazione ad alta affinità determina la rapida ed efficiente internalizzazione dell'heparanase nella cellula inoltre è stato dimostrato che il sindecano-1 e il sindecano-4 vengono internalizzati qualora venga fornita alla cellula heparanase esogena e co-localizzano con essa nelle vescicole endocitiche. È stato inoltre riportato che nel mieloma multiplo l'heparanase aumenta l'espressione genica del sindecano-1 ed anche il suo shedding. Questa seconda azione sarebbe dovuta ad un'azione congiunta con le MMP. L'heparanase degradando l'HS che riveste il proteoglicano renderebbe il core proteico più esposto al taglio proteolitico delle metalloproteasi. In questo modello tumorale inoltre l'aumentata espressione dell'heparanase genera un aumento di espressione delle MMP (una sheddase del sindecano-1).

6. Le metalloproteasi della matrice.

Vari tipi di proteasi sono state implicate nella degradazione dell'ECM ma il gruppo più numeroso è quello delle metalloproteasi della matrice (MMP). Tutti i membri della famiglia delle MMP condividono un dominio propeptidico che viene perso dopo il processo di attivazione ed un dominio catalitico che contiene un sito di legame per lo zinco. Inoltre, il dominio COOH-terminale delle MMPs è probabilmente il responsabile della specificità per il riconoscimento del substrato ed è presente nella stragrande maggioranza delle MMPs ad eccezione della matrilisina che quindi è la più piccola delle MMPs conosciute. Finora ne sono state descritte 23, tutte geneticamente distinte, e storicamente sono divise in collagenasi, gelatinasi, stromalisine, matrilisine; la distinzione è stata fatta in base alla loro specificità per i componenti della matrice extracellulare e all'organizzazione dei domini e ai loro substrati.

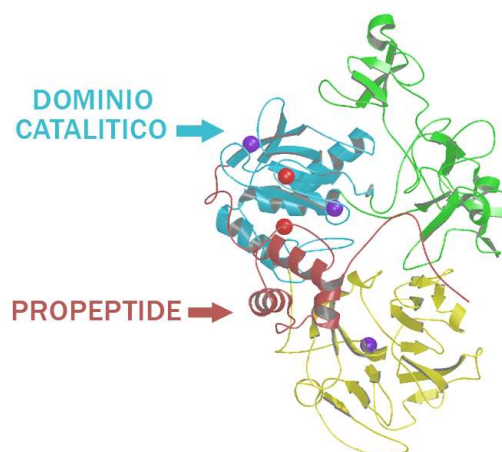


Fig.15: Struttura dell'MMP2.

Le collagenasi -1, -2 e -3 (MMP1, 8 e 13) hanno la capacità di degradare il collagene fibrillare di tipo I, II, III, V e IX. In particolare, la collagenasi-1 degrada preferenzialmente il collagene di tipo III, mentre la collagenasi-2 ha preferenza per i collageni monomerici di tipo I e II. La collagenasi-3 è dieci volte più efficace nella degradazione del collagene di tipo II, ha una più forte attività gelatinolitica rispetto alla collagenasi-1 ed una più ampia specificità di substrato rispetto ad altre collagenasi. Alcune collagenasi sono espresse in tessuti specifici mentre altre sono presenti in numerosi tipi cellulari sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Infatti, numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che la collagenasi-1 è espressa in numerosi tipi cellulari normali quali cheratinociti, fibroblasti, cellule endoteliali, monociti, macrofagi, condrociti ed osteoblasti, al contrario dell'espressione della collagenasi-2 che è stata ritrovata solo nei neutrofili, nei condrociti in presenza di IL-1 β , in cellule endoteliali e nei fibroblasti sinoviali. Infine, la collagenasi-3, originariamente clonata da tessuto tumorale mammario, è stata trovata nel midollo in sviluppo, nella cartilagine osteoartritica, nella membrana sinoviale reumatoide, in periodontiti, e in cellule tumorali di melanoma e del carcinoma a cellule squamose.

Le gelatinasi A e B (MMP2 e 9) tagliano preferenzialmente i legami peptidici nel collagene denaturato di vari tipi (IV, V, VII e X) e producendo piccoli peptidi di degradazione. Le MMP2 e 9 sono presenti in differenti cellule e tessuti. La MMP2 è stata identificata in fibroblasti cutanei, cellule endoteliali, monociti e in un numero di altre cellule normali e trasformate. Esperimenti *in vivo* su topi *knockout* per i geni delle gelatinasi hanno prodotto animali caratterizzati da ridotta capacità angio-genetica e ridotta crescita tumorale primaria e con un moderato ritardo nell'accrescimento. La MMP9 è prodotta dai cheratinociti, macrofagi, leucociti e da numerose cellule tumorali ma non dai fibroblasti. Essa svolge inoltre un ruolo fondamentale nella crescita delle ossa, infatti la condizione *knockout* per il gene della MMP9 nel topo induce ritardo nella vascolarizzazione ed ossificazione ed una anomala crescita delle ossa piatte dello scheletro.

Le stromalisine comprendono un gruppo di enzimi proteolitici tra cui la stromalisina -1 e -2 (MMP 3 e MMP10), la matrilisina (MMP7) e la metalloelastasi di matrice (MMP12). Questi enzimi hanno un'ampia specificità di substrato e condividono la proprietà di essere capaci di attivare altre MMPs. Le matrilisine comprendono la MMP7 (matrilisina 1) e la MMP26 (matrilisina 2) e sono spesso costitutivamente espresse in cellule epiteliali ghiandolari e in vari tipi di tessuti tumorali. Sono capaci inoltre di degradare proteoglicani, collagene di tipo IV e IX, laminina, fibronectina ed

elastina. La MMP7 è anche capace di attivare la procollagenasi e processare il pro-TNF- α , similmente alla stromalisina-1(Murphy, Nagase 2008).

Ci sono poi due tipi di MMP transmembrana (MT-MMP) che comprendono quattro proteine transmembrana di tipo I (MMP14, 15, 16 e 24) e due proteine ancorate via glicofosfatidilinositolo (MMP17 e 25). Queste, ad eccezione della MMP17, possono attivare la proMMP2 e la MMP14 oltre ad avere un'attività collagenolitica verso i collagene I, II e III può anche attivare anche la proMMP13.

Recentemente è stata inoltre illustrata una relazione fra heparanase e MMP, in particolare in un modello murino *knockout* per l'heparanase in alcuni organi l'espressione di MMP2 e 14 risultava incrementata.(Zcharia et al. 2009).

7. Il rene

a. Anatomia e fisiologia

I reni sono due organi di colore rosso scuro, a forma di fagiolo, simmetrici, lunghi circa 10 cm, larghi 7, spessi 3 o 4 cm e dal peso unitario di circa 150 grammi, situati nella cavità addominale ai lati delle ultime vertebre toraciche e delle prime lombari, Ogni rene riceve grosse quantità di sangue dall'arteria renale (ramo dell'aorta) e, dopo averlo filtrato, lo riversa nella vena renale che confluisce nella vena cava. In sezione longitudinale si evidenziano due regioni: una esterna più chiara detta corticale ed una interna più scura detta midollare. Entrambe le regioni contengono al loro interno i nefroni, i nervi, i vasi sanguigni ed i vasi linfatici.

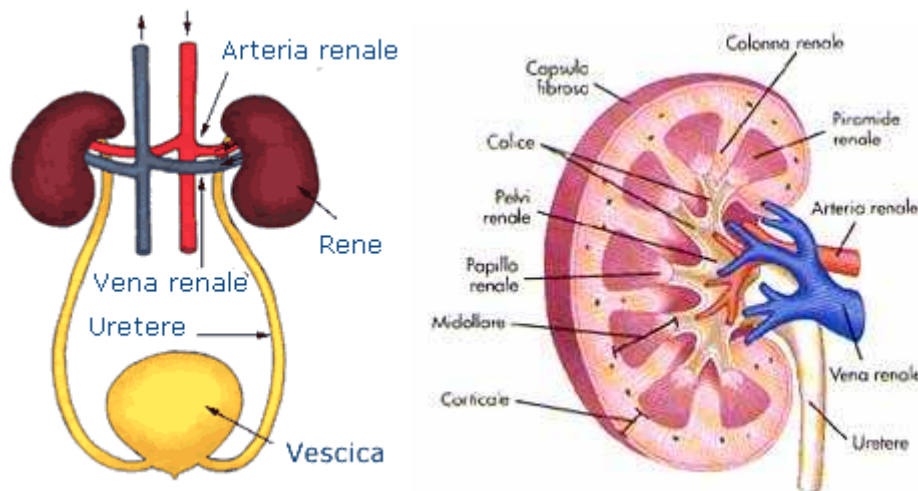


Fig.16: Rappresentazione della struttura renale e le connessioni di questi organi agli apparati vascolare e urinario.

I reni ricoprono funzioni importantissime: oltre alla nota attività filtrante questi organi regolano gli equilibri idro-salini e il pH nel sangue. A livello renale avviene anche la sintesi di eritropoietina (un ormone che favorisce la produzione di globuli rossi) e di renina (un enzima con azione ipertensiva che regola la sintesi di ormoni implicati nel bilancio del sodio e nel controllo pressorio). Grazie a tutte queste funzioni, i reni sono organi essenziali per la sopravvivenza dell'individuo; per questo motivo i pazienti con patologie renali gravi sono costretti a sottoporsi periodicamente ad una

procedura medica di purificazione del sangue, detta dialisi. L'unità funzionale del rene è il nefrone, un tubulo microscopico in grado di svolgere tutte le funzioni dell'organo e capace, come tale, di filtrare il sangue e raccogliere il filtrato che darà origine all'urina. Il prodotto finale della filtrazione confluisce nella pelvi renale e poi, attraverso un piccolo tubicino chiamato uretere, nella vescica. In ciascun rene sono presenti circa un milione di nefroni; in ognuno di essi si possono riconoscere un polo vascolare, nel quale scorre il sangue da filtrare, ed una porzione tubulare in cui si raccoglie il filtrato. La parte vascolare è formata dalla arteriola afferente, che si dirama, in una fitta rete di capillari chiamata glomerulo; in questa sede avviene la filtrazione glomerulare, che dà origine al filtrato o preurina. Dopo essere passato dall'arteriola afferente al glomerulo, il sangue confluisce all'arteriola efferente. All'inizio del glomerulo, il sangue è raccolto in una struttura chiamata capsula di Bowman, da cui originario una serie contigua di tubuli, chiamati, nell'ordine, tubulo contorto prossimale, ansa di Henle e tubulo contorto distale, per una lunghezza complessiva di 5 centimetri.

Durante l'ultrafiltrazione del plasma dai capillari glomerulari allo spazio di Bowman, il filtrato passa attraverso tre strati: l'endotelio capillare, la membrana basale glomerulare e lo strato dei podociti.

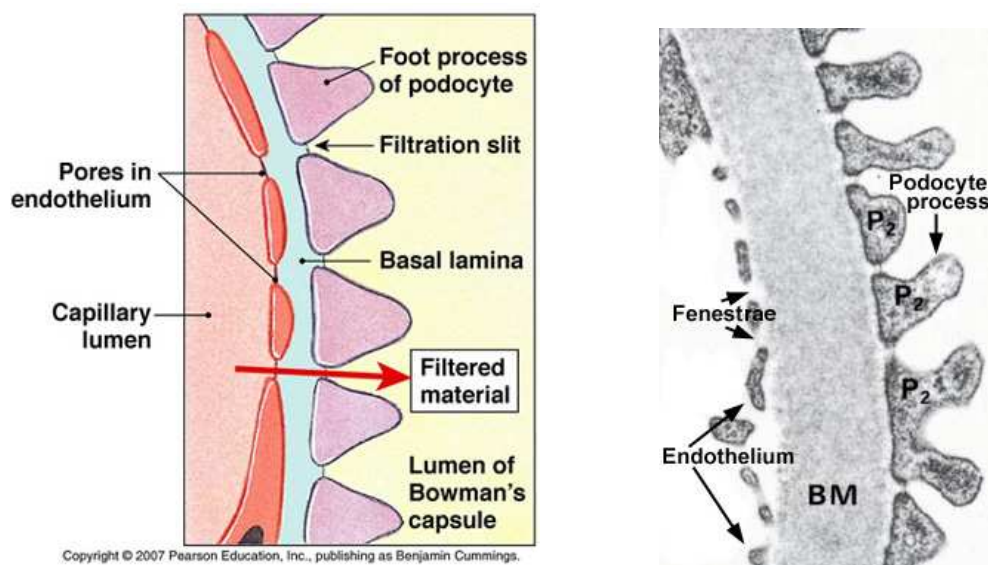


Fig.17: Rappresentazione grafica (sinistra) e immagine al microscopio elettronico (destra) della composizione della barriera di filtrazione glomerulare.

Tutte e tre queste strutture compongono il filtro glomerulare e partecipano al processo di ultrafiltrazione. Le cellule endoteliali dei capillari glomerulari contengono numerose fenestrazioni del diametro di circa 50-100 nm, che sono sufficientemente grandi da permettere il passaggio di quasi tutti gli elementi acellari del sangue. La membrana basale glomerulare è molto più spessa (240-340 nm) delle altre membrane basali e sembra essere elaborata sia dalle cellule endoteliali capillari sia da podociti. Essa è costituita da collagene di tipo IV, da glicoproteine strutturali (fibronectina e laminina) e da HSPG; gli interstizi di questa struttura sono occupati d'acqua. Osservata al microscopio elettronico a trasmissione, questa membrana è costituita da tre strati: una lamina rara interna, adiacente all'endotelio, una lamina densa centrale ed una lamina rara esterna in

contatto con lo strato dei podociti. Entrambe le lamine rare presentano cariche negative. Il foglietto viscerale della capsula del Bowman è composto da uno strato di cellule epiteliali specializzate: i podociti. Queste cellule avvolgono i capillari glomerulari ed hanno lunghe estensioni citoplasmatiche chiamate processi primari. I processi primari danno origine, a loro volta, a corti processi secondari conosciuti col nome di pedicelli. I pedicelli si interdigitano strettamente con i processi primari e sono direttamente adesi alla membrana basale glomerulare (MBG) attraverso fini filamenti. Gli spazi tra le interdigitazioni, chiamati fessure di filtrazione, sono di larghezza uniforme e sono chiusi da un sottile diaframma elettrondenso spesso 4 nm. La superficie esterna dei podociti è rivestita da uno spesso glicocalice, struttura fortemente carica negativamente, che si estende anche sulle fessure di filtrazione. Il tubulo prossimale inizialmente ha una forma contorta a cui segue un tratto retto che scende verso la midollare. Le cellule dei tubuli renali non hanno la medesima morfologia in tutti i tratti; infatti, le cellule del tubulo prossimale sono di forma isoprismatica e possiedono due specializzazioni cellulari: l'orletto a spazzola (un ricco insieme di microvilli a livello del polo basale delle cellule) e il labirinto basolaterale (un tortuoso labirinto di introflessioni citoplasmatiche che accolgono numerosissimi mitocondri a livello del polo basale della cellula). I microvilli aumentano la superficie di assorbimento delle cellule tubulari, contenendo numerosissime proteine di trasporto transmembranarie, la cui energia è fornita dalla ricca quota di mitocondri di cui è provvista la cellula. Il segmento successivo è l'ansa di Henle, costituita dal tratto retto del tubulo prossimale, da un tratto sottile discendente (che termina con un'ansa a forcina), e da due tratti ascendenti (solo nei nefroni dotati di anse di Henle lunghe), uno sottile ed uno spesso. Il tubulo distale inizia dopo l'ansa di Henle e si estende fino ad un punto della corticale dove due o più nefroni confluiscono per formare un dotto collettore corticale. Tale dotto si inoltra nella midollare formando il dotto collettore della midollare dapprima esterna e successivamente interna. I dotti collettori confluiscono progressivamente nella pelvi renale, nei calici maggiori ed infine raggiungono l'uretere dove viene raccolta l'urina.

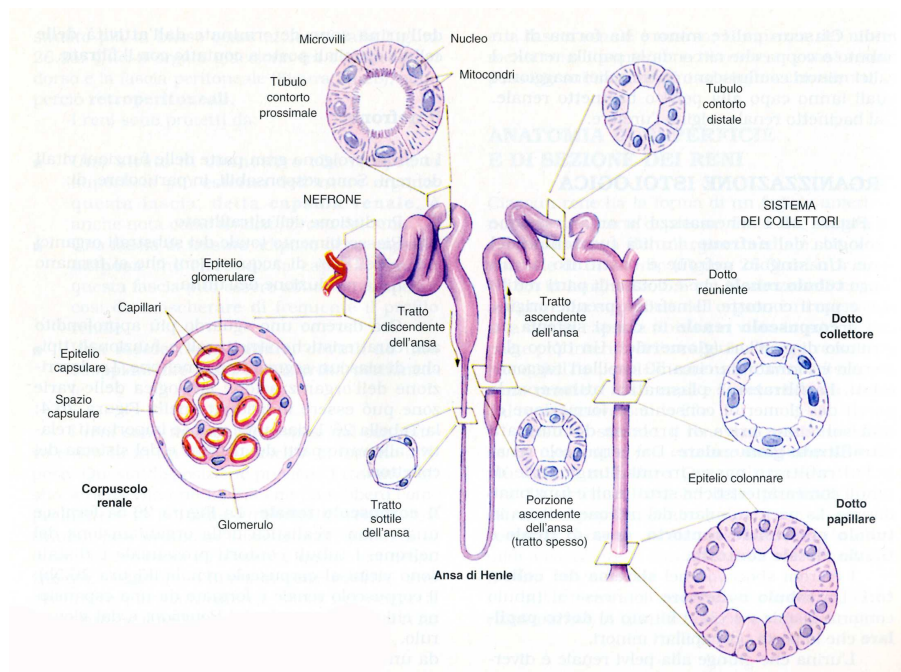


Fig.18: Struttura del nefrone.

Le funzioni del rene sono essenzialmente due: la regolazione della concentrazione di acqua e soluti e l'eliminazione di sostanze non più utilizzabili o dannose (farmaci e prodotti finali del metabolismo come urea, acido urico ed eccesso di ioni H^+). I processi fondamentali che avvengono nel nefrone sono tre, dal momento che ognuno di essi è in grado di filtrare, riassorbire e secernere in modo indipendente.

FILTRAZIONE: avviene tra capillari glomerulari e capsula di Bowman. Per le loro eccessive dimensioni, nel filtrato non passano le cellule, quindi non sono presenti i globuli rossi, i globuli bianchi e le piastrine; viene inoltre impedito il passaggio delle proteine più grandi. Il filtrato assume così la stessa composizione del plasma (parte liquida del sangue) privato delle proteine a molecola maggiore, dal momento che solo le più piccole e modeste quantità di albumina riescono a passare nel filtrato.

RIASSORBIMENTO: consiste nel recupero di acqua e soluti filtrati, che passano dai tubuli ai capillari sanguigni. La quantità riassorbita è quindi data dall'acqua più le sostanze che lasciano la preurina e tornano nel circolo sanguigno. Tra queste rientrano tutti i prodotti utili per l'organismo, come il glucosio, le proteine più piccole che sono riuscite a passare nel filtrato, gli amminoacidi, le vitamine, una grandissima quantità di acqua e vari sali.

SECREZIONE: processo, inverso al riassorbimento, per cui alcune sostanze passano dal sangue contenuto nei capillari ai tubuli renali, aggiungendosi a quelle filtrate. Tra le sostanze secrete rientrano tutte quelle che necessitano di una rapida eliminazione, come i farmaci, gli ioni H^+ e le molecole presenti in eccesso.

ESCREZIONE: consiste nell'eliminazione dell'urina nella pelvi renale. Il volume escreto equivale al volume filtrato meno quello riassorbito più quello secreto. L'acqua e i sali minerali sono in parte riassorbiti ed in parte escreti, grazie ad un fine meccanismo regolatorio.

b. Il glucosio e l'albumina nel tubulo prossimale

Il glucosio, in virtù delle sue ridotte dimensioni, viene rapidamente filtrato a livello glomerulare; per questo motivo la sua concentrazione nel filtrato è identica a quella del plasma. Se in un grafico si riportano in ascissa la concentrazione plasmatica di glucosio ed in ordinata la sua concentrazione nel filtrato, si ricave una retta, poiché i due valori sono direttamente proporzionali (tanto più glucosio è presente nel plasma e tanto più ne ritroviamo nel filtrato). Questa relazione è valida sia per valori glicemici fisiologici, sia per concentrazioni di glucosio superiori (diabete). Dopo essere stato filtrato il glucosio viene prontamente riassorbito nel tubulo prossimale, delle cellule epiteliali. Quest'operazione è abbastanza complessa: il glucosio viene captato da specifici trasportatori, capaci di legare contemporaneamente una molecola di sodio ed una di glucosio e di trasportarli insieme nel citoplasma delle cellule che costituiscono la membrana esterna del tubulo renale; a questo livello una pompa sodio potassio provvederà a riportare all'esterno il sodio, mentre un trasportatore GLUT-4 compirà la medesima operazione con lo zucchero (riversandolo nell'interstizio). In condizioni fisiologiche questi trasportatori riescono a recuperare tutto il glucosio ma, dal momento che il loro numero è limitato, quando le concentrazioni dello zucchero nel filtrato salgono eccessivamente, un po' di glucosio sfugge al riassorbimento. Quando tutti questi carriers sono legati ad una molecola di glucosio(saturati) l'originale e diretta proporzionalità tra glucosio filtrato e glucosio riassorbito viene quindi perduta. Questo fenomeno si manifesta in corrispondenza della cosiddetta soglia

renale, che equivale ad una glicemia di 300 mg/dl. Una volta superato tale limite, la concentrazione di glucosio riassorbito non può più aumentare, anche se la concentrazione di glucosio nel filtrato continua a crescere. Di conseguenza la concentrazione dello zucchero nelle urine, pari a 0 al di sotto della soglia renale, inizierà ad aumentare proporzionalmente. Il limite di 300 mg di glucosio per decilitro di sangue è un valore teorico, ma in pratica tale soglia è molto più bassa, pari a circa 180 mg/dl. Questa differenza dipende dal fatto che non tutti i nefroni sono ugualmente abili nel recuperare il glucosio, a causa della variabilità nel numero di trasportatori. La presenza di glucosio nelle urine è molto pericolosa, poiché questo zucchero richiama notevoli quantità di acqua, disidratando l'organismo; inoltre, facilitando la proliferazione batterica, aumenta l'incidenza di infezioni alle vie urinarie.

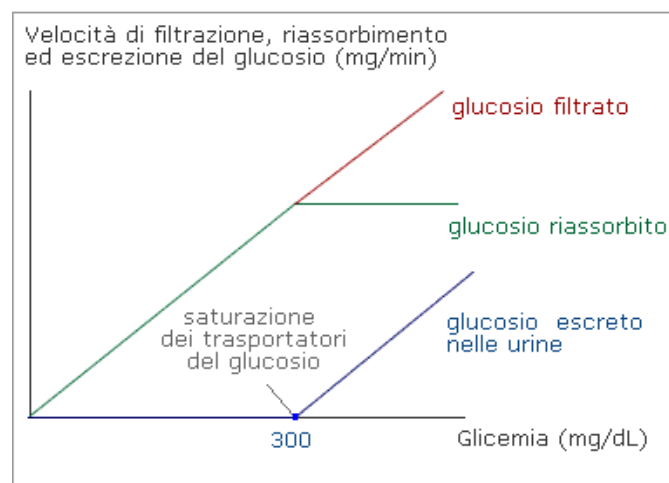


Fig.19: Schematizzazione della filtrazione, riassorbimento ed escrezione del glucosio. Il glucosio filtra completamente dal plasma alla preurina, a livello del tubulo prossimale viene riassorbito fino alla concentrazione di 300 mg/dL. Quando la glicemia supera i 180 mg/dl solo alcuni nefroni si lasciano scappare piccole quantità di glucosio, mentre quando i livelli glicemici superano la soglia teorica di 300 mg/dl, tutti i trasportatori sono saturi, non riescono a riassorbire tutto il glucosio ed il nefrone lo espelle nelle urine.

L'albumina è una proteina di 65 kD con carica elettrica negativa; la combinazione tra il fattore dimensione e la carica rendono difficile il suo passaggio nello spazio urinario. La microalbuminuria è da sempre associata ad un difetto primario a livello glomerulare, ci sono comunque evidenze che anche il tubulo renale rivesta un ruolo critico nel riassorbimento dell'albumina filtrata e nello sviluppo dell'albuminuria. La concentrazione di albumina stimata nel filtrato glomerulare è di circa 3,5 µg/ml e il 95% dell'albumina filtrata viene riassorbita.

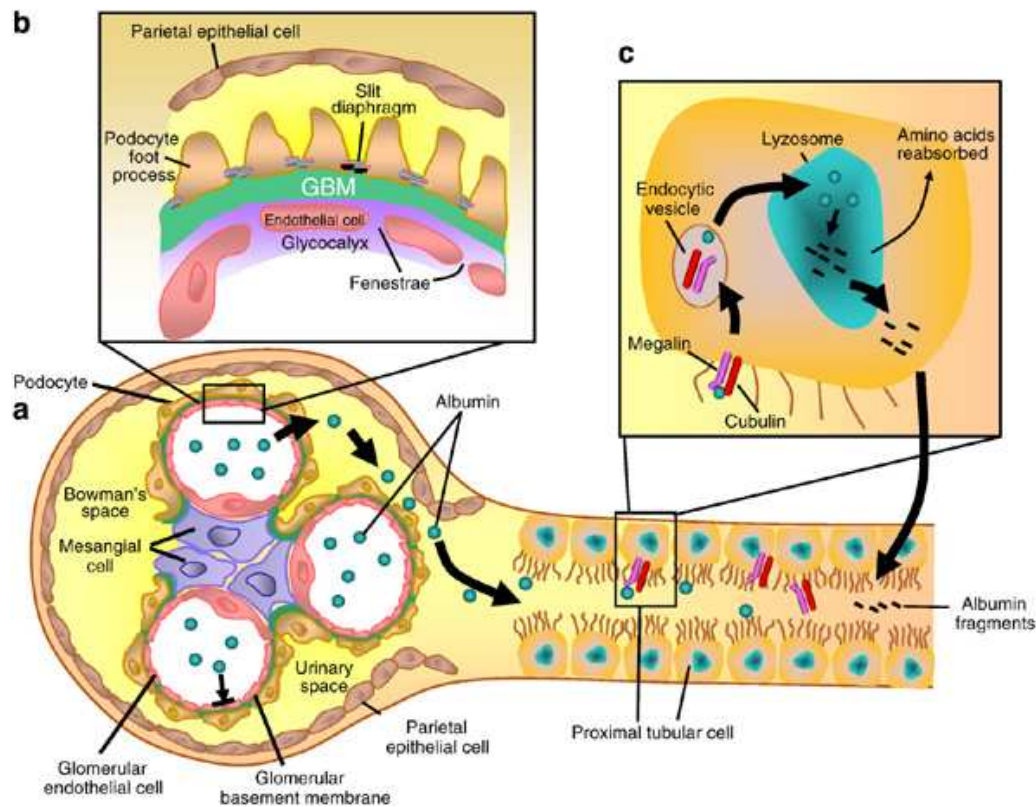


Fig.20: Normale filtrazione e riassorbimento dell'albumina. (a) Normale glomerulo e tubulo prossimale. L'albumina (sfere verdi) normalmente rimane nei capillari del glomerulo e non passa nella capsula di Bowman. (b) Barriera di filtrazione glomerulare (le componenti sono state descritte in precedenza). (c) Tubulo prossimale. L'albumina viene intrnalizzata mediante vescicole e viene degradata da lisozima.

Il meccanismo con cui viene riassorbita l'albumina coinvolge un "pathway" recettore mediato molto attivo che comprende il complesso Megalina/Cubilina responsabile del legame dell'albumina a livello tubulare.

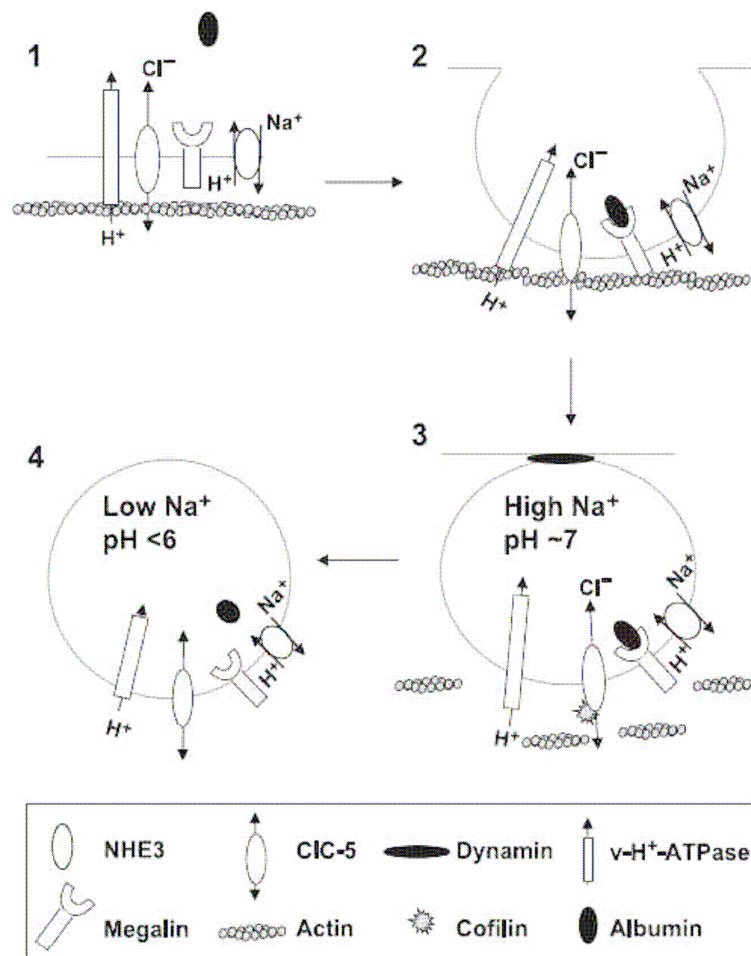


Fig.21: Meccanismo del riassorbimento tubulare dell'albumina. Il complesso di trasporto è presente a livello della membrana plasmatica nella fenditura dei microvilli è ancorato al citoscheletro ed è formato da ClC-5, dallo scambiatore Na^+/H^+ (NHE3) e dal complesso Megalina/Cubilina. (1). L'endocitosi ha inizio quando l'albumina si lega al complesso Megalina/Cubilina (2). L'endosoma nascente viene quindi staccato dalla membrana mediante riarrangiamenti citoscheletrici. A questo punto l'endosoma contiene fluido extracellulare con elevate concentrazioni di Na^+ e un pH neutro (3). A questo punto avviene l'acidificazione dell'endosoma e l'albumina si dissocia dal complesso (4). L'albumina viene infine condotta al comparto lisosomiale in cui verrà degradata nei suoi costituenti aminoacidici. (Hryciw et al. 2004).

8. La nefropatia diabetica .

a. Caratteristiche della ND.

La ND è un importante causa di mortalità e morbidità nei pazienti sia diabetici, sia con diabete di tipo I che di tipo II. Il diabete mellito è la più comune causa di insufficienza renale (IR) negli Stati Uniti e in alte nazioni sviluppate e rappresenta il 40% di nuovi casi di IR negli Stati Uniti. (Gilbertson et al. 2005). Nonostante le innovazioni dei trattamenti clinici, inclusi il controllo

glicemico e della pressione sanguigna il numero di casi di IR correlati al diabete continuano a crescere, specialmente in relazione al diabete di tipo II. La patogenesi e la storia clinica della (ND) caratterizzata da un progressivo declino della funzione glomerulare è stata inizialmente descritta nei soggetti con diabete di tipo I. Si osserva comunque la glomerulopatia e la progressione della malattia renale anche nei soggetti con diabete di tipo II suggerendo che il processo patologico avvenga in maniera simile alla nefropatia dei soggetti con diabete di tipo I. Dati emergenti supportano il fatto che le alterazioni della parete dei capillari glomerulari e del mesangio nella ND implicano alterazioni delle glicoproteine in queste strutture. La ND si caratterizza per la perdita con le urine di una quantità crescente di albumina (albuminuria), che spesso si accompagna all'aumento della pressione arteriosa e precede la riduzione della funzione glomerulare e tubulare (Gilbert, Cooper 1999). L'insufficienza renale terminale, con necessità di dialisi o trapianto, interviene dopo 20-30 anni dalla insorgenza del diabete. Circa il 25% dei diabetici di tipo I e il 5-10% dei soggetti con diabete di tipo II sviluppano insufficienza renale e in dialisi hanno una peggiore qualità di vita ed una ridotta sopravvivenza. Meno del 20% dei pazienti con diabete sopravvive in dialisi per più di cinque anni, rendendo la mortalità di questa patologia più alta di molte forme di cancro. La presenza di ND si accompagna inoltre a un più elevato rischio di malattie cardiovascolari e di altre complicanze tipiche del diabete (neuropatia e retinopatia diabetica). La ND non si associa ad alcun sintomo clinico nelle prime fasi del suo sviluppo, caratterizzato soltanto dalla presenza nelle urine di una quantità moderatamente elevata di albumina (microalbuminuria). In condizioni normali, la quantità di albumina eliminata giornalmente con le urine non supera i 30mg/l. Si definisce microalbuminuria una quantità di albumina compresa fra 30 e 300mg/l. L'escrezione di una quantità superiore ai 300mg viene definita invece macroalbuminuria ed è indicativa di una nefropatia conclamata. Quando la quantità di albumina secreta è superiore ai 300mg, il danno renale è di tale entità da consentire anche il passaggio di proteine diverse dall'albumina. Per questo il termine macroalbuminuria è interscambiabile con quello di proteinuria. Nel tempo la quantità di proteine disperse con le urine può crescere progressivamente fino a raggiungere valori superiori ai 3g nelle 24 ore. Ne deriva una riduzione della concentrazione di albumina nel sangue con conseguente comparsa di edema alle caviglie e successiva estensione ad altri distretti. La comparsa di microalbuminuria è abitualmente accompagnata da un aumento della pressione arteriosa che contribuisce al progressivo peggioramento della funzione renale. La presenza di insufficienza renale si associa a una sintomatologia complessa che include una marcata riduzione delle forze, mancanza di appetito, nausea e, nelle forme più avanzate, vomito, gonfiore alle caviglie o edemi diffusi, anemia per la mancanza di eritropoietina e dolori ossei per la presenza di una osteodistrofia renale secondaria a una carenza di vitamina D. In questa fase di insufficienza renale terminale è inevitabile il ricorso alla terapia dialitica o al trapianto di rene. Sospetti fattori di rischio per lo sviluppo e la progressione della ND includono lo stato iperglicemico, l'ipertensione, la predisposizione familiare, il sesso maschile, il fumo e la dislipidemia.

Nella evoluzione della ND si possono perciò distinguere alcuni stadi. Nel periodo immediatamente successivo alla insorgenza del diabete la funzione renale è normale, può esserci anzi un aumento della filtrazione glomerulare legato all'iperglicemia, non c'è microalbuminuria e la pressione arteriosa è normale. La maggior parte dei pazienti rimane in questo stadio e, se nessuna variazione interviene dopo 15 anni, è ormai improbabile che la ND insorga successivamente. In una minoranza di casi, 15% dei diabetici di tipo I e 5-10% dei diabetici di tipo II, in un tempo variabile dai 5 ai 10

anni di durata del diabete compare microalbuminuria, eventualmente associata a un lieve aumento della pressione arteriosa, mentre la funzione renale di filtrazione si mantiene normale. Questo stadio viene anche definito come nefropatia incipiente. In uno stadio ulteriore, che copre il periodo fra 10 e 20 anni di durata del diabete, aumentano i livelli di proteinuria, compare ipertensione arteriosa e comincia a rendersi evidente una riduzione della funzione renale. Questo stadio viene definito di nefropatia clinica o conclamata. Da questo momento, il calo della funzione renale diviene progressivo e, in assenza di terapia, procede celermente verso lo stadio finale di insufficienza renale terminale con necessità di ricorso alla terapia sostitutiva. Nel diabete di tipo I, difficilmente la microalbuminuria è dimostrabile prima dei 5 anni di durata della malattia. Questo non vale sempre nel diabete di tipo II, che può presentare microalbuminuria fin dal momento della diagnosi, giacché questa, il più delle volte, segue di diversi anni l'insorgenza della malattia. La microalbuminuria è un importante indice predittivo della futura comparsa di ND conclamata. In realtà, fino al 50% dei soggetti diabetici può presentare microalbuminuria nella prima fase della malattia e, di questi, circa un terzo o poco più, all'incirca il 20% del totale, sviluppano una proteinuria ed evolvono verso l'insufficienza renale. Attualmente la ND è la causa più frequente di accesso ai servizi di emodialisi e dialisi peritoneale e ai programmi di trapianto renale. L'esperienza dell'ultimo ventennio ha infatti dimostrato che una terapia appropriata può fare regredire verso la normalità una condizione di microalbuminuria e rallentare in modo significativo il declino della funzione renale quando si sia già stabilita una condizione di proteinuria.

