

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA E PRODUZIONI
ANIMALI



**Dottorato di ricerca in Biologia, Patologia e Igiene ambientale in
Medicina Veterinaria (XXVIII Ciclo)**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Giuseppe Cringoli

**Difetti cardiovascolari nel modello murino di mucopolisaccaridosi
IIIB**

**Docente guida: Ch.mo
Prof. Luigi Avallone**

**Candidata:
Dott.ssa Giuliana Cerulo**

**Tutor: Ch.mo
Prof. Luigi Michele Pavone**

Anno Accademico 2015/2016

INDICE

ABSTRACT	p. 4
SOMMARIO	p. 7
INTRODUZIONE	
❖ I lisosomi e le malattie da accumulo lisosomiale	p. 10
❖ I glicosamminoglicani e loro catabolismo	p. 13
❖ Le mucopolisaccaridosi	p. 17
❖ La mucopolisaccaridosi IIIB	p. 23
❖ Il modello murino della mucopolisaccaridosi IIIB	p. 25
SCOPO DELLA TESI	p. 27
MATERIALI E METODI	
❖ Animali	p. 30
❖ Genotipizzazione dei topi NAGLU ^{-/-}	p. 31
❖ Ecocardiografia transtoracica	p. 31
❖ Analisi istologiche	p. 32
❖ Immunoistochimica	p. 32
❖ Estrazione di RNA, Reverse transcription e Real time PCR	p. 33
❖ Estrazione di proteine ed elettroforesi SDS-PAGE	p. 35
❖ Western blotting	p. 36
❖ Analisi statistica	p. 37

RISULTATI

- ❖ Ridotta funzionalità cardiaca e difetti valvolari nei topi NAGLU^{-/-} p. 38
- ❖ Vacuolizzazione, accumulo di HS, infiammazione e fibrosi
nel miocardio dei topi NAGLU^{-/-} p. 41
- ❖ Aumento dei livelli di espressione di marcatori molecolari
di disfunzioni cardiache nei topi NAGLU^{-/-} p. 45
- ❖ Alterazioni del processo autofagico lisosomiale nel cuore
di topi NAGLU^{-/-} p. 45

DISCUSSIONE p. 50

BIBLIOGRAFIA p. 55

RINGRAZIAMENTI p. 63

ABSTRACT

Mucopolysaccharidoses (MPS) comprise a group of 11 distinct lysosomal storage diseases due to inherited deficiencies of the enzymes involved in glycosaminoglycan (GAG) catabolism. The progressive deposition of GAGs in the tissues results in multi-organ system dysfunctions that varies with the specific enzyme mutation present and the particular GAG deposited. The typical symptoms of the diseases include: organomegaly, dysostosis multiplex, mental retardation and developmental delay. There are currently four main therapeutic options for MPS, which include hematopoietic stem cells transplantation (HSCT), the replacement of the missing enzyme with its normal recombinant counterpart (enzyme replacement therapy, ERT), substrate reduction therapy, and gene therapy. However, all of these therapeutic approaches, some of which are still under investigation, show a limited efficacy, and MPS patients usually do not survive beyond the second decade of their life. Among the different causes of the early death of MPS patients, cardiac disorders appear to play a key role. Indeed, cardiac dysfunctions have been reported in patients affected by all types of MPS, although early and evident symptoms have been mainly reported for those with MPS I, II, and VI. In particular, cardiac valve thickening, dysfunction (more severe for left-sided than for right-sided valves), and hypertrophy are commonly present, but conduction abnormalities, coronary artery and other vascular involvement have been also observed in these patients. Reported cardiac causes of death include heart failure, sudden death from arrhythmias (including complete atrioventricular block) and coronary occlusion. While cardiac involvement has been well established for most of MPS types, there is a lack of information about cardiac disorders in MPS IIIB.

MPS IIIB is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the gene encoding for the enzyme α -N-acetylglucosaminidase (NAGLU) required for the heparan sulfate (HS) degradation. Patients with MPS IIIB are characterized by profound mental retardation, behavioral problems and death usually in the second decade, along with somatic manifestations that are highly variable among the different phenotypes. In order to get more insights into the cardiac involvement in MPS IIIB disease, in this study we used the murine model of the disease obtained by *NAGLU*

gene disruption (NAGLU knockout mice, NAGLU^{-/-}). These mice exhibit a massive increase of HS deposition in liver and kidney, and at a lesser extent in lung, spleen, thymus, and heart. The only GAG accumulated in NAGLU^{-/-} mouse tissues is represented by HS due to the specific enzymatic defect that characterizes MPS IIIB disease from other MPS syndromes in which accumulation of GAGs is mixed. Here, we investigated cardiac morphology and function in NAGLU^{-/-} mice compared to wild-type (WT) littermates over time using cardiac ultrasound, and histological and biochemical methodologies. As defects in lysosomal autophagy pathway were found in the murine models of MPS IIIA and MPS VI, we also investigated the autophagic process in the heart tissues of NAGLU^{-/-} mice, in order to explore the hypothesis that an abnormal lysosomal autophagic activity might be responsible for cardiac dysfunctions in MPS IIIB.

Echocardiographic analysis showed a marked increase in left ventricular (LV) mass, reduced cardiac function and valvular defects in NAGLU^{-/-} mice as compared to wild-type littermates. The NAGLU^{-/-} mice exhibited a significant increase in aortic and mitral annulus dimension with a progressive elongation and thickening of anterior mitral valve leaflet. A severe mitral regurgitation with reduction in mitral inflow E-wave-to-A-wave ratio was observed in 32 week old NAGLU^{-/-} mice. Compared to WT mice, NAGLU^{-/-} mice exhibited a significantly lower survival with increased mortality observed in particular after 25 weeks of age. Histopathological analysis revealed a significant increase of myocardial fiber vacuolization, accumulation of HS in the myocardial vacuoles, recruitment of inflammatory cells and collagen deposition within the myocardium, and an increase of LV fibrosis in NAGLU^{-/-} mice compared to WT mice. Biochemical analysis of heart samples from affected mice showed increased expression levels of cardiac failure hallmarks such as calcium/calmodulin dependent protein kinase II, connexin43, α -smooth muscle actin, α -actinin, atrial and brain natriuretic peptides, and myosin heavy polypeptide 7. Furthermore, heart samples from NAGLU^{-/-} mice showed enhanced expression of the lysosome-associated membrane protein-2 (LAMP2), and the autophagic markers Beclin1 and LC3 isoform II (LC3-II).

Overall, our findings demonstrate that NAGLU^{-/-} mice develop heart disease, valvular abnormalities and cardiac failure associated to an impaired lysosomal autophagic activity.

Recently, it was reported that diastolic LV function and contraction synchrony were normalized after laronidase treatment in a patient with MPS I. Therapeutic efforts are under way for MPS IIIA patients, including intratechal ERT and gene therapy. On the light of our results on cardiac impairment in MPS IIIB mice, we suggest that it would be interesting to investigate the effect of current therapies on the cardiac function also in MPS IIIB patients.

SOMMARIO

Le mucopolisaccaridosi (MPS) sono malattie metaboliche ereditarie causate dall'assenza o malfunzionamento degli enzimi lisosomiali coinvolti nel metabolismo dei glicosaminoglicani (GAG). L'accumulo di tali sostanze negli organi dei pazienti affetti ne provoca alterazioni strutturali e funzionali. I pazienti presentano ritardo psicomotorio e disturbi del comportamento che si manifestano a partire dal 1°-4° anno di età. Malgrado notevoli progressi siano stati raggiunti nel trattamento delle MPS mediante l'impiego della terapia di sostituzione enzimatica o il trapianto di cellule staminali ematopoietiche, i pazienti affetti sopravvivono raramente oltre la seconda decade di vita a causa dell'insorgenza di problemi cardiovascolari. Essi, infatti, presentano disordini cardiaci che comprendono alterazioni strutturali e funzionali delle valvole cardiache, aortica e mitralica, dello stesso muscolo cardiaco e delle arterie coronariche. Sia l'insorgenza sia la gravità dei sintomi cardiaci dipendono dal tipo di MPS: i bambini affetti da MPS I mostrano i sintomi più precoci e più severi di disordini cardiaci, mentre nei pazienti affetti da MPS VII tali sintomi appaiono evidenti solo all'aumentare dell'età. Alterazioni morfo-funzionali del cuore sono state ampiamente descritte per vari tipi di MPS, tra cui la MPS I, II e VII, mentre poco è noto sul coinvolgimento cardiaco nei pazienti MPS III.

Le MPS III comprendono 4 distinte malattie (A, B, C, D) dovute all'assenza di enzimi lisosomiali coinvolti nella degradazione dell'eparan solfato (HS) ed, in particolare, la MPS IIIB (Sanfilippo tipo B) è caratterizzata dalla mancanza dell'enzima α -N-acetilglucosaminidasi (NAGLU). I pazienti MPS IIIB presentano un grave ritardo mentale, disturbi comportamentali e manifestazioni somatiche variabili a seconda del fenotipo. Pochi studi riportano problemi cardiaci nei pazienti affetti da MPS IIIB. Questo lavoro di tesi è stato quindi rivolto allo studio delle alterazioni strutturali e funzionali del cuore associate alla MPS IIIB, mediante l'impiego del modello murino della malattia ottenuto dalla delezione del gene *NAGLU* (topi *NAGLU*^{-/-}).

I topi NAGLU^{-/-} esibiscono un accumulo massivo di HS nel fegato, nei reni nei polmoni, timo, milza e cuore. L'unico tipo di GAG accumulato negli organi dei topi è rappresentato da HS a causa dello specifico difetto enzimatico che distingue la MPS IIIB dalle altre MPS in cui si può avere accumulo di GAG differenti. In questo studio, è stata analizzata la morfologia e la funzionalità cardiaca dei topi NAGLU^{-/-}, comparandola a quella di topi di controllo (WT), mediante l'utilizzo di metodiche ad ultrasuoni, metodologie istochimiche e biochimiche.

Le indagini ecocardiografiche hanno mostrato un significativo aumento delle dimensioni del cuore, della massa del ventricolo sinistro, una ridotta funzionalità cardiaca e difetti valvolari nei topi NAGLU^{-/-} rispetto ai topi WT. I topi NAGLU^{-/-} esibivano un significativo incremento delle dimensioni dell'annulus aortico e mitralico accompagnato da un progressivo allungamento ed ispessimento del foglietto anteriore della valvola mitrale. Gli animali affetti a 32 settimane di età presentavano una grave insufficienza mitralica con una riduzione del rapporto E/A del flusso transmitralico. Tali risultati indicano che le alterazioni strutturali delle valvole causano disfunzione sia diastolica che sistolica nei topi NAGLU^{-/-}. Lo studio della sopravvivenza dei topi ha dimostrato un incremento della mortalità dei topi NAGLU^{-/-} alla 25esima settimana di età rispetto ai topi WT.

