

**DOTTORATO DI RICERCA IN
APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE IN
NEUROMORFOFISIOLOGIA
(XIX CICLO)**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA
Facoltà di Medicina Veterinaria
Settore scientifico disciplinare: VET02

**STUDIO, MEDIANTE APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE,
DI TRE DIVERSI MODELLI SPONTANEI O INDOTTI DI
PATOLOGIE DEL SISTEMA NERVOSO**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Maria Luisa Lucchi

Docente Guida:

Chiar.mo Prof. Monica Forni

Tesi di Dottorato di

Dott.ssa Maria Elena Turba

Anno Accademico 2005-2006

INDICE

INTRODUZIONE	4
PARTE 1 IMPIEGO DEI MICROSATELLITI PER LO STUDIO DELLA MALATTIA GENETICA “ATROFIA PROGRESSIVA DELLA RETINA”NELLA RAZZA CANINA TIBETAN SPANIEL	6
CAPITOLO 1: L’ATROFIA PROGRESSIVA DELLA RETINA	7
1.1 Cenni sulla struttura della retina e dei fotorecettori.....	7
1.2 Le malattie ereditarie della retina nel cane.....	8
1.3 gPRA: introduzione.....	10
1.3.1 gPRA: classificazione.....	12
1.3.2 gPRA a manifestazione precoce.....	13
1.3.3 gPRA a manifestazione tardiva.....	13
1.4 Eterogeneità genetica nella gPRA.....	14
1.4.1 Natura non allelica delle <i>early-onset</i> gPRA.....	14
1.4.2 Natura allelica delle <i>late-onset</i> gPRA.....	15
1.4.3 Eterogeneità allelica della X-linked gPRA.....	16
1.4.4 Influenza della razza e dell’ambiente.....	16
1.5 Breve trattazione delle principali forme di gPRA.....	17
1.5.1 Rod Cone Dysplasia type 1 (RCD-1).....	17
1.5.2 Progressive Rod Cone Degeneration (PRCD).....	18
1.5.3 gPRA nella razza Tibetan spaniel.....	19
CAPITOLO 2: I MICROSATELLITI.....	20
2.1 Caratteristiche generali dei microsatelliti.....	20
2.2 Significato funzionale dei microsatelliti nei procarioti.....	25
2.3 Significato funzionale dei microsatelliti negli organismi superiori.....	26
2.4 I microsatelliti come marker genetici.....	27
CAPITOLO 3: DIAGNOSI DELLE MALATTIE GENETICHE.....	33
3.1 Introduzione.....	33
3.2 Approccio mediante geni candidati.....	34
3.3 Linkage Analysis.....	36
3.4 Approccio candidate-linkage per lo studio della gPRA.....	39
CAPITOLO 4: PARTE SPERIMENTALE STUDIO DELLA GPRA NELLA RAZZA TIBETAN SPANIEL	41
4.1 Introduzione.....	41

4.2 Selezione e ricerca dei microsatelliti.....	41
4.2.1 Ricerca dei microsatelliti in geni canini noti	43
4.2.2 Ricerca dei microsatelliti partendo da sequenze di geni umani.....	44
4.2.3 Elenco dei microsatelliti.....	44
4.3 Multiplex PCR dei microsatelliti selezionati mediante tailed primer.....	45
4.4 Genotyping e analisi di linkage.....	46
BIBLIOGRAFIA.....	47
PARTE 2 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ METALLOPROTEINASICA IN CAMPIONI DI LIQUIDO CEREBRO-SPINALE DI CANI CON PATOLOGIE NON INFIAMMATORIE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE	52
CAPITOLO 1: LE METALLOPROTEINASI DI MATRICE	53
1.1 Introduzione	53
1.2 Classificazione.....	54
1.3 Organizzazione delle MMP.....	55
1.4 Struttura delle MMP.....	59
1.5 Attivazione delle MMP.....	60
1.5.1 Attivazione "in vitro".....	61
1.5.2 Attivazione "in vivo"	61
1.5.3 Attivazione intracellulare	61
1.5.4 Attivazione della MMP2.....	62
1.6 TIMP	63
1.7 Specificità dei substrati delle MMP	63
1.8 Meccanismi molecolari dell'attività delle MMP	63
1.8.1 Rimodellamento della ECM.....	64
1.8.2 Degradazione di molecole di superficie	65
1.8.3 Regolazione di segnali paracrini	66
1.9 Zimografia	66
CAPITOLO 2: MMP ANGIOGENESI E NEOPLASIA	68
CAPITOLO 3: PARTE SPERIMENTALE - STUDIO DELLE MMP NELLE NEOPLASIE DEL SNC DELLA SPECIE CANINA.....	73
3.1 Introduzione	73
BIBLIOGRAFIA.....	74
PARTE 3 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI VEGF E DEI SUOI RECETTORI FLT-1 E FLK-1 NELLE RETINE E NEI NERVI OTTICI DI RATTI SOTTOPOSTI A DANNO ISCHEMICO	87

CAPITOLO 1. VEGF E RECETTORI	88
1.1 Introduzione	88
1.2 Il gene del VEGF e struttura della proteina.....	88
1.3 Espressione del VEGF	89
1.4 Varianti di splicing.....	90
1.5 I recettori per il VEGF.....	93
1.6 Espressione dei recettori per il VEGF.....	96
CAPITOLO 2: NGF	96
CAPITOLO 3: IL MODELLO DEL “2VO”	97
CAPITOLO 4:PARTE SPERIMENTALE - VALUTAZIONE DELL’EFFETTO DI NGF SULLA ESPRESSIONE DI VEGF, FLT-1 E FLK-1 IN CORSO DI “2VO”.....	99
4.1: Introduzione.....	99
4.2: Materiali e metodi	99
4.2.1: Animali.....	99
4.2.2: Intervento chirurgico.....	100
4.2.3: Campionamento delle retine e dei nervi ottici	101
4.2.4: Estrazione dell’RNA e retrotrascrizione	101
4.2.5: Real time PCR per GAPDH, VEGF, FLT-1 e FLK-1	102
4.3: Analisi statistica dei risultati.....	104
4.4: Discussioni e conclusioni	109
BIBLIOGRAFIA.....	110

INTRODUZIONE

La presente tesi di Dottorato raccoglie tre diversi lavori, eseguiti durante il corso di studio, caratterizzati dall'applicazione, allo studio di patologie del sistema nervoso, di una particolare tecnica biotecnologica. Per tale motivo, è stato deciso di suddividere il presente elaborato in tre parti distinte.

La prima parte descrive uno studio effettuato per identificare il locus genetico responsabile della malattia ereditaria del cane conosciuta come Atrofia Progressiva della Retina, mediante l'impiego di microsatelliti e della tecnica del *linkage test*. Tale lavoro ha portato alla pubblicazione dell'allegato elaborato su rivista scientifica internazionale (Turba ME, Binns M, Mellersh C. Canine microsatellites associated with genes known to cause progressive retinal atrophy in dogs or retinitis pigmentosa in humans. *Animal Genetics* 36: 259-261, 2005).

La seconda parte, sempre applicata alla specie canina, descrive l'impiego della tecnica elettroforetica della zimografia per valutare l'attività metalloproteinasica presente in campioni di liquido cerebrospinale prelevati da soggetti spontaneamente affetti da patologie di tipo neoplastico o degenerativo del sistema nervoso centrale o periferico. Anche in questo caso, è stato allegato il relativo lavoro scientifico (Turba ME, Gentilini F, Gandini G, Mastroilli C, Bernardini C, Forni M. Evaluation of matrix metalloproteinases 2 and 9 activity in cerebrospinal fluid of dogs with non-inflammatory diseases of the central nervous system. *Vet Res Commun.* 2006 Aug;30 Suppl 1:317-9. Turba ME, Forni M, Gandini G, Gentilini F. Recruited leukocytes and local synthesis account for increased matrix metalloproteinase-9 activity in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system neoplasm. *J Neurooncol.* 2007 Jan;81(2):123-9.).

La terza parte della tesi, rappresenta invece un lavoro di valutazione dell'espressione genica di VEGF e dei suoi recettori mediante tecnica di PCR quantitativa Real time; tale

lavoro, si inserisce all'interno di uno studio più ampio eseguito dal gruppo di lavoro afferente alla figura della Prof.ssa Calzà del Dipartimento Dimorfipa, sezione di Anatomia, dell'Università di Bologna.

PARTE 1

**Impiego dei microsatelliti per lo studio
della malattia genetica “Atrofia Progressiva della
Retina” nella razza canina Tibetan spaniel**

CAPITOLO 1: L'ATROFIA PROGRESSIVA DELLA RETINA

1.1 Cenni sulla struttura della retina e dei fotorecettori

La retina visiva del cane è organizzata in 10 strati, che, partendo dalla coroide (esterno) e procedendo verso il corpo vitreo (interno), sono così suddivisi: 1 - membrana di Bruch e epitelio pigmentato (nel cane questo epitelio non è pigmentato in corrispondenza della zona tappetale della coroide); 2 – segmento fotorecettoriale esterno; 3 – segmento fotorecettoriale interno; 4 – strato nucleare esterno; 5 – strato plessiforme esterno; 6 – strato nucleare interno; 7 – strato plessiforme interno; 8 – strato delle cellule gangliari; 9 – strato delle fibre del nervo ottico; 10 – membrana limitante interna.

La complessa organizzazione della retina può essere “condensata” per una più semplice ed immediata, seppure semplificata, descrizione considerando che la retina sia composta da 3 differenti tipi di cellule nervose che procedendo dalla coroide verso il corpo vitreo sono: 1 – strato dei coni e dei bastoncelli; 2 – strato delle cellule bipolari; 3 – strato delle cellule gangliari. La luce deve attraversare la cornea, la camera anteriore, il cristallino e il corpo vitreo prima di raggiungere la retina. Le fibre del nervo ottico, che sono gli assoni delle cellule gangliari, si trovano sulla superficie interna della retina, cioè quella che è rivolta verso il corpo vitreo. La normale stimolazione delle cellule gangliari procede dallo strato dei coni e bastoncelli (il più esterno) per poi passare a quello dei neuroni bipolari (intermedio) e infine allo strato gangliare compiendo quindi una sorta di percorso a ritroso rispetto al percorso della luce, che deve invece attraversare tutti gli strati della retina per raggiungere il segmento esterno dei coni e bastoncelli, che rappresenta la struttura fotorectrice di queste cellule. I bastoncelli sono veri e propri fotorecettori sensitivi e funzionano durante la bassa illuminazione per la visione “notturna”; al contrario, i coni hanno una soglia di eccitabilità più alta dei bastoncelli e sono attivati da forte illuminazione, funzionando perciò per la visione “diurna”.

La fototrasduzione è il termine con cui è descritta la veloce cascata di trasduzione del segnale luminoso che avviene nei fotorecettori maturi e che porta alla conversione di quanti di energia luminosa in modificazioni elettrochimiche. Nei bastoncelli tale processo può essere descritto brevemente come segue:

Il recettore per lo stimolo luminoso nei bastoncelli è rappresentato dalla rodopsina, che inizia la cascata di trasduzione del segnale; la rodopsina è una proteina transmembranaria di particolari strutture a disco che si trovano nel segmento esterno dei bastoncelli. La rodopsina è costituita dalla proteina opsina legata ad una molecola che rappresenta una isoforma della vitamina A; la rodopsina è attivata dalla fotoisomerizzazione di quest'ultima componente che passa dalla forma cis alla forma trans. Tale isomerizzazione determina una modificazione nella conformazione molecolare della rodopsina che attiva una proteina G eterotrimerica, la transducina; quest'ultima, a sua volta, stimola l'enzima effettore finale della catena di traduzione rappresentato da una cGMP fosfodiesterasi che catalizza l'idrolisi del cGMP intracellulare in 5'GMP. I canali cationici situati sulla membrana cellulare dei fotorecettori sono direttamente sensibili ai livelli di cGMP per cui, in conseguenza della stimolazione luminosa e della caduta nel contenuto di cGMP, si chiudono determinando un'iperpolarizzazione della membrana con una conseguente riduzione del rilascio di neurotrasmettitore da parte dei fotorecettori; questo permette alle cellule bipolari di originare potenziali generatori, i quali a loro volta stimolano le cellule gangliari a generare potenziali d'azione (Jenkins, 1989).

1.2 Le malattie ereditarie della retina nel cane

La specie canina è affetta da numerose forme di cecità ereditarie, tra le quali la più conosciuta è la patologia chiamata "Atrofia retinica progressiva e generalizzata" (gPRA

- *generalised progressive retinal atrophy*), descritta per la prima volta da Magnusson all'inizio del secolo scorso.

A grandi linee si possono classificare 4 principali patologie ereditarie dell'occhio nel cane: (Aguirre e Acland, 2006)

- 1- gPRA; comprende disordini progressivi della retina che generalmente coinvolgono prima i bastoncelli e solo successivamente anche i coni. Di conseguenza, il segno clinico predominante all'esordio è la cecità nictimerale che evolve in cecità completa nel decorso della patologia. All' esame oftalmoscopico, i cani mostrano modificazioni caratteristiche (iperriflettività, c.d. vasi fantasma).
Secondariamente quasi tutti gli animali malati sviluppano cataratta
- 2- *Cone-Rod dystrophy* (CRD); come dice il nome, in questa classe di patologie ereditarie della retina la prima struttura fotorecettoriale ad essere coinvolta è rappresentata dai coni; generalmente i cani malati mostrano gravi deficit visivi sia durante il giorno che di notte. Esistono delle varianti a seconda dell'età di insorgenza. La malattia è progressivamente ingravescente e culmina nella cecità completa
- 3- *Stationary disorders*; in questo caso possono essere coinvolti solo i coni (cd) o sia coni che bastoncelli (csnb) senza un ulteriore deterioramento della visione e delle modificazioni retiniche dal momento in cui è stata fatta la diagnosi nell'animale giovane
- 4- Disordini di sviluppo; questo gruppo di patologie comprende displasie della retina. Esiste una forma generalizzata in cui la retina presenta uno sviluppo anomalo già dalla nascita o nelle successive settimane; a questi disordini si associano anche anomalie nello sviluppo del sistema scheletrico. In questo gruppo è inclusa anche la *collie eye anomaly* (cea) in cui il disordine è a carico di

retina, coroide e sclera; questa patologia è diffusa in tutto il mondo e colpisce cani di razza Pastore delle Shetland e Collie

1.3 gPRA: introduzione

La gPRA comprende uno spettro di disordini spontanei della retina a carattere progressivo che si caratterizzano per essere eterogenei sia dal punto di vista fenotipico che genotipico in modo razza-specifico. In altre parole, gPRA è un termine generico che copre “ad ombrello” una serie di patologie ereditarie del cane a carico della retina, che sebbene possiedano alcuni segni clinici comuni, differiscono in base alla razza considerata per quanto riguarda sia l'insorgenza che la progressione della malattia.

Questa malattia ereditaria del cane è oggetto di studio da più di 30 anni sia per la ricerca veterinaria che umana; infatti, la gPRA rappresenta l'ortologo canino di una complessa malattia ereditaria umana conosciuta con il termine di Retinite Pigmentosa, e rappresenta perciò un ottimo modello spontaneo di studio.

Nel cane, così come nel topo, la morfogenesi dei fotorecettori retinici è incompleta alla nascita e procede seguendo un andamento radiale dal centro della retina verso la periferia; il completo sviluppo delle strutture fotorecettoriali si completa tra il quarantaduesimo e il sessantesimo giorno dopo la nascita. Questo presupposto è molto importante ai fini della classificazione della malattia che è distinta in:

- Displasia, se i fotorecettori presentano disordini già prima della completa maturazione
- Degenerazione se l'inizio della patologia avviene a maturazione funzionale raggiunta (Clements et al., 1996)

Da un punto di vista clinico, gli animali malati mostrano un'iniziale cecità notturna, seguita dalla perdita progressiva anche della visione diurna fino alla completa cecità. La retina progressivamente si assottiglia per la morte delle cellule che la costituiscono, con

una conseguente riduzione anche dell'apporto sanguigno; questo si traduce all'esame oftalmoscopico in una progressiva e generalizzata iper-riflettività tappetale con attenuazione dei vasi superficiali (definiti come vasi fantasma). Con il tempo anche il fondo non-tappetale mostra modificazioni della pigmentazione e la papilla ottica si atrofizza. Infine, la cataratta è una sequela molto comune. Generalmente, in corso di questa patologia alterazioni dell'esame elettroretinografico si riscontrano prima della comparsa di segni oftalmoscopici (Aguirre e Acland, 2006).

La gPRA nelle sue varie forme si presenta generalmente come malattia genetica autosomica recessiva; tuttavia, è conosciuta una particolare forma di gPRA nel Siberian Husky che è invece provocata da un disordine a livello del cromosoma sessuale X.

Il carattere recessivo di questa malattia genetica, la rende particolarmente subdola e pericolosa ai fini diagnostici e ne complica l'eradicazione; infatti, l'"effetto fondatore" (*founder effect*) può determinare la propagazione di un'alta incidenza di animali carrier, cioè clinicamente sani ma portatori di uno dei 2 alleli omologhi mutato. Gli animali carrier all'interno di un piano di selezione molto spinto, come spesso avviene nelle razze canine, essendo clinicamente sani possono essere inclusi in programmi di incrocio spesso con consanguinei determinando quindi la generazione di prole malata e la propagazione della malattia nella razza.

L'animale malato, che presenta entrambi gli alleli omologhi mutati, può rappresentare un'ulteriore complicazione in termini diagnostici; in molte razze, infatti, la malattia si configura come degenerazione e la sua comparsa clinica è tardiva generalmente dopo la maturazione sessuale, quando, quindi, l'animale può avere già generato della progenie.

Lo studio e la ricerca dei tratti genetici responsabili rappresentano gli unici metodi per affrontare questa patologia in termini di eradicazione, oltre che rappresentare un mezzo per l'approfondimento dello studio della biologia della retina.

Inoltre, l'individuazione dei tratti di malattia rappresenta potenzialmente la base per lo sviluppo di tecnologie terapeutiche innovative, come la terapia genica. Il fatto che l'occhio sia una struttura facilmente aggredibile in termini terapeutici rende la gPRA un modello quasi ideale per lo sviluppo di terapie geniche; dal 2001 sono infatti in corso i primi trial sperimentali per testare potenziali terapie geniche in animali affetti da gPRA (Acland et al., 2001).

1.3.1 gPRA: classificazione

La gPRA, come già anticipato nelle parte introduttiva, è un insieme di malattie della retina simili tra di loro in termini di manifestazione clinica e di modificazioni oftalmoscopiche, ma, allo stesso tempo, molto variabili per età di insorgenza in modo generalmente razza-specifico. Sulla base dell'età di comparsa della sintomatologia, la gPRA è stata suddivisa genericamente in 2 distinti gruppi di malattie: gPRA a manifestazione precoce (c.d. *early onset*) e gPRA a manifestazione tardiva (c.d. *late onset*). Ciascun gruppo contiene, a sua volta, numerose varianti di malattia con caratteristiche peculiari sia dal punto di vista genotipico che fenotipico. Le malattie genetiche della retina ascrivibili al gruppo della gPRA sono qui di seguito riassunte:

Malattia	Razza	Locus di malattia
<i>Rod-cone displasia 1;</i> <i>rcd1</i>	Irish setter	PDE6B (Clements et al., 1993)
<i>Rod-cone displasia 2;</i> <i>rcd2</i>	Collie	Non determinato
<i>Rod-cone displasia 3;</i> <i>rcd3</i>	Cardigan Welsh Corgi	PDE6A (Petersen-Jones et al., 1999)
<i>Photoreceptor dyplasia</i> <i>Rod dysplasia</i>	Miniature schnauzer Norwegian elkhound	Non determinato Non determinato
<i>Early retinal</i> <i>degeneration</i>	Norwegian elkhound	Non determinato
<i>Progressive rod-cone</i> <i>degeneration</i>	Molte razze	CFA09 (Zangerl et al., 2006)
<i>X-linked PRA</i>	Siberian husky; Samoyedo	RPGR (Zeiss et al., 2000)
<i>Autosomal dominant</i> <i>PRA</i>	English mastiff; bullmastiff	Rho (Kijas et al., 2004)

1.3.2 gPRA a manifestazione precoce

Questo gruppo di malattie si manifesta nei cani tra la seconda e la sesta settimana di età, quando cioè dovrebbe avvenire la differenziazione post-natale della retina. La malattia è classificata come displasia, dal momento che i bastoncelli e i coni non si sviluppano normalmente e vanno incontro a morte cellulare. Le alterazioni all'esame elettroretinografico sono immediatamente evidenziabili, insieme ad una precoce comparsa di cecità notturna; le modificazioni oftalmoscopiche sono invece generalmente ritardate e compaiono solo dopo una perdita consistente di cellule fotorecettoriali.

Da un punto di vista tassonomico, le malattie appartenenti a questo gruppo sono identificate con particolari nomi che indicano il tipo di cellula fotorecettoriale coinvolta nella patologia e il locus genetico di malattia. Di conseguenza, si distinguono le *rod dysplasia* (cioè con coinvolgimento solo dei bastoncelli) dalle *rod-cone dysplasia* (dove cioè sono coinvolti anche i coni); queste ultime a loro volta si differenziano in *rod-cone dysplasia* tipo 1, 2 e 3 a seconda del tipo di mutazione.

1.3.3 gPRA a manifestazione tardiva

Le gPRA a manifestazione tardiva sono degenerazioni dei fotorecettori che si sono però sviluppati in modo normale durante la differenziazione della retina. Ad oggi, in questo gruppo di malattie si distinguono 3 principali distinti sotto-gruppi: 1- il gruppo "autosomico-recessivo" 2- il gruppo "legato al cromosoma X" trovato nel Siberian Husky e nel Samoyedo 3- il gruppo "autosomico dominante" nella razza English Mastiff.

1.4 Eterogeneità genetica nella gPRA

Lo studio della genetica della gPRA risulta particolarmente complesso. Da un punto di vista temporale, prima di identificare i geni coinvolti e le specifiche mutazioni responsabili di malattia, sono stati eseguiti numerosi studi per comprendere se i differenti fenotipi con cui si manifesta questa malattia nelle diverse razze canine derivino da mutazioni sullo stesso gene (fenomeno conosciuto come eterogeneità allelica) o, viceversa, da mutazioni diverse su geni diversi.

La strategia seguita per valutare l'eterogeneità allelica della gPRA è stata inizialmente quella di eseguire precisi piani di accoppiamento tra cani di diverse razze affetti da gPRA. Tale strategia si basa sul fatto che la gPRA ha generalmente carattere autosomico recessivo; di conseguenza, gli animali carrier, che non presentano anomalie fenotipiche, sono eterozigoti per la mutazione, mentre, gli animali malati sono sicuramente omozigoti per la mutazione. Due animali malati della stessa razza genereranno sempre prole affetta. Qualora, invece, siano incrociati 2 animali malati ma di razze differenti può accadere che i figli siano tutti sani; questo significa che la mutazione responsabile di gPRA nelle 2 razze risiede su geni differenti e quindi la malattia non è allelica. Se invece i figli nati dall'incrocio risultano comunque affetti la malattia è definita allelica (Figura 1).

1.4.1 Natura non allelica delle *early-onset* gPRA

Gli studi eseguiti hanno dimostrato che incrociando animali malati di razze differenti affetti da varianti di *early-onset* gPRA è stata generata prole sana; di conseguenza le malattie definite come *early-onset* gPRA sono non-alleleliche, cioè derivano da mutazioni su geni differenti tra le diverse razze colpite (Figura 1) (Aguirre e Acland, 2006).

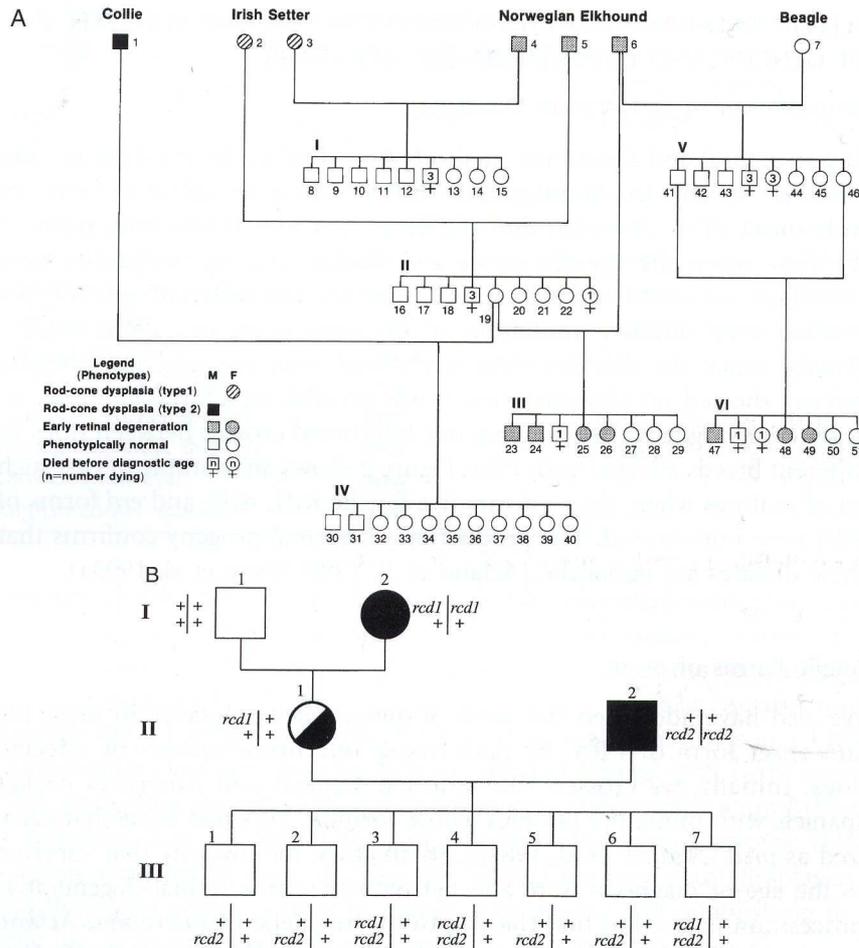


Figura 1: A e B: pedigree che illustrano il non-allelismo delle *early-onset* gPRA, usando animali di razze diverse omozigoti per varianti “razza-specifiche” di GPR.

1.4.2 Natura allelica delle late-onset gPRA

Lo stesso studio è stato eseguito anche nell’ambito della gPRA a manifestazione tardiva. In particolare è stata investigata una forma di gPRA *late-onset* conosciuta come *progressive rod-cone degeneration* (prcd), che è stata identificata in più di venti razze canine diverse. In questo caso, incrociando animali malati appartenenti a razze diverse è stata generata prole malata dimostrando di conseguenza una natura allelica della prcd (Aguirre e Acland, 2006).

1.4.3 Eterogeneità allelica della X-linked gPRA

Sebbene la maggiore parte delle forme di gPRA siano malattie genetiche a carattere autosomico e recessivo, esiste anche una variante di gPRA in cui l'evento mutazionale è legato al cromosoma sessuale X (X-linked PRA; XLPRA). Lo studio di questa variante di gPRA ha dimostrato una marcata natura allelica di questa malattia. Infatti sono state riconosciute 2 ulteriori varianti della XLPRA definite come XLPRA1 e XLPRA2; in entrambe il gene coinvolto è lo stesso ma il tipo di mutazione cambia. La XLPRA1 è una displasia e quindi una variante di gPRA di tipo *early-onset*, mentre la XLPRA2 è una degenerazione, e quindi una gPRA di tipo *late-onset*, che subentra dopo un normale sviluppo dei fotorecettori retinici. Da un punto di vista clinico la malattia risulta analogamente severa nelle femmine omozigoti per la mutazione così come nei maschi, che sono necessariamente eterozigoti per la mutazione.

1.4.4 Influenza della razza e dell'ambiente

Occorre sottolineare, come in parte già fatto in diversi punti della trattazione, che questa malattia genetica, in analogia alla retinite pigmentosa dell'uomo, è estremamente articolata sia per le svariate possibili variazioni nella manifestazione clinica che per la complessità della sua base genetica.

Occorre inoltre aggiungere che questa malattia è fortemente influenzata da fattori legati alla razza, che la rendono ulteriormente più complessa. A titolo esemplificativo, la malattia chiamata prcd (gruppo delle *late-onset*) è stata identificata in circa una ventina di razze canine e, sebbene recenti studi genetici abbiano dimostrato che la mutazione causale sia la stessa, ha un comportamento sintomatologico molto differente a seconda della razza considerata; ad esempio, nel Labrador la malattia insorge clinicamente a tra

i 4 e i 6 anni, mentre nel miniature e toy poodle è evidenziabile tra il terzo e quinto anno (Clements et al., 1996).

Infine, alcune varianti di gPRA sono suscettibili ad influenze ambientali; ad esempio esiste una variante di gPRA nell'English Mastiff in cui la gravità della manifestazione sintomatologica è direttamente proporzionale alla durata di esposizione alla luce (Ostrander et al., 2006).

1.5 Breve trattazione delle principali forme di gPRA

In questo sottocapitolo saranno descritte per sommi capi le 2 forme più conosciute di gPRA; sarà inoltre descritta la variante di gPRA che colpisce la razza Tibetan spaniel, che è stata l'oggetto di studio di questa prima parte di tesi e che ha portato alla realizzazione di una pubblicazione sulla rivista internazionale *Animal Genetics*.

1.5.1 Rod Cone Dysplasia type 1 (RCD-1)

La *rod-cone dysplasia type 1* è una gPRA di tipo *early-onset*, e quindi una displasia retinica, che colpisce cani di razza Irish Setter. Gli animali malati mostrano cecità notturna dalla sesta – ottava settimana di età e molti animali diventano addirittura totalmente ciechi a partire già dal primo anno di età. Tipicamente, le anomalie all'esame oftalmoscopico consistono in un'iperriflettività del fondo tappetale evidenziabile tra i 4 e i 6 mesi di età accompagnata da una attenuazione dei vasi retinici. All'esame elettroretinografico, le risposte dei bastoncelli sono rapidamente perse dopo la nascita e sebbene le risposte dei coni siano inizialmente presenti, anche se ridotte in ampiezza rispetto al normale, sono generalmente perse verso i 6 mesi di età.

La causa di questa malattia è rappresentata da un'anomala attività dell'enzima cGMP fosfodiesterasi dei bastoncelli, che provoca un accumulo di cGMP intracellulare. Da un

punto di vista genetico la mutazione causale di questa malattia è stata individuata tramite approccio del “gene candidato”; essa deriva da una mutazione puntiforme in cui una base G è sostituita con una A provocando un prematuro codone di stop nel residuo 49 dal terminale carbossilico della proteina (Clements et al., 1993). Avendo identificato la mutazione, è stato messo a punto uno specifico test genetico, che può essere utilizzato dagli allevatori per programmare i piani di accoppiamento. Mutazioni nel gene omologo dell'uomo sono state descritte in pazienti affetti da forme di retinite pigmentosa a carattere recessivo.

