

NEFROLOGIA DI BASE

Fisiologia e biologia cellulare - Traduzione del segnale

CO

INCREASE OF A3 ADENOSINE RECEPTORS BY DEPLETED EXPRESSION OF POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE-1 GENE (PKD1) IN HUMAN RENAL CELL AND TISSUES: IMPLICATIONS FOR CAMP-DEPENDENT SIGNALLING AND PROLIFERATION OF PKD1-MUTATED CYSTIC CELLS

Aguari G¹, Bogo M¹, Varani K², Mangolini A¹, Durante C¹, Magri E³, Querzoli P³, Felicianelli G⁴, Faenza A⁵, Catizone L⁶, Borea Pier A², Del Senno L¹

¹Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara, Ferrara; ²Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale; Università di Ferrara, Ferrara; ³Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica; Università di Ferrara, Ferrara; ⁴Dipartimento di Medicina Interna, dell'invecchiamento e Malattie Nefrologiche, Policlinico Sant'Orsola Malpighi, Bologna; ⁵Dipartimento Emergenza/Urgenza, Chirurgia Generale e dei Trapianti; Policlinico Sant'Orsola Malpighi, Bologna; ⁶Reperto di Nefrologia; Ospedale Sant'Anna, Ferrara

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most frequent renal disorder affecting about 1:1000 people in the general population and accounts for up to 10% of all patients on renal replacement therapy. The disease is caused by mutations in either PKD1 or PKD2 genes: PKD1 defects account for ~85% of ADPKD cases, while the remaining 15% are associated with PKD2 alterations. PKD1 and PKD2 genes codify for polycystin-1 (PC1) and polycystin-2 (PC2), respectively. PC1 is a putative orphan receptor able to regulate ion channels including PC2, a calcium permeable cation channel. The disruption of functional PC1/PC2 complex abolishes normal cellular calcium and cAMP signalling resulting in abnormally increased cell proliferation and apoptosis. Furthermore, ADPKD cyst growth and expansion have been attributed to numerous factors, including ATP, cAMP and adenosine signalling. Although the role of ATP and especially cAMP has been widely investigated, no information is currently available on adenosine-mediated signalling in ADPKD cells. In this study, we have investigated the impact of PC1 abnormalities on the expression and functional activity of adenosine receptors (AR), members of the G-protein-coupled receptor superfamily.

Experiments were performed on normal and ADPKD renal tissues, and kidney cell lines in absence or presence of agonist and antagonists specific for A1, A2 and A3 AR types. Cells include normal tubular (4/5) and cystic (9.7 and 9.12) SW40-transformed cell lines, wild type (HEKpSuper) and PC1-depleted by PKD1 siRNA silencing HEK293 cells (HEKpSsiPKD1), and primary epithelial cell cultures derived from cysts of ADPKD kidneys. AR expression was studied by saturation binding experiments, Western blotting and immunohistochemistry. Cell proliferation was analyzed by direct cell counting and FACS analysis, while p21Waf expression and phosphorylation levels of ERK and S6 kinases were investigated by Western blotting.

(segue)

PO

SIGNALING DELL'ANGIOTENSINA II VIA RECETTORI TIPO 2 IN UN MODELLO UMANO DI IPOREATTIVITÀ VASCOLARE: IMPLICAZIONI PER L'IPERTENSIONE ARTERIOSA

Calò L¹, Schiavo S², Pagnin E², D'Angelo A¹, Pessina A²

¹ Clinica Medica 4 e Nefrologia 1, Università-Azienda Ospedaliera Padova; ² Clinica Medica 4, Università-Azienda Ospedaliera Padova

Il signaling dell'Angiotensina II (Ang II) via recettori tipo 1 (AT1R) è stato ampiamente caratterizzato mentre il signaling dell'Ang II via recettori tipo 2 (AT2R), ipotizzato mediare effetti opposti alle azioni mediate dall'attivazione di AT1R, deve ancora essere pienamente chiarito. I pazienti con sindrome di Bartter/Gitelman (BS/GS) hanno elevati livelli di Ang II ed un blocco endogeno del signaling dell'Ang II via AT1R che rende questi pazienti un buon modello per esplorare il signaling dell'Ang II via AT2R, in particolare attraverso la valutazione di mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) che è indotta dall'attivazione di AT2R ed interagisce, inibendolo, con il signaling mediato da ERK, effettore di primo piano nell'azione dell'Ang II per il rimodellamento cardiovascolare.