Analisi istopatologiche effettuate su sezioni di cuore prelevati dai topi sacrificati hanno mostrato un significativo incremento della vacuolizzazione delle fibre miocardiche, la presenza di un maggior numero di infiltrati infiammatori, un aumento della deposizione di collagene nel miocardio ed un aumento della fibrosi nel ventricolo sinistro nei topi NAGLU^{-/-} rispetto ai topi WT.

I risultati morfologici e funzionali sono stati confermati mediante l'analisi biochimica dei livelli di espressione di alcuni marcatori di insufficienza cardiaca nei tessuti cardiaci dei topi affetti e dei topi sani. In particolare, nei campioni di cuore dei topi NAGLU^{-/-} sono stati riscontrati aumentati livelli di proteina chinasi calcio/calmodulina dipendente di tipo II,

connessina 43, α -actina del muscolo liscio, α -actinina, dei peptidi natriuretici atriale e cerebrale, e del polipeptide 7 della catena pesante della miosina.

Studi recenti hanno messo in evidenza la presenza di anomalie del processo di autofagia in alcuni modelli di malattie da accumulo lisosomiale; in questo studio, pertanto, è stato verificata l'ipotesi che un'alterazione dell'autofagia potesse essere responsabile delle disfunzioni cardiache osservate nei topi $NAGLU^{-/-}$. Analisi biochimiche dei campioni di cuore dei topi hanno dimostrato un incremento nei topi $NAGLU^{-/-}$ rispetto ai topi WT dei livelli di espressione della proteina LAMP2, componente essenziale della membrana lisosomiale che sembra avere un ruolo nella fusione dell'autofagosoma-lisosoma, e delle proteine Beclin 1 e LC3II, segnali di autofagia.

In conclusione, i risultati di questo lavoro di tesi dimostrano che i topi $NAGLU^{-/-}$ sviluppano anomalie valvolari e insufficienza cardiaca probabilmente associati ad un'alterazione dell'attività autofagica lisosomiale.

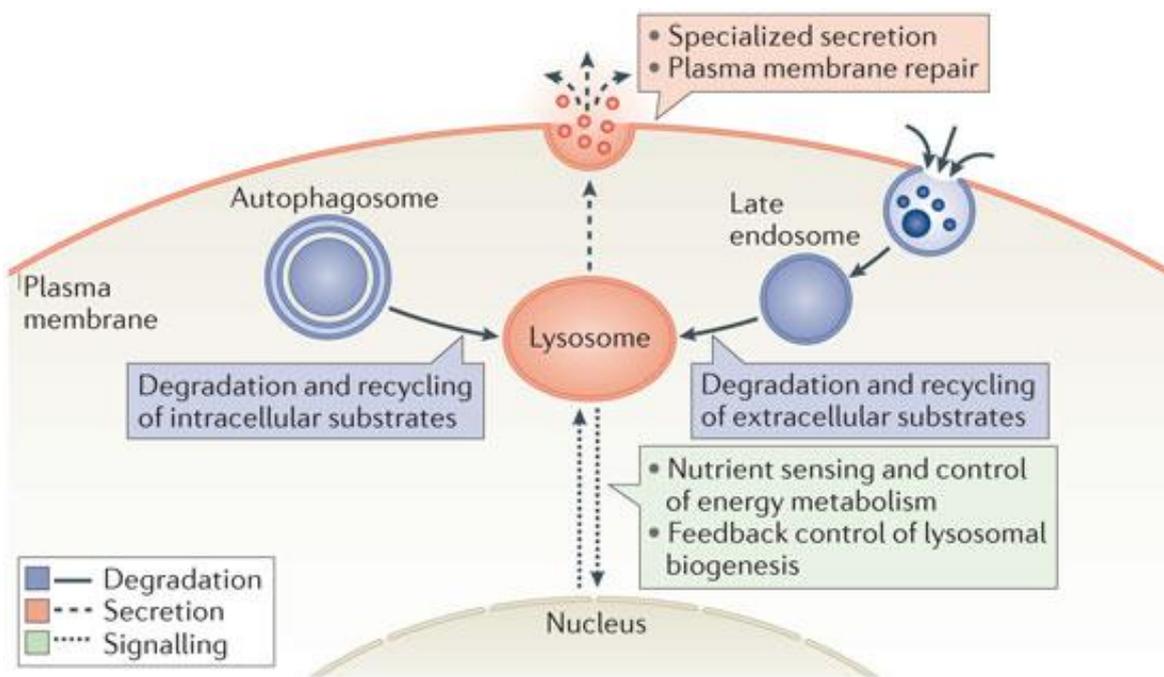
INTRODUZIONE

I lisosomi e le malattie da accumulo lisosomiale

I lisosomi, scoperti negli anni '50 dal citologo belga Christian René de Duve, sono organelli subcellulari deputati alla digestione di macromolecole, materiale cellulare di scarto e microorganismi. Ciascun lisosoma è delimitato da una membrana che mantiene l'ambiente acido all'interno del lisosoma tramite una pompa protonica. I lisosomi contengono una varietà di enzimi idrolitici, quali proteasi, nucleasi, glicosidasi, lipasi, fosforilasi, fosfatasi e solfatasi, che demoliscono le macromolecole biologiche (proteine, acidi nucleici e polisaccaridi). Tali enzimi sono attivi solo nell'ambiente acido del lisosoma; la dipendenza dal pH acido degli enzimi protegge la cellula dall'auto-degradazione nel caso di perdite o rottura del lisosoma, in quanto il pH della cellula è neutro o leggermente basico.

Gli enzimi lisosomiali sono sintetizzati nel reticolo endoplasmatico e vengono rilasciati dall'apparato del Golgi in piccole vescicole che possono essere destinate ai lisosomi, agli endosomi o alla membrana plasmatica (de Duve, 1983). I lisosomi si fondono con vescicole derivanti da tre processi: endocitosi, auto-fagocitosi e fagocitosi. Nell'endocitosi, le macromolecole extracellulari vengono inglobate dalla cellula formando vescicole legate alla membrana chiamate endosomi che si fondono con i lisosomi. L'autofagocitosi è il processo mediante cui organelli vecchi e parti cellulari mal funzionanti vengono rimossi dalla cellula, avvolti da una membrana interna che poi si fonde con i lisosomi. La fagocitosi è effettuata da cellule specializzate (i.e., macrofagi) che inglobano grosse particelle extracellulari, quali cellule morte o ospiti estranei (i.e., batteri) e le indirizzano alla degradazione lisosomiale. Molti prodotti della digestione lisosomiale, quali amminoacidi e nucleotidi, vengono riutilizzati dalla cellula per la sintesi di nuovi componenti. In Figura 1 è schematizzata l'attività del lisosoma nella cellula.

Figura 1



Schema dell'attività dei lisosomi nella cellula. (da Luzio et al.: Nature Reviews Molecular Cell Biology 8: 622-63, 2007. doi:10.1038/nrm2217).

Mutazioni genetiche che causano l'assenza o il malfunzionamento degli enzimi lisosomiali causano patologie note come malattie da accumulo lisosomiale (LSD) (Neufeld, 1991). In tali malattie, il normale metabolismo di specifiche macromolecole si blocca, con conseguente accumulo delle macromolecole nei lisosomi. L'accumulo intra-lisosomiale di metaboliti non degradati provoca un ingrossamento dei lisosomi che interferisce con le normali funzioni cellulari sino alla morte della cellula stessa (Vellodi, 2005). Malgrado l'ipotesi della citotossicità dei lisosomi ingrossati sia considerata la causa primaria della patogenesi delle LSD, tuttavia, studi più recenti hanno messo in luce nuovi meccanismi per spiegare gli eventi patogenetici della malattia.

Il lisosoma è parte integrante del più ampio sistema endosoma/lisosoma strettamente connesso ai sistemi ubiquitina-proteosoma ed autofagosoma, che insieme contribuiscono ai processi cellulari di degradazione e riutilizzo di substrati, regolazione omeostatica e trasduzione di segnali (Settembre et al., 2008; Walkley, 2009). Interferenze con la cascata di segnali e i processi di recupero controllati dal sistema endosoma/lisosoma rappresentano meccanismi critici da cui dipende la complessità tipica dei disordini lisosomiali.

Le LSD comprendono un gruppo di oltre 40 malattie ereditarie che presenta un ampio spettro di disabilità fisiche e mentali e, spesso, morte prematura. La maggior parte delle LSD sono caratterizzate dal coinvolgimento di tutti gli organi, benché la patologia neuronale sia particolarmente frequente e riguarda i due terzi di tutte le malattie lisosomiali (Hoffmann and Mayatepek, 2005). Le LSD hanno un'incidenza di circa 1/8000 nati vivi (Klein and Futerman 2013), tuttavia, sono considerate malattie rare. Esse si trasmettono in genere con modalità autosomica recessiva, ad eccezione di due casi (malattia di Fabry e mucopolisaccaridosi di tipo II) in cui la trasmissione è recessiva legata al cromosoma X.

Le LSD comprendono: le mucopolisaccaridosi (MPS) caratterizzate da difetti nella degradazione dei mucopolisaccaridi (glicosoaminoglicani); le sfingolipidosi (glicolipidosi), in cui mancano gli enzimi per la degradazione delle sfingomieline, dei cerebrosidi e dei

gangliosidi, tutti componenti delle cellule nervose; oligosaccaridosi, in cui mancano gli enzimi per il metabolismo degli zuccheri a catena corta e delle proteine a loro legate (glicoproteine); malattie legate al mancato trasporto all'interno dei lisosomi di sostanze che dovrebbero essere degradate; malattie legate al mancato trasporto all'interno dei lisosomi degli enzimi lisosomiali; malattie legate a deficit di enzimi lisosomiali specifici per singole molecole, quale ad esempio la malattia di Pompe in cui manca la maltasi acida che è deputata alla degradazione del glicogeno.