1.5.2 Progressive Rod Cone Degeneration (PRCD)

La PRCD è una gPRA *late-onset* e quindi una degenerazione retinica. Questa malattia è stata descritta in più di 20 razze canine tra cui Miniature e Toy Poodle, American e English Cocker Spaniel e Labrador Retriever. Come già precedentemente descritto, è stato dimostrato tramite esperimenti di incroci tra animali di razze diverse affette da PRCD che questa malattia genetica deriva, in tutte le razze colpite, dallo stesso gene mutato; ciononostante, l'età di insorgenza della sintomatologia, la velocità di progressione della malattia e la severità delle manifestazioni cliniche risultano essere molto diverse a seconda della razza considerata.

Da un punto di vista temporale lo studio genetico di questa variante di gPRA è stato molto articolato ed è proceduto per step successivi così riassumibili (Aguirre e Acland, 2006).

1 – inizialmente tramite analisi di *linkage* eseguite su un pedigree altamente informativo è stato mappato il locus di malattia a livello dell'area centromerica cromosoma 9 (CFA09); in questo modo è stato identificato un aplotipo di malattia (insieme di alleli mutati appartenenti a marker posizionati sulla stessa porzione di cromosoma del locus di malattia), che è stato impiegato per la diagnosi dello stato di carrier o di malattia

2 – gli studi genetici sono poi proseguiti cercando di restringere la posizione del locus di malattia e nel 2006 è stata identificata l'esatta mutazione causale (Zangerl et al., 2006).

1.5.3 gPRA nella razza Tibetan spaniel

La gPRA nella razza Tibetan spaniel è una gPRA *late-onset* che non rientra nella variante PRCD. Nonostante siano state identificate variazioni fenotipiche all'interno della razza, generalmente la malattia compare tra il 12 e il 18 mese di età manifestandosi classicamente con cecità notturna, granulosità e iper-riflettività del fondo tappetale all'esame oftalmoscopico; successivamente la progressione della malattia si evidenzia con un peggioramento dell'attenuazione vascolare e una atrofia della papilla ottica, che generalmente si realizzano in un tempo variabile comunque entro il terzo anno di età. Generalmente gli animali malati sviluppano cataratta tra i 4 e i 6 anni. Da un punto di vista elettroretinografico, le prime alterazioni sono evidenziabili già a 10 mesi e consistono in una riduzione della risposta dei bastoncelli seguita poi successivamente da quella dei coni. Comunque, le anomalie all'esame istopatologico si rilevano già dalla nona settimana di età con una completa degenerazione del segmento fotorecettoriale esterno evidente dall'ottavo mese.

Numerosi studi genetici sono stati eseguiti per identificare il gene di malattia; tuttavia, tutti i geni analizzati all'interno di pedigree informativi non hanno ancora consentito l'identificazione della mutazione responsabile.

CAPITOLO 2: I MICROSATELLITI

2.1 Caratteristiche generali dei microsattelliti

Il materiale genetico da un punto di vista funzionale è suddiviso in:

-DNA genico e sequenze legate ai geni

-DNA extragenico non codificante

Il DNA genico rappresenta meno del 30% dell'intero genoma. Risulta costituito da regioni codificanti, che rappresentano solo una piccola parte dell'intero genoma, e da regioni non espresse, coinvolte sia nella regolazione della trascrizione che nel mantenimento dell'integrità strutturale cromosomica.

Il DNA non codificante viene a sua volta suddiviso in sequenze che appaiono uniche o ripetute solo raramente, e in sequenze moderatamente o molto ripetitive (Bennett, 2000).

Al DNA ripetitivo appartiene il DNA satellite o TRS, *tandemly repetitive sequences*, costituito cioè da sequenze nucleotidiche che si ripetono appunto a tandem. Il nome di DNA satellite deriva invece dal fatto che, in base alla sua diversa densità, può essere separato dal restante DNA mediante particolari tecniche di centrifugazione.(Klug e Cummings, 2000) I TRS sono ampiamente interdispersi lungo tutto il genoma e sono polimorfici, ovvero in uno stesso locus il numero delle ripetizioni della sequenza può variare da un individuo all'altro; per queste proprietà i TRS sono utilizzati come marker per il DNA *profiling* e per la costruzione sia di mappe genomiche che di mappe di *linkage*.

Il DNA ripetitivo è ulteriormente suddiviso in tre gruppi: satelliti, minisatelliti e microsattelliti, in base alle dimensioni della singola unità di ripetizione e alla lunghezza totale della sequenza. Prima di incominciare la descrizione dei singoli sottogruppi va precisato che esistono delle disconcordanze tra i vari autori a proposito dei limiti delle

dimensioni di ogni sottogruppo; in questa descrizione del DNA satellite faremo riferimento ai dati riportati da Bennett (Bennet, 2000).

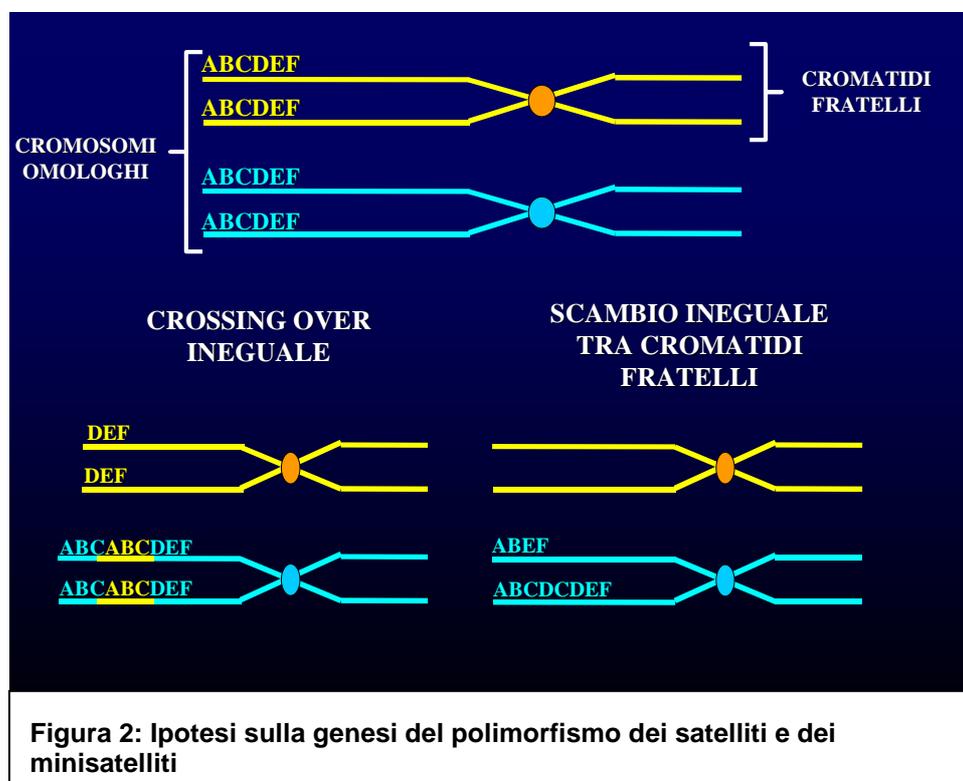
I satelliti sono i primi TRS a essere stati scoperti; la singola unità di ripetizione oscilla tra 5 fino a numerose centinaia di basi, mentre le dimensioni complessive sono comprese tra i 100 kb fino a diversi Mb. Il DNA satellite, che si trova localizzato elettivamente nelle aree centromeriche eterocromatiniche, non è trascritto e non possiede alcuna funzione biologica nota. I satelliti non possono essere impiegati come marker nel DNA *profiling* perchè possiedono dimensioni troppo grandi, che limitano la possibilità dell'amplificazione mediante tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR); inoltre la loro localizzazione, quasi esclusiva in alcune aree del genoma, non ne consente l'impiego nello studio di *linkage* genetici.

I minisatelliti sono invece sequenze nucleotidiche più piccole dei satelliti, che presentano lunghezze comprese tra 100 bp e 20kb; nei minisatelliti la dimensione dell'unità di ripetizione varia tra 6 e 50 bp. Inoltre i minisatelliti si distinguono dai loro parenti satelliti perchè possiedono importanti funzioni biologiche, come è dimostrato dal gruppo dei cosiddetti minisatelliti telomerici, che proteggono le terminazioni cromosomiche dai processi degradativi promuovendo la corretta replicazione dei telomeri. In generale i minisatelliti sono contraddistinti da un alto grado di polimorfismo, ovvero il numero di ripetizioni dell'unità di base varia notevolmente nello stesso locus tra individui diversi. I minisatelliti possiedono dunque tutte le caratteristiche ideali per essere impiegati come marker genetici nel DNA *profiling* e quindi nell'esecuzione di test per l'esclusione di paternità. Da un punto di vista storico i minisatelliti, scoperti nel 1985 all'università di Leicester (Jeffreys et al., 1985), sono stati impiegati nel DNA *fingerprinting* prima della scoperta dei più piccoli microsatelliti, che li hanno sostituiti in gran parte delle analisi di DNA *profiling*. Inoltre, nonostante il loro alto grado di polimorfismo, i minisatelli non sono impiegabili negli studi di *linkage* genetico perchè

tendono a localizzarsi soprattutto nelle parti terminali dei cromosomi. Al contrario, per questo tipo di studio è necessario che il marker abbia la distribuzione più omogenea possibile nell'intero genoma.

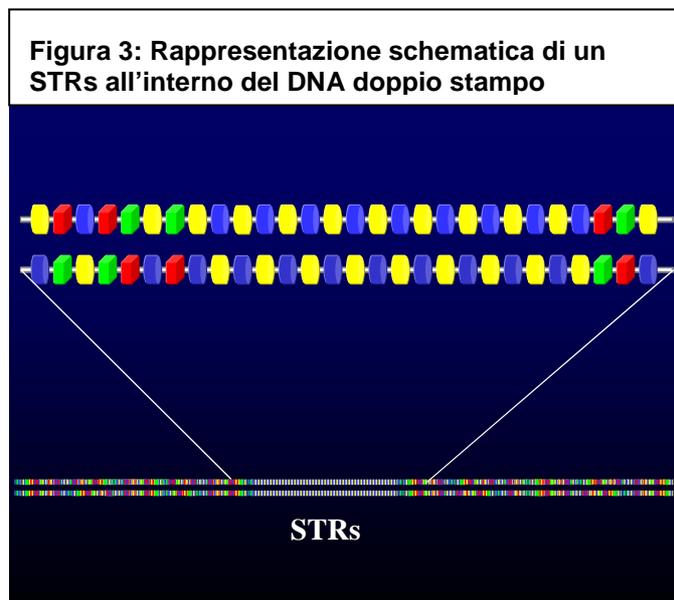
Il polimorfismo sia dei satelliti che dei minisatelliti sembra sia attribuibile a fenomeni di *crossing over* ineguale tra cromosomi omologhi e a fenomeni di *crossing over* ineguale tra cromatidi fratelli verificatesi nel corso di centinaia o migliaia di anni (Bennett, 2000).

La rappresentazione schematica del meccanismo di genesi è illustrato in Figura 2.



Concludiamo la descrizione della gerarchia dei TRS con i microsatelliti o *short tandem repeats* (STRs), che rappresentano il più utile tipo di marker genetico. Gli STRs sono corte sequenze di DNA composte da unità mono-, bi-, tri-, tetra- o pentanucleotidiche ripetute a tandem (Figura 3) con una lunghezza totale dell'intera sequenza da poche decine fino a poche centinaia di basi (Mellersh e Ostrander, 1997). I microsatelliti sono polimorfici per il numero di ripetizioni tra individui diversi con un tasso di mutazione allelico durante la meiosi molto basso pari a 5×10^{-4} o 10^{-5} risultano quindi

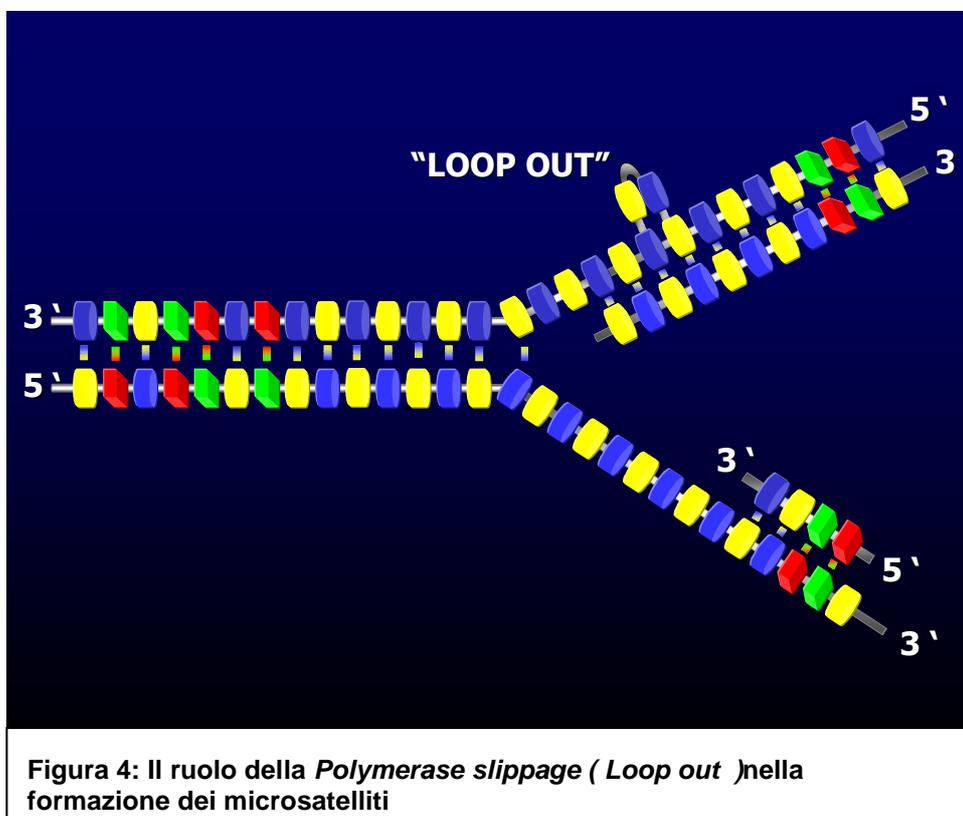
sufficientemente stabili per essere impiegati come marker genetici a eredità mendeliana. I microsatelliti sono dispersi lungo l'intero genoma con una frequenza inversamente proporzionale alla lunghezza dell'unità di ripetizione; perciò ripetizioni mononucleotidiche compaiono nel genoma circa mezzo milione di volte, mentre quelle pentanucleotidiche solo poche migliaia di volte. E' probabile che le sequenze nucleotidiche più grandi compaiano meno frequentemente per la modalità con cui si formano i microsatelliti, processo attribuibile da numerosi autori al fenomeno del "*DNA slippage*", "*polymerase slippage*" o "*slipped strand mispairing*". Lo *slippage* è un errore compiuto dalle proteine che mediano la replicazione del DNA (*DNA Polimerasi*), come conseguenza di un impreciso appaiamento, generalmente di una unità di ripetizione, tra il filamento stampo e il filamento neosintetizzato; la regione non appaiata viene forzata a formare una forcella cioè un "*loop out*" (Figura 4) che è escluso dal processo di



replicazione. Se il "*loop*" è sul filamento stampo si verifica uno "*slippage forward*" sul filamento neoformato che si sta espandendo con un risultato netto di delezione di una unità ripetitiva. Viceversa, se si forma una forcella sul filamento in via di espansione il risultato finale sarà uno "*slippage backward*" con quindi l'inserzione di una unità di ripetizione

in più sul filamento neosintetizzato. In generale è stato osservato che la frequenza con cui compaiono lungo il genoma i microsatelliti tetra e pentanucleotidici è ridotta, probabilmente perché la formazione di *loop* di dimensioni di 4 o 5 nucleotidi è più instabile e quindi meno probabile rispetto a forcelle di soli due nucleotidi. La teoria della

formazione degli STRs mediante *polymerase slippage* implicherebbe una crescita illimitata degli stessi microsatelliti nel corso del tempo, ma questo processo risulta fisiologicamente limitato dall'instaurarsi contemporaneamente di una tendenza alla riparazione dell'errore della replicazione. Infatti, molte forcelle, che si vengono accidentalmente a formare, sono poi eliminate da sistemi di riparazione cellulari. Si osserva, quindi, l'esistenza in parallelo di due fenomeni: da una parte i processi di *slippage* che tendono a modificare la sequenza, e dall'altra i fenomeni riparativi che preservano l'integrità della sequenza stessa.



E' fondamentale precisare che quando avviene uno *slippage* si verifica un evento mutazionale. In realtà la frequenza dei fenomeni di *slippage* è molto superiore al tasso di mutazione degli STRs; ciò è dovuto proprio ai processi riparativi che correggono l'errore provocato dallo *slippage*; il tasso di mutazione è determinato dunque dall'esito finale di un gioco reciproco tra errori di duplicazione e successive correzioni. Questo equilibrio tra fenomeni opposti si rivela come una fortuna per i genetisti; infatti se i

fenomeni mutazionali si presentassero troppo raramente, ciò comporterebbe la presenza di un basso numero di microsatelliti associato ad un basso grado di polimorfismo degli stessi; d'altra parte se la formazione delle forcella e i conseguenti scivolamenti non fossero riparati, si verificherebbe una variabilità dei microsatelliti anche da una generazione parentale alla prole. Da quanto è stato appena detto si desume che se facendo un'analisi parentale mediante microsatelliti un figlio possedesse un pattern di ereditarietà incompatibile con quello dei genitori sarebbe molto più probabile che quel soggetto fosse stato adottato piuttosto che si fosse verificato un evento mutazionale. Sebbene gli eventi mutazionali siano molto rari, nel corso di studi genetici in cui la popolazione di studio è molto vasta, la probabilità di registrare una singola mutazione tra una generazione e l'altra sarebbe molto elevata (Bennett, 2000).

2.2 Significato funzionale dei microsatelliti nei procarioti

Prima di considerare come vengono attualmente impiegati i microsatelliti negli studi scientifici sul genoma eucariote, è bene sottolineare il fatto che STRs sono presenti anche negli organismi inferiori, dove tra l'altro possiedono dimostrate e interessanti funzioni biologiche. Ad esempio in certe popolazioni batteriche esistono geni, chiamati geni di contingenza, caratterizzati dall'essere espressi in maniera intermittente e che contengono, all'interno della loro sequenza, dei microsatelliti. Tali geni garantiscono la sopravvivenza della popolazione batterica a cambiamenti di fattori ambientali come accade nella *Neisseria gonorrhoeae* i cui geni di contingenza aiutano il batterio ad eludere il sistema immunitario. La *Neisseria* possiede almeno una dozzina di geni codificanti per proteine esterne di membrana, geni, che contengono al loro interno ripetizioni di unità pentanucleotidiche molto instabili; se si verifica uno *slippage* di un numero di nucleotidi diverso da 3, ovvero il numero di nucleotidi che identifica un

codone, ciò causerà un “*frameshift* “ cioè una variazione della cornice nucleotidica di lettura (ORF, *open reading frame*) formata dall'insieme di triplette codificanti ciascuna per un amminoacido. Lo slittamento della cornice di lettura di un numero di nucleotidi diverso da tre comporta la completa perdita di capacità codificante del DNA e determina perciò una repressione dell'espressione di quella proteina. Analogamente un nuovo scivolamento che ripristina l'ORF determina il recupero dell'espressione della proteina. Il risultato di questo processo dinamico, in cui contemporaneamente avviene l'espressione di solo alcuni geni di superficie e la repressione di altri garantisce al batterio di presentarsi al sistema immunitario dell'ospite con una costellazione antigenica di superficie diversa da una generazione all'altra. Tale fenomeno viene definito come variazione di fase (Bennett, 2000).

2.3 Significato funzionale dei microsatelliti negli organismi superiori

Sebbene i geni di contingenza sembrino limitati al genoma procariotico, sarebbe sorprendente se i microsatelliti non avessero un ruolo biologico anche negli organismi superiori data la loro abbondanza e la frequente presenza all'interno delle stesse sequenze codificanti. Esistono infatti poli-triplette uguali tra loro inserite nei geni eucariotici codificanti per sequenze poliglutammiche, a cui è attribuito il ruolo di regolazione della trascrizione. Di conseguenza si evince che salendo nella scala biologica il ruolo delle sequenze ripetute ha assunto un significato ancora più raffinato di quello dei geni di contingenza; infatti, nei procarioti gli STRs fungono da segnali on-off cioè permettono o impediscono l'espressione dei geni in cui sono inseriti, mentre negli eucarioti queste sequenze agiscono come commutatori, regolatori dell'espressione genica. Inoltre, i microsatelliti possono avere anche ruoli biologici negativi e sembrano responsabili di alcune malattie genetiche, come la miostrofia di Huntington e la Sindrome dell'X Fragile nell'uomo. Il meccanismo della patologia è legato

all'espansione di ripetizioni trinucleotidiche da cui deriva il nome di *trinucleotide repeats associated diseases*. Caratteristico di queste malattie è il diretto rapporto tra gravità della patologia e estensione dell'espansione anomala che, inoltre, tende a autopotenziarsi da una generazione all'altra causando una via via maggior precocità di comparsa e gravità sintomatologica.

L'assenza delle malattie associate a sequenze trinucleotidiche in tutti gli altri animali, compresi quelli più vicini all'uomo nella scala evolutiva come le scimmie, ha condotto a importanti riflessioni; le triplette ripetute nei geni dei neuroni possono aver condotto ad una evoluzione superiore delle funzioni cerebrali, ma parallelamente lo sviluppo delle malattie associate è stato forse il costo genetico da pagare per questo beneficio (Bennett, 2000).

2.4 I microsatelliti come marker genetici

Un marker genetico per definizione deve avere due o più alleli; quando la frequenza dell'allele più comune è meno del 95% il marker è considerato polimorfico. Il grado di polimorfismo dei marker genetici è misurato dal PIC, acronimo di *polymorphism information content* (Botstein et al., 1980), che può variare tra 0.0 e 1.0. Per un determinato marker il PIC è calcolato sulla base del numero di alleli diversi con cui tale marker compare e sulla base della frequenza di comparsa di tali alleli in una determinata popolazione. La mappa genetica ideale si configura oltre che per la sua alta densità di marker anche per il fatto che tali marker devono possedere un PIC di almeno 0.7 (Mellersh e Ostrander, 1997). Nonostante possa sembrare banale, è importante ribadire che il grado di polimorfismo degli STRs dipende direttamente dal tipo di popolazione canina in cui è calcolato; sarà quindi comprensibile che la variabilità di uno stesso microsatellite risulterà maggiore, quando è valutata su cani non imparentati e, viceversa, si dimostrerà maggiormente monomorfa all'interno di gruppi

canini connessi da legami di parentela. Ancora, la tendenza a ottenere razze sempre più pure ha condotto inevitabilmente a una riduzione della variabilità intrarazziale dei microsatelliti. Infatti, quando sono pubblicati i dati relativi alla scoperta di nuovi microsatelliti (sequenza e primer impiegati per amplificarli), è sempre specificato su quale tipo di popolazione canina si calcola il grado di polimorfismo e la frequenza allelica.

Nella descrizione di un microsatellite sono fornite anche le sequenze *flanking* cioè quelle sequenze che lo attorniano, permettendo, in questo modo, di creare dei primer che promuovano l'amplificazione del microsatellite. I primer sono infatti oligonucleotidi che si affiancano alla sequenza bersaglio in posizioni più o meno ravvicinate e da qui sono capaci di originare una amplificazione a catena in presenza ovviamente dei costituenti essenziali, ovvero una *DNA polimerasi* e dei desossinucleotidi trifosfatati.

Come abbiamo già affermato in precedenza, lungo tutto il genoma sono maggiormente presenti quei microsatelliti costituiti da sequenze dinucleotidiche, in modo particolare da CA e GT. Attualmente tuttavia, molti studiosi hanno identificato aspetti negativi collegati all'impiego di tali microsatelliti come marker genetici. Per prima cosa, la lunghezza media delle sequenze $(CA)_n$ nel genoma canino è più corta di quella osservata negli omologhi umani e ciò si traduce in un minor grado finale di polimorfismo; ancora, gli spinti programmi di selezione mediante incrocio tra consanguinei hanno provocato un alto livello di omozigosi all'interno di molte razze. Da qui è sorta l'esigenza di reperire marker genetici alternativi, sempre all'interno della famiglia dei microsatelliti, utili soprattutto nelle analisi genetiche di pedigree molto puri. Una soluzione sono le ripetizioni tetranucleotidiche come GAAA o GAAT che possiedono tutti i requisiti fondamentali del marker genetico ideale. Tali microsatelliti si presentano frequentemente nel genoma canino, all'incirca ogni 100-200 kb (mentre CA ogni 60 kb); sono altamente polimorfici soprattutto le sequenze GAAA con valori di PIC che

superano generalmente lo 0,7% valutati su cani di razza mista. Sebbene il livello complessivo di eterozigosi può riscontrarsi inferiore in cani di razza, questo livello di polimorfismo risulta comunque molto alto tanto che, in comparazione con l'uomo, non esistono ripetizioni ugualmente polimorfiche. Le ripetizioni tetranucleotidiche mostrano tuttavia una minore stabilità rispetto alle ripetizioni $(CA)_n$ che, come abbiamo precedentemente affermato, hanno un tasso di mutazione pari a 10^{-5} o 10^{-6} durante la divisione meiotica. Nonostante ciò, questi marker sono sufficientemente stabili da essere impiegati nel DNA *profiling* di almeno 3 generazioni di cani di una stessa razza (Francisco et al., 1996).

Dunque, ribadiamo e riepiloghiamo alcuni importanti concetti relativi ai microsatelliti:

- 1) sono polimorfici, cioè lo stesso microsatellite presenta diverse forme alleliche. Gli alleli di uno stesso microsatellite possiedono tutti la stessa unità di ripetizione e il polimorfismo dipende solo dalla lunghezza totale dell'allele, ovvero dal numero complessivo di ripetizioni della stessa unità di base. E' ovvio che all'interno di una popolazione, come ad esempio quella canina, il numero di alleli diversi trovati dipende dalla dimensione della popolazione stessa e dal tipo di popolazione scelta per lo studio; più è grande la popolazione esaminata e più è varia, cioè composta da cani non correlati e di razza mista, più sarà probabile trovare un'ampia costellazione di alleli diversi.
- 2) ogni individuo per uno stesso microsatellite possiede due alleli, uno di origine paterna e uno di origine materna, se sono uguali quell'individuo sarà omozigote per quel microsatellite mentre se sono diversi sarà ovviamente eterozigote per quel microsatellite.

Come detto, l'eredità dei singoli alleli è valutata mediante reazioni di PCR realizzate con l'impiego di primer disegnati per appaiarsi unicamente con le sequenze di DNA che affiancano il microsatellite target. I prodotti dell'amplificazione sono poi visualizzati dopo

corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide tramite colorazione con etidio bromuro o *silver staining*. Siccome il polimorfismo allelico è generalmente costituito da differenze di poche paia di basi o addirittura di una sola coppia di basi, la capacità discriminante della poliacrilamide non è sufficiente per rilevare queste minime differenze.

Ciò rende necessario l'impiego di metodi di rilevazione alternativi e con un potere di risoluzione implementato; la risoluzione può essere rappresentata dall'uso per la corsa elettroforetica dei gel da sequenziamento che, oltre a possedere una trama di poliacrilamide molto fitta, sono lunghi circa il doppio dei normali gel promuovendo quindi in questa lunga corsa la separazione anche di prodotti differenti per un solo nucleotide.

Attualmente esistono anche particolari tipi di agarosio che si avvicinano, come capacità risolutiva, la poliacrilamide; un esempio è il Metaphore Agarose (FMC) specificatamente ideato per l'analisi dei microsatelliti.

Infine, esistono metodiche più complesse non attuabili ancora nei comuni laboratori ma solo in centri specializzati che garantiscono una risoluzione definitiva al problema di

evidenziare il polimorfismo. Queste tecniche si basano su metodi semiautomatici di fluorescenza, in cui i primer usati per amplificare i microsatelliti sono marcati covalentemente con diversi fluorofori. Per la valutazione delle dimensioni dei prodotti di amplificazione sono inseriti nel sistema degli standard a peso noto che ovviamente vengono anch'essi marcati con fluorofori differenti da

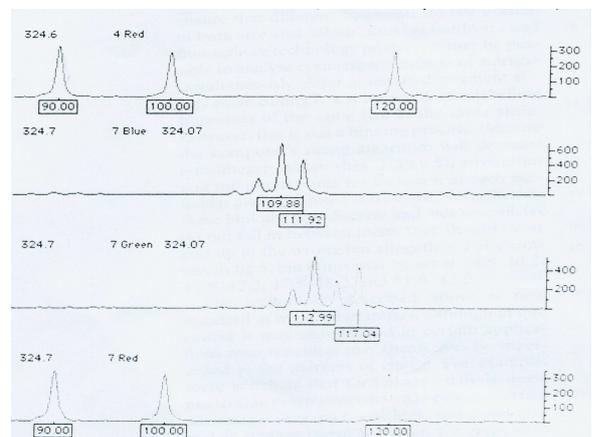


Figura 5: Esempio di individuazione dei polimorfismi mediante tecnologia a fluorescenza

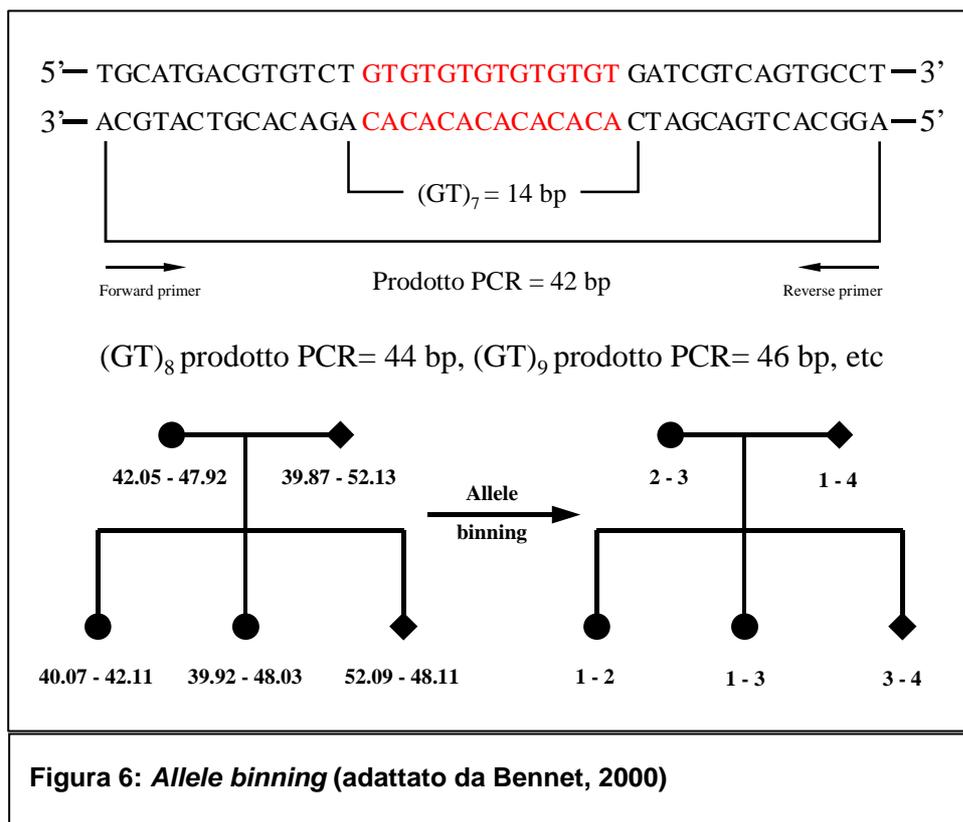
quelli usati per i primer. I suddetti prodotti di amplificazione e gli standard interni sono premixati insieme e sono fatti correre nello stesso capillare di elettroforesi. (Figura 5).

