

Università della Calabria

**FACOLTÀ DI FARMACIA E
SCIENZE DELLA NUTRIZIONE E DELLA SALUTE**

DOTTORATO DI RICERCA IN

FARMACOLOGIA E BIOCHIMICA DELLA MORTE CELLULARE

XXIII CICLO

TESI DI DOTTORATO

**CARATTERIZZAZIONE DEL RUOLO SVOLTO DAL NERVE
GROWTH FACTOR E DAI SUOI RECETTORI NEL
DIFFERENZIAMENTO CELLULARE DEI PODOCITI UMANI**

Settore Scientifico Disciplinare: Bio/14

Dottoranda: Dott.ssa Valentina Carito

Valentina Carito

Coordinatore del Dottorato

Ch.mo Prof.

Giacinto Bagetta

Tutor

Dott.ssa

Maria Cristina Caroleo

Anno Accademico 2010 - 2011

COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Carito V, Russo A, Mancuso D, Bonofiglio R, Caroleo MC. Nerve Growth Factor (NGF) and NGF-receptor expression in human podocyte cell line. Atti del convegno “XII Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine”, Parghelia (VV), 20-22 maggio 2009

Carito V, Caroleo MC, Mancuso D, Russo A, Perrotta I, Bonofiglio R. Nerve Growth Factor (NGF) and NGF-receptors expression in immature human podocyte cell line”. Atti del Congresso XLVII ERA-EDTA Congress, Munich, Germany, (June 25-28, 2010).

Carito V, Caroleo MC, Russo A, Mancuso D, Greco R, Papalia T, Bonofiglio R. Nerve Growth Factor (NGF) and NGF-receptor expression in human podocyte cell line”. Atti del Congresso 51°congresso Nazionale -SIN- Rimini 6-9 ottobre 2010

PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI

Carito V, Pingitore A, Cione E, Perrotta I, Mancuso D , Russo A, Genchi G, Caroleo M.C. Localization of Nerve Growth Factor (NGF) receptors in the mitochondrial compartment: characterization and putative role (accettato su BBA- General Subjects, in press)

INDICE

ABSTRACT	pag. 1
1 INTRODUZIONE	
1.1 NGF e recettori	pag. 5
1.2 Podociti	pag. 18
1.3 Podocitopatie	pag. 22
2 SCOPO DELLA RICERCA	pag. 26
3 MATERIALI E METODI	
3.1 Anticorpi	pag. 27
3.2 Colture cellulari	pag. 28
3.3 RT-PCR e Real-Time PCR	pag. 29
3.4 Determinazione della concentrazione di NGF mediante saggio ELISA	pag. 30
3.5 Western Blotting	pag. 31
3.6 Immunofluorescenza	pag. 32
3.7 Indagine ultrastrutturale ed immunocitochimica	pag. 33
3.8 Immunocitochimica applicata al TEM	pag. 35
3.9 Preparazione dei mitocondri	pag. 36
3.10 Ciclo cellulare	pag. 36
3.11 Analisi mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)	pag. 37
3.12 Co-Immunoprecipitazione	pag. 38
3.13 Saggio per la valutazione dei livelli di cAMP	pag. 38

3.14 Analisi statistica pag. 39

4 RISULTATI

4.1 CARATTERIZZAZIONE NEI PODOCITI UMANI INDIFFERENZIATI E MATURI DELLA PRESENZA DEL NGF E DEI SUOI RECETTORI

- a) Analisi dell'espressione del gene e della sintesi e secrezione della proteina NGF nei podociti umani immaturi e in corso di differenziamento pag. 40
- b) Analisi dell'espressione dei geni per i recettori per il NGF e della sintesi delle proteine recettoriali mature per la neurotrofina nei podociti umani immaturi e in corso di differenziamento pag. 42
- c) Analisi della localizzazione subcellulare dei recettori per il NGF pag. 44

4.2 STUDIO DELLA LOCALIZZAZIONE MITOCONDRIALE DEI RECETTORI PER IL NGF

- a) Caratterizzazione pag. 47
- b) Valutazione del possibile ruolo funzionale svolto dai recettori
- c) per il NGF a livello mitocondriale pag. 50

4.3 STUDIO FUNZIONALE DEL SISTEMA NGF/RECETTORI PER IL NGF IN PODOCITI UMANI IMMaturi ED IN CORSO DI DIFFERENZIAMENTO MEDIANTE DEPRIVAZIONE DELLA NEUROTROFINA ENDOGENAMENTE PRODOTTA

- a) Studio del ruolo del NGF nei podociti umani immaturi pag. 53
- b) Studio del ruolo di NGF nel corso del differenziamento podocitario pag. 58
- c) Studio delle vie di trasduzione del segnale NGF-mediate coinvolte nella regolazione della sinaptopodina in podociti umani in corso di maturazione fenotipica ed esposti a trattamento cronico con anticorpi anti-NGF pag. 62

5 DISCUSSIONE pag. 66

6 BIBLIOGRAFIA pag. 71

ABSTRACT

Il Nerve Growth Factor (NGF) è una proteina solubile appartenente alla famiglia delle neurotrofine. Inizialmente scoperto e studiato per il suo ruolo chiave nello stimolare la crescita e il differenziamento neuronale, il NGF è oggi considerato un mediatore in grado di modulare l'attività biologica di svariate popolazioni cellulari non-neuronali.

Le azioni biologiche del NGF sono mediate dal legame, sulle cellule target, a specifici recettori di membrana: il recettore ad alta affinità, TrkA, dotato di attività tirosin-chinasica intrinseca e responsabile del controllo della sopravvivenza, del differenziamento e della proliferazione cellulare, e il recettore a bassa affinità, p75NTR, appartenente alla famiglia dei recettori di morte, in grado di indurre apoptosi o sopravvivenza cellulare. Diverse osservazioni sperimentali hanno documentato che il NGF e i suoi recettori sono presenti nel rene sano ed affetto da varie patologie, tuttavia è ancora poco nota l'esatta funzione che la neurotrofina riveste nel controllo dell'attività funzionale delle varie popolazioni cellulari renali. Nell'ambito della fisiopatologia renale un ruolo centrale è senz'altro svolto dai podociti, cellule dinamiche altamente specializzate, dotate di una sofisticata architettura cellulare e sub-cellulare, caratterizzate da un voluminoso corpo cellulare, lunghi processi primari e numerosi pedicelli. La funzione principale dei podociti è quella di garantire, insieme alle cellule endoteliali dei capillari glomerulari ed alla membrana glomerulare basale, la selettiva permeabilità di filtrazione della barriera glomerulare. L'integrità di tale struttura anatomica è sostenuta, oltre che dalla presenza di popolazioni cellulari specializzate, anche dall'azione trofica esercitata da diversi fattori solubili di natura proteica, che

agiscono sia in maniera autocrina che paracrina, tra i quali citochine e fattori di crescita. Poiché i podociti e le cellule nervose condividono diverse caratteristiche biologiche, l'espressione di molecole criticamente importanti per la loro funzione e il mantenimento della loro complessa struttura, nonché la stessa origine ontogenetica, il NGF potrebbe giocare un ruolo fondamentale nella maturazione, nei cambiamenti strutturali e quindi nella funzione delle cellule podocitarie, analogamente a quanto già descritto a livello neuronale.

I risultati del presente studio hanno evidenziato, per la prima volta, come i podociti umani immaturi, in corso di differenziamento e completamente differenziati, esprimono costitutivamente il messaggero per il NGF e per i suoi recettori, TrkA e p75NTR. Tale espressione genica è associata, in tutte le condizioni sperimentali, alla produzione, in forma matura, delle proteine recettoriali TrkA e p75NTR ed alla sintesi della neurotrofina in forma biologicamente attiva. L'analisi della distribuzione recettoriale a livello cellulare, condotta mediante microscopia elettronica, ha permesso di evidenziare che l'espressione sub-cellulare di entrambi i recettori varia in funzione dello stadio di maturazione podocitaria, con evidenti differenze nella localizzazione dei recettori ad alta e a bassa affinità, tra podociti proliferanti e podociti maturi. Di notevole interesse è l'evidenza, esclusivamente nella popolazione podocitaria indifferenziata, di una localizzazione di entrambi i recettori per la neurotrofina nel compartimento mitocondriale. L'analisi, mediante studi di immunoprecipitazione, dell'associazione tra i recettori TrkA e p75 e specifiche proteine mitocondriali, quali il traslocatore per il nucleotide adenina (ANT) e la fosfodiesterasi 4 isoforma A5 (PDE4A5), nonché

l'evidenza di più elevati livelli di fosfo-ERK1/2 a livello del compartimento mitocondriale dei podociti immaturi rispetto a quelli proliferanti, ha consentito di ipotizzare, per la prima volta, un possibile ruolo del NGF e dei suoi recettori nel controllo dell'omeostasi energetica e nell'induzione di specifici pathways mitocondriali coinvolti nel mantenimento dello stato proliferativo.

Gli studi volti a definire il ruolo funzionale del sistema NGF/recettori per il NGF nell'ambito della popolazione cellulare podocitaria hanno inoltre documentato come la deprivazione di NGF (mediante anticorpi anti-NGF), nei podociti immaturi, non ha alcun effetto sul ciclo cellulare, sull'espressione dei recettori per la neurotrofina e sulla loro distribuzione a livello subcellulare, mentre nei podociti in corso di differenziamento, l'esposizione agli anticorpi anti-NGF induce drammatiche alterazioni della morfologia cellulare, con perdita della corretta estensione dei pedicelli e notevole alterazione nell'organizzazione del citoscheletro. Si è anche osservata una riduzione selettiva dei livelli proteici di sinaptopodina, non associata a concomitante diminuzione dei livelli di mRNA, indicando un probabile effetto post-traduzionale della neurotrofina, probabilmente dovuto ad una riduzione dell'attività di fosforilazione della PKA che renderebbe così la sinaptopodina maggiormente esposta al clivaggio da parte della L-catepsina. E' noto che il recettore a bassa affinità per il NGF, p75NTR, è coinvolto nel controllo del pathway cAMP/PKA mediante interazione con la PDE4A. Studi di co-immunoprecipitazione del recettore per il NGF p75NTR con la PDE4A su lisati totali di podociti differenziati, di controllo o esposti al trattamento con anticorpi anti-NGF, hanno dimostrato che, nei podociti in corso di maturazione, la deprivazione di NGF

induce un aumento dell'interazione p75-PDE4A5, cui consegue una riduzione dei livelli di cAMP e dell'attività della PKA; questo determina infine una maggiore esposizione della sinaptopodina all'attacco da parte della L-catepsina. In conclusione, i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi evidenziano che il NGF ha un ruolo chiave nella fisiopatologia del podocita e, considerando l'enorme importanza che la neurotrofina sembra avere nell'ambito del corretto differenziamento podocitario e nel mantenimento della corretta morfologia cellulare, si intravedono possibili prospettive applicative del NGF quale valido strumento terapeutico nel trattamento di patologie renali croniche associate a proteinuria, dal momento che la compromissione della funzione podocitaria ne rappresenta l'evento patogenetico precoce e determinante.

1. INTRODUZIONE

1.1 NGF e recettori

Il fattore di crescita delle cellule nervose (NGF), scoperto circa 50 anni fa da Rita Levi Montalcini, è una proteina solubile appartenente alla famiglia delle neurotrofine con un'azione determinante nella maturazione e nello sviluppo del sistema nervoso centrale e periferico. Da un punto di vista strutturale è una proteina complessa di alto peso molecolare, 7S-NGF, (Bradshaw *et al.*, 1994), formata da 3 sub-unità: α , β e γ . Il complesso 7S-NGF è stato descritto unicamente nelle ghiandole salivari di topo e ratto (Bradshaw *et al.*, 1994), mentre nell'uomo la forma attiva della neurotrofina è costituita dal solo dimero formato dalle sub-unità β (β NGF; Edwards *et al.*, 1988; Fahnestock, 1991; McDonald and Chao, 1995). Il β NGF è composto da 2 catene di 118 aminoacidi; ogni β monomero contiene 3 ponti disolfuro arrangiati in una struttura ciclica, essenziale per l'attività biologica del β NGF (Jongstra-Bilen *et al.*, 1989; Wiesmann and deVos, 2001). I due β monomeri sono associati in maniera parallela, attraverso la formazione di legami idrofobici e ad idrogeno tra i foglietti β centrali, in maniera tale da formare il dimero β NGF (Edwards *et al.*, 1988; Bradshaw *et al.*, 1994; McDonald and Chao, 1995) (Fig.1). Nei tessuti, il NGF viene sintetizzato come precursore (pro-NGF) nel reticolo di Golgi e, dopo scissione da parte di pro-convertasi intracellulari e di metallo proteinasi della matrice extracellulare, dà origine alla forma matura, β -NGF (Pattarawarapan and Burgess, 2003).

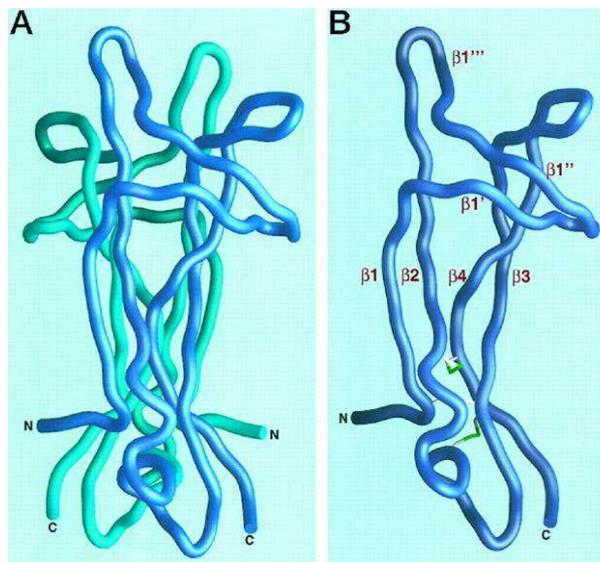


Fig.1 Rappresentazione tridimensionale della struttura del NGF. (A) Rappresentazione del dimero NGF con ogni sub-unità colorata in maniera differente. (B) Singola sub-unità di β -NGF, in cui è possibile individuare i foglietti β e i tre ponti disolfuro disegnati come bastoncini bianchi con in verde l'atomo di zolfo. (Tratta da McDonald NQ, 1995)

Il NGF media i suoi effetti di sopravvivenza e differenziamento o di morte cellulare mediante il legame, sulle cellule target, a specifici recettori di membrana: il recettore ad alta affinità, TrkA, dotato di attività tirosin-chinasica intrinseca nel suo dominio intracellulare, e il recettore a bassa affinità, p75NTR, appartenente alla famiglia dei recettori che mediano apoptosi (Levi Montalcini, 1987).

Il recettore TrkA è una glicoproteina transmembrana di peso molecolare pari a 140 kDa, codificata da un gene localizzato sul cromosoma 1 (Weier *et al.*, 1995) e appartenente alla famiglia dei recettori a tirosina chinasi (Trks), di cui si riconoscono le isoforme: A specifica per il legame con NGF, B che riconosce e lega selettivamente il BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) e C selettiva per le NT (Neurotrophins; NT-3: Neurotrophin-3, NT-4: Neurotrophin-4), La proteina TrkA è formata da un'unica elica

transmembrana e un dominio intracellulare dotato di attività tirosin-chinasica intrinseca (Wiesmann and de Vos, 2001; Fig. 2A). La sequenza extracellulare è composta da 5 distinti domini, D1-D5. D1 e D3 contengono motivi ripetitivi ricchi di cisteina, D2 contiene 3 domini ricchi di leucina mentre D4 e D5 sono domini simili alle immunoglobuline, con D5 responsabile del legame del NGF (Urfer *et al.*, 1998; Wiesmann *et al.*, 1999).

Il recettore p75NTR è una glicoproteina di 75 kDa altamente conservata, costituita da un dominio extracellulare, ricco di residui di cisteina coinvolto nel legame con le neurotrofine; una regione transmembrana, contenente il sito di clivaggio per la γ -secretasi ed un dominio intracellulare, o dominio di morte, tipico della famiglia dei recettori per il TNF, di cui p75NTR fa parte e che comprende circa 25 recettori quali TNFR1 e TNFR2, Fas, RANK e CD40 (Roux and Barker, 2002). (Fig. 2B). Il dominio extracellulare di p75 contiene 4 domini ricchi di cisteina chiamati CRD-1/-4, carichi negativamente e responsabili del legame delle neurotrofine al recettore p75NTR. Sono stati evidenziati due particolari siti di legame del NGF al recettore p75: il sito I formato dalla giunzione CRD1-CRD2 e CRD2 e il sito II composto dalla giunzione CRD3-CRD4. Il recettore p75 ha un unico dominio transmembrana, seguito da un dominio intracellulare presentante due particolari domini che aiutano il reclutamento delle proteine adattatrici: il dominio juxtamembrana o Chopper e il dominio di morte, che è caratteristico di tutti i recettori appartenenti alla famiglia dei recettori che mediano morte cellulare (Freund and Frossard, 2008).

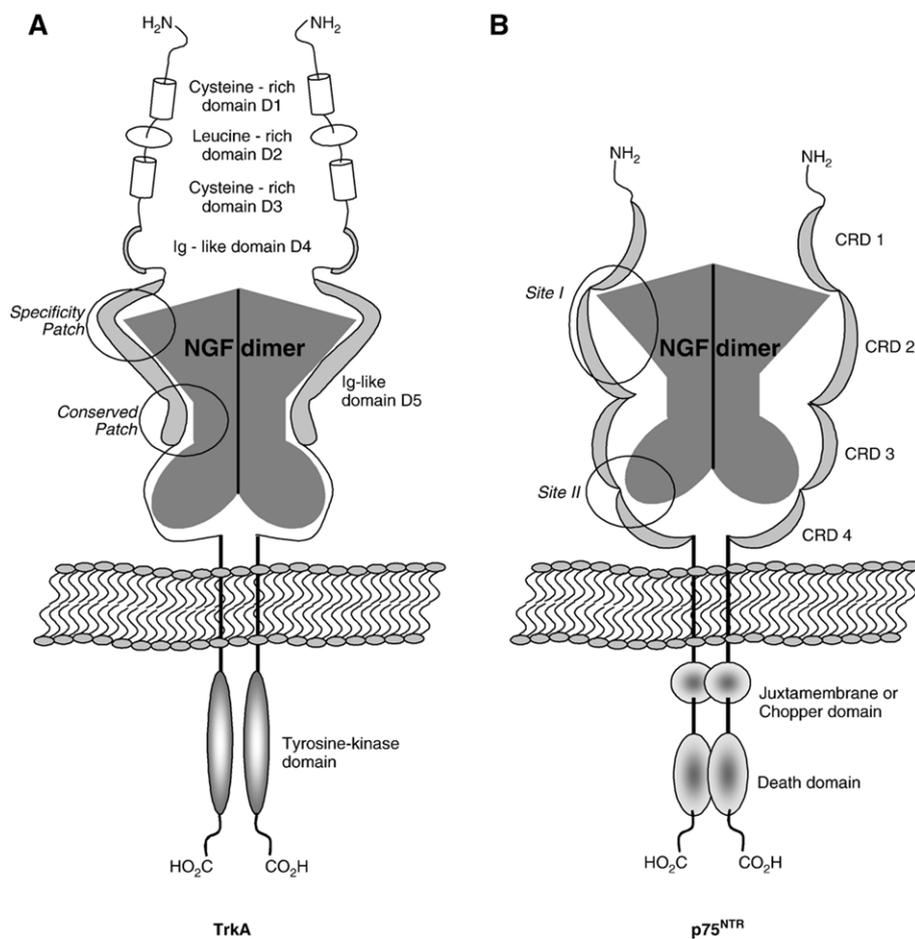


Fig 2 Rappresentazione schematica dei recettori TrkA e p75. (A) Struttura del recettore TrkA. Il dimero NGF induce la dimerizzazione e conseguente attivazione del recettore TrkA. La sequenza extracellulare di TrkA contiene 5 particolari domini: i domini D1 e D3 ricchi di cisteina, il dominio D2 contenente sequenze ripetitive ricche di leucina e i domini D4 e D5 con struttura immunoglobulin-like. Il dominio D5 è responsabile del legame del NGF. Il recettore TrkA ha un unico corto dominio transmembrana seguito da un dominio intracellulare dotato di attività tirosin-chinasica intrinseca. (B) Struttura del recettore p75. Il dimero NGF determina l'attivazione di p75^{NTR} mediante dimerizzazione del recettore. Il dominio extracellulare di p75 contiene 4 domini ricchi di cisteina (CRD-1/-4), caratteristici dei recettori appartenenti alla superfamiglia dei recettori di morte cellulare. I CRD sono carichi negativamente e partecipano al legame delle neurotrofine al recettore p75^{NTR}. In figura è possibile individuare i due siti di legame del NGF al recettore p75: sito I: formato dalla giunzione CRD1-CRD2 e CRD2; sito II: composto dalla giunzione CRD3-CRD4. Il recettore p75 ha un unico dominio transmembrana e uno intracellulare con due particolari domini (il

dominio juxtamembrana o Chopper e il dominio di morte) per l'interazione con le proteine adattatrici. (Tratta da Freund and Frossard, 2008)

Il recettore TrkA è espresso nel sistema nervoso centrale e periferico (Muragaki *et al.*, 1995), ma anche in tessuti non neuronali e gioca un ruolo chiave nel controllo della sopravvivenza, del differenziamento e della proliferazione cellulare (Freund and Frossard, 2004; Freund and Frossard, 2008). Similmente agli altri recettori ad attività tirosina-chinasica, innesca segnali intracellulari attraverso la fosforilazione di chinasi e l'attivazione, nel nucleo, di fattori di trascrizione che inducono infine l'espressione di specifici geni. Più precisamente, il legame recettore-ligando induce una dimerizzazione del recettore stesso e successivo innesco dell'attività tirosina-chinasica. Il recettore TrkA attivo fosforila due residui tirosinici: Y-490, prossimo alla membrana intracellulare, e Y-785, localizzato a livello del residuo carbossilico terminale (Segal, 2003) portando all'attivazione di tre principali cascate di trasduzione del segnale, quali (1) il pathway Ras-Erk, (2) la fosfolipasi-C γ 1, (3) la fosfatidil-inositolo 3 kinasi (PI3K) (Freund and Frossard, 2008, Sofroniew *et al.*, 2001; Kaplan and Miller, 2000; Pawson and Nash, 2000; Fig 3).