I glicosamminoglicani e loro catabolismo

I glicosamminoglicani (GAG) costituiscono una classe di carboidrati complessi che interagiscono con un ampio spettro di proteine coinvolte in numerosi processi fisiologici e patologici. Essi sono anche noti come “mucopolisaccaridi” per le loro proprietà viscoso e lubrificanti. Queste molecole sono presenti sulla superficie di tutte le cellule nella matrice extracellulare ed alcune di esse si legano e regolano l'attività di numerose proteine tra cui chemochine, fattori di crescita, morfogeni, enzimi e molecole di adesione (Gandhi and Mancera, 2008). Le principali proprietà dei GAG sono riportati in Tabella I.

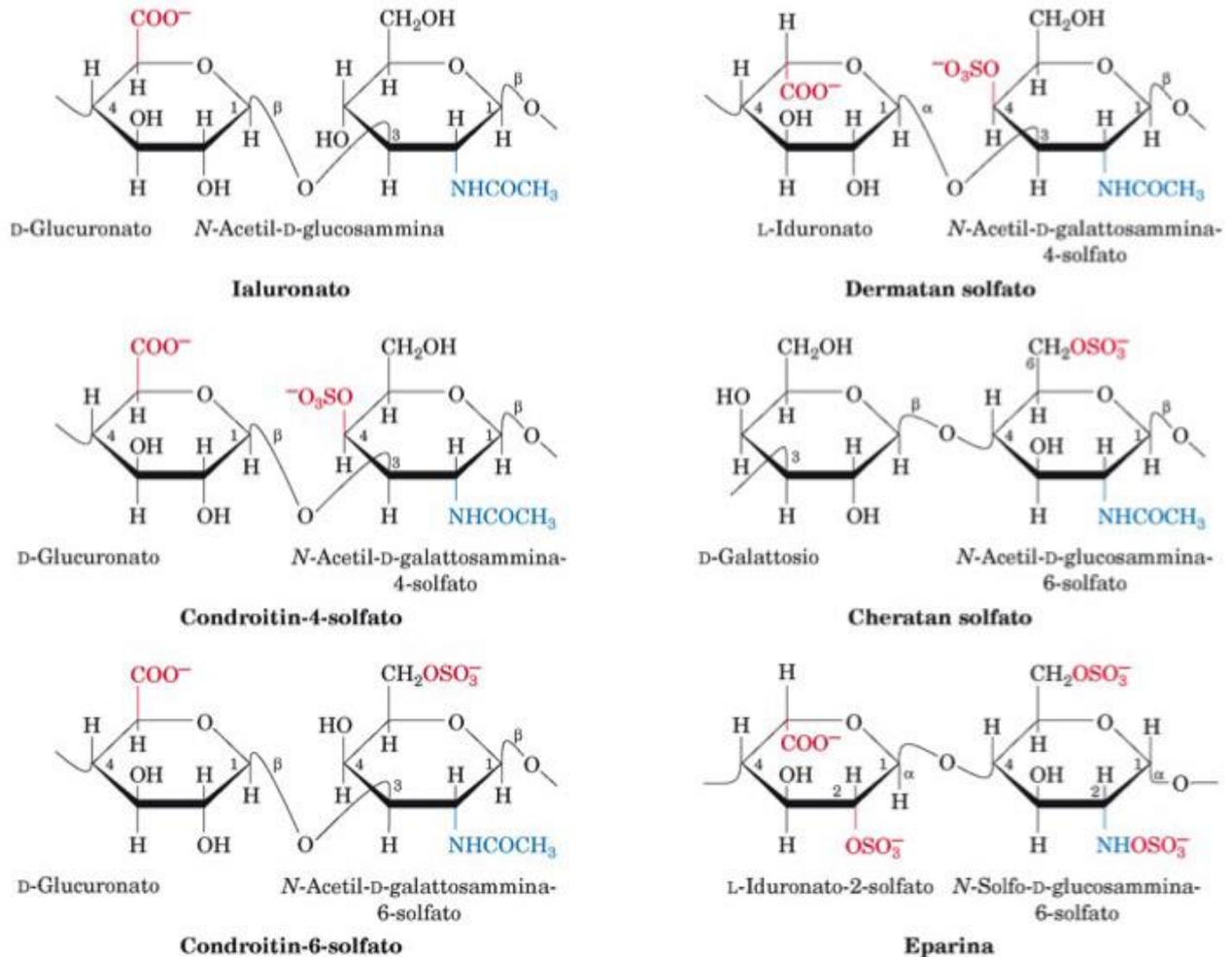
I GAG sono polisaccaridi lineari, solfati, carichi negativamente con un peso molecolare variabile tra 10 e 100 kDa. Si distinguono due tipi di GAG: non solfati, quali l'acido ialuronico, e solfati che comprendono condroitina solfato, cheratan solfato, dermatan solfato, eparan solfato e eparina. Ogni singola catena polisaccaridica è formata da unità disaccaridiche fondamentali, rappresentate da un'esosamina (glucosamina o galattosamina) e da un acido uronico (glucuronico o iduronico), ad eccezione del cheratan solfato in cui l'acido uronico è sostituito da un esoso (galattosio). I GAG, in base alla natura dei residui di esosamine, sono classificati in due gruppi: 1) glucosaminoglicani, acido ialuronico (HA), cheratan solfato (KS), eparan solfato (HS) ed eparina; 2) galattosaminoglicani, condroitin solfato (CS) e dermatan solfato (DS) (Figura 2).

Tabella I

Proprietà chimico-fisiche dei GAG	Carichi negativamente, viscosi, lubrificanti, contengono unità disaccaridiche ripetute, legano grandi quantità di acqua, bassa compressibilità
Classificazione dei GAG	Condroitin solfato, cheratan solfato, dermatan solfato, ialuronato, eparina ed eparan solfato
Funzioni dei GAG	Adesione cellulare, proliferazione cellulare e differenziamento, trasduzione di segnali, anticoagulazione

Proprietà chimico-fisiche, classificazione e funzioni dei GAG.

Figura 2



Strutture di alcuni galattosamminoglicani e glucosaminoglicani. (da D. Voet - C.W. Pratt -J.G. Voet, Fondamenti di Biochimica, Zanichelli editore s.p.a., 2013)

Nei GAG, le unità disaccaridiche sono formate da monosaccaridi uniti tra loro con un legame glicosidico che si forma tra il gruppo ossidrilico del carbonio anomero (C-1) di un acido uronico e il gruppo ossidrilico di una esosamina. Le unità disaccaridiche sono associate tra loro da un legame glicosidico costituendo lunghe catene di GAG. L'elevata varietà di queste macromolecole è determinata dalla presenza di gruppi solfato sugli atomi di carbonio 4 e 6 dell'ammino zucchero o sull'azoto non acetilato; tuttavia, lo scheletro polisaccaridico dei GAG può essere solfatato a varie posizioni. I GAG differiscono anche nella geometria del legame glicosidico (α o β). In virtù dell'alto contenuto di gruppi carbossilici ($-\text{COO}^-$) e dei gruppi solfati ($-\text{OSO}_3^-$) che a pH fisiologico sono deprotonati, i GAG presentano un'alta densità di cariche negative.

In natura tutte le catene dei GAG, ad eccezione, di HA sono legati covalentemente ad una proteina formando i proteoglicani. Il legame dei GAG alla proteina coinvolge uno specifico trisaccaride composto di due residui di galattosio e un residuo di xilosio. Tali residui saccaridici sono legati alla proteina tramite un legame O-glicosidico a un residuo di serina della proteina.

Tutte le cellule producono proteoglicani, li secernano nella matrice extracellulare, li inseriscono nella membrana plasmatica o li conservano in granuli secretori. Esempi di proteoglicani sono l'aggrecano che si trova nella cartilagine e il versicano che è presente in molti tessuti adulti incluso la pelle ed i vasi sanguigni. Alcuni proteoglicani, quale ad esempio sindecano-1, sono strutture ibride che contengono sia HS sia CS. I proteoglicani presentano un'elevata affinità per vari ligandi, tra cui fattori di crescita, molecole di adesione, componenti della matrice, enzimi ed inibitori enzimatici (Raman et al., 2005).

Il catabolismo dei GAG è catalizzato dagli enzimi idrolitici lisosomiali con un meccanismo finemente regolato (Ernst et al., 1995). La maggior parte dei frammenti e dei monosaccaridi generati dalla degradazione lisosomiale dei GAG rientra nelle vie biosintetiche cellulari. Gli enzimi che degradano i GAG sono substrato-specifici, in quanto la loro attività

dipende dalla stereoisomeria dello zucchero, dal tipo di legame glicosidico, dal profilo di sostituzione idrossilica della catena e dal pH del compartimento lisosomiale. La prima classe di questi enzimi è costituita da esoglicosidasi che catalizzano la liberazione dello specifico monosaccaride all'estremità non riducente della catena oligosaccaridica. Le endoglicosidasi idrolizzano, invece, specifiche sequenze glucidiche all'interno del biopolimero generando frammenti di circa 10 kDa. Al processo idrolitico cooperano anche le solfatasi, le esosaminidasi e le glucuronidasi. In Tabella II sono riportati alcuni enzimi responsabili del catabolismo dei GAG.

Le mucopolisaccaridosi

Le mucopolisaccaridosi (MPS) sono un gruppo di malattie lisosomiali causate dalla mancanza di uno degli 11 enzimi necessari alla degradazione dei GAG (Neufeld and Muenzer, 2001). I GAG parzialmente o non degradati si accumulano nei lisosomi e vengono eliminati tramite le urine.

Le MPS sono malattie a trasmissione autosomica recessiva, ad eccezione della MPS II che presenta un'ereditarietà di tipo X-linked recessiva. La MPS I (sindrome di Hurler) è causata dal deficit dell'enzima α -L-iduronidasi (IDUA) che provoca l'accumulo lisosomiale di HS e DS; l'accumulo degli stessi metaboliti si ritrova nella MPS II (sindrome di Hunter), causata dall'assenza dell'enzima iduronato-2-solfatasi (IDS).

La MPS III (sindrome di Sanfilippo) si suddivide in 4 sottotipi, a seconda dell'enzima mancante: MPS IIIA (sindrome di Sanfilippo di tipo A) in cui manca l'enzima eparano-N-solfatasi (SGSH); MPS IIIB (sindrome di Sanfilippo di tipo B) in cui c'è il deficit dell'enzima α -N-acetilglucosaminidasi (NAGLU); MPS IIIC (sindrome di Sanfilippo di tipo C) in cui è assente l'enzima α -glucosaminide N-acetiltrasferasi (HGSNAT); MPS IIID (sindrome di

Sanfilippo di tipo D) carente nell'enzima N-acetilglucosamina 6-solfatasi (GNS). Tutti i sottotipi di MPS III sono caratterizzati dall'accumulo lisosomiale di HS.