Come risultato, è possibile analizzare più microsatelliti nella stessa linea del gel e calcolarne contemporaneamente, mediante un sistema computerizzato, le dimensioni attraverso il paragone con il set di marcatori a peso noto. Quindi questo sistema consente di discriminare un microsatellite da un altro sulla base della lunghezza d'onda emessa dal fluoroforo e consente di valutare la dimensione dei prodotti dal paragone con frammenti di DNA a dimensione nota; ovviamente questa tecnica non consente di conoscere la sequenza nucleotidica degli alleli, che può essere resa nota soltanto con le tecniche di sequenziamento (Bennett, 2000).

Il successivo passo del processo analitico dei prodotti di amplificazione è il cosiddetto *allele-binning*, momento piuttosto critico perché può spesso condurre ad errori. In pratica, dopo essere venuti a avere identificato le dimensioni con cui si presenta un microsatellite, è necessario associare i valori dimensionali dei prodotti con gli alleli noti di quel microsatellite; questo è il processo dell'allele binning. La difficoltà deriva dal fatto che il sistema di elaborazione elettronico non fornisce numeri interi; e quindi risulta necessario fissare i limiti del range di dimensioni massima e minima che può assumere un determinato allele. Ad esempio, illustriamo il caso di un ipotetico microsatellite (GT)₇ e mostriamo il processo di *allele binning* (Figura 6).

E' importante precisare che il processo decisionale dell'*allele binning* non è esclusivo delle tecniche semiautomatiche fluorescenti, ma è, infatti, anche un comune step delle tecniche classiche con separazione degli amplificati su gel di poliacrilamide e con successiva colorazione mediante etidio bromuro, *silver staining* o autoradiografia. Con queste tecniche tradizionali tutti i frammenti di DNA, compreso i marcatori di peso, sono uguali come aspetto; perciò ogni microsatellite deve essere analizzato singolarmente e non può essere premixato con gli standard per evitare confusione tra frammenti di dimensioni analoghe. Il marcatore classicamente è caricato nei pozzetti alle estremità del gel da solo; il *binning* consiste nel comparare il frammento amplificato con lo

standard per desumerne le dimensioni e, successivamente, nell'associare quel frammento con un determinato allele. Sebbene le bande possano correre tutte allo stesso livello e in modo omogeneo, è inevitabile che la corsa alle estremità opposte del gel non sia uguale; quindi il paragone tra una linea del gel e lo standard tra di loro molto lontani porterà inevitabilmente a errori perché non si può assumere con assoluta certezza che frammenti allineati siano effettivamente della stessa dimensione. Il processo del *binning* nei metodi classici è quindi una fonte di errore maggiore rispetto alle tecniche di fluorescenza dove è possibile fare migrare i campioni in esame nello stesso capillare con i marcatori (Bennett, 2000).



CAPITOLO 3: DIAGNOSI DELLE MALATTIE GENETICHE

3.1 Introduzione

In generale, le malattie genetiche derivano da una mutazione di un gene che origina un allele per così dire “malato” o “pericoloso”. Nella maggiore parte dei casi le mutazioni sono tratti che seguono un’eredità Mendeliana semplice con carattere autosomico recessivo, autosomico dominante o legato ai cromosomi sessuali. Altre malattie ereditarie possono risultare più complesse e mostrare una ridotta penetranza o derivare dal contributo di più loci genetici mutati (malattia multigenica).

Normalmente, i disordini genetici possono derivare da mutazioni ex-novo all’interno della storia di una famiglia, ma nella maggior parte dei casi derivano da “vecchie” mutazioni trasmesse da una generazione a quella successiva. Gli alleli mutati possono persistere all’interno di una popolazione per molti motivi:

1. possono conferire particolari vantaggi nello stato di eterozigoti, come nel caso dell’ α e β talassemie dell’uomo che sono associate geograficamente alle aree malariche
2. i segni sintomatologici possono comparire tardivamente, dopo che cioè l’individuo ha già generato prole (ad es. la malattia di Huntington nell’uomo)
3. la mutazione può essere un tratto recessivo e quindi l’allele difettoso può essere diffuso nella popolazione da parte dei soggetti carrier sani. Senza un programma di screening per la mutazione lo stato di carrier può rendersi evidente solo dopo che ha generato prole malata

Il genoma canino contiene approssimativamente 50000 geni distribuiti su 39 paia di cromosomi (38 cromosomi omologhi e 2 cromosomi sessuali). Ad oggi sono state riconosciute nel cane quasi 400 malattie a carattere ereditario; tuttavia, le precise

modalità di eredità di queste malattie sono conosciute solo per circa un terzo di esse, e, nella maggior parte dei casi, sono legate a mutazioni di tipo autosomico recessivo.

Nel cane, così come in generale negli animali domestici, l'obiettivo di rinforzare, mantenere e selezionare precisi caratteri di razza, fa ricorso all'impiego di individui con caratteristiche particolarmente apprezzate per generare un enorme numero di discendenti facendo ricorso anche all'incrocio tra consanguinei; se questi animali clinicamente sani, sono però dei carrier, gli effetti nelle generazioni successive possono essere deleterie perché determinano un notevole aumento della frequenza dell'allele malato e quindi un aumento della probabilità che l'allele compaia in stato di omozigosi.

Da tutto ciò si evince l'importanza della possibilità di riconoscere con anticipo lo stato di carrier attraverso l'uso di test genetici, verso cui è cresciuto, nelle ultime 2 decadi, un interesse progressivamente sempre maggiore sia nella medicina umana che nella medicina veterinaria.

Lo studio genetico di una malattia ereditaria finalizzato ad individuarne la mutazione responsabile può seguire 3 sostanziali strategie che saranno di seguito illustrate singolarmente.

3.2 Approccio mediante geni candidati

L'approccio mediante gene candidato consiste nel selezionare un gene particolare come oggetto di studio essendo considerato come il più probabile sito di mutazione.

I principali criteri di selezione di un gene come candidato sono 2:

1. i geni sono selezionati perché risultano difettivi in disordini genetici simili ma di altre specie animali (generalmente uomo o topo)
2. i geni sono selezionati se, conoscendone la funzione, si ritiene che possano influenzare aspetti morfofunzionali delle strutture che risultano coinvolte nella malattia

L'analisi del gene candidato consiste nel sequenziare l'intero gene mettendo a confronto un gruppo rappresentato da animali sani con uno di malati.

Tuttavia, la presenza di una mutazione in un gene non è di per sé sufficiente ad identificare la causa del disordine e molte differenze nelle sequenze sono soli polimorfismi. Qualora, invece, il cambiamento nella sequenza del DNA provocasse una sostituzione amminoacidica in un'importante parte della corrispondente proteina, dovrebbe essere considerato come candidato "forte". La modificazione genetica responsabile del disordine co-segregherà con la malattia e questo può essere valutato analizzando un pedigree di animali, se disponibile, per verificare se l'eredità della mutazione è accompagnata all'eredità della malattia.

Purtroppo, per molte malattie genetiche non è stato individuato il relativo gene candidato; inoltre, malattie ereditarie molto simili tra specie diverse possono derivare da mutazioni su geni completamente diversi. A titolo esemplificativo; nella razza canina Bedlington terrier è conosciuta una tossicosi ereditaria da rame identica fenotipicamente alla malattia di Wilson dell'uomo; tuttavia, il gene implicato della malattia umana non è responsabile della malattia nel cane (Sampson, 2001).

In conclusione, l'approccio con geni candidati ha come vantaggio quello di permettere di identificare la specifica mutazione e quindi la creazione di mirati test genetici; allo stesso tempo è un metodo molto costoso perché richiede il sequenziamento dell'intero gene che può poi risultare non affetto. Allo stesso tempo, l'approccio per geni candidati non richiede particolari vincoli per quello che riguarda la popolazione di riferimento, che può idealmente essere costituita anche da solo 2 soggetti rappresentati da un animale sano ed uno malato.

3.3 Linkage Analysis

Il metodo di studio del *linkage analysis* si basa su presupposti totalmente differenti dall'approccio mediante geni candidati; la principale differenza consiste nel fatto che nell'analisi di *linkage* non è fatta nessuna supposizione su quale sia né il gene responsabile di malattia, né, più in generale, il tratto cromosomico coinvolto. In questo metodo di studio tutto il genoma è potenzialmente sottoposto ad analisi, senza indirizzare l'attenzione verso nessuna regione in particolare.

Il concetto su cui si incardina la teoria dell'analisi di *linkage* consiste nel fatto che durante l'evento meiotico, che porta alla formazione dei gameti, le coppie di cromosomi omologhi si avvicinano scambiandosi del materiale genetico (c.d. *crossing – over*); tuttavia, le regioni di DNA che “mappano” molto vicine sullo stesso cromosoma tendono a essere co-ereditate durante l'evento meiotico e tanto più queste regioni sono vicine tanto più è alta la probabilità che siano ereditate associate da una generazione a quella successiva.

Alla base dell'analisi di *linkage* deve essere quindi disponibile un pedigree di animali informativo (comprendente animali malati e carrier obbligati) con almeno 3 generazioni parentali, in modo da potere valutare la segregazione dei caratteri da una generazione a quella successiva. La ricerca della localizzazione cromosomica della mutazione causale avviene tramite l'impiego di markers genetici, cioè di regioni di DNA variabili all'interno della popolazione e di cui si conosce la posizione cromosomica. Tanto più tali markers si trovano fisicamente vicini al sito di mutazione tanto più facilmente saranno co-ereditati insieme alla mutazione da una generazione parentale a quella successiva; in tale modo, il marker genetico agisce come una “guida” per la localizzazione cromosomica del locus di malattia. In maniera molto semplificata, l'analisi di *linkage* prevede di valutare se qualcuna delle varianti con cui compare il markers nella

popolazione compaia sempre associata alla presenza di malattia, cioè in altre parole se il marker sia associato o appunto “linkato” alla malattia. Per una completa comprensione della teoria dell’analisi di *linkage* occorre sottolineare che i markers da impiegare nello studio devono necessariamente essere variabili, cioè presentare delle varianti alleliche all’interno della popolazione; ragionando per assurdo, infatti, se un marker non fosse polimorfico, cioè fosse sempre uguale nella popolazione, non riuscirebbe mai ad identificare il sito di malattia neppure se si trovasse ad esso associato perché sarebbe uguale nell’animale sano come nel malato. Di conseguenza, affinché un’analisi di *linkage* abbia successo si devono verificare le seguenti condizioni indispensabili:

1. il marker deve essere fisicamente vicino al locus di malattia
2. il marker deve essere polimorfico nella popolazione e deve possedere una variante allelica rara che compaia solo in associazione alla presenza di malattia

I markers ideali, e normalmente impiegati per eseguire tale tipo di studio, sono i microsatelliti, considerati come marcatori genetici praticamente ideali perché sparsi abbondantemente lungo tutto il genoma e generalmente altamente polimorfici. Il numero di microsatelliti impiegati per eseguire un’analisi di *linkage* non è fisso ma generalmente tanto più è elevato, tanto più è elevata la probabilità che lo studio abbia successo; questo presupposto deriva dal fatto che non indirizzando l’attenzione verso nessun gene e nessuna porzione cromosomica in particolare, lo screening del genoma deve essere il più ampio possibile e cioè deve contenere il numero più elevato possibile di markers in modo da comprendere tutto il genoma (c.d. *genome-wide screening*). Generalmente per eseguire uno studio di *linkage* all’interno di un albero genealogico informativo sono impiegati tra i 200 e i 300 microsatelliti usando pedigree con almeno un centinaio di animali.

Per una data area del genoma la probabilità che avvenga un evento di ricombinazione tra un marker e un gene di malattia è direttamente proporzionale alla loro distanza; la probabilità che tale evento si verifichi è espressa come frazione di ricombinazione (θ). Se θ è uguale a 0.5, il marker e il gene di malattia non sono linkati e sono quindi segregati in modo indipendente; in altre parole, la probabilità che marker e gene siano ereditati associati o separati è identica. Al contrario se marker e gene di malattia sono tra di loro linkati, la θ risulta inferiore a 0.5.

Il *lod score* (Z) è il parametro utilizzato per stimare quanto sia forte un *linkage* tra 2 loci genetici; Z è il logaritmo del rapporto tra la probabilità che i 2 loci siano linkati ($\theta < 0.5$) e la probabilità che i 2 loci siano invece ricombinati in modo casuale ($\theta = 0.5$).

$$Z(\theta) = \log_{10} [P(\theta)/P(0.5)]$$

in cui P = probabilità

Tradizionalmente il *linkage* è accettato se una θ minore di 0.5 è supportata da un *lod score* di almeno 3. Tuttavia, quando si considera un *linkage* tra un microsatellite ed un locus di malattia è richiesto generalmente un *lod score* superiore a 6 (Ostrander et al., 2001).

Il calcolo del *lod score* in pedigree molto complessi ed articolati è generalmente eseguito mediante appositi software come ad esempio M-Link.

L'analisi di *linkage* è quindi uno studio generalmente molto complesso, e il successo di un tale tipo di studio non è mai definitivo. Infatti, l'analisi di *linkage* porta ad individuare una regione cromosomica dove probabilmente risiede il locus della malattia; l'analisi deve proseguire con il c.d. *refinement* cioè si esegue un'ulteriore analisi di *linkage* usando il numero più elevato possibile di microsatelliti che risiedano in quella regione, in modo da potere "restringere" la porzione di cromosoma su cui mappa la malattia genetica. Solo successivamente, l'analisi procede mediante un approccio per geni

candidati; cioè si individuano tutti i geni che mappano in quella regione e si esegue un'analisi di sequenza comparando animali sani (*wild-type*) con malati (*mutant-type*).

Nonostante l'analisi di linkage sia un approccio molto complicato, laborioso e non definitivo perché deve concludersi con un approccio per geni candidati, rimane l'unica via di scelta, quando a priori non possono essere fatte supposizioni sui geni candidati, perché non sono conosciuti le vie e i processi coinvolti nella malattia. Inoltre, l'identificazione di un marker linkato alla malattia può portare molto spesso allo sviluppo di test genetici c.d. di *linkage*, utili soprattutto per l'identificazione degli animali carrier.

3.4 Approccio *candidate-linkage* per lo studio della gPRA

Esiste infine un ulteriore approccio per lo studio delle malattie genetiche, che rappresenta una sorta di sintesi tra i metodi del gene candidato e dell'analisi di *linkage*.

In analogia all'analisi di *linkage*, questo metodo prevede l'impiego di microsatelliti all'interno di un pedigree informativo. Tuttavia, al contrario dell'analisi di *linkage*, la scelta dei microsatelliti da analizzare è totalmente diversa:

1. nell'analisi di *linkage* è analizzato un numero molto elevato di microsatelliti distribuiti possibilmente in modo casuale lungo tutto il genoma
2. l'analisi "*candidate – linkage*" è un'analisi di *linkage* per così dire "mirato" perché i microsatelliti analizzati si trovano o nelle immediate vicinanze o all'interno delle sequenze introniche di geni candidati.

Il "*candidate – linkage*", di conseguenza, rappresenta una strategia meno dispendiosa in termini di tempi e costi rispetto sia all'approccio per geni candidati, che prevede il sequenziamento di interi geni, sia all'analisi di *linkage* tradizionale perché consente di investigare precise regioni genomiche di interesse dove mappano geni che potrebbero essere coinvolti nella malattia.

Tuttavia, affinché tale metodo porti a risultati definitivi si devono contemporaneamente verificare le seguenti condizioni:

1. il gene candidato selezionato deve contenere uno o più microsatelliti
2. tali microsatelliti devono essere polimorfici
3. qualora il gene candidato fosse anche il responsabile di malattia, il microsatellite deve presentare una variante allelica rara che compaia solo in associazione con la variante di malattia.

In conclusione, dalla seppure breve descrizione dei vari metodi con cui affrontare lo studio di una malattia genetica, risulta evidente che non esiste un metodo migliore in senso assoluto; nel caso particolare della malattia genetica descritta in questo elaborato, è stata scelta la strategia del *candidate – linkage*, dal momento che era già stata eseguita un'analisi di *linkage* tradizionale con circa 200 microsatelliti, risultata però non utile ai fini dell'individuazione del locus di malattia.

CAPITOLO 4: PARTE SPERIMENTALE STUDIO DELLA gPRA NELLA RAZZA TIBETAN SPANIEL

4.1 Introduzione

Questo capitolo è dedicato alla descrizione di uno studio genetico eseguito mediante approccio di candidate *linkage* per la ricerca del locus di malattia di gPRA all'interno di un pedigree di 96 cani di razza Tibetan spaniel. Tale studio ha portato alla pubblicazione del lavoro scientifico: Turba ME, Binns M, Mellersh C. *Canine microsatellites associated with genes known to cause progressive retinal atrophy in dogs or retinitis pigmentosa in humans*,. *Animal Genetics*, 36, 259-261, 2005. Tuttavia, vista l'estrema sintesi del lavoro scientifico allegato, abbiamo ritenuto opportuno descrivere con più accuratezza le principali fasi che hanno caratterizzato l'esecuzione di questo studio.



Figura 7: Cane di razza Tibetan spaniel

4.2 Selezione e ricerca dei microsatelliti

I microsatelliti selezionati per l'esecuzione di questo studio sono stati scelti per essere associati:

1. a geni coinvolti nel *pathway* di trasduzione del segnale luminoso a livello retinico, oppure
2. a geni riconosciuti come responsabili di Retinite Pigmentosa nell'uomo

In particolare, la ricerca dei geni candidati è avvenuta tramite consultazione di numerose banche dati genetiche disponibili on-line tra cui:

- Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) e Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>) dove sono depositate le sequenze di tutto il genoma canino e umano
- Il sito RetNet (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>), che raccoglie tutte le principali informazioni sulle patologie ereditarie della retina dell'uomo; nel caso particolare della Retinite Pigmentosa nella sua variante autosomica recessiva sono stati identificati ad oggi 17 tra geni e loci responsabili di malattia
- Il sito OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>) che rappresenta un database dei geni e dei disordini genetici dell'uomo

In questo modo è stato selezionato un pannello di geni candidati, di cui alcuni erano già investigati in altre razze canine diverse dal Tibetan spaniel (cGMPPDE6A e 6B, RHO, RDS), mentre altri non erano mai stati studiati prima nel cane (NRL, TULP1). Lo studio ha previsto di ricercare all'interno di tali geni (soprattutto nelle regioni introniche), o nelle immediate vicinanze (fino ad una distanza di 5 kb da entrambi i terminali 5' e 3') dei microsatelliti aventi però almeno un numero di ripetizioni dell'unità di base uguale o superiore a 12.

Sebbene il genoma canino sia stato completamente sequenziato, la sua mappatura risulta tuttora ancora incompleta. Ciò si traduce nel fatto che molte sequenze del genoma del cane non hanno ancora un'esatta definizione cioè non sono state identificate come geni o sequenze non codificanti etc. Per tale motivo la ricerca dei microsatelliti all'interno dei geni candidati è risultata molto più complessa per tutti quei

geni che non risultavano mappati nel cane; in questo caso le sequenze dei geni omologhi dell'uomo sono state impiegate come sequenze di partenza.

4.2.1 Ricerca dei microsatelliti in geni canini noti

Nel caso di geni candidati a sequenza nota (e disponibile dalla consultazione delle banche dati genetiche riportate sopra), la ricerca dei microsatelliti si è avvalsa di uno speciale programma disponibile on-line (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi?term=trace+archive>) che ha consentito di visionare direttamente il tracciato elettroforetico della sequenza (usando la funzione Show as Trace) e di potere individuare con molta più facilità la presenza di una sequenza ripetuta a tandem.

Per quei geni che non contenevano microsatelliti, la ricerca è stata estesa alle regioni fiancheggianti. Questo tipo di ricerca è chiamata in gergo come *Chromosome-Walking* e può essere eseguita in tutti i casi in cui è disponibile la sequenza dell'intero genoma della specie studiata.

Per eseguire il *Chromosome-Walking* è necessario eseguire in successione una serie di analisi di tipo blast, cioè una serie di allineamenti di sequenze nucleotidiche usando il programma Trace Archive Mega Blast:

1. Il primo blast deve essere eseguito tra la sequenza di cui si vogliono studiare le regioni fiancheggianti e l'intero genoma canino (*Canis Familiaris* WGS); questo consente di identificare tutte le sequenze depositate nelle banche dati genetiche che hanno una parte della sequenza sovrapponibile a quella di partenza.
2. dopo avere identificato la direzione verso cui eseguire il *Chromosome-Walking*, deve essere costruita una sequenza consenso tra tutte le sequenze risultate dal blast del punto 1 e orientate verso la direzione da studiare. Per eseguire il

presente lavoro le sequenze consenso sono state create mediante l'uso del software Staden Package (<http://staden.sourceforge.net/>).

3. la sequenza consenso deve essere sottoposta ad un successivo blast contro l'intera sequenza del genoma canino; gli allineamenti risultanti che sono orientati verso la direzione prescelta sono assemblati con la sequenza consenso originale, che di conseguenza progressivamente si allunga
4. lo studio prosegue ripetendo in serie le analisi di blast tra la sequenza consenso progressivamente sempre più lunga e l'intero genoma del cane, fino a quando è identificato un microsatellite

4.2.2 Ricerca dei microsatelliti partendo da sequenze di geni umani

Per alcuni geni candidati non mappati nel cane, le corrispondenti sequenze umane (ottenute da banche dati on line) sono state impiegate per l'esecuzione di blast contro l'intero genoma canino usando il programma Trace Archive-Cross Species Mega Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/tracemb.shtml>) specifico per il confronto di sequenze tra specie differenti. I risultanti allineamenti di sequenze canine sono stati organizzati in sequenze consenso usando il programma Staden Package e seguendo la modalità descritta nel precedente paragrafo; in questo modo sono state create delle sequenze canine predette come ortologhe dei geni umani di partenza. Anche in questo caso lo studio ha previsto di ricercare all'interno di queste sequenze la presenza di microsatelliti.

4.2.3 Elenco dei microsatelliti

La successiva lista rappresenta i geni analizzati e i corrispondenti microsatelliti trovati; per una più completa trattazione dei microsatelliti si rimanda alla pubblicazione allegata

dove sono indicate anche i relativi numeri di accesso alle banche dati, la posizione cromosomica e l'origine del gene:

1. cGMPPDE6A- (gt)₂₆
2. cGMPPDE6B- (ca)₁₂
3. ABCA4- (ca)₂₃
4. RPE65- (ca)₁₅
5. RPE65- (taaa)₂₀
6. TULP1- (ca)₁₈
7. GUCA1A- (gt)₁₃
8. NRL- (tg)₁₆
9. RDS- (ga)₁₆
10. RHO- (ca)₂₂

4.3 Multiplex PCR dei microsatelliti selezionati mediante tailed primer

Per ogni microsatellite trovato è stata disegnata una specifica coppia di primer usando un programma disponibile on-line (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Alla sequenza di tutti i primer forward è stata aggiunta in posizione 5' una sequenza universale di 19 nucleotidi (tecnica del tailed primer), complementare ad un terzo primer marcato con un fluorocromo (FAM). Le PCR dei 10 microsatelliti sono state organizzate in 4 reazioni di PCR multiplex in modo da amplificare contestualmente più marcatori; poiché è stato usato un unico fluoroforo per tutte le coppie di primer, le PCR sono state appositamente studiate in modo tale da distinguere i vari microsatelliti sulla base delle dimensioni dei prodotti di amplificazione, che risultava diverso tra i microsatelliti amplificati nella stessa reazione multiplex.

Per le specifiche sui protocolli di amplificazione e sull'organizzazione delle PCR Multiplex si rimanda alla pubblicazione allegata.

4.4 Genotyping e analisi di linkage

I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica capillare su sequenziatore automatico. I dati ottenuti sono stati analizzati con il programma M-Link per evidenziare un eventuale *linkage* con il locus di malattia (Tabella 1).

Tuttavia nessuno tra i micorsatelliti ha presentato un *lod-score* maggiore di 3, anche se, in realtà, il microsatellite linkato con il gene TULP1 è stato l'unico marcatore con un *lod-score* positivo, sebbene inferiore al valore giudicato significativo.

MARKER	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20
ABCA4	0.23	0.21	0.19	0.16	0.14
cGMPPDE6A	-0.10	-0.08	-0.07	-0.05	-0.03
RPE65_CA		-0.74	-0.33	-0.15	-0.06
RPE65_CAAA		-0.23	0.03	0.13	0.17
RDS	-3.32	-0.76	-0.48	-0.32	-0.22
NRL	0.10	0.10	0.09	0.07	0.06
RHO	-3.18	-0.62	-0.36	-0.23	-0.15
TULP1	1.87	1.66	1.45	1.24	1.03

Tabella 1: risultati dell'analisi di linkage

Il microsatelliti relativo al gene TULP1 è stato successivamente mappato sul cromosoma CFA12, utilizzando per tale scopo la funzione blast disponibile sul sito internet <http://www.ensembl.org/index.html>. Per tale motivo è stato deciso di proseguire l'analisi di linkage impiegando un pannello di microsatelliti (24 marcatori) localizzati sullo stesso cromosoma 12. Anche in questo caso, nessun microsatellite ha presentato un valore di lod-score significativo. Di conseguenza, il locus di malattia per la variante di gPRA nella razza canina Tibetan spaniel non è stato identificato.

Nella pubblicazione allegata non è presentato il risultato del *linkage* ma sono esclusivamente presentati i 10 microsatelliti associati ai geni candidati, mai identificati

antecedentemente, insieme alla localizzazione cromosomica e ai relativi primer di amplificazione.

BIBLIOGRAFIA

- Acland G.M., Aguirre G.D., Ray J., Zhang Q., Aleman T.S., Cideciyan A.V., Pearce-Kelling S.E., Anand V., Zeng Y., Maguire A. M., *Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness*, *Natural Genetics*, 28, 92-95, 2001.
- Aguirre G.D., Acland G.M., *Models, mutants, and man: searching for unique phenotypes and genes in the dog model of inherited retinal degeneration*, dal libro Ostrander E., Giger U., Lindblad-Toh K., *The dog and its genome*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.
- Bennett P., *Microsatellites*, *Molecular Pathologies*, 53 (4), 177-183, 2000.
- Clements P.J.M., Gregory C.Y., Petersen-Jones S.M., Sragan D.R., Bhattacharya S.S., *Confirmation of the rod cGMP phosphodiesterase beta unit (PDE beta) nonsense mutation in affected rcd-1 Irish setters in the UK and development of a diagnostic test*, *Current Eye Research*, 12, 861-866, 1993.
- Clements P.J., Sragan D.R., Gould D. J., Petersen-Jones S.M., *Recent advances in understanding the spectrum of canine generalised progressive retinal atrophy*, *Journal of small animal practice*, 37 (4), 155-162, 2006.
- Francisco L.V., Langston A.A., Mellersh C.S., Neal C.L., Ostrander E.A., *A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping*, *Mammalian Genome*, 7, 359-362, 1996.
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.I., *Hypervariable minisatellite regions in human DNA*, *Nature*, 314, 67-73, 1985.

- Jenkins T.W., *Neuroanatomia funzionale dei mammiferi*, Edizioni Ed agricole, 256-258, 1989.
- Kijas J.W., Miller B.J., Pearce-Kelling S.E., Aguirre G.D., Acland G.M., *Canine models of ocular disease: outcross breedings define a dominant disorder present in the English mastiff and bull mastiff dog breeds*, Journal of heredity, 94, 27-30, 2003.
- Klug W.S., Cummings M.R., *Genetica*, Città studi edizioni, Milano: 265-281, 360-362, 2000.
- Mellersh C.S., Ostrander E.A., *The Canine Genome*, Advances in Veterinary Medicine, 40, 191-216, 1997.
- Petersen-Jones S.M., Entz D.D., Sargan D.R., *cGMP phosphodiesterase-alpha mutation causes progressive retinal atrophy in the cardigan Welsh corgi dog*, Investigation ophthalmologist visual science, 40, 1637-1644, 1999.
- Sampson J., *Identifying the genes responsible for inherited diseases in dogs*, Journal of Small Animal Practice, 41 (7), 369-371, 2001.
- Ostrander E., Galibert F., Mellersh C., *Linkage and radiation hybrid mapping in the canine genome*, in The Genetics of the dog, CAB International, 2001.
- Zangerl B., Goldstein O., Philp A.R., Lindauer S.J.P., Pearce-Kelling S.E., Mullins R.F., Graphodatsky A.S., Ripoll D., Felix J.S., Stone E.M., Acland G.M., Aguirre G.D., *Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive-rod-cone-degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans*, Genomics, 88, 551-563, 2006.
- Zeiss C.J., Ray K., Acland G.M., Aguirre G.D., *Mapping of x-linked progressive retinal atrophy (XLPR), the canine homolog of retinitis pigmentosa 3 (RP3)*, Human molecular genetics, 9, 531-537, 2000.

Table 2 Microsatellite-containing sequences expected to map to porcine chromosome 17 According to *in silico* comparative analysis.