Su fibroblasti di BS/GS e di soggetti sani di controllo sono stati valutati (western blot) i livelli proteici dei AT1R e AT2R ed il time course dell'effetto di Ang II (250 µM) sull'espressione proteica di MKP-1 e sulla fosforilazione di ERK1/2. Il time course dell'effetto di Ang II sui livelli di MKP-1 e sulla fosforilazione di ERK1/2 sono stati valutati anche in presenza ed assenza di PD123319, un bloccante di AT2R, o di Losartan, un bloccante di AT1R, o di entrambi.

I livelli di AT1R e di AT2R non erano differenti tra BS/GS e soggetti di controllo. L'incubazione dei fibroblasti di BS/GS con Ang II induceva la fosforilazione di ERK1/2 che non differiva rispetto ai controlli ma nelle cellule di BS/GS si osservava un più rapido declino dopo il picco della fosforilazione di ERK1/2 che avveniva in concomitanza con l'incremento dei livelli di MKP-1 che invece non si osservava nelle cellule dei controlli. La preincubazione dei fibroblasti di controllo con Ang II e Losartan induceva un profilo di fosforilazione di ERK1/2 e di livelli di MKP-1 sovrapponibili a quelli osservati nei pazienti BS/GS. Nelle cellule dei BS/GS la preincubazione con Ang II e PD123319, un bloccante di AT2R, aboliva l'incremento di MKP-1 ed il time course della fosforilazione di ERK1/2 si modificava diventando sovrapponibile a quello dei soggetti di controllo. La preincubazione delle cellule di controllo con Ang II, Losartan e PD123319 non aveva effetto sulla fosforilazione di ERK1/2 e sui livelli di MKP-1 che risultavano sovrapponibili a quelli osservati nelle cellule di BS/GS preincubate con Ang II e PD123319, il bloccante di AT2R.

In conclusione, in BS/GS il time course della fosforilazione di ERK1/2 riflette i cambiamenti nei livelli MKP-1 ed il trattamento con il bloccante di AT2R, PD123319, eliminava

(segue)

Findings obtained both in ADPKD tissues and cystic cell lines showed that PC1 loss either by siRNA silencing or PKD1 mutation results in increased expression of the A3 adenosine receptor. Interestingly, the stimulation of A3 AR with the selective agonist CI-IB-MECA causes a reduction in both cytosolic cAMP and cell proliferation in HEKpSsiPKD1, 9.7 and 9.12 cystic cells, as well as in primary ADPKD cell cultures. This reduction is associated with increased expression of p21waf and reduced activation of ERK1/2 and S6 kinases. In the light of these findings, the ability of CI-IB-MECA to reduce disease progression in ADPKD should be further investigated also in a therapeutic key.

questi effetti. Nei controlli il Losartan riproduceva questi cambiamenti osservati nei BS/GS e la presenza di entrambi gli inibitori di AT1R e AT2R li aboliva. I dati di questo studio depongono fortemente per MKP-1 indotta dall'attivazione di AT2R come principale effettore nell'alterare lo stato di fosforilazione di ERK1/2. Questi risultati spiegano i ridotti effetti di Ang II sia a breve che lungo termine riportati in BS/GS, forniscono chiarimenti nei meccanismi responsabili e danno ulteriore supporto al ruolo proposto per il signaling mediato da AT2R negli effetti dei sartani al di là del blocco del recettore AT1 dell'Ang II.