Tabella II

<u>Enzima</u>	<u>Reazione</u>
Iduronato-2-solfatasi	Idrolisi del gruppo 2-solfato in L-iduronato di DS e HS
α -iduronidasi	Idrolisi di legami iduronosidici non solfatati in DS
GalNAc-4-solfatasi	Idrolisi del gruppo 4-solfato di GalNAc4S e di GalAGs
GalNAc-6-solfatasi	Idrolisi del gruppo 6-solfato di GalNAc6S (CS) e di D-gal (KS)
β -N-acetil-esosaminidasi	Rimozione di GalNAc4S alla porzione terminale non riducente
β -glucuronidasi	Rimozione dei residui di β -GlcA

Principali enzimi lisosomiali coinvolti nella degradazione dei GAG.

La MPS IV (sindrome di Morquio) si suddivide in due sottotipi: la MPS IVA (sindrome di Morquio di tipo A) dovuta alla carenza dell'enzima N-acetilgalattosamina-6-solfato solfatasi (GALNS) e la MPS IVB (sindrome di Morquio di tipo B) derivante dalla carenza di β -galattosidasi (β -GAL); in entrambi i sottotipi i prodotti di accumulo lisosomiale sono il CS e il DS. La MPS VI (sindrome di Maroteaux-Lamy) è causata dalla mancanza dell'enzima N-acetilglucosamina-4-solfatasi (arilsolfatasi B, ARSB), il cui gene codifica per un enzima della degradazione del DS. La MPS VII (sindrome di Sly), in cui si riscontra l'accumulo lisosomiale di HS e DS, è provocata dalla mancanza dell'enzima β -D-glucuronidasi (GUSB). Infine, la MPS X, di più recente identificazione, è causata dal deficit dell'enzima ialuronidasi (HYAL1) ed è caratterizzata da accumulo lisosomiale di acido ialuronico, l'unico GAG che non è solfatato (Tabella III).

Le MPS si manifestano con un fenotipo clinico, variabile sia nella gravità sia nella progressione, che comprende malformazioni scheletriche, caratteristiche dismorfiche del viso, organomegalia e difetti motori e neurologici. In alcune forme, come la MPS I, la MPS II e tutti i sottotipi della MPS III il ritardo mentale è il principale sintomo clinico ed è associato ad una grave disabilità. Le alterazioni scheletriche sono, invece, tipiche della MPS IV e della MPS VI.

Al fine di chiarire la patogenesi delle MPS sono stati effettuati numerosi studi *in vivo* sui modelli animali disponibili (Haskins, 2007). Come per altre malattie da accumulo lisosomiale, anche per le MPS evidenze sperimentali supportano il coinvolgimento di meccanismi associati all'infiammazione (Archer et al., 2014). È stato, infatti, dimostrato un aumento dell'espressione di numerose proteine coinvolte nell'infiammazione, soprattutto citochine e proteasi nei modelli animali di MPS I, MPS VI e MPS VII (Simonaro et al., 2005, 2008, 2010; Ma et al., 2008; Richard et al., 2008; Metcalf et al., 2010). Il risultato della iperregolazione di tali geni/proteine causa alterazioni strutturali del tessuto connettivo/cartilagineo che provocano anomalie scheletriche ed articolari.

Tabella III

Disordine	Enzima deficitario	Mucopolisaccaride accumulato
MPS I (Sindrome di Hurler)	α -L-Iduronidasi	HS, DS
MPS II (Sindrome di Hunter)	Iduronato-2-solfatasi	HS, DS
MPS IIIA (Sindrome di Sanfilippo A)	Eparano-N-solfatasi	HS
MPS IIIB (Sindrome di Sanfilippo B)	α -N-acetilglucosaminidasi	HS
MPS IIIC (Sindrome di Sanfilippo C)	α -Glucosaminide N-acetiltrasferasi	HS
MPS IIID (Sindrome di Sanfilippo D)	N-acetilglucosamina-6-solfatasi	HS
MPS IVA (Sindrome di Morquio A)	N-acetilgalattosamina-6-solfato solfatasi	KS, C6S
MPS IVB (Sindrome di Morquio B)	β -Galattosidasi	KS
MPS VI (Sindrome Maroteaux-Lamy)	N-acetilgalattosamina-4-solfatasi	DS, C4S
MPS VII (Sindrome di Sly)	β -D-Glucuronidasi	HS, DS, C4S, C6S
MPS IX	Ialuronidasi	HA

Classificazione delle MPS in funzione dell'enzima mancante e del prodotto di accumulo lisosomiale.

Nel caso delle MPS VI e VII l'iper-regolazione di proteine infiammatorie sembra essere correlata all'attivazione dei meccanismi di trasduzione di segnali mediati dal recettore Toll-like 4 (TLR4) (Simonaro et al., 2010).

Studi rivolti alla comprensione della patogenesi neuronale della MPS IIIB hanno dimostrato che il processo infiammatorio causa l'attivazione della microglia e degli astrociti con conseguente secrezione di citochine e chemochine neurotossiche (Ohmi et al., 2003; Villani et al., 2007).

Alterazioni dei livelli di espressione e/o dell'attività del fattore di crescita dei fibroblasti 2 (FGF2) e delle neurotropine sono state dimostrate *in vitro* (Pan et al., 2005) ed *in vivo* (Richard et al., 2008) nella MPS I e MPS VII, mentre alterazioni nei livelli di espressione di marcatori di stress ossidativo sono stati osservati nei pazienti MPS I e II (Pereira et al., 2008; Hamano et al., 2008) e nel modello murino di MPS I (Reolon et al., 2009). E' stata, infine, recentemente dimostrata un'alterazione del processo di autofagia, provocata dalla mancata fusione tra autofagosomi e lisosomi, nei modelli murini di MPS IIIA ed MPS VI, oltre che nella patologia da deficit multiplo di solfatasi (MSD) (Settembre et al., 2008; Tessitore et al., 2009; Ballabio et al., 2009).

Le opzioni terapeutiche al momento disponibili per le MPS presentano un'efficacia clinica variabile (Hollak, 2014). Esse comprendono: la terapia enzimatica sostitutiva per la MPS I, II, IVA e VI, che, però, non risolve i difetti neurologici a causa dell'incapacità degli enzimi di attraversare la barriera ematoencefalica; il trapianto di cellule staminali ematopoietiche che è risultato efficiente solo per la MPS I in pazienti senza gravi danni neurologici; la terapia di riduzione del substrato mediante genisteina; la terapia genica ancora in fase di studio su un numero limitato di pazienti MPS IIIA e IIIB. Infine si sta valutando anche l'impiego della combinazione di più approcci terapeutici e in Tabella IV sono riportate e terapie attualmente disponibili per i vari tipi di MPS.

Tabella IV

Mucopolysaccharidosis type I	Laronidase	ERT	Genzyme Europe B.V.
Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome)	Iduronate-2-sulfatase	ERT	Shire HGT
	Recombinant human insulin receptor monoclonal antibody-fused iduronate 2-sulfatase	ERT	Voisin Consulting S.A.R.L.
Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome)	Genistein sodium salt dihydrate	SRT	Axcentua Pharmaceuticals
Mucopolysaccharidosis type IIIB (Sanfilippo B syndrome)	Adeno-associated viral vector serotype 9 containing the human N-acetylglucosaminidase alpha gene	Gene therapy	Laboratorios del Dr. Esteve, S.A.
	Recombinant human alpha-N-acetylglucosaminidase	ERT	Synageva BioPharma
Mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo A syndrome)	Adeno-associated viral vector serotype 9 containing the human sulfamidase gene	Gene therapy	Laboratorios del Dr. Esteve, S.A.
	Adenovirus-associated viral vector serotype 10 carrying the human N-sulfoglucosamine sulfohydrolase and sulfatase modifying factor 1 cDNAs	Gene therapy	LY SOGENE
	Recombinant human heparan N-sulfatase	ERT	Shire HGT
Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A syndrome)	N-terminal hexaglutamine-tagged recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase	ERT	Dr. Ulrich Granzer
	Recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	ERT	BioMarin Europe
Mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy syndrome)	N-acetylgalactosamine-4-sulfatase	ERT	BioMarin Europe
	Adeno-associated viral vector containing the human <i>ARSB</i> gene	Gene therapy	Fondazione Telethon
Mucopolysaccharidosis type VII (Sly syndrome)	Recombinant human beta-glucuronidase	ERT	NDA Regulatory Science

Terapie attualmente disponibili per i vari tipi di MPS. (da Chaplin et al., *J Inherit Metab Dis.* 37(4):587-98.)