- 1) Il recettore TrkA, mediante la Tyr-490 fosforilata, interagisce con la proteina adattatrice Shc (Src homology 2-containing protein), che viene così fosforilata e si lega ad un'altra proteina adattatrice nota come Grb-2 (growth factor receptor bound protein-2). Questa proteina si lega a sua volta al fattore Sos (son of sevenless), che attiva la piccola G proteina Ras che trasloca sulla membrana cellulare (Rozakis-Adcock *et al.*, 1992; Segal and Greenberg, 1996), dove può pertanto attivare la chinasi Raf (RafK), espressa a livello

della membrana cellulare, che a sua volta fosforila Raf (Fabian *et al.*, 1993). Raf attiva così la cascata delle MAPK, portando all'attivazione di ERK1/2 (extracellular-regulated protein kinase 1/2) attraverso la chinasi MEK 1/2 (MAPK ERK kinase 1/2). Come effetto finale tale pathway porta all'attivazione di fattori di trascrizione coinvolti nella proliferazione e sopravvivenza cellulare, in particolare Elk-1 (Treisman *et al.*, 1992) e CREB (cAMP response element binding protein, Bonni *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Fig. 3).

- 2) Il recettore TrkA, una volta attivato da parte del NGF, può reclutare la fosfolipasi C γ (PLC γ) che si lega alla tirosina fosforilata Tyr-785 del recettore e in questo modo si fosforila e si attiva essa stessa (Vetter *et al.*, 1991; Obermeier *et al.*, 1993). La PLC γ trasforma il fosfatidil inositolo 4,5-bisfosfato in inositolo trifosfato (IP₃) e diacil glicerolo (DAG). L'IP₃ si lega al suo recettore, espresso a livello della membrana del reticolo endoplasmatico, determinando il rilascio di calcio nel citoplasma che favorisce l'attivazione della protein chinasi C (PKC) da parte del DAG (Berninger *et al.*, 1993). La PKC attiva a sua volta il pathway della chinasi attivata da mitogeni (MAPK) mediante fosforilazione e attivazione delle chinasi della chinasi della MAPK chinasi (MKKK-1 e -3), e portando infine all'attivazione della chinasi c-jun N-terminale (JNK) e all'attivazione di p38 (Patapoutian and Reichardt, 2000; Fig.3).

3) La fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K) si lega al recettore TrkA attraverso l'interazione con la tirosina fosforilata di TrkA Tyr-751 (Ohmichi *et al.*, 1992). Una volta fosforilata dalla chinasi TrkA, la PI3K attivata favorisce la formazione del fosfatidil inositolo 3,4-bisfosfato che induce reclutamento, a livello della membrana cellulare, della chinasi-1 3-fosfoinositide-dipendente (PDK1) e attiva Akt (anche chiamata PKB, protein chinasi B; Dudek *et al.*, 1997; Andjelkovic *et al.*, 1998). Akt, poi, inizia la trascrizione genica o in maniera indipendente dalla MAPK, attraverso l'attivazione della chinasi atipica PKC ξ (Coleman and Wooten, 1994), o attraverso l'attivazione del pathway delle MAPK mediante coinvolgimento della piccola G proteina Rac (Kita *et al.*, 1998; Yasui *et al.*, 2001; Fig.3).

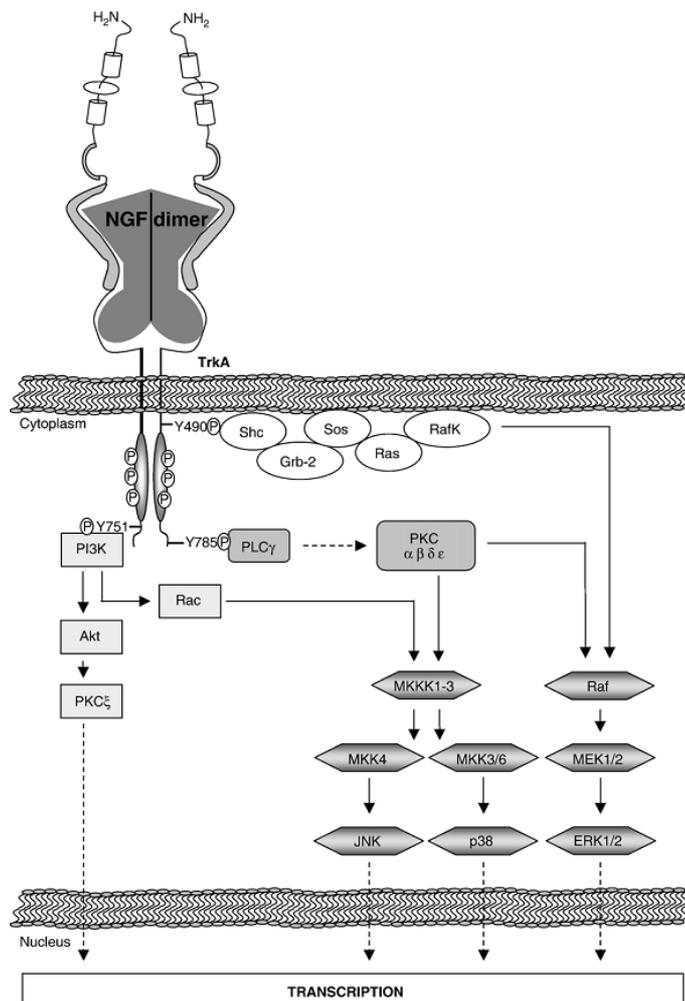


Fig. 3 Pathways attivati da TrkA. Il NGF inducendo la dimerizzazione del recettore TrkA ne promuove l'autofosforilazione e determina l'attivazione di specifici pathways. L'attivazione della PLC γ e della PKC α , β , δ e ϵ , o della piccola G proteina Ras, induce l'attivazione di MAPK p38, JNK ed ERK1/2. Un altro pathway coinvolge la PI3K che induce l'attivazione di Akt, con conseguente attivazione o di un pathway MAPK-indipendente, attraverso l'attivazione della PKC ξ , o delle MAPK, attraverso la piccola G proteina Rac. (Tratta da Freund and Frossard, 2008)

TrkA è frequentemente co-espresso con il recettore p75NTR, appartenente invece alla superfamiglia dei recettori per il fattore di necrosi tumorale (TNFR). A differenza del recettore TrkA che è un dimero, il recettore p75NTR è un monomero per cui quando NGF (dimero) si lega al TrkA non può contemporaneamente legare p75 (Schor, 2005);

tuttavia quest'ultimo è in grado di interagire con il complesso TrkA-NGF modulandone la trasduzione del segnale (Huang and Reichardt, 2003).

L'effetto biologico mediato da p75NTR dipende molto dal contesto cellulare. In generale, mentre TrkA trasmette segnali positivi come l'aumento della sopravvivenza ed il differenziamento, p75NTR è in grado di trasmettere segnali sia positivi che negativi. L'attivazione di p75NTR da parte delle neurotrofine induce due maggiori effetti: (1) induzione dell'apoptosi, attraverso l'attivazione della MAPK JNK, o (2) induzione della sopravvivenza cellulare, attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B (Fig. 4, A e B).

- 1) I pathways attivati dal recettore p75NTR, che determinano l'induzione dell'apoptosi, sono mediati dall'attivazione della MAPK JNK che può fosforilare proteine pro-apoptotiche, quali per esempio Bad, p53 e Bax, e indurre così rilascio di citocromo c dai mitocondri e attivazione delle caspasi, in particolare delle caspasi-3 e -9 (Casaccia-Bonnet *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2001; Beattie *et al.*, 2002; Fig. 4A). JNK può anche portare all'attivazione di c-jun e alla formazione del fattore AP-1 che induce trascrizione genica (Sutter *et al.*, 1979; Whitfield *et al.*, 2001). L'attivazione di JNK da parte del recettore p75 è indotta da tre maggiori pathways: (i) reclutamento di proteine adattatrici, (ii) sintesi di ceramide, e (iii) attivazione della piccola G proteina Rac1. Tra le proteine adattatrici e co-recettori (i), recentemente descritti (Freund and Frossard, 2008, Fig. 4), vi sono TRAF (Tumor necrosis Receptor-Associated Factor) 2, 4, 6, NRIF (Neurotrophin Receptor Interacting Factor), ed NRAGE

(Neurotrophin Receptor-Interacting MAGE (Melanoma Antigen Gene homologus)), coinvolte nella regolazione della sopravvivenza e del ciclo cellulare (Belliveau *et al.*, 1997; Casademunt *et al.*, 1999). L'attivazione di p75NTR può inoltre produrre aumento dei livelli di ceramide (ii) ed attivare il pathway di morte cellulare costituito dalle proteine JNK-p53-Bax (Aloyz *et al.*, 1998) o attivare le piccole G proteine della famiglia delle Rho (iii) con conseguente attivazione delle MKKK e delle MKK 4 e 7 (Fig. 4A).

- 2) L'induzione della sopravvivenza cellulare dopo attivazione del recettore p75 da parte del NGF è mediata dall'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B attraverso tre maggiori pathways, che sono: (i) reclutamento di TRAF6 e attivazione della chinasi associata al recettore per IL-1 (IRAK) e della chinasi atipica PKC, (ii) reclutamento di RIP-2 (receptor interacting protein-2) e (iii) attivazione di PI3K e Akt (Fig. 4B). Una volta attivato, NF- κ B induce la trascrizione di peptidi con attività antiapoptotica, in particolare di proteine appartenenti agli inibitori dell'apoptosi (AIP) o alla famiglia di Bcl-2, o molecole che bloccano i pathways apoptotici, quali Gadd45 β che forma un complesso con MKK7 bloccandone l'attività e prevenendo l'attivazione di JNK (Papa *et al.*, 2004a, 2004b).

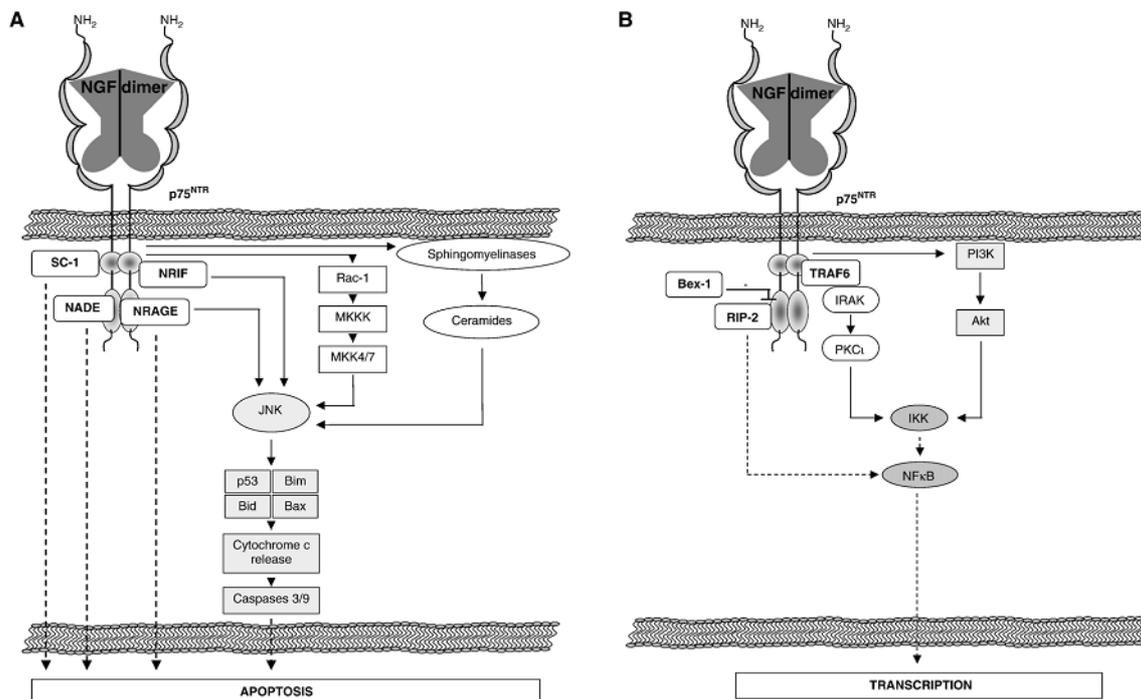


Fig. 4 Pathways attivati da p75. (A) Pathways pro-apoptotici. La MAPK JNK gioca un ruolo centrale nell'induzione dell'apoptosi p75-mediata. La MAPK JNK è attivata (i) dalle proteine adattatrici NRIF e NRAGE reclutate dai domini juxtamembrana e di morte del recettore, (ii) dopo attivazione delle sfingomielinasi e sintesi di ceramide, o (iii) dopo attivazione della piccola G proteina Rac-1 che porta all'attivazione delle MKK4 e MKK7. Una volta attivata, JNK induce la successiva attivazione dei fattori proapoptotici Bim, Bid, Bax e p53 che inducono il rilascio di citocromo c dai mitocondri. Questo determina perciò l'attivazione del pathway delle caspasi, in particolare caspasi 3 e 9, portando all'apoptosi. Il recettore p75, dopo attivazione da parte del NGF può anche reclutare altre proteine adattatrici come NADE e SC-1, responsabili anch'esse dell'attivazione dell'apoptosi, ma attraverso un meccanismo non ancora chiarito. (B) Pathways che mediano sopravvivenza. Il fattore di trascrizione NF-κB gioca un ruolo centrale nei pathways attivati da p75 per indurre sopravvivenza cellulare. NF-κB è attivato (i) dalla proteina adattatrice TRAF6 che porta al reclutamento di IRAK, l'attivazione di PKCξ e di IKK, (ii) dalla proteina adattatrice RIP-2, o (iii) dopo attivazione di PI3K e Akt, che portano alla fosforilazione e attivazione di IKK. Una volta attivato mediante fosforilazione, NF-κB migra nel nucleo e attiva la trascrizione di geni coinvolti nella sopravvivenza cellulare. La proteina Bex-1 compete con RIP-2 per il legame al dominio di morte del recettore p75^{NTR} e blocca la sopravvivenza cellulare RIP-2-dipendente. (Tratta da Freund and Frossard, 2008)

La varietà di effetti biologici mediati da p75NTR e le diverse funzioni da esso svolte nel contesto cellulare potrebbero essere spiegate anche dal fatto che p75NTR può andare incontro ad un processo proteolitico da parte di α - e γ -secretasi dando origine a due frammenti, rispettivamente un dominio extracellulare ed uno intracellulare, entrambi dotati di attività biologica, che portano però all'attivazione di secondi messaggeri differenti. Il primo, sottraendo neurotrofine al p75NTR non clivato potrebbe prevenire il segnale pro-apoptotico, invece il dominio intracellulare potrebbe essere traslocato all'interno del nucleo regolando la trascrizione (Nykjaer *et al.*, 2005). α - e γ -secretasi, dunque, sono in grado di regolare la capacità dei due frammenti di interagire con specifici partners intracellulari e mediare specifici segnali (Coulson *et al.*, 2004; Domeniconi *et al.*, 2005).

Altri effetti indotti dal recettore p75NTR sembrano inoltre essere mediati dall'attivazione del pathway PDE4/cAMP/PKA. Studi recenti (Sachs *et al.*, 2007) hanno infatti identificato un nuovo meccanismo di trasduzione del segnale attivato dal recettore p75 che coinvolge la regolazione dei livelli di cAMP. Secondo il modello proposto da Sachs *et al.* (2007), p75 riduce i livelli di cAMP mediante l'interazione con la fosfodiesterasi (PDE) cAMP-specifica, isoforma PDE4A4/5. Questo meccanismo di trasduzione del segnale è di particolare importanza, dal momento che inibitori selettivi della PDE4 hanno un'azione antinfiammatoria e una potenziale utilità terapeutica in malattie infiammatorie polmonari, così come in una vasta gamma di patologie neurologiche come la depressione, le lesioni del midollo spinale e lo stroke (Gretarsdottir *et al.*, 2003; Nikulina *et al.*, 2004; Houslay *et al.*, 2005). Inoltre, visti i

molteplici geni regolati da cAMP e PKA, molte altre funzioni cellulari potrebbero essere regolate dal signaling p75NTR/cAMP (Sachs *et al.*, 2007).

Il NGF, inizialmente e per molto tempo, è stato studiato e caratterizzato come proteina coinvolta in modo determinante nella maturazione e nello sviluppo del sistema nervoso centrale e periferico (Levi-Montalcini, 1987). Tuttavia, studi successivi (Aloe *et al.*, 1994; Aloe *et al.*, 1997; Aloe *et al.*, 2000) indicano inaspettate azioni della neurotrofina su svariate popolazioni cellulari non-neuronali, suggerendo che la sua azione a livello del sistema nervoso è solo un aspetto della sua biologia.

Dati recenti indicano che il NGF e i suoi recettori sono presenti sia nel rene sano che affetto da varie patologie; tuttavia è ancora poco nota l'esatta funzione che la neurotrofina riveste nel controllo dell'attività funzionale delle varie popolazioni cellulari renali (Durbeej *et al.*, 1993; Huber *et al.*, 1996; Bonofiglio *et al.*, 2007). Nell'ambito della funzionalità renale un ruolo di primo piano è senz'altro svolto dalla popolazione cellulare podocitaria. Poichè i podociti e le cellule nervose condividono diverse caratteristiche biologiche, quali un'analogia espressione di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale, nel trasporto transmembrana e nei contatti intracellulari, nonchè la stessa origine ontogenetica (Kobayashi, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004), è possibile che il NGF svolga un ruolo chiave nella fisiologia del podocita, analogamente a quanto avviene a livello neuronale.

1.2 Podociti

Una delle funzioni primarie del rene è eliminare dal sangue, riversandole nelle urine, le sostanze non necessarie all'organismo e trattenere invece quelle necessarie. Durante l'ultrafiltrazione del plasma dai capillari glomerulari allo spazio di Bowman, il filtrato passa attraverso la parete di filtrazione glomerulare, costituita da tre strati: l'endotelio vascolare fenestrato dei capillari, la membrana glomerulare basale (GBM) e lo strato dei podociti (Fig. 5).

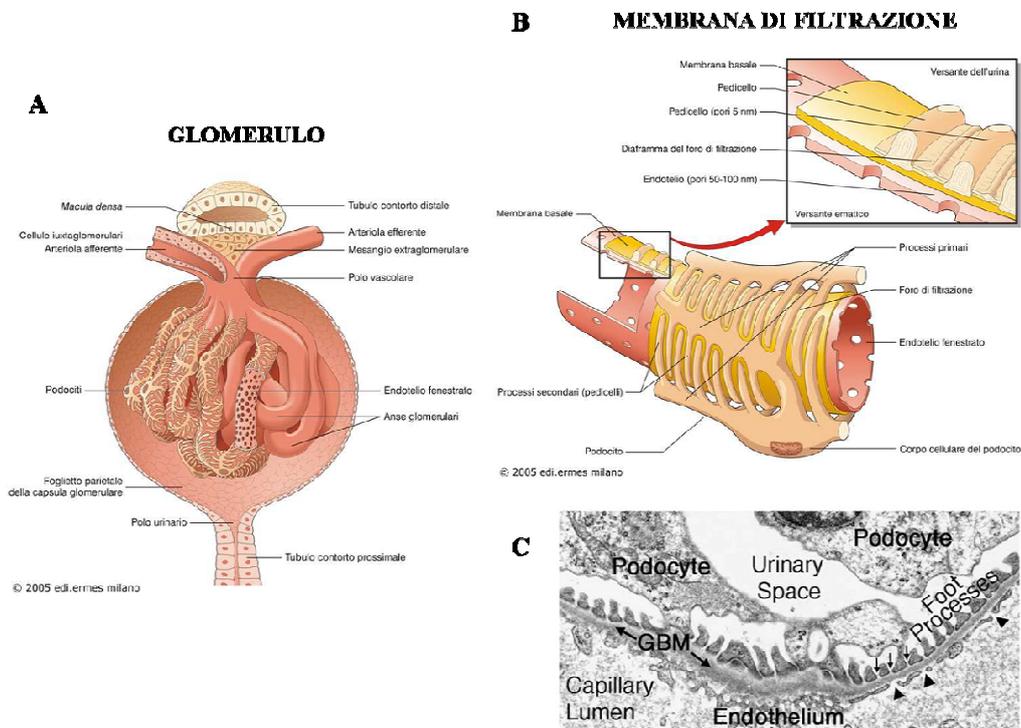


Fig. 5 Struttura della membrana di filtrazione glomerulare. (A) Rappresentazione schematica della membrana di filtrazione inserita all'interno del glomerulo renale. (B) Rappresentazione schematica: è possibile individuare le tre componenti della membrana di filtrazione: endotelio capillare fenestrato; membrana basale glomerulare e strato viscerale della capsula di Bowman costituito dai podociti. (C) Ultrastruttura della barriera di filtrazione glomerulare. Il lume capillare è rivestito da un endotelio fenestrato (punte di freccia), adiacente alla membrana basale glomerulare (GBM), simile ad un nastro. I pedicelli dei podociti, che fungono da ponte insieme allo slit diaphragm (freccie), confinano con la GBM e sono circondati dal filtrato primario presente nello spazio urinario. (Immagine C. Tratta da Miner, 2011).

I podociti sono cellule epiteliali altamente differenziate, la cui funzione dipende dalla loro complessa citoarchitettura, caratterizzata da un voluminoso corpo cellulare e lunghe estensioni citoplasmatiche chiamate processi primari. I processi primari danno origine, a loro volta, a corti processi secondari conosciuti col nome di pedicelli (Fig.6). I pedicelli si interdigitano strettamente con i processi primari e sono direttamente applicati alla membrana basale glomerulare 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 (slit diaphragm o diaframma fenestrato). La superficie esterna dei podociti è rivestita da uno spesso glicocalice, struttura fortemente carica negativamente, che si estende anche sulle fessure di filtrazione (Pavenstädt *et al.*, 2003).