NA

VARIAZIONI QUANTITATIVE DELLA CLEARANCE DELL'ACQUA LIBERA E DEGLI ELETTROLITI IN PAZIENTI AFFETTI DA NEFROLITIASI CALCICA ED IPERCALCIURIA

Fabris A¹, Gangemi C¹, Marchionna N¹, Bernich P¹, Lupo A¹, Gambaro G²
¹ Divisione Clinizzata di Nefrologia Verona; ² Divisione di Nefrologia, Università Cattolica, Roma

Introduzione. La poliuria è di frequente osservazione nei pazienti nefrolitiasici. Tuttavia, il volume urinario raggiunto è il risultato di un complesso equilibrio tra l'introito idrico e il rimaneggiamento renale dello stesso. Recentemente è stato compreso il meccanismo molecolare attraverso cui il calcio luminale influenza il riassorbimento di acqua nel dotto collettore. Il Calcio luminale, legandosi al recettore CASR, inibisce la traslocazione dell'acquaporina dal citoplasma sulla membrana luminale tubulare, fenomeno ADH dipendente, compromettendo così il riassorbimento tubulare di acqua. Tale meccanismo sembra rivestire un ruolo rilevante in condizioni patologiche estreme, quali la ipercalcemia e la Sindrome di Bartter tipo 5, ma non è noto se possa essere implicato anche in situazioni "parafisiologiche" come l'ipercalcemia idiopatica.

Scopo. Abbiamo investigato tale ipotesi nei pazienti con ipercalcemia idiopatica severa.
Metodi. Dal nostro database di 896 pz affetti da nefrolitiasi, abbiamo selezionato coloro che presentavano ipercalcemia al primo episodio di calcolosi e che, prima della nostra valutazione metabolica, non erano mai stati trattati, né avevano mai presentato sintomi clinici. In tutti sia l'ipercalcemia che la nefrolitiasi dovevano essere ad eziologia idiopatica. Sono stati selezionati 49 pz (23 donne), suddivisi in 4 gruppi secondo i valori di calcemia (Uca): gruppo M1 e F1, rispettivamente maschi e femmine, con Uca <6 mg/kg/die; M2 e F2 con Uca >6 mg/kg/die.

Risultati.

	M1	M2	F1	F2
N° pazienti	13	12	12	11
Età anni	34.2 ± 4.3	32.3 ± 5.6	35.4 ± 6.1	33.6 ± 4.9
Ca Intake mg/die	1279 ± 451		980 ± 328	
SNa mEq/l	141 ± 0.3	140 ± 0.7	140 ± 0.5	139 ± 0.4
SK mEq/l	4.35 ± 0.04	4.16 ± 0.05	3.94 ± 0.06	3.69 ± 0.07*
Uca mEq/l	5.6 ± 1.7	6.7 ± 1.4**	4.8 ± 1.6	6.4 ± 1.5**
V/min ml/min	1.22 ± 0.05	2.24 ± 0.07**	1.17 ± 0.05	2.05 ± 0.08**
CCR ml/min/1.73 m ²	128 ± 23	131 ± 18	123 ± 29	132 ± 15
UCI index	133 ± 23	153 ± 18**	105 ± 18	156 ± 24**
UOsm mOsm/kg H ₂ O	643 ± 98	458 ± 120**	586 ± 89	403 ± 53**
COsm ml/min	0.92 ± 0.01	1.59 ± 0.03**	0.84 ± 0.01	1.62 ± 0.03*
E:CH ₂ O	-1.59 ± 0.08	-1.44 ± 0.07*	-1.37 ± 0.05	-1.02 ± 0.06*
WB-EFWC /die	0.158 ± 0.04	0.539 ± 0.08**	0.115 ± 0.06	0.626 ± 0.05**
NEAP mM/die	44 ± 13	43 ± 12	38 ± 9	37 ± 10
UNaV mM/die	187 ± 42	233 ± 56*	156 ± 44	218 ± 34*
UKV mM/die	58 ± 13	65 ± 9	45 ± 12	55 ± 11
UCItrate mg/die	564 ± 187	390 ± 101**	488 ± 97	354 ± 68**
UP mg/die	1129 ± 329	1325 ± 289*	676 ± 137	856 ± 199*
Uca vs WB-EFWC	r = 0.049	r = 0.418	r = 0.046	r = 0.361**

Media ± SD. *p < 0.05; **p < 0.01.

Conclusioni. Il nostro studio ha evidenziato che nei soggetti con elevati valori di Uca la diuresi è maggiore. L'incremento del volume urinario, induce un significativo decremento di E:CH₂O e di WB-EFWC, esplicando indirettamente un effetto protettivo atto a contrastare la precipitazione intratubulare di sali di calcio.