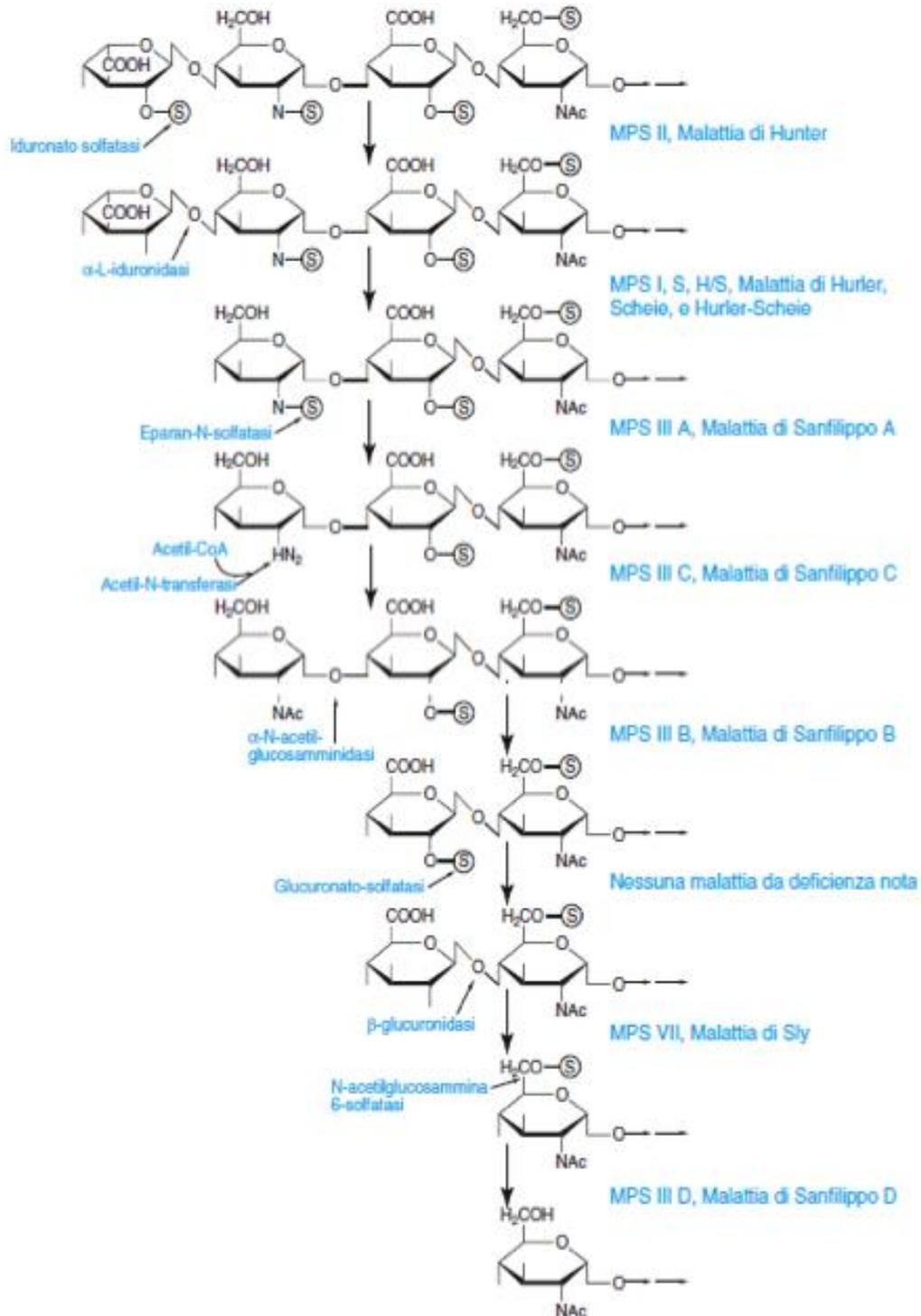
La mucopolisaccaridosi IIIB

La mucopolisaccaridosi IIIB è un sottotipo della MPS III causata da mutazioni nel gene codificante per l'enzima lisosomiale NAGLU coinvolto nella degradazione dell'HS (Figura 3).

Il gene *NAGLU* si estende per 8.2 Kb dal sito di inizio al sito di poliadenilazione, con 6 esoni le cui dimensioni variano da 86 bp a 1452 bp. Il cDNA codifica per una proteina di 720 amminoacidi che ha 6 potenziali siti di N-glicosilazione (Zhao et al., 1996; Weber et al., 1996). La proteina NAGLU è stata purificata dalla placenta (Weber et al., 1996), dal fegato (Sasaki et al., 1991) e dalle urine (Salvatore et al., 1984); la sua biosintesi e maturazione è stata studiata nei fibroblasti cutanei (von Figura et al., 1984) e nelle cellule di carcinoma umano (Di Natale et al., 1985). La massa molecolare è di 80-86 kDa per la molecola precursore, 77 kDa per la forma intermedia e 73 kDa per la forma matura.

La MPS IIIB ha un'incidenza di 1 su 235.000 nati vivi (Meikle et al., 1999) ed è caratterizzata, dal punto di vista clinico, da manifestazioni somatiche relativamente lievi e da severi disordini neurologici. L'esordio della sintomatologia clinica avviene fra 2 e 6 anni di età. I bambini, affetti alla nascita, sembrano apparentemente normali, ma le loro condizioni peggiorano progressivamente ed essi sviluppano gravi manifestazioni neurologiche che comprendono iperattività, comportamento aggressivo, disordini del sonno e rapido deterioramento delle capacità sociali ed adattative (Neufeld and Muenzer, 2001). Le anomalie neuropsichiatriche si suddividono in tre fasi (Cleary and Wraith, 1993; Bax and Colville, 1995): i bambini affetti mostrano nel periodo 1-4 anni di età solo ritardo dello sviluppo, dai 4 anni in poi si aggiungono gravi disturbi comportamentali ed, infine, deterioramento fisico e perdita della forza. L'aspettativa di vita per i soggetti affetti dalla forma grave della malattia è al massimo fino all'adolescenza, benché una maggiore sopravvivenza caratterizzi i pazienti affetti da forme più lievi.

Figura 3



Sequenza delle tappe di degradazione dell' eparan solfato. (da Siliprandi & Tettamanti, Biochimica Medica, Piccin editore, IV edizione, 2011)

Non esiste attualmente una terapia efficace per il trattamento della MPS IIIB, malgrado numerosi studi sperimentali siano stati effettuati e siano tuttora in corso. Sui topi MPS IIIB è stata valutata l'efficacia della terapia enzimatica sostitutiva con scarsi risultati soprattutto nella correzione dei difetti neuronali a causa dell'impossibilità dell'enzima ricombinante di superare la barriera ematoencefalica (Yu et al., 2000). Sono stati effettuati studi di terapia genica ed in particolare il gruppo di ricerca della Prof.ssa Di Natale è stato il primo a dimostrare l'efficacia dell'iniezione intravenosa di un vettore lentivirale contenente il gene *NAGLU* nei topi MPS IIIB: con una singola iniezione di tale vettore si è ottenuta l'espressione del transgene nel fegato, milza, polmone e cuore dei topi trattati, con il recupero dell'attività enzimatica e la riduzione del contenuto dei GAG in tali organi già dopo un mese di trattamento (Di Natale et al., 2005). L'iniezione intracranica dello stesso vettore lentivirale-*NAGLU* ha dimostrato ha la capacità di migliorare le performance comportamentali dei topi MPS IIIB (Di Domenico et al., 2009). Altri studi hanno dimostrato l'efficacia dell'utilizzo dei vettori adenovirali per alleviare la sintomatologia della malattia nel modello murino (Heldermon et al., 2010; Fu et al., 2010).

La terapia di riduzione del substrato, ottenuta mediante trattamento con genisteina, è ancora in fase sperimentale per la MPS IIIB: mentre le prime prove non hanno riportato miglioramenti visibili, più di recente, la somministrazione di alte dosi di genisteina per 9 mesi ai topi MPS IIIB sembra ridurre in maniera significativa l'accumulo lisosomiale dei GAG e la neuro-infiammazione nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo dei topi MPS IIIB (Malinowska et al., 2010). Studi, tuttavia, sono in corso per l'individuazione di approcci terapeutici innovativi di maggiore efficacia per la MPS IIIB.

Il modello murino della mucopolisaccaridosi IIIB

Per la MPS IIIB, come per le altre MPS, è disponibile un modello murino della malattia, ottenuto mutando l'esone 6 del gene *NAGLU* (Li et al., 1999): un frammento di

852bp dell'esone 6 è stato sostituito da una cassetta di espressione contenente il gene della Neomicina (NEO). I topi *NAGLU*^{-/-} nei primi mesi di vita sembrano in apparenza normali e sono generalmente sani; sia i maschi sia le femmine sono fertili almeno fino al sesto mese di età e sopravvivono fino a 8-12 mesi di vita. Man mano che invecchiano, i topi diventano visibilmente malati, con perdita di peso, peli arruffati, ulcerazioni della pelle intorno agli organi genitali e presentano difficoltà nel camminare. I GAG si accumulano nel modello murino soprattutto nel fegato, nel rene, nel polmone, nella milza, nel timo, nel cuore e nel cervello dove si riscontra anche un accumulo di gangliosidi GM2 e GM3. In tutti gli organi, ma soprattutto nel cervello, le cellule che accumulano maggiormente i GAG sono quelle del sistema fagocitario. Già a 33 giorni dalla nascita si ritrovano macrofagi vacuolati in molti organi, quali milza, fegato, linfonodi, rene, polmone, pelle e cervello. I neuroni appaiono gravemente affetti e si osservano vari tipi di lesioni soprattutto nel cervelletto, nella maggior parte delle cellule di Purkinje e nei nuclei cerebellari contenenti uno o più inclusioni visibili con la colorazione ematossilina/eosina e di Shiff. Il modello murino della MPS IIIB presenta deficit sensoriali e comportamentali simili a quelli dei pazienti umani (Heldermon et al., 2007). La malattia nel topo presenta un decorso cronico e progressivo simile a quello della malattia lisosomiale umana e, pertanto, esso rappresenta un ottimo modello sia per studi volti a chiarire i meccanismi della patogenesi della malattia sia per studi volti a verificare l'efficacia di nuove terapie per il trattamento della MPS IIIB.

SCOPO DELLA TESI

Le mucopolisaccaridosi (MPS) sono malattie da accumulo lisosomiale caratterizzate dall'assenza di uno degli enzimi lisosomiali che agiscono nella sequenza delle reazioni cataboliche dei glicosaminoglicani (GAG). I soggetti affetti da uno di tali rari disordini metabolici presentano un accumulo progressivo di GAG non completamente degradati in tutti gli organi, benché la distribuzione vari a seconda della specifica malattia (Wraight, 1995). L'accumulo dei GAG parzialmente degradati che coinvolge progressivamente i vari organi provoca una cascata di eventi che produce il classico fenotipo osservato in queste malattie. Tipiche manifestazioni delle MPS comprendono bassa statura, deformazioni scheletriche, caratteristiche dismorfiche cranio-facciali, coinvolgimento del sistema nervoso centrale (ritardo mentale, compressione della spina dorsale e aumento della pressione intracranica), disordini del sistema visivo (degenerazione della retina, annebbiamento della cornea, cecità) e uditivo, difficoltà respiratorie, patologie gastrointestinali (epatosplenomegalia) e ombelicali, ed ernia inguinale (Garcia et al., 2010; Lachman et al. 2010; Ferrari et al., 2011).