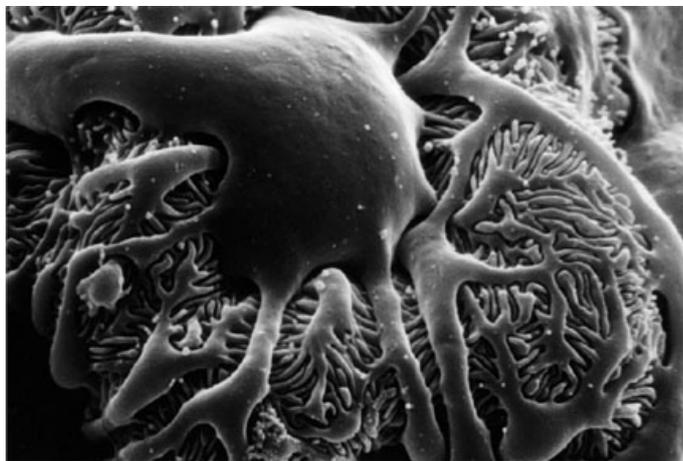


Fig. 6 Normale struttura del podocita. Immagine di Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) di un podocita glomerulare così come lo si vede dallo spazio urinario. Il prominente corpo cellulare invia spessi processi primari che si ramificano ulteriormente nei sottili processi secondari (pedicelli) che si interdigitano con i pedicelli dei podociti adiacenti. Al di sotto dei processi vi è la membrana basale glomerulare che circonda il capillare glomerulare (non visibile in questa immagine). (Tratta da Smoyer and Mundel, 1998)

Il corpo cellulare del podocita contiene un nucleo prominente, un sistema di Golgi ben sviluppato, un abbondante reticolo endoplasmatico liscio e rugoso, prominenti lisosomi e molti mitocondri. A differenza del corpo cellulare i processi cellulari contengono invece pochi organelli. La densità di organelli nel corpo cellulare indica un elevato livello di attività anabolica e catabolica necessaria sia a sostenere l'integrità strutturale di queste cellule dall'architettura così complessa sia a sintetizzare molti, se non tutti, i componenti della GBM. La particolare forma di tali cellule e il mantenimento dei processi primari e secondari sono garantiti dalla presenza di un citoscheletro ben sviluppato (Pavenstädt *et al.*, 2003).

Quest'ultimo si compone di tre serie discrete di elementi ultrastrutturali che si distinguono per funzione e composizione: i microfilamenti (7-9 nanometri di diametro), i filamenti intermedi (10 nm) e i microtubuli (24 nm), tutti formati da piccole subunità proteiche. Nel podocita, il citoscheletro risponde alle necessità della barriera di filtrazione con diversi livelli di organizzazione strutturale. I pedicelli contengono una fitta rete di filamenti di actina, o microfilamenti, mentre i microtubuli e i filamenti intermedi costituiscono l'impalcatura dei processi primari e del corpo cellulare centrale (Andrews, 1981; Cortes *et al.*, 2000, Drenckhahn and Franke, 1988; Kobayashi and Mundel, 1998; Vasmant *et al.*, 1984). L'espressione di microfibrille podocita-specifiche sembra essere un prerequisito per il processo di formazione dei pedicelli durante la glomerulogenesi. Durante la capillary loop stage, il citoscheletro passa da un fenotipo epiteliale ad un fenotipo mesenchimale mediante l'induzione dell'espressione del microfilamento intermedio vimentina, seguita dallo sviluppo di processi cellulari

ramificati ricchi di actina che porta, alla fine, all'interdigitazione dei pedicelli caratteristica della barriera di filtrazione matura (Holthofer *et al.*, 1984, Nagata *et al.*, 1993). È interessante notare che una simile sequenza di riarrangiamenti del citoscheletro può essere osservata durante il differenziamento in vitro di podociti condizionalmente immortalizzati (Mundel *et al.*, 1997).

Le conoscenze riguardo al citoscheletro dei podociti sono notevolmente aumentate nel corso degli ultimi 50 anni. Dalla descrizione di alterazioni citoscheletriche nei podociti, in corso di danno glomerulare, si è arrivati a delineare l'esistenza di una notevole omologia nell'organizzazione del citoscheletro tra podociti e neuroni, o meglio tra pedicelli podocitari e dendriti neuronali. Infine, le ultime intuizioni riguardo ai meccanismi di trasduzione del segnale consentono una sempre migliore comprensione dell'architettura altamente specializzata del podocita maturo. Di notevole interesse è il fatto che, le molecole recentemente identificate come criticamente rilevanti nel garantire una intatta barriera di filtrazione, siano proteine del citoscheletro o strettamente interconnesse con il citoscheletro. Tale evidenza supporta l'ipotesi che il citoscheletro costituisca l'elemento comune che lega le varie forme di danno podocitario (Pavenstädt *et al.*, 2003).

Nei podociti è stato identificato un caratteristico pattern di proteine associate all'actina e la loro regolazione, in corso di danno podocitario, ha messo in luce la rilevanza del citoscheletro nel mantenere intatta la barriera di filtrazione. La prima proteina associata all'actina, che è emersa dagli studi, è stata la sinaptopodina (Mundel *et al.*, 1997). Si tratta di una proteina podocita-specifica; originariamente è stata infatti identificata come

proteina associata all'actina caratteristica dei podociti differenziati, dove gioca un ruolo importante nell'ambito dell'apparato contrattile, actina-basato, dei pedicelli podocitari (Mundel *et al.*, 1991). La sinaptopodina esiste in tre isoforme: neuronal Synpo-short, renal Synpo-long e Synpo-T (Asanuma *et al.*, 2005). Numerosi studi hanno suggerito che la sinaptopodina gioca un ruolo fondamentale nel modulare la forma e la motilità delle spine dendritiche e delle cellule podocitarie (Mundel *et al.*, 1997) ma l'esatto ruolo che la proteina svolge a livello molecolare è ancora in gran parte sconosciuto. E' noto che, topi deficienti per la sinaptopodina mostrano una normale espressione di nefrina e di CD2AP, due marker di differenziamento podocitario implicati nel mantenimento di un normale sistema di adesione, associata ad un danno a livello del citoscheletro, ciò fa sì che il podocita non risponda adeguatamente agli stimoli, con perdita della sua funzione fisiologica. Inoltre, studi su biopsie renali di bambini con vari tipi istologici di sindrome nefrosica hanno rilevato una significativa riduzione di espressione di sinaptopodina, particolarmente nelle Glomerulosclerosi Focali e Segmentali (GSFS) e nelle sindromi nefrosiche congenite, cioè nelle forme più severe e corticoresistenti, tanto che ne viene proposto il valore di marker prognostico (Barisoni *et al.*, 2009; Asanuma *et al.*, 2005; Yanagida-Asanuma *et al.*, 2007).

1.3 Podocitopatie

Il riconoscimento del ruolo svolto dai podociti nell'organizzazione e nel mantenimento dell'integrità della struttura e della funzione glomerulare, sia durante lo sviluppo embrionale che nel tessuto renale maturo, ha indotto in questi ultimi anni lo sviluppo di

una serie di ricerche volte alla comprensione dei meccanismi molecolari che inducono danno a livello di questa popolazione cellulare al fine di poter individuare una terapia mirata ed efficace nel controllare gli eventi patogenetici precoci del danno renale.

L'approccio farmacologico attuale della maggior parte delle glomerulopatie non è risolutivo in quanto capace di controllare unicamente i meccanismi patogenetici secondari, con la conseguenza di produrre esclusivamente il rallentamento della progressione del danno renale (Leeuwis JW *et al.*, 2010). Le podocitopatie umane comprendono un ampio spettro di glomerulonefriti a diversa etiologia. Indipendentemente dalla causa, le risposte che tale popolazione cellulare mette in atto, in seguito ad un danno, sono quattro (Fig. 7), che si traducono da un punto di vista clinico nella comparsa di proteinuria: (1) “*effacement*” ovvero retrazione dei pedicelli, dovuta a profonde modificazioni e riarrangiamenti del citoscheletro (è quanto si verifica per esempio nella Minimal Change Nephropaty (MCN); (2) *alterazione della maturazione cellulare*; il podocita fallisce nel completare la maturazione cellulare e conserva una certa attività proliferativa tipica delle fasi immature della nefrogenesi. (3) *apoptosi*, (Glomerulosclerosi Focale e Segmentale (FSGS); (4) *dedifferenziazione*, i podociti danneggiati regrediscono verso uno stato più immaturo e rientrano nel ciclo cellulare (Collapsing Glomerulopathy, CG). (Barisoni *et al.*, 2009; Leeuwis *et al.*, 2010; Reiser *et al.*, 2010).

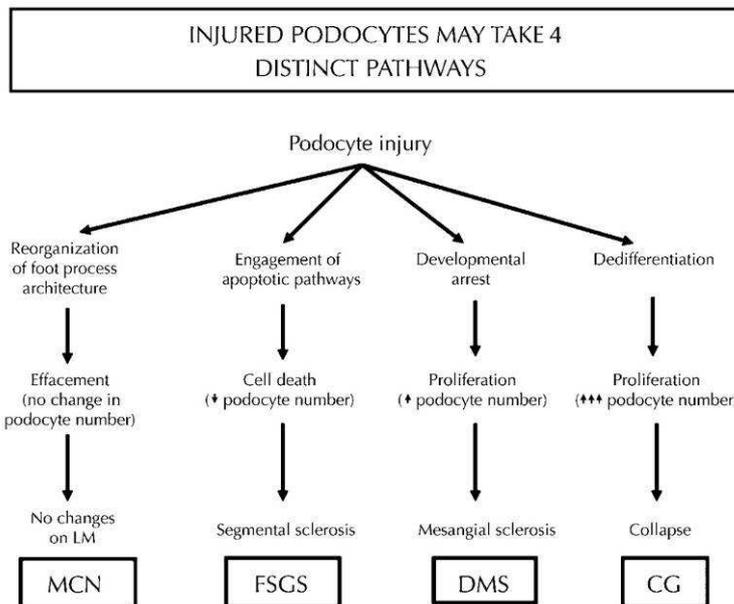


Fig. 7 Rappresentazione schematica dei 4 differenti pathways messi in atto dai podociti in risposta ad un danno (Tratta da Barisoni et al, 2009)

Studi recenti hanno dimostrato che la proteinuria, oltre ad essere accompagnata a livello macroscopico da alterazioni strutturali della cellula podocitaria, potrebbe essere il risultato del clivaggio enzimatico di regolatori chiave della struttura citoscheletrica podocitaria, da parte della proteasi citosolica L-Catepsina (Mundel and Reiser, 2010; Fig. 8).

Un aumento dell'espressione di L-Catepsina a livello podocitario è stato infatti documentato in un ampio spettro di patologie renali umane associate a proteinuria, inclusa la glomerulopatia membranosa, la glomerulosclerosi focale e segmentale (FSGS) e la nefropatia diabetica (Sever *et al.*, 2007). Questi risultati dimostrano quindi che la proteolisi, L-catepsina-mediata, a livello podocitario potrebbe avere un ruolo chiave nello sviluppo di molte forme di proteinuria.

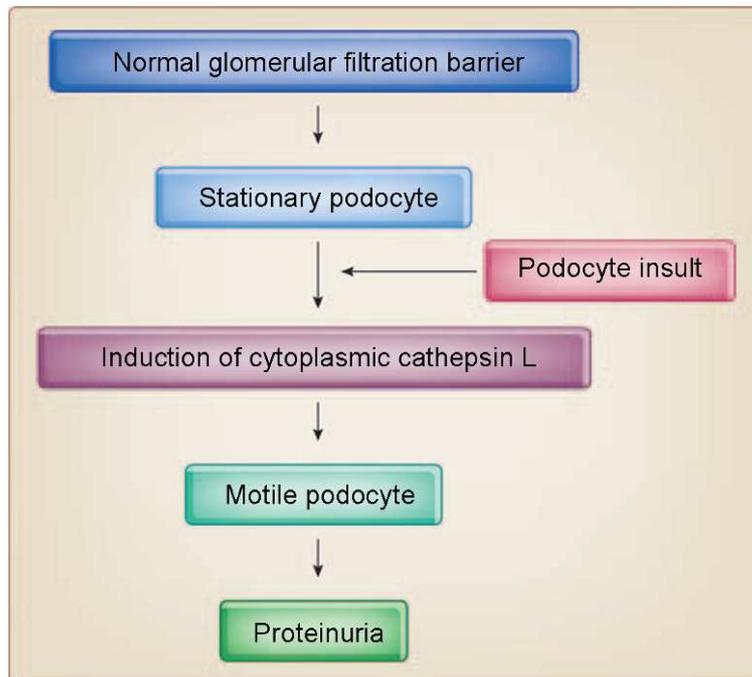


Fig. 8 L'induzione della L-Catepsina nei podociti precede l'effacement dei pedicelli e la proteinuria. In seguito ad un insulto, i podociti stazionari rispondono con un aumento dell'espressione citoplasmatica e dell'attività della L-Catepsina citosolica e successivo sviluppo di processi podocitari (pedicelli) mobili. Questa risposta migratoria porta ad effacement dei pedicelli, rimodellamento dello slit diaphragm e proteinuria. (Tratta da Mundel and Reiser, 2010).

L'abnorme rimodellamento glomerulare, che sottintende l'espansione mesangiale, così come le alterazioni a carico del microcircolo e della barriera di filtrazione glomerulare che si verificano in corso di proteinuria, sono sostenute da alterazioni dell'espressione, ma anche dall'azione periferica, di fattori solubili che, di regola, partecipano al mantenimento dell'omeostasi tessutale glomerulare, attraverso un'azione sia di tipo autocrino che paracrino all'interno del glomerulo stesso. La fonte di questi mediatori solubili è da ricercarsi non soltanto nelle cellule residenti del glomerulo, endoteliali, mesangiali ed epiteliali, ma anche in cellule non residenti, quali piastrine, linfociti e

monociti-macrofagi, che vi giungono attraverso il torrente circolatorio, o in cellule neuronali, responsabili dell'innervazione del rene. I fattori coinvolti comprendono: citochine, agenti vasoattivi, fattori che modulano la coagulazione e la fibrinolisi, molecole di adesione e fattori di crescita, implicati prevalentemente nel controllo del ricambio cellulare e della matrice extracellulare (Pugliese et al., 1999; Pugliese,2006). Tra questi ultimi un ruolo importante potrebbe essere svolto dal Nerve Growth Factor (NGF). E' da sottolineare che i reni sono innervati principalmente da diramazioni provenienti dal plesso celiaco e dal nervo piccolo splanchnico, fibre appartenenti al sistema ortosimpatico. Questa peculiarità anatomica garantirebbe un' elevata presenza di NGF a livello renale candidando la neurotrofina come un importante regolatore nella fisiopatologia del rene.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Il NGF, originariamente identificato come fattore importante nello sviluppo e maturazione del sistema nervoso centrale e periferico, ha sicuramente visto negli ultimi anni ampliare enormemente le conoscenze sulla sua biologia, ma anche le implicazioni per la patologia e forse la farmacologia di molte malattie della specie umana (Aloe and Calzà, 2004). Sebbene esistano già numerose evidenze sull'importanza della neurotrofina nel controllo dell'attività funzionale di numerose popolazioni cellulari non-neuronali, il ruolo svolto dal sistema NGF/recettori per il NGF, a livello renale, non è ancora stato documentato. Poiché i podociti e le cellule nervose condividono diverse caratteristiche biologiche e la stessa origine ontogenetica (Kobayashi, 2002; Kobayashi

et al., 2004), la neurotrofina potrebbe rappresentare un fattore fondamentale anche nella maturazione, nei cambiamenti strutturali, e quindi nella funzione delle cellule podocitarie, analogamente a quanto già descritto nei neuroni.

Lo scopo del presente studio è stato quello di caratterizzare il sistema NGF/recettori per il NGF nei podociti umani al fine di comprendere il potenziale ruolo fisiopatologico della neurotrofina, valutando l'effetto del NGF sulla proliferazione cellulare, sullo sviluppo dei pedicelli e sul corretto differenziamento podocitario. A tal fine è stata utilizzata una linea podocitaria umana mantenuta in condizioni di coltura tali da consentire il mantenimento dello stato indifferenziato o il fenotipo cellulare maturo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Anticorpi

L'anticorpo policlonale rabbit anti-p75, diretto contro gli aminoacidi 266-357 del recettore per il NGF, NGFRp75, l'anticorpo policlonale goat anti-ANT, diretto contro un peptide corrispondente ad una regione interna del ANT di origine umana, l'anticorpo monoclonale mouse anti-COX IV, diretto contro l'enzima-marker mitocondriale COX IV e l'anticorpo policlonale anti-sinaptopodina, sono stati forniti da Santa Cruz (CA, USA). L'anticorpo policlonale rabbit anti-TrkA, che non cross-reagisce con TrkB né con TrkC, è stato fornito da Upstate (Millipore Corporation, Billerica, MA). L'anticorpo policlonale rabbit anti-PDE4A, diretto contro la regione C-terminale del PDE4A, che cross-reagisce con tutte le varianti conosciute di PDE4A comprendenti PDE4A1 (66

kDa), A5 (109 kDa), A8 (106 kDa), Ax (102 kDa) e una variante di 76 kDa specifica dei testicoli, è stato fornito da Abcam (Cambridge, UK). Gli anticorpi anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), anti-p44/42 MAPK (Erk1/2), anti-phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) e anti-p38 α MAP Kinase sono stati forniti da Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA). Gli anticorpi secondari goat anti-rabbit e goat anti-mouse HRP-coniugati sono stati forniti da Invitrogen (NY, USA). Il complesso particellare goat anti-rabbit-gold (10 nm) è stato fornito da AURION Immuno Gold Reagents & Accessories (The Netherlands).

3.2 Colture cellulari

La linea cellulare di podociti umani, ottenuta da biopsia renale e trasfettata con il gene tsSV40, è stata isolata presso il Dip. di Patologia del Haartman Institute dell'Università di Helsinki, diretto dal Prof. Holthöfer. Le cellule proliferano a 33°C (temperatura permissiva) in cui il gene tSV40 è attivo, mentre quando vengono trasferite a 37°C (temperatura non-permissiva) l'antigene è inattivo cosicché le cellule smettono di proliferare e assumono il fenotipo di podociti differenziati. Gli esperimenti sono stati condotti su podociti mantenuti sia a "temperature permissive" (usando passaggi tra 5 e 15) che a temperature "non permissive". In entrambe le condizioni sperimentali le cellule sono state mantenute in coltura in RPMI-1640 arricchito con 10% Fetal Bovin Serum (v/v), 1% Penicillina/Streptomicina (v/v), e 1% ITS (Insulin-Transferrin-Selenium; v/v). Il mezzo è stato cambiato tre volte a settimana e a 33°C le cellule sono state fatte crescere fino al 80% di confluenza, tripsinizzate e rimesse in coltura ad una

diluizione di 1:3-1:5. Prima del thermo-switching a 37°C, le cellule sono state fatte crescere fino al 70-80% di confluenza, staccate, contate, seminate in piastre trattate con collagene di tipo I e incubate alla temperatura non-permissiva di 37°C (5% CO₂) allo scopo di inattivare l'antigene SV40 e consentire così alle cellule di acquisire il fenotipo completamente differenziato. Il numero di cellule e la vitalità cellulare è stata stimata usando il Cell Countess automated cell counter (Invitrogen).

3.3 RT-PCR e Real-Time PCR

L'espressione del mRNA per NGF e per i suoi recettori (TrkA e p75), nonché l'espressione del mRNA per sinaptopodina, sono stati valutati mediante metodica di RT-PCR e Real Time-PCR. L'RNA totale è stato estratto dalle cellule proliferanti e completamente differenziate utilizzando il Pure Link Total RNA Blood Purification Kit (Invitrogen) ed è stato quantificato con il fluorometro Qubit (Invitrogen) utilizzando il kit Quant-iTTM RNA Assay Kit (Invitrogen). L'RNA totale (100 ng) è stato convertito in cDNA mediante reazione di trascrizione inversa utilizzando il kit SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). I cDNA sono stati poi amplificati per NGF e i suoi recettori (TrkA e p75), oppure per la sinaptopodina usando i seguenti primers forniti da Invitrogen: NGF (fwd: CAGGACTCACAGGAGCAAGC; rev: GCCTTCCTGCTGAGCACACA), TrkA (fwd: CCATCGTGAAGAGTGGCCTC; rev: CCAGCTCTGTGAGGATCCAG), p75 (fwd: CGTGTTCTCCTGCCAGGACA; rev: GAGATGCCACTGTCGCTGTG), sinaptopodina (fwd: CATGGTGGAAAGGAGGATGATGG; rev: ACTTGGGGTTCGGAGCTGGGATAC),

actina (fwd: CTACAATGAGCTGCGTGTGG; rev: GTGAGGATCTTCATGAGG) e utilizzando la Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen). A tal punto i prodotti amplificati sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio (2%), visualizzati mediante transilluminatore a raggi UV e fotografati.

I cDNAs sono stati anche usati per l'analisi quantitativa del mRNA per TrkA e p75 in real-time PCR analysis utilizzando TaqMan Gene expression Assay (Applied Biosystems). I primers per TrkA e p75^{NTR} (NTRK1, Hs01021011_m1; NGFR, Hs00609976_m1) sono stati forniti da Applied Biosystems. I risultati sono stati analizzati con il software StepOne Real Time System v2.1 (Applied Biosystems) usando il metodo del comparative Ct. I dati sono espressi come $\Delta\Delta Ct$ per i geni TrkA e p75 normalizzati per la β -actina. L'analisi quantitativa del mRNA per NGF e sinaptodina è stata invece effettuata utilizzando il SYBR® GreenER™ Reagent System (Invitrogen). I risultati sono stati analizzati con il software StepOne Real Time System v2.1 (Applied Biosystems) usando il metodo del comparative Ct. I dati sono espressi come $\Delta\Delta Ct$ per il gene, NGF o sinaptodina, normalizzato per la β -actina.