Microsatellite	Accession number
KVL9	AY918128
KVL10	AY918129
KVL11	AY918130
KVL12	AY918131
KVL13	AY918132
KVL14	AY918133
KVL15	AY918135
KVL16	AY918138
KVL17	AY918139
KVL19	AY918141
KVL20	AY918142
KVL22	AY918145
KVL23	AY918146
KVL24	AY918147
KVL25	AY918148
KVL26	AY918149
KVL28	AY918151
KVL29	AY918152
KVL30	AY918153
KVL31	AY918156
KVL32	AY918157
KVL33	AY918158
KVL34	AY918159
KVL35	AY918160
KVL36	AY918161

Research PTC-200 thermocyclers (MJ Research, Watertown, MA, USA) with an initial denaturation at 95 °C for 15 min followed by 10 cycles of 15 s denaturation at 95 °C, touchdown annealing temperature 60–51 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 1 min, followed by 25 cycles of denaturation, annealing and elongation at 95, 50 and 72 °C for 15, 30 and 60 s respectively. The forward primers were labelled with one of four fluorescent dyes (6-FAM, PET, NED or VIC) in the PCR reaction. Allele sizes were determined using an ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer and ABI GeneMapper™ Genotyping Software (Applied Biosystems).

Results: Relative positions of the eight new markers are presented in Table 1 and Fig. 1. Accession numbers for 25 sequences containing dinucleotide repeats expected to map to SSC17 are given in Table 2.

References

- 1 Archibald A. L. *et al.* (1995) *Mamm Genome* 6, 157–75.
- 2 Fahrenkrug S. C. *et al.* (2001) *Mamm Genome* 12, 472–4.
- 3 Green P. *et al.* (1990) Documentation for CRIMAP Version 2.4. Washington University School of Medicine, St Louis, MO.
- 4 Pearson W. R. *et al.* (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 2444–8.
- 5 Yerle M. *et al.* (1996) *Cytogenet Cell Genet* 73, 194–202.

Correspondence: P. Karlskov-Mortensen (pkm@kvl.dk)

doi:10.1111/j.1365-2052.2005.01271.x

Canine microsatellites associated with genes known to cause progressive retinal atrophy in dogs or retinitis pigmentosa in humans

M. E. Turba*, M. Binns† and C. Mellersh‡

*Department of Veterinary Morphophysiology and Animal Reproduction, University of Bologna, Ozzano Emilia 40064, Italy.

†Department of Veterinary Basic Sciences, The Royal Veterinary College, Royal College Street, London NW1 0TU, UK. ‡Centre for Preventive Medicine, The Animal Health Trust, Lanwades Park, Newmarket, Suffolk CB8 7UU, UK

Accepted for publication 22 February 2005

Source/description: Ten canine microsatellites that were associated with nine genes known to cause either progressive retinal atrophy (PRA) in dogs or whose orthologues cause retinitis pigmentosa (RP) in humans have been isolated in this study. The microsatellites were optimized to amplify in four multiplexes, thus enabling the rapid screening of canine PRA pedigrees for linked markers.

Partial canine or human gene sequences were retrieved from GenBank (Table 1) and screened against the NCBI *Canis familiaris* whole genome shotgun sequences trace archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/trace.cgi?>) for homologous sequences. Contigs were assembled using the Staden Package software (<http://staden.sourceforge.net/>) and, where necessary, extended until microsatellites were reached and/or sufficient flanking sequence was available to design primers. Five of the microsatellites had been described previously (microsatellites from *ABCA4*, *RPE65*, *PDE6B*, *PDE6A*¹ and *RHO*) but contig extension was necessary to obtain sufficient flanking sequence for satisfactory primer design. The remaining five microsatellites are described here for the first time. The position of each microsatellite was determined by BLAST analysis, via Ensembl (<http://www.ensembl.org>), as well as the positions of the closest published proximal and distal flanking markers. Primer pairs flanking each microsatellite were designed using Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) and each microsatellite was genotyped on a pedigree of 96 purebred dogs to determine the number of observed alleles. The positions and flanking markers for each microsatellite are indicated in Table 1, as well as the accession number (for the new five microsatellites), repeat motif, forward and reverse primers, product size, allele number and the accession number of the source sequence from which each contig was extended.

PCR conditions: The microsatellites were amplified in four different multiplexes (Table 1) using unlabelled forward and reverse primers and a third, fluorescently labelled primer, complementary to an 18-nucleotide extension (TGACCGG-CAGCAAAATTG) at the 5'-end of the forward primer. This methodology has been described elsewhere.²

The polymerase chain reaction (PCR) conditions for a final volume of 12 µl were: 1X Gold Ampli Taq Buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1.5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 0.24 mM of each dNTP (Roche, Penzberg, Germany), 1.5 U Ampli Taq Gold (Applied Biosystems), 0.166 µM of each

Table 1 Canine microsatellites associated with genes known to cause progressive retinal atrophy in dogs or retinitis pigmentosa in humans.

Marker; location (Mb)	Flanking markers (Mb)	Accession no.	Repeat motif	Primer 1 (5'-3')	Primer 2 (5'-3')	Allele no.	Allele size range (bp)	Multiplex	Accession no. of source sequence
ABC44; CFA06 56.71	BAC_375-K3 55.15 FH2370 56.83		(ca) ₂₂	aga tgcaccagsggagagaga	gcaaggttcaagggtcagata	2	407-409	1	AJ605080
RPE65; CFA06 78.43	REN287L04 77.24 EST15F11 78.91		(ca) ₁₄	cactcgtcgcacaataagca	taaaaagccagacgtgagca	5	203-214	1	AJ506757
PDE6B; CFA03 94.96	BAC_376-N15 93.93		(ca) ₁₂	gccgcttcctacatactga	caaggcttagggctccagatg	6	256-266	2	AJ278000
PDE6A; CFA04 62.31	REN195B08 60.30 EST16F4 63.77		(gb) ₂₆	acggsgaacccataatactc	agtggtcttgggacg-gaatg	2	393-395	2	AJ233689 ¹
RHO; CFA20 8.47	FH2887 8.28 REN55P2 1 9.48		(ca) ₁₂	cc-gatctcaaatggctcac	acacatggctctg'tg'gaaag	3	201-214	4	Y09004
AHT.CFA06.RPE65.2; CFA06 78.43	REN287L04 77.24 EST15F11 78.91	AY822068	(taaa) ₂₀	tgccaatggaaacaccaata	tattgtcagagcgatgagca	9	287-327	1	AJ506757
AHT.CFA12.TULP1.1; CFA12 7.55	FH2975 7.34 BAC_375-08 7.80	AY822069	(gb) ₂₈	tgaggctctggaaagcatag	gttccccacaccctctctct	3	182-188	2	AF034922
AHT.CFA12.GUCA1A; CFA12 13.71	REN211B14 13.19 BAC_372-K13 13.83	AY822070	(gb) ₁₃	gcttccgagacagagctcag	agggaacaacctcattcacag	2	391-393	4	NM000409
AHT.CFA08.NRL.1; CFA08 6.95	EST16D6 6.43 TGM1 7.09	AY822071	(gb) ₁₆	caaaagttgccigaggctta	cagcattctctcggaaacttg	2	164-167	3	U95012
AHT.CFA12.RDS.1; CFA12 14.24	FH2152 14.01 EST11C5 14.97	AY822072	(ct) ₁₅ ; (gb) ₇	gagaccgggtatcaggtgag	tggacttttccaaagtttgccta	2	229-231	3	AJ249964

forward primer, 0.416 μM of each reverse primer and 0.833 μM of the third FAM (carboxyfluorescein) conjugated primer. The PCR was performed on a MJ-Research thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) under the following conditions: initial 4 min denaturation step at 94 °C, 29 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, 1 min at 72 °C followed by seven cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 50 °C, 1 min at 72 °C and a final 30 min elongation step at 72 °C.

PCR product analysis: The PCR products were fractionated using ABI Prism® 3100 genetic analysers (Applied Biosystems) and the resulting data analysed using GeneMapper software (Applied Biosystems).

References

- Petersen-Jones S. M. *et al.* (1999) *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 1637–44.
- Oetting W. S. *et al.* (1995) *Genomics* **30**, 450–8.

Correspondence: M. E. Turba (meturba@vet.unibo.it)

doi:10.1111/j.1365-2052.2005.01272.x

Equine microsatellites associated with the *COMP*, *LRP5* and *COL1A1* genes

L. L. Hillyer*, L. A. Pettitt†, S. L. Debenham†, J. E. Swinburne†, M. M. Binns* and J. S. Price*

*Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, London, UK. †Animal Health Trust, Newmarket, Suffolk, UK

Accepted for publication 23 February 2005

Source/description: Genes thought to play a role in determination of musculoskeletal phenotype in the horse were selected

for study. Overgo probes designed to exonic regions of the equine *cartilage oligomeric matrix protein (COMP)*, *LDL receptor related protein 5 (LRP5)* and *collagen, type 1, alpha 1 (COL1A1)* genes were used to identify BAC clones containing target sequence from the equine CHORI-241 BAC library. BAC DNA was digested with restriction enzyme *AclI*, 1-kb fragments size selected by gel electrophoresis, before ligation into pUC18 *SmaI* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) and transformation into *Escherichia coli* TG1 cells. Approximately 1000 colonies for each BAC clone were picked in duplicate onto ampicillin agar plates. Filters were prepared from one of the duplicates, the DNA being fixed by UV transillumination and hybridized using ³²P and a poly-CA/GT probe in order to identify microsatellite-containing colonies. The second culture plate was used to prepare plasmid DNA from microsatellite-positive clones. Insert DNA was then sequenced using an ABI 3100 automated sequencer (Foster City, CA, USA). Sequencing resulted in one dinucleotide repeat being identified in each of the three genes (Table 1).

Genotyping: The PCR primer pairs were designed to amplify the repeats using Primer 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Genotyping PCRs were in 20 μl volumes containing 25–50-ng genomic horse DNA, 2.0 μl PEII buffer (Perkin-Elmer), 4.0 μl dNTP's (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA), 0.5 μl Amplitaq GOLD (Applied Biosystems), 1.5 mM MgCl₂, 10-pmol reverse primer, 10-pmol forward primer containing a 5'-tail sequence, TGACCGCAGCAAAATTG and 10 pmol FAM-labelled tail sequence.¹ The PCR conditions, using a PTC-225 MJ Tetrad thermocycler (Global Medical Instrumentation Inc., Ramsey, MN, USA) were: denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, followed by seven cycles of 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, finishing with a 30 min extension at 72 °C. The amplified fragments were analysed on an ABI 3100 analyser.

Table 1 Characterization of three equine microsatellites.

Gene	Marker	Accession number	Repeat structure	Alleles	Size (bp)	HTZ ¹	Primer Sequence 5'-3'
<i>COMP</i>	RVC001	AJ879804	(TG) ₁₄	4	231	0.51	GGGCTGATGGCTGTGTTCCAGCTTCGAATTCITTTTGC
<i>LRP5</i>	RVC002	AJ879805	(GT) ₃ (GA) ₂ (GT) ₈ CC(GT) ₄	4	248	0.45	GGGGTAACTGAGATGGCATAAACACTCAACACAGACATACTCACCCTCTGGCAACACACACAGGTGCCAGAGGAGAGGCTGTATG
<i>COL1A1</i>	RVC003	AJ879806	(CA) ₁₆	6	218	0.42	

¹HTZ, heterozygosity.

Table 2 Chromosomal assignments for equine microsatellites associated with *COMP*, *LRP5* and *COL1A1*.

Marker	Chromosome assignment	Nearest markers	LOD score	Recombination fraction # (sex-averaged)
<i>COMP</i>	ECA21	<i>AHT059</i>	19.23	0.02
		<i>UM229</i>	7.71	0.05
<i>LRP5</i>	ECA12	<i>UCDEQ411</i>	4.84	0.12
<i>COL1A1</i>	ECA11	<i>TKY304</i>	10.54	0.00
		<i>UMNe201</i>	11.44	0.00
		<i>TKY33</i>	11.14	0.00

PARTE 2

Valutazione dell'attività metalloproteinasica in campioni di liquido cerebro-spinale di cani con patologie non infiammatorie del Sistema Nervoso Centrale

CAPITOLO 1: LE METALLOPROTEINASI DI MATRICE

1.1 Introduzione

Le Metalloproteinasi di Matrice (*Matrix Metalloproteinases*, MMP), conosciute anche come matrixine, sono una famiglia di enzimi proteolitici, la cui attività catalitica di tipo endopeptidasico, come indicato dallo stesso nome, è dipendente dalla presenza di specifici ioni metallici. Le MMP hanno una potente azione degradativa nei confronti di componenti proteici della matrice extracellulare (*ExtraCellular Matrix*, ECM) e possiedono, inoltre, attività di *cleavage* verso molecole presenti sulla membrana cellulare e verso altre molecole proteiche pericellulari (Sternlicht e Werb, 2001).

L'attività di questi enzimi è fondamentale per lo svolgimento di numerosi processi fisiologici; a titolo puramente esemplificativo, le MMP sono riconosciute come indispensabili sia per il corretto sviluppo embrionale, sia per il rimodellamento/*turn-over* tissutale e per la riparazione di ferite nella vita adulta. Allo stesso tempo, però, le MMP sono coinvolte in svariati processi patologici sia di tipo infiammatorio che degenerativo (ad es. artriti, artrosi) e, inoltre, nell'acquisizione del fenotipo invasivo e/o metastatizzante delle neoplasie (Sternlicht e Werb, 2001).

Tale molteplicità di funzioni svolte dalle MMP è accompagnata da precisi meccanismi di regolazione, che, quando perdono di efficienza, possono appunto determinare la comparsa di eventi patologici. I meccanismi di controllo dell'attività delle MMP sono molto articolati e agiscono a differenti livelli; oltre ad essere conosciuti dei meccanismi di regolazione a livello trascrizionale, le MMP, al pari degli enzimi pancreatici, sono secrete come "zimogeni" cioè come enzimi che si attivano solo dopo la rimozione di un pro-peptide inibitorio. Inoltre, l'attività delle MMP è ulteriormente regolata da molecole con azione inibitoria chiamate Inibitori Tissutali delle MMP (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*, TIMP).

Gli organismi superiori producono numerose e diverse MMP, ciascuna delle quali si contraddistingue per possedere un proprio profilo di espressione, localizzazione, attivazione, inibizione e *clearance* così come uno specifico pannello di substrati da degradare. Tuttavia, alcune funzioni delle diverse MMP sono sovrapponibili; in questo modo, l'attività delle MMP è, per certi aspetti, ridondante, ma, allo stesso tempo, è vantaggiosa per l'organismo perché garantisce una sorta di meccanismo compensatorio, nel caso di perdita di funzione di qualche MMP (Visse e Nagase, 2003).

1.2 Classificazione

Le metalloproteinasi, in generale, sono delle endopeptidasi organizzate in 5 superfamiglie; tra queste, la superfamiglia delle metzincine è caratterizzata dal possedere in modo altamente conservato, un motivo contenente 3 istidine leganti uno ione zinco a livello di dominio catalitico (*zinc-binding-motif*), e sotto tale sito attivo una metionina (c.d. *Met-Turn*) (Sternlicht e Werb, 2001). Tale motivo legante lo zinco risulta possedere la seguente sequenza aminoacidica: **HEBXHXBGBXHZ**, dove i residui H = istidina, E = acido glutammico e G = glicina sono invariati, mentre X è un residuo variabile e Z è un aminoacido famiglia-specifico. Tale superfamiglia è, a sua volta, suddivisa in 4 famiglie multigeniche (Sternlicht e Werb, 2001):

- Famiglia delle serralisine dove il residuo Z è rappresentato da una prolina
- Famiglia delle astacine con un acido glutammico in posizione Z
- Famiglia delle adamanlisine ADAM con un acido aspartico
- Famiglia delle MMP dove generalmente il residuo Z è rappresentato da una serina

1.3 Organizzazione delle MMP

Le MMP sono altamente conservate nel processo evolutivo tanto che la loro presenza è stata dimostrata nelle piante e negli invertebrati oltre che nei vertebrati superiori. In questi ultimi ad oggi sono state identificate 25 distinte MMP, di cui 22 hanno un omologo nell'uomo (Sternlicht e Werb, 2001).

In generale, le MMP condividono una serie di caratteristiche sempre identiche, rappresentate dallo *Zinc binding motif*, dal *Met-turn* e da un'elevata omologia di sequenza, che determinano complessivamente un'elevata conservazione delle loro struttura.

La nomenclatura delle MMP associa normalmente all'acronimo MMP un numero che di solito si riferisce alla sequenza cronologica della scoperta. In aggiunta, le MMP possono essere raggruppate e, di conseguenza, anche nominate sulla base dell'organizzazione dei loro domini. La maggior parte delle MMP sono secrete; tuttavia, 6 mostrano un dominio transmembranario e sono espresse come molecole di superficie.

Genericamente e in modo schematico, la struttura delle MMP può essere così organizzata (Visse e Nagase, 2003):

1. peptide segnale N-terminale (chiamato anche pre-dominio) che è rimosso dopo avere indirizzato la proteina durante la sua sintesi verso il reticolo endoplasmatico
2. propeptide, che garantisce la latenza dell'attività fino alla sua rimozione
3. dominio catalitico legante lo zinco
4. *hinge-region* cioè una regione cerniera, che varia in lunghezza e composizione aminoacidica tra le MMP e influisce sulla specificità dei substrati
5. dominio per l'emopessina, che influenza varie funzioni tra cui il legame con i TIMP.

La MMP7 e la MMP26 rappresentano un'eccezione perchè non possiedono questo dominio analogamente alla MMP23, che, invece, possiede in questa posizione un dominio ricco in cisteina e prolina chiamato "*IL-1 type II receptor-like domain*"

A seconda della specifica MMP considerata possono essere presenti altri domini come ad esempio quello per la fibronectina o il dominio transmembranario di tipo 1. Sulla base della specificità per i substrati, della similarità nella sequenza e nell'organizzazione dei domini, le MMP dei vertebrati sono state divise in 6 distinti gruppi (Visse e Nagase, 2003) (Tabella1).

Collagenasi

Appartengono a questo gruppo la MMP1, MMP8, MMP18 (Xenopus); sono caratterizzate dalla capacità di digerire il collagene interstiziale di tipo I, II, e III insieme ad altre molecole della matrice extracellulare.

Gelatinasi

Appartengono a questo gruppo la Gelatinasi A e B, che rappresentano rispettivamente le MMP2 e 9. Questi enzimi hanno inserito nel dominio catalitico 3 ripetizioni di un dominio legante la fibronectina. L'azione degradativa è diretta verso la gelatina, la laminina e il collagene di tipo IV e V, cioè il collagene non fibrillare che è il maggiore componente della membrana basale; solo la MMP2 può anche digerire collagene di tipo I e III.

Stromelisine

La stromelisina 1 (MMP3) e la stromelisina 2 (MMP10) hanno una simile specificità di substrato, anche se l'attività della MMP3 è più efficiente. Oltre a degradare vari componenti della ECM, la MMP3 partecipa all'attivazione di numerose pro-MMP. La

stromelisina 3 (MMP11) è generalmente raggruppata nonostante il nome tra le “altre MMP” perché la sequenza e la specificità di substrati divergono da quella delle altre stromelisine.

Matrilisine

Come già affermato, gli enzimi di questo gruppo non possiedono il dominio per l'emopessina e comprendono la matrilisina 1 (MMP7) e la matrilisina 2 (MMP26). Oltre a processare vari componenti della ECM (collagene di tipo I, IV, fibronectina etc), la MMP7 degrada anche il pro-TNF α , il Fas-ligand la E-caderina e altre molecole di superficie.

MMP membrane type

Il nome di queste MMP deriva dal fatto che sono molecole di membrana (Membrane Type MMP, MTMMP); le prime 4 MTMMP (corrispondenti in ordine alle MMP14, MMP15, MMP16 e MMP24) sono dotate di un dominio transmembranario di tipo I, mentre le MT5MMP e MT6MMP (MMP17 e MMP25) sono proteine ancorate alla membrana attraverso la molecole del GPI (glicosil fosfatidil inositolo). Con l'eccezione della MT2MMP le altre MTMMP hanno tutte la capacità di attivare la proMMP2 oltre a digerire numerosi componenti delle ECM (collegene tipo I, II e III). Inoltre, la MT1MMP è conosciuta per svolgere un ruolo fondamentale nei processi di angiogenesi e di regolazione della produzione del VEGF.

Il gruppo delle “altre MMP”

Appartengono a questo gruppo 7 MMP. La MMP12 o metalloelastasi è conosciuta per essere espressa nei macrofagi dove svolge un ruolo fondamentale nei processi di

migrazione digerendo appunto l'elastina e numerose altre proteine. La MMP19 sembra essere un auto-antigene espresso nei pazienti affetti da artrite reumatoide.

La MMP20, o enamelisina, digerisce l'amelogenina ed è primariamente espressa a livello dentale. La MMP23 non possiede il *cysteine-switch-motif* a livello di predominio e al posto del dominio emopessinico presenta un dominio ricco in cisteina e prolina chiamato "*IL-1 type II receptor-like domain*". La MMP23 è stata proposta come MMP di membrana di tipo II perché possiede un dominio transmembranario a livello N-terminale del predominio. Inoltre sempre nel propeptide, è presente un motivo che riconosce la furina ed è perciò clivata a livello dell' Apparato di Golgi e rilasciata come proteina già attiva nello spazio extracellulare. Appartengono infine a questo gruppo la MMP22, con funzione ancora ignota, e la MMP28, principalmente espressa nei keratinociti.

Family	Enzyme	MMP Number	Matrix substrates
Collagenases	Interstitial collagenase, Neutrophil	MMP-1	Collagens I, II, III, VII, X, IGFBP-3
	Collagenase	MMP-8	Collagens I, II, III
	Collagenase-3	MMP-13	Collagens I, II, III
	Collagenase-4 (Xenopus)	MMP-18	Collagen I
Gelatinases	Gelatinase A	MMP-2	Gelatins, collagens IV, V, VII, X and XI, fibronectin, laminin, plasminogen
	Gelatinase B	MMP-9	Gelatins, collagens IV, V and XIV, fibronectin, plasminogen
Stromelysins	Stromelysin-1	MMP-3	Gelatins, fibronectin, laminin, collagens III, IV, IX and X, vitronectin, proteoglycan, ECAD, IGFBP-3, activates proMMP-1
	Stromelysin-2	MMP-10	Fibronectin, collagen IV
	Stromelysin-3	MMP-11	Fibronectin, laminin, collagen IV, gelatine
Membrane-type MMPs	Enamelysin	MMP-20	Amelogenin
	MT1-MMP	MMP-14	Collagens I, II and III, fibronectin, laminin, vitronectin: activates proMMP-2 and proMMP-13
	MT2-MMP	MMP-15	Fibronectin, gelatin, laminin: activates proMMP-2, collagen I and III, nidogen, tenascin, aggrecan, perclean
	MT3-MMP	MMP-16	Collagen III, fibronectin, gelatin, activates proMMP-2
	MT4-MMP	MMP-17	Gelatin, proMMP-2, proTACE-substrate
Others	MT5-MMP	MMP-24	ProMMP-2
	MT6-MMP (Leukolysin)	MMP-25	Collagen IV, gelatin, fibronectin, fibrin
	Matrilysin	MMP-7	Fibronectin, gelatin, laminin, collagen IV, plasminogen, proteoglycan
	Metalloelastase	MMP-12	Elastin, plasminogen
	RASI-1	MMP-19	Fibronectin, gelatin, collagen I, IV
	Xenopus MMP (xMMP)	MMP-21	Not known
	Chicken MMP (cMMP)	MMP-22	Casein
	Cysteine array MMP (ca-MMP)	MMP-23	Not known
	Matrilysin-2 (Endmetase)	MMP-26	Fibrinogen, fibronectin, vitronectin, gelatin, collagen I and IV, proMMP-9
	Human paralog of MMP-22	MMP-27	Not known
Epilysin	MMP-28	Casein	

Tabella 1: Classificazione delle MMP (adattato da Visse e Nagase, 2003)

1.4 Struttura delle MMP

Il **prodominio**: la struttura, presente nelle MMP2, 3 e 9, consiste in 3 α -eliche e altrettante forcelle di connessione. La prima forcella tra l'elica 1 e 2 è una regione sensibile all'azione di proteasi ed è chiamata "*bait-region*", cioè regione esca. Al contrario, l'estesa regione peptidica localizzata dopo l'elica 3 partecipa alla formazione di un solco destinato a legare il substrato in corrispondenza del dominio catalitico; è in questa regione che si trova il c.d. "*cystein switch*", che costituisce un quarto sito di legame per lo zinco del sito attivo mantenendo l'enzima in forma inattiva. Considerando la MMP nella sua struttura tridimensionale, l'orientamento del pro-peptide rispetto al solco del sito attivo risulta essere opposto a quello che assume il substrato (Figura 1).

Il **dominio catalitico**: consiste di 5 foglietti- β (I, II, III, IV, V), 3 α -eliche (A, B, C) e forcelle di connessione. In questo dominio è contenuto: uno zinco catalitico, uno zinco strutturale e 3 ioni calcio. Il solco destinato a ricevere il substrato (*substrate binding cleft*) risulta formato dal IV foglietto β e dall'elica B insieme alla successiva forcella. Come già detto, 3 istidine coordinano lo zinco del sito attivo, il cui quarto legame avviene con una molecola di acqua, quando il prodominio è stato clivato; il residuo di acido glutammico che risiede vicino alla prima istidina è fondamentale per la catalisi.

Nelle MMP2 e 9 a si trovano in questo dominio 3 regioni leganti la fibronectina, inserite tra il V foglietto β e l'elica del sito catalitico; il dominio per la fibronectina è formato da 2 foglietto β antiparalleli connessi da una corta α -elica e stabilizzati da 2 ponti disolfuro (Figura 1).

Il **dominio per l'emopessina**: possiede 4 ripetizioni di foglietti β orientati a elica (*4-bladed β -propeller*) con un singolo ponte disolfuro stabilizzante. Attraverso questo dominio sia la MT1-MMP che la MMP9 formano degli omodimeri asimmetrici. Inoltre, la MMP9 può legare, attraverso questo dominio, anche l'estremità C-terminale del TIMP2,

in modo mutuamente esclusivo rispetto alla possibilità di formare degli omodimeri. La MMP2, al contrario, lega con questo dominio il TIMP2. In generale il dominio emopessinico è importante perché determina la specificità di diversi substrati ed è richiesto per l'attivazione della proMMP2 (Figura 1).

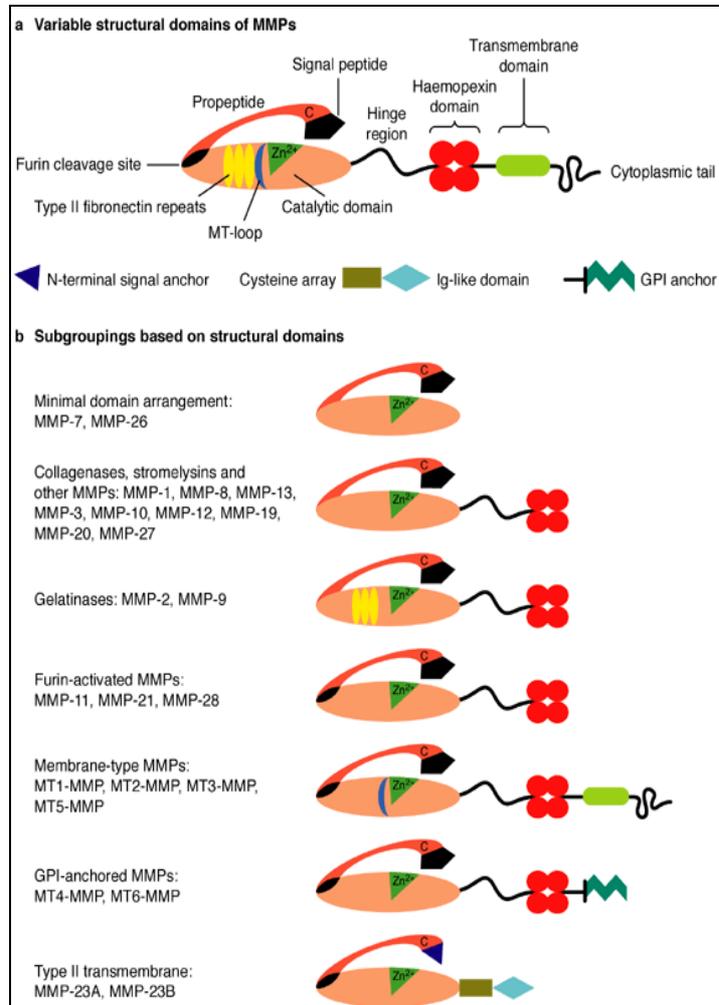


Figura 1: Rappresentazione schematica della famiglia delle MMP (da Lafleur et al., 2003)

1.5 Attivazione delle MMP

Come altri enzimi proteolitici, le MMP, in una sorta di meccanismo autodifensivo, sono sintetizzate primariamente come zimogeni, cioè proenzimi inattivi (definite perciò come proMMP). La latenza è garantita dal gruppo sulfidrilico di una cisteina a livello dell'estremità C-terminale del prodominio; questo gruppo sulfidrilico rappresenta il quarto sito di legame per lo zinco presente nel sito attivo del dominio catalitico.

L'attivazione si verifica quando il legame gruppo sulfidrilico – ione zinco (c.d. *cystein to zinc switch*) è rimosso; a questo punto il sito attivo, in cui il quarto legame è rimpiazzato con una molecola di acqua, può attaccare i legami peptidici delle proteine target delle MMP (Kleiner e Stetler-Stevenson, 1993; Visse e Nagase, 2003).

1.5.1 Attivazione “in vitro”

“In vitro”, l'attivazione delle MMP può essere mediata da molti agenti chimici quali ad esempio SDS, glutatione ossidato, agenti caotropici, oltre che da bassi valori di pH e da trattamento al calore. Questi agenti probabilmente agiscono interferendo direttamente con l'interazione tra la cisteina e lo zinco del sito attivo.

1.5.2 Attivazione “in vivo”

“In vivo” l'attivazione della maggior parte delle MMP a livello extracellulare avviene per proteolisi. Tale attivazione procede generalmente per step e può essere iniziata o da altre MMP, a loro volta già attivate, oppure da numerose serin-proteasi. Il primo attacco proteolitico avviene a livello della *bait region* del prodominio. Quando questa prima parte del prodominio è rimossa, si verifica una destabilizzazione complessiva di tutta questa regione comprendendo anche l'interazione cisteina-zinco del sito attivo. L'attivazione completa della MMP è mediata da una successiva processazione intermolecolare da parte di altre MMP parzialmente o totalmente attivate; di conseguenza, lo step finale dell'attivazione è MMP-dipendente.