L'accumulo dei GAG nel cuore dei pazienti MPS provoca disfunzioni cardiache (Braunlin et al., 2011). Disordini cardiaci sono stati descritti per quasi tutti i tipi di MPS, tuttavia, l'insorgenza e l'entità del coinvolgimento cardiaco, variano a seconda del tipo di MPS. I pazienti MPS I, MPS II e MPS VI mostrano i sintomi più precoci e più frequenti (Dangel, 1998; Neufeld and Muenzer 2001; Mohan et al., 2002; Chen et al., 2005; Fesslova et al., 2009; Leal et al., 2010), mentre disfunzioni cardiache in pazienti con MPS VII si manifestano solo in età adulta (Mohan et al., 2002). Le manifestazioni cliniche e la severità dei disordini cardiaci dipende dal tipo di MPS, dalla specifica mutazione genetica coinvolta (Matte et al., 2003; Karageorgos et al., 2007) e dalla biologia individuale del paziente, oltre che da fattori non ben definiti a cui è associata la varietà dei fenotipi delle MPS. Disfunzioni delle valvole cardiache (mitralica e aortica), del muscolo stesso del cuore e delle arterie

coronarie sono state documentate nei pazienti MPS (Mohan et al., 2002; Brands et al., 2013). Tutte le MPS, tuttavia, sono associate a mortalità precoce. Compromissioni respiratorie e disfunzioni cardiache sono le cause principali della morte prematura dei pazienti MPS non trattati (Chen et al., 2005; Jones et al., 2009). I disordini cardiaci responsabili della morte di tali soggetti comprendono anche l'infarto, la morte improvvisa dovuta ad aritmie, e l'occlusione coronarica (Hishitani et al., 2000; Lin et al., 2003; Martins et al., 2009).

Le terapie attualmente disponibili per il trattamento delle MPS, quali ad esempio la terapia enzimatica sostitutiva o il trapianto di cellule staminali ematopoietiche, hanno dimostrato la capacità di rallentare la progressione della malattia ed, in taluni casi, di migliorare la funzionalità cardiaca, sebbene ulteriori studi siano necessari, sia ai fini di una migliore comprensione della patologia cardiaca nei soggetti MPS, sia per valutare l'efficacia di nuovi approcci terapeutici.

L'obiettivo di questa tesi ha riguardato lo studio della patologia cardiaca nella MPS IIIB mediante l'utilizzo del modello murino della malattia ottenuto dalla delezione del gene *NAGLU* (topi *NAGLU* knockout, *NAGLU*^{-/-}) (Li et al., 1999). Questi topi mostrano un aumento massivo di deposizione di eparan solfato (HS) in diversi organi rispetto ai topi non affetti. In particolare, in questo studio abbiamo analizzato la funzionalità cardiaca dei topi *NAGLU*^{-/-} a partire dalla 16esima settimana post-natale fino alla 32esima settimana di età utilizzando metodiche ad ultrasuoni (ecocardiografia e Doppler) confrontandola con quella di topi non affetti (WT). Nel corso dello studio abbiamo anche valutato la mortalità dei topi affetti rispetto ai topi sani.

In secondo luogo, allo scopo di verificare la presenza di alterazioni strutturali del cuore dei topi *NAGLU*^{-/-} sono state effettuate analisi istologiche ed analisi biochimiche su campioni di cuore prelevati dai topi sacrificati. In particolare, è stata valutata la morfologia del miocardio dei topi affetti confrontandola con quella dei topi sani, come pure è stata analizzata la presenza di depositi di HS nei vacuoli, di infiltrati infiammatori, di collagene e

fibrosi nel tessuto cardiaco dei topi NAGLU^{-/-}. I risultati istologici sono stati ulteriormente validati da indagini biochimiche volte a valutare i livelli di espressione di biomarcatori di insufficienza cardiaca nei topi affetti.

Sulla base di precedenti osservazioni che dimostravano alterazioni del sistema autofagico nei modelli murini di MPS IIIA e MPS VI (Settembre et al., 2008; Tessitore et al., 2009), seppure non in tessuti cardiaci, abbiamo investigato la possibilità che anomalie del sistema autofagico-lisosomiale possano essere associate alle disfunzioni cardiache osservate nei topi MPS IIIB. Abbiamo, pertanto, valutato l'attività autofagica lisosomiale nei tessuti cardiaci dei topi affetti e sani, misurando i livelli di espressione di LAMP2, proteina di membrana associata al lisosoma (Bandyopadhyay et al., 2008), Beclin-1, proteina coinvolta nella prima fase dell'autofagia (Salminen et al., 2013) e dell'isoforma II di LC3 (LC3-II) proteina associata all'autofagosoma (Kaminsky et al., 2012).

I risultati ottenuti hanno fornito per la prima volta un quadro completo delle disfunzioni cardiache associate alla MPS IIIB e contribuito al chiarimento dei meccanismi molecolari responsabili dei disordini cardiaci nei pazienti affetti. Essi possono essere utili ai fini di una più attenta valutazione degli eventuali interventi terapeutici per il trattamento della MPS IIIB.

MATERIALI E METODI

Animali

Topi C57/BL6 (WT, n=30) acquistati dalla Jackson Laboratory e topi NAGLU knockout (NAGLU^{-/-}, n=30), gentilmente forniti dalla Prof. Paola Di Natale, sono stati allevati presso il Centro di Biotecnologie dell'AORN Cardarelli di Napoli. Essi sono stati mantenuti in condizioni identiche di temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), umidità ($60 \pm 5\%$) e ciclo luce/buio, con libero accesso al cibo e all'acqua. La sperimentazione sugli animali è stata effettuata in conformità alle Linee guida per la cura e l'uso di animali da laboratorio pubblicati dal "National Institutes of Health" (NIH Publication No. 85-23, riveduta nel 1996), ed è stata approvata dalla Commissione per la Salute degli Animali del Centro di Biotecnologie dell'AORN Cardarelli di Napoli. Per gli studi ecocardiografici, i topi (WT, n=15, NAGLU^{-/-}, n=15) sono stati anestetizzati con un'iniezione intraperitoneale (i.p.) di tiletamina (5 ml/kg), zolazepam (5 ml/kg) (Zoletil 100) e xilazina (5 mg/Kg) (Sigma-Aldrich), al fine di minimizzare ogni sofferenza. Per le indagini istologiche e biochimiche, subito dopo l'analisi ecocardiografica, i topi sono stati anestetizzati con una iniezione ulteriore i.p. dei farmaci di cui sopra, e poi sacrificati mediante dislocazione cervicale in conformità con le raccomandazioni contenute nelle Linee guida dell' "American Veterinary Medical Association" (AVMA) per l'eutanasia degli animali. I cuori sono stati raccolti e trattati come descritto di seguito.

Per lo studio della sopravvivenza, le condizioni di salute dei topi sono state monitorate ogni giorno alle ore 12.00 per un periodo di 32 settimane dalla nascita. Durante il periodo di monitoraggio, i topi che mostravano i sintomi clinici dello stadio avanzato della malattia, quali ritenzione urinaria, prolasso rettale e curvatura della colonna vertebrale, sono stati anestetizzati e sacrificati per dislocazione cervicale in conformità alle raccomandazioni contenute nelle Linee guida dell' AVMA. I topi di controllo WT sono stati osservati fino al raggiungimento degli 8 mesi di età.

Genotipizzazione dei topi NAGLU^{-/-}

I topi sono stati genotipizzati secondo la procedura descritta dal gruppo di ricerca della prof.ssa Di Natale (Di Natale et al., 2005). In breve, è stata effettuata un'analisi di PCR su campioni di DNA genomico estratti dalla coda dei topi 1 mese dopo la nascita. Le PCR sono state eseguite in un volume totale di 100 µl contenenti 500 ng di DNA stampo, tampone 1X PerkinElmer, 0,2 mM di ciascun dNTP, 2,5 unità di Taq polimerasi e due serie dei seguenti primers (0,5 mM ciascuno): (i) MXXDe1F, a partire dalla posizione 6773 del gene murino NAGLU, numero di accesso GeneBank AF003255 (5'-GCTCCTACTCAGAAGTGTCTACAACCTGCTC-3'), e MXXDe1R, primer antisenso a partire dalla posizione 7279 (5'-GAGGCTGGTAGTAATCAGCCACCAGTCCTG-3'). L'amplificazione produce un frammento di 537 bp in presenza dell'allele normale, nessuna banda in presenza dell'allele mutante; (ii) Neo1F, primer senso a partire dalla posizione 202 del gene per la Neomicina (5'-GTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCG-3'), e M7R, primer antisenso a partire dalla posizione 7454 del gene murino NAGLU (5'-GAGGAAGATCTTCTTGGAGAGGTCCACGGTG-3'). L'amplificazione non produce nessuna banda in presenza dell'allele normale, ma produce una banda di 1200 bp in presenza dell'allele mutante. I cicli termici utilizzati nel programma della PCR sono stati i seguenti: 96°C per 5 min, 35 cicli a 95°C per 45 s, 64°C per 35 s e 72°C per 2 min.

Ecocardiografia transtoracica

La funzione cardiaca degli animali MPS IIIB è stata monitorata mediante ecocardiografia transtoracica non invasiva utilizzando il sistema di "imaging" ad alta risoluzione Vevo 2200 (VisualSonics). I topi sono stati anestetizzati come descritto precedentemente e sono stati eseguiti ecocardiogrammi con una scansione RMV-707B 30-MHz. Le dimensioni dell'annulus aortico e mitralico sono state ottenute in proiezione

parasternale asse lungo durante la sistole per le valvole semilunari e nella proiezione apicale quattro camere durante la diastole per le valvole atrioventricolari (Christensen et al., 1997). Le misure della radice aortica sono state ottenute in parasternale asse lungo modificato durante la diastole. Le misure Doppler sono state eseguite sull'afflusso della valvola atrioventricolare in proiezione apicale quattro camere e il deflusso della valvola semilunare nella proiezione parasternale asse lungo per valutare la stenosi e il rigurgito con un volume campione. In alcuni casi, si è resa necessaria una proiezione parasternale asse lungo modificato al fine di garantire l'accertamento della velocità massima. Sono state misurate le dimensioni delle camere cardiache ed è stata valutata la funzione ventricolare mediante immagini bidimensionali M-mode ottenute da proiezioni in asse parasternale corto. Le immagini Doppler sono state ottenute dalla proiezione apicale quattro camere in conformità alle Linee guida (Cheitlin et al., 2003). Tutte le misurazioni sono state effettuate in triplicato.

Analisi istologiche

Campioni di cuore prelevati da topi di 32 settimane (NAGLU^{-/-}, n=5 e WT, n=5) sono stati fissati in formalina al 4% per tutta la notte, disidratati con etanolo, chiarificati in xilolo, inclusi in paraffina e tagliati al microtomo. Sezioni coronali (10 micron di spessore) contenenti entrambi i ventricoli, destro e sinistro, sono stati trattati come descritto in letteratura (Perrino et al., 2013; Pavone et al., 2009). Sezioni sequenziali da ogni cuore sono state colorate con ematossilina ed eosina (H & E) (Sigma-Aldrich) e con acido periodico di Schiff (PAS) - Alcian blu (Dako) per valutare il contenuto di GAG. L'analisi delle immagini è stata eseguita con una fotocamera accoppiata con un microscopio ottico.