3.4 Determinazione della concentrazione di NGF mediante saggio ELISA

Il NGF è stato quantificato nel mezzo di coltura dei podociti umani, sia proliferanti che a differenti stadi del processo di differenziamento, usando il Sistema NGF Emax Immunoassay (Promega Italia, Italy), seguendo il protocollo fornito dal kit. La densità ottica è stata misurata a 450 nm. La concentrazione di NGF è stata espressa come pg/ml e tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

3.5 Western Blotting

Lo studio dell'espressione delle diverse proteine di interesse è stato condotto mediante Western Blotting, eseguito secondo il metodo NuPAGE MES SDS system (Invitrogen). Le cellule sono state esposte ad un opportuno buffer di lisi (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 10 mM e pH 7,5, glicerolo 10%, Triton X-100 1%) arricchito con l'aggiunta di un cocktail di inibitori delle proteasi (aprotinina 0,6%, fenilmetanolsolfonilfluoruro (PMSF), ortovanadato di sodio 1,2mM). I campioni sono stati incubati per 30 minuti in ghiaccio, successivamente centrifugati a 12000 rpm per 15 minuti a 4°C e il sovrinatante è stato utilizzato per la determinazione delle proteine totali mediante il fluorometro Qubit (Invitrogen) utilizzando il kit Quant-iT™ Protein Assay Kit. Un'aliquota di lisato cellulare contenente circa 35µg di proteine per campione è stata denaturata mediante l'aggiunta di Dodecil Solfato di Litio (LDS, 1:4) e riscaldata a 70°C per 10 minuti, successivamente le proteine sono state esposte ad un agente riducente (1:10). I campioni così allestiti sono stati caricati, unitamente ad un marker di peso molecolare noto, MagicMark (Invitrogen), su un gel di poliacrilammide (4-12% bis-tris gel da 1-1,5 mm) posizionato in una camera elettroforetica ed immersi in un tampone di corsa; la separazione è stata ottenuta mediante applicazione alla camera di un campo elettrico di 200 V costante per 35-50 minuti. Le proteine separate mediante elettroforesi sono state trasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa mediante elettrotrasferimento con camera trans-blot in un tampone di trasferimento. Il trasferimento delle proteine è stato ottenuto mediante applicazione alla camera di un campo elettrico costante di 25 V per 1 h. Il corretto caricamento delle proteine e il loro

trasferimento su membrana è stato confermato mediante Ponceau-red staining. Le proteine, fissate sul filtro di nitrocellulosa, sono state successivamente visualizzate tramite immunorivelazione. La membrana di nitrocellulosa è stata posta in blocking solution (5% di milk in TBST buffer 1X) per 60 minuti a temperatura ambiente e poi incubata over-night a 4°C con l'anticorpo primario specifico per il target di interesse. Dopo tre lavaggi con TBST buffer la membrana è stata incubata per 1 h con lo specifico anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano in grado di riconoscere la porzione della IgG utilizzata come anticorpo primario. Trascorsi i 60 minuti di incubazione con l'anticorpo secondario, e dopo lavaggi con TBST buffer, la membrana è stata esposta all'ECL Western Blotting Analysis System, contenente H₂O₂ e luminolo, un substrato chemiluminescente. La perossidasi riduce H₂O₂ liberando 2O⁻ che andrà ad ossidare il luminolo con la contemporanea produzione di luce. La luce emessa è stata rilevata esponendo la membrana ad una lastra fotografica (X-ray film). Le immagini fotografiche sono state processate in Adobe Photoshop 7.0.

3.6 Immunofluorescenza

Le cellule sia proliferanti che completamente differenziate sono state fatte crescere fino al 80% di confluenza in Flask da 75 cm², tripsinizzate e rimesse in coltura alla concentrazione di 5x10⁵ in piastre da 6 pozzetti in mezzo completo. Successivamente è stato rimosso il mezzo e sono stati effettuati lavaggi con Phosphate-Buffered Saline (PBS). Le cellule sono state fissate quindi con Paraformaldeide al 2% per 10 min. I podociti sono stati successivamente lavati con PBS ed incubati con NH₄Cl 50mM per

30 min a RT, per bloccare l'autofluorescenza. Dopo lavaggio con PBS, le cellule sono state incubate con Goat Serum al 2% in PBS per 30 min, per bloccare i siti aspecifici, ed esposte agli anticorpi primari (TrkA 1:200 e p75 1:200) overnight a 4°C. Dopo lavaggi con PBS, le cellule sono state esposte agli anticorpi secondari (Alexa-Fluor 488 goat anti-rabbit IgG) 1:500 per 1h a temperatura ambiente. Dopo esposizione al DAPI (1:500 in PBS) per 10 min, per la colorazione dei nuclei, le cellule sono state sottoposte a diversi lavaggi con PBS e montate con Fluoromont-G mounting media (Southern Biotech).

Per la colorazione dei mitocondri le cellule sono state esposte al Mitotracker-red (Molecular Probes) seguendo il protocollo suggerito dalla ditta fornitrice.

Le immagini sono state acquisite con un microscopio Leica AF 9600, utilizzando una lente a immersione 100x e sottoposte a deconvoluzione secondo il protocollo Leica per la microscopia a deconvoluzione.

3.7 Indagine ultrastrutturale ed immunocitochimica

I campioni in esame sono stati sottoposti a fissazione aldeidica seguita da una post-fissazione in tetrossido di osmio. Il fissativo consiste in una miscela costituita dall'agente chimico di fissazione, la glutaraldeide o il tetrossido di osmio e da una soluzione tampone a base di fosfato, che ha lo scopo di mantenere il pH costante durante tutto il processo. Per la prima fissazione del campione è stata utilizzata la glutaraldeide al 3%, per 2 ore, veicolata da un tampone a base di fosfato (fosfato monobasico e bibasico di sodio, 0.1 M, pH 7.2). Per la post-fissazione è stato scelto il

tetrossido di osmio all'1%, a penetrazione più lenta rispetto alle aldeidi, veicolato sempre da un tampone fosfato. Tra le due fissazioni ed al termine della fase di post-fissazione i campioni vengono sottoposti a più lavaggi con il solo tampone fosfato (0.15M).

La fase di disidratazione prevede la completa rimozione dei liquidi presenti nel tessuto e la sostituzione con un solvente organico compatibile con la resina usata nella fase di infiltrazione. Gli agenti disidratanti sono solventi organici ad alta forza e responsabili, per tale motivo, di un certo grado di coartazione ed estrazione dei costituenti cellulari. La procedura di disidratazione è stata effettuata in maniera graduale, immergendo il campione in soluzioni a concentrazione crescenti di acetone. Terminata la disidratazione è stata avviata la procedura di inclusione che consiste nella graduale sostituzione del disidratante con il mezzo di inclusione. Per il nostro studio è stata utilizzata una resina epossidica ottenuta miscelando Epon 812 ed Araldite, in presenza di agenti indurenti ed acceleratori. La successiva fase di polimerizzazione permette di ottenere un blocchetto di inclusione. Le operazioni di inclusione sono state condotte sotto cappa, quelle di polimerizzazione in stufa a 60°. I campioni inclusi nei blocchetti di resina, sono stati sottoposti dapprima ad una fase denominata di "trimming", la quale consiste nella rimozione della resina in eccesso presente intorno al tessuto in esame, quindi posizionati e bloccati sul braccio dell'ultramicrotomo LKB Ultratome III che oscillando determina il taglio delle sezioni ultrafini, dello spessore di 60-90 nm. Le sezioni ultrasottili sono state sottoposte ad un processo definito "contrastazione", che consiste nel trattamento del campione con metalli pesanti in grado di fissarsi selettivamente alle strutture

subcellulari con conseguente aumento dello scattering con il fascio elettronico del microscopio. E' stato prima usato l'acetato di uranile (per 10') e poi il citrato di piombo (sempre per 10') entrambi in soluzione al 2%. I Sali di uranio si fissano in particolare agli acidi nucleici, evidenziando la cromatina nucleare ed i ribosomi mentre i sali di piombo potenziano l'azione dell'osmio e dell'uranio delineando l'ultrastruttura cellulare. Alla contrastazione segue la fase di metallizzazione.

3.8 Immunocitochimica applicata al TEM

Per i campioni sottoposti all'esame immunocitochimico, è stata effettuata una fissazione in paraformaldeide al 4% in tampone fosfato per 24 ore a 4 °C. Dopo il lavaggio del campione è stata condotta la disidratazione in concentrazioni crescenti di etanolo fino ad arrivare ad etanolo a 70°. I campioni sono stati, infine, inclusi in resina acrilica LR White e messi a polimerizzare a 60°C per 36 ore.

Per la localizzazione degli antigeni in esame mediante immuno-oro marcatura è stata seguita la seguente procedura. Sezioni ultrasottili (60-90 nm) incluse in resina, montate su retini di nichel, sono state preincubate in glicina 0,05M-PBS a faccia in giù su goccia per 20 min e lavate con BSA 1% PBS. Le sezioni sono state incubate con anticorpo primario, anti-TrkA o anti-p75NTR, diluito 1:10 in BSA 1% PBS, a 4°C overnight in camera umida. Dopo tre lavaggi in BSA 1% PBS, le sezioni sono state incubate con anticorpo secondario coniugato con sfere d'oro colloidale da 10 nm di diametro, diluito 1:10 in BSA 1% in PBS per 1 ora in camera umida a temperatura ambiente. Sono seguiti tre lavaggi in BSA1% PBS e tre in H₂O distillata. I retini sono quindi stati

contrastati con acetato di uranile, asciugati, metallizzati ed osservati al microscopio elettronico a trasmissione.

3.9 Preparazione dei mitocondri

Le cellule sono state staccate con trypsina e centrifugate a 2000 rpm a RT per 5 minuti. Il pellet è stato successivamente risospeso in RIPA buffer (Sigma Aldrich) arricchito con inibitori delle proteasi e digitonina 0.1% e incubato a 4°C per 15-20. Il campione è stato centrifugato a 3000 rpm per 15' a 4°C. Il supernatante è stato raccolto e centrifugato nuovamente a 14000 rpm per 20' a 4°C, ottenendo i mitocondri (Cione *et al.*, 2010). Il pellet è stato risospeso in Triton x-100 ottenendo il lisato proteico mitocondriale, utilizzato per la determinazione delle proteine mitocondriali mediante il fluorometro Qubit (Invitrogen) utilizzando il kit Quant-iT™ Protein Assay Kit.

3.10 Ciclo cellulare

Per la determinazione della distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare è stata utilizzata la citofluorimetria, una tecnica che analizza singole cellule mediante la rilevazione della luce emessa da fluorocromi. Nel caso specifico è stata usata la colorazione con un agente intercalante del DNA, lo Ioduro di Propidio (PI), che, dopo essersi legato all'acido nucleico, aumenta notevolmente la propria fluorescenza. Sarà possibile osservare cellule con quantità di DNA variabile da 2N (G0/G1) a 4N (G2/M). Un istogramma rivela la frazione di cellule presente nelle varie fasi del ciclo cellulare. Le cellule trattate con anticorpi anti-NGF (20-40 µg/ml) e di controllo sono state lavate in PBS, fissate in etanolo al 70% e poste a -20°C per 24 h. Le cellule così fissate sono

state poi centrifugate e risospese in 300 µl di PI/Triton X-100 staining solution addizionata di RNase A. Sono state poi incubate per 30 min a temperatura ambiente su un agitatore. I dati sono stati analizzati escludendo gli aggregati ed i frammenti cellulari tramite i valori di FSC (*Forward SCatter*) e SSC (*Side SCatter*). La conta delle cellule in ogni fase del ciclo cellulare è stata effettuata usando un BD FACS Calibur Flow Cytometer (che misura la fluorescenza alla luce rossa, dovuta alla presenza di IP) e il software CellQuest.

3.11 Analisi mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

I campioni sono stati fissati adeguatamente al fine di modificare artificialmente l'ambiente cellulare, di immobilizzare i componenti molecolari e macromolecolari della cellula arrestandone le attività metaboliche. In particolare i podociti sono stati sottoposti a fissazione aldeidica seguita da una post-fissazione in tetrossido di osmio. Per la prima fissazione dei campioni è stata utilizzata glutaraldeide al 3% veicolata da un tampone a base di fosfato (fosfato monobasico e bibasico di sodio, 0.1 M, pH 7.2). Per la post-fissazione è stato scelto il tetrossido di osmio all'1%, a penetrazione più lenta rispetto alle aldeidi, veicolato sempre da un tampone fosfato. Tra le due fissazioni ed al termine della fase di post-fissazione i campioni sono stati sottoposti a più lavaggi con il solo tampone fosfato (0.15M).

La fase di disidratazione che prevede la completa rimozione dei liquidi presenti nel campione è stata effettuata mediante passaggi in soluzioni di acetone in una scala crescente di concentrazioni: 50, 70, 90 e 100%. Dopo le fasi di prelievo, stabilizzazione

e disidratazione, i campioni sono stati sottoposti al processo di essiccamento; questo consiste nell'allontanamento dei fluidi eventualmente presenti nel campione, generalmente acqua o solventi utilizzati per la disidratazione. La metodica seguita è stata quella del "critical point drying", che impiega l'anidride carbonica (CO₂) come fluido intermedio. Una volta essiccati, i preparati vengono posizionati su portacampioni specifici per SEM e quindi sottoposti alla fase di ricopertura che prevede l'impiego di sostanze metalliche ad elevato peso atomico (oro nel caso specifico). I campioni così allestiti sono stati osservati al SEM "Zeiss DSM 940".

3.12 Co-Immunoprecipitazione

L'immunoprecipitazione è stata condotta mediante anticorpi specifici (anti-p75NTR ed anti-PDE) su estratti mitocondriali o lisati cellulari utilizzando il Dynabeads® protein G kit (Invitrogen) seguendo il protocollo fornito dal kit.

Le proteine purificate sono state poi sottoposte a corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide ed evidenziate con gli anticorpi specifici mediante western blotting.

3.13 Saggio per la valutazione dei livelli di cAMP

1×10^6 di podociti trattati dal 6° al 15° giorno con anticorpi anti-NGF (40 µg/ml) o con IgG di capra alla stessa concentrazione o esposti al solo mezzo di coltura, sono stati lisati mediante una soluzione di HCl 0.1N, ed i livelli di cAMP sono stati valutati mediante saggio ELISA (Assay Designs). Le cellule sono state trattate per 16 h con 100 ng/ml di PTX. Per l'inibizione dell'attività fosfodiesterasica le cellule sono state trattate per 16 h con isobutil-metilxantina (500 µM, IBMX; Calbiochem), 8-metossimetil-3-

isobutil-1-metilxantina (18.7 μM , inibitore della PDE1; Calbiochem), eritro-9-(2-idrossi-nonil)-adenina (80 μM , inibitore PDE2; Calbiochem), trequisina (100 nM, inibitore PDE3; Calbiochem) e rolipram (10 μM , inibitore PDE4; Calbiochem). Le cellule sono state trattate con forskolin in presenza degli inibitori per 1 h.

3.14 Analisi statistica

I risultati sono presentati come Media \pm SEM di n esperimenti indipendenti.

La significatività statistica è stata determinata mediante student t -test. I dati sono stati analizzati usando *GraphPad Prism*® software.

4. RISULTATI

4.1 CARATTERIZZAZIONE NEI PODOCITI UMANI INDIFFERENZIATI E MATURI DELLA PRESENZA DEL NGF E DEI SUOI RECETTORI

a) Analisi dell'espressione del gene e della sintesi e secrezione della proteina NGF nei podociti umani immaturi ed in corso di differenziamento

La valutazione dell'espressione del gene codificante il NGF nelle cellule podocitarie immature e nelle varie fasi del loro differenziamento è stata condotta mediante metodica di RT-PCR e di real-time PCR al fine di apprezzare eventuali variazioni quantitative del gene per la neurotrofina legate alla maturazione fenotipica. 100 ng dell'RNA estratto dai podociti coltivati in condizioni permissive e non permissive sono stati convertiti in cDNA mediante retrotrascrizione. Sui cDNA così prodotti ed opportunamente diluiti è stata effettuata l'amplificazione di una porzione del gene del NGF mediante primers specifici. I risultati ottenuti sono stati validati confrontandoli con quelli di primers specifici per la β -actina.

Come illustrato in Fig 1A, i podociti, coltivati sia in condizioni permissive che non permissive, esprimono costitutivamente il mRNA per il NGF. La valutazione quantitativa, condotta mediante Real-Time PCR (Fig.1B), ha permesso di evidenziare come nei podociti in corso di differenziamento e in quelli maturi si osserva un aumento significativo dei livelli di mRNA per la neurotrofina rispetto alle cellule indifferenziate o coltivate a 37°C per 24 ore.

L'analisi della produzione e della secrezione di NGF biologicamente attivo, è stata condotta nel mezzo condizionato di podociti indifferenziati e durante i vari stadi di

maturazione cellulare mediante saggio ELISA. I risultati (Fig.1C) hanno dimostrato che i podociti coltivati nelle condizioni sperimentali permissive o non permissive sono in grado di sintetizzare e secernere costitutivamente la neurotrofina sottoforma di proteina matura, con un incremento significativo dei livelli di NGF nelle fasi terminali del differenziamento cellulare.

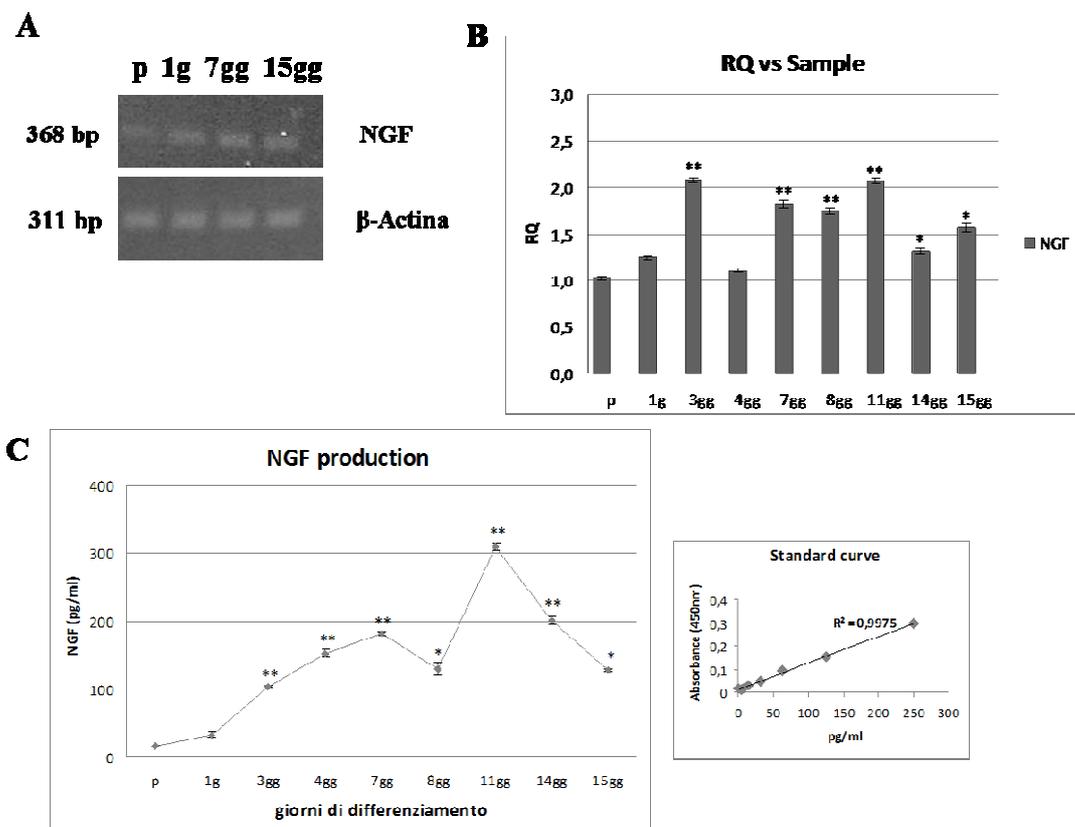


Fig. 9 Analisi dell'espressione genica e proteica del NGF. L'RNA è stato raccolto dai podociti proliferanti e a differenti stadi della maturazione cellulare. I livelli di mRNA per il NGF sono stati valutati mediante (A) RT-PCR e (B) Real-Time PCR. (C) I livelli di NGF, prodotto e rilasciato dalle cellule, sono stati valutati mediante saggio ELISA nel mezzo condizionato di podociti indifferenziati e durante i vari stadi di maturazione cellulare. Ogni campione è stato processato in triplicato ed i valori ottenuti rappresentano la media \pm ES rapportati ad 1×10^6 cellule. Il grafico è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$ versus p (cellule proliferanti); ** $p < 0.001$ versus p (cellule proliferanti)). (P: proliferanti; 1g, 3gg, 4gg, 7gg, 8gg, 11gg, 14gg e 15gg: giorni di differenziamento).

b) Analisi dell'espressione dei geni per i recettori del NGF e della sintesi delle proteine recettoriali mature per la neurotrofina nei podociti umani immaturi ed in corso di differenziamento.

La valutazione della presenza dei geni codificanti per i recettori ad alta (TrkA) ed a bassa affinità (p75NTR) per il NGF nei podociti immaturi ed in corso di differenziamento è stata condotta mediante metodica di RT-PCR e di real-time PCR al fine di evidenziare eventuali variazioni quantitative dell'espressione del gene per TrkA e per p75NTR legate alla maturazione fenotipica. 100 ng dell'RNA estratto dai podociti coltivati in condizioni permissive e non permissive sono stati convertiti in cDNA mediante retrotrascrizione. Sui cDNA così prodotti ed opportunamente diluiti è stata effettuata l'amplificazione di una porzione del gene per TrkA e per p75NTR mediante primers specifici. I risultati ottenuti sono stati validati confrontandoli con quelli di primers specifici per la β -actina.

Come illustrato in Fig. 10A i podociti coltivati sia in condizioni permissive che non permissive esprimono costitutivamente il mRNA per i recettori del NGF. La valutazione quantitativa condotta mediante metodica di real-time PCR ha permesso di evidenziare (Fig. 10B) come nei podociti umani i livelli di mRNA per il gene codificante il recettore ad alta affinità per il NGF (TrkA) e il gene codificante il recettore a bassa affinità per la neurotrofina (p75NTR) si mantengono costanti in tutte le condizioni sperimentali adottate.

La quantificazione delle proteine recettoriali TrkA e p75NTR nei podociti immaturi ed in corso di differenziamento è stata condotta mediante metodica di Western Blotting e riconoscimento con anticorpi specifici. Per valutare l'uniformità della quantità di

proteine totali caricate sul gel sono stati stimati i livelli di β -actina presenti a livello cellulare. I risultati (Fig. 10C) hanno dimostrato che i podociti umani, in corso di proliferazione e durante le prime e ultime fasi del differenziamento cellulare, esprimono costitutivamente i recettori per il NGF nella loro forma matura. L'analisi densitometrica (Fig. 10D) ha evidenziato che i livelli proteici del recettore a bassa affinità subiscono una lieve variazione nel corso del differenziamento, mentre l'espressione del recettore TrkA è risultata notevolmente aumentata nella fase di completa maturazione cellulare rispetto alla condizione di immaturità fenotipica.