CO

SUPPRESSION OF PKHD1 IMPAIRS SURVIVAL IN CULTURED KIDNEY TUBULAR CELLS

Mangolini A, Bogo M, Aguiari G, Durante C, Borgatti M, Gambari R, Del Senno L
 Dipartimento Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara

PKHD1, the autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) gene encodes fibrocystin/polyductin (FC1), a membrane-associated receptor-like protein involved in the regulation of cell adhesion, proliferation and apoptosis. To better define the elevated susceptibility to programmed cell death in ARPKD and the function on this feature of FC1, we investigated proliferation and apoptosis in human kidney cells with downregulation of PKHD1 by siRNA interference.

To this aim we produced human kidney FC1-depleted cells lines by stable transfection with pSsiPKHD1a and pSsiPKHD1b recombinant pSuper plasmids expressing PKHD1 siRNA sequences. We established various embryonic HEK293^{pSsiPKHD1}, adult 4/5^{pSsiPKHD1} tubular epithelial cells, and relative HEK293^{pSuper} and 4/5^{pSuper} control cells. Levels of PKHD1 downregulation were assessed by RT-PCR. The activity of NF-κB, a transcription factor regulating apoptosis in many organs and tissues, was assessed by luciferase assay after transfection with pNF-κB-TA-Luc reporter plasmid, and by nuclear fluorescence after transfection with a p65 NF-κB-GFP construct. Cell proliferation was studied by direct cell counting after trypan blue staining and FACS analysis. Apoptosis was analyzed by Hoechst 33258 staining and caspase-3 activity. Expression of FC1, p53, p21^{Waf} and NF-κB p65, and phosphorylation levels of ERK kinase were studied by immunoblotting.

In both HEK293^{pSsiPKHD1} and 4/5^{pSsiPKHD1} cells a decrease in 1% FBS-induced cell proliferation, which was concomitant with an increase in cell death, apoptotic index and caspase-3 activity, was observed. These changes were accompanied by reduction in ERK1/2 kinase activation, upregulation of p53 expression and by activation of NF-κB. Interestingly, selective inactivation of NF-κB using either parthenolide, a blocker of IKK-dependent activation of NF-κB, or a NF-κB decoy, a synthetic oligonucleotide (ODN) imitating the NF-κB binding site, did not increase, rather reduced, apoptosis in FC1-depleted cells. In conclusion, our results provide evidence that apoptosis may occur in absence of hyperproliferation in FC1-depleted kidney cells. Moreover, NF-κB, a regulator of both cell survival and apoptosis in the kidney, plays a proapoptotic role during cell death in these cells.

PO

IGA CON ABERRANTE GLICOSILAZIONE INDUCONO PERDITA DI NEFRINA IN PODOCITI CON UN MECCANISMO DIPENDENTE DAL FATTORE DI ATTIVAZIONE PIASTRINICA (PAF)

Fonsato V¹, Balegno S², Loiacono E², Daprà V², Camilla R², Peruzzi L², Amore A², Bussoleti B¹, Mazzucco G³, Camussi G¹, Coppo R²

¹ Dip Medicina Interna e Centro Di Ricerca Sperimentale e Scienze Mediche, Università Torino, Torino; ² Nefrologia Dialisi Trapianto, Osp Universitario R Margherita Torino, Torino; ³ Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Torino, Torino

La reazione delle cellule mesangiali con IgA ad aberrante glicosilazione (deSia/deGal IgA) rappresenta il momento patogenetico iniziale della nefropatia a depositi IgA (IgAN), in cui la comparsa di proteinuria rappresenta il fattore di rischio più importante di progressione verso la perdita di funzione renale. Recentemente è stata proposta l'ipotesi secondo cui il fattore di necrosi tumorale (TNF-α) gioca un ruolo nel trasferimento di un messaggio dalle cellule mesangiali ai podociti con induzione di sviluppo di proteinuria. Scopo di questo studio è stato di indagare il possibile ruolo del fattore di attivazione piastrinica (PAF) nell'indurre un riarrangiamento della nefrina e dell'actina F del citoscheletro dopo attivazione delle cellule mesangiali da parte di IgA con aberrante glicosilazione. Podociti di origine umana sono stati coltivati con supernatanti di coltura di cellule mesangiali incubate con IgA ad aberrante glicosilazione ottenute da sieri di pazienti affetti da IgAN o prodotte *in vitro* per azione di specifiche glicosidasi. L'espressione della nefrina e della F-actina è stata valutata in assenza o presenza di antagonisti recettoriali del PAF. Podociti transfettati per iperesprimere PAF-acetilidrolasi, il maggiore enzima catabolico del PAF, sono stati usati in esperimenti di controllo.