1.5.3 Attivazione intracellulare

Sebbene la maggior parte delle proMMP sia attivata in sede extracellulare, esistono alcune eccezioni rappresentate da MMP11 (stromelisina 3), MMP23, MMP28 e dalle MTMMP. Queste MMP contengono tra il loro propeptide e il dominio catalitico una

sequenza che riconosce enzimi furina-simili; ciò permette a queste MMP di essere direttamente attivate in sede intracellulare. Dal momento che questi enzimi sono principalmente secreti già in forma attivata, la regolazione della loro espressione e l'attività di specifici inibitori risultano particolarmente critici per la corretta regolazione della loro attività.

1.5.4 Attivazione della MMP2

La proMMP2 è refrattaria all'attivazione mediata da serin-proteasi. Il principale meccanismo di attivazione avviene a livello di membrana cellulare ed è mediata dall'azione contemporanea di MTMMP e del TIMP2. Tutte le MTMMP, ad eccezione della MT4MMP possono attivare la proMMP2. L'attivazione mediata dalla MT1MMP è stata quella più estensivamente studiata. In modo schematico può essere così riassunta:

1. la proMMP2 forma un complesso, attraverso il suo dominio emopessinico, con il terminale carbossilico del TIMP2
2. il dominio N-terminale inibitorio del TIMP2 essendo libero si lega alla MT1MMP sulla superficie cellulare
3. le MT1MMP a loro volta con i domini emopessinici possono formare omodimeri o multimeri sulla superficie cellulare
4. la proMMP2 risulta in questo modo legata alla superficie cellulare, dove può essere attivata attraverso la presentazione della *bait region* ad altre MT1MMP adiacenti e non inibite da TIMP
5. la MMP2 risulta parzialmente attivata; si dissocia dalla membrana cellulare e completa l'attivazione ad opera di una processazione intermolecolare

1.6 TIMP

I TIMP sono inibitori peptidici di peso molecolare compreso tra 21 e 29 kDa, che legano le MMP secondo un rapporto stechiometrico di 1:1. Nei vertebrati sono stati identificati 4 diversi TIMP (TIMP1, 2, 3 e 4). Analogamente alle MMP, anche l'attività dei TIMP è regolata in condizioni fisiologiche. I TIMP hanno un'estremità N e C terminale di, rispettivamente, 125 e 65 aminoacidi, ciascuno contenente 3 ponti disolfuro. L'estremità N-terminale è quella con azione inibitoria sulle MMP. La struttura complessiva tridimensionale dei TIMP è riferibile ad un "cuneo" che si inserisce a livello del solco del sito attivo nel dominio catalitico delle MMP (Visse e Nagase, 2003).

Da un punto di vista funzionale, è noto che i TIMP, oltre l'inibizione delle MMP, svolgono altre funzioni come la stimolazione dell'attività eritroide e della crescita cellulare (Sternlicht e Werb, 2001).

1.7 Specificità dei substrati delle MMP

In generale, le MMP degradano un legame peptidico che si trova a monte di un residuo laterale idrofobico. In alcuni casi anche il dominio non catalitico influisce sull'attività dell'enzima particolarmente verso macromolecole dell'ECM. Per esempio, i domini per la fibronectina delle MMP2 e 9 sono importanti per l'attività svolta sul collagene di tipo IV, la gelatina e l'elastina. Nella collagenasi 1, la forcina che si trova immediatamente prima del sito catalitico è essenziale per l'azione collagenolitica.

1.8 Meccanismi molecolari dell'attività delle MMP

Sebbene le MMP possano virtualmente degradare tutto lo spettro di componenti proteici che costituiscono l'ECM, l'attività proteolitica delle MMP è diretta anche nei confronti di altre molecole sia circolanti che presenti sulla superficie cellulare o pericellulare.

Da ciò deriva che le MMP, oltre ad essere coinvolte nei processi di rimodellamento della matrice sia fisiologici che patologici, risultano in grado di influenzare il comportamento cellulare attraverso numerosi meccanismi.

1.8.1 Rimodellamento della ECM

La degradazione della ECM, operata dalle MMP in concerto con altri gruppi di molecole proteolitiche quali principalmente le serin-proteasi, è un processo che permette, distruggendo fisicamente le barriere strutturali, l'invasione cellulare dei tessuti circostanti. Tuttavia la ECM non deve essere considerata solo come una semplice impalcatura, perché la sua degradazione può fortemente influenzare il comportamento cellulare in conseguenza della liberazione numerose molecole bioattive che normalmente sono sequestrate nella ECM stessa. Queste molecole sono molto numerose e possiedono funzioni tra loro molto differenti: fattori di crescita, proteine che legano i fattori di crescita e molecole che rappresentano i ligandi per recettori cellulari di adesione (ad es. per le integrine). Di conseguenza, la ECM risulta implicata nella regolazione di numerosi processi cellulari quali la forma, il movimento, la crescita, la differenziazione e la sopravvivenza. Per estensione, tutti questi processi possono essere alterati dall'azione delle MMP, che modificando la normale composizione e organizzazione della ECM, influenzano tutti i segnali derivati dalla matrice. Ad esempio, per dimostrare come l'attività delle MMP possa influenzare il comportamento cellulare, la degradazione MMP-dipendente delle fibrille native di collagene determina l'esposizione di siti altrimenti criptati che possono essere legati da integrine di cellule neoplastiche di melanoma, consentendone la sopravvivenza e la crescita (Sternlicht e Werb, 2001).

1.8.2 Degradazione di molecole di superficie

Le MMP possiedono attività degradativa anche diretta verso molecole proteiche presenti sulla superficie cellulare come, per esempio, nei confronti di molecole di adesione.

Infatti, le MMP3 e 7 degradano le molecole di adesione cellulare E-caderina, rilasciando un frammento solubile, che inibisce l'aggregazione cellulare e promuove fenomeni di tipo invasivo. Ancora, alcune MTMMP possono degradare delle transglutaminasi tissutali di superficie che, come co-recettori di integrine, promuovono l'adesione e la diffusione delle cellule attraverso il legame con la fibronectina favorendo o inibendo l'invasione di cellule con fenotipo neoplastico a seconda della particolare composizione della ECM in cui si trovano.

Sempre nell'ambito del rimodellamento di molecole di superficie, le MMP possono determinare anche il rilascio di molecole bioattive. Ad esempio, la MMP3 può determinare la liberazione dai leucociti di L-selectina e può anche rilasciare il fattore di crescita HB-FGF in forma attivata. La MMP7 a sua volta può indurre apoptosi cellulare mediata dal recettore FAS determinando il rilascio del ligando attivato per il FAS dalla superficie delle stesse cellule con un meccanismo autocrino. La liberazione del ligando per il FAS può prevenire in certi contesti la progressione neoplastica, ma, allo stesso tempo, può essere responsabile della selezione di sottopopolazioni neoplastiche resistenti all'apoptosi FAS-mediata. Le MMP2 e 9 possono attivare il TGF- β e almeno 7 diverse MMP possono attivare il precursore del TNF- α legato alla membrana cellulare. Oltre ad attivare e/o rilasciare numerosi fattori di crescita e citochine, le MMP possono rilasciare anche i recettori specifici per tali molecole. Ad esempio, la MMP2 libera dalla superficie cellulare il recettore 1 per l'FGF, che mantiene dopo il rilascio la capacità di

legame con l'FGF influenzandone di conseguenza la biodisponibilità (Sternlicht e Werb, 2001).

1.8.3 Regolazione di segnali paracrini

Le MMP possono intervenire anche nella regolazione di segnali con azione paracrina sia inattivando direttamente le molecole responsabili di tali segnali sia, in alternativa, degradando i recettori destinati al legame con tali molecole ad azione paracrina. Per esempio le MMP possono direttamente degradare molecole con azione paracrina quali angiotensina I e II, bradichinina e la sostanza P (Sternlicht e Werb, 2001).

1.9 Zimografia

La zimografia è una tecnica elettroforetica utilizzata per identificare l'attività proteolitica di enzimi separati sulla base del loro peso molecolare su speciali gel di poliacrilamide in condizioni non denaturanti. Separando gli enzimi sulla base del peso molecolare, questa tecnica garantisce di poter separatamente identificare la forma proenzimatica dalla forma attivata delle MMP. Inoltre, l'elettroforesi garantisce un'efficiente separazione di questi enzimi anche da eventuali TIMP. La tecnica consiste nell'impiegare gel di poliacrilammide che sono stati polimerizzati inglobando il substrato specifico della MMP da investigare; ad esempio con la gelatina se si vogliono studiare le MMP2 e 9 o con il collagene se si intende studiare la MMP1. Alla corsa elettroforetica è fatta seguire una fase prima di rinaturazione con speciali buffer contenenti Triton X 100, che rimuove i residui di SDS presenti nel gel di poliacrilammide; a questa prima fase è fatta seguire una seconda fase di incubazione in condizioni di temperatura idonea e in presenza di cofattori in modo da favorire l'attività dell'enzima. La tecnica si conclude con la colorazione del gel con Blu di Comassie o con un altro colorante generico per le proteine. La presenza nel campione analizzato di attività MMP è

evidenziata con la presenza di bande “non colorate” che rappresentano l’esito della digestione da parte dell’enzima delle proteine substrato presenti nel gel. Questa tecnica è molto sensibile perché, prolungando il tempo di incubazione, permette di evidenziare picogrammi di enzima. Per evitare di prolungare eccessivamente la fase di digestione enzimatica, fatto che può esitare nella saturazione dell’attività dell’enzima, i tempi di incubazione devono essere settati sulla base del tipo di matrice analizzata e quindi del suo normale contenuto di MMP per consentire di lavorare con la zimografia in una fase di incremento dell’attività enzimatica e non in una fase di plateau per eccessiva attività (Kleiner e Stetler-Stevenson, 1994).

CAPITOLO 2: MMP ANGIOGENESI e NEOPLASIA

L'angiogenesi consiste nella formazione di nuovi vasi sanguigni da vasi pre-esistenti e rappresenta un fenomeno fondamentale in numerosi processi sia fisiologici che parafisiologici quali l'organogenesi, le modificazioni della parete uterina e del follicolo ovarico durante il ciclo femminile e infine nella riparazione di ferite (Handsley e Edwards, 2005).

L'angiogenesi risulta, altresì, cruciale in numerosi eventi patologici di tipo sia neoplastico che degenerativo. Nell'ambito delle neoplasie, l'angiogenesi rappresenta uno step indispensabile nel processo di transizione del tumore verso un fenotipo maligno, cioè verso l'acquisizione di capacità invasiva e in certi casi anche metastatizzante. Infatti affinché un tumore solido cresca oltre una certa dimensione limite, e diventi conseguentemente invasivo, è necessario che parallelamente sviluppi un adeguato letto vascolare per supportare gli incrementati fabbisogni di ossigeno, nutrienti e di rimozione dei cataboliti metabolici. L'incrementata vascolarizzazione di un tumore costituisce, inoltre, la via di accesso per la disseminazione sistemica delle cellule neoplastiche verso altri organi (Carmeliet e Jain, 2000; Munaut et al., 2002).

Sebbene l'angiogenesi rappresenti il meccanismo principale di vascolarizzazione delle neoplasie, altri processi garantiscono un adeguato supporto ematico. Tra questi, è stato identificato un fenomeno tipico della vita embrionale e definito come vasculogenesi, in cui cellule di derivazione midollare (EPC, Endothelial Precursor Cell) migrano nella sede del tumore e contribuiscono alla formazione di nuovi vasi sanguigni. Ancora, nel tumore cellule neoplastiche possono simulare le cellule endoteliali (*vasculogenic-mimicry*) o addirittura svilupparsi in un primo momento attorno a vasi sanguigni preesistenti per garantirsi un corretto apporto nutritivo (*vessel co-option*) (Munaut et al., 2002).

Affinché un tumore acquisti fenotipo invasivo, oltre ad un adeguato supporto ematico, devono verificarsi 3 fondamentali fenomeni rappresentati da (MacDonald et al., 1998):

- 1- alterazioni dell'adesione cellulare
- 2- migrazione delle cellule
- 3- degradazione della ECM.

Le MMP sono presenti in grandi quantità e in forma spesso attivata nell'ambito delle neoplasie, generalmente predominando nelle forme con fenotipo maligno. Sia nell'angiogenesi fisiologica che nell'acquisizione del carattere invasivo è fondamentale l'attività di degradazione della ECM che consente alle cellule endoteliali, in un caso, e neoplastiche, nell'altro, di invadere i tessuti circostanti.

Il ruolo svolto dalle MMP nell'angiogenesi tumorale è in realtà molto più complesso, non essendo limitato all'“apertura” di una via libera per la migrazione di cellule invasive. È stato, infatti, scoperto che dalla degradazione della ECM possono verificarsi 2 ulteriori fenomeni capaci di modulare l'angiogenesi rappresentati dalla liberazione di fattori di crescita sequestrati normalmente nella matrice e dallo “smascheramento” di ligandi pro- o anti-angiogenetici nascosti nella matrice (*matricryptic ligands*) (Handsley e Edwards, 2005).

I principali fenomeni che, nell'ambito del processo angiogenetico, possono essere influenzati e modulati dall'azione delle varie MMP possono essere così riassunti e organizzati:

1. **MMP e fattori di crescita:** la degradazione della ECM può determinare la liberazione di numerosi fattori di crescita che risultano normalmente immagazzinati nella ECM stessa. Tra questi, il VEGF, che rappresenta uno dei fattori di crescita più importante nell'ambito dell'angiogenesi sia fisiologica che patologica/neoplastica; è stato, infatti, ampiamente dimostrato il ruolo chiave che questo fattore di crescita svolge nell'ambito di numerosi tipi di neoplasia con

carattere invasivo e metastatizzante. Tra le varie MMP, è stato dimostrato che la MMP9 in forma attivata è una potente liberatrice del VEGF sequestrato nella ECM. E' stato altresì dimostrato che molte neoplasie con carattere invasivo e in cui si è verificato il fenomeno del c.d. *angiogenic switch* presentano un'incrementata espressione e produzione di MMP9 associata a MMP2; queste 2 MMP, infatti, permettono di degradare le 2 componenti fondamentali della membrana basale rappresentati da laminina e il collagene di tipo IV garantendo perciò alle cellule endoteliali invasive di superare la prima barriera per l'invasione della ECM (Munaut et al., 2003; Handsley e Edwards, 2005).

2. **MT1-MMP e VEGF:** è stato dimostrato che numerose forme neoplastiche (melanoma, carcinoma mammario, glioblastoma) hanno un'incrementata espressione di MT1-MMP. Questa MMP aumenta l'espressione di VEGF da parte delle cellule tumorali e, partecipando all'attivazione della MMP2, favorisce indirettamente i processi di degradazione della ECM. Di conseguenza le MMP possono favorire l'angiogenesi sia a livello trascrizionale per opera della MT1-MMP sia a livello post-trasduzionale per opera della MMP9 che rende disponibile il VEGF depositato nella matrice (Bergers et al., 2000; Munaut et al., 2003).
3. **Matricryptic ligands:** le MMP possono favorire il processo angiogenetico determinando l'esposizione di molecole normalmente non accessibili che risultano utili per l'ancoraggio e la successiva migrazione delle cellule endoteliali (Sternlicht e Werb, 2001).
4. **Interazione con le integrine:** L'integrina $\alpha\beta3$ rappresenta una molecola presente sulla superficie cellulare che garantisce l'ancoraggio della cellula stessa alla ECM; tale legame è garantito attraverso il riconoscimento di sequenze specifiche, chiamate RDG, presenti sulla vitronectina e su altri componenti della ECM. Questa integrina risulta essere sovraespressa in cellule endoteliali con

fenotipo angiogenetico. E' stato, infatti, dimostrato che questa molecola possiede anche un'azione proangiogenetica, perché può formare un legame con la MMP2 attivata e di conseguenza può garantire alle cellule di avere localizzato sulla loro superficie un sistema proteolitico che favorisce la loro invasione attraverso la ECM (Sternlicht e Werb, 2001; Handsley e Edwards, 2005).

Nell'ambito del processo angiogenetico fisiologico l'azione delle MMP, che da una parte risulta fondamentale e indispensabile, deve essere in seguito controbilanciata da specifici inibitori (TIMP) affinché l'angiogenesi possa completarsi (fenomeno della regressione vascolare); infatti, alla prima fase di degradazione della ECM e invasione cellulare, deve seguire una fase di maturazione dei vasi neoformati, dove l'azione delle MMP non è appropriata e anzi risulta destabilizzante, in quanto deve essere ricostituita la membrana basale (precedentemente distrutta dall'azione di specifiche MMP) e le cellule endoteliali devono completare la loro differenziazione diventando poi quiescenti. Talvolta, nell'ambito di neoplasie altamente maligne, il processo angiogenetico è talmente tumultuoso che la formazione dei nuovi vasi sanguigni risulta disorganizzata e incompleta generando, perciò, strutture capillari con architettura caotica e con una incrementata permeabilità vascolare (per una formazione discontinua o assente della membrana basale) (Handsley e Edwards, 2005).

Il paradigma fin qui descritto in cui le MMP e i TIMP si comportano rispettivamente come fattori favorenti o inibitori dell'angiogenesi, è tuttavia non completamente corretto e merita di essere parzialmente riconsiderato. E', infatti, molto probabile che i ruoli svolti da ogni MMP o TIMP siano direttamente correlati e dipendenti dalla particolare fase del processo, così come dall'influenza di fattori ambientali e, infine, dal tipo di tessuto in cui si verifica il processo angiogenetico. Pertanto alla luce di queste considerazioni, le MMP, accanto al loro ruolo ampiamente dimostrato di fattori pro-angiogenetici, possono determinare, attraverso la loro azione proteolica, la formazione di inibitori endogeni

dell'angiogenesi. Questo è il caso di 3 importanti inibitori endogeni dell'angiogenesi, che sono generati dal clivaggio di precursori con funzione non inibitoria, ad opera di proteasi tra cui le MMP (Sternlicht e Werb, 2001).

Ad esempio l'angiostatina rappresenta il prodotto di degradazione proteolitica del plasminogeno e risulta essere un importantissimo inibitore dell'angiogenesi sia in vitro che in vivo. L'angiostatina può essere generato dall'azione di diverse MMP quali le MMP7, 9, 2, 3 e 12.

Anche la molecola anti-angiogenetica Endostatina deriva da un precursore non inibitorio rappresentato dal collagene XVIII; sebbene la sua generazione sia imputata principalmente all'azione dell'elastina e della catepsina L, numerose MMP (3, 7, 9, 12, 13 e 20) sono in grado di generare questo frammento.

Infine la Tumstatina, un frammento della catena $\alpha 3$ del collagene tipo IV, è un'ulteriore molecola con potere anti-angiogenetico che può essere efficientemente generata dall'azione di MMP 2, 3, 9 e 13 (Handsley e Edwards, 2005).

CAPITOLO 3: PARTE SPERIMENTALE - STUDIO DELLE MMP NELLE NEOPLASIE DEL SNC DELLA SPECIE CANINA

3.1 Introduzione

Tale capitolo descrive brevemente uno studio eseguito durante il periodo di dottorato, che ha portato alla pubblicazione di 2 articoli scientifici su riviste internazionali, allegati in calce:

- Turba M.E., Forni M., Gandini G., Gentilini F., *Recruited leukocytes and local synthesis account for increased matrix metalloproteinase-9 activity in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system neoplasm*, Journal of neurooncology, 81, 123-129, 2006.
- Turba M.E., Gentilini F., Gandini G., Mastroilli C., Bernardini C., Forni M., *Evaluation of matrix metalloproteinases 2 and 9 activity in cerebrospinal fluid of dogs with non-inflammatory diseases of the central nervous system*, Veterinary research communications, 30 Suppl 1, 317-319, 2006.

Lo scopo di tale lavoro è stato quello di valutare, mediante tecnica zimografia, l'attività metalloproteinasica presente nel liquido cerebro spinale (LCS) di cani con patologie neurologiche del SNC di tipo non infiammatorio con particolare riferimento alle lesioni occupanti spazio (LOS). Tale attività è stata confrontata con quella rilevata nei LCS di 2 differenti gruppi rappresentati da soggetti affetti da epilessia idiomatica (EI) e da ernia discale (ED).

E' stato, infatti, ampiamente dimostrato che, nelle lesioni neoplastiche del sistema nervoso centrale (SNC), l'espressione di MMP è correlata alla invasività e alla capacità metastatizzante della neoplasia e la misurazione della concentrazione nel liquido cerebro-spinale (LCS) riveste un ruolo diagnostico e prognostico rilevante nell'uomo (Friedberg et al., 1998). E' stato, altresì, dimostrato che la MMP2 è costitutivamente

espressa nel LCS di cani clinicamente sani, anche se nessuno studio in precedenza ha valutato nel cane la concentrazione delle MMP2 e 9 nel LCS in corso di patologie neurologiche (Bergman et al. 2002).

Dal presente studio è risultato che:

- i gruppi LOS e ED hanno presentato incrementi concomitanti di proteine totali (P_t), albumina, conta cellulare e MMP, riflettendo probabilmente la presenza di un'alterazione della permeabilità della barriera emato-encefalica (BEE) e della barriera emato-LCS. In letteratura umana (Friedberg et al., 1998) è stato infatti ampiamente descritto un ruolo chiave svolto dalle MMP sull'integrità della BEE e sulle conseguenti modificazioni nella composizione del LCS.
- la valutazione dell'albumina è risultata essere un valido parametro per evidenziare il danno di barriera, forse anche più sensibile delle P_t , che nel caso di ED ed EI non hanno rivelato differenze significative.
- La minore attività MMP2 e 9, associata alla mancanza di modificazioni della composizione del LCS, nel gruppo EI ha ulteriormente avvalorato le precedenti considerazioni.

In conclusione, il presente lavoro ha dimostrato, in analogia con quanto riscontrato nell'uomo, che nelle neoplasie del SNC del cane si assiste ad una modificazione dell'attività metalloproteinasi, e che tale valutazione potrebbe essere vantaggiosamente inserita nel protocollo analitico del LCS. E' stato altresì evidenziato l'intervento delle MMP in corso di patologie a carico del disco intervertebrale, così come accade nell'uomo (Goupille et al., 1998).

BIBLIOGRAFIA

- Bergers G., Brekken R., McMahon G., Vu T.H., Itoh T., Tamaki K., Tanzawa K., Thorpe P., Itohara S., Werb Z., Hanahan D., *Matrix metalloproteinases-9 triggers*

the angiogenic switch during carcinogenesis, Nature cell biology, 2, 737-744, 2000.

- Bergman R.L., Inzana K.D., Inzana T.J., *Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in cerebrospinal fluid of clinically normal dogs*, American journal of veterinary research, 63, 1359-1362, 2002.
- Carmeliet P., Jain R.K., *Angiogenesis in cancer and other diseases*, Nature, 407, 249-257, 2000.
- Friedberg M.H., Glantz M.J., Klempner M.S., Cole B.F., Perides G., *Specific matrix metalloproteinase profiles in the cerebrospinal fluid correlated with the presence of malignant astrocytomas, brain metastases, and carcinomatous meningitis*, Cancer, 82, 923-930, 1998.
- Goupille P., Jayson M.I., Valat J.P., Freemont A.J., *Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration?*, Spine, 23, 1612-1626, 1998.
- Lafleur M.A., Handsley M.M., Edwards D.R., *Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis*, Expert reviews in molecular medicine, 5, 1-39, 2003.
- Handsley M.M., Edwards D.R., *Metalloproteinases and their inhibitor in tumor angiogenesis*, International journal of cancer, 115, 849-860, 2005.
- Kleiner D.E. e Stetler-Stevenson W.G., *Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases*, Current opinion in cell biology, 5, 891-897, 1993.
- Kleiner D.E. e Stetler-Stevenson W.G., *Quantitative zymography: detection of pictogram quantities of gelatinases*, Analytical biochemistry, 218, 325-329, 1994.
- MacDonald T., DeClerck Y.A., Laug W.E., *Urokinase induces receptor mediated brain tumor cell migration and invasion*, Journal of neuro-oncology, 40, 215-226, 1998.
- Munaut C., Noel A., Hougrand O., Foidart J.-M., Boniver J., Deprez M., *Vascular endothelial growth factor expression correlates with matrix metalloproteinases*

MT1-MMP, MMP2 and MMP9 in human glioblastomas, *International journal of cancer*, 106, 848-855, 2003.

- Sternlicht M.D. e Werb Z., How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour, *Annual review of cell and developmental biology*, 17, 463-513, 2001.
- Visse R. e Nagase H., *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases, structure, function, and biochemistry*, *Circulation research*, 92, 827-839, 2003.

J Neurooncol (2007) 81:123–129
 DOI 10.1007/s11060-006-9213-2

LABORATORY INVESTIGATION

Recruited leukocytes and local synthesis account for increased matrix metalloproteinase-9 activity in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system neoplasm

Maria Elena Turba · Monica Forni ·
 Gualtiero Gandini · Fabio Gentilini

Received: 17 May 2006 / Accepted: 8 June 2006 / Published online: 7 July 2006
 © Springer Science+Business Media B.V. 2006

Abstract Matrix metalloproteinases (MMP) 2 and 9 are enzymes known to degrade several protein components of the extracellular matrix. In humans, increased concentrations of these enzymes have been demonstrated in the cerebrospinal fluid (CSF) of subjects affected by many neurological conditions including brain tumours; nevertheless comparative data in dogs are completely lacking. Aim of this study was to investigate these molecules in CSF of dogs diagnosed with CNS neurological diseases. Higher activity of MMP 2 and 9 was revealed in dogs with space occupying lesions of likely neoplastic origin in comparison to dogs with idiopathic epilepsy. Statistical modelling reveals that increased MMP 9 activity is mainly due to leukocytes recruitment and local synthesis.

Keywords Central nervous system · Gelatin zymography · MMPs · Space occupying lesions · Dog

Abbreviations

BBB	Blood–brain barrier
CNS	Central nervous system
CSF	Cerebrospinal fluid
DH	Disk herniation
IE	Idiopathic epilepsy

MMP	Matrix metalloproteinases
NCC	Nucleated cell count
proMMP	Proenzymatic MMP
actMMP	Activated MMP
Tprot	Total protein
SOL	Space occupying lesion

Introduction

Matrix metalloproteinases (MMP) 2 and 9 are zinc- and calcium-dependent endopeptidases with a specific proteolytic activity against type IV collagen, a key structural component of the basement membrane that surrounds blood vessels. MMPs are produced as proenzymes and activated after a proteolytic cleavage. Besides their roles in several physiological contexts where ECM remodelling occurs, MMPs play a pivotal role in a number of inflammatory, degenerative and neoplastic conditions. In particular, MMP expression or concentration was found increased in either tissue or cerebrospinal fluid (CSF) of human beings affected by central nervous system (CNS) diseases [1, 2]. In these conditions, increased MMP activity may determine blood–brain barrier impairment and alterations of CSF composition, so that multiple sources originating MMPs, like serum and leukocytes, could contribute to the overall MMP amount. Furthermore, it has been demonstrated that MMPs expression is correlated with invasiveness and metastatic potential of CNS neoplasia [1–3] and that the corresponding MMPs level measured on CSF specimens could have a diagnostic

M. E. Turba (✉) · M. Forni
 Department of Veterinary Morphophysiology and Animal
 Production (DIMORFIPA), University of Bologna, via
 Tolara di sopra 50, 40064 Ozzano Emilia, Bologna, Italy
 e-mail: meturba@vet.unibo.it

G. Gandini · F. Gentilini
 Veterinary Clinical Department, University of Bologna, via
 Tolara di sopra 50, 40064 Ozzano Emilia, Bologna, Italy

and prognostic value [1]. In dogs, MMP 2 and 9 have been investigated in several pathological conditions like osteoarthritic joints and neoplastic tissues [4, 5]. CSF MMPs activity of clinically healthy dogs has been described by using gelatin zymography which represents one of the most commonly employed and sensitive way for detecting MMP 2 and 9 activities [6]. Accordingly to human literature, healthy dogs showed constitutive MMP 2 and no MMP 9 activity. The same authors have recently demonstrated detectable MMP 9 activity in CSF of dogs affected by disk herniation (DH) [7]. At our best knowledge there are no report evaluating the CSF MMPs activity in dogs affected by CNS neoplastic conditions which could represent a good animal model of the human counterpart. As advantage of this model should be pointed out that CNS neoplasm in dogs is a late diagnosis allowing to investigate the pathogenic role of MMPs in advanced stages cancer. Conversely, as a major drawback, in late stage neoplasm a different pathogenesis of CSF MMPs activity may occur which requires the refinement of the interpretative approach.

With the aim of establishing a reliable animal model, the present work was intended to: (1) validate an accurate protocol for evaluating MMP 2 and 9 in CSF of dogs by the means of gelatin zymography, (2) ascertain the patterns of zymographic analysis in three subsets of diseased dogs represented by space occupying lesions (SOL), idiopathic epilepsy (IE), and disk herniation (DH), (3) investigate the pathogenesis of MMP 2 and 9 activity in CSF of dogs affected by advanced stages CNS neoplasm by statistical modelling of MMPs measurements together with other parameter measured in CSF.

Materials and methods

Animals

In the present study we have evaluated 37 CSF of dogs visited at the University of Bologna Veterinary Teaching Hospital (UBVTH) between 1999 and 2003. Twenty CSF were included on the basis of a diagnosis of SOL evidenced either by computed tomography (CT, $n = 18$) or by contrast myelography (CM, $n = 2$). In seven cases the lesions were confirmed by neuropathology as CNS neoplasia. Six CSF of dogs affected by disk herniation (DH) were evaluated as positive control group according to results obtained by other authors [7–9]. Due to the lack of specimens collected from healthy subjects, negative control group was

replaced by 11 CSF obtained from dogs diagnosed with idiopathic epilepsy, where no increased MMP level was expected.

Collection and processing of samples

CSF samples were collected after general anaesthesia from cerebellomedullary cistern in 32 cases and from lumbosacral cistern in the remaining five cases. Samples were routinely processed and assayed for nucleated cell count (NCC) within 30 min from collection using a hemocytometer after counterstaining with fencated fucsin. When NCC exceeded 5 cell/ μ l, an aliquot of samples was cytocentrifuged and stained with May-Grünwald Giemsa or Diff Quick to carry out a differential cell count. Remaining samples were then centrifuged at 1,000g for 5 min and the supernatants harvested for biochemical assessment of total protein (Tprot) (pirogallol red method), glucose, LDH and CK concentrations. Moreover, albumin [10] and d-dimer (TinaQuant, Roche, Milan, Italy) were retrospectively measured. CSF supernatants were then stored at -20°C for a variable period (1–4 weeks) and then routinely transferred at -80°C for long-term storage.