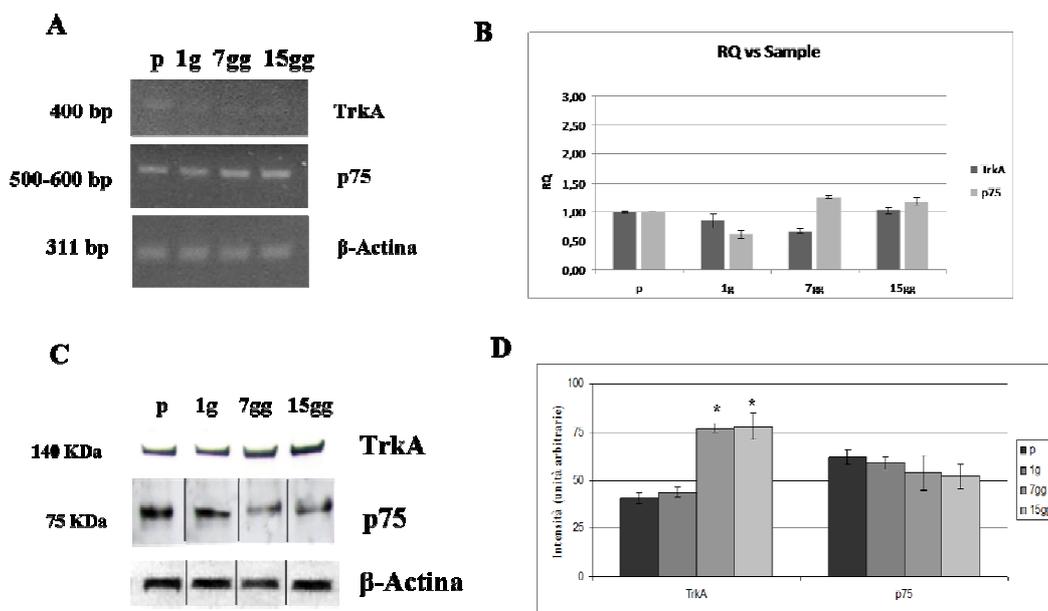


Fig. 10 Analisi dell'espressione del mRNA per i recettori del NGF (TrkA e p75) e della sintesi delle proteine recettoriali mature per la neurotrofina in podociti proliferanti e in corso di differenziamento. L'RNA è stato raccolto dai podociti proliferanti (p) e a differenti stadi della maturazione cellulare (1g, 7gg, 15gg: giorni di differenziamento). I livelli di mRNA per i recettori sono stati valutati mediante RT-PCR (A) e Real-Time PCR (B). I lisati totali di podociti proliferanti (p) e a differenti stadi del differenziamento (1g, 7gg, 15gg) sono stati testati separatamente con gli anticorpi per i recettori TrkA e p75 e analizzati mediante metodica di Western blotting (C). Come controllo interno è stata usata la proteina β -actina. (D) Quantizzazione dei livelli di TrkA e p75 normalizzati per la proteina β -actina. I dati sono espressi come medie \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. * $P < 0.05$ vs p (proliferanti).

L'analisi dell'espressione proteica dei recettori per il NGF è stata ulteriormente validata mediante metodica di immunofluorescenza in podociti, coltivati in condizioni permissive o non permissive per 15 giorni. I risultati hanno dimostrato che, analogamente a quanto evidenziato con la metodica di Western Blotting, sia i podociti immaturi, che completamente differenziati, esprimono in forma matura entrambi i recettori per il NGF.

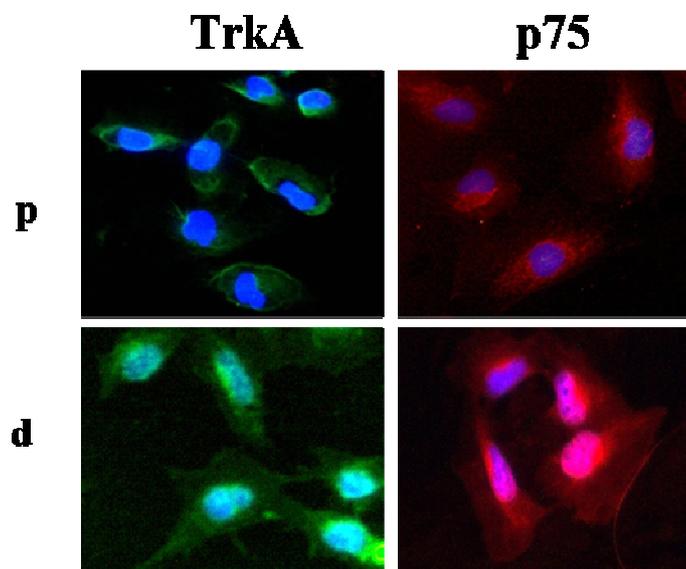


Fig. 11. Analisi mediante immunofluorescenza dell'espressione proteica dei recettori TrkA e p75 in podociti umani immaturi (p) e completamente differenziati (d). I podociti umani in entrambe le condizioni sperimentali sono stati separatamente immunomarcati con l'anticorpo policlonale anti-p75 (rosso) o l'anticorpo policlonale anti-TrkA (verde). Il nucleo è stato marcato con il DAPI (blu).

c) Analisi della localizzazione subcellulare dei recettori per il NGF.

La distribuzione dei recettori per il NGF a livello sub-cellulare è stata condotta, in podociti proliferanti o completamente maturi, attraverso la metodica di Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM). Come illustrato nelle figure 12 e 13 i risultati hanno

dimostrato come nei podociti indifferenziati il recettore p75NTR sia localizzato a livello della membrana cellulare (Fig. 12 pannello 1A), della regione perinucleare e della membrana nucleare (Fig 12 pannello 1B). Una analoga distribuzione del recettore è stata osservata nei podociti maturi (Fig. 13 1A e 1B), associata ad una concomitante presenza di p75NTR a livello citosolico (Fig. 13 pannello 1). Diversamente da p75NTR, nei podociti immaturi l'espressione di TrkA è unicamente a livello della membrana cellulare (Fig. 12 Pannello 2A), mentre una localizzazione più estesa del recettore ad alta affinità per il NGF, a livello del nucleo e del citosol, è stata invece osservata nei podociti maturi (Fig. 13 pannello 2B). Infine, come illustrato nelle Fig. 12 pannello 1C e Fig. 12 pannello 2C entrambi i recettori per la neurotrofina sono presenti a livello della membrana mitocondriale interna, unicamente nei podociti fenotipicamente immaturi.

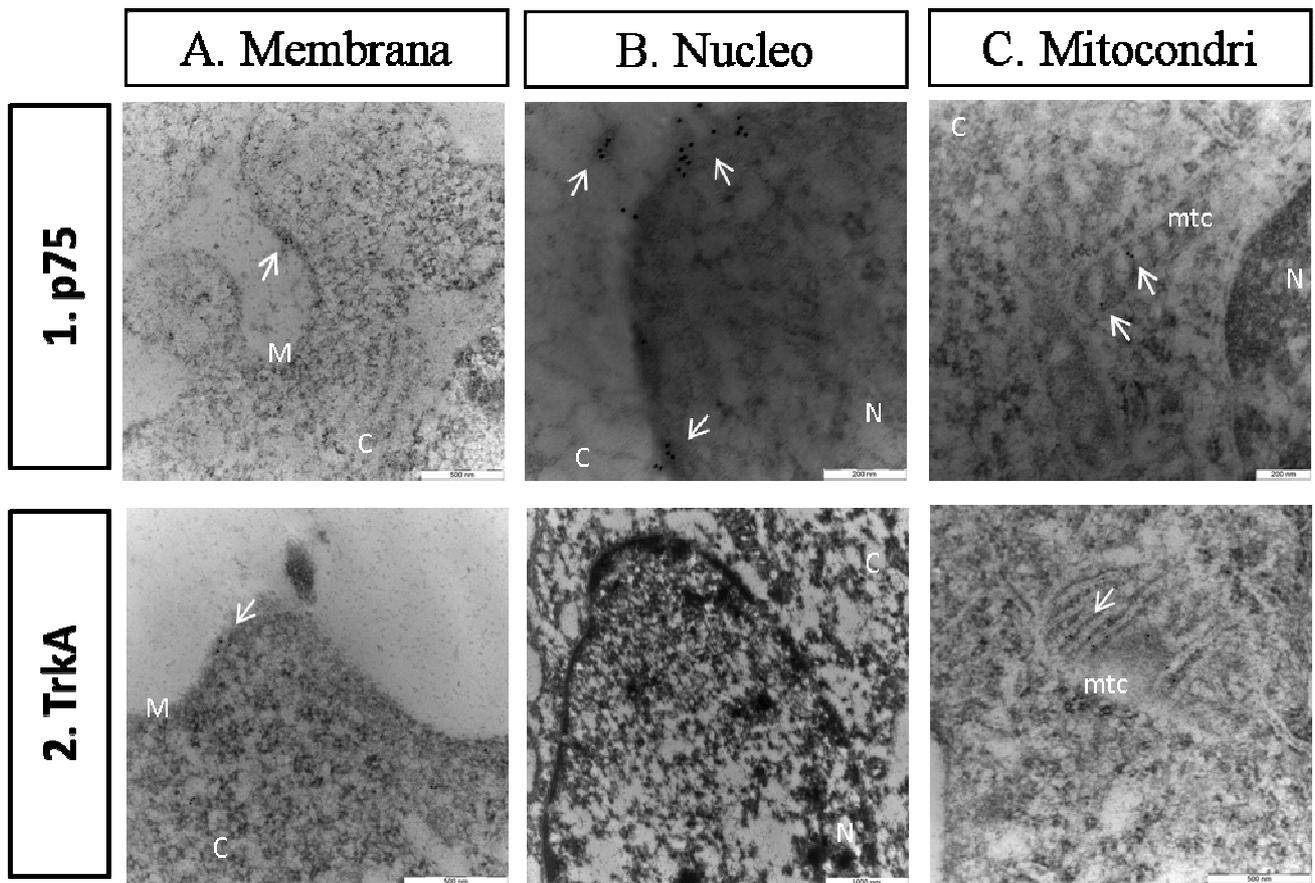


Fig. 12 Analisi della localizzazione subcellulare dei recettori per il NGF, TrkA e p75, in podociti indifferenziati, mediante Microscopia Elettronica. Ingrandimento: 50000x (1A); 125000x (1B); 80000x (1C); 63000x (2A); 25000x (2B); 63000x (2C). N: nucleo; C: citosol; mtc: mitocondrio.

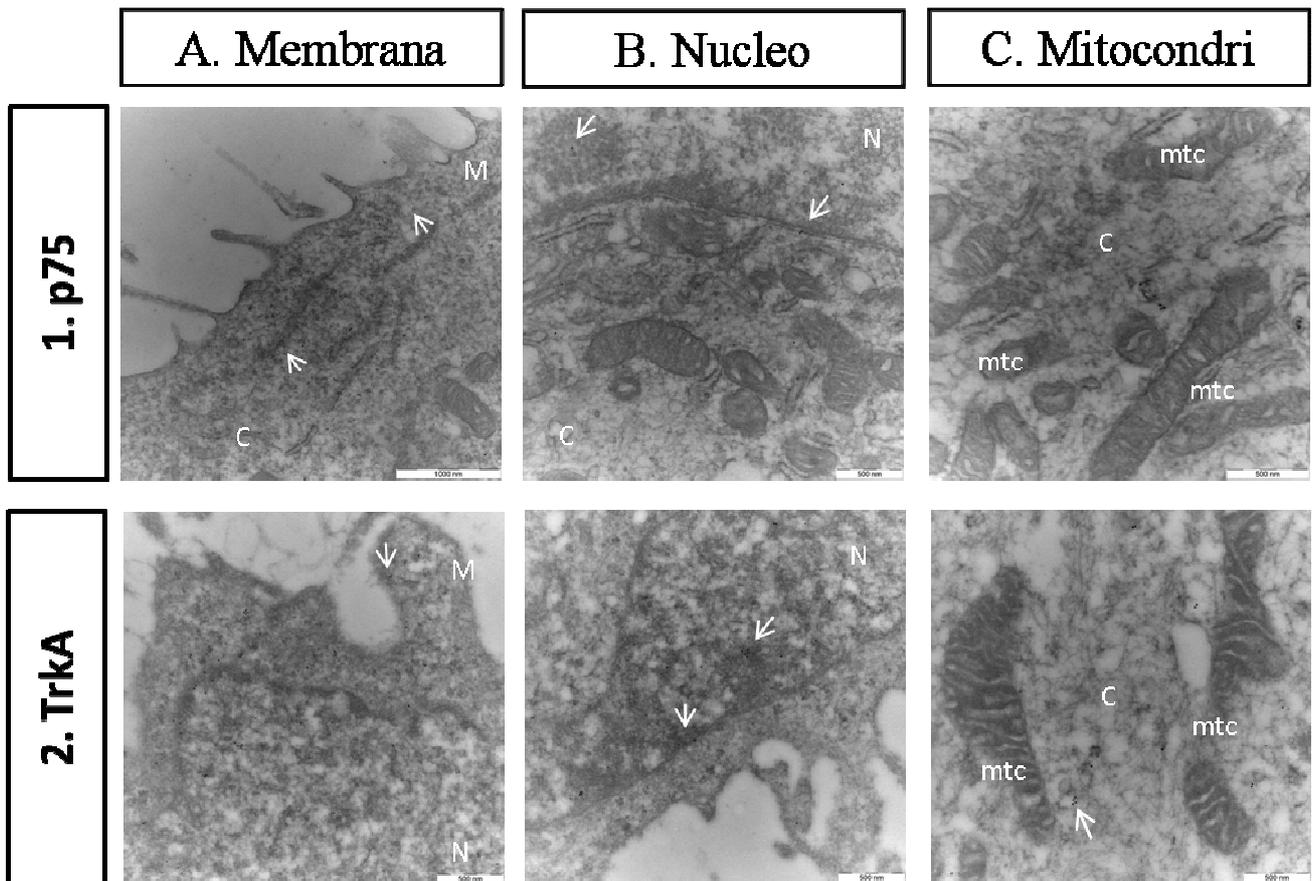


Fig. 13 Analisi della localizzazione subcellulare dei recettori per il NGF, TrkA e p75, in podociti completamente differenziati, mediante Microscopia Elettronica. Ingrandimento: 31500x (1A); 40000x (1B); 50000x (1C); 40000x (2A); 40000x (2B); 50000x (2C). N: nucleo; C: citosol; mtc: mitocondrio.

4.2 STUDIO DELLA LOCALIZZAZIONE MITOCONDRIALE DEI RECETTORI PER IL NGF

a) Caratterizzazione

La localizzazione mitocondriale dei recettori per il NGF è stata ulteriormente analizzata, in colture di podociti umani mantenute in condizioni permissive o non permissive, mediante metodica di immunofluorescenza. A tal fine, i podociti, in entrambe le condizioni sperimentali, sono stati marcati con uno specifico colorante mitocondriale

(mitotraker-red) (Figura 14 pannelli b e f; Figura 15 pannelli b e f) e successivamente immunomarcati, con l'anticorpo anti-p75 o con l'anticorpo anti-TrkA. Come controllo negativo le cellule sono state esposte al solo anticorpo secondario. Come illustrato in Fig 14 (pannelli d e h) nei podociti immaturi entrambi i recettori per la neurotrofina sono co-localizzati a livello mitocondriale, mentre (Fig. 15 pannelli d e h) nei podociti fenotipicamente maturi p75NTR e TrkA sono espressi in compartimenti sub-cellulari distinti.

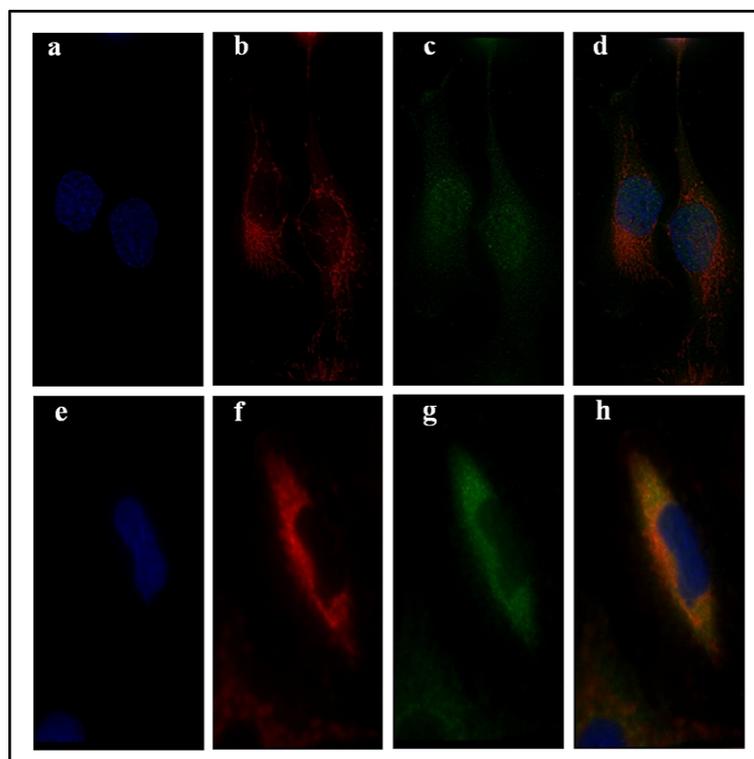


Fig. 14 Analisi mediante Immunofluorescenza della localizzazione subcellulare dei recettori TrkA e p75 in podociti umani indifferenziati. I podociti umani indifferenziati sono stati incubati con il mitotraker-red (b ed f) e separatamente immunomarcati con l'anticorpo policlonale anti-p75 (c) o l'anticorpo policlonale anti-TrkA (g). Il nucleo è stato marcato con il DAPI, blu (a ed e). La colorazione gialla indica la colocalizzazione dei mitocondri (rossi) rispettivamente con p75 (d) o TrkA (h), colorati di verde.

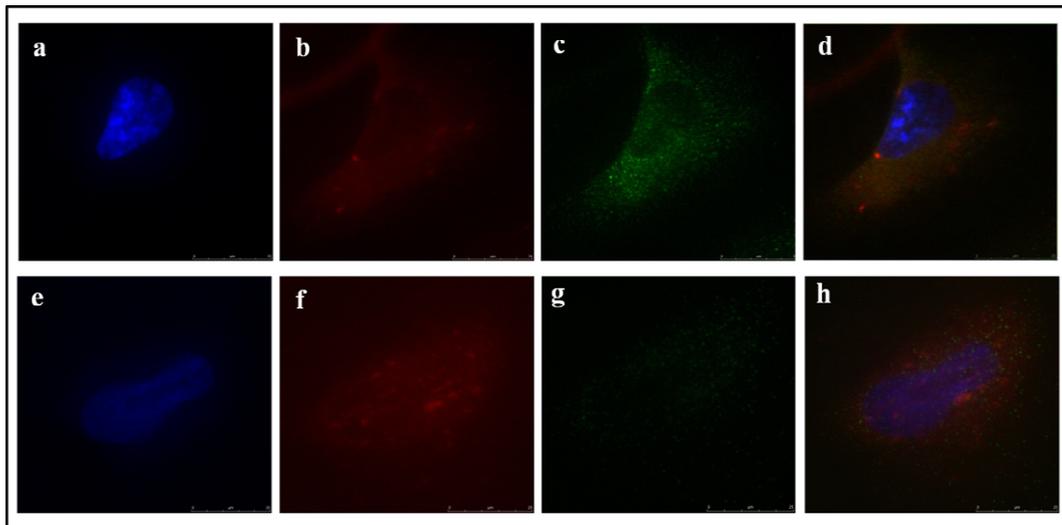


Fig. 15 Analisi mediante Immunofluorescenza della localizzazione subcellulare dei recettori TrkA e p75 in podociti umani maturi. I podociti umani completamente maturi sono stati incubati con il mitotraker-red (b ed f) e separatamente immunomarcati con l'anticorpo policlonale anti-p75 (c) o l'anticorpo policlonale anti-TrkA (g). Il nucleo è stato marcato con il DAPI, blu (a ed e). La colorazione gialla indica la colocalizzazione dei mitocondri (rossi) rispettivamente con p75 (d) o TrkA (h), colorati di verde.

La localizzazione mitocondriale dei recettori per il NGF è stata ulteriormente approfondita mediante metodica di western blotting e riconoscimento con anticorpi specifici. La stima dei livelli di COX IV ha consentito di valutare l'uniformità della quantità di proteine totali mitocondriali caricate sul gel. I risultati (Fig. 16) hanno dimostrato nei lisati mitocondriali provenienti da podociti immaturi (colonne p) la presenza di una banda di peso molecolare pari a 145 kDa corrispondente alla proteina recettoriale TrkA (Fig. 16A) e di una banda di peso molecolare pari a 75 kDa corrispondente al recettore p75NTR (Fig. 16B). Per contro la metodica di western blotting non ha evidenziato nei lisati mitocondriali provenienti da colture di podociti

fenotipicamente maturi (colonne d) la presenza della proteine recettoriali TrkA e p75NTR.