Le caratteristiche delle alterazioni glomerulari nella ND possono essere divise nelle seguenti categorie: 1) Alterazioni patologiche dello spessore della MBG e deplezione delle cariche anioniche dei GAG, specialmente HS, nella MBG con la conseguente riduzione della fisiologica barriera elettrostatica. (Jensen 1997). La riduzione della barriera elettrostatica è il risultato di una ridotta sintesi di HS ed una sua ridotta solfatazione. La perdita di questa barriera ionica permette il passaggio dell'albumina, e successivamente ad altre grandi molecole, attraverso la MBG nel filtrato glomerulare e con il conseguente instaurarsi di albuminuria e proteinuria. 2) L'espansione del mesangio è dovuta ad un aumento sia della matrice che ad una proliferazione cellulare. Un mediatore cardine di questi eventi è il "Transforming Growth Factor- β 1" (TGF- β 1) che nelle cellule mesangiali induce un' aumentata espressione delle proteine della matrice incluse fibronectina e collagene IV (Oh et al. 1998). L'espansione del mesangio altera la configurazione delle strutture glomerulari, specialmente la superficie di filtrazione. Oltre alle alterazioni glomerulari i danni tubulo interstiziali sono una caratteristica prominente della ND e l'albuminuria / proteinuria sono un potente mediatore di questo processo patologico. La presenza di albumina e altre proteine nel filtrato glomerulare è tossica per le cellule epiteliali tubulari e causa infiammazione e fibrosi. Quindi albumina e proteine non sono solamente un marcatore passivo di ND ma una causa della progressione di questa patologia. Il grado di danno tubulo/interstiziale è altamente predittivo per lo sviluppo della ND (Bohle et al. 1991).

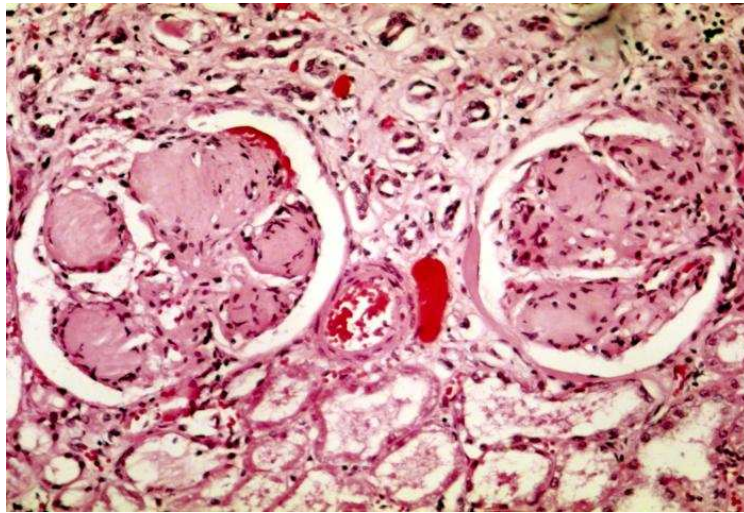


Fig.22: Glomerulosclerosi con notevole proliferazione mesangiale.

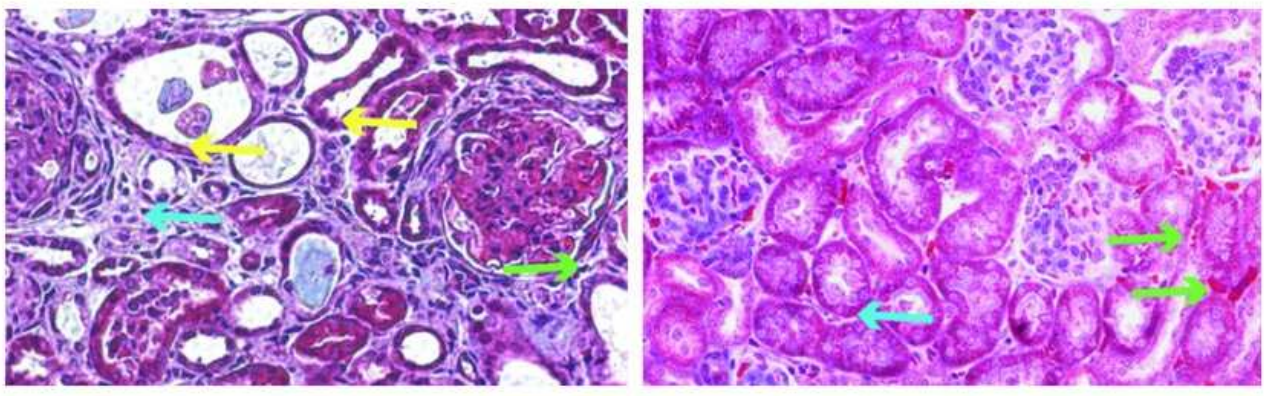


Fig.23: Fibrosi tubulo/interstiziale. A sinistra rene fibrotico che mostra l'accumulo di molti fibroblasti (freccie azzurre), tubuli danneggiati (freccie gialle), e vasi sanguigni (freccie verdi). A destra un rene normale con la propria struttura e pochi fibroblasti.

b. I mediatori del danno tubulare nella nefropatia diabetica: alto glucosio, albumina e AGE

È stato dimostrato che il danno tubulare nel corso della ND dipende da vari fattori come l'eccesso di glucosio, l'albuminuria nonché dalla presenza di prodotti di avanzata glicazione (AGE).

- **L'alto glucosio**

Il ruolo dei trasportatori del glucosio in vari tipi cellulari renali non è ancora stato chiarito completamente, comunque, dopo il suo ingresso nella cellula le vie del segnale che vengono attivate sono simili.(Kanwar et al. 2008). L'assorbimento di glucosio nelle cellule del tubulo prossimale è proporzionale alla concentrazione plasmatica visto che viene filtrato liberamente dal glomerulo.

All'iperglicemia, del diabete, si associano quindi alti livelli di glucosio nel filtrato glomerulare e si verifica quindi un aumento del suo riassorbimento tubulare. Il riassorbimento del glucosio avviene mediante un meccanismo che implica un trasporto di sodio all'interno della cellule e aumentati livelli di glucosio si riflettono nell'ipertrofia delle cellule del tubulo prossimale tipica della ND (Bank, Aynedjian 1990). Alti livelli di glucosio alterano inoltre il metabolismo dei componenti della matrice extracellulare, come fibronectina e collagene IV attivando la via dei polioli (Bleyer et al. 1994) ed aumentando la produzione di TGF- β .

- **La proteinuria / albuminuria**

La riduzione della funzione renale nelle condizioni proteinuriche, inclusa la ND, è caratterizzata dallo sviluppo di un insieme di caratteristiche quali l'infiammazione interstiziale, l'atrofia tubulare e la fibrosi che evolvono nell'insufficienza renale e dove l'intensità del danno è direttamente proporzionale alla proteinuria (Baines, Brunskill 2008).

Diversi studi hanno dimostrato una relazione fra il grado di insulto tubulare e i livelli di proteinuria sostenendo l'importanza delle strategie miranti a ridurre la proteinuria al fine di controllare la progressione della malattia.(Gambaro et al. 2002).

L'esposizione delle cellule epiteliali del tubulo prossimale ad un eccesso di proteine, in modo particolare all'albumina (che nei modelli sperimentali *in-vitro* viene simulata dall'albumina sierica bovina – BSA) porta all'attivazione di molteplici vie di trasduzione del segnale e di fattori di trascrizione.

Signalling mediators stimulated	Transcription factors altered	Mediators released
ERK 0.5	NF κ B	Endothelin-1
MEK1	AP-1	MCP-1
p38 MAP kinase	Elk-1	RANTES
c-jun N-terminal kinase	STAT	Fractalkine
Ribosomal p70 ^{S6} kinase	HIF/HRE (reduced)	Interleukin-8
PKC	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (by albumin-bound fatty acids)	Osteopontin
PKB		Transforming growth factor- β
Phosphatidylinositide 3-kinase		Tumor necrosis factor- α
NAD(P)H oxidase		Connective tissue growth factor
Intracellular [Ca ²⁺] (increased)		Fibronectin
		Collagen
		Complement
		Reactive oxygen species

Tabella 2: Alterazioni delle vie del segnale, dei fattori di trascrizione e del fenotipo di secrezione dovute a condizioni proteinuriche in cellule epiteliali del tubulo prossimale (Pollock, Poronnik 2007) (Caruso-Neves et al. 2006).

- **I prodotti di avanzata glicazione (AGE)**

I prodotti di avanzata glicazione (Advanced Glycation End-products – AGE) sono un gruppo di macromolecole che si formano in maniera non enzimatica dall'interazione di zuccheri con proteine, lipidi e acidi nucleici e la loro formazione risulta aumentata nella situazione di iperglicemia tipica del diabete (Bucala, Cerami 1992) (Vlassara, Bucala & Striker 1994). La glicosilazione non enzimatica avviene attraverso il legame non covalente di gruppi aldeidici o chetonici degli zuccheri ai gruppi aminici liberi delle proteine, con formazione di addotti instabili, chiamati basi di Schiff. Durante stati prolungati di iperglicemia, come nel diabete, questi prodotti di glicosilazione primaria rappresentano le basi per ulteriori riarrangiamenti molecolari, che portano alla formazione degli AGE. Tali trasformazioni possono avvenire a livello dei fosfolipidi, dei nucleotidi e delle proteine, preferibilmente su quelle molecole che hanno un basso grado di ricambio fisiologico. Il glucosio è il carboidrato più abbondante nel plasma, e quindi più facilmente di altri zuccheri può attaccarsi ai gruppi aminici delle proteine plasmatiche. Dopo giorni, le basi di Schiff possono formare composti più stabili chiamati prodotti di Amadori. Per esempio, la reazione del glucosio con i gruppi aminici delle proteine forma il prodotto di Amadori che possono essere degradati in una varietà di altri composti carbonilici altamente reattivi. Gli AGE possono formarsi sia nell'ambiente extracellulare che all'interno della cellula. Il tubulo renale, particolarmente il suo segmento prossimale, è esposto agli AGE filtrati dai glomeruli e anche agli AGE circolanti nei capillari peritubulari (Friedman 1999). Gli AGE prodotti nell'ambiente extracellulare possono essere riassorbiti mediante meccanismi aspecifici dalle PTEC (Miyata et al. 1998) o interagire con il loro recettore RAGE o altre proteine di legame di membrana e da qui innescare una serie di eventi. (Tan, Forbes & Cooper 2007) (Neeper et al. 1992). Le vie di trasduzione del segnale che vengono attivate sono molteplici: p38, PI3K, p21ras, ERK1/2 kinases, and NF- κ B (Schmidt et al. 1994) (Calcutt et al. 2009) e portano all'induzione di stress ossidativo, iper-responsività alle citochine infiammatorie e sovraespressione di molecole di adesione (Schmidt et al. 1995).

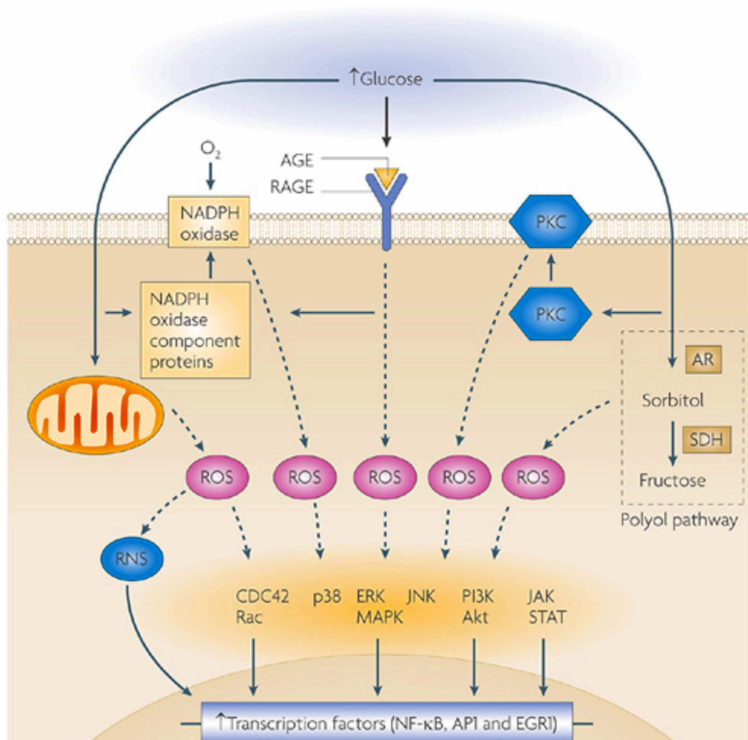


Fig.24: Rappresentazione delle vie del segnale che vengono influenzate dallo stress ossidativo generato dagli AGE e conseguenti modificazioni ai fattori di trascrizione.

c. Il ruolo dell'FGF-2

La famiglia genica dei “Fibroblast Growth Factor” (FGF) comprende 18 membri di cui i più rilevanti sono l'FGF-1 e l'FGF-2 (chiamato anche b-FGF). L'FGF-2 è un fattore di crescita pleiotropico con un'ampia distribuzione in tutto il corpo.

Esso è coinvolto in molteplici processi come la morfogenesi, la cicatrizzazione, l'infiammazione, l'angiogenesi e la crescita tumorale. Esistono diverse isoforme di recettori per FGF (FGFR), derivanti da splicing alternativi di uno stesso gene, con diverse affinità per i diversi membri della famiglia degli FGF.

Inizialmente erano stati descritti due tipi di recettori per FGF-2: uno ad alta capacità e bassa affinità e uno a bassa capacità ed alta affinità, successivamente è stato dimostrato che il recettore ad alta capacità e bassa affinità è costituito dai GAG dell'HS ed è stato dimostrato che sono necessari per il legame dell'FGF-2 ai recettori ad alta affinità che sono poi quelli che mediano il segnale intracellulare.

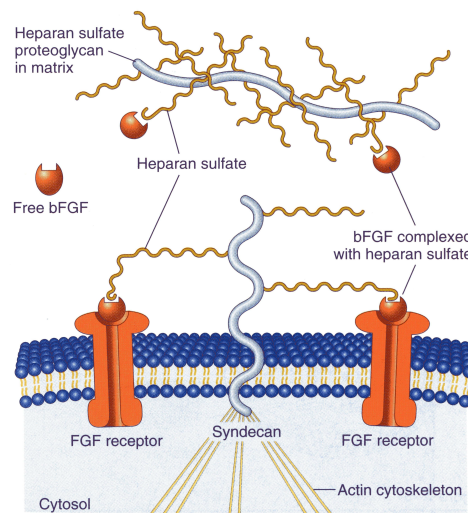


Fig.25: I sindecani rappresentano i co-recettori dell'FGF-2

Gli splicing alternativi dell'FGF determinano la sua localizzazione cellulare citoplasmatica o nucleare. Dati recenti suggeriscono una comune via di traslocazione nucleare fra FGF-2 e sindecano-1 e qui co-localizzano con l'heparanase (Zong et al. 2009).

Dopo il rilascio nello spazio extracellulare l'FGF viene sequestrato dagli HSPG che ne regolano la disponibilità. A riguardo è stato dimostrato che la degradazione da parte dell'heparanase di frammenti solubili di sindecano-1 con annesso FGF-2 legato alle catene di HS li trasforma da inibitori a potenti attivatori del segnale dell'FGF (Kato et al. 1998a).

L'FGF media i suoi effetti biologici mediante il legame, la dimerizzazione e quindi l'attivazione dei recettori tirosin chinatici.

Questo risulta in una serie di eventi molecolari che portano risposte biologiche come la mitogenesi, la differenziazione o la migrazione.

Il legame dell' FGF-2 al recettore attiva una serie di vie di trasduzione del segnale fra cui la via PI3K/AKT, le MAPK (conosciute anche come ERK) , p38 e JUN kinasi.

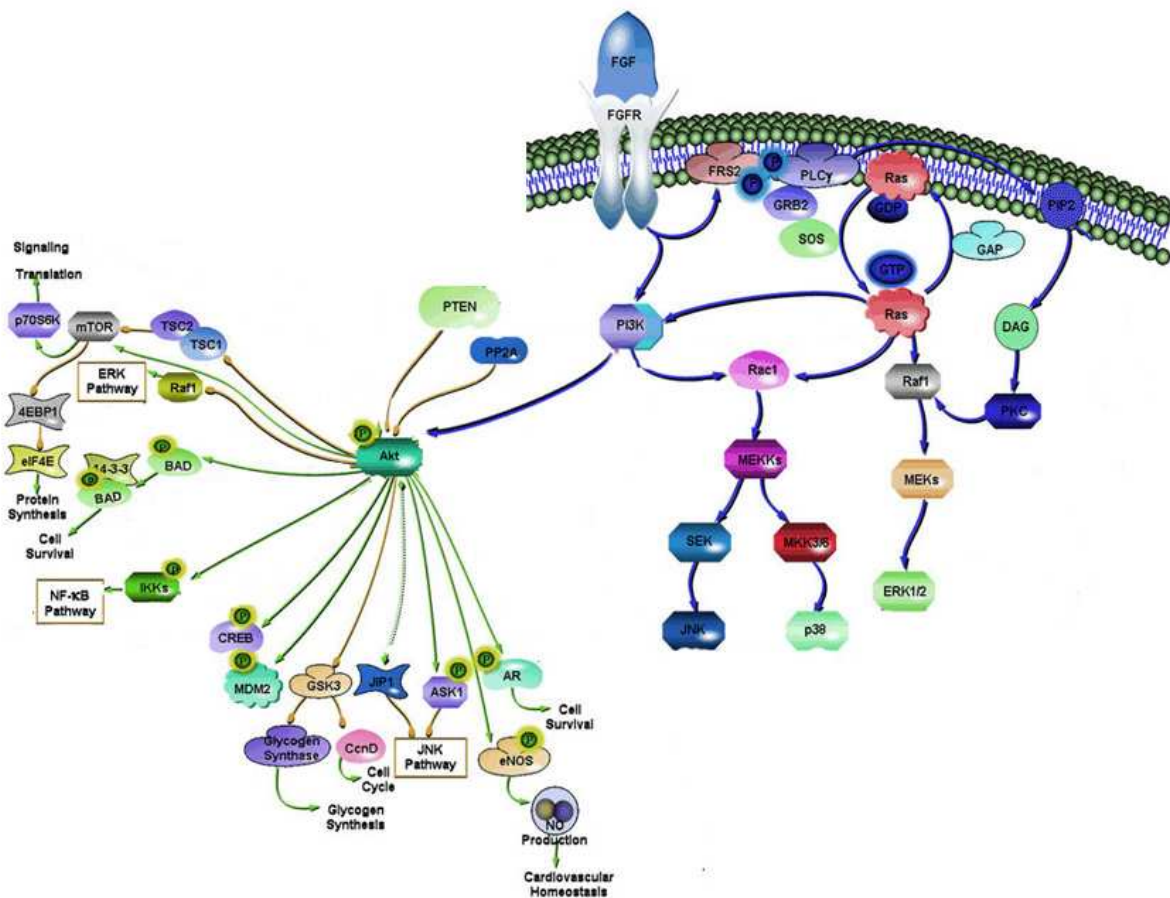


Fig.26: Vie di trasduzione del segnale potenzialmente attivabili dal legame dell'FGF-2 al suo recettore.

Evidenze sperimentali suggeriscono che nel rene l'FGF-2 può servire come un amplificatore endogeno di danni citotossici immuno-mediati nel glomerulo, e può contribuire allo sviluppo di glomerulosclerosi.

L'FGF-2 inoltre mostra un'attività mitogenica su varie cellule renali come le mesangiali, le epiteliali ed endoteliali glomerulari, le epiteliali tubulari e le cellule muscolari lisce. L'FGF- è stato inoltre indicato come un importante attore nel meccanismo di transizione epitelio mesenchimale che termina nella fibrosi tubulare.

In particolare FGF-2 induce motilità cellulare, riduce l'espressione di citocheratina ed E-caderina, induce l'espressione di marcatori mesenchimali e aumenta l'attività di MMP2 e MMP9.

9. Rene, heparanase, MMP e sindecano-1

Diversi studi suggeriscono un coinvolgimento dell'heparanase in diverse patologie proteinuriche a livello dei glomeruli

Disease	Species	HS in GBM	Glomerular heparanase
Streptozotocin-induced DNP	Rat	Reduced (n.s.)	Increased
	Mouse	Reduced (n.s.)	Increased
Adriamycin nephropathy	Rat	Reduced	Increased
PHN	Rat	Reduced	Increased
PAN nephrosis	Rat	n.a.	Increased
Anti-GBM nephritis	Mouse	n.a.	Increased
Lupus	Mouse	Masked	Unaltered
DNP	Human	Reduced	Increased
MCD	Human	Reduced	Increased
MG	Human	Reduced	Increased
IgA nephropathy	Human	Reduced	Increased
SLE	Human	Masked	Unaltered

Tabella 3: coinvolgimento dell'espressione e dell'heparanase e dell'HS in patologie proteinuriche. DNP, nefropatia diabetica; GMB, membrana basale glomerulare; MCD, patologia minimal change; MG, glomerulopatia membranosa; n.a., non analizzato nello studio; n.s., non significativo; PAN nephrosis, nefrosi indotta dall'aminonucleoside puromicina; PHN, nefrite di Heymann; SLE, lupus eritematoso sistemico (van den Hoven et al. 2007).

La membrana glomerulare è un filtro altamente selettivo sulla base della dimensione delle molecole e sulle loro cariche. Per quest'ultima azione sembra avere un ruolo importante l'HS che le conferisce carica negativa. Il fatto che l'heparanase sia in grado di degradare l'HS, suggerisce che essa sia responsabile della sua riduzione nella MBG. L'heparanase è presente nel rene adulto ma nell'insieme i dati riguardanti la sua espressione non sono ancora completi. Gli ultimi dati suggeriscono che l'heparanase sia espressa nei tubuli prossimali e a livelli inferiori nei tubuli distali nei glomeruli. È stato supposto che quantità patologiche dell'enzima nei glomeruli renali possano causare proteinuria mediante la digestione dei componenti della MBG, in particolare gli HSPG. Gli zuccheri di questi proteoglicani, degradati dall'heparanase, sono stati considerati i responsabili dell'alterata permeabilità della MBG. Gli ultimi lavori comunque non supportano questa ipotesi sul ruolo primario degli HSPG, questo perché è stato dimostrato che la riduzione dei siti anionici degli HSPG da parte dell'heparanase non è la causa della proteinuria. La degradazione di una componente di una struttura così delicata come la MBG genera comunque dei cambiamenti che ne influenzano la funzionalità (Szymczak, Kuzniar & Klinger 2010). L'heparanase potrebbe portare a proteinuria in diversi modi: la degradazione dell'HS potrebbe modificare le interazioni delle cellule con la membrana, possono essere rilasciati fattori dall'HS oppure l'heparanase potrebbe anche attivare vie del segnale intracellulari

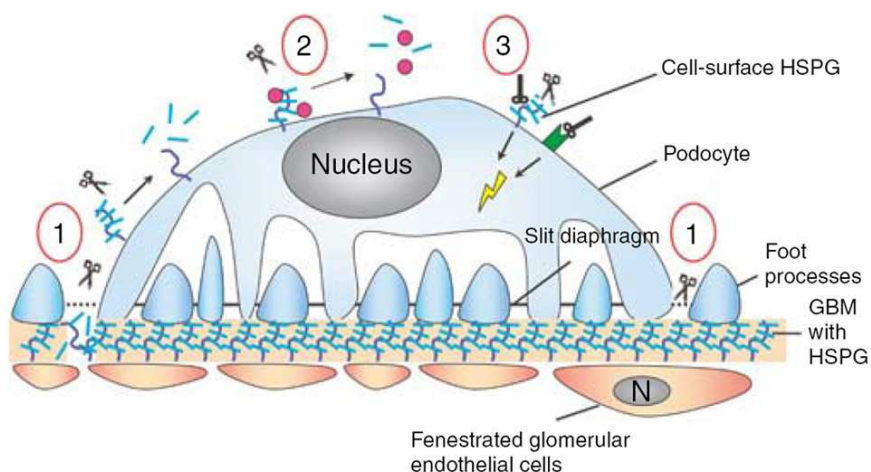


Fig.27: rappresentazione dell'ipotizzato meccanismo di proteinuria dovuto alla degradazione dell'HS da parte dell'heparanase. I meccanismi che possono portare a proteinuria sono i seguenti: (1) l'HS della MBG o sulla superficie dei podociti e delle cellule endoteliali glomerulari può essere tagliato dalla forma attiva dell'heparanase e ciò può disturbare le interazioni cellula-MBG; (2) la degradazione dell'HS comporta il rilascio di diversi fattori, particolarmente FGF-2 , VEGF, HBGF, CTGF e altri ed i frammenti attivi di HS possono sostenere la proteinuria ed inoltre (3) sia la forma attiva che quella inattiva dell'enzima possono legarsi agli HSPG di membrana o altri recettori e indurre delle cascate del segnale con i risultanti cambiamenti nelle proprietà cellulari. Potenzialmente tutti questi meccanismi possono causare nel distacco dei podociti o nell'appiattimento dei loro processi pedicellari ed quindi sostenere la .

L'heparanase può essere presente nelle urine di soggetti sani ma solo in bassissime concentrazioni mentre risulta aumentata nel 16% di pazienti con diabete mellito di tipo I senza proteinuria e nel 25% dei pazienti con diabete di tipo II proteinurici. Altre evidenze suggeriscono la presenza dell'heparanase nel 73% dei pazienti con ND. Si suppone che i podociti siano la fonte primaria di heparanase nelle urine comunque potrebbero essere altrettanto importanti i tubuli visto che l'espressione dell'heparanase vi risulta aumentata nella nefropatia diabetica e questa correla inversamente con la presenza di HS. (van den Hoven et al. 2006). Dato che l'espansione mesangiale dovuta all'accumulo di matrice extracellulare è una delle maggiori caratteristiche della ND e visto che le MMP prodotte dalle cellule mesangiali sono responsabili per circa il 70% della degradazione e del rimaneggiamento dell'ECM è stato suggerito un possibile legame anche fra MMP e ND. Nel rene sono espresse MMP2, 3, 9, 13, 14, 24, 25, 27, 28 e gli inibitori delle metalloproteasi (TIMP) TIMP1, 2, e 3. la MMP2 risulta ridotta prima di cambiamenti strutturali nel modello di diabete indotto da streptozocina (tipo I) mentre nel modello di diabete di tipo II (ratti Goto-Kazaki) è stato osservato l'aumento di MMP2, 9 e 14 prima dello sviluppo di glomerulosclerosi e fibrosi tubulo-interstiziale (Portik-Dobos et al. 2006). La ND è anche associata con la riduzione delle MMP2 e 9 e l'aumento di TIMP2 specialmente nelle cellule mesangiali ed in seguito a stimolo iperglicemico (Mason, Wahab 2003). Un ruolo delle MMP nella ND è stato inoltre dimostrato in alcuni studi clinici (Catania, Chen & Parrish 2007). Anche gli HSPG possono giocare un ruolo fondamentale nell'omeostasi renale infatti la carenza di sindecano-1 comporta un peggioramento della funzione renale in un modello di nefrite anti MBG e in particolare correla con maggiori livelli di proteinuria.

10. Sulodexide

Il Sulodexide è un GAG isolato dalla mucosa intestinale porcina, il nome chimico del Sulodexide è glucuronilglicosaminoglicanosolfato e appartiene alla famiglia dei glicosaminoglicani come le eparine. La composizione chimica del sulodexide è definita come un 80% di eparina “Fast-moving heparin”(FMH) e un 20% di dermatan solfato (DS). La FMH è definita sulla base della mobilità elettroforetica e questa componente è presente nelle formulazioni commerciali assieme ad una frazione a bassa mobilità elettroforetica. La FMH è caratterizzata da un basso peso molecolare (7kDa), un basso grado di solfatazione, un attività anticoagulante inferiore a quella delle frazioni a bassa mobilità elettroforetica e alle eparine non frazionate. La FMH contiene gli stessi disaccaridi delle eparine ma con una minore concentrazione di acido iduronico-2-solfato e una diversa concentrazione del disaccaride N-acetilglucosamina-acido glucuronico. Il DS è un polisaccaride polidisperso con una massa molecolare media di 25kDa. La particolare struttura chimica del DS è responsabile per la sua attività anticoagulante ed antitrombotica. Data la concomitante presenza di FMH con affinità per l’antitrombina III e del DS con affinità per il cofattore eparinico II, il Sulodexide è caratterizzato da varie attività biologiche (Harenberg 1998). Il sulodexide è commercializzato in Italia dal 1982 da Alfa Wasserman S.p.A. Il trattamento della nefropatia diabetica necessita di nuove strategie terapeutiche visto che nei pazienti diabetici un rigoroso controllo glicemico può essere difficile. Inoltre anche se i pazienti rispondono alle tradizionali terapie con gli ACE-inibitori il danno renale progredisce lentamente e alla fine si sviluppa insufficienza renale. I GAG possono risultare particolarmente interessanti perché possono riparare le lesioni endoteliali e i difetti metabolici della sintesi dell’ECM e in particolare della membrana basale che sono responsabili della nefropatia diabetica (Ceol et al. 1996) (Gambaro et al. 1994). Una perdita di GAG è stata dimostrata in questa condizione ed è stato riportato che il Sulodexide è efficace nel prevenire le alterazioni morfologiche e nel ridurre la proteinuria in modelli animali di diabete. (Gambaro et al. 2002). Questo effetto è stato confermato anche nell’uomo in pazienti sia con diabete di tipo I che tipo II che sono stati inseriti in un trial clinico con Sulodexide (n=223 soggetti) hanno mostrato una riduzione dell’albuminuria rispetto ai controlli (Lauver, Lucchesi 2006). Il possibile meccanismo d’azione dei GAG nella nefropatia diabetica non è ancora stato chiarito esattamente anche se sono state fatte alcune osservazioni in studi preclinici. Il Sulodexide sembra prevenire l’assottigliamento della membrana basale glomerulare (MBG), previene e corregge la perdita di cariche anioniche della MBG mediante diretta deposizione nella MBG o mediante induzione della sintesi di HSPG. Il Sulodexide potrebbe ridurre l’espansione e la proliferazione mesangiale potrebbe ridurre albuminuria, infiammazione e fibrosi tubulo interstiziale inibendo la produzione di endotelina. Studi preclinici hanno dimostrato che l’utilizzo di Sulodexide inibisce la proliferazione delle cellule muscolari lisce delle arterie, rallenta la formazione e la progressione di trombi indicando la sua interferenza nella patogenesi della nefropatia diabetica. È stato inoltre ipotizzato che il Sulodexide possa esercitare il suo effetto anti-proteinurico bloccando l’attività dell’heparanase che è sovra-espressa nei reni dei pazienti proteinurici. (Weiss, Niecestro & Raz 2007).

RAZIONALE DELLO STUDIO

Dato il coinvolgimento dell'heparanase in diverse patologie proteinuriche specialmente nella ND ed essendo i dati finora disponibili parziali, abbiamo deciso di studiare il suo ruolo a livello del tubulo prossimale renale.

Sono stati valutati quali fattori, tipici del diabete, possano regolare l'heparanase.

Nel corso della malattia diabetica le cellule del tubulo prossimale sono soggette a diversi fattori di stress, quindi sono stati presi in considerazione l'alto glucosio, l'albuminuria e i prodotti di avanzata glicazione. È stata valutata la capacità di questi stimoli di regolare l'espressione dell'heparanase ed è stato indagato attraverso quali vie di trasduzione del segnale ciò possa avvenire.

Al fine di discriminare i diretti effetti degli stimoli diabetici da quelli dovuti alla sovraespressione dell'heparanase abbiamo ottenuto una linea di cellule epiteliali del tubulo prossimale stabilmente silenziata per l'heparanase.

Data l'attività endoglicosidica dell'heparanase è stato valutato il suo ruolo, anche in relazione agli stimoli diabetici, sulla regolazione dell'HS, il suo substrato naturale, e degli HSPG fra cui il più rappresentativo nelle PTEC è il sindecano-1.

Dato che la progressione della ND è sostenuta da fattori di crescita e citochine pro-fibrotiche come FGF-2, e visto che l'attivazione delle sue vie del segnale sono influenzate dagli HSPG si è valutato come la regolazione dell'heparanase possa influenzare le vie del segnale intracellulari di questo fattore.

Dato che l'heparanase interviene nel rimodellamento dell'ECM assieme ad altre proteasi è stata valutata la regolazione di alcune MMP da parte degli stessi stimoli diabetici e si è indagato se esista una relazione fra heparanase ed MMP in questo modello cellulare.

Si è inoltre testato l'efficacia del farmaco Sulodexide, che viene utilizzato per controllare la proteinuria nel corso della ND, come inibitore dell'heparanase. Per valutare infine se l'attività plasmatica dell'heparanase possa essere un marcatore di qualche particolare nefropatia o correli con la progressione delle stesse ne è stata quantificata l'attività enzimatica presente nel plasma di pazienti con ND.

MATERIALI E METODI

1. Colture cellulari

La linea cellulare HK2 (Human-Kidney 2) è una linea immortalizzata di cellule epiteliali del tubulo prossimale ottenuta dalla trasfezione dei geni E6/E7 di HPV16. Le cellule HK2 mostrano il fenotipo di cellule epiteliali del tubulo prossimale differenziate in quanto sono positive per l'espressione di fosfatasi alcalina, gamma glutamiltranspeptidasi, leucina-aminopeptidasi, fosfatasi acida, citocheratina, alfa 3 beta 1 integrina, fibronectina (Ryan et al. 1994). Le cellule sono coltivate in DMEM-F15 (EuroClone, Pavia, Italy) (17.5mM glucosio) con 10% di siero fetale bovino (Biocrom AG, Berlin, Germany), 2 mM L-glutamina, penicillina (100 U/ml) and streptomicina (100 µg/ml). Le cellule sono mantenute in incubatore a 37°C al 5% di CO₂ e 95% di umidità.

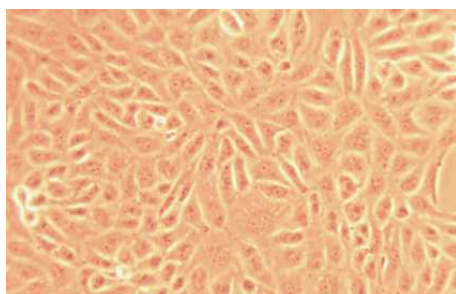


Fig.28: Immagine al microscopio ottico delle cellule HK2

2. Reagenti

Albumina sierica bovina (BSA, Sigma), FGF-2 ricombinante umano (BD Biosciences), D(+)glucosio e D(+)mannitolo (Sigma), PDTC (ammonium pyrrolidine dithiocarbamate Sigma P8765) inibitore di NF-κB, LY294002 inibitore di PI3K, SB203580 inibitore di p38 Kinase, AG490 inibitore di Jak2, PD98059 e U0126 inibitori di MEK1 e MEK2 (Calbiochem).

3. Preparazione dell'albumina glicata: advanced glycosilation end product (AGE)

L'albumina glicata è stata preparata incubando 20mg/ml BSA in tampone fosfato 0.4M (pH 7.5) con D(+)glucosio 0.5M e 0.05 mg/ml di NaN₃) per 15 giorni a 56°C in condizioni sterili. Al termine dell'incubazione il glucosio che non si è legato alla BSA è stato rimosso mediante dialisi verso il tampone fosfato. La concentrazione proteica è stata determinata misurandone l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm. Per l'analisi, il campione è costituito da 20 µl di estratto proteico a cui si aggiungono 980 µl del reagente "BioRad Protein Assay" (BioRad) diluito 1:5 in acqua milliQ. La concentrazione proteica si ricava per confronto con una retta di taratura ottenuta tramite diluizioni seriali di BSA a concentrazione nota. La BSA di controllo (BSA non glicata) è stata incubata nelle stesse condizioni sperimentali ma in assenza di glucosio. La preparazione di AGE e



gli RNA bersaglio a livello del citosol. Se l'appaiamento è corretto il RISC è in grado di determinarne la degradazione e indurre così il silenziamento (Hannon 2002).

Sono stati utilizzati quattro plasmidi codificanti quattro shRNA antisenso al gene umano dell'heparanase(NM_006665) (OriGene Rockville, MD, USA) le cui sequenze sono riportate in Tabella 1.

shRNA	Sequenza
pHPSE-1	TTATGTGGCTGGATAAATTGGGCCTGTCA
pHPSE-2	GTTCAAGAACAGCACCTACTCAAGAAGCT
pHPSE-3	GTGGTGATGAGGCAAGTATTCTTTGGAGC
pHPSE-4	TCGTTCCCTGTCCGTCACCATTGACGCCAA

Tabella 4: Sequenze degli shRNA

Oltre a questi plasmidi codificanti gli shRNA sono stati utilizzati come controlli negativi un plasmide vuoto, pRS plasmid (TR20003), e un plasmide che codifica un shRNA senza bersaglio in queste cellule, shRNA pRS non-effective GFP plasmid (TR30003). I plasmidi liofilizzati sono stati ricostituiti con 50 µl di acqua RNase-Free (Gibco, Invitrogen) ottenendo una soluzione a 100 ng/µl. È stata effettuata una reazione di trasfezione per ciascuno dei plasmidi e una in cui tutti e quattro i plasmidi codificanti gli shRNA effettivi sono stati trasfettati contemporaneamente, come da schema sottostante.