MMP analysis by gelatin zymography

MMP 2 and 9 were measured by gelatin zymography as suggested by manufacturer (Novex Zymogram Gelatin Gel, Invitrogen, CA, USA) with some modifications concerning incubation time. Briefly, each CSF sample (9 μ l) was mixed with an equal volume of specific sample diluent (Tris-Glycine Zymogram Sample Buffer, Invitrogen) and immediately electrophoresed. Thereafter, gels were renatured and then incubated with a specific buffer; different incubation times lasting for 24, 48, and 72 h were assayed in order to increase test sensitivity, especially for MMP 9 which resulted in all cases much fainter than MMP 2.

After overnight staining with Coomassie blue, MMP gelatinolytic activities were identified as clear bands by comparison with a MMP 2 and 9 human standard (Chemicon International, CA, USA). Bands were quantified using computerised image analysis system software (Quantity One, Bio-Rad, CA, USA) and expressed as Arbitrary Unit (AU). Furthermore, two operators carried out a blinded evaluation in parallel in a semi-quantitative manner to assess MMP 9 activity. Based on the intensity, a value from 0 (no visible band) to 3 (most intense band) was assigned to each band.

For assay validation, three different samples were repeated four times within the same gel (Intra-Assay) and between five different gels (Inter-Assay) for each incubation time; all gels employed for this study belonged to the same production lot.

Statistical analysis

Intra and inter-assay reproducibility of MMP zymography were calculated as coefficients of variations (CVs). Limit of detection were assumed as 2 SD of measured AU of those samples for which both observer assigned 0 value; those AU values were considered as 0 for statistical purposes. For each parameter, between groups differences were compared by non-parametric Mann–Whitney *U*-test, with the exception of MMP 9 data after 24 h of incubation, where the proportion of subjects with or without MMP 9 band was compared by Fisher Exact test. The concordance between operators were evaluated by Kappa inter rater agreement. With the aim of focusing the relationship among the evaluated parameters in SOL affected dogs group, multivariate regression analysis were accomplished using MMP data obtained after 48 h of incubation. A forward stepwise methods using an *F* cutoff >1 was employed; total, proenzymatic and activated values of MMP 9 were distinctly entered as dependent variables. Consequently, albumin, d-dimer, NCC and MMP 2 were assumed as independent variables. Tprot data were always redundant with albumin and thus were excluded by analysis (tolerance < 0.05) [11]. All data recorded were analysed by Statistica (<http://www.StatSoft.com>).

Results

CSF albumin, Tprot, d-dimer and NCC values resulted higher in the SOL and DH than the IE group. Significant differences were reported in Fig. 1A–D, where complete data were graphed as box-plots.

Intra and Inter-Assay coefficients of variation of gelatin zymography assay were 19 and 28%, respectively, considered reliable for further statistical evaluations. The limit of detection of the computerised image analysis system was established as 0.09 AU. The subjective evaluation concordance between readers was reliable with a *K* coefficient ± SE of 0.873 ± 0.59.

After 24 h of incubation, all samples revealed a MMP 2 band representing the proenzyme form of MMP 2 (proMMP 2); in a small proportion of cases (19%) a second band fused with the latter and representing the activated form of MMP 2 (actMMP 2) was

furthermore observed. ProMMP 2 and actMMP 2 were measured together in the same box of the computerised image system analysis and expressed as total MMP 2 (totMMP 2). TotMMP 2 activity resulted significantly different among the three groups as shown in Fig. 2A.

After 24 h of incubation, visible discrete bands of the proMMP 9 and no actMMP 9 were evidenced in a variable proportion of subjects. Nevertheless, since the intensity of MMP 9 bands were too low to be quantified with the computerised image system analysis, data gathered from the subjective evaluation were recorded. In particular, proMMP 9 bands were evidenced in 16 out of 20 samples of SOL group, in 1 out of 11 of IE group and in 4 out of 6 of DH group. The proportion of samples with visible proMMP 9 bands of the groups of SOL and DH was statistically different from IE ($P < 0.001$ and $P = 0.02$, respectively).

As expected, MMP band intensity was significantly affected by incubation time. By prolonging incubation time to 48, an increased proportion of subjects revealed MMP 9 bands, whose intensity resulted sufficiently higher to be measured by computerised image analysis system. Furthermore, the actMMP 9 and other heavier bands resulted evident. Data, concerning MMP 9, after 48 h of incubation are shown in Fig. 2B–D. Both the proMMP 9 and the actMMP 9 activities resulted significantly higher in the SOL and DH than the IE group. The 72 h protocol did not confer substantial advantage and a plateau effect seemed to be found.

Multivariate analysis gave statistical significant models describing the relationships between parameters whose details are furnished in Table 1.

Discussion

The zymographic analysis was focused on establishing the MMP gelatinolytic activity patterns observed in three distinct canine CNS pathologic conditions. The more consistent group was represented by SOL affected dogs of which 35% were definitely diagnosed with CNS malignancy. Concerning the DH group, it is well known that the degeneration of the intervertebral disc which anticipates disc herniation, is a complex phenomenon, in which MMP were shown to play an important role [7, 9]. On the contrary, a subset of 11 dogs affected by IE was chosen as a negative control group as surrogate of healthy dogs. Our data confirm these abovementioned findings (Fig. 3).

The zymographic protocol was set up to allow the quantitative assessment of the gelatinolytic bands. In particular the MMP 2 band measurement was found to be more accurate after 24 h of incubation, while with

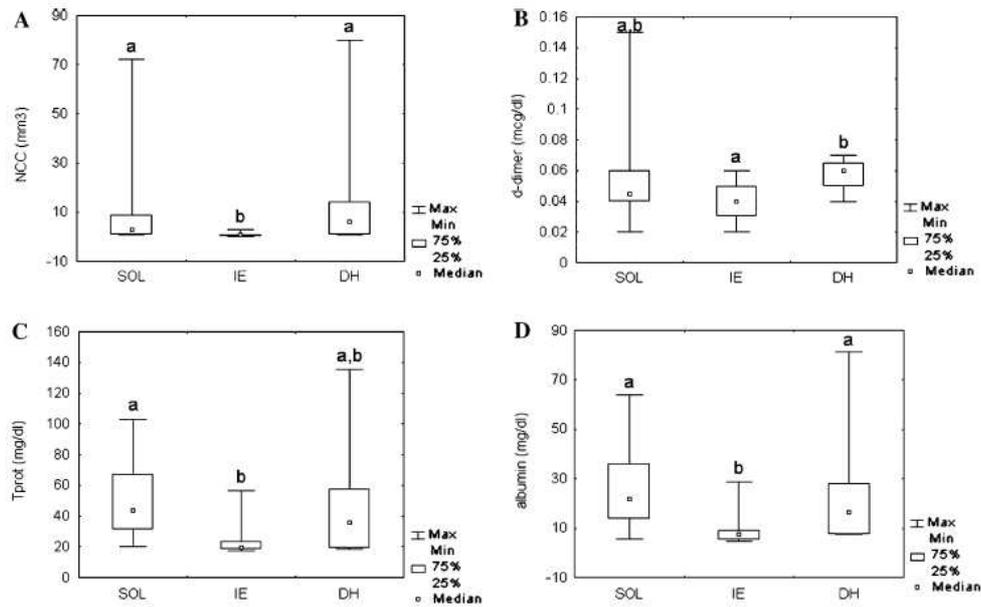


Fig. 1 Box-plots of: (A) total NCC (expressed as number/mm³), (B) d-dimer (expressed as mg/dl), (C) total protein (Tprot) (expressed as mg/dl), (D) albumin contents (expressed as mg/dl)

in the group of space occupying lesions (SOL), idiopathic epilepsy (IE) and disk herniation (DH)

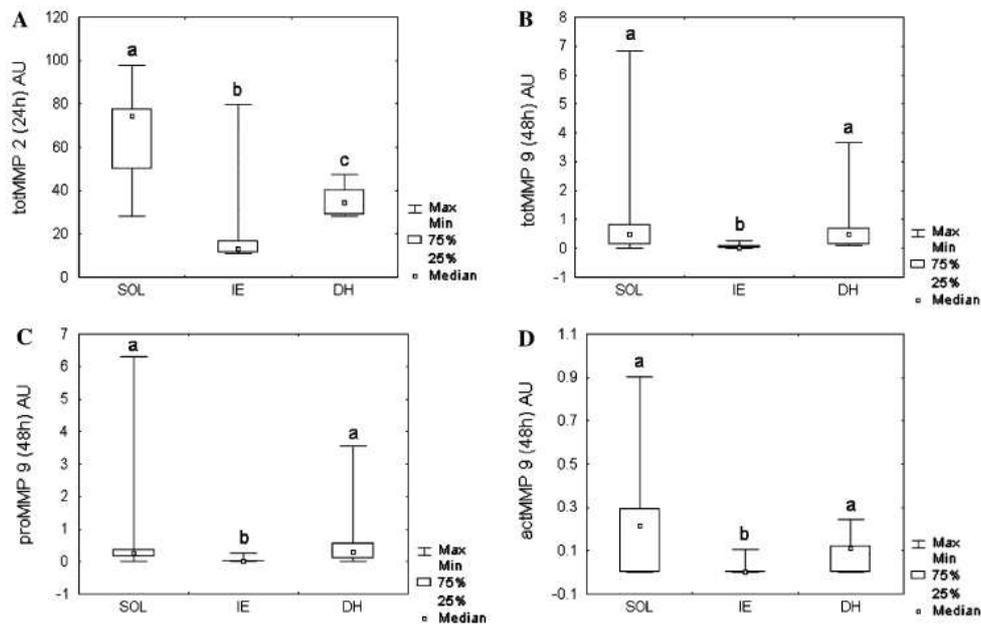


Fig. 2 Box-plots of MMP 2 and 9 zymographic activities (expressed as AU) in the group of space occupying lesions (SOL), idiopathic epilepsy (IE) and disk herniation (DH);

MMP 2 and 9 were, respectively, measured after 24 and 48 h of incubation. (A) Total MMP 2, (B) total MMP 9, (C) proenzymatic MMP 9, (D) activated MMP 9

Table 1 Multiple linear regression (stepwise forward) of total (totMMP), proenzymatic (proMMP) and activated (actMMP) MMP 9 in the group of space occupying lesions (SOL). In bold: dependent variable. In italic: independent variable

Variable	Independent R^2	F to enter (P -level)	$\beta \pm SE$ (P -level)
totMMP 9 48 h^a			
<i>NCC</i>	0.66	34.6 (<0.0001)	0.78 ± 0.09 (<0.0001)
<i>d-dimer</i>	0.20	23.0 (0.0003)	0.44 ± 0.09 (0.0002)
proMMP 9 48 h^b			
<i>NCC</i>	0.61	27.6 (<0.0001)	0.83 ± 0.16 (0.0002)
<i>d-dimer</i>	0.21	20.1 (0.0003)	0.51 ± 0.12 (0.0011)
actMMP 9 48 h^c			
<i>NCC</i>	0.59	27.6 (<0.0001)	0.59 ± 0.13 (0.0004)
<i>totMMP 2</i>	0.21	20.1 (0.0003)	0.42 ± 0.15 (0.0013)
<i>d-dimer</i>	0.01	1.3 (0.28)	-0.15 ± 0.14 (0.33)

^aAdjusted multiple R^2 : 0.84; $P < 0.0001$

^bAdjusted multiple R^2 : 0.77; $P < 0.0001$

^cAdjusted multiple R^2 : 0.67; $P < 0.0001$

the 48 h incubation experiment, bands tended to lose a shaped aspect determining problems in the activity measurement. On the contrary, MMP 9 could be quantified only after at least 48 h of incubation. The overall reproducibility of the assay resulted good enough for the purposes of the present work.

The observed patterns of gelatinolytic bands were similar to those described by Bergman et al. [6]

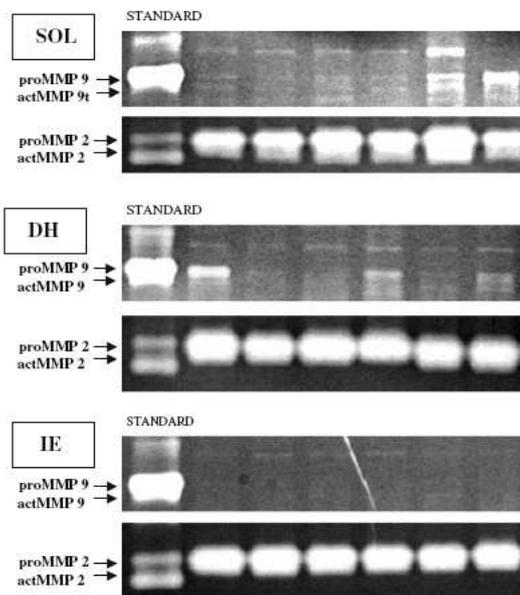


Fig. 3 Representative gelatin zymography gels after 48 h of incubation. From upper to bottom: space occupying lesions (SOL), disk herniation (DH) and idiopathic epilepsy (IE) groups. For each group, bands corresponding to MMP 9 were photographically enhanced. Human MMP 2 and 9 standard was run in each gel

together with some additional bands in SOL dogs. We have first reported herein that CSF of dogs diagnosed with SOL showed increased concentration of MMP 2 and 9 as reported in human beings (Fig. 2) [1]. Moreover, the proMMPs were found to coexist with activated forms and with heavier likely multimeric bands with molecular mass above 150 kDa. NCC, albumin, Tprot and d-dimer, resulted higher in the SOL and DH group than in the IE group (Fig. 1A–D). Many considerations must be taken into account when interpreting this evidence. In human beings, increased local MMP expression could cause a blood–brain barrier (BBB) breakdown favouring a net flow of blood soluble components and leukocyte transmigration into CSF [2, 12–16]. In particular, blood–brain barrier breakdown associated with MMPs activities was described in inflammatory conditions as CNS tuberculous meningitis and multiple sclerosis [2, 12, 13, 17]. Consequently, as a major drawback, MMPs from both serum and leukocyte source could leak into CSF thereby increasing the overall MMPs content and worsening the blood–brain barrier breakdown. In previous studies, intracellular MMP component was avoided by centrifuging the sample before analysis. Nevertheless, the amount of MMPs already secreted from leukocytes and derived from blood could not be eliminated. In such a context, the primary event that have determined increased MMPs concentration could not be ascertained. CSF timing of sample becomes crucial for limiting the leukocytes MMPs contamination; by selecting those samples with low cellular count, MMPs activity data would be more affordable for a local synthesis. In human literature, some authors, who investigated MMPs in brain tumours, have specifically excluded those samples with cell count above physiological range [1]. Nevertheless, in veterinary medicine,

CNS neoplasms are frequently diagnosed at advanced stages and early timed sample with high MMP activity and low NCC would be only a minority.

As for NCC also CSF albumin elicits similar considerations. Quotient between CSF albumin and serum albumin (QAlb) represents the most accurate tool for interpreting CSF albumin content irrespective of the serum concentration. Thereby increased Qalb reflects the serum albumin leakage in CSF due to blood-CSF barrier dysfunction [18]. Unfortunately, Qalb was not calculated in this study since the corresponding albumin serum concentration was not available and a lowered sensitivity was expected from the sole CSF albumin measurement. Indeed, two major causes may explain the increased CSF albumin concentration in these two groups: (1) accordingly with the molecular flux/CSF flow theory, neoplastic masses and herniated disk could interfere with the normal CSF outflow inducing therefore a progressive accumulation of molecules from blood to CSF [18, 19]; (2) as already described for cells, the passage of molecules from blood to CSF could be a consequence of increased MMP 2 and 9 activities evidenced in these two groups.

However, the contemporary increases of albumin, Tprot and NCC in the groups of SOL and DH elicited a major interpretative problem on whether the associated incremented MMP activity was primarily due to a neoplastic induced local synthesis or to a blood-CSF barrier dysfunction.

Certainly, the finding of the activated forms of MMP 9 represented a clue for a local synthesis since circulating MMPs are abundantly in the proenzyme form. In the attempt to clarify the pathological mechanism underlying this increased MMP activity, a statistical approach based on multivariate regression analysis were carried out for SOL group. Unfortunately, this approach could not be applied to DH due to the limited number of cases.

The totMMP 9 activity of SOL group was explained by a model that encompassed NCC and d-dimer (Table 1). In particular, the 66% of totMMP 9 variance resulted correlated with NCC, while a further 20% was explained by d-dimer. D-dimer formation is known to result from the cleavage of fibrin and fibrinopeptides by means of plasmin that originates from urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) cleavage of plasminogen. At the same time uPA is known to determine focal tissue degradation and ECM turnover by MMP 9 activation as well [20, 21]. Neoplastic tissues of the CNS with aggressive behaviour are known to express high levels of uPA [20]. Thus, in the context investigated, the relationship between totMMP 9 and d-dimer, were interpreted as an indirect evidence of the uPA local

activity pathway and supposed to be linked with a MMP 9 local synthesis.

Similarly to totMMP 9, the proenzyme form are mainly explained by a model where NCC and d-dimer account for an overall 82% of the variance in accordance with the previous interpretation (Table 1). ActMMP 9 is described by a significative model where NCC but also MMP 2 (i.e. 21% of the variance of actMMP 9) showed significant positive beta coefficients (Table 1). This finding could be explained by the evidence that MMP 2 could act in a paracrine way as activator of proMMP 9 as already demonstrated [21]. According to the above-mentioned hypothesis a significant relationship between d-dimer and actMMP 9 would have been expected. Nevertheless, MMP activation is a stepwise process in which uPA participates to the initial proteolytic attack while other active MMPs are responsible of the final step of activation and its amplification [21]. This evidence could explain why d-dimer, which are though to indirectly represent uPA activity, correlate only with both totMMP 9 and proMMP 9 and not with the actMMP 9, which in turn is correlated with MMP 2.

This statistical modelling of data concerning SOL furnished a reasonable interpretation of the origin of the increased MMP activity found in CSF of affected dogs. The majority of such gelatinolytic activity could arise from nucleated cells, mainly leukocytes, which could actively migrate in CSF due to BBB impairment and chemoattraction [13–15]. In turn, albumin was surprisingly not found to add significant information in the statistical model. Thus, BBB impairment is not probably the main cause of increased CSF leukocytes that could rather depend on a mechanism involving chemoattracting molecules and active migration [13–15]. A proportion of MMP activity (14%) could not be ascribed either to NCC or to serum origin. As a consequence, a local SNC origin for the remaining proportion of MMP is very likely and is also enforced by the significant relationship of total and proenzyme form with CSF d-dimer levels.

In human literature several authors have quantitatively correlated MMP 2 and 9 with the aggressiveness of primary and metastatic brain tumours. Friedberg et al. [1] described proMMP 9 in the CSF of all the patients included in the study with primary or metastatic brain tumours. Moreover glioblastoma cells have been demonstrated to markedly increase MMPs expression, that resulted, in turn, correlated with a concomitant enhanced VEGF expression. This last evidence suggests for the existence of an interplay between these molecules in the resulting malignancy of tumour [3]. MMPs could exert a double function in

determining tumour invasiveness; they promote the infiltration of tumour cells and newly formed capillaries by degrading ECM components and they favour VEGF-mediated angiogenesis by enhancing its expression (transcriptional way) and by mobilizing VEGF from ECM reservoir (post-translational way) [3, 22].

Our results showed preliminary evidence that canine CNS neoplasm could behave in a very similar manner as the human counterparts and that CSF MMP 9 activity is likely due to leukocytes recruitment and local synthesis associated with neoplastic diseases. Some problem related with the retrospective nature of this study could not be circumvented. To fully elucidate the importance of MMP 9 evaluation in CNS neoplasm the availability of cases with definitive diagnosis, the selection of a particular neoplasm, or the correlation between the CSF MMP activity and the follow up all represent further aspect which worth to be investigated in dogs in larger prospective studies.

Finally, in the perspective of human cancer therapy development, canine CNS neoplasm could represent a reliable pre-clinical orthologue model for validating MMPs as drug targets and for identifying eventual MMP anti-target and counter-target effects [23].

References

- Friedberg MH, Glantz MJ, Klempner MS, Cole BF, Perides G (1998) Specific matrix metalloproteinases profiles in the cerebrospinal fluid correlated with the presence of malignant astrocytomas, brain metastases and carcinomatous meningitis. *Cancer* 82:923–930
- Leppert D, Lindberg RLP, Kappos L, Leib SL (2001) Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res Rev* 36:249–257
- Munaut C, Noël A, Hougrand O, Foidart J-M, Boniver J, Deprez M (2003) Vascular endothelial growth factor expression correlates with matrix metalloproteinases MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 in human glioblastomas. *Int J Cancer* 106:848–855
- Volk SW, Kapatkin AS, Haskins ME, Walton RM, D'Angelo M (2003) Gelatinase activity in synovial fluid and synovium obtained from healthy and osteoarthritic joints of dogs. *Am J Vet Res* 64:1225–1233
- Loukopoulos P, Mungall BA, Straw RC, Thornton JR, Robinson WF (2003) Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Vet Pathol* 40:382–394
- Bergman RL, Inzana KD, Inzana TJ (2002) Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in cerebrospinal fluid of clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 63:1359–1362
- Levine JM, Ruaux CG, Bergman RL, Coates JR, Steiner JM, Williams DA (2006) Matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid and serum of dogs with acute spinal cord trauma from intervertebral disk disease. *Am J Vet Res* 67:283–287
- Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans EH, Jaffray DC, Eisenstein SM (2000) Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine* 25:3005–3013
- Crean JK, Roberts S, Jaffray DC, Eisenstein SM, Duance VC (1997) Matrix metalloproteinases in the human intervertebral disc: role of disc degeneration and scoliosis. *Spine* 22:2877–2884
- Gentilini F, Dondi F, Mastroilli C, Giunti M, Calzolari C, Gandini G, Mancini D, Bergamini PF (2005) Validation of a human immunoturbidimetric assay to measure canine albumin in urine and cerebrospinal fluid. *J Vet Diagn Invest* 17:179–183
- Petrie A, Watson P (1999) *Statistics for veterinary and animal science*. Blackwell Science, London
- Rosenberg GA, Dencoff JE, Correa N Jr, Reiners M, Ford CC (1996) Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood–brain barrier injury. *Neurology* 46:1626–1632
- Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DCC, Adams SE, Gearing AJH (1997) Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol* 72:155–161
- Leppert D, Leib SL, Grygar C, Miller KM, Schaad UB, Holländer GA (2000) Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood–brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis* 31:80–84
- Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW (2002) Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* 125:1297–1308
- Kolaczowska E, Chadzinska M, Scisłowska-Czarnecka A, Plytycz B, Opdenakker G, Arnold B (2006) Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 contributes to cellular infiltration in a murine model of zymosan peritonitis. *Immunobiology* 211:137–148
- Lee KY, Kim EH, Yang WS, Ryu H, Cho SN, Lee BI, Heo JH (2004) Persistent increase of matrix metalloproteinases in cerebrospinal fluid of tuberculous meningitis. *J Neurol Sci* 220:73–78
- Reiber H, Peter JB (2001) Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 184:101–122
- Reiber H (2003) Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci* 21:79–96
- Levicar N, Nuttall RK, Lah TT (2003) Proteases in brain tumour progression. *Acta Neurochir (Wien)* 145:825–838
- Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92:827–839
- Ribatti D, Marimietri D, Pastorino F, Brignole C, Nico B, Vacca A, Ponzoni M (2004) Angiogenesis in neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci* 1028:133–142
- Overall CM, Kleinfeld O (2006) Tumour microenvironment – opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6:227–239

Veterinary Research Communications, 30(Suppl. 1) (2006) 317–319
DOI: 10.1007/s11259-006-0070-4

© Springer 2006

Evaluation of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Activity in Cerebrospinal Fluid of Dogs with Non-Inflammatory Diseases of the Central Nervous System

M.E. Turba^{1,*}, F. Gentilini², G. Gandini², C. Mastrorilli², C. Bernardini¹ and M. Forni¹

¹*Department of Veterinary Morphophysiology and Animal Production;* ²*Veterinary Clinical Department, Faculty of Veterinary Medicine, Bologna, Italy*

*Correspondence: E-mail: meturba@vet.unibo.it

Turba, M.E., Gentilini, F., Gandini, G., Mastrorilli, C., Bernardini, C. and Forni, M., 2006. Evaluation of matrix metalloproteinases 2 and 9 activity in cerebrospinal fluid of dogs with non-inflammatory diseases of the central nervous system. *Veterinary Research Communications*, 30(Suppl. 1), 317–319

Keywords: disk herniation, dog, idiopathic epilepsy, matrix, metalloproteinases, space-occupying lesions, zymography

Abbreviations: BBB, blood-brain-barrier, CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; DH, disk herniation; ECM, extracellular matrix; IE, idiopathic epilepsy; MMP, matrix metalloproteinases; SOL, space-occupying lesions; TP, total protein

INTRODUCTION

Matrix metalloproteinases (MMP) 2 and 9 are enzymes involved in extracellular matrix (ECM) degradation with specific proteolytic activity for type IV collagen and gelatin. MMPs participate in several physiological processes characterised by ECM remodelling and are implicated in various inflammatory, degenerative and neoplastic pathological conditions. The invasive and metastatic potential of several neoplastic lesions in the central nervous system (CNS) has been correlated with MMP expression; therefore, MMP assessment in cerebrospinal fluid (CSF) has gained an important diagnostic and prognostic role in human medicine (Friedberg *et al.*, 1998). MMP2 has been evidenced in the CSF of clinically normal dogs; nevertheless, MMP expression has not been evaluated in the CSF of dogs affected by pathological conditions of the CNS (Bergman *et al.*, 2002). The aim of the present work was to retrospectively evaluate, using gelatin-zymography, the MMP2 and 9 activities in CSF samples obtained from dogs with non-inflammatory diseases of the CNS, with particular attention to space-occupying lesions (SOL). This last activity was evaluated in comparison with two other different pathological conditions: idiopathic epilepsy (IE) and disk herniation (DH).

MATERIALS AND METHODS

In the present study, 37 CSF samples, obtained from dogs presented to the Veterinary Clinical Department from 1999 to 2003, were analysed. All CSF samples ($n = 20$) collected

from dogs diagnosed with brain ($n = 13$) or spinal cord ($n = 7$) SOL, by means of computed tomography ($n = 18$) or contrast myelography ($n = 2$), were included in the work. For 8 out of these 20 samples, neuropathological diagnosis of a CNS neoplastic lesion was available. The remaining samples consisted of 11 CSF samples collected from dogs with IE and 6 obtained from subjects affected by DH. Samples were recovered from the cerebellomedullary cistern, with the exception of 2 cases in SOL and 3 in DH, collected from the lumbar site. Sample collection was immediately followed by cell count and, after centrifugation, by total protein (TP) and albumin assessment (immunoturbidimetric method) (Gentilini *et al.*, 2005); supernatants were then stored at -80°C until the subsequent zymographic analysis. Zymography was carried out using a commercial system (Novex Zymogram Gelatin gel, Invitrogen); in respect to manufacturer instruction, incubation time was prolonged to 24 h (Bergman *et al.*, 2002). MMP2 and 9 were identified on the basis of their molecular weight by comparison with reference standards. Bands corresponding to MMP2 were quantified, in Arbitrary Units (AU), by employing a computer assisted image analysis system. Bands corresponding to MMP9 were fainter than the sensitivity limit of the system, so they were analysed by 2 blinded independent operators; observation agreement was statistically assessed (Inter-rater agreement Kappa). The proportion of LCS samples with MMP9 activity in the different groups was compared using the χ^2 Test or Fisher Exact Test. For MMP2, cell count, TP and albumin, data were compared among 3 groups using the Mann Whitney U Test and within each group with the Spearman R Test. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Albumin concentration and cell count were found to be significantly higher for SOL and DH than IE. In a similar way, the TP content was also higher for the same groups, even though only the difference between the SOL and IE groups was statistically significant (Figure 1B and C). SOL MMP2 activity was the highest, followed in order by DH and IE (Figure 1A). Subjective evaluation of MMP9 was found to be reliable with a $K \pm \text{SE}$ coefficient of 0.873 ± 0.59 . A significantly higher proportion of subjects with MMP9 activity was present in SOL and DH groups in comparison to IE (Fig. 1D). Finally, in the SOL group a significant correlation was seen between MMP2 and TP concentration ($R = 0.51$).

DISCUSSION

In the SOL and DH groups the concomitant increase of TP, albumin, cell count and MMPs could reflect a permeability alteration of the blood-brain-barrier (BBB) and of the blood-cerebrospinal fluid-barrier. Blood contamination during sampling must be taken into account especially in the case of SOL. Moreover, sample centrifugation before freezing is a correct practice to avoid white blood cell contamination as a source of MMPs. Literature on human medicine reports the critical role played by MMPs on the BBB integrity and on the subsequent modifications in CSF composition (Friedberg *et al.*, 1998). Albumin evaluation is a reliable parameter for identifying barrier damage, even more sensitive than TP, which did not reveal significant differences between DH and IE. The lower MMP activity without CSF

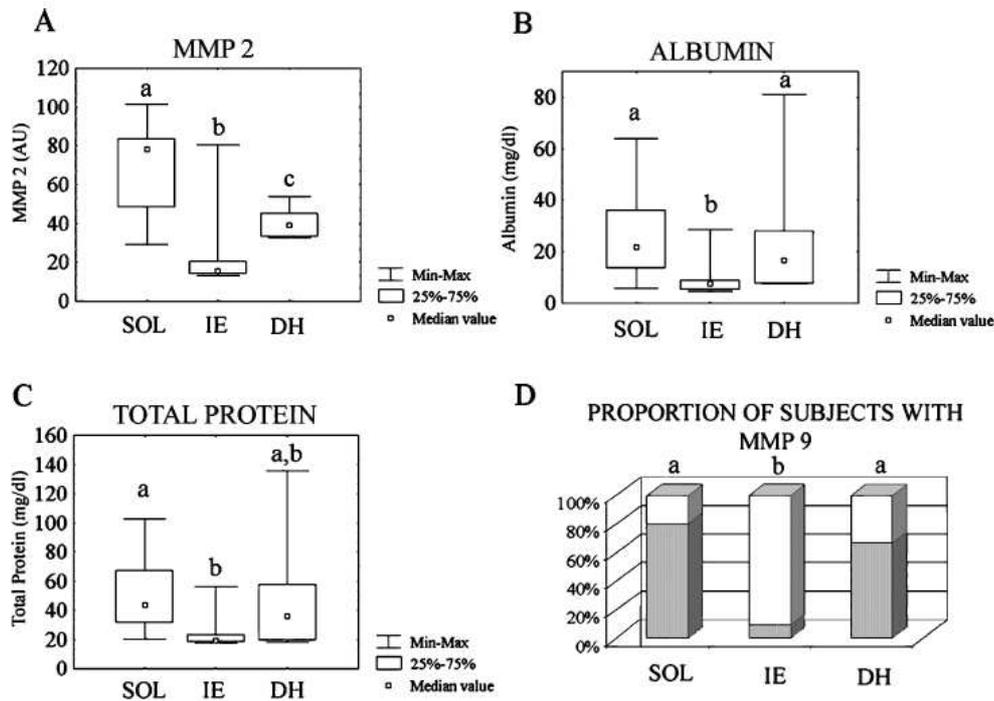


Figure 1. Box-plots of MMP 2 levels (A), albumin (B) and Total Protein (C) concentrations; (D) proportion of subjects with evident MMP 9 activity for each group. SOL: space-occupying lesions; IE: idiopathic epilepsy; DH: disk herniation. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated by different letters

modifications in the IE group enforces the abovementioned considerations. In agreement with human findings, in the present work a modification of MMP activity was revealed, especially over the course of pathological conditions of suspected or ascertained neoplastic origin. For this reason, MMP evaluation could be reliably enrolled in the routine diagnostic work-up of CSF samples. Finally, the involvement of MMPs in disk remodelling has been evidenced as already described for humans (Goupille *et al.*, 1998).