Immunoistochimica

Campioni di cuore intero sono stati prelevati da topi NAGLU^{-/-} e WT alla 32esima settimana di età, fissati in formalina acquosa al 4% ed inclusi in paraffina. Sezioni coronali

dello spessore di 10 µm contenenti sia il ventricolo destro che il ventricolo sinistro sono stati processati come precedentemente descritto (Pavone et al., 2009; Perrino et al., 2013). Sezioni seriali di ciascun cuore sono state colorate con ematossilina-eosina (H&E) (Sigma-Aldrich), colorante tricromatico di Masson (Sigma-Aldrich), ed acido periodico di Schiff Alcian blu-PAS (Dako). Tutte le sezioni sono state esaminate con un microscopio (Leitz, DIAPLAN) e le immagini acquisite con una telecamera digitale (Digital JVC, TK-C1380). L'area fibrotica è stata misurata nei tessuti cardiaci dei topi NAGLU^{-/-} e WT (2 sezioni per campione, 6-10 immagini per sezione) usando un sistema computerizzato di analisi di immagini (Image J, USA), ed è stata espressa come percentuale dell'area totale.

Per l'analisi immunohistochimica sono stati usati i seguenti anticorpi alla diluizione indicata: CD3, 1:50 (Dako, clone F7.2.38); CD4, 1:15 (Vision Bio-System, clone IF6); CD8, 1:30 (Dako, clone C8/144B) e CD68, 1:50 (Dako, clone KP-1). Per la localizzazione della proteina 2 di membrana associata ai lisosomi LAMP2 è stato usato l'anticorpo policlonale di coniglio (Santa Cruz). I tessuti, inclusi in paraffina, sono stati tagliati a fettine di 4 µm di spessore, montati su vetrini, deparaffinizzati e poi reidratati. I vetrini sono stati sottoposti ad ebollizione utilizzando un forno a microonde per 12 min in tampone citrato (pH 6) e fissati con l' anticorpo primario tutta la notte. Le sezioni sono state lavate 3 volte con PBS, incubate con l'anticorpo secondario e, successivamente con streptavidina-biotina (LSAB kit; DakoCytomation, Denmark) per 30 min. Dopo l'incubazione le sezioni sono state incubate con streptavidina coniugata a per ossidasi. Lo sviluppo della colorazione è stato ottenuto mediante 3-5 min di trattamento con diaminobenzidina (Dako). Le sezioni sono state contro colorate con ematossilina di Mayer. Nei controlli negativi, l'anticorpo primario è stato omesso o sostituito con siero normale.

Estrazione di RNA, Reverse transcription e Real time PCR

L'RNA totale è stato estratto da campioni di cuore congelati prelevati da topi di 32 settimane di età, utilizzando il TRIzol (Invitrogen), secondo le istruzioni della ditta produttrice.

I campioni sono stati incubati con Trizol (1 ml per pozzetto) per 5 min e cloroformio per 3 min a 30°C e centrifugati a 14.000 rpm per 15 min a 4°C. La fase acquosa ottenuta dalla centrifugazione è stata incubata con isopropanolo per 10 min a 30°C e centrifugata a 14.000 rpm per 10 min a 4°C. Il precipitato di RNA ottenuto è stato lavato con etanolo al 75%, centrifugato a 10.000 rpm per 5 min a 4°C e incubato con acqua sterile per 10 min a 55-60°C. La quantità di RNA estratta è stata misurata mediante spettrofotometro utilizzando i valori di assorbanza a 260 nm. Per valutare il grado di purezza dell'RNA estratto, esso è stato caricato su un gel all'1% di agarosio-formaldeide in condizioni denaturanti. Gli RNA ribosomiali (18S e 28S) apparivano chiaramente risolti indicando una buona qualità dell'RNA estratto.

Il cDNA è stato sintetizzato mediante la metodica della "Reverse Transcriptase" (RT) utilizzando il kit Invitrogen (SUPER SCRIPT III First-strand Synthesis System for RT-PCR), che utilizza esameri "random" per ottenere copie di cDNA della maggior parte degli RNA messaggeri della cellula. Sono stati utilizzati 5 µg di RNA, 1 µl di "random examer" e 1 µl di deossinucleotiditriposfati (dNTPs) 10 mM, in un volume di 10 µl. La miscela è stata incubata a 70°C per 5 min e a 4°C per 5 min. Contemporaneamente è stata preparata una miscela di reazione contenente: 2 µl di tampone RT 10X, 4 µl MgCl₂ 25 mM, 2 µl ditiotreitolo (DTT) 0,1M, 1 µl RNase OUT (40 U/µl), 1 µl SuperScript III RT (200 U/µl). L'RNA è stato aggiunto alla miscela di reazione che è stata incubata per 50 min a 42°C e a 70°C per 15 min. Il cDNA ottenuto è stato messo in ghiaccio. Dopo l'aggiunta di 1 µl di RNasi H, il cDNA è stato incubato a 37°C per 20 min. Il cDNA così ottenuto è stato in parte conservato a -20°C, in parte utilizzato per le reazioni di real-time PCR.

I livelli di mRNA dei marcatori studiati sono stati determinati nei campioni di cDNA provenienti dai tessuti cardiaci dei diversi gruppi sperimentali di topi mediante real-time PCR quantitativa utilizzando un IQ-5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). I primers utilizzati per ciascun marcatore sono stati i seguenti: MYH7: forward 5'-

CGGAAACTGAAAACGGAAAG-3', reverse 5'-TCCTCGATCTTGTCGAACTTG-3'; ANP: forward 5'-CACAGATCTGATGGATTCAAGA-3', reverse 5'-CCTCATCTTCTACCGGCATC-3'; BNP: forward 5'-GTCAGTCGTTTGGGCTGTAAC-3', reverse 5'-AGACCCAGGCAGAGTCAGAA-3'; GAPDH: forward 5'-TGCAGTGGCAAAGTGGAGATT-3', reverse 5'-TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3'. La fase di denaturazione iniziale è stata di 5 min a 95°C, seguita da una fase di amplificazione come di seguito dettagliato: denaturazione a 95°C per 30 s; “annealing” a 60°C per 30 s; polimerizzazione a 72°C per 30 s per 40 cicli.

Estrazione di proteine ed elettroforesi SDS-PAGE

I campioni di ventricolo sinistro di topi NAGLU^{-/-} e di topi WT di 32 settimane di età sono stati lisati in un tampone contenente 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH7,5, 1mM EDTA, 1% v/v NP-40, 0,5% w/v deossicolato, NaF 10mM, sodio pirofosfato 10 mM, 2mM PMSF, 2 mg/ml leupeptina, 2 mg/ml aprotinina. I lisati sono stati incubati in ghiaccio per 15 min, e poi centrifugati a 38000 x g per 30 min a 4°C. Per la determinazione della concentrazione proteica è stato utilizzato il metodo Bradford (1976). Sono state preparate diverse soluzioni a concentrazioni note di albumina di siero bovino (BSA) per ottenere una curva standard di riferimento. Da ciascuna diluizione sono stati prelevati 800 µl a cui sono stati aggiunti 200 µl del reagente colorante di Bradford. Le soluzioni sono state trasferite in cuvette di plastica ed è stata eseguita la lettura allo spettrofotometro (Cary-1, Varian) a 595 nm. La concentrazione proteica del campione è stata determinata utilizzando la curva di taratura della BSA.

I campioni contenenti uguali quantità di proteine totali sono stati bolliti per 5 min in un tampone (“sample buffer”) contenente 50 mmol Tris-HCl, pH 6,8, 2% sodio dodecil solfato (SDS), 10% glicerolo, 0,1% blu di bromofenolo e 5% β-mercaptoetanolo. Successivamente, i campioni sono stati caricati mediante una siringa Hamilton sul gel di poliaccrilammide posto in

una cameretta per elettroforesi (Bio-Rad) ed immersi nel tampone di corsa costituito da 25 mM Tris, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3. I campioni da separare sono stati caricati su un gel di impaccamento (“*stacking gel*”) al 4% di poliacrilammide che ha la funzione di impaccare le proteine contenute in ciascun campione in una sottile banda prima che esse entrino nel gel di separazione (“*running gel*”). Una volta caricati i campioni, la camera elettroforetica è stata collegata ad un alimentatore di corrente elettrica. La corsa elettroforetica è terminata quando il blu di bromofenolo raggiunge il fondo del gel di separazione.

Western blotting

Dopo l'elettroforesi SDS-PAGE, le proteine separate sul gel sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa usando una cameretta di trasferimento “trans-blot” (Bio-Rad). L'avvenuto trasferimento delle bande proteiche è stato visualizzato mediante colorazione per 10 min del filtro di nitrocellulosa con il colorante Rosso Ponceau. Il filtro è stato saturato mediante incubazione per 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione al 5% di latte disidratato in TBS-T 0,1% (150 mmol NaCl, 20 mmol Tris-HCl, pH 7,4, Tween-20 0,1%). Dopo l'incubazione, il filtro è stato lavato in TBS-T ed incubato per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo specifico opportunamente diluito in TBS-T, in presenza di latte disidratato al 2,5%.

L'immunoblotting è stato effettuato utilizzando i seguenti specifici anticorpi: α -actinina (1:1000, monoclonale di topo, Sigma-Aldrich), proteina chinasi II calcio/calmodulina-dipendente (CaMKII) (1:1000, monoclonale di topo, Santa Cruz), connexina 43 (Cx43) (1:500, policlonale di coniglio, Santa Cruz), Beclin 1(BCN1) (1:500, policlonale di coniglio, Santa Cruz), isoforma della proteina LC3 (LC3-II) (policlonale di coniglio, Novus Biologica), LAMP2 (1:500, policlonale di ratto, Pierce), α -actina del muscolo liscio (α -SMA) (1:1000, monoclonale di topo, Sigma-Aldrich), γ -tubulina (1:1000, monoclonale di topo, Sigma-Aldrich).

Successivamente sono stati effettuati lavaggi in TBS-T ed un'incubazione per 1 ora con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi (Amersham Life Sciences Inc), opportunamente diluito in TBS-T, in presenza di latte disidratato al 2,5%. Le proteine specifiche sono state visualizzate mediante il metodo della chemiluminescenza (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) ed esposizione con lastra autoradiografica. Le proteine sono state quantificate mediante densitometria (Chemidoc, Bio-Rad). Ogni esperimento è stato ripetuto separatamente almeno tre volte.