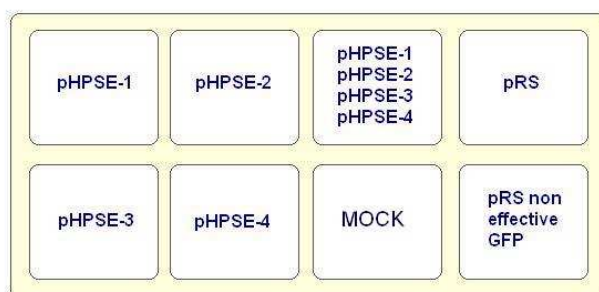


Fig.30: Schematizzazione delle trasfezioni effettuate sulle cellule HK2

Sono state seminate 1.5×10^5 cellule HK2 in ogni pozzetto di piastre da 6 pozzetti (come da schema) e dopo 24 ore erano al 70 - 80% di confluenza. Il terreno di coltura è stato rimosso e sostituito con 2 ml/pozzetto di terreno completo. Per ogni trasfezione è stata preparata una soluzione con 188 µl di terreno senza siero e 12 µl di reagente di trasfezione TransIT-LT1(Mirus, Madison, WI) che è stata vortexata ed incubata a temperatura ambiente per 20 minuti. Il reagente di trasfezione è una miscela di istoni e lipidi cationici che assicurano un'alta efficienza di trasfezione su cellule che crescono in adesione e in terreno con siero. Questo reagente inoltre mostra una minima tossicità cellulare. Alla soluzione sono stati aggiunti 3 µg di DNA plasmidico, il tutto è stato mantenuto a temperatura ambiente per altri 20 minuti quindi la soluzione è stata aggiunta

goccia a goccia sulle cellule. Le cellule di controllo (Mock) sono state trattate con la stessa quantità di reagente di trasfezione TransIT-LT1.

Le cellule vengono lasciate in coltura per 48 ore in modo che possano esprimere le proteine codificate dal DNA plasmidico inserito. Fra queste c'è anche una proteina che conferisce la resistenza alla puomicina. In alcune cellule il DNA plasmidico viene integrato nel DNA cromosomale e viene replicato insieme ad esso e questo permette il mantenimento della resistenza all'antibiotico. Dopo 48 ore le cellule sono quindi state poste in selezione con 0.75 µg/ml di puomicina (Sigma). Il processo di selezione dura qualche settimana e il terreno deve essere cambiato a giorni alterni per rimuovere le cellule morte.

Esperimenti preliminari hanno dimostrato che 0.75 µg/ml è la minima concentrazione efficace per selezionare le cellule che sono state efficacemente trasfettate e quindi ne esprimono la resistenza. Con questo procedimento abbiamo ottenuto i cloni resistenti all'antibiotico che sono stati usati per i successivi esperimenti.

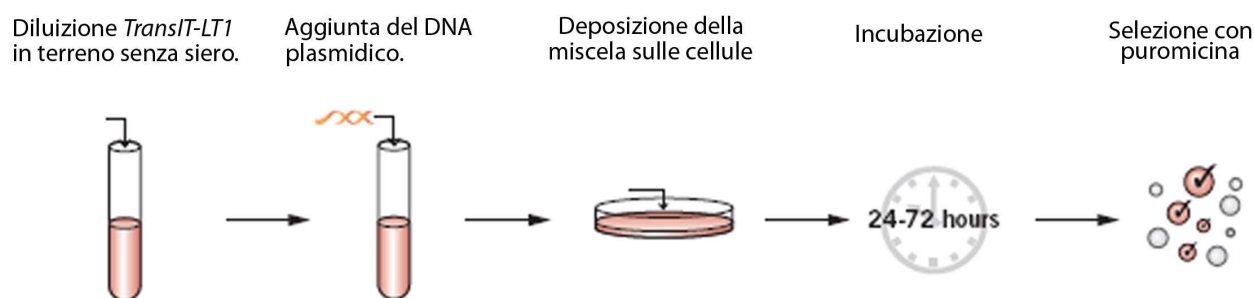


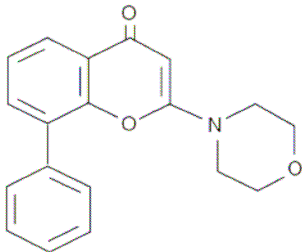
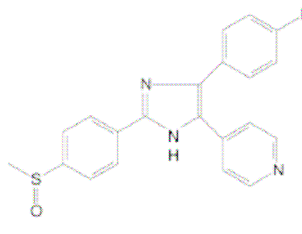
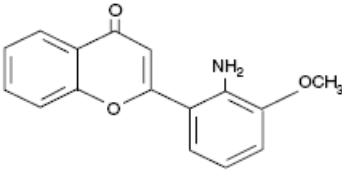
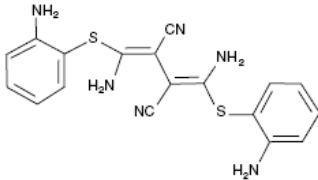
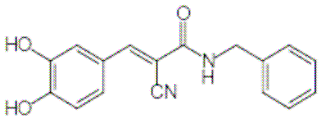
Fig.31: Schematizzazione del processo di trasfezione e selezione.

5. Preparazione delle cellule per l'estrazione dell'RNA .

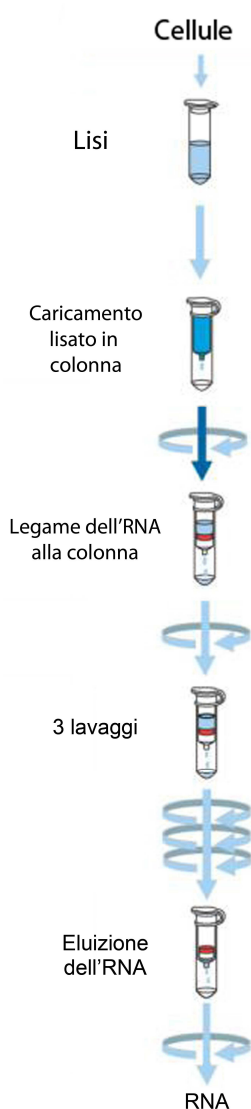
Per l'analisi di espressione genica le cellule sono state coltivate a sub-confluenza, starvate in terreno senza siero per 24 ore e quindi coltivate in per altre 6 ore in terreno senza siero con i diversi trattamenti.

Le cellule HK2 crescono alla concentrazione fisiologica di glucosio di 17.5mM quindi per indurre una situazione di iperglicemia sono state coltivate in terreno in cui la concentrazione di glucosio era incrementata ; ovvero 21 e 25mM. Per definire se eventuali effetti fossero specifici del trattamento con glucosio è stato introdotto un controllo di osmolarità in cui le cellule sono state coltivate in terreno con mannitolo alle concentrazioni di 21 e 25mM. Gli altri trattamenti che sono stati effettuati sono con BSA e AGE alle concentrazioni di 30 o 60 µg/ml in presenza o assenza di diversi inibitori di kinasi. Tutti gli inibitori sono stati addizionati alle cellule 30 minuti prima dell'inizio delle incubazioni con BSA o AGE tranne LY294002 che è stato addizionato 2 ore prima.

Tabella 5: Lista degli inibitori testati.

Kinasi bersaglio	Nome inibitore	Struttura chimica	IC ₅₀	Conc. usata
PI3K	LY294002 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one. Blocca la fosforilazione di AKT dipendente da PI3K e non fosforila altre kinasi come PI4 kinase, PKC, MAP kinase o c-Src		1.4 μM	25 μM
p38 Kinase	SB203580 4-(4'-fluorophenyl)-2-(4'-methylsulfinylphenyl)-5-(4'-pyridyl)imidazole E' un inibitore specifico di p38 attraverso un meccanismo competitivo con ATP per lo stesso sito di legame		2 μM	20 μM
MEK1	PD98059 2'-amino-3'metthoxyflavone Inibisce MEK1 lagando la forma inattiva e presevandola dall'attivazione da parte di fattori come c-Raf.		4μM	25 μM
MEK1 e MEK2	U0126 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene Inibisce MEK1/2 ma non altre kinasi come c-Abl, Raf, MEKK, Erk, JNK, MKK3, MKK4/SEK1, MKK6, CDK2 or CDK4.			10 μM
Jak2	AG490 NBenzyl-3,4-dihydroxy-a-cyanocinnamide 		100 nM	25 μM
NF-kB	PDTC Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate 			10μM

6. Estrazione dell'RNA.



Per l'estrazione dell'RNA dalle cellule è stato usato il Kit commerciale GenElute Mammalian Total RNA (Sigma). Con questo metodo le cellule possono essere lisate direttamente sulle fiasche aggiungendo 250 μ l di soluzione di lisi contenente β -mercaptoetanololo, un agente riducente, e guanidinioisotiocianato un agente che denatura le proteine comprese le RNasi presenti nel campione. Dopo un'incubazione di un paio di minuti, si trasferisce il lisato in una colonna con filtro e si centrifuga il campione per due minuti alla massima velocità (15000 x g). Questo passaggio serve per rompere il DNA cromosomale che altrimenti sarebbe co-purificato con l'RNA. Si getta la colonna di filtrazione. Al lisato filtrato si aggiunge un eguale volume di etanolo al 70% e si mescola brevemente sul vortex. A questo punto 700 μ l di ciascun campione vengono trasferiti su una colonna posta in una provetta e contenente la resina che lega l'RNA. Si centrifuga alla massima velocità per 15 secondi, ciò fa sì che il liquido fuoriesca dalla colonna e passi nella provetta sottostante, mentre l'RNA si lega alla resina. Si getta il filtrato, quindi si aggiungono 500 μ l della prima soluzione di lavaggio sulla colonna. Si centrifuga alla massima velocità per 15 secondi, quindi si trasferisce la colonna in una provetta pulita. Si aggiungono 500 μ l della seconda soluzione di lavaggio che contiene etanolo, poi si centrifuga alla massima velocità, quindi si getta il filtrato. Questo lavaggio viene ripetuto quindi si centrifuga per 2 minuti alla massima velocità per portare a secco la colonna; questa viene poi trasferita in un nuovo tubo, si aggiungono 30 μ l di soluzione di eluizione al centro della colonna e si centrifuga per 1 minuto alla massima velocità.

A questo punto l'RNA purificato si stacca dalla resina e passa nella provetta sottostante. L'RNA purificato è stato conservato a -80°C.

7. Purificazione RNA da contaminazioni di DNA

Al fine di escludere tracce di DNA che potrebbero contaminare il campione l'RNA è stato trattato con DNase I recombinant (1U/ μ l, Roche). In accordo con quanto descritto dal produttore, si aggiungono 5 μ l di tampone di incubazione 10X, 1 μ l di enzima e acqua fino al volume totale di 50 μ l. Si effettua un'incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente ed infine si inattiva la DNasi con 2 μ l di soluzione di 2 mM EDTA e poi si scalda a 70° C per 10 minuti.

Per completare la procedura di purificazione dell'RNA da DNasi, si porta il volume dell'RNA a 100 μ l finali con la soluzione di eluizione. Si aggiungono 350 μ l della soluzione di lisi (con l'1% di β -mercaptoetanololo) poi si aggiungono 250 μ l di etanolo assoluto e quindi si trasferisce il tutto in una colonna. Si centrifuga a 16000g per 15 secondi ed infine si ripetono i passaggi sopra descritti dai lavaggi fino all'eluizione, ottenendo in questo modo 30 μ l di RNA totale, privo di DNA genomico.

8. Quantificazione dell'RNA.

La quantità e la purezza sono state determinate mediante lettura di assorbenza al Nanodrop (EuroClone) alla lunghezza d'onda di 26nm. Sono stati considerati idonei i campioni con rapporto A_{260}/A_{280} maggiore a 1.9 e quindi senza contaminazioni da parte di proteine e con rapporto A_{260}/A_{230} maggiore a 1.9 e quindi senza contaminazioni da parte di glucidi o fenolo che potrebbero inficiare l'efficienza di retrotrascrizione.

9. Retrotrascrizione.

Di ogni campione è stato retrotrascritto 1 µg di RNA totale a cDNA usando utilizzando il kit "SuperScript™ II Reverse Transcriptase" (Invitrogen). Per ogni campione si prepara una reazione con 1 µl di random primers (500 ng/µl), 1 µg di RNA, 1 µl di una miscela di dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 mM ciascuno) e acqua fino ad un volume di 12 µl. La reazione viene posta a 65°C per 5 minuti per denaturare l'RNA quindi la si pone rapidamente in ghiaccio. Dopo una breve centrifugazione, si aggiungono: 4 µl di tampone di reazione 5X (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µl di DTT (0,1 M), 1 µl di RNaseOUT™ (40 U/l) per inibire le RNasi.

Seguono una fase di appaiamento dei random primers all'RNA a singolo filamento a 25°C per 2 minuti, si aggiunge poi 1 µl di enzima Trascrittasi Inversa e si effettua un'ulteriore incubazione della reazione a 25°C per 10 minuti. La reazione di retrotrascrizione avviene mediante un'incubazione di 50 minuti a 42°C. Infine si inattiva l'enzima scaldando la reazione a 70°C per 15 minuti.

10. Real-time PCR

L'espressione quantitativa dei geni heparanase, sindecin-1, MMP2, MMP9, MMP14 e gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH) è stata valutata mediante Real-time PCR. La valutazione dell'espressione del GAPDH è stata effettuata con lo scopo di normalizzare i dati presupponendo che l'espressione di questo gene sia invariata nei diversi campioni.

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica che prevede l'amplificazione di una sequenza di DNA di cui si conoscono gli estremi. Per realizzarla si ha bisogno di: una sequenza da amplificare, dei nucleotidi per costruire i nuovi filamenti sotto forma di desossiribonucleosidi trifosfati (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), degli inneschi detti primers, costituiti da brevi sequenze di DNA complementari agli estremi 5' e 3' del segmento da riprodurre, una DNA-polimerasi e i tamponi necessari per la reazione di elongazione.

La PCR avviene in una serie di cicli composti da tre fasi: nella prima avviene la separazione dei frammenti ad alte temperature, nella seconda fase di annealing (appaiamento) i primers si appaiono ai filamenti di cDNA stampo e nella terza fase la DNA-polimerasi polimerizza il nuovo filamento usando come stampo la sequenza. La Real-time PCR è una tecnica di PCR quantitativa che permette di monitorare in tempo reale la reazione di amplificazione del DNA ed è basata sulla diretta proporzionalità tra l'emissione di fluorescenza e la quantità di DNA amplificato. Questo è possibile

grazie all'introduzione all'interno della reazione di una molecola fluorescente, che dà la possibilità di seguire la reazione in tutte le sue fasi. Durante la fase esponenziale della reazione la relazione tra la quantità di DNA ed il numero di cicli è:

$$\text{quantità di DNA al ciclo } n = \text{quantità iniziale di DNA} \times 2^n$$

La Real-time PCR permette di visualizzare su di un grafico i numeri di cicli rispetto all'aumento di fluorescenza, il tutto normalizzato su Rox (Rn) ovvero una referenza passiva che permette di compensare variazioni nella fluorescenza tra pozzetti diversi contenenti lo stesso campione. Il punto in cui la fluorescenza emessa da ciascun campione incontra la linea che separa la fluorescenza effettiva dal rumore di fondo è detto ciclo soglia (Ct) e questo è proporzionale al numero di copie iniziali di DNA.

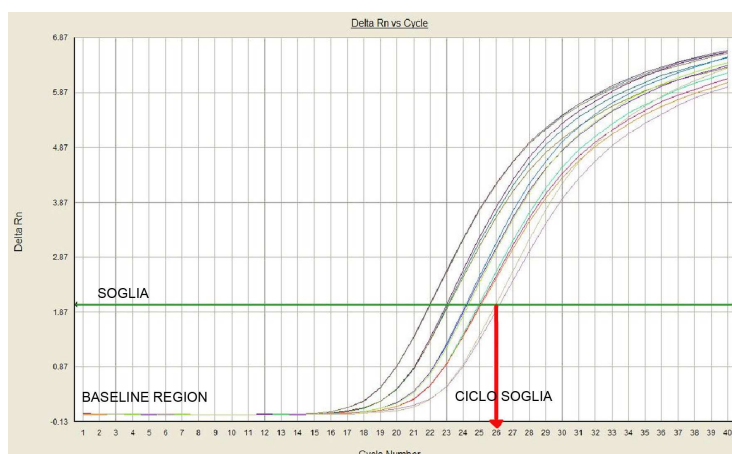


Fig.32: Tipiche curve di amplificazione di campioni a diverse concentrazioni. Sono riportati i più comuni termini usati nell'analisi quantitativa. In ascissa è riportato il numero del ciclo di amplificazione, in ordinata il ΔRn , ovvero la variazione dell'intensità di emissione della fluorescenza normalizzata al ROX. La linea verde orizzontale è la soglia ed i punti di intersezione delle curve con la soglia definiscono i cicli soglia (Ct).

La metodica scelta per effettuare la Real-Time PCR prevede l'utilizzo del SYBR Green come marcatore di amplificazione. Il SYBR Green è un intercalante del DNA che si lega alle molecole di DNA prodotte durante le reazioni di amplificazione. Si lega ogni 12 paia di basi nel solco minore del doppio filamento (dsDNA). Il complesso DNA-colorante assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda di 488 nm ed emette luce verde a 522 nm di lunghezza d'onda. Il risultato è un aumento dell'intensità di fluorescenza proporzionale alla quantità dell'amplificato di PCR ad ogni fase di appaiamento-estensione. Per questo motivo, tramite Real-Time PCR, è possibile monitorare la progressione delle reazioni di amplificazione, ovvero l'aumento di fluorescenza ad ogni ciclo piuttosto che misurare la quantità del prodotto che si accumula al termine dei cicli.

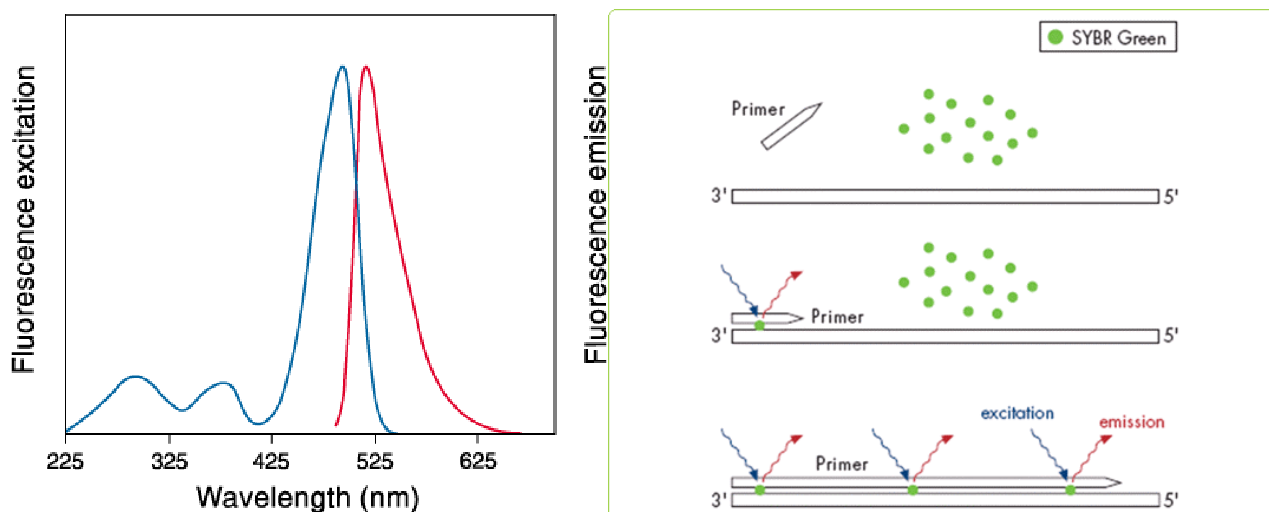


Fig.33: A sinistra curve di assorbimento ed emissione del fluoroforo SYBR Green e a destra la sua cinetica di incorporazione in una doppia elica di DNA.

Innanzitutto sono stati disegnati i primer per i diversi geni e con l’ausilio del programma bioinformatico “Operon-Oligo Toolkit” (Operon Biotechnologies © 2004), è stato controllato che non formassero dimeri o forcine , che la loro temperatura di melting fosse di circa 60°C e avessero una percentuale di GC compresa fra il 45 ed il 55%.

Tabella 6: Sequenze dei primers utilizzati nello studio.

Gene		Sequenze
HPSE	senso	5’ – ATTTGAATGGACGGACTGC – 3’
	antisenso	5’ – GTTCTCCTAACCAGACCTTC – 3’
MMP2	senso	5’ – GCGGCGGTCACAGCTACTT – 3’
	antisenso	5’ – CACGCTCTTCAGACTTTGGTTCT – 3’
MMP9	senso	5’ – CCTGGAGACCTGAGAACCAATC – 3’
	antisenso	5’ – CCACCCGAGTGTAACCATAGC – 3’
MMP14	senso	5’ – TGCCATGCAGAAGTTTTACGG – 3’
	antisenso	5’ – TCCTTCGAACATTGGCCTTG – 3’
SDC1	senso	5’ – GAAGATCAAGATGGCTCTGGG – 3’
	antisenso	5’ – GTTCTGGAGACGTGGGAATAG – 3’
GAPDH	senso	5’ – ACACCCACTCCTCCACCTTT – 3’
	antisenso	5’ – TCCACCACCCTGTTGCTGTA – 3’

Le razioni di amplificazione sono state eseguite su piastre da 96 pozzetti con lo strumento Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System. Il volume finale di reazione è stato di 12.5 µl, contenente 10 ng di cDNA, 6.25 µl di Power SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), 5 µmoli di ciascun primer senso e antisenso ed acqua. Per ogni campione la reazione è stata effettuata in

triplicato. L'amplificazione inizia con 1 ciclo a 95°C per 10 minuti: questa fase è necessaria per l'attivazione della "AmpliTaq Gold® DNA Polymerase" cosicché l'enzima attivo viene reso disponibile solo quando il DNA è completamente denaturato. Poi sono stati eseguiti 40 cicli, ciascuno costituito da 30 secondi a 95°C per la denaturazione ed 1 minuto a 60°C per l'appaiamento dei primers al cDNA e l'estensione dei nuovi filamenti. Infine si è eseguito un ultimo ciclo costituito da 15 secondi a 95°C, 1 minuto a 60°C e altri 15 secondi a 95°C per delineare la curva di dissociazione. Oltre ai vari campioni in ogni piastra è stata inserita anche una retta di taratura per definire l'efficienza di reazione. La retta di taratura è costituita da tre punti, ciascuno in triplicato con concentrazioni crescenti di DNA: 5, 10 e 20 ng. Il DNA della retta di taratura è un pool, ovvero una miscela dei cDNA di tutti i campioni analizzati. Si considera che un'amplificazione abbia una buona efficienza quando la pendenza della retta standard è compresa fra i valori "-3" e "-3.5" e quando il suo coefficiente di correlazione (R^2) risulta maggiore a 0,98. I livelli di espressione sono stati determinati con una quantificazione relativa mediante il metodo di comparazione dei cicli soglia ($\Delta\Delta C_t$) e sono stati normalizzati al gene housekeeping GAPDH. La quantificazione relativa di ogni campione rispetto al controllo è stata calcolata con la seguente formula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Per il calcolo delle deviazioni standard e per l'analisi statistica dei risultati è stato utilizzato il programma Rest2009. E' stata inoltre analizzata la presenza di eventuali amplificati aspecifici effettuando l'analisi delle curve di dissociazione.

11.Preparazione delle cellule per l'estrazione delle proteine.

Per valutare l'espressione proteica dell'heparanase e del gene housekeeping GAPDH le cellule HK2 wt e silenziate sono state coltivate a sub-confluenza e quindi incubate in terreno senza siero per 24 ore. Per analizzare ERK, pERK, AKT, pAKT le cellule sono state coltivate a sub-confluenza, incubate prima 24 ore in terreno senza siero e poi alter 24 ore in terreno senza siero con 0 o 60 µg/ml di BSA o AGE. Le cellule infine sono state stimulate per 0, 1, 2, 5, 10 and 20 minuti con 10ng/ml di bFGF.

12. Estrazione delle proteine

Le cellule sono state lavate due volte con tampone fosfato (PBS) e quindi incubate alcuni minuti in ghiaccio in buffer di lisi (50 mM Tris-HCl (pH 5.0), 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) con Protease Inhibitor Cocktail "Complete" (Roche, Milan, Italy) e Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 and 2 (Sigma), due miscele di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi. Le cellule sono state staccate dal fondo delle plastiche di coltura con l'ausilio di "cell scrapers" ed il tutto è stato trasferito in provetta. Le cellule sono state sottoposte a sonicazione al fine di garantire una completa disaggregazione. Per separare le proteine dalle membrane le provette sono state centrifugate a 16000g per 30 minuti a 4°C. Infine, il supernatante contenente le proteine totali, è stato raccolto, posto in una nuova provetta e conservato a -80°C.

13. Quantificazione proteica

Gli estratti proteici sono stati quantificati tramite analisi spettrofotometrica. Ogni campione è stato preparato diluendo 10 µl di estratto proteico totale in 990 µl di reagente “BioRad Protein Assay” (BioRad) diluito 1:5 in acqua milliQ. In base alla concentrazione proteica il reagente fa virare il colore della soluzione in diverse tonalità di blu. Ogni campione, così preparato, è stato trasferito in una cuvetta di plastica per lettura allo spettrofotometro e ne è stata misurata l’assorbanza alla lunghezza d’onda di 595nm. La concentrazione proteica si ricava per confronto con una retta di taratura ottenuta tramite diluizioni seriali di BSA a concentrazione nota.

14. Western blot: preparazione dei gel di poliacrilamide.

Le proteine possono essere separate in base al loro peso molecolare mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide in presenza di Sodio Dodecil Solfato ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_3^-\text{Na}^+$, SDS). Questo è un detergente ionico usato come agente solubilizzante e denaturante delle proteine, perciò questa tecnica è denominata SDS-PolyAcrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Nell’SDS-PAGE le proteine vengono esposte al detergente prima e durante l’elettroforesi; 1.4g di SDS si legano a ciascun grammo di proteina. Le cariche negative dell’SDS si respingono, e le proteine multimeriche si dissociano nelle loro subunità. Tutte le catene polipeptidiche sono forzate in conformazioni estese con carica simile. Il trattamento con SDS elimina le strutture secondarie e terziarie, quindi la lunghezza della catena polipeptidica, che riflette la massa, è l’unico determinante della velocità di migrazione. La concentrazione dell’acrilamide può essere variata in rapporto alla grandezza delle proteine che si vogliono separare, più piccole sono le proteine, più elevata dovrà essere la concentrazione dell’acrilamide. In presenza di SDS e a pH basico le proteine assumono una carica prevalentemente negativa e migrano verso il polo positivo che viene applicato alla base del gel. Il gel di poliacrilamide-SDS è composto da due distinte fasi, che differiscono per forza ionica, pH e concentrazione di acrilamide. La parte superiore è costituita dallo “Stacking gel”, un gel di acrilamide al 5% (1,14 ml di 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 2,7 ml di acqua milliQ; 5% acrilamide 29:1; 45 µl di SDS 10%; 45 µl di Ammonio persolfato (APS) 10%; 1 µl/ml Tetraetilen-dietil-amina (TEMED)), attraverso il quale le proteine migrano e si compattano. Nella parte inferiore, invece, è presente il “Separating gel”, un gel di acrilamide al 10% (3 ml di 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 6 ml di acqua milliQ; 9% acrilamide 29:1; 120 µl di SDS 10%; 120 µl di APS 10%; 1 µl/ml TEMED), nel quale si realizza la vera corsa elettroforetica e le proteine caricate si separano in funzione del loro peso molecolare.

15. Western blot: solubilizzazione delle proteine e SDS-PAGE

I campioni sono stati preparati con 50 µg di proteine, 10 µl di tampone di caricamento (1,54% DTT, ditiotreitolo; 2% SDS; 10% glicerolo, 80 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,005% blu di bromofenolo), 5 µl di β-mercaptoetanolo e tampone di corsa (25 mM Tris; 192 mM glicina; 0,1% SDS) fino al raggiungimento di un volume finale pari a 50 µl. Il β-mercapto-etanolo è un agente riducente che

rompe i ponti disolfuro fra le catene polipeptidiche e il colorante Blu di bromofenolo permette di visualizzare l'avanzamento della corsa. I campioni sono stati scaldati a 100°C per 10 minuti, allo scopo di denaturare le proteine, quindi sono stati mantenuti in ghiaccio per 2 minuti ed infine caricati nei gel di poliacrilamide-SDS con accanto un marker di peso molecolare. Una volta caricati con i campioni i gel sono stati inseriti nell'apparecchio per la corsa elettroforetica (Mini Protean Tetra Cell, BIO-RAD), che è stata effettuata nel tampone di corsa ad amperaggio costante (120V-25 mA), per circa 1 ora e mezza.

16. Western blot: trasferimento su nitrocellulosa

Terminata la corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa sottoponendole ad un campo elettrico in un apparato apposito (elettro-blotting). Ogni gel è stato posto direttamente a contatto con una membrana ed entrambi sono stati inseriti in una struttura a "sandwich" costituita, dall'interno all'esterno, da due strati di carta assorbente Whatman e due di spugna. Il tutto è stato inserito in un apposito supporto di plastica ed immerso nel tampone di trasferimento (25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20% metanolo). Le cariche elettriche attraversano perpendicolarmente i "sandwich". La membrana di nitrocellulosa è stata posta in prossimità dell'elettrodo positivo, mentre il gel dell'elettrodo negativo: poiché le proteine sono cariche negativamente, possono migrare unicamente dal gel verso il filtro. Il trasferimento è stato effettuato ad amperaggio costante (350 mA), per 2 ore e mezza a 4°C. Terminato il trasferimento i gel sono stati colorati con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka), mantenendoli in agitazione per tutta la notte, e poi decolorati con acqua milliQ. Questo passaggio consente di verificare il corretto trasferimento delle proteine alla membrana. Nei filtri di nitrocellulosa, invece, i siti di legame aspecifico degli anticorpi sono stati saturati mediante un'incubazione per 2 ore a temperatura ambiente con "blocking solution" (5% latte in polvere in TBS con 1 µl/ml di Tween 20 e lo 0,2% di Na-azide)

17. Western blot: incubazione con anticorpi e sviluppo.

Le membrane di nitrocellulosa sono state incubate per tutta la notte a 4°C con gli anticorpi primari anti-HPSE, anti-AKT e anti-ERK in "antibody solution" (2,5% latte in polvere in TBS e 0,5 µl/ml Tween 20). Il giorno successivo sono stati effettuati tre lavaggi da 10 minuti ciascuno con il tampone TBST (TBS; 0,5 µl/ml Tween 20), quindi le membrane sono state incubate per 1 ora e mezza a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari coniugati con perossidasi alcalina disciolti in "antibody solution". I filtri sono stati lavati altre 3 volte con TBST e quindi immersi per 3 minuti nella soluzione chemiluminescente (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce), che contiene il substrato della perossidasi. In questo modo, in corrispondenza delle bande della proteina di interesse, si sviluppa la reazione di chemiluminescenza, che può essere rivelata ponendo la membrana a contatto con una lastra autoradiografica in una cassetta per autoradiografie. Successivamente alle stesse membrane è stata applicata una procedura di "stripping", allo scopo di eliminare gli anticorpi ad esser rimasti legati. Lo stripping è stato effettuato incubando 30 minuti per due volte consecutive le membrane in un apposito tampone (0,2 M Glicina; 0,1% SDS; 10 µl/ml

Tween 20), a temperatura ambiente ed in agitazione. Le membrane sono state poi lavate altre 3 volte con TBST e sottoposte a nuova procedura di saturazione. Le membrane sono state quindi incubate con degli altri anticorpi primari e secondari e sottoposte a rilevazione con lo stesso metodo descritto sopra. In particolare il filtro precedentemente esposto all'anticorpo primario anti-HPSE è stato incubato con un anticorpo anti-GAPDH, quello esposto con l'anticorpo primario anti AKT è stato incubato con un anticorpo anti-pAKT e il filtro esposto con l'anticorpo primario anti ERK è stato incubato con un anticorpo anti-pERK. Le specifiche e le diluizioni dei vari anticorpi utilizzati per il western blot sono riportati in Tabella 6. L'intensità netta delle bande rilevate è stata quantificata mediante il software di analisi di immagini ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). L'intensità netta di ogni banda ottenuta da ciascun campione è stata rapportata all'intensità netta della banda del gene di riferimento dello stesso campione, per normalizzare eventuali differenze nella quantità di proteine caricate.

Tabella 6: Anticorpi per western blot.

	Primary antibody	Secondary antibody
HPSE	sc-25825, (Santa Cruz Biotechnology) 1:200	sc-2004, (Santa Cruz Biotechnology) 1:3000
GAPDH	sc-25778 (Santa Cruz Biotechnology) 1:1000	sc-2004, (Santa Cruz Biotechnology) 1:10000
AKT	sc-8312, (Santa Cruz Biotechnology) 1:1000	NA934 anti rabbit-HRP (Amershan) 1:4000
pAKT	sc-7985-R, (Santa Cruz Biotechnology) 1:1000	NA934 anti rabbit-HRP (Amershan) 1:4000
ERK	9102 (Cell Signaling) 1:1000	NA934 anti rabbit-HRP (Amershan) 1:4000
pERK	9101(Cell Signaling) 1:1000	NA934 anti rabbit-HRP (Amershan) 1:4000

18. Analisi della proliferazione: saggio MTT.

Il saggio MTT serve a valutare la vitalità delle cellule servendosi di un agente ossidante cromogeno (MTT bromide) corrispondente ad un sistema policiclico ($C_{18}H_{16}BrN_5S$) dotato di un anello tetrazolico che può essere facilmente ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali o da altri sistemi di trasporto elettronico, formando, per apertura dell'anello tetrazolico, un composto cromogeno azotato detto formazano, il cui gruppo funzionale caratteristico è $R^1NH-N=CR^2-N=NR^3$.

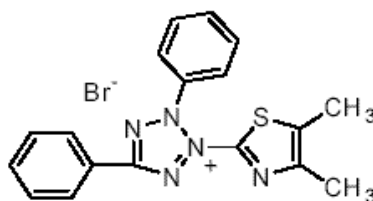


Fig.34: Formazano, un cromogeno.

Tale formazano forma dei cristalli insolubili nell'ambiente intracellulare a cui le membrane risultano sostanzialmente impermeabili: è quindi permessa l'entrata della molecola nella cellula, ma non l'uscita del prodotto se questo è stato correttamente metabolizzato, cioè se le catene di trasporto elettronico sono metabolicamente attive (vale a dire dotate di un attivo potere riducente).

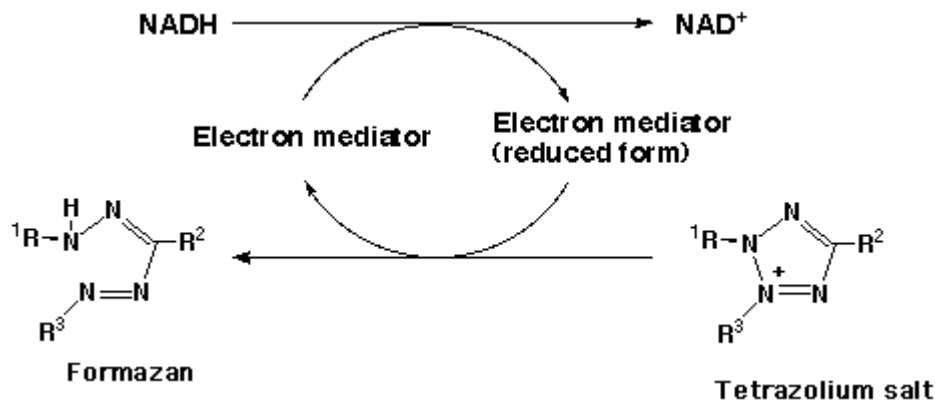


Fig.35: Reazione di conversione del sale di tetrazolio in formazano.

La trasformazione dell'MTT vede un viraggio della molecola da giallo a blu scuro-violetto, pertanto questo è un saggio colorimetrico che permette di stimare il numero di mitocondri attivi e quindi il numero di cellule vitali nel campione.

Sono state piastrate 3×10^3 cellule in ogni pozzetto di una multiwell da 96 pozzetti e coltivate in terreno senza siero per 24 ore. Le cellule sono quindi state incubate in terreno senza siero con e senza 25mM mannitolo, 25mM glucosio o BSA o AGE (0, 30, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) per 24, 48 and 72 ore. Successivamente sono stati aggiunti 10 μl della soluzione a 5 mg/ml in tampone fosfato di MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e la piastra è stata incubata per 4 ore a 37 °C. Il terreno è stato rimosso e in ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 μl di dimetilsolfossido (DMSO) per dissolvere i cristalli di formazon che si erano formati sulle cellule.