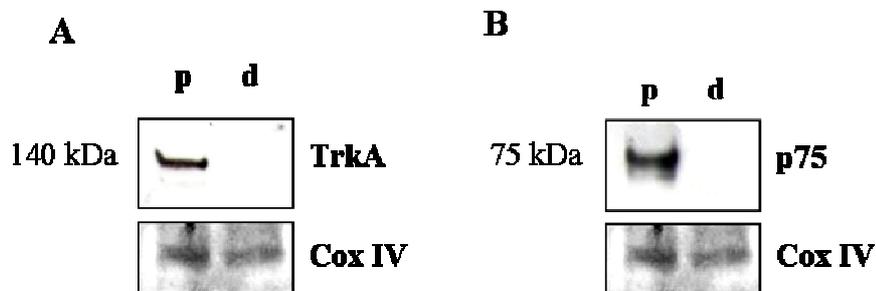


Fig. 16 Studio della localizzazione mitocondriale dei recettori TrkA e p75 mediante metodica di Western blotting. I lisati mitocondriali di podociti proliferanti (p: podociti proliferanti) e completamente differenziati (d: podociti differenziati) sono stati testati separatamente con gli anticorpi per i recettori TrkA (A) e p75 (B) e analizzati mediante metodica di Western blotting. La proteina mitocondriale Cox IV è stata utilizzata come controllo interno.

b) Valutazione del possibile ruolo funzionale svolto dai recettori per il NGF a livello mitocondriale

Il possibile ruolo funzionale svolto nella popolazione cellulare podocitaria immatura dai recettori per il NGF presenti a livello mitocondriale è sconosciuto. Analogamente a quanto dimostrato per TrkA e p75NTR di membrana (Epa *et al.*, 2004), la concomitante presenza dei recettori per il NGF nella membrana mitocondriale interna dei podociti immaturi potrebbe indurre in questa popolazione cellulare la selettiva attivazione delle ERK 1/2 mitocondriali. Per valutare questa ipotesi lisati mitocondriali provenienti da podociti immaturi (p: proliferanti) o completamente differenziati (d: differenziati) sono stati analizzati mediante metodica di western blotting e riconoscimento con anticorpi

specifici. Come illustrato in Fig. 17 i livelli proteici di p38MAPK fosforilata mitocondriale sono simili in entrambe le condizioni sperimentali, mentre l'espressione mitocondriale delle ERK1/2 fosforilate è più alta nei podociti indifferenziati rispetto alla popolazione cellulare fenotipicamente matura. Nell'insieme i presenti risultati suggeriscono l'attivazione a livello mitocondriale di un selettivo pathway di trasduzione del segnale che potrebbe essere correlato con la concomitante espressione dei recettori per il NGF.

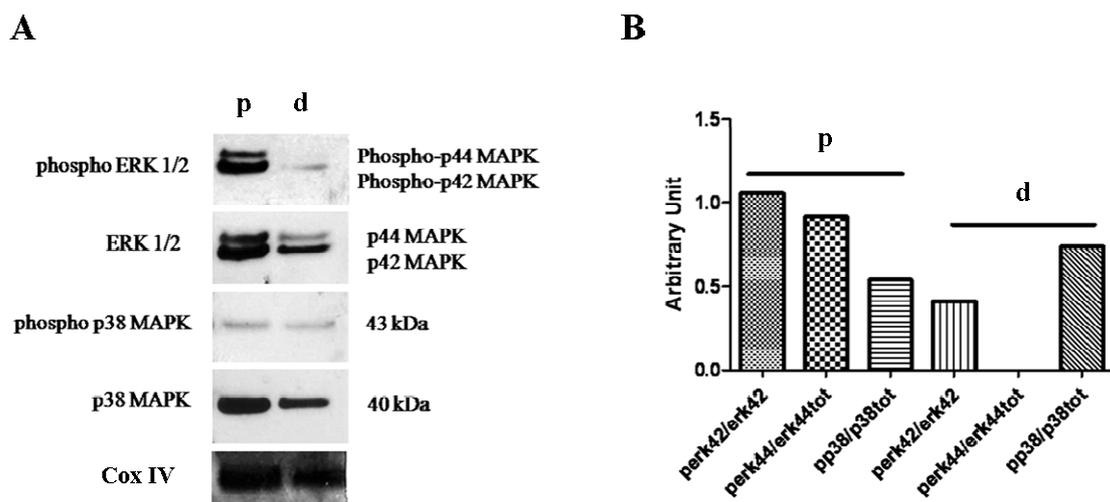


Fig. 17 Espressione di ERK1/2 e p38MAPK mitocondriali. (A) L'analisi mediante WB di lisati mitocondriali provenienti da podociti immaturi (p) e completamente differenziati (d) è stata condotta utilizzando gli anticorpi fosfo-p44/42 MAPK (fosfo-ERK1/2), p44/42 MAPK (ERK1/2), fosfo-p38 MAPK e p38 MAPK. La proteina mitocondriale Cox IV è stata utilizzata come controllo interno. (B) Quantizzazione dei livelli di fosfo-ERK1/2 e fosfo-p38 normalizzati rispettivamente per ERK1/2 totale e p38 totale. I dati sono espressi come medie \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. **P<0.01 vs p (proliferanti).

Un ulteriore aspetto della caratterizzazione funzionale è stata l'analisi dell'associazione dei recettori per il NGF con specifiche proteine mitocondriali quali la traslocasi per il nucleotide Adenina (ANT) e la fosfodiesterasi 4 isoforma A5 (PDE4A5), coinvolte rispettivamente nel trasporto ATP/ADP e nel controllo dei livelli di cAMP mitocondriali. A tal fine i lisati mitocondriali di podociti fenotipicamente immaturi sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo specifico per la proteina ANT o con l'anticorpo specifico per la proteina PDE4. Gli immunoprecipitati sono stati poi analizzati con metodica di western blotting e saggiati con l'anticorpo diretto contro la proteina p75NTR o con l'anticorpo diretto contro la proteina TrkA.

I risultati hanno dimostrato la presenza di una specifica banda di 75kDa negli immunoprecipitati individualmente saggiati con l'anticorpo anti-p75NTR, indicando un'interazione tra il recettore a bassa affinità per il NGF ed il carrier mitocondriale ANT (Fig. 18A) e la PDE4A (Fig. 18B). Il saggio individuale degli immunoprecipitati con l'anticorpo anti-TrkA non ha evidenziato alcuna interazione fra il recettore ad alta affinità per il NGF e le proteine mitocondriali ANT e PDE4A (dato non mostrato).

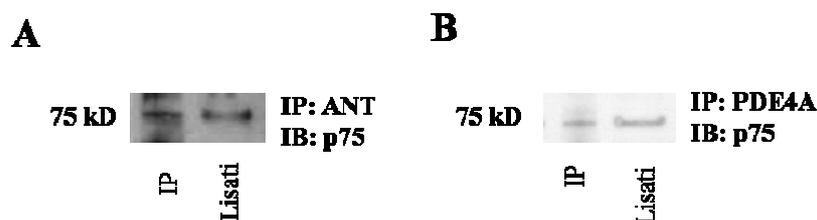


Fig. 18. Analisi mediante immunoprecipitazione dell'associazione del recettore p75 con le proteine mitocondriali ANT (A) e PDE4A (B). I lisati mitocondriali di podociti fenotipicamente immaturi sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo specifico per la proteina ANT (A) o con l'anticorpo specifico per la proteina PDE4 (B). Gli immunoprecipitati sono stati poi analizzati mediante metodica di western blotting e saggiati con l'anticorpo diretto contro la proteina p75NTR.

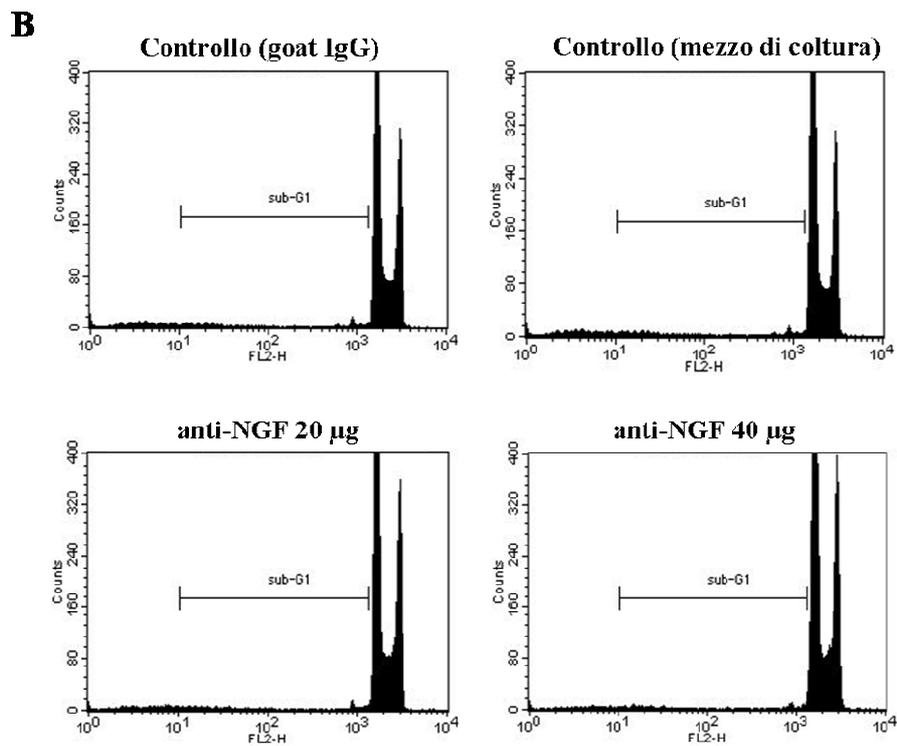
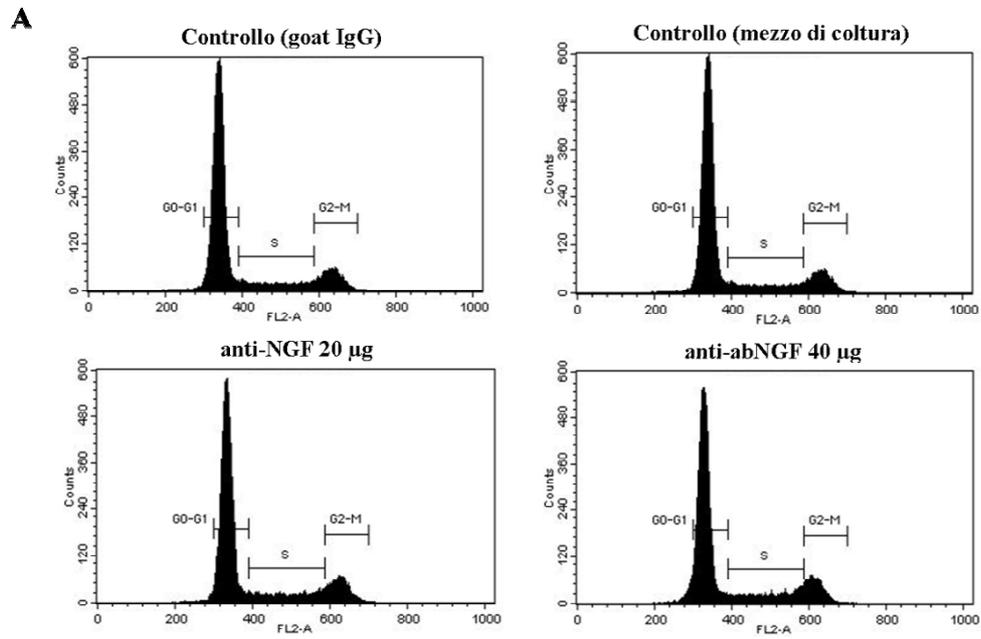
4.3 STUDIO FUNZIONALE DEL SISTEMA NGF/RECETTORI PER IL NGF IN PODOCITI UMANI IMMaturi ED IN CORSO DI DIFFERENZIAMENTO MEDIANTE DEPRIVAZIONE DELLA NEUROTROFINA ENDOGENAMENTE PRODOTTA

a) Studio del ruolo del NGF nei podociti umani immaturi

La dimostrazione della capacità dei podociti di produrre e rilasciare NGF e dell'espressione in vari compartimenti cellulari dei recettori per la neurotrofina, suggerisce che il NGF potrebbe essere un fattore implicato nelle fasi di maturazione e nei cambiamenti strutturali che si osservano nel corso del differenziamento podocitario. In particolare, nei podociti immaturi la neurotrofina, mediando la sua azione attraverso l'attivazione dei suoi recettori, potrebbe essere un elemento chiave nel mantenimento della sopravvivenza cellulare o dello stato proliferativo. Per valutare tale ipotesi le cellule podocitarie immature sono state trattate per 24 ore con anticorpi anti-NGF, alla concentrazione di 20 e 40 µg/ml al fine di bloccare l'attività biologica svolta dalla neurotrofina. Le colture di controllo sono state allestite esponendo le cellule podocitarie al trattamento, alle stesse concentrazioni e per lo stesso intervallo di tempo, con IgG di capra. Le cellule sono state colorate con Ioduro di Propidio e analizzate mediante citofluorimetria con un BD FACS Calibur Flow Cytometer al fine di valutare il ciclo cellulare. La percentuale di cellule nelle fasi S, G0-G1, G2-M e sub-G1 è stata analizzata usando il software CellQuest.

Come illustrato nelle Figg. 19A, 19B e 19C il trattamento dei podociti immaturi con anticorpi anti-NGF mostra, per tutte le condizioni sperimentali, un simile pattern citofluorimetrico, dimostrando che l'esposizione all'anticorpo anti-NGF, ad entrambe le concentrazioni utilizzate, non modifica il profilo di distribuzione delle cellule nelle varie

fasi del ciclo cellulare rispetto al controllo esposto alle IgG di capra o al solo mezzo di coltura.



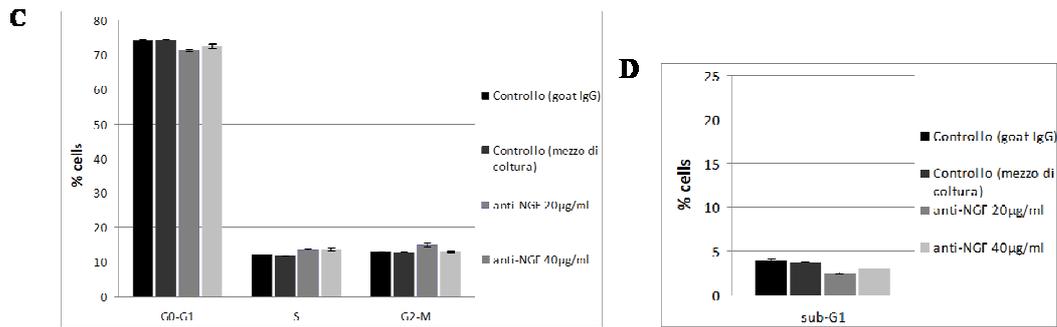


Fig. 19 Analisi del ciclo cellulare dei podociti di controllo (esposti alle IgG di capra o al solo mezzo di coltura) o trattati con anticorpo anti-NGF. (A) I podociti proliferanti sono stati trattati con anti-NGF 20µg/ml e anti-NGF 40µg/ml ed è stata valutata la percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare attraverso analisi citofluorimetrica 24h dopo il trattamento. Il profilo della distribuzione cellulare ed i valori percentuali sono rappresentativi di uno di tre esperimenti con risultati simili. In grafico (C) sono indicate le percentuali di cellule in fase G0-G1, S, G2-M. (B) Analisi della percentuale di cellule in fase sub-G1. I podociti proliferanti sono stati trattati con anti-NGF 20µg/ml e anti-NGF 40µg/ml ed è stata valutata la percentuale di cellule nella fase sub-G1 del ciclo cellulare attraverso analisi citofluorimetrica 24 h dopo il trattamento. Il profilo della distribuzione cellulare ed i valori percentuali sono rappresentativi di uno di tre esperimenti i. In grafico (D) sono indicate le percentuali di cellule in fase sub-G1.

Le colture di podociti immaturi sono state inoltre sottoposte ad analisi mediante western blotting (Fig.20) e di imaging mediante TEM (Fig.21) al fine di valutare se il trattamento con anticorpi anti-NGF inducesse una variazione dei livelli proteici di TrkA e p75NTR o della localizzazione subcellulare dei recettori per la neurotrofina. Le cellule sono state trattate secondo lo schema sperimentale su descritto: con il solo mezzo di coltura, con le IgG di capra o con l'anticorpo anti NGF; avendo ottenuto, mediante citofluorimetria, risultati simili in seguito ad esposizione delle cellule ad entrambe le concentrazioni di anticorpo anti-NGF, per gli esperimenti successivi di western blotting e microscopia elettronica le cellule sono state esposte esclusivamente all'anticorpo anti-NGF, alla concentrazione di 40 µg/ml. I risultati hanno dimostrato che l'esposizione dei

podociti immaturi agli anticorpi anti-NGF non modifica (Fig. 20) i livelli proteici di TrkA o di p75NTR né (Fig. 21A, B e C) la distribuzione subcellulare dei recettori per la neurotrofina rispetto alle colture di controllo esposte alle IgG di capra o al solo mezzo di coltura.

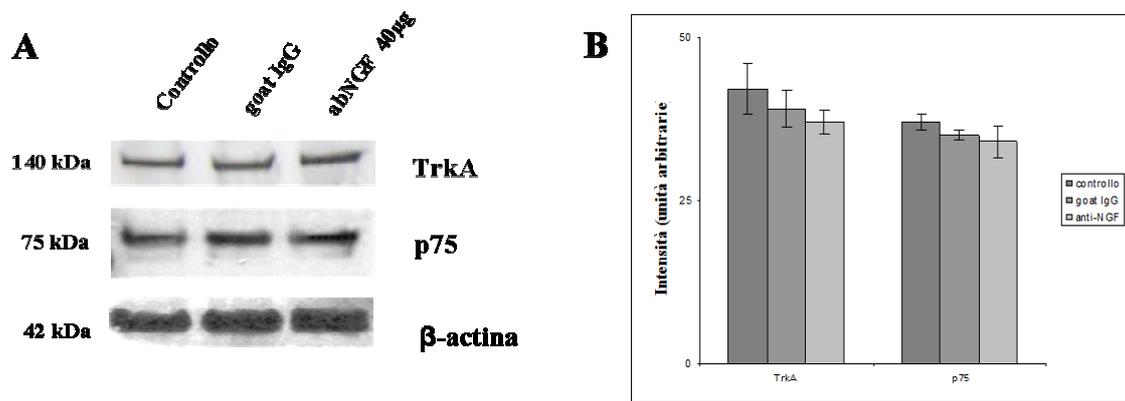
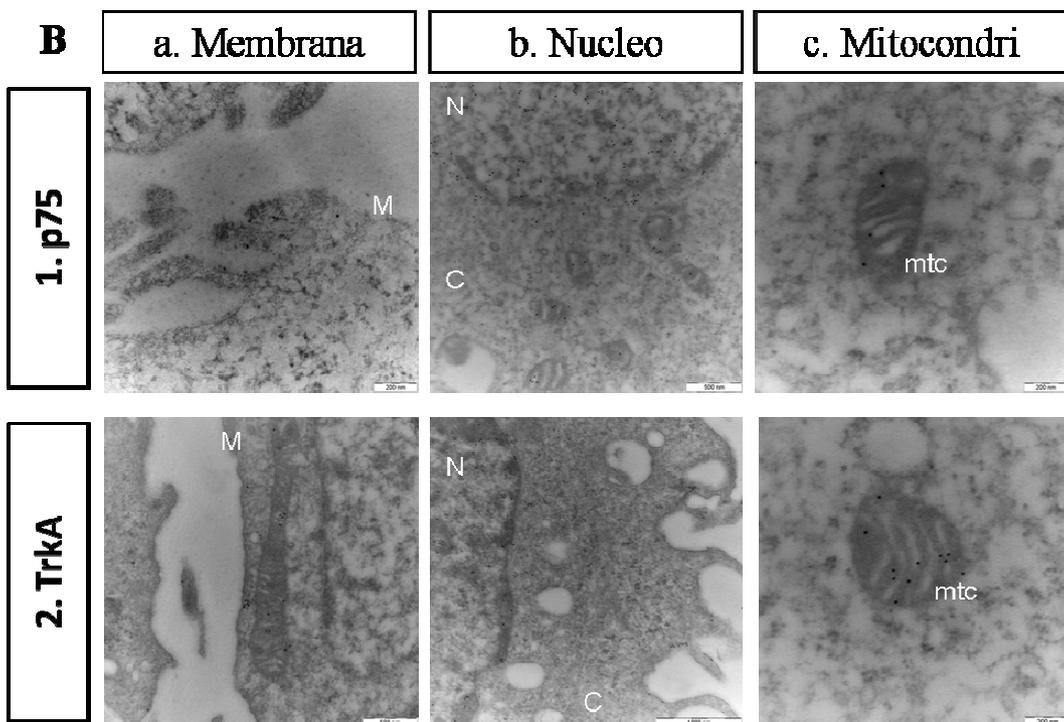
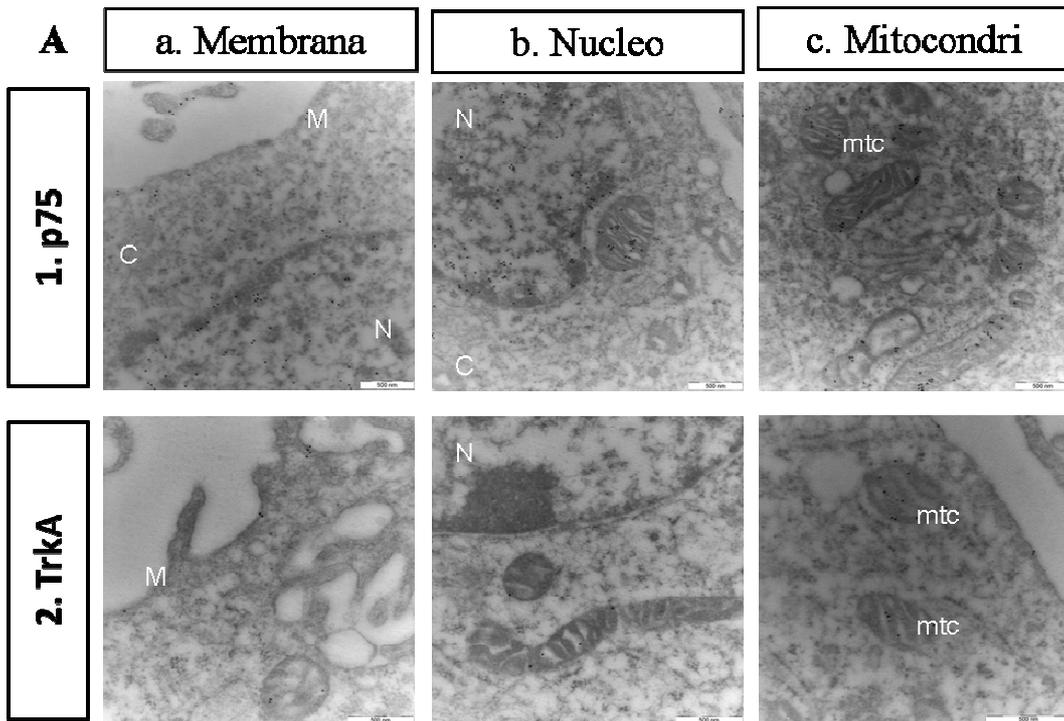


Fig. 20 Analisi mediante Western Blotting dell'espressione dei recettori TrkA e p75 in podociti esposti ad anticorpi anti-NGF. (A) I lisati totali di podociti di controllo (esposti al solo mezzo di coltura), di podociti esposti alle IgG di capra e di podociti esposti all'anticorpo anti-NGF (40µg/ml) sono stati testati separatamente con gli anticorpi per i recettori TrkA e p75 e analizzati mediante metodica di Western blotting. La proteina β-actina è stata utilizzata come controllo interno. (B) Analisi densitometrica dei livelli di TrkA e p75 normalizzati per la proteina β-actina. I dati sono espressi come media ± SEM di tre esperimenti indipendenti.