REFERENCES

- Bergman, R.L., Inzana, K.D. and Inzana, T.J., 2002. Characterization of matrix metalloproteinases -2 and -9 in cerebrospinal fluid of clinically normal dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **63**(10), 1359–1362
- Friedberg, M.H., Glantz, M.J., Klempner, M.S., Cole, B.F. and Perides, G., 1998. Specific matrix metalloproteinases profiles in the cerebrospinal fluid correlated with the presence of malignant astrocytomas, brain metastases, and carcinomatous meningitis. *Cancer*, **82**(5), 923–930
- Gentilini, F., Dondi, F., Mastroianni, C., Giunti, M., Calzolari, C., Gandini, G., Mancini, D. and Bergamini, P.F., 2005. Validation of a human immunoturbidimetric assay to measure canine albumin in urine and cerebrospinal fluid. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, **17**, 179–183
- Goupille, P., Jayson, M.I., Valat, J.P. and Freemont, A.J., 1998. Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disk degeneration? *Spine*, **23**, 1612–1626

PARTE 3

Valutazione dell'espressione di VEGF e dei suoi recettori Flt-1 e Flk-1 nelle retine e nei nervi ottici di ratti sottoposti a danno ischemico

CAPITOLO 1. VEGF E RECETTORI

1.1 Introduzione

La famiglia dei fattori di crescita per l'endotelio vascolare, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), risulta costituita da numerosi componenti rappresentati nello specifico dal:

- VEGF A, la prima molecola scoperta e indicata anche semplicemente come VEGF
- Placental Growth factor (PlGF)
- VEGF-B, -C, -D ed -E

Il PlGF è presente solo in sede placentare, mentre il VEGF-B è particolarmente abbondante nella muscolatura cardiaca e scheletrica; le rimanenti 2 molecole risultano invece coinvolte nei processi di linfangiogenesi e mantenimento dei vasi linfatici (Robinson e Stringer, 2001; Ferrara et al., 2003; Witmer et al., 2003).

La famiglia di molecole del VEGF esercita le sue funzioni biologiche quasi esclusivamente attraverso una famiglia di recettori di tipo tirosin kinasico rappresentati da Flt-1 (Fms-Like Tyrosine kinase) o VEGFR-1, Flk-1/KDR (*Fetal Liver kinase1/kinase insert domain-containing receptor*) o VEGFR-2, e Flt-4 o VEGFR-3. Inoltre, PlGF, VEGF-B, VEGF-E e alcune isoforme di VEGF-A si legano selettivamente a 2 recettori transmembranari di tipo 1 conosciuti rispettivamente come neuropilina 1 e 2 (NRP1 e 2) (Gluzman-Poltorak et al., 2000; Robinson e Stringer, 2001).

1.2 Il gene del VEGF e struttura della proteina

Il gene del VEGF-A contiene 8 esoni (Houck et al., 1991; Tischer et al., 1991). Per fenomeni di *splicing* alternativo, da un singolo pre-mRNA possono essere generate numerose isoforme identificate dalla diversa composizione esonica e

conseguentemente aminoacidica della relativa proteina prodotta. Tutte le isoforme di VEGF sono prodotte come omo-dimeri legati in modo covalente. Il peptide segnale (esone 1 e 4 residui dell'esone 2) è staccato durante la fase di secrezione. In posizione Asn74 avviene una N-glicosilazione, indispensabile per un'efficiente secrezione, sebbene sembri ininfluenza per le funzioni della molecola (Claffey et al., 1995).

1.3 Espressione del VEGF

Molte citochine e fattori di crescita influiscono sia sulla espressione che sui fenomeni di rilascio del VEGF. Questi includono: PDGF, TNF- α , TGF- α , TGF- β , FGF-4, *Keratinocyte Growth Factor* (KGF/FGF-7), *Epidermal Growth Factor* (EGF), IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1).

L'ipossia è una condizione che induce una rapida e intensa espressione dei livelli di mRNA di VEGF. Nel fenomeno di risposta all'ipossia è coinvolto il fattore noto come *Hypoxia Responsive Element* (HRE), che agisce a monte del gene del VEGF funzionando come *enhancer*; esso contiene una sequenza consenso capace di legare il fattore di trascrizione *Hypoxia-Inducible Factor 1* (HIF-1), responsabile dell'attivazione della trascrizione del VEGF.

L'ipossia incrementa inoltre l'emivita dell'mRNA da 3 a 8 volte grazie al legame del VEGF, molecola intrinsecamente labile, con una molecola stabilizzatrice, chiamata *Hypoxia-induced stability factor* (HuR). Infine, sul gene del VEGF è presente un sito alternativo per l'inizio della trascrizione, che garantisce la traduzione dell'mRNA a livello ribosomiale anche in condizioni svantaggiose, come nel caso dello stress ipossico, in cui può verificarsi una inibizione della traslazione mediata dal *cap* in posizione 5' dell'mRNA (Stein et al., 1998).

1.4 Varianti di *splicing*

Nell'uomo sono conosciute almeno 8 diverse isoforme di VEGF A, generate da fenomeni di *splicing* alternativo della stessa molecola di mRNA, e denominate VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189 e VEGF206 in base al numero di aminoacidi presenti nella proteina. In tutti gli animali non primati, rispetto all'uomo, tutte le isoforme di VEGF mancano di un aminoacido a livello dell'esone 2; per tale motivo, la nomenclatura delle isoforme è rappresentata con un aminoacido in meno.

Le varie isoforme del VEGF si distinguono tra loro per la presenza/assenza dei peptidi codificati dagli esoni 6a, 6b, 7a e 7b del gene del VEGF. Nel VEGF121 tutti questi esoni sono assenti, al contrario nel VEGF206 sono tutti presenti; nel VEGF189 manca l'esone 6b, nel VEGF165 mancano gli esoni 6a e 6b, mentre nel VEGF145 mancano gli esoni 6b, 7a e 7b (Figura 1; Houck et al., 1991; Tischer et al., 1991). Nel VEGF183, oltre alla mancanza dell'esone 6b, per la presenza di un sito di *splicing* alternativo conservato a livello dell'esone 6a, sono persi anche gli ultimi 18 bp dall'estremità C-terminale (Lei et al., 1998). Infine nel VEGF148 mancano gli esoni 6a, 6b e 7b; ciò determina una modificazione della cornice di lettura, a sua volta responsabile della formazione di un prematuro codone di stop a livello dell'esone 8a (Whittle et al., 1999).

Successivamente alle sopra-citate isoforme, è stato identificato il VEGF165b, che rappresenta una variante di *splicing* del VEGF165 con funzione inibitoria. Nello specifico, il VEGF165b, generato dalla selezione di un sito di *splicing* distale a livello dell'estremità C terminale, determina una cornice di lettura codificante per una sequenza C-terminale alternativa, chiamata appunto 8b, ma della stessa lunghezza dell'originale. Di conseguenza la proteina tradotta possiede lo stesso numero d'aminoacidi del VEGF165, ma una differente sequenza a livello dell'estremità C-

terminale. Infatti, i 6 aminoacidi C-terminali codificati dall'esone 8 (CDKPRR), sono rimpiazzati da 6 diversi aminoacidi (SLTRKD) codificati da 18 nucleotidi localizzati normalmente 66 basi dopo il normale sito accettore di *splicing* per l'esone 8.

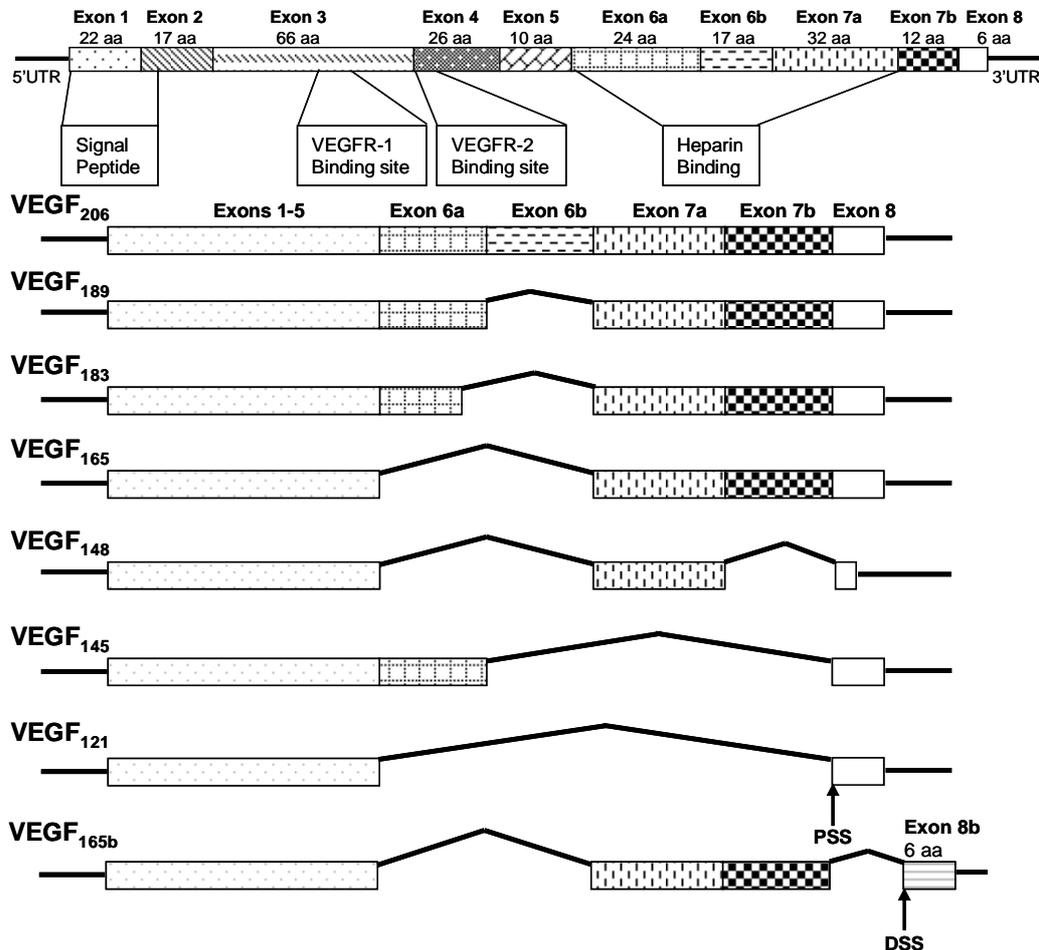


Figura 1: Le varianti di splicing del VEGF umano. Nella parte alta della figura sono rappresentati i domini funzionali e gli esoni dai quali derivano.

La maggiore parte delle cellule esprime generalmente le isoforme VEGF121, VEGF165 e VEGF189, sebbene anche il VEGF183 sia ampiamente espresso da molti tessuti. Al contrario, le 2 isoforme 145 e 206 sono molto più rare, essendo espresse soprattutto a livello di tessuto placentare.

Il VEGF165 è secreto dalle cellule come omodimero di peso pari a circa 46 kDa; la proteina ha carattere basico e una moderata affinità per l'eparina, dovuta alla presenza di 15 aminoacidi basici all'interno dei 44 residui codificati dall'esone 7. All'opposto, il VEGF121, che manca dell'esone 7, è una proteina leggermente acida e non lega

l'eparina. Di conseguenza, il VEGF121 è libero dopo la secrezione da parte delle cellule mentre il VEGF165 rimane per il 50-70% associato alle cellule e alla matrice extra-cellulare, probabilmente attraverso interazioni con il proteoglicano eparan-solfato (Houck et al., 1992). Il VEGF189 e il 206 contengono una sequenza aggiuntiva codificata dall'esone 6 e che determina una forte affinità per l'eparina. Per tale motivo, tali isoforme sono completamente sequestrate nella ECM e in misura inferiore sulla superficie cellulare (Houck et al., 1992). Il VEGF183, sebbene mancante degli ultimi 18 nucleotidi dell'esone 6a, continua a possedere un sito di legame con l'eparina in modo analogo all'isoforma 189. Il VEGF145 ha affinità per l'eparina, che gli è conferita dalla sequenza aminoacidica codificata dall'esone 6a, e che risulta simile a quella conferita dall'esone 7 al VEGF165. Comunque questa sequenza è responsabile del legame anche con altri componenti della matrice extra-cellulare in modo indipendente dal legame con l'eparina o l'eparan-solfato. Il VEGF145 legato alla matrice extra-cellulare rimane in ogni modo biologicamente attivo come mitogeno cellulare (Poltorak et al., 1997).

Le isoforme di VEGF legate alla matrice extra-cellulare costituiscono un *reservoir* di fattori di crescita, che possono essere rapidamente rilasciati dall'azione di specifici enzimi di tipo serin-proteasico, come l'Attivatore del Plasminogeno urokinase-type (uPA), o da particolari metalloproteinasi (MMP), come la MMP9. Complessivamente questi enzimi proteolitici, degradando la matrice extra-cellulare, favoriscono l'angiogenesi non soltanto attraverso la liberazione del VEGF sequestrato, ma determinando anche l'apertura di una via libera alle cellule endoteliali invasive.

Il VEGF189 può legarsi al VEGFR1; tuttavia, il legame con il VEGFR2 e la funzione di fattore mitogeno sulle cellule endoteliali sono dipendenti da un fenomeno di maturazione enzimatica operato dalla plasmina o dall'uPA. Questi enzimi determinano il clivaggio del VEGF189 a livello dell'estremità C-terminale della regione codificata

dall'esone 6, determinando la formazione di una proteina tronca (uPA-VEGF189) con attività biologica analoga a quella del VEGF 165. In generale, sebbene non tutte le isoforme del VEGF contengano un sito per l'uPA, possono essere tutte clivate della plasmina. Il VEGF degradato dalla plasmina, rispetto al VEGF165 o all'uPA-VEGF189, possiede una funzione angiogenetica molto inferiore e simile a quella del VEGF121. Ciò dimostra che le sequenze codificate dagli esoni 6 e 7 del gene VEGF regolano sia la bio-disponibilità della molecola, che l'intensità della sua azione.

Infine, il VEGF165b è un'isoforma inibitoria, descritta per la prima volta come molecola down-regolata in un modello di carcinoma renale dell'uomo. Ulteriori studi hanno dimostrato che questa isoforma è una variante di *splicing* normalmente espressa anche da altri tessuti in condizioni fisiologiche, dove agisce controbilanciando l'azione angiogenetica e mitogena svolta dell'isoforma VEGF165 attraverso l'inibizione dell'attivazione del VEGFR-2 (Woolard et al., 2004).

1.5 I recettori per il VEGF

I 3 recettori per il VEGF, nominati VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3, sono molecole di tipo tirosin-kinasico formate da una regione extra-cellulare, costituita a sua volta da 7 domini simili alle immunoglobuline, da una regione trans-membranaria e infine da un dominio tirosin-kinasico intra-cellulare (Robinson e Stringer, 2001; Cross et al., 2003) (Figura 2).

Il VEGFR1 pesa circa 180 kDa e rappresenta la molecola con la più alta affinità per il VEGF. Tale recettore è anche condiviso con i fattori di crescita PlGF e VEGF-B.

Il VEGFR2, che pesa 200-230 kDa, presenta un'alta affinità per il VEGF, così come per il VEGF-C, -D e -E. Sebbene il VEGFR1 abbia una maggiore affinità per il VEGF, il VEGFR2 ha una fosforilazione della tirosina intracitoplasmatica molto più efficiente dopo il legame con il ligando.

Il legame del VEGF con i suoi 2 recettori avviene attraverso 2 domini distinti, localizzati rispettivamente alle estremità opposte di ciascuno dei monomeri che compongono il VEGF. Inoltre, poiché nella molecola di VEGF matura i 2 monomeri sono orientati testa-coda, i siti di legame per il recettore VEGFR1 e VEGFR2 si trovano rispettivamente alle 2 estremità della molecola matura, come è rappresentato in Figura 3 (A e B). Questa particolare posizione dei siti di legame con i recettori, favorisce la formazione di strutture recettoriali dimeriche rispettivamente legate ad un polo e al polo opposto della stessa molecola di VEGF; la dimerizzazione del recettore è essenziale per iniziare il fenomeno della fosforilazione del residuo tirosinico intracitoplasmatico e per iniziare quindi la traduzione del segnale (Figura 3 C).

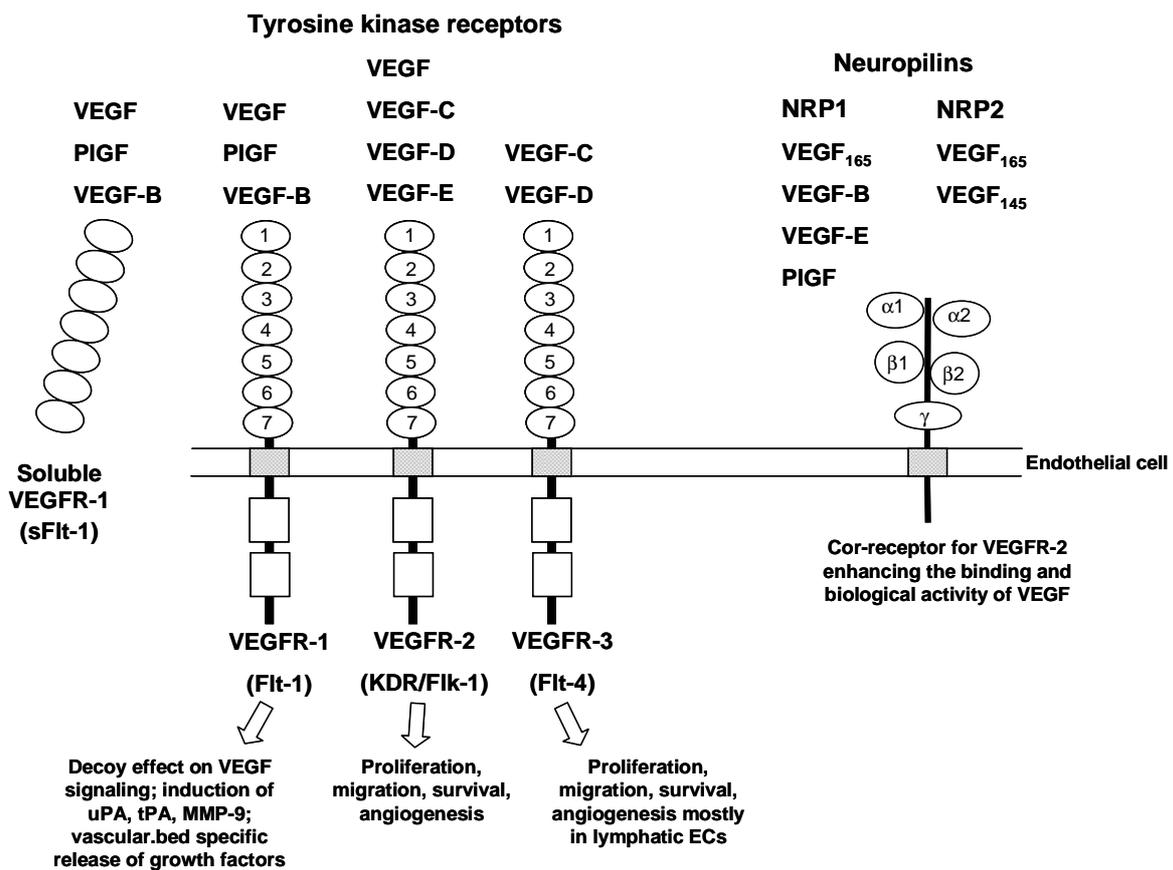


Figura 2: I recettori per il VEGF e le rispettive funzioni biologiche.

E' stata, inoltre, identificata una forma solubile troncata del VEGFR1 (*soluble* Flt1, sFlt1), che contiene, nella porzione corrispondente alla parte extracellulare dell'Flt1, solo i primi 6 domini simili alle immunoglobuline (Figura 2). La molecola sFlt1 possiede

una capacità di legame al VEGF analoga all'Flt1; tuttavia, tale recettore inibisce l'attività del VEGF perché ne impedisce il legame con le sue molecole effettrici. Anche il VEGF-B e il PlGF possono legarsi al sFlt1.

Per quanto riguarda il VEGFR2, è conosciuta una forma troncata anche per questo recettore; in questo caso, la molecola è comunque attaccata alla membrana cellulare, ma non possiede parte del dominio kinasico. Tale recettore è espresso normalmente nella retina di ratto e, sebbene sia espresso a livelli inferiori rispetto alla sua forma completa, sembra essere attivato dal VEGF altrettanto efficacemente.

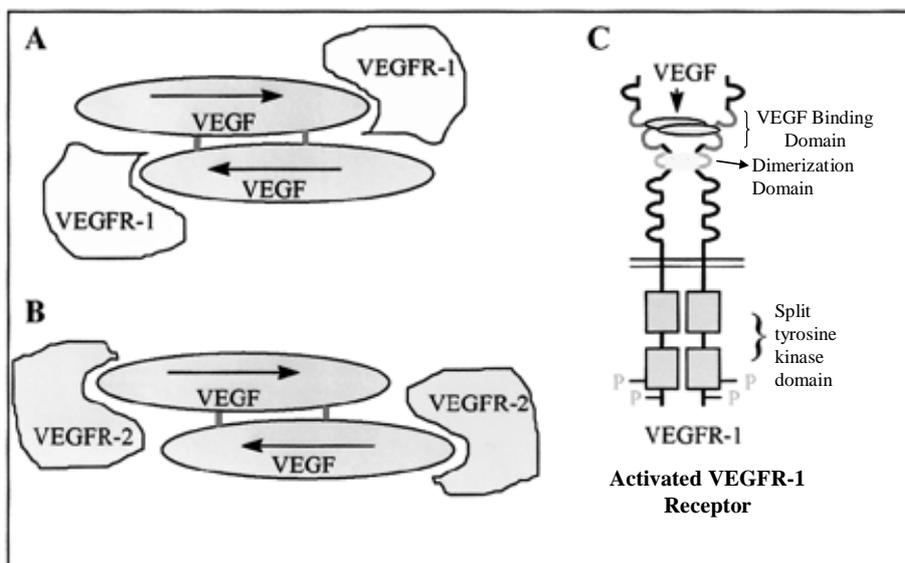


Figura 3: Interazione del VEGF con i siti di legame presenti sul VEGFR1 (A) e VEGFR2 (B) (da Neufeld et al., 1999).

Il VEGFR3 (Flt-4) è espresso principalmente a livello di endotelio linfatico dei tessuti adulti; questo recettore lega il VEGF-C e -D ma non lega il VEGF-A e sembra essere coinvolto nella regolazione della linfangiogenesi.

Infine, anche le 2 molecole Neuropilina 1 e 2 agiscono come recettori per il VEGF. Nello specifico la NRP1 lega il VEGF165, mentre la NRP2 lega sia il VEGF165 che 145 (Figura 2). La NRP1 sembra possa presentare la molecola di VEGF165 al VEGFR2 in maniera tale da aumentare l'efficacia della trasduzione del segnale mediata dal

VEGFR2. Questo fenomeno del legame alla NRP1 può in parte spiegare il maggiore potenziale mitogeno del VEGF165 rispetto al VEGF121.

1.6 Espressione dei recettori per il VEGF

L'espressione dei recettori VEGFR1 e 2 è fortemente stimolata dall'ipossia. In maniera analoga al VEGF, anche il VEGFR1 possiede nella sua regione promotrice una sequenza consenso capace di legare il fattore di trascrizione *Hypoxia-Inducible Factor 1* (HIF-1). Dal momento che il VEGFR2 non possiede tale sequenza, la sua trascrizione può essere leggermente down-regolata durante l'ipossia. Tuttavia, si ritiene che tale minore attività di trascrizione del VEGFR2 sia compensata da una up-regolazione post-trascrizionale associata al rilascio da parte del tessuto ischemico di un fattore non ancora identificato che agisce in modo paracrino (Waltenberger et al., 1996). Inoltre, molti fattori di crescita, incluso lo stesso VEGF, possono influenzare l'espressione dei recettori. La molecola bFGF è nota per stimolare, in sinergia con il VEGF, l'angiogenesi anche determinando un aumento dell'espressione del VEGFR2 sulle cellule endoteliali.

CAPITOLO 2: NGF

Il fattore di crescita Nerve Growth Factor (NGF) è una molecola di natura polipeptidica, appartenente alla famiglia delle neurotropine, che svolge un ruolo cruciale nei processi di promozione della crescita, differenziazione e nello svolgimento delle funzioni del sistema nervoso simpatico e sensitivo (Levi-Montalcini et al., 1995; Moser et al., 2004). Recentemente, la funzione dell'NGF è stata definita come pleiotropica data la molteplicità di sedi e processi in cui può essere coinvolta, quali ad esempio nell'infiammazione, nella regolazione della secrezione di altri neuropeptidi, nella fisiologia della pelle ed infine nei processi di rigenerazione tissutale. NGF esercita le sue attività biologiche attraverso il legame con 2 recettori, indicati come p75, recettore

comune delle neurotrophine, e *trkA*, recettore ad alta affinità (Chao e Hempstead, 1995). Inoltre, è stato altresì evidenziato che NGF dopo essersi legato ai suoi 2 recettori sulle terminazioni nervose, è trasportato in modo retrogrado verso il neurone sensitivo o simpatico, dove esercita una funzione neurotrofica, che previene la morte cellulare e promuove l'innervazione periferica.

Studi precedenti hanno rilevato che NGF da solo o in combinazione con l'azione di altre molecole endogene, può esercitare la sua azione biologica anche sulle cellule endoteliali molto probabilmente agendo come fattore angiogenetico (Dollè et al., 2005). Infatti, è stato evidenziato che NGF induce arteriogenesi e allargamento di capillari preesistenti a livello di gangli cervicali periferici di ratti appena nati, così come favorisce la formazione di arterie in risposta all'ischemia (Calzà et al., 2001). Tuttavia, non è stato ancora completamente delucidato come NGF eserciti la sua azione angiogenetica e se possa influenzare la funzione del VEGF.

CAPITOLO 3: IL MODELLO DEL “2VO”

Nell'ambito delle malattie neurologiche dell'età adulta dell'uomo, le patologie di tipo cerebro-vascolare occupano, per frequenza di comparsa e importanza, una posizione di grande rilievo. In generale, il termine di malattia cerebro-vascolare include tutte le alterazioni cerebrali provocate da processi patologici a carico della parete dei vasi sanguigni. Una delle conseguenze più frequenti dovute alla modificazione della parete e della permeabilità vasale, è rappresentata da fenomeni di ipoperfusione cerebrale dei distretti tributari della struttura vascolare compromessa.

In ambito sperimentale, la doppia occlusione delle arterie carotidi (*2 vessel-occlusion*, 2VO) eseguita nel ratto rappresenta un modello animale di ipoperfusione cerebrale di tipo cronico, paragonabile a quello che avviene spontaneamente nell'uomo (Stevens et al., 2001). Questo tipo di intervento sperimentale determina la comparsa di danni

molecolari, anatomici e funzionali a carico di diverse strutture rappresentate principalmente dalla retina, dal nervo ottico e dall'ippocampo. In modo analogo, le patologie di tipo occlusivo dell'arteria carotide nell'uomo si manifestano generalmente con sintomi di tipo oculare, tanto che l'amaurosi temporanea risulta essere la manifestazione probabilmente più frequente presentandosi approssimativamente in un terzo dei pazienti; le alterazioni del riflesso pupillare sono conseguenze altrettanto frequenti per questo tipo di patologia, che può progredire fino alla cecità completa. Anche nel modello sperimentale indotto nel ratto, l'ipoperfusione determina, come prima conseguenza, alterazioni o perdita del riflesso pupillare, che si può determinare già nei primi 2 giorni successivi all'intervento. Le alterazioni del riflesso pupillare sono indice di degenerazione sia della retina, che presenta un generale assottigliamento dei vari strati che la compongono, che del nervo ottico, in cui si evidenzia una sofferenza assonale rappresentata dalla disgregazione della proteina strutturale del citoscheletro (β III tubulina) accompagnata, anche se in maniera più tardiva, da una distruzione della mielina.

CAPITOLO 4: PARTE SPERIMENTALE - VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI NGF SULLA ESPRESSIONE DI VEGF, FLT-1 E FLK-1 IN CORSO DI "2VO"

4.1: Introduzione

Il presente studio è stato eseguito per valutare i possibili effetti determinati dalla somministrazione intra-oculare di NGF in ratti sottoposti alla doppia occlusione delle arterie carotidi (modello del 2VO). In particolare, nel presente studio è stato investigato l'effetto di NGF sull'espressione del VEGF-A e dei suoi 2 recettori a livello di retina e di nervo ottico. Tale lavoro è stato eseguito in collaborazione con la sezione di Anatomia del Dipartimento Dimorfipa dell'Università di Bologna, nella figura della Prof.ssa Calzà; esso si inserisce all'interno di un lavoro di più ampio respiro e rappresenta solo uno degli aspetti che la Prof.ssa Calzà e i suoi collaboratori hanno deciso di valutare.