La quantità di cellule proliferanti è stata stimata mediante lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 540 nm. I valori di assorbanza letti sono proporzionali alla quantità di cellule in proliferazione.

19. Saggio di ipertrofia

Numeri uguali di cellule HK2 wt e HPSE silenziate sono state piastrate su dish di diametro 60mm in terreno senza siero per 24 ore. Le cellule sono poi state incubate altre 24h in terreno senza siero con 25mM mannitolo, 25mM glucosio, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di BSA o AGE. Le cellule sono infine state staccate dai dish, contate e sono state quantificate le proteine.

La quantità di proteine totali estratte da ogni dish è stata normalizzata al numero di cellule ottenendo una stima di del volume cellulare che risulta espresso in μg di proteine /milione di cellule.

20. Citometria a flusso: principi

La citometria a flusso è una tecnica che permette la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un mezzo fluido. Essa rende possibile la misurazione di proprietà multiple di singole cellule ad una velocità molto rapida, permettendone una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa. Le proprietà misurate comprendono la dimensione, la granularità, la complessità interna e la relativa intensità di fluorescenza. La comparsa della citofluorimetria a flusso (CFM) avviene intorno agli anni 70, determinando un veloce ed intenso sviluppo delle tecniche istologiche e citochimiche. Inizialmente era limitata alla misurazione di 1-2 parametri: uno per le misure fisiche e l'altro per la fluorescenza. La CFM portò grande impulso allo studio del sistema immunitario, grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati con fluoresceina isotiociano (FITC). Negli ultimi anni la CFM ha raggiunto una notevole diffusione, sia in laboratori clinici che in laboratori di ricerca. Fattori che hanno contribuito a questo notevole sviluppo sono: la possibilità di utilizzare più laser di emissione, che permettono di effettuare analisi multiparametriche a 4 e più colori, la disponibilità di anticorpi monoclonali marcati con un'ampia gamma di fluorocromi e diretti contro una larghissima varietà di antigeni di membrana e/o intracellulari e la riduzione dei costi e della complessità nell'utilizzo dello strumento. Le cellule di una popolazione eterogenea vengono aspirate dalla provetta e immesse in una camera di flusso dove vengono separate le une dalle altre. Successivamente ogni singola cellula viene attraversata da un fascio di luce laser che eccita i fluorocromi e determina l'emissione di un segnale fluorescente. Il segnale passando attraverso un sistema di filtri e specchi raggiunge un rivelatore. Viene quindi processato elettronicamente, trasformato da analogico a digitale e inviato all'analizzatore, che elabora il dato e lo visualizza tramite un grafico.

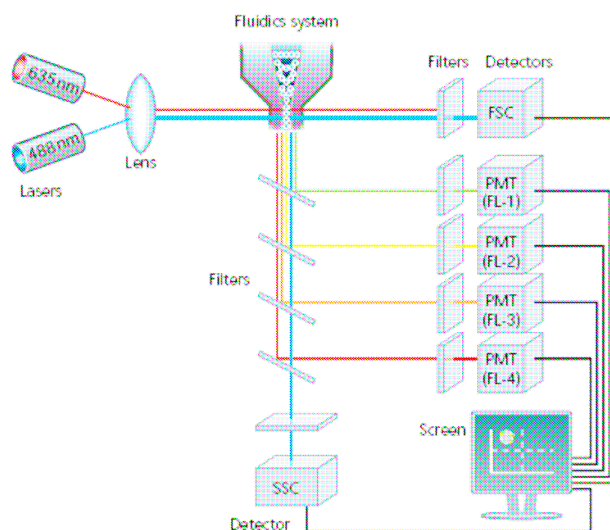


Fig.36: Rappresentazione schematica della struttura di un citometro a flusso.

Quando un campione in soluzione è iniettato in un citometro a flusso, le particelle sono distribuite casualmente in uno spazio tridimensionale. Il campione deve quindi essere ordinato in un flusso di singole particelle affinché ognuna possa essere analizzata da un sistema di rilevamento. Questo processo è gestito dal sistema fluidico. Essenzialmente, il sistema fluidico consiste in un canale centrale in cui viene iniettato il campione, racchiuso da un rivestimento esterno che contiene un

liquido che fluisce in modo più rapido. Il movimento del fluido di rivestimento crea un importante effetto di trascinamento nella stretta camera centrale. Ciò altera la velocità del fluido centrale, che diviene parabolico con una velocità maggiore al centro e praticamente nulla verso l'esterno. Questo effetto genera una singola fila di particelle e ciò è definito focalizzazione idrodinamica. In condizioni ideali di flusso laminare il fluido nella camera centrale non si mescola con quello di rivestimento.

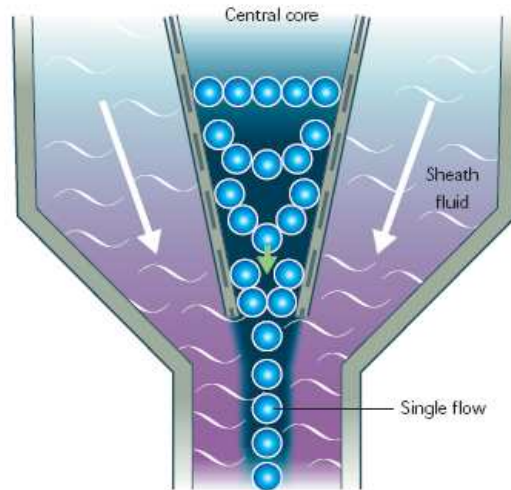
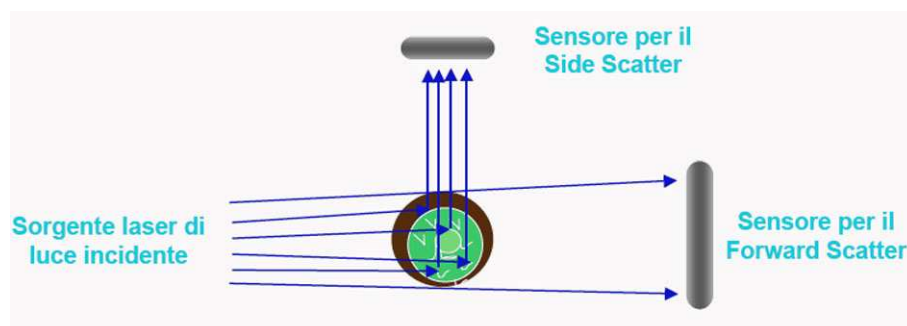


Fig.37: La focalizzazione idrodinamica produce l'allineamento in una sola fila delle particelle.

Quando la luce laser colpisce le singole particelle si verifica una diffusione della luce stessa. Si definisce forward scatter (FSC) la quantità di luce diffusa e raccolta lungo la direzione della luce incidente dopo l'interazione con le cellule in esame. L'intensità di FSC è proporzionale alle dimensioni delle cellule stesse. Si definisce invece side scatter (SSC) la quantità di luce diffusa e raccolta a 90° rispetto alla direzione della luce incidente dopo l'interazione con le cellule in esame. L'intensità di SSC è proporzionale alla granularità e complessità intracitoplasmatica delle cellule in esame.



I dati ottenuti dalla valutazione di FSC e SSC permettono di selezionare la popolazione cellulare di interesse e di escludere eventuali detriti o aggregati di più cellule. In citometria a flusso gli epitopi da analizzare vengono marcati con anticorpi coniugati a fluorofori. I fluorofori sono sostanze che esposte ad una luce di una determinata lunghezza d'onda passano in uno stato eccitato e quando ritornano allo stato diseccitato emettono un fotone ma ad una lunghezza d'onda superiore.

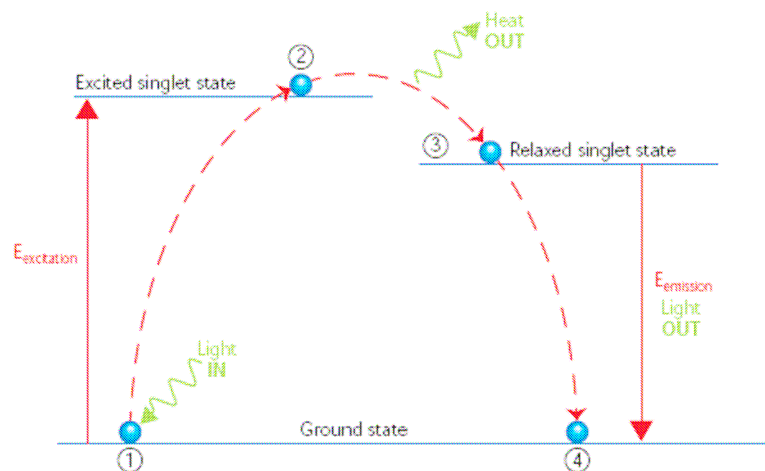


Fig.38: Schematizzazione dell'eccitazione e dell'emissione di fluorescenza da parte dei fluorofori.

Un tipico fluoroforo è FITC che viene eccitato a 488nm ed emette a 520nm, ha un basso peso molecolare ed è facilmente coniugabile con gli anticorpi. In un citofluorimetro per ogni singola cellula viene analizzata la fluorescenza emessa e questa è proporzionale all'antigene di interesse. Si può quindi ottenere un grafico in cui sono riportate le fluorescenze di tutti gli eventi analizzati e si può calcolare l'intensità media di fluorescenza (MFI) della popolazione cellulare in esame.

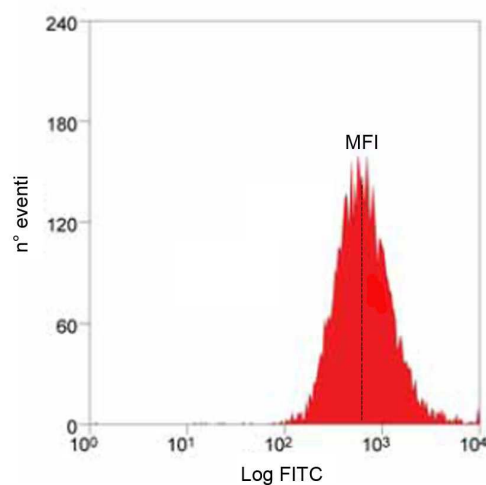


Fig.39: Distribuzione di fluorescenza di una popolazione cellulare. In ascissa il logaritmo dell'intensità di fluorescenza e in ordinata la quantità di cellule che presentano una certa intensità di fluorescenza. MFI è l'intensità media di fluorescenza di tutta la popolazione.

21. Citometria a flusso: preparazione ed analisi del campione.

Le cellule per l'analisi di citofluorimetria a flusso sono state coltivate 24 ore in terreno senza siero e quindi incubate altre 24 ore in terreno senza siero con 0 o 60 $\mu\text{g/ml}$ di BSA o AGE o 25mM glucosio o 25mM mannitolo. Le cellule sono quindi state staccate dalle plastiche mediante tripsina e lavate due volte in PBS. Per ogni punto sperimentale 5×10^5 cellule sono state incubate 10 minuti al buio con 0.5 μg di anticorpo primario anti-HS (Monoclonal anti-HS, mouse IgM, k-chain, clone

HepSS-1; Seikagaku) o anti-sindecano-1 (mouse anti-human CD138, clone MI15; BD Biosciences). Nell'analisi sono stati inclusi anche i relativi controlli isotipici. Le cellule che a questo punto sono marcate sono state lavate tre volte con PBS e incubate 10 minuti al buio con 0.5 µg di anticorpo secondario: anti-mouse IgM-FITC (AbD Serotec) e anti-mouse IgG-FITC (BioLegend) rispettivamente. L'analisi di fluorescenza e la significatività statistica con il calcolo del Ks dei valori di MFI è stata effettuata con lo strumento FACSScan (BectonDickinson) e relativo software. Ogni punto sperimentale è stato eseguito in triplicato in tre esperimenti indipendenti.

22. Immunofluorescenza per sindecano-1

Le cellule sono state piastrate su dei vetrini di diametro 22mm, lasciate crescere a sub-confluenza, lavate due volte delicatamente con PBS e quindi fissate per 10 minuti in 4% para-formaleide (PFA) precedentemente scaldata a 37°C. I vetrini sono stati sottoposti a 3 lavaggi di tre minuti ciascuno con PBS e quindi le cellule sono state permeabilizzate mediante 5 minuti di incubazione in PBT (PBS + 0.2% TritonX-100). Le cellule sono state lavate altre 3 volte con PBS quindi i siti di legame aspecifici degli anticorpi sono stati saturati mediante un ora di incubazione con PBS+1% BSA. Le cellule sono state incubate 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo primario (anti-human CD138, clone MI15; BD Biosciences) diluito 1:200 in PBS con 1% BSA, sono stati effettuati tre lavaggi di cinque minuti ciascuno con PBS quindi le cellule sono state incubate un ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (anti mouse IgG-FITC; BioLegend) diluito 1:100 in PBS con 1% BSA. Dopo altri tre lavaggi con PBS, per marcare i nuclei, le cellule sono state trattate con 20ng/ml di Hoechst per 5 minuti a temperatura ambiente. Alla fine i vetrini sono stati montati sui portavetrini con l'apposito medium (Fluoromount, Sigma)

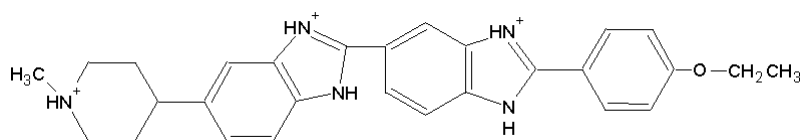


Fig.40: struttura chimica dell'Hoechst , un fluoroforo intercalante del DNA e utilizzato per la marcatura dei nuclei.

23. Immunofluorescenza per Actina

Le cellule HK2 wt e silenziate sono state piastrate su vetrini di diametro 22mm e incubate 24ore in terreno senza siero e poi trattate altre 24 ore con 25 mM mannitolo, 25mM glucosio, 60µg/ml di BSA o AGE. Le cellule sono state fissate, permeabilizzate sottoposte a saturazione come descritto in precedenza. I vetrini sono stati incubati al buio 30 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di 5U/ml (165 nM) di phalloidin-Alexa-fluor-350 in PBT. Alla fine i vetrini sono stati lavati due volte con PBT e montati sui portavetrini con l'apposito medium. La falloidina è una micotossina presente in alcune specie di funghi velenosi appartenenti al genere Amanita, è un

ciclopeptide che lega l'actina e ne impedisce la depolimerizzazione. Se coniugata con appositi fluorofori la falloidina risulta essere un ottimo marcatore dei filamenti actinici nelle cellule.

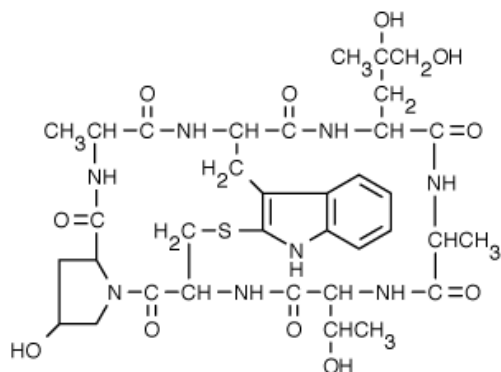


Fig.41: Struttura chimica della falloidina.

24. Saggio di quantificazione dell'attività dell'heparanase su lisati cellulari e terreni di coltura

La quantificazione dell'attività dell'heparanase nei lisati cellulari e nei terreni di coltura è stata effettuata con il kit "Heparanase assay" (AMS Biotechnology, Milton Abingdon, Oxon, UK), il quale è sostanzialmente un saggio di tipo ELISA che permette di rilevare in maniera sensibile e specifica l'attività dell'heparanase nel degradare il suo naturale substrato l'HS. Il formato del saggio è su piastra da 96 pozzetti e ha un metodo di rilevazione non radioattivo. In particolare, sul fondo dei pozzetti della piastra è stata ancorata una quantità nota di HS coniugato con biotina. Quando questo viene incubato con il campione, l'heparanase presente in esso può degradare l'HS che poi può essere rimosso mediante dei lavaggi. Successivamente l'HS-biotinilato rimanente sulla piastra può essere riconosciuto da streptavidina coniugata con perossidasi alcalina e all'aggiunta del substrato di quest'ultima si sviluppa una reazione di tipo colorimetrico che può essere quantificata mediante analisi spettrofotometrica. L'assorbanza è direttamente proporzionale alla quantità di HS residuo e quindi inversamente proporzionale all'attività dell'heparanase nel campione.

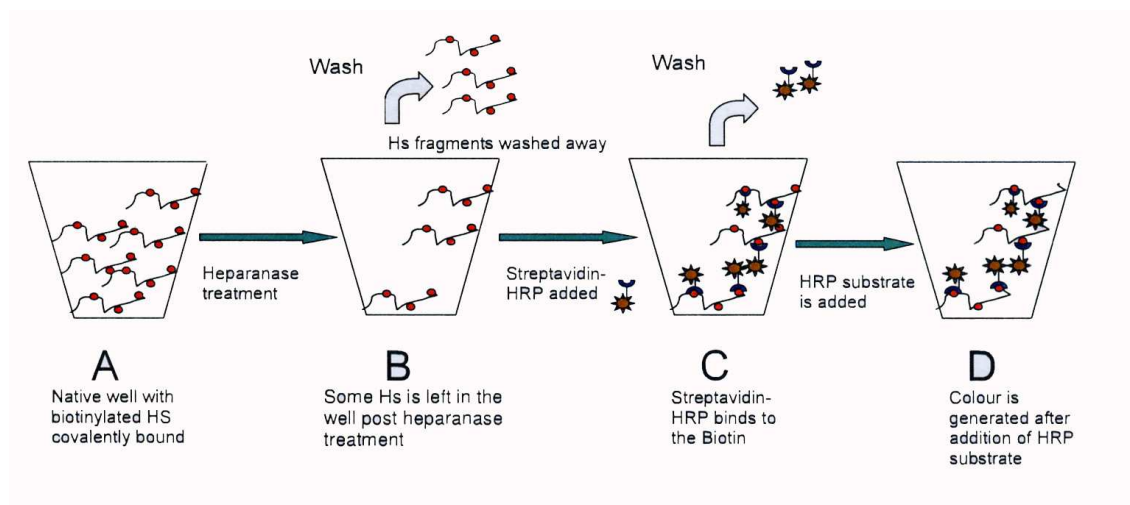


Fig.42: Schematizzazione dell'"Heparanase assay".

In accordo con il protocollo suggerito dal produttore, la piastra è stata reidratata aggiungendo in ogni pozzetto 100 µl di PBS e incubata a temperatura ambiente per 30 minuti. Il PBS è stato aspirato e in ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 µl del tampone di reazione, che era stato preparato in precedenza miscelando 6ml di acqua milliQ con 6ml di tampone base, 12 µl di additivo1 e 12 µl di additivo2.

Ai pozzetti usati come controlli negativi sono stati aggiunti altri 50 µl di tampone di reazione. Ai pozzetti usati come controlli positivi sono stati aggiunti 50 µl di estratto piastrinico diluito 1:100 in tampone heparanase. Come controllo positivo è stato utilizzato dell'estratto piastrinico perché è noto che le piastrine e le cellule attivate del sistema immunitario sono fra i maggiori produttori dell'enzima heparanase.

Nei rimanenti pozzetti sono stati aggiunti 50 µl dei campioni da testare. I campioni erano costituiti o da estratto proteico totale o da mazzi condizionati senza siero dopo 24 ore di incubazione con egual numero di cellule. Ogni campione è stato testato in triplicato. La piastra è stata quindi incubata a 37°C per un ora in agitazione, e poi ogni pozzetto è stato lavato quattro volte con 200 µl di PBT (PBS+ 0.1% v/v Tween-20). In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di streptavidina-HRP, fornita nel kit, la piastra è stata incubata 1 ora a temperatura ambiente in agitazione e poi ogni pozzetto è stato lavato cinque volte con 200 µl di PBT.

Per la rivelazione sono stati aggiunti a temperatura ambiente 100 µl di substrato della perossidasi e velocemente si è sviluppata una colorazione. La reazione è stata monitorata mediante letture allo spettrofotometro a 1,3 e 5 minuti a 650nm. Non appena l'O.D. dei campioni negativi ha raggiunto valori di 0.60-0.65 la reazione è stata fermata aggiungendo in ogni pozzetto 100 µl di HCl 0.12M. Entro 5 minuti dal termine della reazione l'assorbanza è stata misurata alla lunghezza d'onda di 450nm e questi valori sono stati utilizzati per calcolare l'attività dell'heparanase nei diversi campioni. Per calcolare l'attività dell'heparanase, espressa come ng di HS rimossi al minuto è stata applicata la seguente formula.

Come prima cosa è stato calcolato R:

$$R = (OD / \text{Max OD}) \times 500$$

Dove OD è l'OD letta per ogni campione e MaxOD è la massima OD letta nella piastra ovvero in coincidenza con i controlli negativi

Poi, R è stato inserito nella seguente formula:

$$\text{Attività (ng HS rimossi / minuto)} = (500 - R) / 60$$

25. Preparazione dei mezzi condizionati

I mezzi condizionati sono stati preparati incubando lo stesso numero di cellule per 24 ore in terreno senza siero. Poi questo terreno è stato sostituito con dell'altro terreno senza siero con e senza 60µg/ml di BSA o AGE. I mezzi condizionati sono poi stati raccolti e chiarificati mediante centrifugazione a 2000rpm per 2 minuti. Una parte dei terreni sono stati concentrati 10 volte mediante ultracentrifugazione usando i concentratori Vivaspinn da 0.5 ml a 4°C. ed infine sono stati aliquotati e conservati a -20°C.

26. Zimografia

La zimografia è una metodica che consente di valutare l'attività gelatinolitica delle MMPs presenti in un mezzo di coltura condizionato da cellule.

I mezzi condizionati sono stati preparati senza siero perché nel siero è presente una grande quantità di gelatinasi, che poi all'analisi zimografica non permetterebbe di analizzare le proteasi effettivamente secrete dalle cellule. Le analisi di zimografia sono state effettuate seguendo una procedura standard (Onisto et al. 2005).

I campioni costituiti dai mezzi condizionati concentrati in sample buffer (4% SDS, 125mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerolo e 0.05% blu di bromofenolo) sono stati separati mediante elettroforesi in condizioni non riducenti in gel al 10% SDS-PAGE copolimerizzati con lo 0.1% di gelatina che è un substrato delle gelatinasi ovvero MMP2 e MMP9. Conclusa la corsa elettroforetica, il gel subisce due lavaggi di mezz'ora ciascuno con una soluzione al 2,5% di Triton X-100.

Questo trattamento consente di eliminare l' SDS dal gel e dai campioni che potrebbe ostacolare l'attività enzimatica delle MMP. Successivamente il gel viene incubato 16 h a 37 °C con un tampone di sviluppo per le gelatinasi (collagenasi buffer: Tris-HCl, 50 mM; NaCl, 200 mM; CaCl₂, 10 mM a pH 7.4). Al termine dell'incubazione il gel è colorato per 30 min in 30% metanolo/ 10% acido acetico contenente 0,5% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Amersham-Pharmacia), e decolorato con la stessa soluzione senza colorante. Le bande chiare su sfondo blu rappresentano le zone di digestione della gelatina ad opera delle gelatinasi presenti nel campione. Le stesse sono quantificate utilizzando il sistema di analisi densitometrico dell'immagine ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)

27. Quantificazione della capacità inibente del Sulodexide sull'heparanase.

Si piastrano 25 µl di matrigel (Matrigel™ Basement Membrane Matrigel) alla concentrazione di 200 µg/ml nei pozzetti di una multiwell da 96 per ELISA. Si lascia asciugare sotto cappa aspirante a temperatura ambiente per 1 ora e 30 minuti. Si preparano i campioni da testare miscelando a diverse concentrazioni i GAGs (Sulodexide Batch 20061006; Parnaparina Alfawassermann 100mg Batch 20061544; Chondroitin Sulphate B Sodium Salt min 90% (Dematan Sulphate) Sigma C-3788 100mg Batch 046K1411; Fast Moving Heparin H2046 Opocrin 100mg; OP D2047 (Dematan Sulphate Opocrin 100mg) con l'Heparanase (HepaOne™ Recombinant Human Heparanase-1 (rhHPA1) (Stabilized Lyophilized). I pozzetti con il matrigel vengono lavati una volta con PBT (PBS+ 0.05% Tween20) quindi vi si trasferiscono i campioni. Le miscele di enzima – inibitore sono piastrate 25 µl /pozzetto in working buffer (50mM Tris-HCl pH 5; 150 mM NaCl; 0.01% Triton X; inibitore proteasi (Complete – Roche Diagnostics) e incubate over night a 37°C.

L'enzima heparanase viene usato alla concentrazione di 0.5 ng/ml.

Ciascuno dei GAGs viene testato a 4 concentrazioni (5, 10, 15, 20 µg/ml); vengono anche testate, alle stesse concentrazioni, diverse miscele di GAGs costituite da: Parnaparina Alfawassermann - Chondroitin Sulphate B Sodium Salt (Dematan Sulphate) Sigma nei rapporti 20:80, 50:50, 80:20 e Fast Moving Heparin H2046 Opocrin - OP D2047 (Dermatan Sulphate) Opocrin nei rapporti 20:80, 50:50, 80:20. Si aspira il trattamento e si effettua un lavaggio con PBT 200 µl /pozzetto.

Si eseguono 2 ore di saturazione in Blocking Buffer (PBT; 0.5%BSA; 1mM EDTA), 200 µl /pozzetto in agitazione a temperatura ambiente. Si aspira il Blocking Buffer e si effettuano 2 lavaggi con PBT. Si effettua l'incubazione con l'anticorpo primario "Anti-Heparan Sulphate (Mouse IgM) Purif. Clone HepSS-1" 25 µl /pozzetto, diluito 1:500 in Blocking buffer per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente. Si effettuano 3 lavaggi da 5 minuti ciascuno con 200 µl /pozzetto di PBT e l'incubazione con l'anticorpo secondario "goat anti-mouseIgM-HRP Santa Cruz Biotecnology, sc-2973" 25 µl /pozzetto, diluito 1:1000 in Blocking buffer per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente. Si effettuano 3 lavaggi da 5 minuti ciascuno con 200 µl/pozzetto di PBT. In ogni pozzetto si aggiungono 50 µl di ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) liquid substrate system for ELISA – Sigma), si mantiene la piastra al buio per 15 minuti quindi si blocca la reazione con 50 µl /pozzetto di 1% SDS. Si legge l'assorbanza a 405nm. L'intensità del segnale è proporzionale alla quantità di HS residua che sarà tanto maggiore quanto più efficaci saranno i GAG nell'inibire l'heparanase.

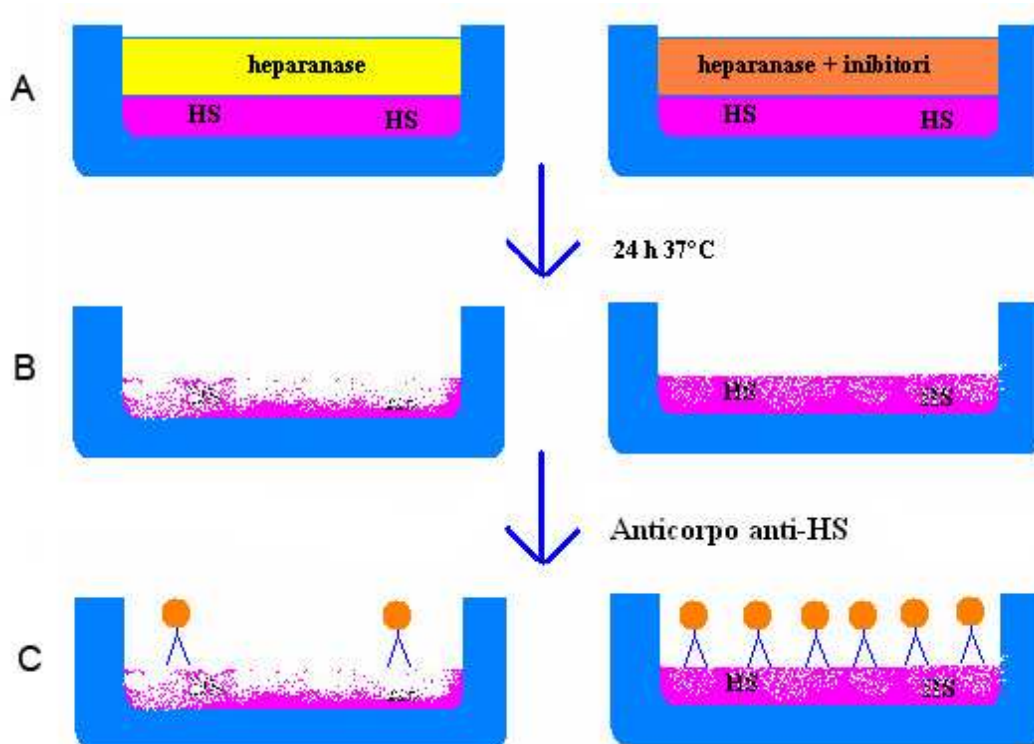


Fig.43: Schematizzazione del saggio per rilevare l'attività residua dell'heparanase dopo inibizione con i GAG. A). I campioni con heparanase ed heparanase/inibitore sono incubati sopra al matrigel che contiene HS. B) In base all'attività dell'heparanase nel campione l'HS viene più o meno degradato. C) L'HS residuo viene rilevato con un anticorpo anti-HS ed un anticorpo secondario coniugato con per ossidasi che all'aggiunta del suo substrato sviluppa una reazione colorimetrica.

28. Quantificazione dell'attività plasmatica dell'heparanase.

Sono stati raccolti 3ml di sangue periferico in EDTA, sono stati centrifugati per 15 minuti a 1500g e il plasma è stato raccolto, aliquotato e conservato a -80°C . I campioni di plasma sono stati diluiti 1:4 nell'apposito tampone (0.1 M Sodium Acetate (pH 5.0), 0.1 mg/ml BSA, 0.01% Triton X-100, Protease Inhibitor Cocktail) e la quantificazione dell'attività plasmatica è stata effettuato con lo stesso tipo di saggio descritto sopra in accordo con il metodo di Xu et al. (Xu et al. 2003). I campioni sono stati testati in triplicato e con l'aggiunta di Parnaparina a 50 $\mu\text{g/ml}$ (una concentrazione che inibisce completamente l'heparanase). In questo modo si riesce a discriminare la degradazione dell'HS specificamente dovuta all'heparanase e non da qualche altra proteasi.

RISULTATI

1. Silenziamento stabile dell'heparanase nella linea cellulare HK2.

Al fine di indagare il ruolo dell'heparanase nelle cellule epiteliali del tubulo prossimale si è cercato di ottenere il suo silenziamento genico mediante la tecnica di shRNA. I plasmidi codificanti gli shRNA sono commercialmente e l'analisi delle loro sequenze mostra come essi siano complementari con quattro tratti diversi dell'RNA messaggero dell'heparanase.

pHPSE-1 pHPSE-2 pHPSE-3 pHPSE-4

CAGCGCTGCTCCCCGGGCGCTCCTCCCCGGGCGCTCCTCCCCAGGCCTCCCGGGCGCTTGGATCCCCGGCCATCTC
CGCACCTTCAAGTGGGTGTGGGTGATTTCTGGCGGGGGAGCAGCCAGGTGAGCCCAAGATGCTGCTGCGCT
CGAAGCCTGCGCTGCCGCCGCCGCTGATGCTGCTGCTCCTGGGGCCGCTGGGTCCCCTCTCCCCTGGCGCCCTGC
CCCGACCTGCGCAAGCACAGGACGTCGTGGACCTGGACTTCTTACCCAGGAGCCGCTGCACCTGGTGAGCCCCCT
CGTTCCTGTCCGTACCATTTGACGCCAACCTGGCCACGGACCCGCGGTTCTCATCCTCCTGGGTCTCTCCAAAGCT
TCGTACCTTGGCCAGAGGCTTGTCTCCTGCGTACCTGAGGTTTGGTGGCACCAAGACAGACTTCCTAATTTTCGAT
CCCAAGAAGGAATCAACCTTTGAAGAGAGAAGTTACTGGCAATCTCAAGTCAACCAGGATATTTGCAAAATATGG
ATCCATCCCTCCTGATGTGGAGGAGAAGTTACGGTTGGAATGGCCCTACCAGGAGCAATTGCTACTCCGAGAACC
TACCAGAAAAAGTTCAAGAACAGGACCTACTCAAGAAGCTCTGTAGATGTGCTATACACTTTTGCAAACTGCTCA
GGACTGGACTTGATCTTTGGCCTAAATGCGTTATTAAGAACAGCAGATTGTCAGTGAACAGTTCTAATGCTCAG
TTGCTCCTGGACTACTGCTCTTCCAAGGGGTATAACATTTCTTGGGAAGTAGGCAATGAACCTAACAGTTTCCTTA
AGAAGGCTGATATTTTCATCAATGGGTCGCAGTTAGGAGAAGATTTTATTCAATTGCATAAACTTCTAAGAAAGT
CCACCTTCAAAAATGCAAACTCTATGGTCTGATGTTGGTCAGCCTCGAAGAAAGACGGCTAAGATGCTGAAG
AGCTTCTGAAGGCTGGTGGAGAAGTGATTGATTGATTACATGGCATCACTACTATTTGAATGGACGGACTGCT
ACCAAGGAAGATTTTCTAAACCTGATGTATTGGACATTTTATTTCATCTGTGCAAAAAGTTTCCAGGTGGTTG
AGAGCACCAGGCCCTGGCAAGAAGGCTGTGTTAGGAGAAACAAGCTCTGCATATGGAGGCGGAGCGCCCTTGCTA
TCCGACACCTTTGCAGCTGGCTTTATGTGGCTGGATAAAATGGGCCTGTCAAGCCGAATGGGAATAGAACTGGTG
ATGAGGCAAGTATTTCTTTGGAGCAGGAACTACCATTTAGTGGATGAAAACCTTCGATCCTTTACCTGATTATTGG
CTATCTCTTCTGTTCAAGAAATTGGTGGGCACCAAGGTGTTAATGGCAAGCGTGCAAGGTTCAAAGAGAAGGAA
GCTTCGAGTATACCTTCATTGCACAAACACTGACAAATCCAAGGTATAAAGAAGGAGATTTAACTCTGTATGCCAT
AAACCTCCATAATGTCACCAAGTACTTGGGTTACCCTATCCTTTTCTAACAAGCAAGTGGATAAAACCTTCTA
AGACCTTTGGGACCTCATGGATTACTTTCCAAATCTGTCCAACCTCAATGGTCTAACTCTAAAGATGGTGGATGAT
CAAACCTTGCCACCTTTAATGAAAAACCTCTCCGCCAGGAAGTTCAGTGGGCTTGCCAGCTTTTCTCATATAGT
TTTTTTGTGATAAGAAATGCCAAAGTTGCTGCTGTCATCTGAAAAATAAAATATACTAGTCTGACACTGAATTTT
CAAGTATACTAAGAGTAAAGCAACTCAAGTTATAGGAAAGGAAGCAGATACCTTGCAAAGCAACTAGTGGGTGC
TTGAGAGACACTGGGACACTGTCAGTGCTAGATTTAGCACAGTATTTGATCTCGTAGGTAGAACACTGCTAAT
AATAATAGCTAATAATACCTTGTTCAAATACTGCTTAGCATTTTGCATGTTTTACTTTTATCTAAAGTTTGTGTTT
GTTTTATTATTTATTTATTTATTTATTTGTGACAGAGAGGATTCCATCTCAAAAAACAAGTTATTAATAATGT
ATATGAATGCTCCTAATATGGTCAGGAAGCAAGGAAGCAAGGATATATTATGAGTTTAAAGAAAGTGCTTAGC
TGTATATTTATCTTTCAAAATGTATTAGAAGATTTTAGAATTCTTTCTTCATGTGCCATCTCTACAGGCACCCATC
AGAAAAAGCATACTGCCGTTACCGTGAACCTGGTTGTAAGAGAACTATCTATTTGCACCTTAAAGACAGC
TAGATTTTGTGATTTTCTTCTTTCGGTTTTCTTTGTGACGAATAATATGTGAGAGGACAGATTGTTAGATATGAT
AGTATAAAAAATGGTTAATGACAATTCAGAGGCGAGGAGATTCTGTAACTTAAATTAATAAAATGAAATTG
ATTTGTCAAGAGGATAAATTTTAGAAAACACCCAATACCTTATACTGTCTGTTAATGCTTGCTTTTCTCTACCT
TTCTTCTTGTTCAGTTGGGAAGCTTTTGGCTGCAAGTAACAGAACTCCTAATTCAAATGGCTTAAGCAATAA
GGAAATGTATATTTCCACATAACTAGACGTTCAAACAGGCCAGGCTCCAGCACTTCAGTACGTCACCAGGGATCT
GGGTTCTTCCAGCTCTCTGCTCTGCCATCTTTAGCGCTGGCTTCATTCTCAGACTCTGGTAGCATGATGGCTGTA
GCTGTTTCATGGGCCCTTCAAACCTCATAGCAACCAGAGGAAGAAAATGAGCCATTTTTTGTAGTCTCCTTCATA

GACTTGAATAACTCTTTTTTCAGAGCTTCTCACAGCAAACCTCTCCTCATGTCTCCTCATGTCTTATTGTTTCAGAAA
 TGGGTAATGTGGCCATTTCCACCAGTCACTGCCAACAAACACGAGGTTCCCTATAATTGTCTCTGAGTAACCCCTTG
 GAATGGAGAGGGTGTGGTCAGTCTACAACTGAACACTGCAGTTCTGCGCTTTTACCAGTGAAAAAATGTAAT
 TATTTTCCCCTCTTAAGGATTAATATTCTTCAAATGTATGCCTGTTATGGATATAGTATCTTTAAAAATTTTTATTT
 TAATAGCTTTAGGGGTACACACTTTTGGCTTACAGGGGTGAATTGTGTAGTGGTGAAGACTCGGCTTTAATGTA
 CTTGTACCTGAGTGATGTACATTGTACCCAATAGGTAATTTTCATCCATTACCCTCCTTCCGCCCTCTTCCCTTC
 TGAGTCTCCAACATCCCTTATACCACTGTGTATGTTCTTGTGTACCTACAGCTAAGCTTCCACTTATAAGTGAGAA
 CATGCAGTATTTGGTTTTCCATTCTGAGTTACTTCCCTTAGGATAACAGCCCCCAGTTCCGTCCAAGTTGCTGCA
 AAATACATTATTCTTCTTTATGGCTGAGTAATAGTCCATGGTACATATATACCACATTTTCTTTATCCACTTATCA
 GTTGATGGACACTTAGGTTAATTCCATTCAATTTCAATTTAAGTATATTTGTAAGGAGCTAAAGCTGAAAAT
 TAAATTTTAGATCTTTCAATACTCTTAAATTTTATATGTAAGTGGTTTTATATTTTCACATTGAAATAAAGTAAT
 TTTTATAATCTTG

Fig.44: Sequenza del cDNA di HPSE; nero e blu sono usati per distinguere i vari esoni; le sequenze evidenziate con i quattro colori corrispondono alle sequenze degli shRNA e la rispettiva legenda è riportata in alto.