Una riduzione dell'espressione di nefrina e di F-actina è stata osservata in immunofluorescenza ed in Western blot quando i podociti sono stati coltivati con il supernatante di cellule mesangiali incubate con IgA ad alterata glicosilazione. Pre-incubazione di podociti con antagonisti del recettore del PAF prevenivano la perdita e redistribuzione della nefrina. In podociti overesprimenti PAF-acetilidrolasi veniva impedita la perdita di nefrina.

Questi risultati definiscono il meccanismo attraverso il quale l'espressione di nefrina e F-actina in podociti è sotto-regolata da messaggi provenienti da cellule mesangiali attivate da IgA ad aberrante glicosilazione. Il PAF si propone come un mediatore coinvolto nelle alterazioni podocitarie che conducono alla comparsa di proteinuria nella IgAN.

PO

L'OSSIDO NITRICO SINTASI ENDOTELIALE (ENOS) È ESPRESSA NEGLI ERI-TROCITI DI SOGGETTI UREMICI E POTREBBE CONTRIBUIRE AL RILASCIO DI NO NEL VASO

Sirrolli V¹, Giardinelli A², Di Silvestre S², Di Tomo P², Amoroso L¹, Libardi F¹, Piano A¹, Cardillo A¹, Di Pietro N², Pandolfi A², Bonomini M¹, Pipino C²

¹ Clinica Nefrologica, Dipartimento di Medicina, Università "G. D'Annunzio" di Chieti-Pescara; ² Centro Scienze dell'invecchiamento (Cesi), Fondazione "G. D'Annunzio", Università "G. D'Annunzio" di Chieti-Pescara

La sintesi dell'Ossido di Azoto (ossido nitrico, ON) vascolare è stata attribuita principalmente all'azione di eNOS localizzata nell'endotelio. Ad oggi i globuli rossi (GR) sono stati considerati capaci di trasportare ON legato all'emoglobina intracellulare, ma non di sintetizzare tale gas. Sebbene l'argomento sia ancora dibattuto, recenti evidenze sperimentali indicano la presenza di una eNOS eritrocitaria funzionale. È altresì noto che la biodisponibilità di ON è ridotta in numerosi stati patologici, tra cui l'uremia cronica, dove si correla alle complicanze vascolari.

Scopo dello studio. Lo studio si è proposto di dimostrare la presenza nei GR di una eNOS funzionale e di valutare le potenziali alterazioni della stessa in GR ottenuti da soggetti uremici.

Materiali e metodi. In GR ottenuti da 12 pazienti uremici (P) e da 10 controlli sani (C) sono stati valutati: espressione del gene (Real Time PCR) e della proteina eNOS (immunofluorescenza e citofluorimetria); attività enzimatica e visualizzazione della produzione di ON su cellula viva (conversione di 3H-arginina in 3H-citrullina e microscopia confocale, DAF-2DA).

Risultati. I risultati dimostrano la presenza di una eNOS eritrocitaria funzionale, localizzata sia a livello della membrana plasmatica che del citoplasma, attivabile mediante meccanismi calcio-dipendenti (ionomicina) e fosforilazione-dipendenti (livelli di fosfo-eNOS stimolati da insulina). Tali caratteristiche risultano presenti anche nella popolazione eritrocitaria dei pazienti uremici, dove tuttavia, a fronte di un incremento basale dei livelli di proteina eNOS (totale e fosforilata), non si osserva un aumento significativo della produzione di NO.