4.2: Materiali e metodi

4.2.1: Animali

Per il presente studio sono stati impiegati 68 ratti di razza Sprague-Dawley apatogeni di età compresa tra 3 e 12 mesi. Al momento dell'arrivo degli animali, e prima degli interventi chirurgici, è stato verificato il normale funzionamento del riflesso pupillare in ogni animale. La risposta diretta e consensuale è stata valutata per ogni occhio. A tale scopo, ogni animale è stato prima adattato al buio per almeno 5 minuti, poi un occhio è stato esposto ad un fascio luminoso ottenuto con un otoscopio per valutare la risposta diretta. In seguito, il fascio è stato immediatamente indirizzato anche sull'occhio controlaterale per valutare la risposta consensuale. Entrambi gli occhi sono stati poi ri-adattati al buio per circa 1 minuto, e la procedura, nella medesima modalità, è stata ripetuta per l'altro occhio. La diagnosi di perdita del riflesso pupillare è stata stabilita alla

presenza di un ritardo nella costrizione della pupilla superiore ai 10 secondi dal momento in cui l'occhio è stato esposto alla fonte luminosa. Il riflesso pupillare è stato valutato quotidianamente nella prima settimana seguente all'intervento chirurgico, e almeno una volta alla settimana successivamente.

4.2.2: Intervento chirurgico

Gli animali sono stati suddivisi in modo casuale in 2 gruppi:

- gruppo di controllo (n= 32) e
- gruppo sottoposto all'intervento di doppia occlusione delle carotidi definito come gruppo del 2VO (n= 36)

Gli animali di ogni gruppo sono stati suddivisi in modo randomizzato in 3 ulteriori sottogruppi rappresentati da:

- sottogruppo di controllo in cui non è avvenuta nessuna somministrazione (n= 10 per il gruppo di controllo: n= 12 per il gruppo del 2VO)
- sottogruppo in cui è stata somministrata soluzione fisiologica a livello intra-oculare (n= 12 per il gruppo di controllo: n= 12 per il gruppo del 2VO)
- sottogruppo in cui è stata somministrato NGF a livello intra-oculare (n= 10 per il gruppo di controllo: n= 12 per il gruppo del 2VO)

Induzione dell'ipoperfusione

L'intervento della doppia occlusione è stato eseguito dopo anestesia con ketamina cloridrato. La procedura chirurgica ha previsto l'esecuzione di un'incisione ventrale sulla linea mediana del collo in modo da esporre bilateralmente le arterie carotidi, che, dopo essere state isolate dalla guaina connettivale, sono state separate delicatamente dal nervo vago. In seguito, è stata eseguita una legatura di entrambe le carotidi con un filo di seta 5-0: la prima approssimativamente 8-10 mm inferiore alla biforcazione

dell'arteria carotide comune (Davidson et al., 2000), la seconda 2-5 mm al di sotto della prima.

Due giorni dopo l'intervento, gli animali sono stati nuovamente anestetizzati con ketamina cloridrato e dopo aver instillato in ciascun occhio del collirio anestetico (Ossibuprocaina 4mg/ml), è stata eseguita, mediante l'utilizzo di un microscopio operatorio (Wild Heerbrugg M651), un'iniezione intravitreo di 3 μ l di soluzione salina sterile nel gruppo controllo, e di 5 μ g di NGF in 3 μ l di soluzione fisiologica nel gruppo trattato. L'iniezione è stata effettuata a livello della *pars plana* utilizzando un ago (butterfly) 27 gauge (PIC) collegato ad una siringa Hamilton da 25 μ l.

4.2.3: Campionamento delle retine e dei nervi ottici

Dopo 8 giorni dall'intervento, gli animali sono stati soppressi; i campioni di retina e di nervo ottico per ogni occhio di ogni animale sono stati immediatamente prelevati, pesati e congelati in azoto liquido. I campioni sono stati successivamente conservati a -80°C fino all'esecuzione delle relative analisi.

4.2.4: Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione

L'RNA è stato estratto dai campioni di retina e di nervo ottico mediante uso di kit commerciale (Roche) specifico per l'estrazione dell'RNA messaggero (mRNA) da piccole quantità di tessuto. Dopo l'estrazione, l'RNA è stato quantificato mediante lettura allo spettrofotometro; l'eventuale DNA genomico presente nel RNA estratto è stato eliminato trattando il campione con l'enzima Deossiribonucleasi I libera da RNasi (Promega) 0,1 U/ μ l in presenza di un inibitore delle ribonucleasi (*Ribonuclease inhibitor*, Fermentas) 4 U/ μ l, a 37°C per 30 min, denaturando poi l'enzima a 95 °C per 5 min. Successivamente circa 100 ng di RNA sono stati sottoposti a retrotrascrizione in una reazione finale di 20 μ l, secondo le condizioni indicate per l'enzima trascrittasi

inversa M-MLV (*Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*) (GIBCO BRL); il protocollo di retrotrascrizione ha previsto un'iniziale incubazione a 37 °C per 50 minuti, seguita da una denaturazione a 70°C per 15 min.

4.2.5: Real time PCR per GAPDH, VEGF, FLT-1 e FLK-1

Prima di sottoporre i campioni all'analisi di PCR Real time, è stata eseguita la "messa a punto" delle reazioni di PCR finalizzate ad amplificare il cDNA di 4 diversi geni di ratto rappresentati da:

- Gene per la Gliceraldeide 3 Fosfato Deidrogenasi (GAPDH) scelto come gene *house-keeping*
- Gene per il VEGF-A
- Gene per il recettore FLT-1
- Gene per il recettore FLK-1

Le sequenze nucleotidiche dei geni di interesse sono state individuate tramite consultazione del database Nucleotide disponibile su internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>). I primer sono stati disegnati mediante impiego del software Beacon Designer 3.0 (Biorad) a cavallo tra 2 esoni adiacenti, in modo tale da escludere l'amplificazione di eventuale DNA contaminante.

I primer, la posizione, il peso atteso del prodotto e la temperatura di *melting* (TM) delle sequenze dei geni di interesse, sono indicata in Tabella 1:

GENE	PRIMER	POSIZIONE	PRODOTTO	TM
VEGF	accctggccttactgctgtac cgtccatgaacttcaccacttc	Esoni 2-3	103	86.5
FLT-1	tgtcctcaactgcaccgtcac ccgctgcctgatagatgctctc	Esoni 6-7	100	84.0
FLK-1	tggcaaatacaacccttcag cacactagtcaccaacac	Esoni 2-3	108	85.5

Tabella 1

Per eseguire l'analisi di PCR Real time è stata impiegata la chimica del Sybr green, con verifica della specificità dei prodotti amplificati mediante curva di *melting*. In ogni caso, nella fase di "messa a punto" i prodotti di amplificazione sono stati controllati anche mediante corsa su gel di agarosio e colorazione con Etidio Bromuro per verificare la corrispondenza del peso del prodotto con quello atteso.

In seguito per ogni coppia di primer è stata valutata la relativa curva di efficienza effettuando 4 diluizioni seriali in rapporto 1:2 un campione di cDNA di controllo partendo da una concentrazione di circa 150 ng. Le condizioni di amplificazione sono state modificate in termini di temperature di *annealing* fino all'ottenimento di curve di efficienza simili e superiori al 90% per tutti e 4 i geni di interesse. In particolare i valori di efficienza delle PCR per GAPDH; VEGF, FLT-1 e FLK-1 sono state rispettivamente: 94%, 93,8%, 98,7%, 99%. In generale, per eseguire le reazioni di PCR Real time è stata impiegata una mix contenente Sybr Green (Biorad), primer alla concentrazione di 500 nM e acqua per arrivare ad un volume finale di 25 µl. Per ogni reazione di PCR è stato poi identificata la specifica temperatura di *melting*.

Nel caso delle PCR per GAPDH, VEGF, FLT-1 il protocollo di amplificazione è stato:

STEP1	95°C per 1'50"
STEP2	95°C per 15"
(40 volte)	60°C per 1'
STEP3	Curva di <i>melting</i> da 55°C

Nel caso invece di FLK-1 il protocollo eseguito è stato:

STEP1	95°C per 1'50"
STEP2	95°C per 15"
(40 volte)	58°C per 20"
	72°C per 20"
STEP3	Curva di <i>melting</i> da 53°C

Tutte le PCR Real time dei campioni di retina e nervo ottico sono state eseguite in doppio per ogni gene di interesse mettendo in ogni reazione 5 ng di cDNA. I risultati delle PCR Real time sono stati espressi come *cycle-Threshold* (cT) cioè considerando il punto di incontro tra la curva di amplificazione di ciascun campione con la linea di fluorescenza di base.

4.3: Analisi statistica dei risultati

I valori medi di cT di ogni campione, sia di retina che di nervo ottico, sono stati calcolati per ogni gene analizzato; i valori di cT medi relativi ai geni VEGF, FLT-1 e FLK-1 di tutti i campioni sono stati poi normalizzati contro i corrispondenti valori medi di GAPDH, considerato come gene *house-keeping*, secondo la tecnica del Delta cT (cT gene house-keeping – cT gene di interesse).

Nelle figure 4 e 5 sono rappresentati i grafici dei valori medi normalizzati dei 3 geni VEGF (a), FLT-1 (b) e FLK-1 (c), con i relativi valori di deviazione standard, rispettivamente delle retine e dei nervi ottici.

I valori medi normalizzati di cT per ogni gene, sia per le retine che per i nervi ottici, sono stati analizzati mediante test *t* di Student, confrontando ogni sottogruppo del gruppo del 2VO contro il relativo sottogruppo del gruppo Controllo (Figura 6 e 7). Inoltre, all'interno del gruppo del 2VO, i 3 sottogruppi sono stati confrontati tra loro.

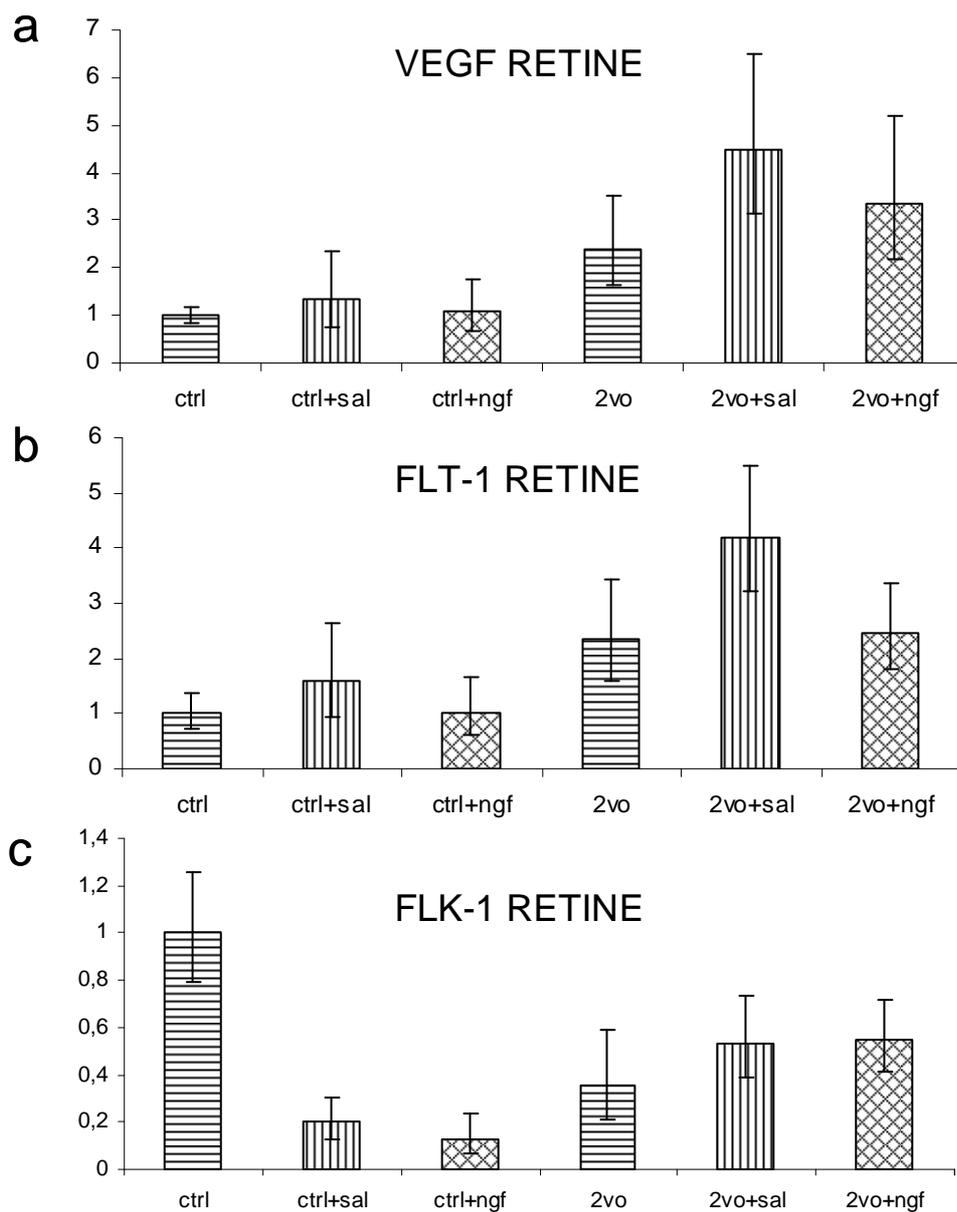


Figura 4: Retine, valori medi di VEGF e dei suoi recettori nei gruppi controllo e 2VO.

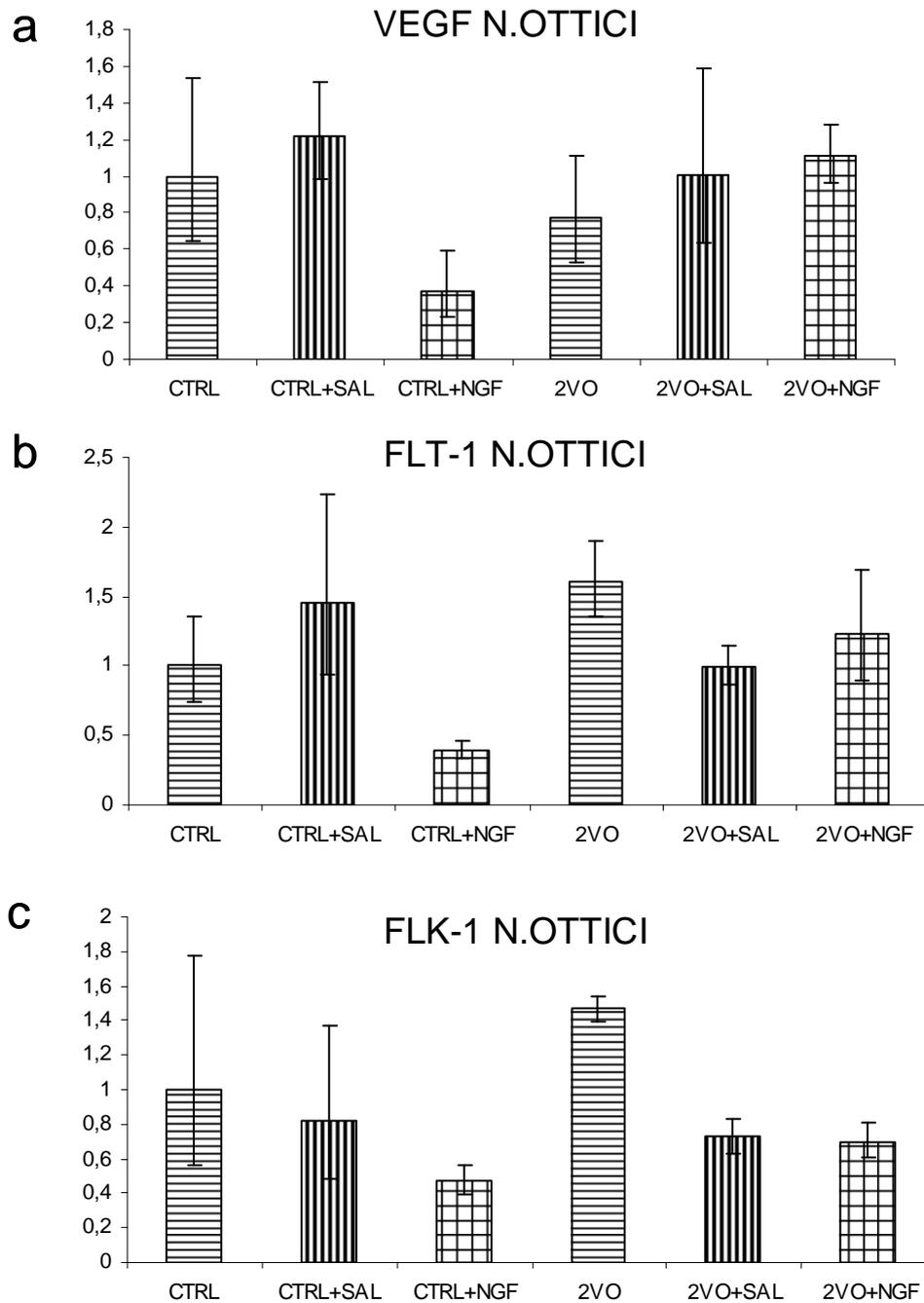


Figura 5 Nervi ottici, valori medi di VEGF e dei suoi recettori nei gruppi controllo e 2VO.

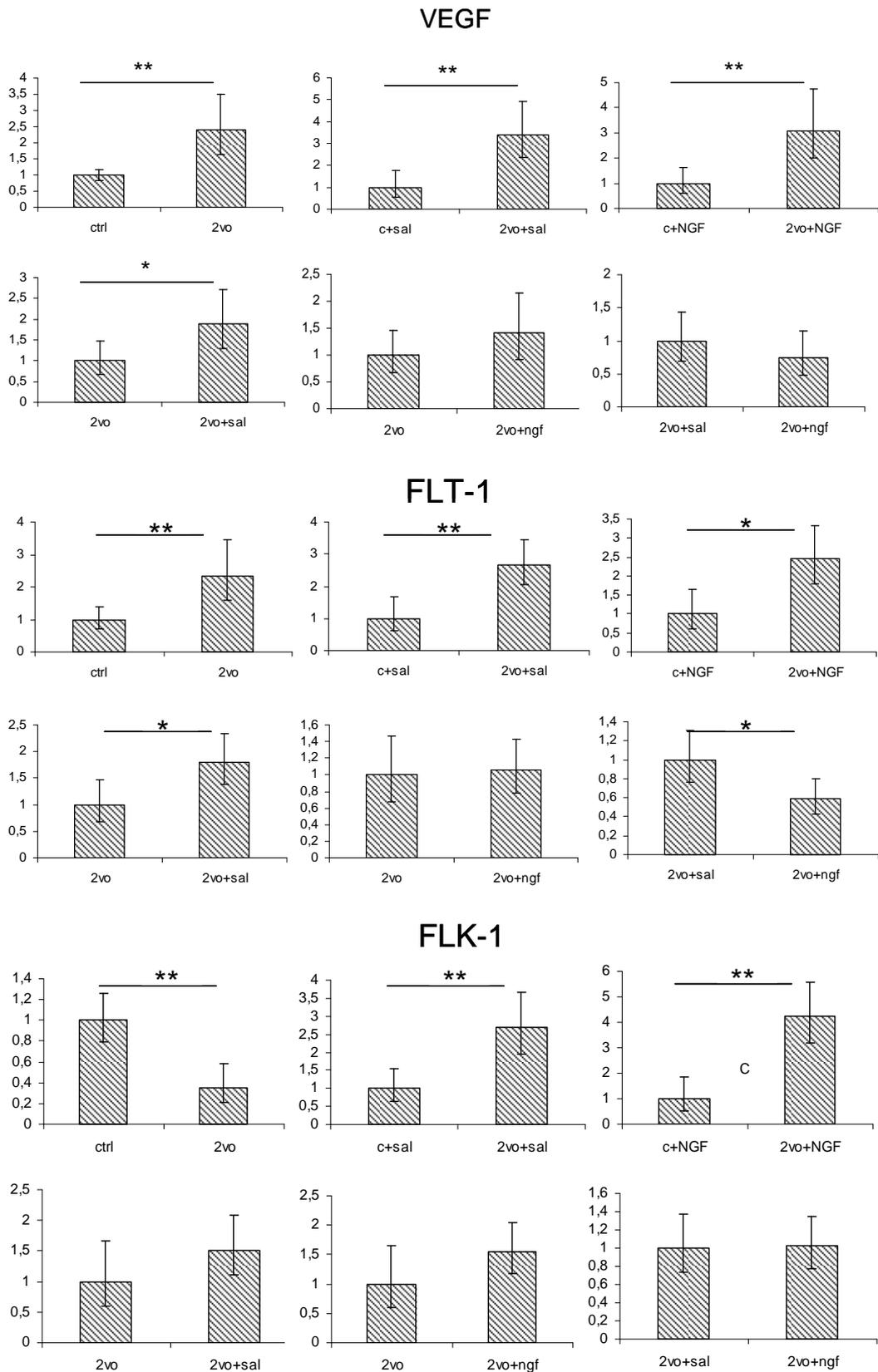


Figura 6: Retine, confronto tra gruppi mediante test t; * = p < 0.05; ** = p < 0,01.

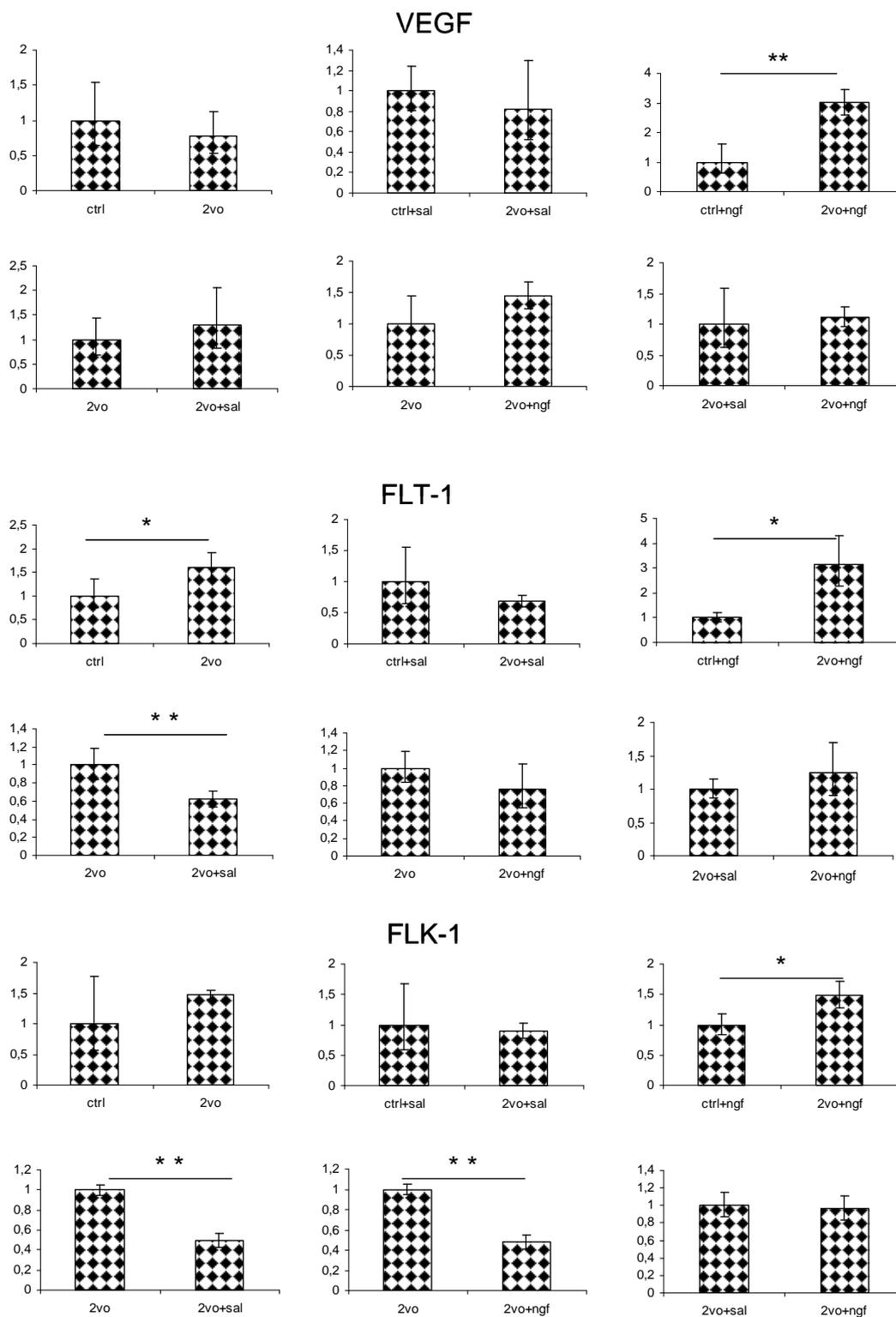


Figura 7 Nervi ottici, confronto tra gruppi mediante test t; * = p < 0.05; ** = p < 0,01.

4.4: Discussioni e conclusioni

Il fattore di crescita NGF è noto per possedere funzioni pro-angiogenetiche, anche se i precisi meccanismi che regolano questa funzione non sono stati completamente delucidati. Tra le varie ipotesi, esiste la possibilità che alla base di tale funzione ci sia una relazione tra l'azione di NGF e quella del VEGF. Nel presente lavoro, è stato valutato, attraverso uno studio di espressione molecolare, l'eventuale influenza di NGF sulla regolazione dell'espressione dell'mRNA di VEGF e dei suoi recettori. Tuttavia, come indicato nei risultati, non è stato possibile evidenziare nessun effetto statisticamente significativo sull'espressione di VEGF e dei suoi recettori dovuto alla somministrazione di NGF. Chiaramente, come già dimostrato da numerosi studi precedenti, la procedura di occlusione delle arterie carotidi, determinando un'ischemia e quindi una situazione di ipossia, ha rappresentato un forte stimolo alla produzione di VEGF e dei suoi recettori in tutti i 3 sottogruppi del 2VO, attraverso la via di stimolazione dell'HIF.

Sorprendentemente, il sottogruppo in cui è stata somministrata la soluzione salina ha presentato una *up-regulation* dell'espressione di VEGF, FLT-1 e FLK-1 anche se non sempre in modo significativo. Ciò ha portato alla conclusione che la procedura dell'iniezione intra-oculare è stata capace di stimolare una risposta angiogenetica, probabilmente conseguente all'aumento pressorio dovuto alla stessa manipolazione e al deposito di liquido.

In conclusione, nonostante la funzione pro-angiogenetica di NGF sia stata ampiamente dimostrata da precedenti lavori, dai risultati ottenuti nel presente lavoro, emerge che NGF non esercita la sua funzione attraverso la via del VEGF, quantomeno del modello sperimentale utilizzato. L'ipotesi più probabile che può essere formulata dai dati qui

presentati è che NGF possa stimolare la neo-angiogenesi attraverso vie differenti, come attraverso la stimolazione di altri fattori di crescita con azione pro-angiogenetica.

BIBLIOGRAFIA

- Calzà L., Giardino L., Giuliani A., Aloe L., Levi-Montalcini R., *Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactive factors*, PNAS, 98, 4160-4165, 2001.
- Chao M.V. e Hempstead B.L., *p75 and Trk: a two receptor system*, Trends neuroscience, 18, 321-326, 1995.
- Claffey K.P., Sender D.R., Spiegelman B.M., *Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF*, Biochimica et biophysica acta, 1246, 1-9, 1995.
- Cross M.J., Dixelius J., Matsumoto T., Claesson-Welsh L., *VEGF-receptor signal transduction*, Trends in biochemical sciences, 28, 488-494, 2003.
- Dollè J.-P., Rezvan A., Allen F.D., Lazarovici P., Lelkes P.I., *Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells*, The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 315, 1220-1227, 2005.
- Gluzman-Poltorak Z., Cohen T., Herzog Y., Neufeld G., *Neuropilin-2 and Neuropilin-1 are receptors for the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF) and of placenta growth factor-2, but only neuropilin-2 functions as a receptor for the 145-amino acid form of VEGF*, Journal of biological chemistry, 275, 18040-18045, 2000.
- Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J., *The biology of VEGF and its receptors*, Nature Medicine, 9, 669-676, 2003.

- Houck K.A., Ferrara N., Winer J., Cachianes G., Li B., Leung D.W., *The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA*, *Molecular Endocrinology*, 5, 1806-1814, 1991.
- Houck K.A., Leung D.W., Rowland A.M., Winer J., Ferrara N., *Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms*, *Journal of biological chemistry*, 267, 26031-26037, 1992.
- Lei J., Jiang A., Pei D., *Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183*, *Biochimica et biophysica acta*, 1443, 400-406, 1998.
- Levi-Montalcini R., Dal Toso R., della Valle F., Skaper S.D., Leon A., *Update of the NGF saga*, *Journal of neurological science*, 130, 119-127, 1995.
- Moser K.V., Reindl M., Blasig I., Humpel C., *Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, express NGF receptors and secrete NGF after inflammation*, *Brain research*, 1017, 53-60, 2004.
- Poltorak Z., Cohen T., Sivan R., Kandelis Y., Spira G., Vlodyasky I., Keshet E., Neufeld G., *VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix*, *Journal of biological chemistry*, 272, 7151-7158, 1997.
- Robinson C.J., e Stringer S.E., *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors*, *Journal of cell science*, 114, 853-865, 2001.
- Stein I., Itin A., Einat P., Skaliter R., Grossman Z., Keshet E., *Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia*, *Molecular and cellular biology*, 18, 3112-3119, 1998.

- Stevens W.D., Fortin T., Pappas B.A., *Retinal and optic nerve degeneration after chronic carotid ligation, time course and role of light exposure*, Stroke, 33, 1107-1112, 2001.
- Tischer E., Mitchell R., Hartman T., Silva M., Gospodarowicz D., Fiddes J.C., Abraham J.A., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*, Journal of biological chemistry, 266, 11947-11954, 1991.
- Waltenberger J., Mayr U., Pentz S., Hombach V., *Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia*, Circulation, 94, 1647-1654, 1996.
- Whittle C., Gillespie K., Harrison R., Mathieson P.W., Harper S.J., *Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant*, Clinical science, 97, 303-312, 1999.
- Witmer A.N., Vresen G.F.J.M., Van Noorden C.J.F., Schlingemann R.O., *Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease*, Progress in retinal and eye research, 22, 1-29, 2003.
- Woolard J., Wang W.Y., Bevans H.S., Qiu Y., Morbidelli L., Pritchard-Jones R.O., Cui T.G., Sugiono M., Waine E., Perrin R., Foster R., Digby-Bell J., Shields J.D., Whittles C.E., Mushens R.E., Gilatt D.A., Ziche M., Harper S.J., Bates D.O., *VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression*, Cancer research, 64, 7822-7835, 2004.