Questa tecnica permette il silenziamento stabile del gene mediante integrazione delle sequenze trasfettate nel genoma cellulare. Tutti i plasmidi, anche quelli dei controlli negativi, codificano anche per la resistenza alla puromicina quindi aggiungendo l'antibiotico al terreno di coltura è possibile selezionare le cellule efficacemente trasfettate. Esperimenti preliminari hanno dimostrato che le cellule HK2 wt sono sensibili alla puromicina anche dopo 24 ore. Già alla concentrazione più bassa testata ovvero 0.125µM la puromicina causa una certa tossicità cellulare e la concentrazione di 0.75µM è risultata essere la minima concentrazione efficace per determinare la morte di più del 95% delle cellule dopo 24 ore di incubazione(Fig.45).

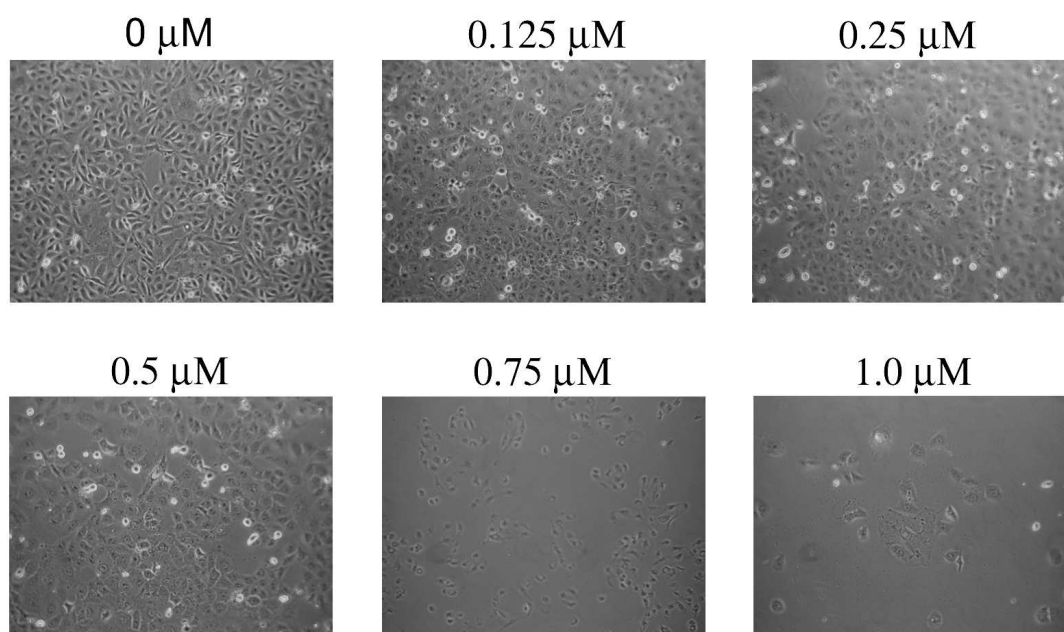


Fig.45: Immagini delle cellule HK2 wt dopo 24 ore di incubazione con diverse concentrazioni dell'antibiotico puromicina.

Dopo la trasfezione e dopo una settimana di selezione con puromicina alla concentrazione 0.75 μ M sono stati ottenuti i primi cloni che avevano integrato stabilmente i vari plasmidi di controllo e quelli codificanti gli shRNA.

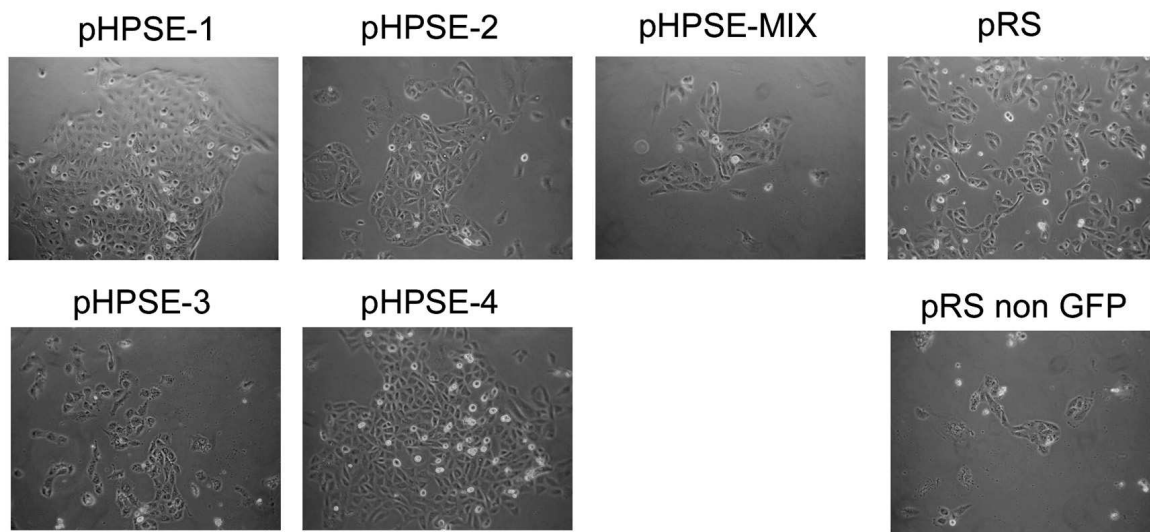


Fig.46: Immagine dei cloni generati dalla trasfezione dopo una settimana di selezione con puromicina.

Dopo tre settimane i cloni hanno generato delle linee che crescevano similmente alle cellule parentali HK2 wt e che rispetto a queste non mostravano sostanziali differenze fenotipiche apprezzabili all'osservazione al microscopio.

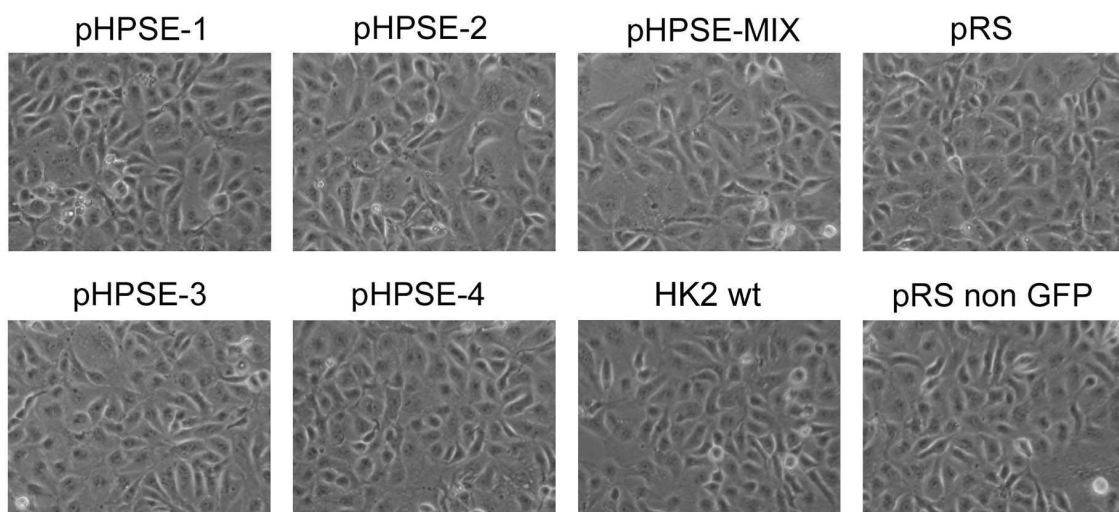


Fig.47: Immagine delle linee stabilmente resistenti alla puromicina a distanza di 3 settimane dalla trasfezione.

2. Analisi di espressione nelle cellule trasfettate: silenziamento a livello genico

Dai vari cloni ottenuti è stato estratto l'RNA messaggero, e l'espressione dell'heparanase è stata quantificata mediante Real-time PCR. Per l'analisi dei dati è stata effettuata una quantificazione relativa comparando i Ct dei diversi campioni. In particolare, per ogni clone cellulare, è stata eseguita in triplicato una reazione di amplificazione per HPSE ed una per GAPDH. Il GAPDH è un gene housekeeping ed è stato utilizzato per la normalizzazione dei valori.

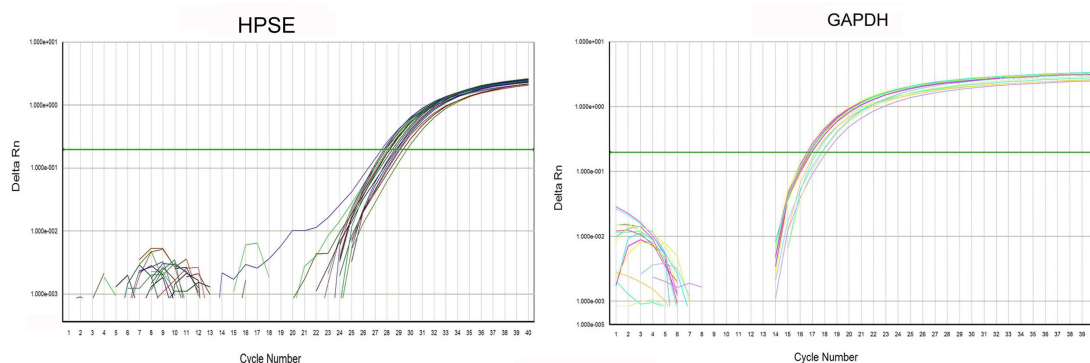


Fig.48: Curve di amplificazione dei campioni per il gene HPSE e per il gene GAPDH

L'analisi delle curve di dissociazione ha rivelato che non erano presenti amplificati aspecifici e l'analisi delle rette standard ottenute per diluizioni seriali del pool di tutti i cDNA ha rivelato delle buone efficienze di amplificazione per entrambi i geni. In particolare la retta standard del gene HPSE mostrava una pendenza -3.3 E un R^2 di 0.993 e quella del gene GAPDH una pendenza -3.15 E un R^2 di 0.996

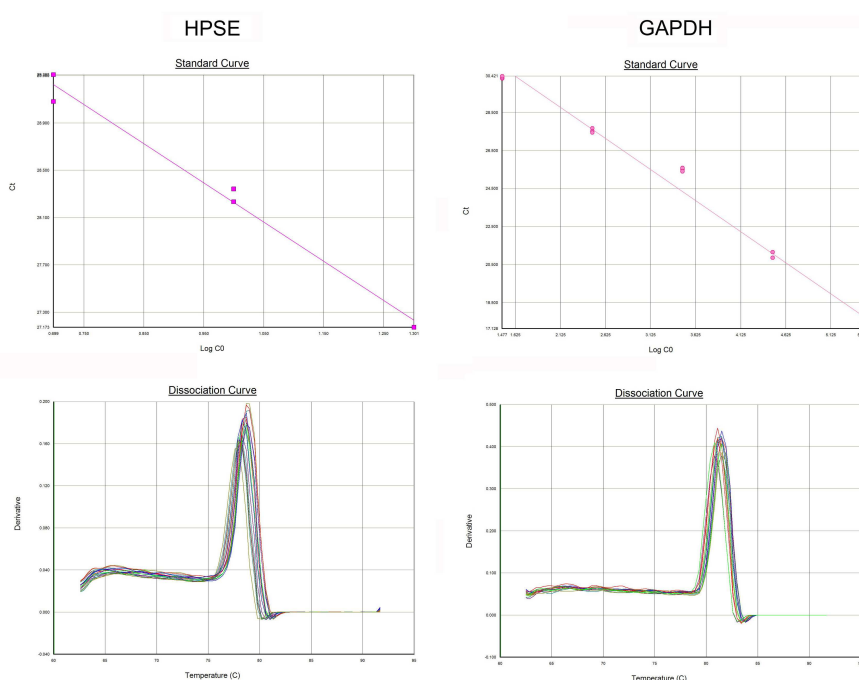


Fig.49: Rappresentazione delle rette standard (in alto) e delle curve di dissociazione (in basso) delle amplificazioni dei geni HPSE e GAPDH. Non sono presenti amplificati aspecifici poichè tutti i prodotti di PCR presentano una stessa temperatura di dissociazione, ovvero nel grafico è presente un solo picco.

L'analisi di espressione ha dimostrato che le cellule HK2 esprimono costitutivamente l'heparanase e i cloni originati dalla trasfezione con i due plasmidi di controllo (pRS e pRS-non-eff-GFP) mostrano livelli di espressione dell'heparanase coincidenti con quelli delle cellule wt. I cloni originati dalla trasfezione con i plasmidi codificanti gli shRNA antisenso mostrano delle significative riduzioni dell'espressione dell'heparanase.

La percentuale di silenziamento varia in ogni clone, in particolare a livello di mRNA il clone pHPSE-1 è risultato silenziato del 40%, il clone pHPSE-2 del 21%, il clone pHPSE-3 dell'82%, il clone pHPSE-4 del 52% e il clone pHPSE-MIX, generato dalla trasfezione di tutti e quattro gli shRNA, è risultato silenziato del 96% (Fig50).

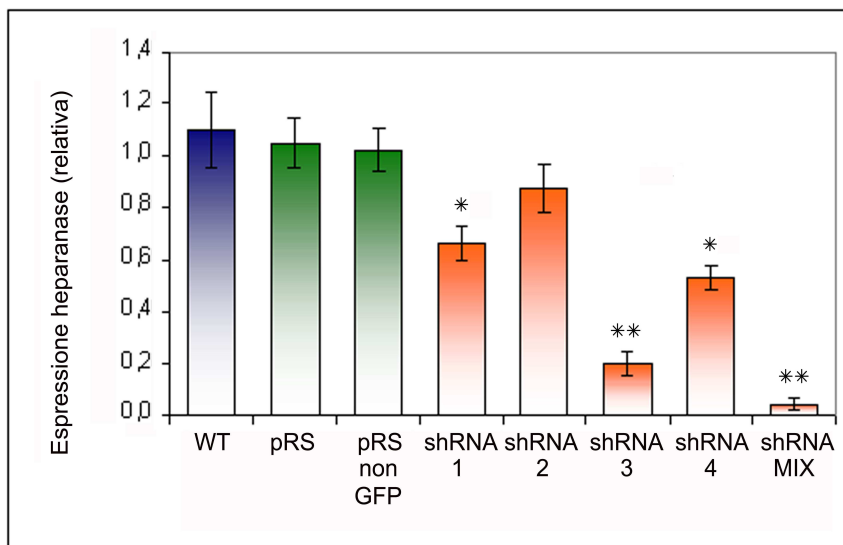


Fig.50: Rappresentazione grafica del livello di espressione del gene HPSE normalizzato al gene GAPDH, ottenuto mediante Real-Time PCR. L'esperimento è stato condotto in triplicato e le barre rappresentano la media $\pm$ deviazione standard. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. wt)

3. Analisi di espressione nelle cellule trasfettate: silenziamento a livello proteico

Dato che i cloni pHPSE-3 e pHPSE-MIX sono quelli che hanno mostrato le maggiori percentuali di silenziamento a livello di espressione dell'RNA messaggero, essi sono stati scelti per effettuare le successive analisi e sono stati rinominati rispettivamente shRNA1 ed shRNA2. Da questi due cloni e dalle cellule HK2 wt sono state estratte le proteine totali, sono state quantificate e analizzate mediante Western Blot per l'espressione dell'heparanase e del gene housekeeping GAPDH. L'intensità delle bande in corrispondenza della proteina heparanase è apparsa più debole nei cloni shRNA1 ed shRNA2 rispetto alle cellule HK2 wt. Il gene GAPDH è risultato invece molto simile in tutti i campioni dimostrando quindi come il caricamento proteico era effettivamente uguale in tutti i campioni analizzati. L'analisi quantitativa dell'intensità di tutte le bande e la normalizzazione dei valori dell'heparanase a quelli del GAPDH ha dimostrato che effettivamente nei cloni silenziati anche i livelli proteici dell'heparanase erano significativamente ridotti. In particolare il clone shRNA1 mostra una riduzione della proteina heparanase rispetto alle cellule HK2 wt del 42% e il clone shRNA2 del 55% (Fig.51).

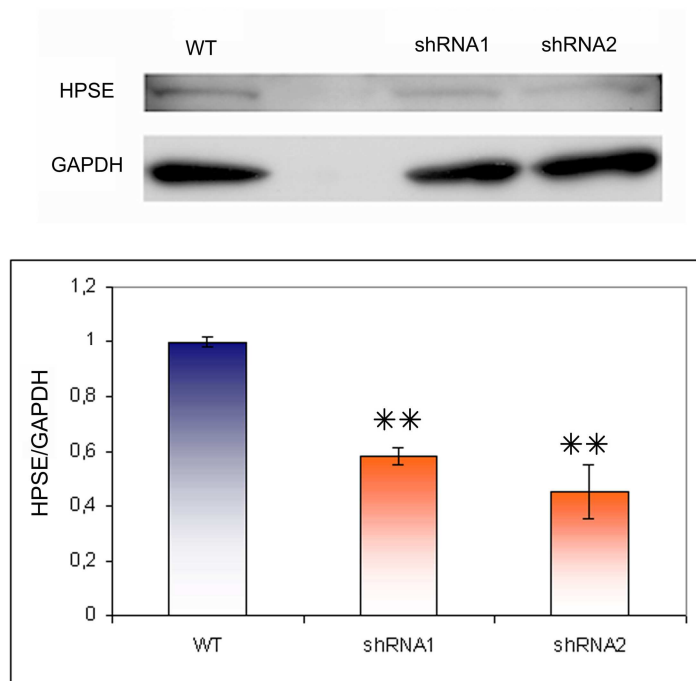


Fig.51: Analisi di espressione dell'heparanase ottenuta mediante Western Blot degli estratti proteici totali. In alto W.B. per HPSE e GAPDH e in basso il grafico relativo all'espressione di HPSE normalizzato al GAPDH. L'esperimento è stato condotto in triplicato e le barre rappresentano la media $\pm$ deviazione standard. (** $p < 0.01$ vs. wt)

Dato che l'heparanase presenta una complessa via di maturazione la sua attività è stata valutata sia a livello della cellula che nei mezzi condizionati, al fine di verificare se il silenziamento a livello genico e proteico si manifestava anche in termini di attività enzimatica. È stata quindi testata, con saggio ELISA, la capacità dell'heparanase, presente negli estratti proteici e nei mezzi condizionati, di degradare il suo substrato naturale ossia l'HS. È stato così rilevato che nelle cellule HK2 l'enzima heparanase è presente sia a livello di estratto proteico che nei terreni di coltura condizionati e che nelle cellule silenziate l'attività enzimatica è significativamente ridotta del 71% a livello intracellulare e del 62% a livello di mezzi condizionati (Fig.52).

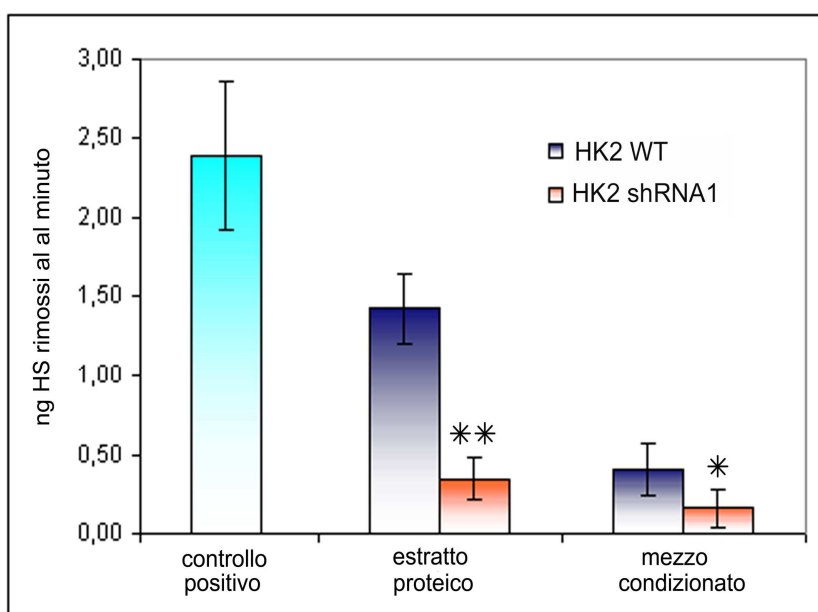


Fig.52: Quantificazione dell'attività dell'heparanase in estratti proteici e in mezzi condizionati senza siero delle cellule HK2 wt e nelle cellule silenzi con saggio ELISA. Come controllo positivo è stato usato dell'estratto piastrinico. I risultati rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard di due esperimenti condotti in triplicato (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. wt)

4. Valutazione fenotipica delle cellule HK2 wt e silenziate in condizioni normali ed in risposta a stimoli diabetici.

Gli “stimoli diabetici” che abbiamo preso in considerazione sono l’alta concentrazione di glucosio, l’albuminuria ed i prodotti di avanzate glicazione (AGE). In questo studio, per simulare l’albuminuria è stata utilizzata albumina sierica bovina (BSA), dopo avere verificato che generava gli stessi effetti dell’albumina umana.

a. Morfologia delle cellule sottoposte agli stimoli diabetici.

Sia le cellule HK2 wt che quelle silenziate sono state osservate e fotografate al microscopio ottico dopo 24 ore di trattamento con 25mM mannitolo (come controllo di osmolarità), 25mM glucosio, 60µg/ml di BSA o AGE. È emerso che questi trattamenti non inducono variazioni apprezzabili sulla morfologia e sulla struttura sia delle cellule wt che di quelle silenziate (Fig.53).

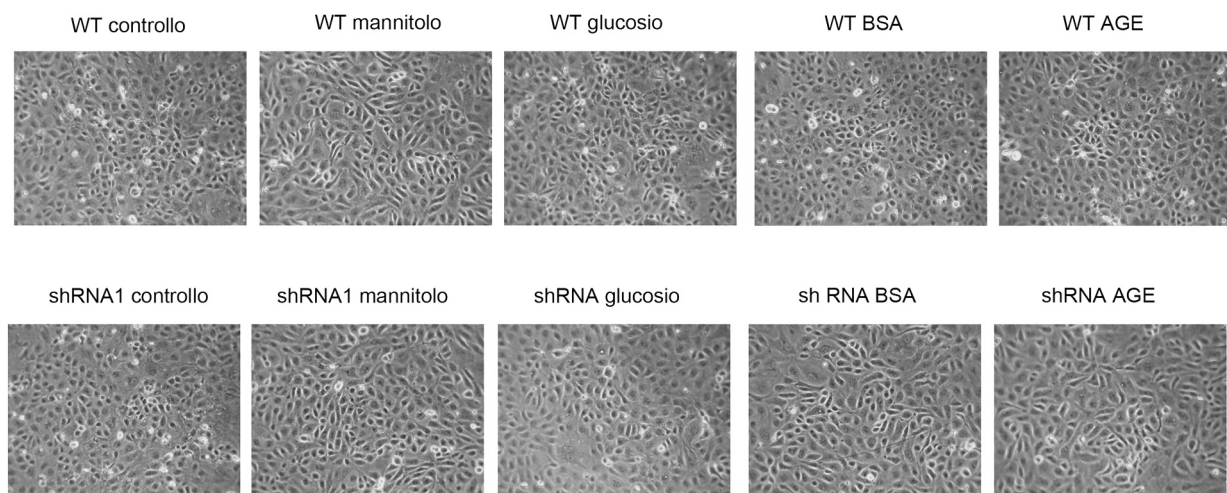


Fig.53: Immagine delle cellule HK2 wt e HPSE-silenziante dopo 24 ore di incubazione in terreno senza siero con 25mM mannitolo, 25mM glucosio, 60µg/ml di BSA o AGE.

b. Saggio di ipertrofia.

Dato che nel corso di diverse nefropatie proteinuriche le cellule del tubulo prossimale spesso vanno incontro ad ipertrofia, è stato valutato se gli stimoli diabetici possano modificare il rapporto fra il numero di cellule e il loro contenuto proteico totale. I risultati mostrano che le cellule, sia wt che HPSE-silenziante, incubate 24 ore con 25mM mannitolo, 25mM glucosio, 60µg/ml di BSA o AGE non modificano il loro contenuto proteico totale (Fig.54).

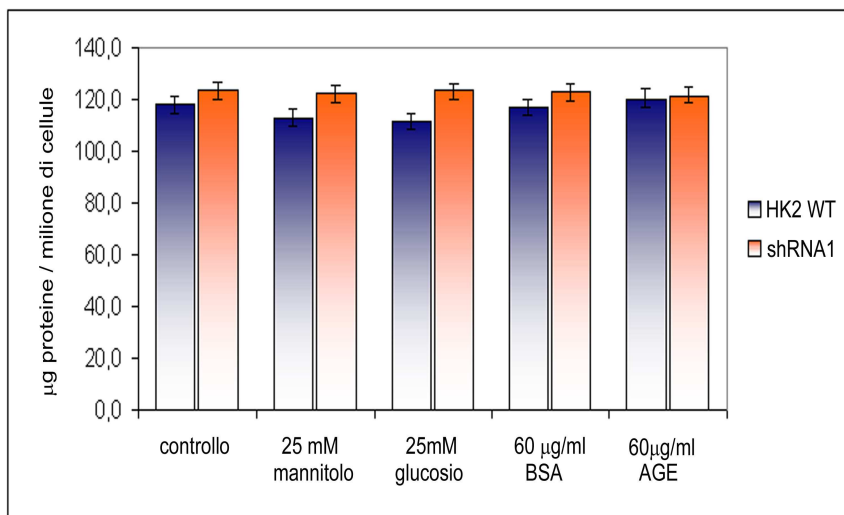


Fig.54: Rappresentazione grafica della quantità proteica in relazione al numero di cellule. In blu sono riportate le cellule HK2 wt e in arancio le cellule silenziate. Entrambe sono state incubate con 25mM mannitolo, 25mM glucosio, 60µg/ml di BSA o AGE. I risultati sono la media $\pm$ la deviazione standard di due esperimenti condotti in triplicato.

c. Distribuzione delle fibre di actina.

Dato che la struttura citoscheletrica, nelle cellule epiteliali del tubulo prossimale, è essenziale per garantirne l'adesione alla membrana basale e fra le cellule, è stata valutata la distribuzione dei filamenti di actina. I risultati mostrano che le cellule HPSE-silenziate presentano lo stesso "pattern" di distribuzione dei filamenti di actina delle cellule HK2 wt.

Sono chiaramente riconoscibili le stress fibres da un polo all'altro delle cellule che ne garantiscono la contrattilità e l'actina giunzionale disposta in prossimità delle membrane. Sia nelle cellule HK2 wt che in quelle silenziate i trattamenti con 25mM mannitolo, 25mM glucosio, 60µg/ml di BSA o AGE non alterano la struttura, la polimerizzazione o la disposizione dei microfilamenti (Fig.55).

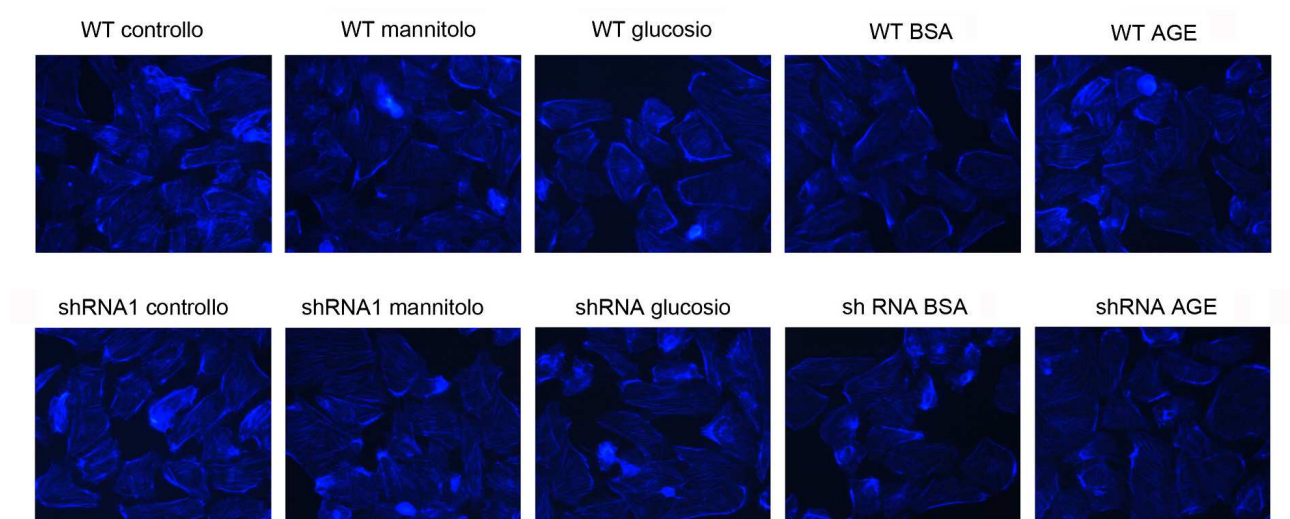


Fig.55: Immagine da microscopia a fluorescenza dei microfilamenti di actina nelle cellule HK2 wt e silenziate e dopo trattamento con 25mM mannitolo, 25mM glucosio, 60µg/ml di BSA o AGE. I filamenti di actina sono stati marcati con phalloidin-Alexa-fluor-350.

d. Vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante il saggio MTT a 24, 48 e 72h. I cloni cellulari HPSE-silenziati non differiscono dalle cellule HK2 wt in termini di numero di cellule in attiva proliferazione (Fig.56). Nemmeno i trattamenti con alto glucosio (25mM), BSA o AGE (60µg/ml) inducono significative modificazioni di proliferazione. (Dato non mostrato graficamente)

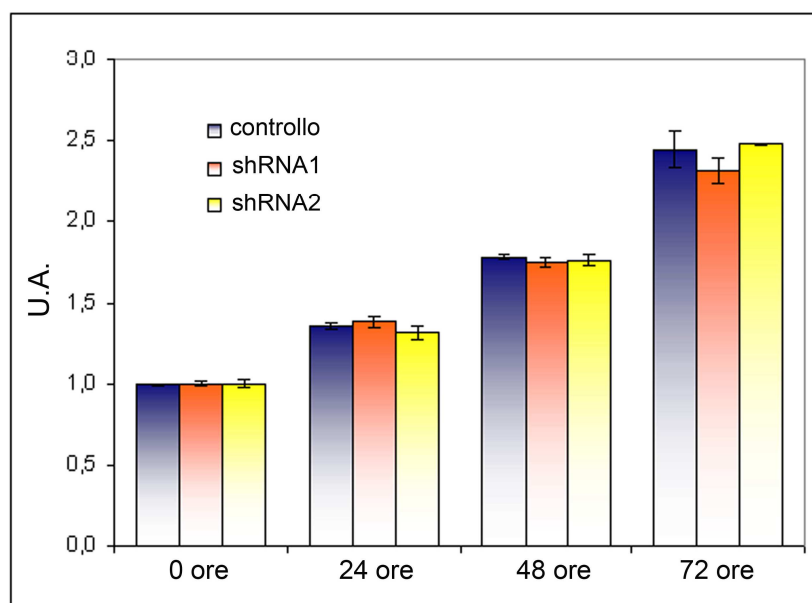


Fig.56: Analisi di vitalità cellulare mediante saggio MTT su cellule HK2 wt (controllo) e due cloni HPSE-silenziati. In ordinata sono riportate unità arbitrarie di incremento del numero di cellule proliferanti rispetto al tempo zero posto uguale a uno. I risultati sono la media $\pm$ la deviazione standard di due esperimenti condotti in triplicato.

5. Regolazione dell'heparanase in cellule epiteliali del tubulo prossimale: effetto del glucosio.

Dato che il glucosio è stato dimostrato essere un regolatore dell'espressione dell'heparanase a livello glomerulare (Maxhimer et al. 2005), è stato valutato il suo effetto a livello delle cellule del tubulo prossimale. Le cellule HK2 sono state quindi coltivate in terreno senza siero alla concentrazione fisiologica di 17.5mM di glucosio per 24 ore e poi stimulate per 6 ore con concentrazioni crescenti di glucosio e mannitolo come controllo di osmolarità. L'espressione dell'heparanase e del GAPDH sono state valutate mediante Real-time PCR. L'amplificazione dei due geni non ha generato prodotti aspecifici e l'efficienza di reazione è risultata buona dato che le rette standard in un esperimento tipo avevano i seguenti parametri: pendenza -3.45 e -3.36 ed R^2 0.989 e 0.9982 per GAPDH e HPSE rispettivamente. Né il glucosio, né il mannitolo hanno indotto variazioni statisticamente significative sull'espressione del gene heparanase nelle cellule HK2 (Fig.57).

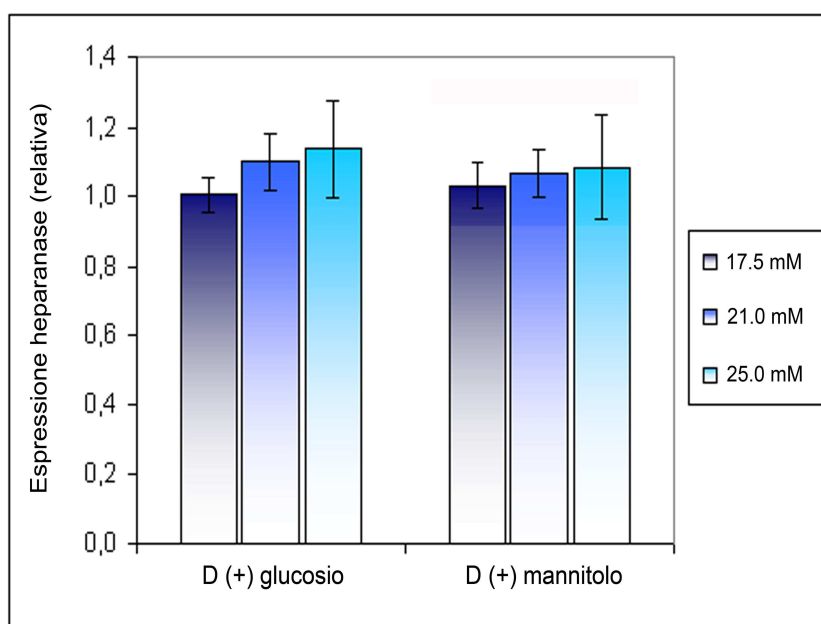


Fig.57: Rappresentazione grafica del livello di espressione del gene HPSE mediante Real-Time PCR in cellule HK2 wt in presenza di concentrazioni crescenti di glucosio e di mannitolo come controllo di osmolarità. L'espressione dell'heparanase è normalizzata al gene GAPDH. L'esperimento è stato effettuato due volte in triplicato e le barre rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. wt)

6. Regolazione dell'heparanase in cellule epiteliali del tubulo prossimale: effetti di BSA e AGE .

L'effetto di BSA e AGE sull'espressione dell'heparanase è stato valutato nelle cellule HK2 wt mediante Real-time PCR; anche in questo caso l'amplificazione è stata efficiente e non ha generato prodotti aspecifici. I risultati hanno mostrato che BSA e specialmente AGE inducono un significativo aumento dell'espressione dell'heparanase con un andamento dose dipendente. In particolare 30 e 60 $\mu\text{g/ml}$ di BSA inducono rispettivamente un aumento di 1,7 e 2,8 volte nell'espressione dell'heparanase mentre 30 e 60 $\mu\text{g/ml}$ di AGE causano rispettivamente aumenti di 3,6 e 4,1 volte (Fig.58).