Conclusioni. In conclusione, i nostri dati confermano la presenza di eNOS nei GR umani; lo stato uremico potrebbe alterarne le funzioni catalitiche riducendo la quota di ON che viene rilasciata dalle cellule eritrocitarie.

CO**LA PROTEOMICA URINARIA NELLA SINDROME DI GITELMAN**Vilasi A¹, Capasso G¹, Dal Piaz F², Calò L³¹ Cattedra di Nefrologia, Policlinico Nuovo, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli; ² Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Salerno;³ Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Clinica Medica; ⁴ Università degli Studi di Padova, Padova

La sindrome di Gitelman (GS) è una tubulopatia ereditaria a carattere autosomico recessivo, caratterizzata da alcalosi metabolica ipokaliemica, ipomagnesemia, iperreninemia, ipocalciuria e poliuria. Questa patologia è causata da mutazioni nel gene SLC12A3 (*solute carrier family 12*) che codifica per il cotrasportatore Na-Cl (NCC), tiazide-sensibile. Questo canale è localizzato sulla membrana apicale delle cellule principali del tubulo distale (DCT) e alterazioni nella funzione di NCC comportano un ridotto riassorbimento di Na⁺ and Cl⁻ nel tubulo distale. Il ridotto riassorbimento di Na⁺ in DCT, induce un aumento di soluti nel tubulo collettore e di conseguenza un'alterazione nei meccanismi di concentrazione e diluizione delle urine, mediati da specifiche proteine di membrana: recettori, trasportatori e canali ionici. Al fine di una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari che inducono al fenotipo caratteristico della sindrome di Gitelman, sono stati utilizzati tre diversi e complementari approcci di proteomica. Essi sono stati finalizzati alla caratterizzazione delle proteine a basso peso molecolare, normalmente filtrate dal glomerulo (frazione solubile) e alle proteine di membrana escrete nelle urine in piccole vescicole membranose, note come esosomi. Nel primo gruppo di esperimenti, la frazione proteica solubile di pazienti affetti da GS è stata confrontata con quella di soggetti normali, mediante due diverse strategie analitiche di proteomica: a) elettroforesi bidimensionale (2DE) seguita da analisi mediante spettrometria di massa MALDI-TOF; b) elettroforesi monodimensionale (1D-SDS-PAGE), seguita da analisi mediante spettrometria di massa tandem (nano-ESI-LC-MS/MS). Nel secondo gruppo di esperimenti la frazione esosomiale urinaria estratta da pazienti affetti da GS e soggetti controllo è stata analizzata mediante c) 1D-SDS-PAGE seguita da analisi nano-ESI-LC-MS/MS; d) shotgun: digestione in soluzione della miscela proteica seguita da analisi nano-ESI-LC-MS/MS. L'analisi proteomica sulla frazione solubile ha evidenziato un significativo incremento, in pazienti affetti da GS, nell'espressione alcune proteine, membri della famiglia S100, deputate al trasporto di calcio e coinvolte in attività regolatorie sia intracellulari che extracellulari: S100A7; S100A8; S100A9; S100A11. L'analisi proteomica sulla frazione esosomiale urinaria ha al contrario evidenziato una sensibile riduzione, nei pazienti affetti da sindrome di Gitelman, in ognuna delle proteine periferiche di membrana appartenenti alla famiglia Rab-GTPase: RAB1A; RAB1B; RAB3A; RAB3D; RAB 3D; RAB7A e RAB10. Questa classe di

(segue)

proteine, le GTPase, è coinvolta in numerosi meccanismi di traffico proteico e molecolare a partire dalla formazione di vescicole, al movimento delle vescicole stesse alla loro fusione alla membrana cellulare. Gli esperimenti hanno inoltre evidenziato una consistente riduzione dell'AQP2 e un'alterata espressione di altri trasportatori tra cui la calbindina, la megalina e la cubilina. In conclusione, i risultati ottenuti hanno evidenziato tangibili differenze nel pattern polipeptidico urinario, che caratterizza i pazienti affetti da sindrome di Gitelman, in grado di elucidare alcuni aspetti del fenotipo di questa tubulopatia, caratterizzata da un ridotto riassorbimento tubulare di trasportatori e canali ionici.