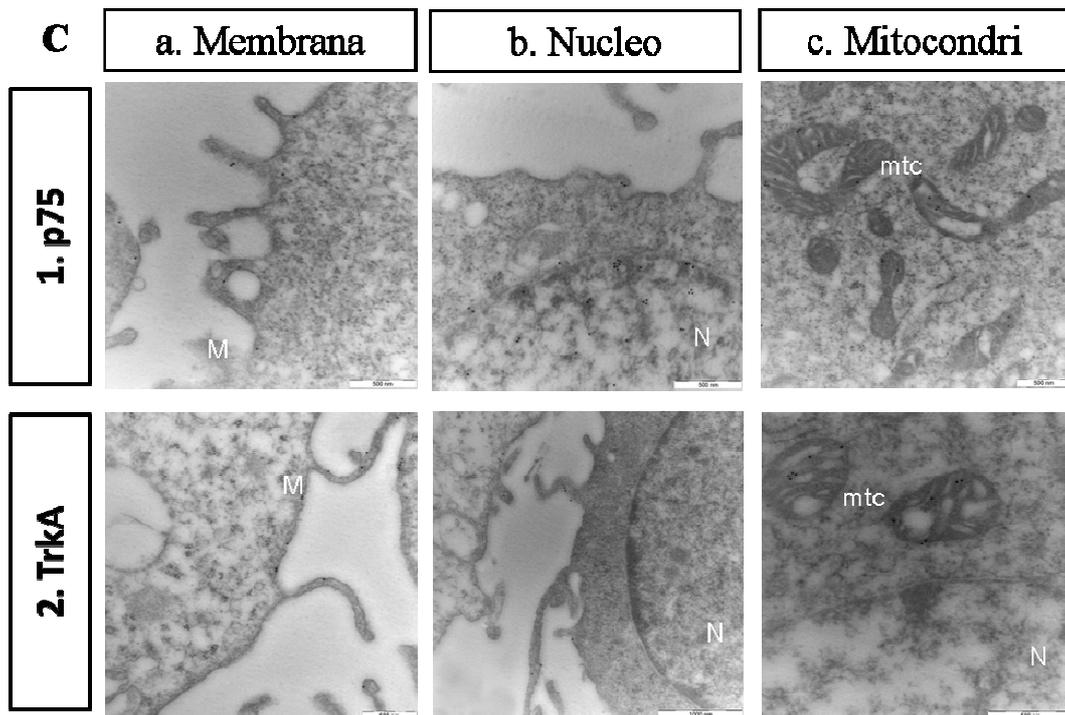


Fig. 21 Analisi della localizzazione subcellulare dei recettori per il NGF, TrkA e p75, in (A) podociti di controllo esposti al solo mezzo di coltura, (B) podociti di controllo esposti alle IgG di capra e (C) podociti esposti a trattamento con anti-NGF 40µg/ml. (A) Ingrandimento: 1a 50000x; 1b 40000x; 1c 40000x; 2a: 50000x; 2b: 50000x; 2c: 63000x. (B) Ingrandimento: 1a: 50000x; 1b: 50000x; 1c:40000x; 2a: 40000x; 2b: 31500x;2c: 63000x. (C) Ingrandimento: 1a: 50000x; 1b 50000x; 1c: 40000x; 2a: 40000x; 2b: 31500x; 2c: 63000x.

b) Studio del ruolo di NGF nel corso del differenziamento podocitario

Al fine di valutare le possibili implicazioni della neurotrofina nel processo di maturazione cellulare e a livello delle proteine del citoscheletro, sono stati condotti esperimenti di deprivazione del NGF endogenamente prodotto dai podociti durante le fasi del differenziamento cellulare. Le cellule sono state fatte crescere in condizioni permissive fino al 70-80% di confluenza e successivamente incubate alla temperatura non-permissiva di 37°C, per consentire così alle cellule di acquisire il fenotipo

differenziato. Dopo 6 giorni dal thermo-switching a 37°C, le cellule sono state sottoposte a trattamento cronico con anti-NGF (40 µg/ml) per 7 giorni, al fine di bloccare l'attività biologica della neurotrofina fisiologicamente prodotta, o con IgG di capra alla stessa concentrazione o esposte al solo mezzo di coltura. Completati i 15 giorni di maturazione le colture podocitarie sono sottoposte ad analisi ultrastrutturale mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) (Fig. 22) ed analizzate con metodica di western blotting al fine di evidenziare alterazioni nei livelli proteici dei recettori per la neurotrofina (Fig. 23).

Come illustrato in Fig.22, i risultati hanno dimostrato che rispetto alle colture di controllo, dove si osserva una corretta morfologia cellulare con corretta distensione dei pedicelli, nei podociti in fase di differenziamento la deprivazione dell'attività biologica della neurotrofina indotta dal trattamento con anticorpi anti-NGF induce la comparsa di un fenotipo non correttamente maturo con evidenti alterazioni strutturali. L'analisi dell'espressione dei recettori per la neurotrofina condotta mediante western blotting (Fig. 23) non ha evidenziato alcuna variazione nei livelli proteici di TrkA e p75NTR in tutte le condizioni sperimentali adottate.

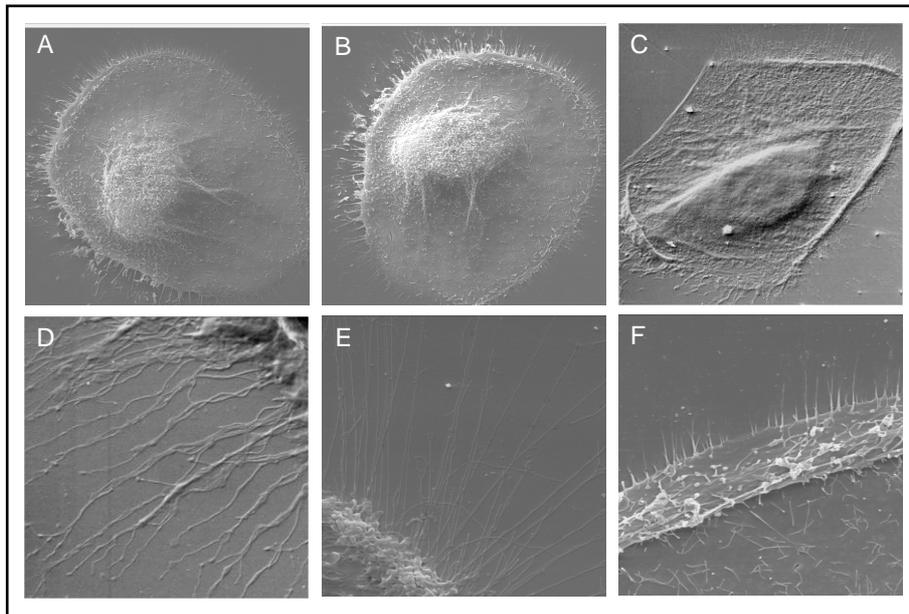


Fig. 22 Analisi ultrastrutturale mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) in podociti di controllo esposti al solo mezzo di coltura (A: ingrandimento 892x e D: ingrandimento 3500x), in podociti esposti alle IgG di capra (B: ingrandimento 865x e E ingrandimento 3500x) e in podociti esposti all'anticorpo anti-NGF (C: ingrandimento 876x e F: ingrandimento 3500x)

Poiché il trattamento cronico con anticorpi anti-NGF nei podociti in fase di differenziamento induce la comparsa di un'anomala organizzazione del citoscheletro sono stati condotti ulteriori esperimenti al fine di valutare l'effetto della deprivazione dell'attività biologica delle neurotrofina sull'espressione di proteine chiave coinvolte nella corretta maturazione fenotipica podocitaria. In particolare sono state valutate eventuali modificazioni nell'espressione genica della sinaptopodina mediante metodica di real time PCR. 100 ng dell'RNA estratto dai podociti esposti al solo mezzo di coltura e dai podociti trattati cronicamente con anticorpi anti-NGF (40 µg/ml) o con IgG di capra dal 6° al 15° giorno di differenziamento, sono stati convertiti in cDNA mediante

retrotrascrizione. Sui cDNA così prodotti ed opportunamente diluiti è stata effettuata l'amplificazione di una porzione del gene della sinaptopodina mediante primers specifici. I risultati ottenuti sono stati validati confrontandoli con quelli di primers specifici per la β -actina. La valutazione quantitativa ha permesso di evidenziare (Fig. 23A) come in tutte le condizioni sperimentali adottate non vi sia una differenza significativa dei livelli di mRNA per la sinaptopodina.

La quantificazione dei livelli proteici della sinaptopodina nei podociti in corso di maturazione fenotipica esposti al solo mezzo di coltura o al trattamento cronico con IgG di capra o con anticorpi anti-NGF (40 μ g/ml) dal 6° al fino 15° giorno del differenziamento è stata condotta mediante metodica di Western Blotting e riconoscimento con anticorpi specifici. Per valutare l'uniformità della quantità di proteine totali caricate sul gel sono stati stimati i livelli di β -actina presenti a livello cellulare. I risultati hanno dimostrato (Fig. 23B e 23C) che nei podociti in corso di maturazione fenotipica il trattamento cronico con anticorpi anti-NGF induce una riduzione dei livelli proteici di sinaptopodina rispetto alle colture podocitarie di controllo, indicando che il NGF regola a livello post-traduzionale la proteina del citoscheletro.

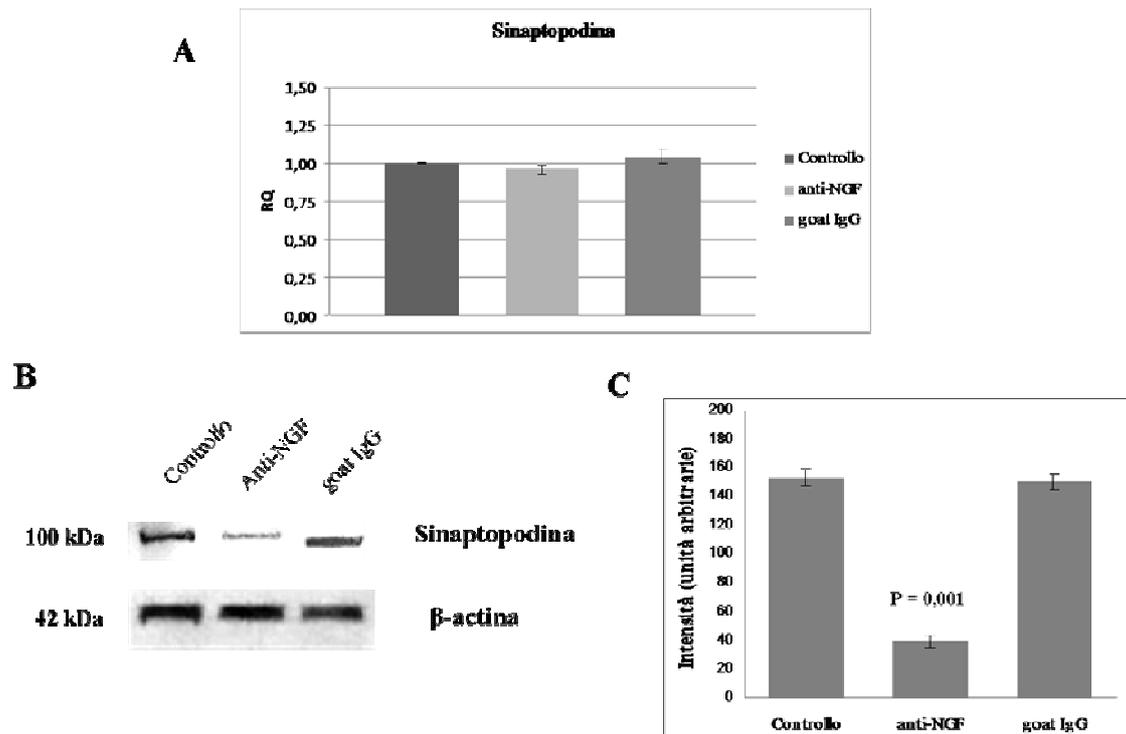


Fig. 23 Analisi dell'espressione genica, mediante Real Time PCR (A), e dei livelli proteici, mediante WB, della sinaptopodina (B,C). (A) L'RNA totale è stato raccolto dai podociti di controllo esposti al mezzo di coltura, dai podociti esposti alle IgG di capra e dai podociti trattati con anti-NGF. I livelli di mRNA per la sinaptopodina sono stati valutati mediante Real-Time PCR (B) I lisati totali di podociti di controllo (esposti al solo mezzo di coltura), di podociti esposti alle IgG di capra e di podociti esposti all'anticorpo anti-NGF (40µg/ml) sono stati testati con l'anticorpo specifico per la sinaptopodina e analizzati mediante metodica di Western blotting. La proteina beta-actina è stata utilizzata come controllo interno. (C) Analisi densitometrica dei livelli di TrkA e p75 normalizzati per la proteina beta-actina. I dati sono espressi come media ± SEM di tre esperimenti indipendenti. P=0,001 vs controllo.

c) Studio delle vie di trasduzione del segnale NGF-mediate coinvolte nella regolazione della sinaptopodina in podociti umani in corso di maturazione fenotipica ed esposti a trattamento cronico con anticorpi anti -NGF.

Evidenze sperimentali indicano che il recettore a bassa affinità per il NGF, p75NTR, è coinvolto nel controllo del pathway cAMP/PKA mediante interazione con la PDE4A (Sachs *et al.*, 2007). Poiché la fosforilazione PKA-mediata rappresenta il meccanismo

attraverso cui la sinaptopodina è protetta dal clivaggio da parte della L-catepsina (Mundel and Reiser, 2010; Reiser *et al.*, 2010) sono state intraprese ulteriori analisi volte a validare l'ipotesi di un possibile coinvolgimento del NGF nella modulazione dell'espressione della proteina del citoscheletro attraverso il suo recettore p75NTR. A tal fine i lisati proteici totali di podociti differenziati esposti per 15 giorni al solo mezzo di coltura (cellule di controllo) o trattati con IgG di capra o anticorpi anti-NGF (40 µg/ml) dal 6° al 15° giorno del differenziamento, sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo specifico per la proteina p75NTR e successivamente saggiati con l'anticorpo diretto contro la proteina PDE4A mediante metodica di western blotting. Come illustrato in Fig. 24 il saggio degli immunoprecipitati con l'anticorpo anti-PDE4A ha rivelato la presenza di una banda di peso molecolare pari a 109 kDa, corrispondente alla PDE4A isoforma 5, in tutti i campioni analizzati, con un incremento della sua intensità negli immunoprecipitati dei podociti trattati cronicamente con gli anticorpi anti-NGF rispetto a quelli provenienti dalle colture podocitarie di controllo.

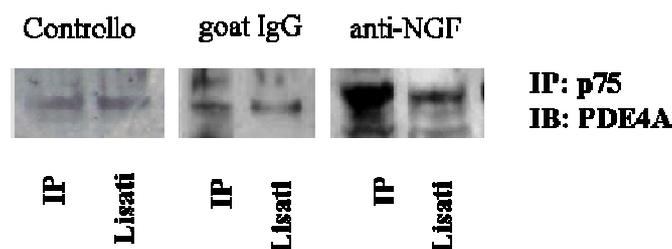


Fig. 24 Analisi mediante immunoprecipitazione dell'associazione del recettore p75 con le proteina PDE4A. I lisati totali di podociti maturi di controllo, esposti alle IgG di capra o esposti all'anticorpo anti-NGF sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo specifico per la proteina p75. Gli immunoprecipitati sono stati poi analizzati mediante metodica di western blotting e saggiati con l'anticorpo diretto contro la proteina PDE4A.

Nel complesso tali risultati indicano che nei podociti in corso di differenziamento e maturi il recettore per il NGF p75NTR forma un complesso con la PDE4A. La dimostrazione di un aumento del recruitment della PDE4A da parte di p75NTR nei podociti in corso di maturazione fenotipica esposti cronicamente al trattamento con anticorpi anti-NGF suggerisce che la complessazione fra le due proteine è modulata dal NGF prodotto endogenamente. La riduzione dei livelli di cAMP e il coinvolgimento della PDE4A nelle cellule podocitarie in corso di differenziamento esposte cronicamente dal 6° al 15° giorno ad anticorpi anti-NGF è stato ulteriormente confermato mediante trattamento farmacologico con specifici inibitori della fosfodiesterasi. A tal fine i podociti in corso di differenziamento, trattati cronicamente dal 6° al 15° giorno con anticorpi anti-NGF (40 µg/ml), sono stati esposti per 16h a 100 ng/ml di tossina della pertosse (PTX). Per l'inibizione dell'attività fosfodiesterasica le cellule sono state trattate per 16h con IBMX (isobutil-metilxantina) alle dose di 500 µM, o con 8-metossimetil-3-isobutil-1-metilxantina (inibitore della PDE1) alla dose di 18.7 µM, o con eritro-9-(2-idrossi-3nonil)adenina (inibitore PDE2) alla dose di 80 µM, o con trequisina (inibitore PDE3) alla dose di 100 nM, o con rolipram (inibitore della PDE4) alla dose di 10 µM. Tutti i campioni, di controllo ed esposti al trattamento cronico con anticorpi anti-NGF, sono stati trattati con forskolin per 1h. Le cellule sono state successivamente lisate mediante opportuna soluzione ed il cAMP è stato misurato mediante saggio ELISA. I risultati (Fig. 25) hanno dimostrato che nei podociti in corso di maturazione fenotipica, trattati cronicamente con anticorpi anti-NGF, i livelli di cAMP intracellulari sono significativamente ridotti rispetto alle colture di controllo. La

dimostrazione che il trattamento con PTX nei podociti trattati cronicamente con anticorpi anti-NGF non induce alcuna variazione del cAMP, mentre l'esposizione delle stesse cellule all'IBMX (Fig. 25) è in grado di ripristinare il nucleotide ciclico ai livelli delle colture di controllo suggerisce il coinvolgimento dell'attività fosfodiesterasica. L'uso di specifici inibitori delle fosfodiesterasi (Fig. 25) ha permesso di dimostrare che solo il rolipram, lo specifico inibitore della PDE4, è in grado di aumentare significativamente i livelli di cAMP nei podociti in corso di differenziamento trattati cronicamente con anticorpi anti-NGF confermando che la riduzione del cAMP p75NTR-indotta è mediata dalla PDE4.

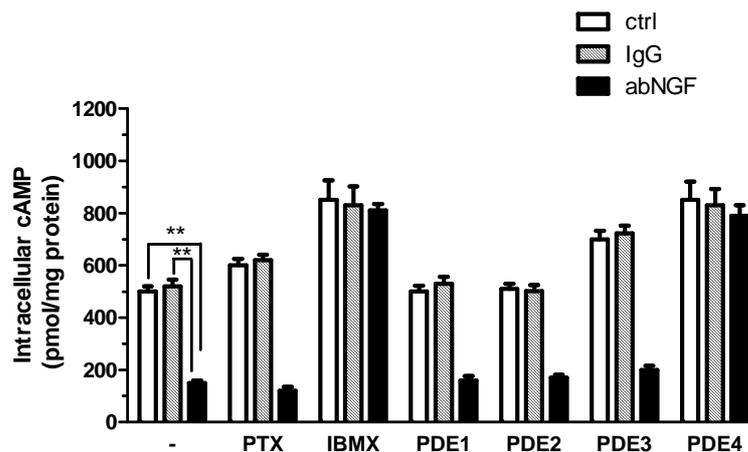


Fig. 25 p75NTR riduce i livelli di cAMP intracellulare mediante interazione con la PDE4. La valutazione dei livelli di cAMP nei podociti in corso di differenziamento esposti al trattamento con anticorpi anti-NGF mostra una riduzione dei livelli intracellulari del nucleotide ciclico rispetto alle colture di controllo o trattate con IgG di capra. Il trattamento con tossina delle pertosse (PTX), IBMX, specifici inibitori per le PDE1, PDE2, PDE3 e PDE4 (rolipram) indica che solo IBMX (IC₅₀ per PDE4 2–50 μ M) e rolipram (IC₅₀ per PDE4 0.8 μ M) ($P < 0.001$) sono in grado di ripristinare i livelli di cAMP nei podociti in corso di differenziamento esposti al trattamento con anticorpi anti-NGF con valori simili alle colture di controllo. Gli esperimenti sono stati condotti per tre volte ed ogni campione è stato testato mediante saggio ELISA in triplicato. I valori sono espressi come media \pm SEM (ANOVA e Tukey-Kramer come post-hoc test).

5. DISCUSSIONE

Il presente lavoro di tesi, mettendo in luce un nuovo ruolo del NGF nel controllo dell'attività biologica della popolazione cellulare podocitaria, si inserisce nell'ambito delle ricerche volte alla valutazione degli effetti che la neurotrofina è in grado di svolgere a livello di svariati tessuti non-neuronali.

I dati ottenuti dimostrano, infatti, che i podociti umani, sia fenotipicamente immaturi che differenziati, possiedono costitutivamente il mRNA per il NGF e per i suoi recettori, (Fig.9A e B; Fig. 10A e B), ed esprimono le proteine recettoriali TrkA e p75NTR in forma matura, (Fig. 10C e 10D). Tali evidenze, insieme con l'osservazione, ottenuta mediante saggio ELISA, che la produzione della neurotrofina in forma biologicamente attiva, varia in funzione dello stadio di maturazione cellulare (Fig. 9C), suggeriscono il coinvolgimento del sistema NGF/NGF recettori nel processo del differenziamento podocitario.