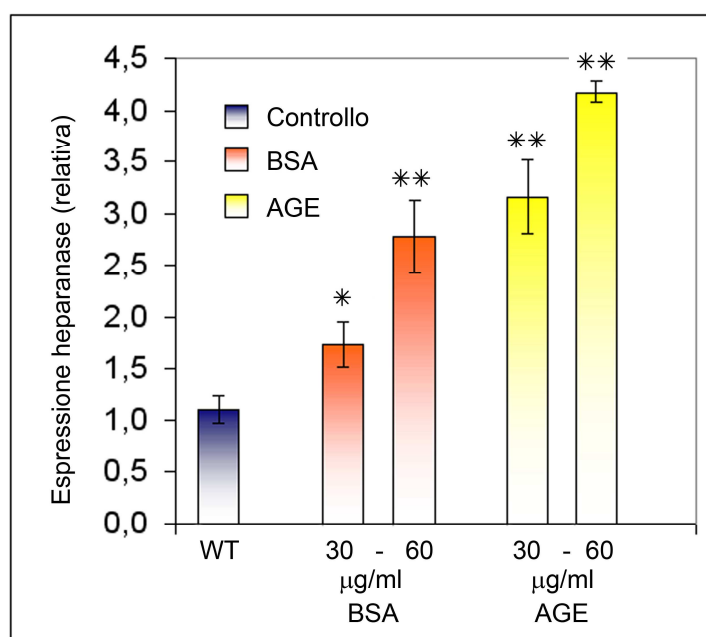


Fig.58: Rappresentazione grafica del livello di espressione del gene HPSE mediante Real-Time PCR in cellule HK2 wt in presenza di concentrazioni crescenti di BSA e AGE. L'espressione dell'heparanase è normalizzata al gene GAPDH. L'esperimento è stato effettuato due volte in triplicato e le barre rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. wt).

7. Alto glucosio, BSA e AGE non modificano l'espressione dell'heparanase nelle cellule HPSE-silenziate.

È stato verificato che in entrambi i cloni di cellule silenziate, shRNA1 ed shRNA2, alte concentrazioni di glucosio (25mM) o di mannitolo (25mM) non modificano l'espressione dell'heparanase, proprio come accade nelle cellule HK2 wt. Diversamente dalle cellule HK2 wt nelle cellule HPSE silenziate neppure i trattamenti con 60 µg/ml di BSA o AGE modificano l'espressione dell'heparanase che rimane in ogni caso molto bassa (Fig.59).

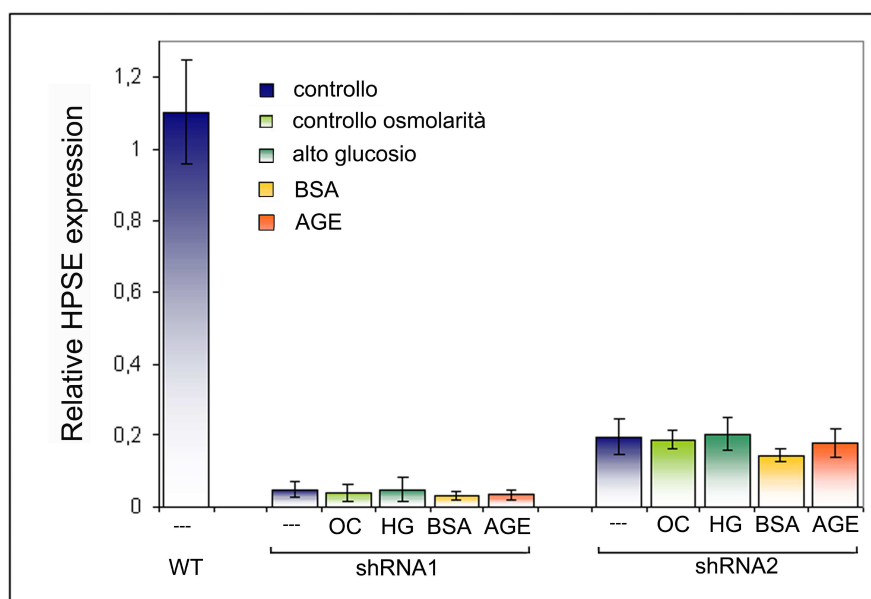


Fig.59: Rappresentazione grafica del livello di espressione del gene HPSE mediante Real-Time PCR in cellule HK2 wt e HPSE-silenziate in presenza di alto glucosio, BSA e AGE. In blu le cellule non trattate, in verde chiaro le cellule trattate con 25mM di mannitolo (OC), in verde scuro le cellule trattate con 25mM di glucosio (HG), in giallo le cellule trattate con 60 µg/ml di BSA e in arancio con 60 µg/ml di AGE. L'espressione dell'heparanase è normalizzata al gene GAPDH. L'esperimento è stato effettuato in triplicato e le barre rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard.

8. L'heparanase degrada l'HS nelle cellule epiteliali del tubulo prossimale.

Visto che l'HS è il substrato naturale dell'heparanase si è voluto verificare se l'espressione e di conseguenza l'attività dell'enzima, correlino con l'espressione dell'HS sulla superficie cellulare. Per fare ciò è stato quantificato l'HS mediante citometria a flusso nelle cellule HK2 wt e HPSE-silenziate trattate con i diversi "mediatori diabetici" fin qui presi in considerazione. Come parametro di comparazione dei diversi campioni è stata considerata l'intensità media di fluorescenza (MFI). Al fine di discriminare l'HS integro dai frammenti che si generano dopo l'azione endoglicosidica dell'heparanase è stato utilizzato un anticorpo monoclonale che riconosce in maniera specifica un epitopo strettamente correlato con la glucosamina O-solfata ed N-acetilata. (clone Hep-SSI) (Kure, Yoshie 1986).

L'analisi ha mostrato che tutti i campioni analizzati erano composti da un'unica popolazione cellulare, omogenea come dimensioni e granulosità cellulare. È stato poi osservato che entrambi i cloni silenziati, shRNA1 e shRNA2 presentano un significativo incremento dell'HS rispetto alle cellule HK2 wt.

I risultati mostrano che i trattamenti con alto mannitolo o alto glucosio (25mM) non inducono nessuna variazione sull'HS nè nelle cellule HK2 wt nè in quelle silenziate. Diversamente, il trattamento con BSA, e soprattutto con AGE, determinano una significativa riduzione dell'HS nelle cellule HK2 wt ma non in quelle HPSE-silenziate.

Complessivamente esiste quindi una relazione inversamente proporzionale fra heparanase ed HS nelle PTECs: 1) il silenziamento dell'enzima coincide con un incremento dell'HS e 2) l'aumento di espressione dell'heparanase, riscontrato nelle cellule HK2 wt a seguito dei trattamenti con BSA e AGE, determina una riduzione dell'HS in maniera dose dipendente.

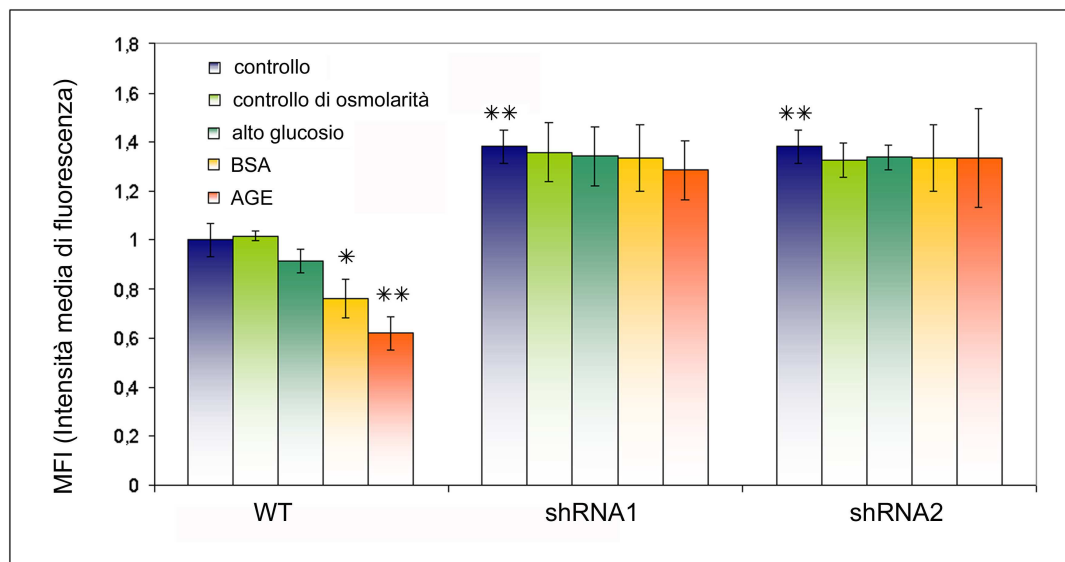


Fig.60: Quantificazione dell'HS di superficie mediante citometria a flusso nelle cellule HK2 wt e nei cloni silenziati shRNA1 ed shRNA2. In blu le cellule non trattate, in verde chiaro le cellule trattate con 25mM di mannitolo, in verde scuro le cellule trattate con 25mM di glucosio, in giallo le cellule trattate con 60 µg/ml di BSA e in arancio con 60 µg/ml di AGE. In ordinata sono riportate unità arbitrarie di intensità media di fluorescenza. I risultati rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. cellule wt non trattate).

9. L'heparanase regola il sindecano-1 nelle cellule del tubulo prossimale.

Al fine di determinare se la riduzione dell'HS ad opera dell'heparanase dipenda solamente dalla degradazione del dominio glucidico o se l'enzima possa influenzare anche il core proteico degli HSPG, è stato analizzato il sindecano-1 che è il più abbondante HSPG di membrana nelle PTECs.

Il sindecano-1 è stato quantificato mediante citometria a flusso usando un anticorpo monoclonale che riconosce in maniera specifica il core del proteoglicano (clone MI15) (Gattei et al. 1999). I dati ottenuti mostrano come il sindecano-1 sia significativamente aumentato nei cloni silenziati rispetto alle cellule HK2 wt (Fig.61 eFig.62).

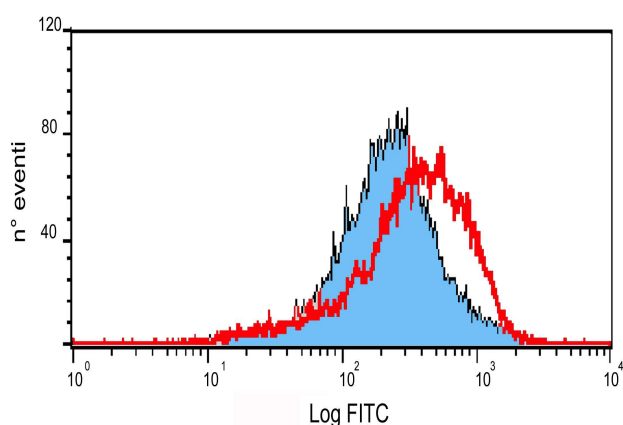


Fig.61: Analisi di espressione del sindecano-1 in cellule HK2 wt (azzurro) e HPSE silenziate (rosso). Nel grafico viene rappresentata la distribuzione dell'intensità di fluorescenza (LogFITC) verso il numero di cellule. Si nota come le cellule HPSE-silenziate mostrino una curva più spostata verso destra e quindi presentino un'intensità media di fluorescenza maggiore rispetto alle cellule HK2 wt. (Ks = 23.6 quindi $p < 0.001$)

Similmente alla regolazione dell'HS, i trattamenti con alto glucosio e mannitolo (come controllo di osmolarità) non hanno alcun effetto sulla regolazione del sindecano-1 sia nelle cellule HK2 wt che nei cloni silenziati per l'heparanase (dati non mostrati graficamente).

I trattamenti con BSA e soprattutto con AGE hanno invece generato delle significative riduzioni della proteina sindecano-1 nelle cellule HK2 wt. D'altro canto, gli stessi trattamenti con BSA e AGE nelle cellule silenziati non hanno prodotto alcuna modificazione del sindecano-1 (Fig.62).

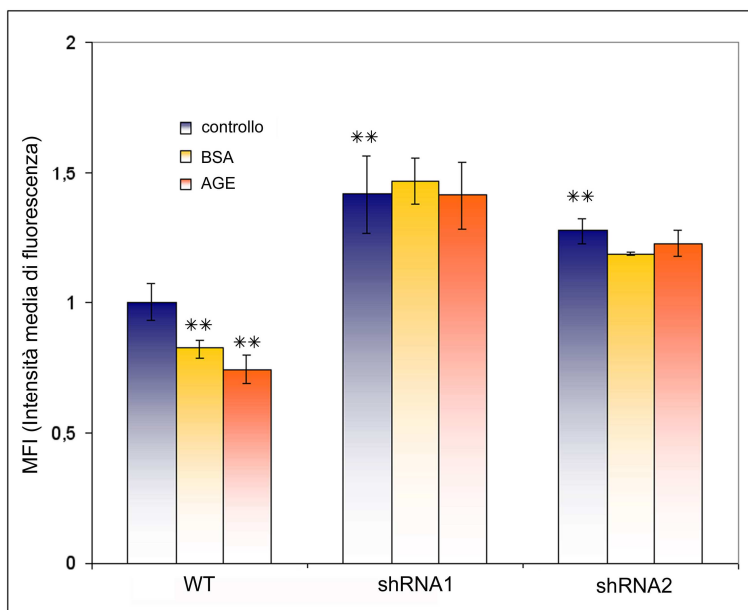


Fig.62: Quantificazione del sindecano-1 mediante citometria a flusso nelle cellule HK2 wt e nei cloni silenziati shRNA1 ed shRNA2. In blu le cellule non trattate, in giallo le cellule trattate con 60 $\mu\text{g/ml}$ di BSA e in arancio con 60 $\mu\text{g/ml}$ di AGE. In ordinata sono riportate unità arbitrarie di intensità media di fluorescenza. I risultati rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. cellule wt non trattate).

L'incremento di sindecano-1 nelle cellule silenziate è stato inoltre osservato mediante marcatura di immunofluorescenza. I risultati hanno mostrato che nelle cellule HK2 wt la distribuzione del sindecano-1 è prevalentemente nucleare. Le cellule HPSE silenziate invece mostrano una marcatura più intensa sia a livello nucleare che nella regione citoplasmatica (Fig.63).

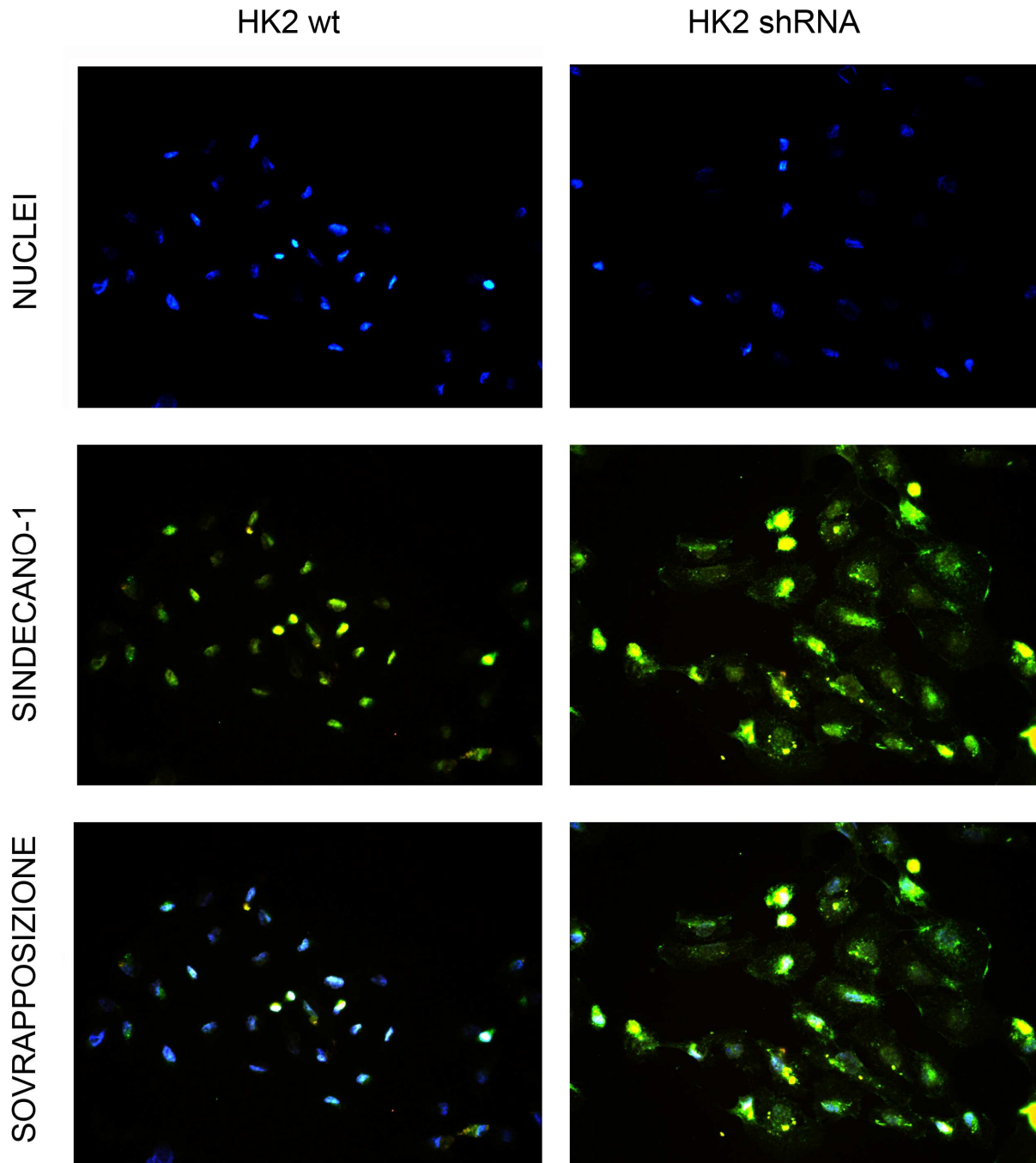


Fig.63: La localizzazione della proteina sindecano-1 è stata valutata nelle cellule HK2 wt e silenziate mediante analisi di immunofluorescenza. Il sindecano-1 è stato rivelato mediante un anticorpo primario contro il core della proteina ed un anticorpo secondario coniugato con FITC (verde) mentre i nuclei sono stati controcolorati con Hoechst (blu). L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

Per stabilire se la regolazione del sindecano-1, in relazione all'espressione dell'heparanase, avvenga a livello trascrizionale o post-trascrizionale è stata valutata l'espressione dell'mRNA del sindecano-1 mediante Real-time PCR. I valori del sindecano-1 sono stati normalizzati al gene GAPDH e l'amplificazione è risultata efficiente per entrambi i geni.

L'espressione genica del sindecano-1 è stata quantificata nelle cellule wt e nei cloni HPSE-silenziati ed i risultati hanno mostrato un significativo aumento di espressione nelle cellule silenziate rispetto alle cellule HK wt. L'espressione del sindecano-1 è stata valutata anche nelle cellule HK2 wt e silenziate trattate con 25mM mannitolo, 25mM glucosio, 60µg/ml di BSA o AGE. Il trattamento con mannitolo o glucosio non ha prodotto alcuna variazione di espressione del sindecano-1 nè nelle cellule HK2 wt nè in quelle silenziate (dato non riportato graficamente). Come già evidenziato a livello proteico, i trattamenti con BSA e soprattutto con AGE inducono un significativo aumento dell'espressione genica del sindecano-1 nelle cellule HK2 wt. I trattamenti con BSA ad AGE, nei cloni cellulari HPSE-silenziati, non hanno prodotto alcun effetto sulla regolazione del sindecano-1 (Fig.64).

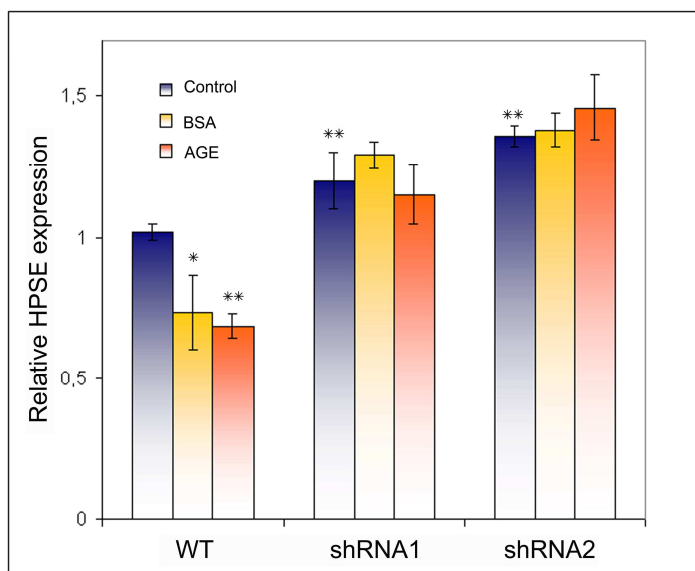


Fig.64: Rappresentazione grafica del livello di espressione del gene SDC1 mediante Real-Time PCR in cellule HK2 wt e HPSE silenziate. In blu le cellule non trattate, in giallo le cellule trattate con BSA e in arancio le cellule trattate con AGE. L'espressione dell'sindecano-1 è normalizzata al gene GAPDH. L'esperimento è stato condotto in triplicato e le barre rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. cellule wt non trattate).

10. BSA e AGE regolano l'espressione dell'heparanase mediante la via PI3K.

Si sa dalla letteratura che BSA e AGE attivano diverse vie del segnale nelle cellule epiteliali del tubulo prossimale e ciò avviene o mediante meccanismi aspecifici di assorbimento, o mediante l'interazione con specifici recettori come RAGE. Questi segnali alterano l'espressione genica, la crescita e la secrezione di mediatori pro-fibrotici che in ultima analisi conducono alla fibrosi e all'insufficienza renale.

È stato quindi analizzato il contributo di diverse vie del segnale nel mediare l'up-regolazione dell'heparanase indotta dai trattamenti con BSA ed AGE. Lo studio è stato effettuato valutando l'efficacia di diversi inibitori, di varie chinasi, nel riportare a livelli basali l'espressione dell'heparanase dopo stimolazione con BSA e AGE. Le cellule sono state coltivate per 24 ore in terreno senza siero, sono state poi incubate con gli inibitori per 30 minuti e quindi con BSA e AGE

per 6 ore al termine delle quali è stato estratto l'mRNA, retrotrascritto a cDNA. L'analisi di espressione è stata effettuata mediante Real-time PCR. L'amplificazione non ha generato prodotti aspecifici e l'efficienza di amplificazione è stata adeguata sia per il gene HPSE che per GAPDH che è stato utilizzato per normalizzare i valori di espressione.

Innanzitutto è stato controllato che il mezzo in cui sono stati disciolti i diversi inibitori non influenzasse l'espressione dell'heparanase. Si è quindi rilevato che il dimetilsolfossido (DMSO) induce solamente un lieve e non significativo aumento dell'espressione dell'heparanase (Fig.65).

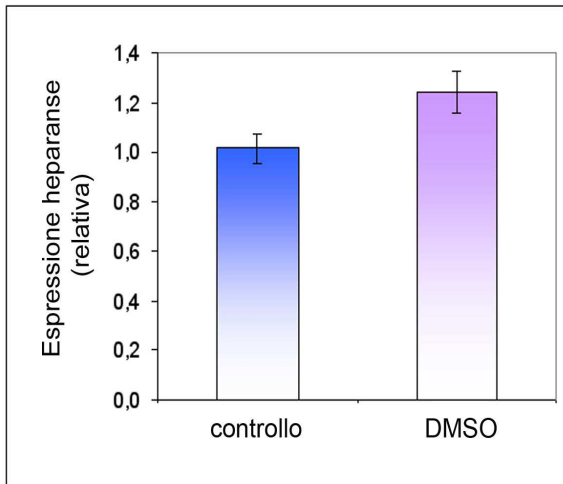
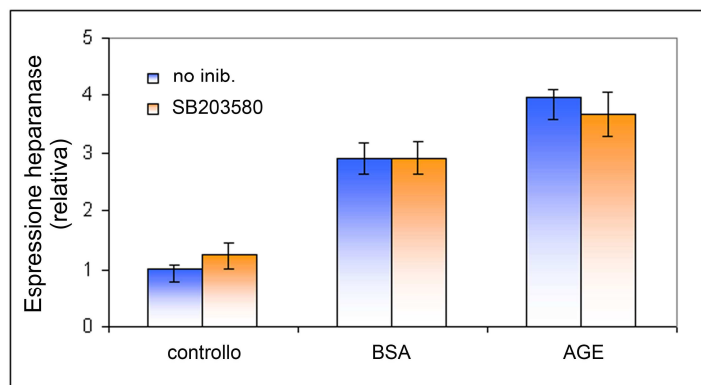


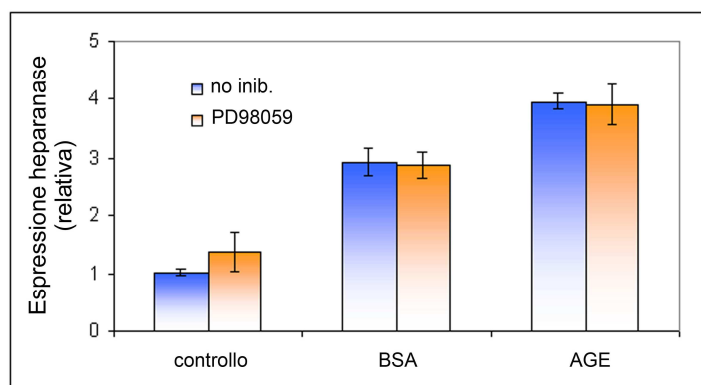
Fig.65: Analisi di espressione dell'heparanase, mediante Real-time PCR, in cellule HK2 wt e dopo 6 ore di incubazione con DMSO. L'espressione dell'heparanase è normalizzata al gene GAPDH. L'esperimento è stato condotto in triplicato e le barre rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard.

Abbiamo testato SB203580 (inibitore di P38 Kinasi), PD98059 e U0126 (inibitori di MEK1-2), AG490 (inibitore di JACK) e PDTC (inibitore di NF-kB) e nessuno di questi è risultato efficace nel ridurre l'espressione dell'heparanase dopo trattamento con BSA e AGE. I risultati hanno però mostrato che gli inibitori di NF-kB, JACK e MEK2 inducono un aumento di espressione dell'heparanase nelle cellule HK2 wt non trattate con BSA o AGE (Fig.66).

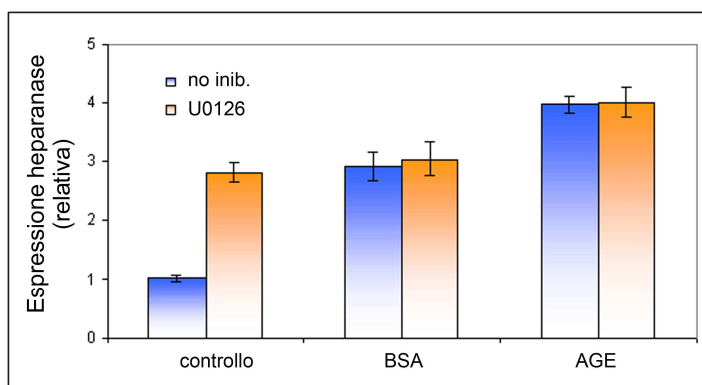
A)



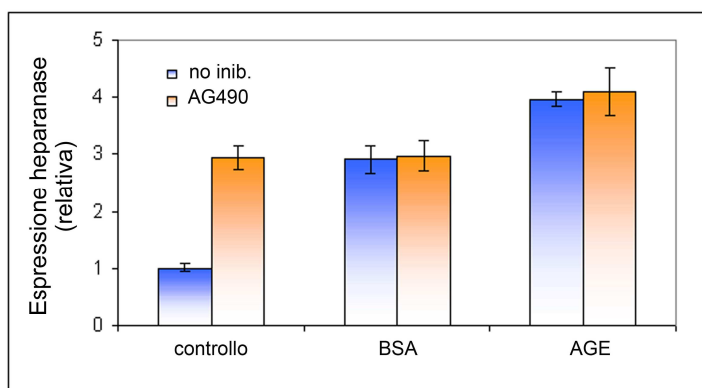
B)



C)



D)



E)

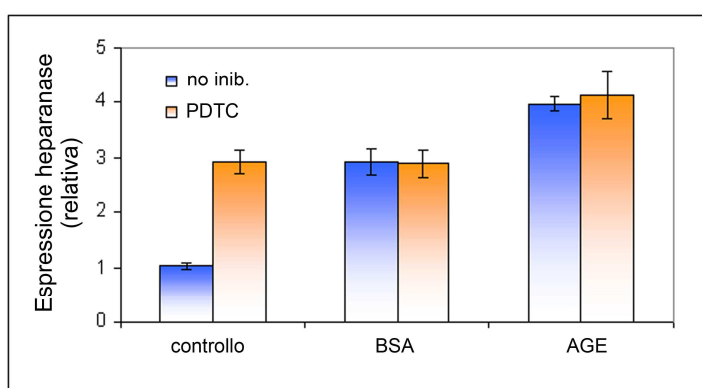


Fig.66: Analisi di espressione dell'heparanase, mediante Real-time PCR, in cellule HK2 wt e trattate con AGE o BSA in presenza o meno degli inibitori SB203580 (20 μ M), PD98059 (25 μ M), U0126(10 μ M), AG490 (25 μ M) e PDTC (10 μ M). L'espressione dell'heparanase è normalizzata al gene GAPDH. L'esperimento è stato condotto in triplicato e le barre rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard.

È stata inoltre testata l'azione di LY294002, l'inibitore della via PI3K/AKT. Esso è risultato capace di riportare a livelli basali l'espressione dell'heparanase sia dopo trattamento con BSA che con AGE (Fig.67).

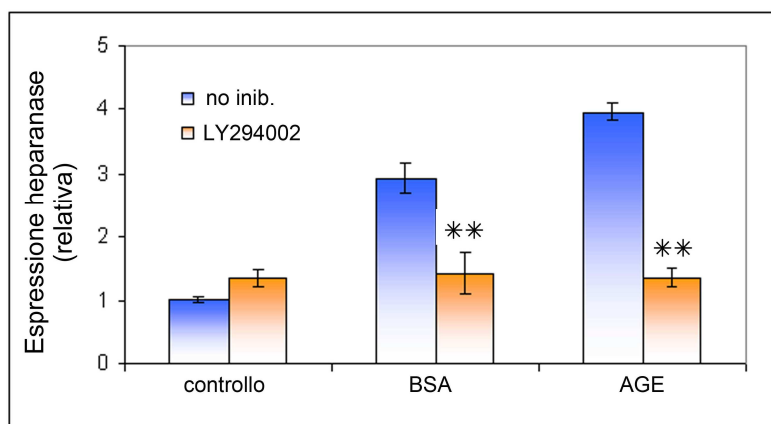


Fig.67: Analisi di espressione dell'heparanase, mediante Real-time PCR, in cellule HK2 wt e trattate con AGE o BSA in presenza o meno dell' inibitore LY294002 (25 μ M). L'espressione dell'heparanase è normalizzata al gene GAPDH. L'esperimento è stato condotto in triplicato e le barre rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard (** $p < 0.01$ vs. cellule trattate con BSA o AGE).

11. Regolazione delle metalloproteasi della matrice nelle cellule epiteliali del tubulo prossimale.

Al fine di avere una visione più ampia sul rimodellamento della matrice extracellulare nel corso della nefropatia diabetica è stata valutata l'azione delle MMP in questo modello cellulare. È stata quindi effettuata un'analisi zimografica dei mezzi condizionati delle cellule HK2 wt eHPSE-silenziate, in presenza o meno del trattamento con 60 μ g/ml di BSA o AGE. La presenza delle forme attive delle metalloproteasi è stata rilevata in corrispondenza delle bande di gelatinolisi al peso molecolare di 92kDa per la MMP9 e 72kDa per la MMP2.

Le cellule HK2 wt mostrano una discreta attività della MMP9 mentre risulta molto debole quella della MMP2.

Il trattamento con BSA e soprattutto con AGE chiaramente aumenta sia l'attività della MMP9 che della MMP2. In particolare, nelle cellule HK2 wt, BSA aumenta in maniera significativa l'attività della MMP9 di 2.73 volte e della MMP2 di 1.56 volte e AGE produce un incremento dell'attività della MMP9 di 2.97 volte e della MMP2 pari a 1.74 volte rispetto alle cellule non trattate. Nel complesso, l'attività della MMP2 rimane comunque piuttosto debole anche dopo stimolazione con BSA o AGE e resta inferiore all'attività della MMP9 nelle cellule non trattate.

Anche le cellule HPSE-silenziate mostrano una prevalente attività della MMP9 rispetto alla MMP2 ma entrambe sono significativamente ridotte, rispettivamente del 42 e 45%, rispetto alle cellule HK2 wt. Come nei tubulociti wt, anche nelle cellule HPSE-silenziate, il trattamento con BSA e ancora di più con AGE provoca un significativo incremento dell'attività gelatinolitica delle MMP. Il trattamento con BSA aumenta l'attività della MMP9 di 1.29 volte e della MMP2 di 1.31 volte e il trattamento con AGE determina un incremento dell'attività della MMP9 e della MMP2 rispettivamente di 1.64 e 1.41 volte rispetto alle cellule silenziate e non trattate con BSA o AGE. Complessivamente gli incrementi dell'attività delle MMP, a seguito dei trattamenti con BSA e AGE, nelle cellule silenziate sono risultati inferiori a quelli osservati nelle cellule HK2 wt (Fig.68).

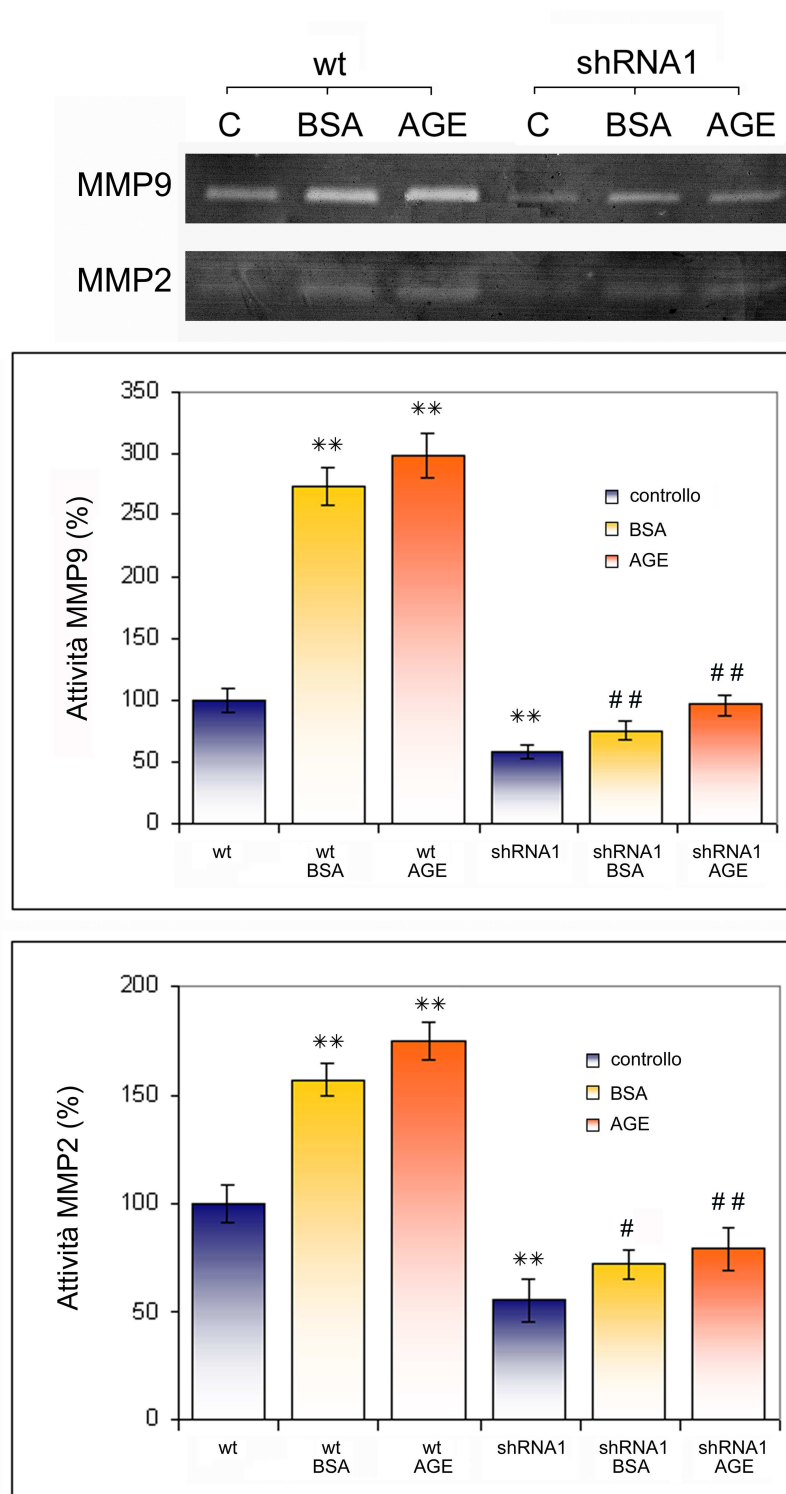


Fig.68: In alto analisi zimografica dell'attività delle MMP2 ed MMP9 nei mezzi condizionati delle cellule HK2 wt e HPSE-silenziate, in presenza o meno di BSA o AGE. In basso, gli istogrammi rappresentano la quantificazione mediante densitometria delle bande di gelatinolisi. I risultati sono espressi come percentuale rispetto alle cellule HK2 wt non trattate (** $p < 0.01$ vs cellule wt non trattate; ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ vs cellule shRNA1 non trattate).

Per definire se la regolazione dell'attività delle MMP avvenga solo a livello post-trascrizionale o invece sia sostenuta anche da una diversa espressione genica è stata valutata l'espressione di MMP9, MMP2 ed MMP14 mediante Real-time PCR. Similmente all'analisi zimografia, l'espressione delle MMP è stata valutata nelle cellule HK2 wt e nelle cellule HPSE-silenziate, trattate o meno con AGE o BSA. L'amplificazione non ha generato prodotti aspecifici e l'efficienza di amplificazione è stata adeguata sia per i geni delle MMP9 e 14 che per GAPDH che è stato utilizzato per normalizzare i valori di espressione. L'efficienza di amplificazione dell'MMP2 è stata bassa perché tutti i campioni ne esprimevano livelli basali minimi.

I risultati dell'amplificazione hanno mostrato che l'MMP9 mostra un andamento di espressione paragonabile a quello della sua attività. In particolare, le cellule HPSE-silenziate mostrano una significativa riduzione dell'espressione dell'MMP9 del 42% rispetto alle cellule HK2 wt. I trattamenti con BSA e maggiormente con AGE determinano un significativo aumento del mRNA di MMP9 sia nelle cellule wt che in quelle silenziate; in particolare BSA incrementa di 1.4 volte l'espressione di MMP9 in entrambi i tipi cellulari e AGE produce un incremento più intenso pari a 1.9 volte nelle cellule HK2 wt e 2.52 volte nelle cellule HPSE-silenziate rispetto alle cellule non trattate (Fig.69).

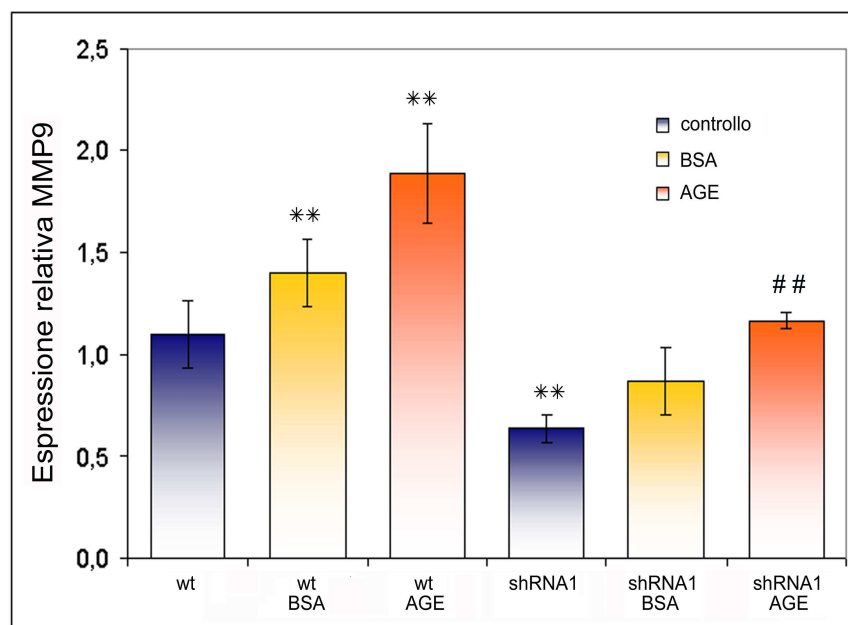


Fig.69: Rappresentazione grafica del livello di espressione del gene MMP9 mediante Real-Time PCR in cellule HK2 wt e HPSE silenziate. In blu le cellule non trattate, in giallo le cellule trattate con BSA e in arancio le cellule trattate con AGE. L'espressione dell'heparanase è normalizzata al gene GAPDH. L'esperimento è stato condotto in triplicato e le barre rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard (** $p < 0.01$ vs cellule wt non trattate; ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ vs cellule shRNA1 non trattate).

Per quanto riguarda l'espressione dell'MMP2 essa è risultata veramente bassa, tanto che era rilevabile solo in alcuni campioni e con cicli soglia superiori al trentaseiesimo, e quindi non è stato possibile effettuarne una quantificazione.

È stata inoltre valutata l'espressione dell'MMP14, una metalloproteasi di membrana che agisce anche come attivatore dell'MMP2. L'analisi ha rivelato che tra le cellule HK2 wt e le cellule HPSE-silenziate non vi sono differenze mentre il trattamento con BSA e AGE induce un aumento di espressione di MMP14, in particolare AGE produce un incremento di espressione pari a 1.4 e 1.3 volte rispettivamente nelle cellule HK2 wt e silenziate rispetto agli stessi tipi cellulari non trattati (Fig70).

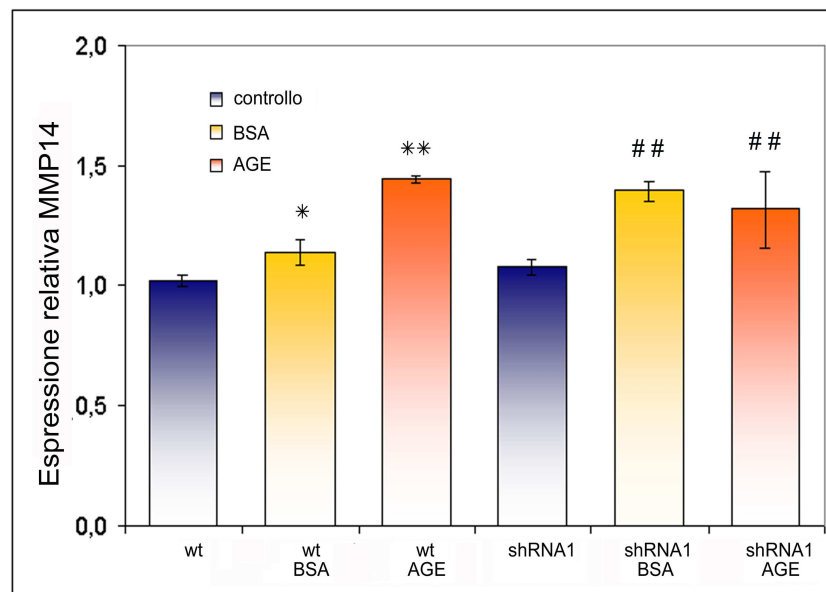


Fig.70: Rappresentazione grafica del livello di espressione del gene MMP14 mediante Real-Time PCR in cellule HK2 wt e HPSE silenziate. In blu le cellule non trattate, in giallo le cellule trattate con BSA e in arancio le cellule trattate con AGE. L'espressione dell'heparanase è normalizzata al gene GAPDH. L'esperimento è stato condotto in triplicato e le barre rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs cellule wt non trattate; ## $p < 0.01$ vs cellule shRNA1 non trattate).

12. Effetti del FGF-2 sulle cellule epiteliali del tubulo prossimale.

FGF-2 è una citochina che è stata ampiamente correlata ai meccanismi patogenetici della nefropatia diabetica. Si è quindi deciso di studiare se esistono delle possibili relazioni fra heparanase e FGF-2, in particolare se l'heparanase possa influenzare il "signalling" di questo fattore trofico.

L'attivazione delle principali vie di traduzione del segnale attivate da FGF-2, ERK ed AKT, sono state valutate mediante analisi di WB. L'attivazione di queste chinasi avviene attraverso la loro fosforilazione. Sono quindi stati utilizzati sia anticorpi che riconoscono le forme fosforilate che anticorpi che riconoscono totalmente queste proteine siano esse fosforilate o meno. La quantificazione delle chinasi totali serve a normalizzare i valori delle chinasi fosforilate fra diversi campioni.

I risultati dell'analisi hanno mostrato che sia AKT che ERK1-2 totali erano simili in tutti i campioni.

Nelle cellule KH2 wt il trattamento con FGF-2 attiva immediatamente la fosforilazione di AKT che raggiunge valori massimali già dopo un minuto e si mantiene a plateau oltre i 20 minuti. Diversamente nelle cellule HPSE-silenziare il trattamento con FGF-2 attiva la fosforilazione di AKT, anche in questo caso entro un minuto, ma il segnale poi declina rapidamente e a 20 minuti AKT è defosforilata a livelli pari a prima del trattamento.

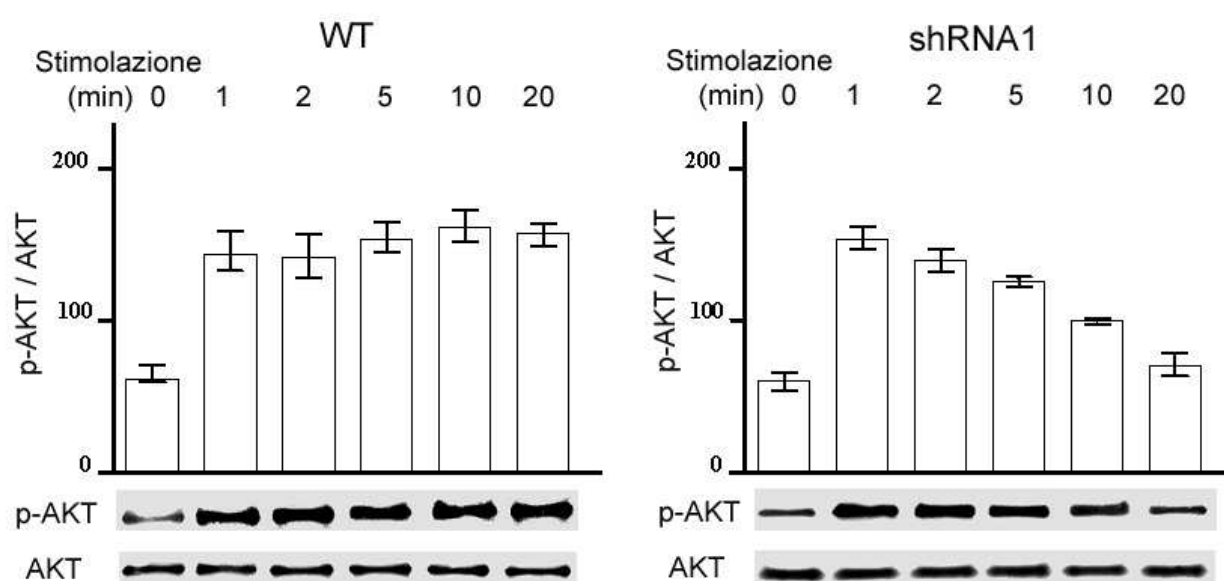


Fig.71: Analisi della fosforilazione di AKT dopo stimolazione con FGF-2 in cellule HK2 wt eHPSE-silenziare, mediante WB. p-AKT e AKT totale sono state valutate a 0, 1, 2, 5, 10 e 20 minuti di stimolazione con 10ng/ml di FGF-2. In alto sono riportati i grafici che rappresentano la quantificazione della p-AKT normalizzata all'AKT totale e le barre rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard di due esperimenti condotti in duplicato. In basso sono riportate le bande di p-AKT e AKT di un esperimento significativo.

Il trattamento con AGE e BSA produce la fosforilazione di AKT, che si mantiene anche dopo 24 ore.

Il trattamento con FGF-2 su cellule HK2 wt, preincubate con BSA o AGE, e quindi con AKT già fosforilata, non induce alcun effetto ed AKT continua a rimanere attiva.

Il trattamento con FGF-2 su cellule HPSE-silenziate, preincubate con BSA o AGE, quindi con AKT già fosforilata, provoca dopo alcuni minuti la defosforilazione di AKT e dopo 20 minuti la chinasi risulta defosforilata a livelli basali(Fig.72).

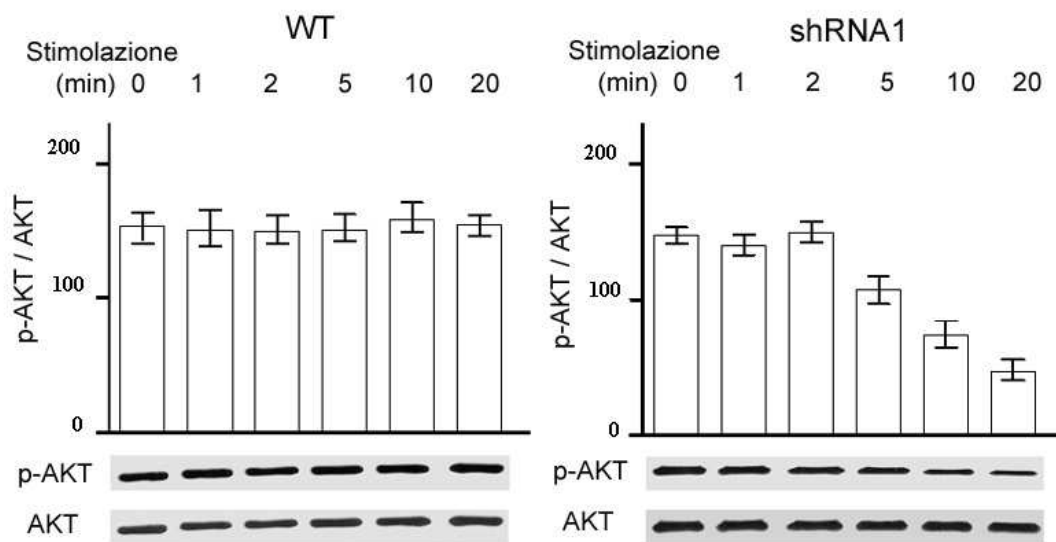


Fig.72: Analisi della fosforilazione di AKT dopo stimolazione con FGF-2 in cellule HK2 wt ed HPSE-silenziate preincubate 24 h con 60µg/ml AGE, mediante WB. p-AKT e AKT totale sono state valutate a 0, 1, 2, 5, 10 e 20 minuti di stimolazione con 10ng/ml di FGF-2. In alto sono riportati i grafici che rappresentano la quantificazione della p-AKT normalizzata all'AKT totale e le barre rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard di due esperimenti condotti in duplicato. In basso sono riportate le bande di p-AKT e AKT di un esperimento significativo. (Lo stesso esperimento con la pre-incubazione con BSA anziché AGE ha prodotto risultati pressoché uguali; dato non mostrato graficamente).

Sia nelle cellule HK2 wt che in quelle silenziate le ERK risultano costitutivamente attivate e il trattamento con FGF-2 non ne induce modificazioni (Fig.73).

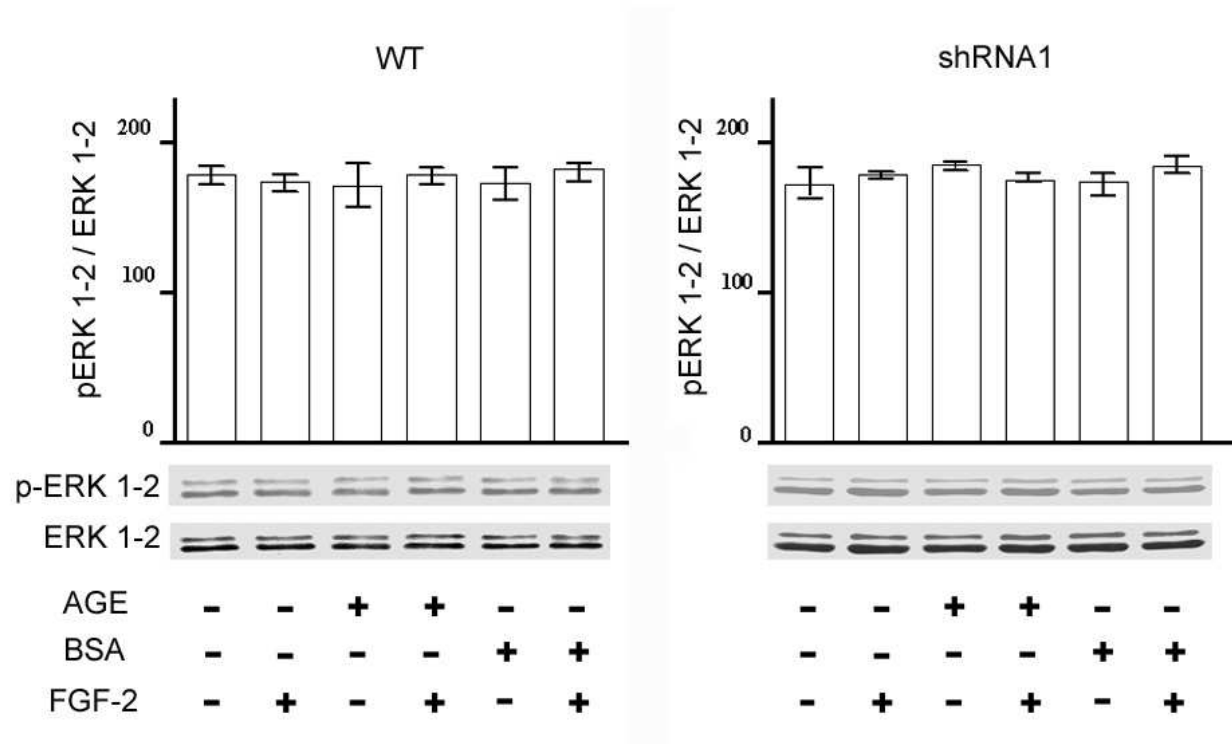


Fig.73: Analisi della fosforilazione di ERK 1-2 dopo stimolazione con FGF-2 in cellule HK2 wt eHPSE-silenziate, in condizioni basali o preincubate 24 h con 60µg/ml AGE o age, mediante WB. p-AKT e AKT totale sono state valutate dopo 10 minuti di stimolazione con 10ng/ml di FGF-2. In alto sono riportati i grafici che rappresentano la quantificazione della p-ERK 1-2 normalizzata alla quantità totale di ERK 1-2; le barre rappresentano la media $\pm$ la deviazione standard di due esperimenti condotti in duplicato. In basso sono riportate le bande di p-ERK 1-2 e di ERK 1-2 di un esperimento significativo. (Lo stesso esperimento con la preincubazione con BSA anziché AGE ha prodotto risultati pressoché uguali; dato non mostrato graficamente).

13. Quantificazione dell'attività inibitoria di diversi glicosaminoglicani sull'heparanase.

Il Sulodexide è un farmaco formato da GAG e viene comunemente usato per la riduzione della proteinuria. Dato che il suo effetto sembra essere dovuto alla capacità di inibire l'heparanase, è stata la capacità del Sulodexide e dei suoi componenti di inibire l'attività enzimatica dell'heparanase. In particolare, è stato verificato se la proprietà di inibire l'heparanase sia da attribuire alla componente eparinica o al dermatan solfato (DS) che costituiscono il farmaco ed è stato verificato se le due componenti potessero agire in maniera additiva, sinergica o altro. Sono stati testati i seguenti GAG tutti forniti dalla ditta Alfa Wassermann:

- 1) Sulodexide (Alfa Wassermann)
- 2) Parnaparina (Alfa Wassermann)
- 3) DS (Sigma)
- 4) FMH (Opocrin)
- 5) DS (Opocrin)

Per ciascuno di essi sono state testate 4 concentrazioni (5, 10, 15, 20 µg/ml) e diverse miscele in rapporto 0/100, 20/80, 50/50, 80/20, 100/0 costituite da

- a) Parnaparina (Alfa Wassermann) : DS Sigma
- b) FMH (Opocrin) : DS Opocrin

Esperimenti preliminari hanno dimostrato che l'enzima usato alla concentrazione di 0.5ng / ml è sufficiente ad ottenere la completa degradazione dell'HS contenuto nel Matrigel. Dai test a varie concentrazioni di GAGs si riscontra che alla concentrazione più bassa testata (5 µg/ml) la Parnaparina Alfawassermann è sufficiente ad inibire completamente l'attività dell'heparanase mentre il Sulodexide e la Fast Moving Heparin a questa concentrazione riducono al 30% l'attività dell'heparanase ma riescono ad inibirla quasi completamente alla concentrazione di 10µg/ml. Per quanto riguarda il Dermatan Solfato sia Sigma che Opocrin si vede che a qualunque diluizione (5, 10, 20, 50 µg/ml) non riescono a ridurre l'attività dell'enzima oltre al 10% (Fig.74).

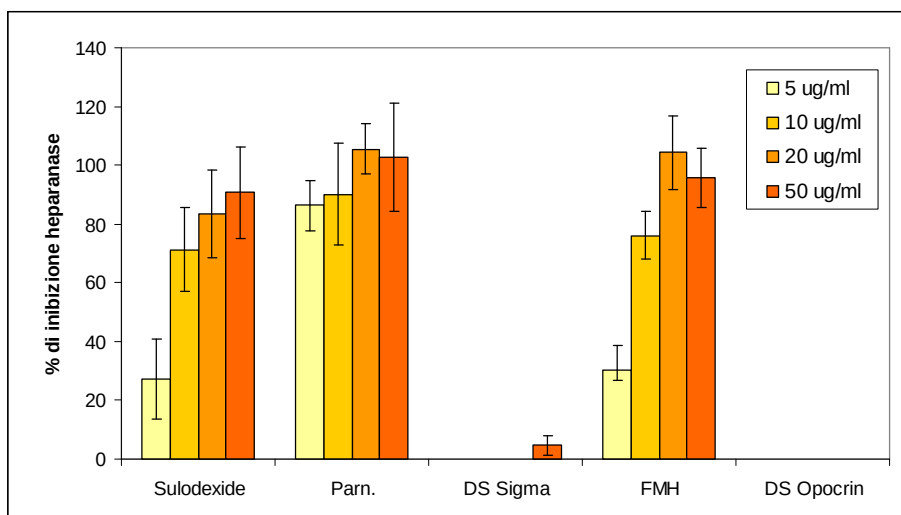


Fig.74: Istogramma che rappresenta la percentuale di inibizione dell'attività dell'heparanase da parte dei vari GAG testati a diverse concentrazioni. Ogni barra rappresenta la media di due esperimenti condotti in triplicato $\pm$ la deviazione standard.

È stata poi testato l'efficacia come inibitore dell'heparanase delle due miscele di GAG ognuna costituita da un'eparina e da un DS. Le miscele sono state testate nei diversi rapporti e a varie concentrazioni. Si può osservare che l'attività di inibizione dell'enzima heparanase sembra essere dovuta solamente alla componente eparinica e non al DS ed inoltre non si nota un effetto sinergico nelle due coppie di GAGs. Anzi, come si può osservare dai grafici sottostanti, 5 μ g di Parnaparina da sola (asterisco giallo) sono più efficaci nell'inibire l'heparanase che non quando la stessa quantità è in miscela con il DS (asterischi rosso e verde). Inoltre anche 10 μ g di Parnaparina da sola (asterisco nero) sono più efficace della stessa quantità in miscela con DS (Fig.75).

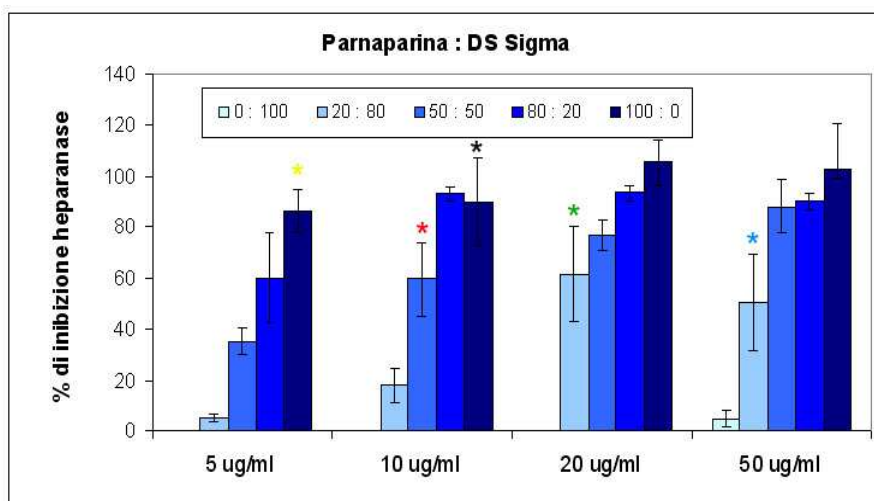


Fig.75: Istogramma che rappresenta la percentuale di inibizione dell'attività dell'heparanase da parte della miscela Parnaparina : DS Sigma in vari rapporti e a diverse concentrazioni. Ogni barra rappresenta la media di due esperimenti condotti in triplicato $\pm$ la deviazione standard

Lo stesso andamento è stato osservato per la miscela FMH con DS Opocrin: infatti 5 μ g di FMH da soli (asterisco rosso) sono più efficaci nell'inibire l'heparanase che non quando la stessa quantità è in miscela con DS (asterisco viola)(Fig.76).

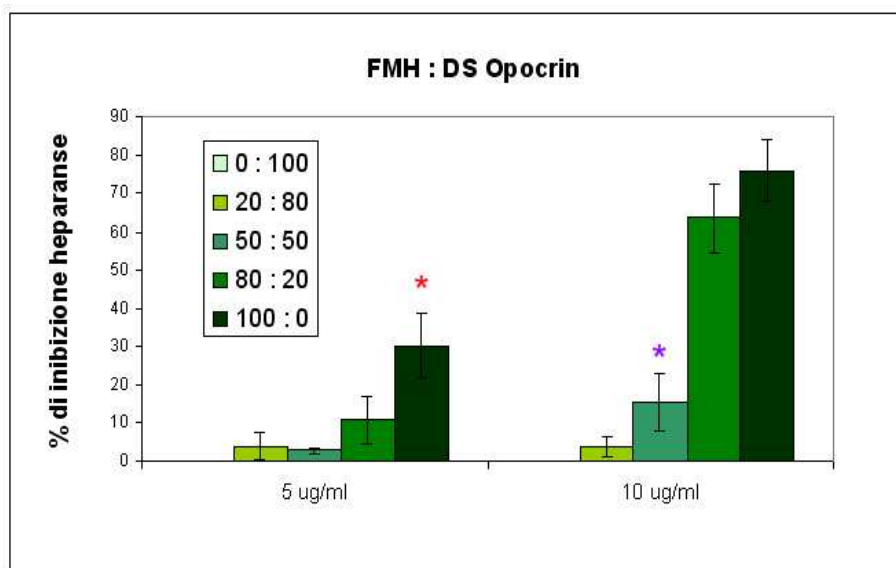


Fig.76: Istogramma che rappresenta la percentuale di inibizione dell'attività dell'heparanase da parte della miscela FMH: DS Opocrin in vari rapporti e a diverse concentrazioni. Ogni barra rappresenta la media di due esperimenti condotti in triplicato $\pm$ la deviazione standard

14. Attività dell'heparanasenei plasmi di pazienti nefropatici

Dato che l'heparanase risulta coinvolta in diverse tipologie di nefropatie, si è deciso di valutare se la sua attività plasmatica possa essere un possibile marcatore di qualche nefropatia. Sono stati analizzati tre gruppi di soggetti: un gruppo di soggetti sani come controllo, un gruppo di soggetti con rigetto di trapianto e un gruppo di soggetti con varie nefropatie.

Per quanto concerne l'attività dell'heparanase nel plasma, ad una prima osservazione, è stato riscontrato che i componenti del gruppo di controllo (n=12), sia maschi che femmine, mostrano un'attività di degradazione dell'HS molto modesta, quasi nulla mentre diversi campioni dei plasmi dei soggetti nefropatici mostrano un netto aumento dell'heparanase. In particolare i soggetti con rigetto di trapianto (n = 26) presentano in media valori dell'attività dell'heparanase quattro volte superiori rispetto ai soggetti di controllo. Anche il gruppo di soggetti con varie nefropatie (n = 89) mostra un incremento medio dell'attività plasmatica dell'heparanase rispetto ai controlli ma in maniera non significativa (Fig.77).

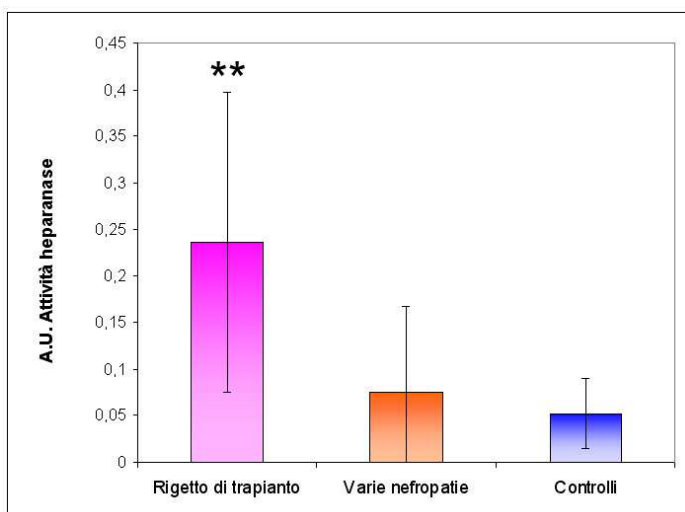


Fig.77: Gli istogrammi rappresentano unità arbitrarie di attività plasmatica dell'heparanase. I valori sono stati calcolati come differenza di O.D. a 405nm del campione con e senza eparina alla concentrazione di 50 g/ml. Ogni barra rappresenta la media di due esperimenti condotti in triplicato $\pm$ la deviazione standard (* $p < 0.001$ vs controlli).

Il gruppo di soggetti che presentavano varie nefropatie è un gruppo molto eterogeneo e comprende:

	n°	maschi	femmine	età media $\pm$ dev.st.
Controlli	12	6	6	36 $\pm$ 13,8
Nefropatia diabetica	4	4	0	63 $\pm$ 13,0
Malattia del rene policistico (PKD)	7	2	5	39,1 $\pm$ 16,0
Glomerulo Nefrite Membranosa	11	8	3	48,1 $\pm$ 9,5
Nefropatia da IgA	22	17	5	37,5 $\pm$ 12,5
Glomerulo Nefrite Proliferativa mesangiale	2	2	0	48,9 $\pm$ 1,2
Glomerulo Sclerosi Focale Segmentale (GSFS)	5	3	2	34,7 $\pm$ 9,4
GNMP tipo II	2	2	0	34,6 $\pm$ 25
Gn Lesioni minima	4	2	2	51,7 $\pm$ 22,6
Crioglobulinemia	2	1	1	58,4 $\pm$ 6,8
Lupus eritematoso sistemico (LES)	4	2	2	31,2 $\pm$ 8,5
Nefrite interstiziale	2	2	0	52,9 $\pm$ 5,3
Vasculite ANCA associata	3	2	1	44,8 $\pm$ 20,1
GN Proliferativa	2	1	1	45,5 $\pm$ 27,9
Ipertensione arteriosa	3	2	1	50,6 $\pm$ 13,8
Insufficienza renale	5	4	1	67,1 $\pm$ 11,5
Nefroangiosclerosi	2	2	0	52,0 $\pm$ 12,8
Malattia di Fabry	1	0	1	55,4
Fibrillare	1	1	0	25,5
Microangiopatia trombotica	1	1	0	32,3
Osteomalacia	1	0	1	36,2
Uremia	1	1	0	24,4
Ipokaliemia in normofunzione renale	1	0	1	59,9
Ab anti fosfolipidi	1	1	0	23,3
Ipoplasia e sclerosi controlat.	1	1	0	52
ESKD	1	0	1	13,6

Tabella 7: Composizione del gruppo di soggetti analizzati che presentavano varie nefropatie. Per ogni tipo di patologia è riportata la numerosità e l'età media $\pm$ la deviazione standard.

Confrontando le patologie con una numerosità campionaria superiore a 4 si può osservare che anche i gruppi di soggetti con ND ed insufficienza renale cronica o acuta hanno dei livelli di attività plasmatica dell'heparanase significativamente superiori ai soggetti di controllo.

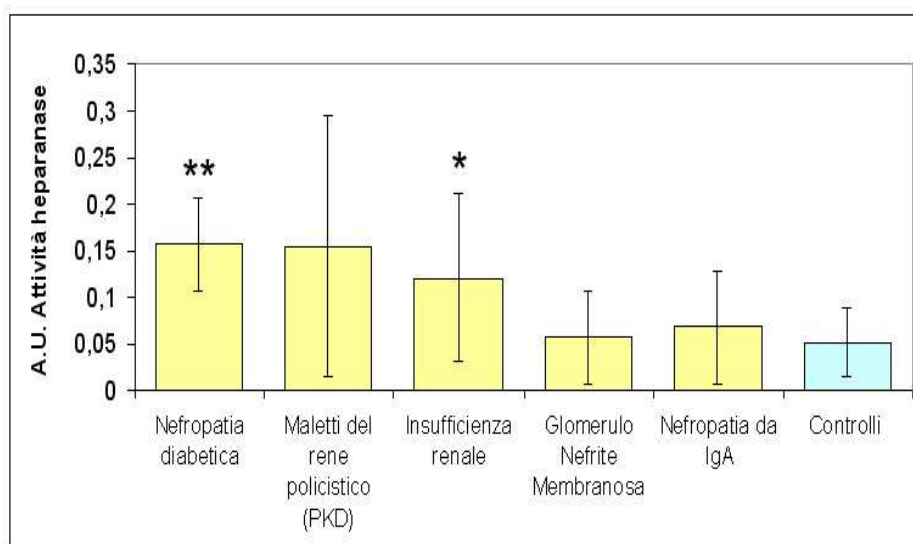


Fig.78: Gli istogrammi rappresentano unità arbitrarie di attività plasmatica dell'heparanase. I valori sono stati calcolati come differenza di O.D. a 405nm del campione con e senza eparina alla concentrazione di 50µg/ml Ogni barra rappresenta la media di due esperimenti condotti in triplicato $\pm$ la deviazione standard (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs controlli).

DISCUSSIONE

L'heparanase sta assumendo di giorno in giorno un ruolo sempre più importante a livello glomerulare, in particolare nei meccanismi patogenetici che portano allo sviluppo di varie nefropatie proteinuriche. Vari studi sostengono che i proteoglicani dell'HS della MBG siano ridotti nel corso della ND e che la quantità di HS sia inversamente correlata con l'espressione glomerulare dell'heparanase.

Per quanto riguarda il tubulo prossimale, ad oggi sono disponibili solo pochi dati riguardanti l'espressione, la regolazione ed il ruolo dell'heparanase nelle PTEC sia in condizioni fisiologiche che patologiche come nel diabete. La biologia e l'omeostasi delle cellule tubulari sta acquisendo un'importanza sempre maggiore tanto che alcuni autori suppongono che il meccanismo patogenetico della fibrosi interstiziale, tipica della ND, abbia inizio nel comparto tubulare piuttosto che essere una conseguenza delle alterazioni glomerulari. (Christensen, Verroust 2008).

Nello studio oggetto di questa tesi, è stato dimostrato come l'heparanase sia un mediatore cardine dell'omeostasi delle PTEC in condizioni diabetiche e possa intervenire nella patogenesi della ND.

Inizialmente si è osservato che l'heparanase è: 1) costitutivamente espressa nelle PTEC sia a livello di RNA messaggero che di proteina, 2) che queste cellule secernono l'enzima in forma attiva nell'ambiente extracellulare. Questi dati dimostrerebbero che l'heparanase è un enzima che svolge un ruolo fisiologico sia nell'omeostasi delle cellule tubulari stesse che dell'ECM e della membrana basale tubulare.

Alcuni dei fattori che portano al danno tubulare, notoriamente coinvolti nella patogenesi della ND sono l'eccesso di glucosio, l'albuminuria ed i prodotti di avanzata glicazione (AGE). È stato quindi dimostrato che l'heparanase risulta essere sovra-espressa in risposta ad alcuni di questi stimoli e che a sua volta essa interagisce ed influenza altre molecole.