L'analisi della distribuzione cellulare dei recettori per la neurotrofina, condotta con metodica di microscopia elettronica (TEM) e di immunofluorescenza, ha inoltre dimostrato come nella popolazione cellulare podocitaria umana la localizzazione di TrkA e di p75NTR non sia classicamente confinata a livello della membrana plasmatica (Fig.11, Fig.12 e Fig.13), ed ha evidenziato per la prima volta l'espressione dei recettori per la neurotrofina nel compartimento mitocondriale dei podociti immaturi.

Attualmente, la possibile funzione della co-localizzazione di TrkA e p75NTR nel mitocondrio è sconosciuta. Particolarmente interessante è l'identificazione (Fig. 17) della presenza, a livello del compartimento mitocondriale dei podociti immaturi, di un

elevato contenuto di proteine ERK1/2 fosforilate rispetto alla popolazione podocitaria matura, mentre i livelli di fosfo-p38MAPK sono uguali in entrambe le condizioni sperimentali (Fig. 17). Ciò suggerisce, analogamente a quanto già dimostrato in studi condotti sul cervello di topo (Arciuch *et al.*, 2009), che il livello mitocondriale di fosfo-ERK 1/2 sia un processo regolato dallo sviluppo e legato alla fase di proliferazione. In questo contesto, va sottolineato come la proteina recettoriale TrkA giochi un ruolo importante nel controllo di cruciali funzioni cellulari come la sopravvivenza, il differenziamento e la proliferazione. La sua cascata trasduzionale è caratterizzata dall'attivazione di vari pathways (Freund and Frossard, 2008) tra cui quello delle MAPKs che a loro volta inducono attivazione del sistema ERK1/2. E' pertanto possibile che l'espressione del recettore ad alta affinità a livello della membrana mitocondriale interna dei podociti immaturi partecipi al mantenimento del loro stato proliferativo attraverso l'attivazione delle chinasi ERK1/2 mediata dal circuito autocrino indotto dalla produzione endogena di NGF. Tuttavia, l'autofosforilazione ligando-dipendente del recettore TrkA induce l'attivazione di diversi pathways trasduzionali (Kaplan *et al.*, 1991b; Jing *et al.*, 1992; Freund and Frossard, 2008). Come dimostrato in sistemi cellulari neuronali e non-neuronali la presenza di entrambi recettori per la neurotrofina a livello della membrana cellulare si traduce in un effetto cooperativo caratterizzato da un cross-talk funzionale legato alla convergenza di pathways trasduzionali e/o alla condivisione di molecole adattatrici (Freund and Frossard, 2008). Studi di biologia molecolare documentano come il recettore p75NTR presente a livello della membrana plasmatica possa direttamente interagire con la proteina adattatrice Shc promuovendo la

selettiva attivazione del sistema ERK 1/2 mediata a sua volta dalla fosforilazione di TrkA NGF-indotta (Epa *et al.*, 2004); è quindi possibile che un analogo meccanismo possa essere presente anche a livello del mitocondrio. Tale ipotesi è ulteriormente rafforzata dalla dimostrazione (Fig. 17) di un aumento dei livelli di fosfo-ERK1/2 nel compartimento mitocondriale dei podociti indifferenziati rispetto alla popolazione cellulare differenziata, nonché dall'assenza dei recettori per il NGF nei mitocondri dei podociti fenotipicamente maturi. Pertanto, la co-espressione mitocondriale nei podociti immaturi delle proteine recettoriali TrkA e di p75NTR potrebbe essere considerato l'evento biologico fondamentale che garantirebbe l'attivazione selettiva di effettori responsabili del mantenimento del stato proliferativo ed indifferenziato.

Particolarmente interessante è la dimostrazione attraverso gli studi di immunoprecipitazione (Fig. 18) di un'associazione tra il recettore p75NTR e specifiche proteine mitocondriali quali il carrier ANT e la PDE4A, entrambe coinvolte nel controllo dell'omeostasi energetica. Questa evidenza aprirebbe nuovi scenari su una possibile attività del NGF, mediante attivazione del suo recettore a bassa affinità, come modulatore di classiche funzioni mitocondriali.

La definizione del ruolo del NGF nella fisiologia podocitaria è stato ulteriormente approfondita mediante esperimenti di deprivazione della neurotrofina, condotti mediante trattamento delle colture di podociti immaturi ed in corso di differenziamento con anticorpi anti-NGF capaci di bloccare l'attività biologica delle neurotrofina (Caroleo *et al.*, 2001; Bracci-Laudiero *e al.*, 2005). I dati ottenuti hanno dimostrato che la deprivazione del NGF nello stadio di immaturità non è in grado di indurre variazioni del

ciclo cellulare (Fig. 19), nè di modificare i livelli proteici dei recettori TrkA o p75NTR (Fig. 20) o la loro distribuzione subcellulare (Fig. 21). Diversamente da quanto osservato a livello dei podociti immaturi, il blocco dell'attività biologica del NGF endogenamente prodotto dai podociti durante le fasi del differenziamento cellulare, induce profonde modificazioni della morfologia cellulare associata a disorganizzazione del citoscheletro. L'analisi ultrastrutturale mediante microscopia elettronica a scansione (SEM, Fig. 22) ha infatti dimostrato che i podociti esposti a trattamento cronico con anticorpi anti-NGF durante il processo di differenziamento, sono caratterizzati da un fenotipo non maturo con evidenti alterazioni strutturali e perdita della corretta architettura dei pedicelli similmente a quanto osservato in corso di patologie glomerulari (Kerjaschki, 2001). L'indagine, mediante metodiche di real-time PCR e di western blotting (Fig. 23), dell'espressione di proteine fondamentali per una corretta organizzazione del citoscheletro ha evidenziato, per la prima volta, come nei podociti in corso di differenziamento la deprivazione del NGF induca una riduzione selettiva dei livelli proteici di sinaptopodina, ma non della sua espressione genica indicando che la neurotrofina è implicata nel controllo della proteina mediante meccanismi post-traduzionali.

E' noto come, in un gran numero di patologie renali associate a proteinuria, la sinaptopodina subisca degradazione mediante clivaggio da parte della L-catepsina (Reiser et al., 2010). In condizioni fisiologiche la sinaptopodina è infatti "protetta" dal clivaggio catepsina-mediato mediante fosforilazione da parte della PKA o della CaMKII (Mundel and Reiser, 2010). La fosforilazione della sinaptopodina è quindi

indispensabile per mantenere il corretto fenotipo podocitario e preservare la barriera di filtrazione glomerulare. Evidenze sperimentali indicano che il recettore a bassa affinità per il NGF, p75NTR, è coinvolto nel controllo del pathway cAMP/PKA mediante interazione con la PDE4A (Sash *et al.*, 2007). In accordo con questi studi, i risultati ottenuti mediante tecnica di co-immunoprecipitazione hanno dimostrato che nei podociti in corso di maturazione fenotipica la deprivazione di NGF induce un aumento dell'interazione p75NTR-PDE4A5 indicando che il recruitment di una singola isoforma della PDE4 da parte del recettore a bassa affinità per la neurotrofina, a localizzazione trans membrana, è regolato dal NGF prodotto endogenamente. Inoltre, i risultati ottenuti mediante saggio ELISA (Fig. 25) hanno permesso di validare, mediante approccio farmacologico, il selettivo coinvolgimento della PDE4A5, e di documentare come la maggiore complessazione tra la proteina recettoriale p75NTR e la proteina PDE4A5 induca una drammatica riduzione dei livelli citoplasmatici di cAMP nei podociti in corso di differenziamento deprivati del NGF. Alla luce di queste evidenze è possibile quindi ipotizzare che la riduzione dei livelli di cAMP induca una conseguente minore fosforilazione, PKA-dipendente, della sinaptopodina, che risulta così essere non protetta ma esposta al clivaggio da parte della L-catepsina. La degradazione della sinaptopodina sarebbe l'evento chiave dell'insorgenza di un fenotipo mobile con perdita dell'integrità della barriera di filtrazione.

In conclusione, i presenti risultati indicano che il NGF può essere certamente considerato una molecola chiave che svolge un ruolo fondamentale nel corretto processo di differenziamento dei podociti umani. La dimostrazione di un legame tra la

neurotrofina e questa importante popolazione cellulare potrebbe aprire nuove vie nella comprensione dei meccanismi alla base delle patologie renali croniche ed evidenziare nuovi target idonei per lo sviluppo di specifici strumenti terapeutici volti alla conservazione della loro integrità, quest'ultima essenziale per il corretto funzionamento della barriera di filtrazione.

6. BIBLIOGRAFIA

Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Manni L (1997). The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy* **52**:883-894.

Aloe L, Calzà L (2004). NGF and related molecules in health and disease. *Progress in Brain Research* 146.

Aloe L, Micera A, Bonini S (2000). Nerve growth factor, mast cells, and allergic inflammation. In: Marone G, Lichtenstein LM, Galli SJ, editors. *Mast cells and basophils*. New York: Academic Press; 2000; 325-239.

Aloe L, Skaper SD, Leon A, Levi-Montalcini R (1994). Nerve growth factor and autoimmune diseases. *Autoimmunity*. **19**: 141-150.

Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD, Toma JG, Atwal J, Kaplan DR, et al. (1998). p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol* **143**: 1691-1703.

Andjelkovic M, Suidan HS, Meier R, Frech M, Alessi DR, Hemmings BA (1998). Nerve growth factor promotes activation of the alpha, beta and gamma isoforms of protein kinase B in PC12 pheochromocytoma cells. *Eur J Biochem* **251**(1-2): 195-200.

Andrews PM (1981). Investigations of cytoplasmic contractile and cytoskeletal elements in the kidney glomerulus. *Kidney Int* **20**: 549-562.

Arciuch VG, Alippe Y, Carreras MC, Poderoso JJ (2009). Mitochondrial kinases in cell signaling: Facts and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**: 1234-1249.

Asanuma K, Kim K, Oh J, Giardino L, Chabanis S, Faul C, et al. (2005). Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of α -actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest.* **115**(5): 1188-1198.

Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB (2009). Advances in the biology and genetics of the podocytopathies: implications for diagnosis and therapy. *Arch Pathol Lab Med* **133**(2): 201-216.

Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, et al. (2002). ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* **36**(3): 375-386.

Belliveau DJ, Krivko I, Kohn J, Lachance C, Pozniak C, Rusakov D, Kaplan D, Miller FD (1997). NGF and neurotrophin-3 both activate TrkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neuritogenesis. *J Cell Biol.* **136**: 374-388.

Berninger B, Garcia DE, Inagaki N, Hahnel C, Lindholm D (1993). BDNF and NT-3 induce intracellular Ca²⁺elevation in hippocampal neurones. *Neuroreport* **4**(12): 1303-1306.

Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**(5443): 1358-1362.

Bonofiglio R, Antonucci MT, Papalia T, Romeo F, Capocasale G, Caroleo MC, et al., (2007). Nerve growth factor (NGF) and NGF-receptor expression in diseased human kidneys. *J Nephrol* **20**(2): 186-195.

Bracci-Laudiero L, Aloe L, Caroleo MC, Buanne P, Costa N, Starace G et al., (2005). Endogenous NGF regulates CGRP expression in human monocytes, and affects HLA-DR and CD86 expression and IL-10 production. *Blood.* **106**(10): 3507-3514.

Bradshaw RA, Murray-Rust J, Ibanez CF, McDonald NQ, Lapatto R, Blundell TL (1994). Nerve growth factor: structure/function relationships. *Protein Sci* **3**(11): 1901-1913.

Caroleo MC, Costa N, Bracci-Laudiero L, Aloe L (2001). Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. *J Neuroimmunol.* **113**(2): 193-201.

Casaccia-Bonnet P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* **383**: 716-719.

Casademunt E, Carter BD, Benzel I, Frade IM, Dechant G, Barde YA (1999). The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75 (NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J* **18**: 6050-6061.

Cione E, Pingitore A, Genchi F, Genchi G (2010). Coenzyme A enhances activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **42**: 106-112.

Coleman ES, Wooten MW (1994). Nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells employs the PMA-insensitive protein kinase C-zeta isoform. *J Mol Neurosci* **5**(1): 39-57.

Cortes P, Mendez M, Riser BL, Guerin CJ, Rodriguez-Barbero A, Hassett C *et al.* (2000). F-actin fiber distribution in glomerular cells: structural and functional implications. *Kidney Int* **58**: 2452-2461.

Coulson EJ, Reid K, Shipham KM, Morley S, Kilpatrick TJ, Bartlett PF (2004). The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog Brain Res.* **146**: 41-62.

Domeniconi M, Zampieri N, Spencer T, Hilaire M, Mellado W, Chao MV, *et al.*, (2005). MAG induces regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* **46**(6): 849-55.

Drenckhahn D, Franke RP (1988). Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab Invest* **59**: 673-682.

Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, *et al.* (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* **275**(5300): 661-665.

Durbeej M, Söderström S, Ebendal T, Birchmeier C, Ekblom P (1993). Differential expression of neurotrophin receptors during renal development. *Development* **119**(4): 977-989.

Edwards RH, Selby MJ, Garcia PD, Rutter WJ (1988). Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor. *J Biol Chem* **263**(14): 6810-6815.

Epa WR, Markovska K, Barrett GL (2004). The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation. *J. Neurochem* **89**(2): 344-353.

Fabian JR, Daar I.O, Morrison DK. (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol* **13**(11): 7170-7179.

Fahnestock M (1991). Structure and biosynthesis of nerve growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol* **165**: 1-26.

Freund V, Frossard N. (2004). Expression of nerve growth factor in the airways and its possible role in asthma. *Prog Brain Res.* **146**: 335-346.

Freund-Michel V, Frossard N (2008). The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacol Ther* **117**(1): 52-76.

Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Reynisdottir ST, Manolescu A, Jonsdottir S, Jonsdottir T, et al. (2003). The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke. *Nat. Genet.* **35**: 131-138.

Holthofer H, Miettinen A, Lehto VP, Lehtonen E, Virtanen I (1984). Expression of vimentin and cytokeratin types of intermediate filament proteins in developing and adult human kidneys. *Lab Invest* **50**: 552-559.

Houslay MD, Schafer P, Zhang KY (2005). Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov. Today.* **10**: 1503-1519.

Huang EJ, Reichardt LF (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* **72**: 609-642.

Huber LJ, Hempstead B, Donovan MJ (1996). Neurotrophin and neurotrophin receptors in human fetal kidney. *Dev Biol.* **179**(2): 369-381.

Jing S, Tapley P, Barbacid M (1992). Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* **9**(6): 1067-1079.

Jongstra-Bilen J, Coblentz L, Shooter EM (1989). The in vitro processing of the NGF precursors by the gamma-subunit of the 7S NGF complex. *Brain Res Mol Brain Res* **5**(2): 159-169.

Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF (1991b). Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto oncogene product induced by NGF. *Nature* **350**(6314): 158-160.

Kaplan DR, Miller FD (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* **10**: 381-391.

Kerjaschki D (2001). Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* **108**(11): 1583-1587.

Kita Y, Kimura KD, Kobayashi M, Ihara S, Kaibuchi K, Kuroda S, et al. (1998). Microinjection of activated phosphatidylinositol-3 kinase induces process outgrowth in rat PC12 cells through the Rac-JNK signal transduction pathway. *J Cell Sci* **111**(Pt 7): 907-915.

Kobayashi N (2002). Mechanism of the Process Formation; Podocytes vs. Neurons. *Microsc Res Tech* **57**: 217-223.

Kobayashi N, Gao S, Chen J, Saito K, Miyawaki K, Li C, et al (2004). Process formation of the renal glomerular podocyte: Is there common molecular machinery for processes of podocytes and neurons? *Anat Sci Int.* **79**: 1-10.

Kobayashi N, Mundel P (1998). A role of microtubules during the formation of cell processes in neuronal and non-neuronal cells. *Cell Tissue Res* **291**(2): 163-174.

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**: 1945-1948.

Leeuwis JW, Nguyen TQ, Dendooven A, Kok RJ, Goldschmeding R (2010). Targeting podocyte-associated diseases. *Adv Drug Deliv Rev* **62**(14): 1325-1336.

Levi Montalcini R (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**(4819): 1154-1162.

Liu YZ, Boxer LM, Latchman DS (1999). Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade. *Nucleic Acids Res* **27**(10): 2086-2090.

- McDonald NQ, Chao MV (1995). Structural determinants of neurotrophin action. *J Biol Chem* **270**(34): 19669-19672.
- Miner JH (2011). Organogenesis of the kidney glomerulus. Focus on the glomerular basement membrane. *Organogenesis* **7**(2): 75-82.
- Mundel P, Gilbert P, Kriz WJ (1991). Podocytes in glomerulus of rat kidney express a characteristic 44 KD protein. *Histochem Cytochem* **39**(8): 1047-1056.
- Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, Kriz W (1997). Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* **139**: 193-204.
- Mundel P, Reiser J (2010). Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney Int* **77**(7): 571-580.
- Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia BA, Pavenstadt H, Davidson GR, Kriz W *et al.* (1997). Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* **236**: 248-258.
- Muragaki Y, Timothy N, Leight S, Hempstead BL, Chao MV, Trojanowski JQ, *et al.* (1995). Expression of trk receptors in the developing and adult human central and peripheral nervous system. *J Comp Neurol* **356**(3): 387-397.
- Nagata M, Yamaguchi Y, Ito K (1993). Loss of mitotic activity and the expression of vimentin in glomerular epithelial cells of developing human kidneys. *Anat Embryol* **187**: 275-279.
- Nikulina E, Tidwell JL, Dai HN, Bregman BS, Filbin MT (2004). The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*. **101**: 8786-8790.
- Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM (2005). p75NTR-live or let die. *Current Opinion in Neurobiology* **15**: 49-57.
- Obermeier A, Halfter H, Wiesmuller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A (1993). Tyrosine 785 is a major determinant of Trk-substrate interaction. *EMBO J* **12**(3): 933-941.

- Ohmichi M, Decker SJ, Saltiel AR (1992). Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by nerve growth factor involves indirect coupling of the trk proto-oncogene with src homology 2 domains. *Neuron* **9**(4): 769-777.
- Papa S, Zazzeroni F, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, Matsuda S et al. (2004a). Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* **6**(2): 146-153.
- Papa S, Zazzeroni F, Pham CG, Bubici C, Franzoso G (2004b). Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* **117**(Pt22): 5197-5208.
- Patapoutian A, Reichardt LF (2000). Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol* **10**(3): 392-399.
- Pattarawarapan M, Burgess K (2003). Molecular basis of neurotrophin-receptor interactions. *J Med Chem* **46**(25): 5277-5291.
- Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M (2003). Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiol Rev* **83**: 253-307.
- Pawson T, Nash P (2000). Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* **14**: 1027-1047.
- Pugliese G (2006). Studio di geni candidati: lezioni da modelli animali. Grandangolo in Diabetologia vol. 7: Geni e nefropatia. 35-48.
- Pugliese G, Pricci F, Romeo G, Leto G, Amadio L, Iacobini C, et al. (1999). Autocrine and paracrine mechanisms in the early stages of diabetic nephropathy. *Endocrinol Invest* **22**: 708-735.
- Reiser J, Gupta V, Kistler AD. (2010). Toward the development of podocyte-specific drugs. *Kidney Int* **77**(8): 662-668.
- Roux PP, Barker PA (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* **67**(3): 203-233.
- Rozakis-Adcock M, McGlade J, Mbamalu G, Pelicci G, Daly R, Li W, et al. (1992). Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* **360**(6405): 689-692.

- Sachs BD, Baillie GS, McCall JR, Passino MA, Schachtrup C, Wallace DA, et al. (2007). p75 neurotrophin receptor regulates tissue fibrosis through inhibition of plasminogen activation via a PDE4/cAMP/PKA pathway. *J. Cell Biol* **177**: 1119-1132.
- Schor NF (2005). The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol* **77**(3): 201-14.
- Segal RA (2003). Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci* **26**: 299-330.
- Segal RA, Greenberg ME (1996). Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* **19**: 463-489.
- Sever S, Altintas MM, Nankoe SR, Möller CC, Ko D, Wei C, Henderson J, et al. (2007). Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease. *J Clin Invest* **117**(8): 2095-2104.
- Smoyer WE, Mundel P (1998). Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. *J Mol Med (Berl)*. **76**(3-4): 172-183.
- Sofroniew MV, Howe WC, Mobley WC (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection and neural repair. *Annu Rev Neurosci* **24**: 1217-1281
- Sutter A, Riopelle RJ, Harris-Warrick RM, Shooter EM (1979). Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J Biol Chem* **254**(13): 5972-5982.
- Treisman R, Marais R, Wynne J (1992). Spatial flexibility in ternary complexes between SRF and its accessory proteins. *EMBO J* **11**(12): 4631-4640.
- Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Hongo JA, Zhao W, Presta LG (1998). High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. *J Biol Chem* **273**(10): 5829-5840.
- Vasmant D, Maurice M, Feldmann G (1984). Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat. *Anat Rec* **210**: 17-24.
- Vetter ML, Martin-Zanca D, Parada LF, Bishop JM, Kaplan DR (1991). Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a

kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13): 5650-5654.

Weier HU, Rhein AP, Shadravan F, Collins C, Polikoff D (1995). Rapid physical mapping of the human trk protooncogene (NTRK1) to human chromosome 1q21-q22 by P1 clone selection, fluorescence in situ hybridization (FISH) and computer-assisted microscopy. *Genomics* **26**(2): 390-393.

Whitfield J, Neame SJ, Paquet L, Bernard O, Ham J (2001). Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* **29**(3): 629-643.

Wiesmann C, De Vos AM (2001). Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci* **58**(5-6): 748-759.

Wiesmann C, Ultsch MH, Bass SH, de Vos AM (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* **401**(6749): 184-188.

Yanagida-Asanuma E, Asanuma K, Kim K, Donnelly M, Young Choi H, Hyung Chang J, et al., (2007). Synaptopodin protects against proteinuria by disrupting Cdc42:IRSp53:Mena signaling complexes in kidney podocytes. *Am J Pathol.* **171**(2): 415-427.

Yasui H, Katoh H, Yamaguchi Y, Aoki J, Fujita H, Mori K, et al. (2001). Differential responses to nerve growth factor and epidermal growth factor in neurite outgrowth of PC12 cells are determined by Rac1 activation systems. *J Biol Chem* **276**(18): 15298-15305.