Complessivamente si è osservato che questi "fattori diabetici" non alterano in maniera significativa il fenotipo delle PTEC. In particolare l'osservazione al microscopio ottico ha mostrato che le cellule mantengono la loro morfologia, la loro capacità di adesione sia alle plastiche sia ad altre cellule. La microscopia a fluorescenza dei filamenti actinici ha mostrato che i vari trattamenti non alterano la struttura, la polimerizzazione o la disposizione dei microfilamenti. Rimangono chiaramente riconoscibili le "stress-fibres" che garantiscono la contrattilità e l'actina giunzionale essenziale per i corretti contatti cellula-cellula e cellula-ECM. Anche l'analisi di vitalità cellulare ha evidenziato che questi fattori non influenzano la proliferazione delle cellule epiteliali del tubulo prossimale.

Diversamente da quanto descritto da Maxhimer B. et al. in cellule epiteliali glomerulari e tubulari embrionali, nel nostro modello di cellule epiteliali tubulari adulte nè l'alto glucosio, e nemmeno un ambiente iper-osmotico (alte concentrazioni di mannitolo), sono in grado di influenzare l'espressione dell'heparanase. Ciò significa che nonostante i podociti e le PTEC siano entrambe cellule epiteliali ed entrambe esprimano recettori per il glucosio, questi tipi cellulari mostrano una diversa responsività e presentano differenti meccanismi di regolazione genica dell'heparanase. Le condizioni iperglicemiche inoltre non provocano nessuna riduzione di HS sulle PTEC suggerendo che un ambiente ad alta concentrazione di glucosio non è di per se fonte di alterazioni della biosintesi dell'HS, nè del grado di solfatazione e nemmeno dell'espressione degli HSPG. Questo lo si può affermare basandosi sul fatto che negli esperimenti sono stati utilizzati due specifici anticorpi:

uno che riconosce un epitopo dell'HS strettamente correlato con la glucosamina O-solfatata ed N-acetilata ed un altro anticorpo monoclonale che riconosce in maniera selettiva il core proteico del sindecano-1.

Al contrario, l'esposizione delle PTEC all'albumina e ad AGE, due condizioni che rispecchiano l'ambiente che si instaura nella ND, inducono un incremento dose-risposta dell'espressione dell'heparanase nelle cellule HK2. L'effetto degli AGE è risultato più intenso rispetto a quello della albumina ma entrambi sono statisticamente significativi rispetto alle cellule non trattate.

Per la prima volta, è stato osservato che l'heparanase è un bersaglio di due mediatori paradigmatici della ND: l'albuminuria e i prodotti di avanzata glicazione. Basandosi su queste evidenze è stato indagato quali siano i meccanismi responsabili di questi eventi e quali possano essere i successivi effetti e conseguenze.

Come descritto da vari autori l'albumina e gli AGE, sia attraverso l'assorbimento mediato da megalina che tramite l'interazione con RAGE, attivano una molteplicità di vie di trasduzione del segnale intracellulare (ref). In questo lavoro ne sono state esaminate alcune, come NF-kB, PI3 Kinase, p38 MAPK, Jak and MEK1-2 per testare attraverso quali di esse BSA e AGE inducano l'aumento di espressione dell'heparanase. Da queste analisi è emerso che tra queste vie di trasduzione del segnale solamente una, la via della PI3K, media l'aumento di espressione dell'heparanase visto che il suo specifico inibitore (LY294002) è capace di riportare a livelli basali la sovra-espressione dell'heparanase. Il fatto che AGE attivi la via della PI3K e dei suoi più comuni effettori a valle (AKT ed ERK) era già stato osservato da Xu et al in cellule mesangiali (Xu, Kyriakis 2003). Il modello cellulare tubulare che è stato utilizzato in questo studio è solo parzialmente sovrapponibile con il loro in quanto si è osservato che BSA ed AGE attivano solamente AKT e non le ERK dato che queste ultime sono costitutivamente attivate. Si può inoltre affermare che la sovra-espressione dell'heparanase indotta da BSA e AGE non dipende dalla via PI3K/ERK poichè, gli inibitori di MEK1-2 (PD98059 e U0126) che sono le chinasi che direttamente attivano le ERK, non sono risultati idonei per riportare a livelli basali la sovra-espressione dell'heparanase.

Le azioni di PI3K/AKT e dei loro seguenti effettori sono numerose ed essenziali al controllo del metabolismo, della sintesi proteica, della regolazione del ciclo cellulare e dei fattori di trascrizione: i risultati ottenuti in queste analisi permettono di affermare che PI3K/AKT sia la via di segnalazione intracellulare di elezione degli stimoli di proteinuria e degli AGE che porta all'aumento di heparanase nelle PTEC nella ND.

È stato inoltre osservato che BSA e principalmente AGE provocano una significativa riduzione di HS sulle PTEC. Questo rispecchia quanto precedentemente riportato da Van den Hoven et al. i quali riferirono un significativo aumento di heparanase e una riduzione di HS nei tubuli di pazienti con ND e quindi suggerendo una possibile regolazione negativa dei livelli di HS da parte dell'heparanase.

Al fine di valutare gli effetti derivanti dalla sovra-espressione dell'heparanase e discriminarli da quelli causati direttamente dall'albumina e dall'AGE è stata generata una linea di cellule HK2 con il gene dell'heparanase stabilmente silenziato. Questa linea cellulare silenziata mostra una significativa riduzione dell'heparanase sia a livello di RNA messaggero, che di quantità proteica e presenta un'attività dell'enzima rilasciato nell'ambiente extracellulare significativamente ridotta. A livello fenotipico le cellule tubulari heparanase-silenziata non differiscono dalle parentali wt ne

all'osservazione al microscopio ottico, né in base alla distribuzione dei filamenti actinici né in termini di proliferazione cellulare sia in condizioni normali che dopo stimolazione con glucosio, BSA o AGE. Il tipo di silenziamento che è stato utilizzato ha permesso di ottenere questa linea in cui BSA e AGE non sono capaci di produrre una sovra-espressione dell'heparanase. Questo perché, anche se BSA e AGE inducono un aumento di trascrizione del gene HPSE il relativo mRNA generato viene rapidamente degradato dal meccanismo degli shRNA, con cui queste cellule sono state silenziate.

È possibile quindi affermare che, anche nelle cellule tubulari, come già dimostrato per le glomerulari, i livelli di HS dipendono dalla regolazione dell'heparanase e non da altri meccanismi, in quanto nei tubulociti heparanase-silenziati l'HS risulta significativamente aumentato ed i trattamenti con albumina e AGE non portano ad alcuna alterazione dello stesso..

Per verificare se la correlazione inversa fra livelli di HS ed espressione dell'heparanase sia mediata solamente dall'attività endoglicosidica dell'enzima o dipenda anche dalla regolazione del core proteico degli HSPG, è stata quantificata l'espressione del sindecano-1 ossia il più abbondante HSPG nelle PTEC. L'esposizione delle PTEC all'albumina e agli AGE comporta sia una riduzione del core proteico del PG che una riduzione della sua espressione genica. Questo effetto si riscontra solamente nelle cellule HK2 wt mentre nelle cellule tubulari heparanase-silenziate questi mediatori di ND non causano modificazioni dell'espressione del sindecano-1. È stato inoltre riscontrato che nelle cellule silenziate i livelli basali di sindecano-1 sono significativamente incrementati sia a livello di trascrizione genica che come quantità di proteina risultante rispetto alle cellule HK2 wt.

Per la prima volta si è potuta osservare una nuova ed inaspettata azione dell'heparanase nelle cellule del tubulo prossimale: essa infatti regola in maniera inversamente proporzionale l'espressione del sindecano-1.

Altri autori hanno precedentemente riportato delle relazioni fra heparanase e sindecano-1: 1) Zong V. et al. hanno osservato in cellule di mieloma che heparanase e sindecano-1 colocalizzano nel nucleo (Zong et al. 2009), 2) Yang Y. et al. hanno riportato una diretta correlazione fra heparanase e shedding del sindecano-1 (Yang et al. 2007) e 3) Mahtouk K. et al., anch'essi su cellule di mieloma, hanno riportato che il silenziamento dell'heparanase correla con una ridotta espressione genica del sindecano-1 (Mahtouk et al. 2007). Le discrepanze, fra le loro osservazioni e ciò che si è riscontrato nelle PTEC, circa la regolazione del sindecano-1 da parte dell'heparanase, possono essere spiegate dal fatto che si tratta di modelli cellulari molto diversi: il loro un modello tumorale di origine mesenchimale e il nostro un modello di cellule epiteliali non tumorali.

Si è inoltre evidenziato che l'heparanase è coinvolta nella regolazione delle vie del segnale dell'FGF-2 nelle PTEC. Partendo dall'osservazione che nelle PTEC l'heparanase regola sia l'HS che il sindecano-1 e dato che in letteratura è noto che gli HSPG sono essenziali per il legame dell'FGF-2 ai recettori si è voluto verificare se esistesse qualche relazione fra espressione dell'heparanase ed il signalling dell'FGF-2. Le tipiche vie di trasduzione del segnale dell'FGF-2 coinvolgono le MAPK (conosciute anche come ERK) ed AKT (conosciuta anche come PKB). Nelle cellule tubulari le ERK sono risultate costitutivamente attivate sia nelle cellule wt che in quelle heparanase-silenziate. Le ERK sono chinasi considerate le principali responsabili della crescita cellulare che regolano diversi processi metabolici e che si riscontrano fosforilate in cellule con attivo metabolismo quali possono essere le PTEC. La stimolazione con FGF-2 porta all'attivazione di AKT che nei tubulociti wt si mantiene nel tempo. Le azioni di AKT nella cellula sono numerose

e diverse ma tutte risultano avere un effetto pro-proliferativo. Questi ruoli fisiologici di AKT comprendono la regolazione del metabolismo, della sintesi proteica, della regolazione del ciclo cellulare e di vari fattori di trascrizione. Nelle cellule heparanase silenziate invece la stimolazione con FGF-2 induce un'attivazione transitoria di AKT. Ad un fenomeno simile si assiste se si stimolano con FGF-2 cellule pre-incubate con BSA e AGE. Questi fattori sostengono l'attivazione dell'AKT anche dopo 24 ore sia nelle cellule wt che in quelle heparanase-silenziante. Ciò suggerisce che questi mediatori regolano l'attivazione di AKT in maniera totalmente indipendente da heparanase, HS o HSPG. Il trattamento con FGF-2 in cellule wt preincubate con albumina o AGE non induce alcun effetto e come ipotizzabile AKT continua a rimanere attivata. Nelle cellule heparanase silenziate invece, la preincubazione con albumina o AGE attiva AKT ed il successivo trattamento con FGF-2 ne provoca la completa defosforilazione in tempi brevi. Questa diversa risposta, al trattamento con FGF-2, fra cellule wt ed heparanase-silenziante, dovrà essere oggetto di ulteriori approfondimenti, ma suggerisce che le vie di segnalazione dell'FGF-2 e di conseguenza anche gli effetti che ne derivano sono influenzati o dall'heparanase stessa o da qualcuna delle molecole che essa regola. Abbiamo formulato alcune ipotesi per spiegare questi effetti, ma devono ancora essere verificate. Una ipotesi è che la maggior presenza di sindecano-1 sulla superficie delle cellule heparanase-silenziante possa influenzare il legame dell'FGF-2 al suo recettore; in alcune situazioni infatti il sindecano-1 è stato proposto come regolatore negativo della stimolazione dell'FGF-2 (review). Una seconda ipotesi potrebbe essere che la diversa interazione dell'FGF-2 con gli HSPG, diversamente presenti sulle cellule heparanase-silenziante, comporti la stimolazione di qualche altra via del segnale (con un leggero ritardo rispetto alla via che attiva AKT) e che questa abbia come effetto la defosforilazione di AKT (Rane et al. 2010).

Dato che le MMP sono coinvolte nel rimodellamento dell'ECM nella ND e visto che recentemente è stato dimostrato che l'heparanase può regolare l'espressione e l'attività delle proteasi è stato valutato l'effetto del silenziamento dell'heparanase, dell'albumina e degli AGE sull'espressione e sull'attività delle MMP sulle PTEC. Un elemento interessante è che l'heparanase è in grado di regolare l'espressione delle diverse MMP in modi diversi per le diverse MMP e in maniera tessuto specifica (Purushothaman et al. 2008). Nelle PTEC si è osservato che esiste una co-regolazione di heparanase ed MMP. L'isoforma più espressa ed attiva nelle cellule HK2 è l'MMP9 mentre l'MMP2 mostra un'attività veramente debole e la sua espressione genica è quasi non rilevabile. Nelle cellule HPSE-silenziante la MMP9 risulta ridotta a livello di espressione genica come pure la sua attività gelatinolitica. Anche l'attività della MMP2 è significativamente ridotta nei tubulociti heparanase-silenziati. Per quanto riguarda MMP14, una metalloproteasi che non viene secreta nell'ambiente extracellulare bensì rimane a livello della membrana cellulare, la sua espressione genica è simile nelle cellule HK2 wt e in quelle silenziate. Da questi dati si evince che il silenziamento dell'heparanase in cellule tubulari influenza due forme solubili di MMP e non una ancorata alla membrana.

In questo modello cellulare albumina ed AGE producono un aumento significativo dell'attività sia dell'MMP9 che dell'MMP2 e inducono anche un significativo aumento dell'espressione genica dell'MMP9 e dell'MMP14 nelle cellule HK2 rispecchiando quanto osservato da Portik-Dobos V et al. in ratti Goto-Kakizaki (diabete di tipo II). Generalmente la ND è caratterizzata dall'accumulo di matrice come risultato di una aumentata sintesi di ECM ed una riduzione della sua degradazione. Gli autori di questo lavoro sostengono quindi che nel loro modello di diabete lieve la sovra-

espressione delle MMP potrebbe essere considerata una risposta compensatoria mirata a prevenire un'eccessiva deposizione di ECM (Portik-Dobos et al. 2006).

Per quanto riguarda gli effetti dell'albumina e AGE nelle cellule silenziate la regolazione delle MMP risulta analoga a quella osservata nelle cellule HK2 wt. In particolare BSA e AGE inducono l'aumento dell'espressione e dell'attività della MMP9, l'aumento dell'attività della MMP2 e l'aumento dell'espressione della MMP14. Complessivamente l'incremento di espressione ed attività delle MMP nelle cellule heparanase-silenziante è inferiore a quello osservato nelle cellule tubulari wt probabilmente perché le cellule silenziate presentano livelli costitutivi di MMP inferiori.

MMP9 è generalmente considerata come un enzima antifibrotico perché degrada il collagene di tipo IV ma può anche essere interpretata come un agente pro-fibrotico dato che attiva TGF- β ed endotelina-1 e la degradazione del collagene IV può favorire la transizione epitelio-mesenchima (EMT), condizione che predispone alla fibrosi renale. È stato dimostrato inoltre che anche MMP2 è necessaria e sufficiente ad indurre EMT specialmente in cellule del tubulo prossimale. In quest'altra ottica quindi, l'aumento di espressione e di attività delle MMP, in seguito a stimolazione con albumina e AGE, potrebbe favorire l'instaurarsi di una situazione pro-fibrotica (Ronco, Chatziantoniou 2008). L'albumina ed gli AGE inducono una serie di fenomeni rilevanti nelle trasformazioni fenotipiche delle PTEC, e questi hanno un ruolo chiave nella progressione delle nefropatie croniche inclusa la ND. In questo contesto l'heparanase è emersa essere un mediatore cardine di questi eventi con la capacità di modificare la regolazione di altre molecole e quindi di alterare le risposte biologiche a stimoli come i fattori trofici.

L'inibizione dell'heparanase potrebbe quindi essere una strategia vincente nel controllo della progressione della nefropatia diabetica.

A riguardo, si è dimostrato che il Sulodexide, un farmaco comunemente usato nel trattamento della ND e che è risultato essere efficace nel ridurre la proteinuria, è effettivamente un buon inibitore dell'heparanase con un IC_{50} di 50 μ g/ml. Il Sulodexide è un inibitore dell'heparanase in virtù della sua componente eparinica a basso peso molecolare mentre la componente di DS non è risultata un inibitore dell'heparanase ed in miscela con l'eparina non ne aumenta la capacità inibitoria. L'utilizzo di questo farmaco nel trattamento della ND può ridurre l'attività di degradazione dell'SH da parte dell'heparanase a livello della MBG, contenere il danno ai podociti dall'alta espressione di heparanase e quindi contenere la proteinuria (Chen et al. 2009) (Lewis, Xu 2008).

Infine si è considerato se l'heparanase potesse essere un indicatore generico di sofferenza renale o di qualche particolare nefropatia. Basandosi sul fatto che l'heparanase si ritrova nel circolo sanguigno e visto che è stato precedentemente dimostrato essere possibile rilevarne l'attività plasmatica, è stato intrapreso uno studio in soggetti con varie nefropatie. Sono stati raccolti i plasmi di 12 soggetti di controllo (sei maschi e sei femmine), 89 soggetti con varie nefropatie e 22 soggetti con rigetto di trapianto renale. Lo studio è ancora in corso, ma al momento è emerso che tutti i soggetti di controllo, sia maschi che femmine presentano una modesta attività plasmatica dell'heparanase. Il gruppo di soggetti nefropatici mostra un valore medio di attività plasmatica dell'heparanase superiore ai controlli. Questo valore non è statisticamente significativo perché è presente una grande variabilità fra i campioni ed il gruppo comprende nefropatie con evoluzione e caratteristiche anche molto diverse. Analizzando questo gruppo in base ai diversi tipi di nefropatie è emerso che i soggetti con ND o insufficienza renale presentano valori di attività plasmatica media significativamente superiori ai controlli. Per alcune nefropatie non è stato possibile effettuare un

analisi di significatività dei valori data l'esiguità della numerosità campionaria. D'altro canto il gruppo di soggetti con rigetto di trapianto mostra valori di attività plastica dell'heparanase significativamente superiori ai controlli e in alcuni soggetti l'attività plasmatica raggiunge valori paragonabili a quelli riscontrati in soggetti con neoplasie. Ciò suggerisce che nel rigetto di trapianto si innescano meccanismi che coinvolgono in modo sostanziale la regolazione di questo enzima. Per avere un'idea complessiva dell'utilità del valore dell'heparanase plasmatica come marcatore di qualche nefropatia specifica o della loro progressione sarà necessario ampliare questa casistica e analizzare i risultati anche in relazione ad altri parametri di funzionalità renale.

BIBLIOGRAFIA

- Alexopoulou, A.N., Multhaupt, H.A. & Couchman, J.R. 2007, "Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology", *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 39, no. 3, pp. 505-528.
- Baines, R.J. & Brunskill, N.J. 2008, "The molecular interactions between filtered proteins and proximal tubular cells in proteinuria", *Nephron.Experimental nephrology*, vol. 110, no. 2, pp. e67-71.
- Bank, N. & Aynedjian, H.S. 1990, "Progressive increases in luminal glucose stimulate proximal sodium absorption in normal and diabetic rats", *The Journal of clinical investigation*, vol. 86, no. 1, pp. 309-316.
- Bishop, J.R., Schuksz, M. & Esko, J.D. 2007, "Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology", *Nature*, vol. 446, no. 7139, pp. 1030-1037.
- Bleyer, A.J., Fumo, P., Snipes, E.R., Goldfarb, S., Simmons, D.A. & Ziyadeh, F.N. 1994, "Polyol pathway mediates high glucose-induced collagen synthesis in proximal tubule", *Kidney international*, vol. 45, no. 3, pp. 659-666.
- Bohle, A., Wehrmann, M., Bogenschutz, O., Batz, C., Muller, C.A. & Muller, G.A. 1991, "The pathogenesis of chronic renal failure in diabetic nephropathy. Investigation of 488 cases of diabetic glomerulosclerosis", *Pathology, research and practice*, vol. 187, no. 2-3, pp. 251-259.
- Bucala, R. & Cerami, A. 1992, "Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging", *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, vol. 23, pp. 1-34.
- Calcutt, N.A., Cooper, M.E., Kern, T.S. & Schmidt, A.M. 2009, "Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials", *Nature reviews.Drug discovery*, vol. 8, no. 5, pp. 417-429.
- Caruso-Neves, C., Pinheiro, A.A., Cai, H., Souza-Menezes, J. & Guggino, W.B. 2006, "PKB and megalin determine the survival or death of renal proximal tubule cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 49, pp. 18810-18815.
- Catania, J.M., Chen, G. & Parrish, A.R. 2007, "Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies", *American journal of physiology.Renal physiology*, vol. 292, no. 3, pp. F905-11.

- Ceol, M., Del Prete, D., Tosetto, E., Graziotto, R., Gambaro, G., D'Angelo, A. & Anglani, F. 2004, "GAPDH as housekeeping gene at renal level", *Kidney international*, vol. 65, no. 5, pp. 1972-3; author reply 1973-4.
- Ceol, M., Nerlich, A., Baggio, B., Anglani, F., Sauer, U., Schleicher, E. & Gambaro, G. 1996, "Increased glomerular alpha 1 (IV) collagen expression and deposition in long-term diabetic rats is prevented by chronic glycosaminoglycan treatment", *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 74, no. 2, pp. 484-495.
- Chen, S., Fang, Z., Zhu, Z., Deng, A., Liu, J. & Zhang, C. 2009, "Protective effect of sulodexide on podocyte injury in adriamycin nephropathy rats", *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban*, vol. 29, no. 6, pp. 715-719.
- Christensen, E.I. & Verroust, P.J. 2008, "Interstitial fibrosis: tubular hypothesis versus glomerular hypothesis", *Kidney international*, vol. 74, no. 10, pp. 1233-1236.
- Couchman, J.R. 2003, "Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains?", *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 4, no. 12, pp. 926-937.
- Friedman, E.A. 1999, "Advanced glycation end-products in diabetic nephropathy", *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 14 Suppl 3, pp. 1-9.
- Fux, L., Ilan, N., Sanderson, R.D. & Vlodavsky, I. 2009, "Heparanase: busy at the cell surface", *Trends in biochemical sciences*, vol. 34, no. 10, pp. 511-519.
- Gambaro, G., Kinalska, I., Oksa, A., Pont'uch, P., Hertlova, M., Olsovsky, J., Manitius, J., Fedele, D., Czekalski, S., Perusicova, J., Skrha, J., Taton, J., Grzeszczak, W. & Crepaldi, G. 2002, "Oral sulodexide reduces albuminuria in microalbuminuric and macroalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patients: the Di.N.A.S. randomized trial", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 13, no. 6, pp. 1615-1625.
- Gambaro, G., Venturini, A.P., Noonan, D.M., Fries, W., Re, G., Garbisa, S., Milanesi, C., Pesarini, A., Borsatti, A. & Marchi, E. 1994, "Treatment with a glycosaminoglycan formulation ameliorates experimental diabetic nephropathy", *Kidney international*, vol. 46, no. 3, pp. 797-806.
- Gattei, V., Godeas, C., Degan, M., Rossi, F.M., Aldinucci, D. & Pinto, A. 1999, "Characterization of anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells", *British journal of haematology*, vol. 104, no. 1, pp. 152-162.

- Gekle, M. 2005, "Renal tubule albumin transport", *Annual Review of Physiology*, vol. 67, pp. 573-594.
- Gilbert, R.E. & Cooper, M.E. 1999, "The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury?", *Kidney international*, vol. 56, no. 5, pp. 1627-1637.
- Gilbertson, D.T., Liu, J., Xue, J.L., Louis, T.A., Solid, C.A., Ebben, J.P. & Collins, A.J. 2005, "Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 16, no. 12, pp. 3736-3741.
- Gugliucci, A. & Bendayan, M. 1996, "Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells", *Diabetologia*, vol. 39, no. 2, pp. 149-160.
- Hannon, G.J. 2002, "RNA interference", *Nature*, vol. 418, no. 6894, pp. 244-251.
- Harenberg, J. 1998, "Review of pharmacodynamics, pharmacokinetics, and therapeutic properties of sulodexide", *Medicinal research reviews*, vol. 18, no. 1, pp. 1-20.
- Hryciw, D.H., Lee, E.M., Pollock, C.A. & Poronnik, P. 2004, "Molecular changes in proximal tubule function in diabetes mellitus", *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, vol. 31, no. 5-6, pp. 372-379.
- Ilan, N., Elkin, M. & Vlodavsky, I. 2006, "Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis", *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 38, no. 12, pp. 2018-2039.
- Jensen, T. 1997, "Pathogenesis of diabetic vascular disease: evidence for the role of reduced heparan sulfate proteoglycan", *Diabetes*, vol. 46 Suppl 2, pp. S98-100.
- Kanwar, Y.S., Wada, J., Sun, L., Xie, P., Wallner, E.I., Chen, S., Chugh, S. & Danesh, F.R. 2008, "Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression", *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, vol. 233, no. 1, pp. 4-11.
- Kato, M., Wang, H., Kainulainen, V., Fitzgerald, M.L., Ledbetter, S., Ornitz, D.M. & Bernfield, M. 1998a, "Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2", *Nature medicine*, vol. 4, no. 6, pp. 691-697.
- Kato, M., Wang, H., Kainulainen, V., Fitzgerald, M.L., Ledbetter, S., Ornitz, D.M. & Bernfield, M. 1998b, "Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2", *Nature medicine*, vol. 4, no. 6, pp. 691-697.
- Kure, S. & Yoshie, O. 1986, "A syngeneic monoclonal antibody to murine Meth-A sarcoma (HepSS-1) recognizes heparan sulfate glycosaminoglycan (HS-GAG): cell density and

transformation dependent alteration in cell surface HS-GAG defined by HepSS-1", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 137, no. 12, pp. 3900-3908.

Lauver, D.A. & Lucchesi, B.R. 2006, "Sulodexide: a renewed interest in this glycosaminoglycan", *Cardiovascular drug reviews*, vol. 24, no. 3-4, pp. 214-226.

Lewis, E.J. & Xu, X. 2008, "Abnormal glomerular permeability characteristics in diabetic nephropathy: implications for the therapeutic use of low-molecular weight heparin", *Diabetes care*, vol. 31 Suppl 2, pp. S202-7.

Mahtouk, K., Hose, D., Raynaud, P., Hundemer, M., Jourdan, M., Jourdan, E., Pantesco, V., Baudard, M., De Vos, J., Larroque, M., Moehler, T., Rossi, J.F., Reme, T., Goldschmidt, H. & Klein, B. 2007, "Heparanase influences expression and shedding of syndecan-1, and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma", *Blood*, vol. 109, no. 11, pp. 4914-4923.

Masola, V., Maran, C., Tassone, E., Zin, A., Rosolen, A. & Onisto, M. 2009, "Heparanase activity in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma: implications for tumor invasion", *BMC cancer*, vol. 9, pp. 304.

Mason, R.M. & Wahab, N.A. 2003, "Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 14, no. 5, pp. 1358-1373.

Maxhimer, J.B., Somenek, M., Rao, G., Pesce, C.E., Baldwin, D., Jr, Gattuso, P., Schwartz, M.M., Lewis, E.J., Prinz, R.A. & Xu, X. 2005, "Heparanase-1 gene expression and regulation by high glucose in renal epithelial cells: a potential role in the pathogenesis of proteinuria in diabetic patients", *Diabetes*, vol. 54, no. 7, pp. 2172-2178.

Miyata, T., Ueda, Y., Horie, K., Nangaku, M., Tanaka, S., van Ypersele de Strihou, C. & Kurokawa, K. 1998, "Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine", *Kidney international*, vol. 53, no. 2, pp. 416-422.

Murphy, G. & Nagase, H. 2008, "Progress in matrix metalloproteinase research", *Molecular aspects of medicine*, vol. 29, no. 5, pp. 290-308.

Nasser, N.J. 2008, "Heparanase involvement in physiology and disease", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 65, no. 11, pp. 1706-1715.

Neeper, M., Schmidt, A.M., Brett, J., Yan, S.D., Wang, F., Pan, Y.C., Elliston, K., Stern, D. & Shaw, A. 1992, "Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins", *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, no. 21, pp. 14998-15004.

- Oh, J.H., Ha, H., Yu, M.R. & Lee, H.B. 1998, "Sequential effects of high glucose on mesangial cell transforming growth factor-beta 1 and fibronectin synthesis", *Kidney international*, vol. 54, no. 6, pp. 1872-1878.
- Onisto, M., Slongo, M.L., Gregnanin, L., Gastaldi, T., Carli, M. & Rosolen, A. 2005, "Expression and activity of vascular endothelial growth factor and metalloproteinases in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma cell lines", *International journal of oncology*, vol. 27, no. 3, pp. 791-798.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. & Conklin, D.S. 2002, "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells", *Genes & development*, vol. 16, no. 8, pp. 948-958.
- Parish, C.R., Freeman, C. & Hulett, M.D. 2001, "Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1471, no. 3, pp. M99-108.
- Pollock, C.A. & Poronnik, P. 2007, "Albumin transport and processing by the proximal tubule: physiology and pathophysiology", *Current opinion in nephrology and hypertension*, vol. 16, no. 4, pp. 359-364.
- Portik-Dobos, V., Harris, A.K., Song, W., Hutchinson, J., Johnson, M.H., Imig, J.D., Pollock, D.M. & Ergul, A. 2006, "Endothelin antagonism prevents early EGFR transactivation but not increased matrix metalloproteinase activity in diabetes", *American journal of physiology.Regulatory, integrative and comparative physiology*, vol. 290, no. 2, pp. R435-41.
- Purushothaman, A., Chen, L., Yang, Y. & Sanderson, R.D. 2008, "Heparanase stimulation of protease expression implicates it as a master regulator of the aggressive tumor phenotype in myeloma", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 47, pp. 32628-32636.
- Rane, M.J., Song, Y., Jin, S., Barati, M.T., Wu, R., Kausar, H., Tan, Y., Wang, Y., Zhou, G., Klein, J.B., Li, X. & Cai, L. 2010, "Interplay between Akt and p38 MAPK pathways in the regulation of renal tubular cell apoptosis associated with diabetic nephropathy", *American journal of physiology.Renal physiology*, vol. 298, no. 1, pp. F49-61.
- Ronco, P. & Chatziantoniou, C. 2008, "Matrix metalloproteinases and matrix receptors in progression and reversal of kidney disease: therapeutic perspectives", *Kidney international*, vol. 74, no. 7, pp. 873-878.
- Ryan, M.J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S.M., Zager, R.A. & Torok-Storb, B. 1994, "HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney", *Kidney international*, vol. 45, no. 1, pp. 48-57.
- Schmidt, A.M., Hasu, M., Popov, D., Zhang, J.H., Chen, J., Yan, S.D., Brett, J., Cao, R., Kuwabara, K. & Costache, G. 1994, "Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central

role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 19, pp. 8807-8811.

Schmidt, A.M., Hori, O., Chen, J.X., Li, J.F., Crandall, J., Zhang, J., Cao, R., Yan, S.D., Brett, J. & Stern, D. 1995, "Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes", *The Journal of clinical investigation*, vol. 96, no. 3, pp. 1395-1403.

Simizu, S., Ishida, K. & Osada, H. 2004, "Heparanase as a molecular target of cancer chemotherapy", *Cancer science*, vol. 95, no. 7, pp. 553-558.

Szymczak, M., Kuzniar, J. & Klinger, M. 2010, "The role of heparanase in diseases of the glomeruli", *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 58, no. 1, pp. 45-56.

Tan, A.L., Forbes, J.M. & Cooper, M.E. 2007, "AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy", *Seminars in nephrology*, vol. 27, no. 2, pp. 130-143.

Tkachenko, E., Rhodes, J.M. & Simons, M. 2005, "Syndecans: new kids on the signaling block", *Circulation research*, vol. 96, no. 5, pp. 488-500.

van den Hoven, M.J., Rops, A.L., Bakker, M.A., Aten, J., Rutjes, N., Roestenberg, P., Goldschmeding, R., Zcharia, E., Vlodavsky, I., van der Vlag, J. & Berden, J.H. 2006, "Increased expression of heparanase in overt diabetic nephropathy", *Kidney international*, vol. 70, no. 12, pp. 2100-2108.

van den Hoven, M.J., Rops, A.L., Vlodavsky, I., Levidiotis, V., Berden, J.H. & van der Vlag, J. 2007, "Heparanase in glomerular diseases", *Kidney international*, vol. 72, no. 5, pp. 543-548.

Vlassara, H., Bucala, R. & Striker, L. 1994, "Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging", *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 70, no. 2, pp. 138-151.

Vlodavsky, I. & Friedmann, Y. 2001, "Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis", *The Journal of clinical investigation*, vol. 108, no. 3, pp. 341-347.

Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I., Spector, L. & Pecker, I. 1999, "Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis", *Nature medicine*, vol. 5, no. 7, pp. 793-802.

Vreys, V. & David, G. 2007, "Mammalian heparanase: what is the message?", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 11, no. 3, pp. 427-452.

- Weiss, R., Niecestro, R. & Raz, I. 2007, "The role of sulodexide in the treatment of diabetic nephropathy", *Drugs*, vol. 67, no. 18, pp. 2681-2696.
- Xu, D. & Kyriakis, J.M. 2003, "Phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent activation of renal mesangial cell Ki-Ras and ERK by advanced glycation end products", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 41, pp. 39349-39355.
- Xu, X., Quiros, R.M., Maxhimer, J.B., Jiang, P., Marcinek, R., Ain, K.B., Platt, J.L., Shen, J., Gattuso, P. & Prinz, R.A. 2003, "Inverse correlation between heparan sulfate composition and heparanase-1 gene expression in thyroid papillary carcinomas: a potential role in tumor metastasis", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 9, no. 16 Pt 1, pp. 5968-5979.
- Yan, S.D., Schmidt, A.M., Anderson, G.M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y.S., Pinsky, D. & Stern, D. 1994, "Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins", *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 13, pp. 9889-9897.
- Yang, Y., Macleod, V., Miao, H.Q., Theus, A., Zhan, F., Shaughnessy, J.D., Jr, Sawyer, J., Li, J.P., Zcharia, E., Vlodavsky, I. & Sanderson, R.D. 2007, "Heparanase enhances syndecan-1 shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis", *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 18, pp. 13326-13333.
- Zcharia, E., Jia, J., Zhang, X., Baraz, L., Lindahl, U., Peretz, T., Vlodavsky, I. & Li, J.P. 2009, "Newly generated heparanase knock-out mice unravel co-regulation of heparanase and matrix metalloproteinases", *PloS one*, vol. 4, no. 4, pp. e5181.
- Zong, F., Fthenou, E., Wolmer, N., Hollosi, P., Kovalszky, I., Szilak, L., Mogler, C., Nilsson, G., Tzanakakis, G. & Dobra, K. 2009, "Syndecan-1 and FGF-2, but not FGF receptor-1, share a common transport route and co-localize with heparanase in the nuclei of mesenchymal tumor cells", *PloS one*, vol. 4, no. 10, pp. e7346.

**L'HEPARANASE NEI RABDOMIOSARCOMI:
IMPLICAZIONI NELL'INVASIVITA' TUMORALE.**

RIASSUNTO

Introduzione: Il rabdomiosarcoma (RMS) è il più comune sarcoma dei tessuti molli dell'infanzia e comprende due principali istotipi, l'alveolare (ARMS) e l'embrionale (ERMS). Come altre neoplasie umane il RMS possiede un alto potenziale metastatico, più evidente nell'ARMS che nell'ERMS. Questa caratteristica influenza diverse molecole inclusi i fattori solubili secreti dalle cellule tumorali, come l'heparanase (HPSE). L'heparanase è una endo- β -D-glucuronidasi che degrada i proteoglicani dell'heparan solfato.

Metodi: Abbiamo valutato l'espressione dell'heparanase mediante WB in linee cellulari ARMS ed ERMS e abbiamo quantificato la sua attività nei rispettivi mezzi condizionati. Abbiamo ottenuto il silenziamento stabile dell'heparanase, mediante shRNA, nelle linee cellulari RH30 ed RD e ne abbiamo valutato la capacità invasiva. L'attività dell'heparanase e la sua espressione sono anche state quantificate nel plasma e in biopsie di pazienti con RMS.

Risultati: L'espressione e l'attività dell'heparanase è stata rilevata in tutte le linee cellulari di RMS. Il silenziamento stabile dell'heparanase ha prodotto una significativa riduzione dell'espressione genica del 76 e del 58% nelle linee cellulari RH30 ed RD rispettivamente e queste hanno mostrato un comportamento meno invasivo rispetto alle cellule parentali. Infine, abbiamo osservato che l'espressione dell'heparanase nelle biopsie è maggiore rispetto al muscolo scheletrico fetale e che i plasmi dei pazienti con RMS mostrano livelli di attività heparanasica più elevati rispetto a soggetti sani e con una tendenza a livelli più alti negli ARMS.

Conclusioni: In conclusione, i nostri dati dimostrano per la prima volta l'espressione e l'attività dell'heparanase nel RMS e sottolineano il suo coinvolgimento nell'invasività tumorale. Inoltre l'espressione dell'heparanase nei pazienti RMS è significativamente superiore rispetto ai soggetti sani. Ulteriori studi sono necessari per chiarire la relazione fra heparanase e comportamento clinico dei RMS.