I filtri, una volta visualizzata la proteina mediante ECL, sono stati sottoposti alla procedura di “stripping” per allontanare gli anticorpi primari e secondari usati nel precedente blot permettendo, quindi, l'esecuzione di un nuovo Western blotting sullo stesso filtro al fine di visualizzare una diversa proteina. Lo “stripping” è stato eseguito immergendo il filtro nella soluzione di “stripping” (100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS, 62 mM Tris-HCl, pH 6,8) per 20 min a 50-60°C. Il filtro, successivamente, è stato lavato abbondantemente con una soluzione tampone e sullo stesso è stato effettuato un nuovo Western blotting. La procedura di “stripping” è stata utilizzata per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa per tutti i canali.

Analisi statistica

I dati sperimentali sono stati espressi come media \pm deviazione standard (SD). La significatività statistica tra i gruppi è stata valutata mediante il t student test. Per tutte le analisi, un valore minimo di $p < 0.05$ è stato considerato significativo. Le curve di sopravvivenza degli animali sono state costruite utilizzando le stime di probabilità di Kaplan-Meier. Tutte le analisi sono state eseguite con la versione 5.01 GraphPad Prism (GraphPad Software).

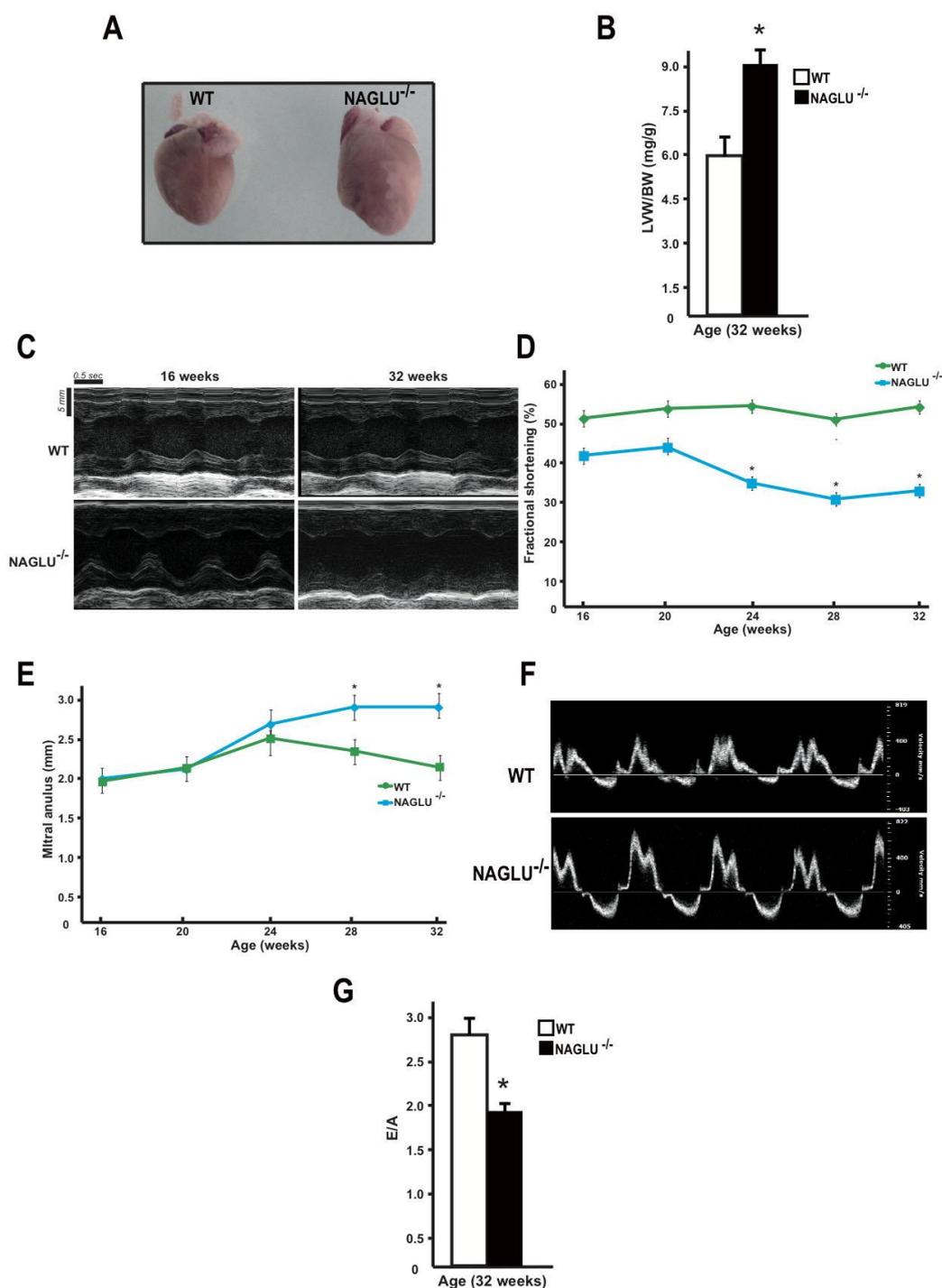
RISULTATI

Ridotta funzionalità cardiaca e difetti valvolari nei topi NAGLU^{-/-}

In questo studio abbiamo analizzato la morfologia del cuore e la funzionalità cardiaca nel modello murino di MPS IIIB, comparandola a quella dei topi non affetti (WT), a partire dalla 16esima settimana fino alla 32esima settimana di età dei topi. In primo luogo, è stato riscontrato un marcato aumento delle dimensioni del cuore (Figura 4A) ed un significativo aumento del rapporto tra il peso del ventricolo sinistro (LVW) ed il peso corporeo (BW) nei topi NAGLU^{-/-} alla 32esima settimana di età rispetto ai topi WT della stessa età (Figura 4B). Abbiamo, quindi, valutato la funzionalità cardiaca dei topi mediante una serie di ecocardiogramma a vari intervalli di età. I risultati ottenuti hanno dimostrato una riduzione della percentuale della frazione di accorciamento (FS) nei topi NAGLU^{-/-} rispetto agli animali WT (Tabella V, Figura 4C). La riduzione della percentuale della frazione di accorciamento (FS) nel ventricolo sinistro, riscontrata a partire dalla 24esima settimana di età, è stata rilevata fino alla 32esima settimana di età (Figura 4D).

L'analisi della morfologia e delle dimensioni delle valvole cardiache effettuata mediante l'esame ecocardiografico ai topi a varie settimane di età non ha evidenziato differenze nelle dimensioni del ventricolo destro e della radice aortica dei topi affetti e dei topi sani. I topi NAGLU^{-/-}, tuttavia, mostravano un incremento significativo rispetto agli animali WT delle dimensioni dell'annulus aortico e mitralico accompagnato da un progressivo allungamento ed ispessimento del lembo della valvola mitralica anteriore (Tabella V, Figura 4E). In accordo con tali risultati, l'analisi Doppler del flusso mitralico ha evidenziato nei topi NAGLU^{-/-} di 32 settimane di età un rilevante getto verso il basso del rigurgito all'orifizio mitralico (Figura 4F). Inoltre, i topi NAGLU^{-/-} presentavano una grave insufficienza mitralica come indicato dalla riduzione del rapporto E/A (Figura 4G).

Figura 4



Caratteristiche morfologiche e funzionali dei cuori dei topi NAGLU^{-/-}. **A.** Aspetto della morfologia del cuore intero dei topi NAGLU^{-/-}. **B.** Istogramma rappresentativo del rapporto tra il peso del ventricolo sinistro (LVW) e il peso corporeo (BW) nei topi WT e NAGLU^{-/-} alla 32esima settimana di età. **C.** Tracciato ecocardiografico M-mode dei topi WT e NAGLU^{-/-} alla 16esima e 32esima settimana di età. **D.** Dati cumulativi della percentuale della frazione di accorciamento (FS) nei topi WT e NAGLU^{-/-} alla 16esima e 32esima settimana di età (*p<0.05 vs. WT). **E.** Dati cumulativi delle dimensioni dell'annulus mitralico (mm) nei topi WT e NAGLU^{-/-} alla 16esima e 32esima settimana di età (*p<0.05 vs. WT). **F.** Analisi Doppler del rigurgito della valvola mitralica dei topi WT e NAGLU^{-/-} alla 16esima e 32esima settimana di età. **G.** Istogramma rappresentativo del rapporto E/A del flusso transmitralico nei topi WT e NAGLU^{-/-} alla 16esima e 32esima settimana di età (*p<0.05 vs. WT).

Tabella V. Parametri morfometrici ed ecocardiografici dei topi WT and NAGLU^{-/-}.

	16 settimane d'età		32 settimane d'età		Variazioni percentuali nel tempo	
	WT (n=15)	NAGLU ^{-/-} (n=15)	WT (n=13)	NAGLU ^{-/-} (n=10)	WT (n=13)	NAGLU ^{-/-} (n=10)
Morfometria						
BW (g)	25.1±0.7	27.2±0.8	35.0±0.2 [†]	33.2±0.4 [†]	+39.8±2.0	+22.5±1.4
LVW (mg)	110.2±5.4	110.1±3.4	210.1±1.5 [†]	300.8±8.8 [†]	+92.5±4.4	+170.9±1.3
LVW/BW (mg/g)	4.4±3.6	4.0±2.5	6.0±1.0 [†]	9.0±1.0 [†]	+38.1±4.4	+121.4±3.2
Ecocardiografici						
LVEDD (mm)	3.3±0.04	3.3±0.04	3.0±0.50	3.6±0.05 [†]	-8.2±1.6	+11.6±5.1
LVESD (mm)	1.6±0.02	1.9±0.13	1.4±0.30	2.5±0.04 [†]	-10.7±4.1	+28.7±9.6
FS (%)	51.6±0.02	42.5±0.03	52.1±0.03	30.5±0.05 [†]	+3.1±3.7	-21.2±5.4
IVSd (mm)	0.9±0.05	0.8±0.13	0.8±0.20	0.9±0.04	-4.6±2.5	+8.6±6.8
PWd (mm)	0.8±0.07	1.0±0.11	1.0±0.20	1.1±0.04	+21.5±6.9	+9.2±6.0
Valvola aortica						
Anulus (mm)	1.47±0.4	1.56±0.3	1.49±0.2	1.77±0.2 [†]	+1.1±0.14	+65.5±7.2
Lunghezza della cuspidi sinistra (mm)	0.8±0.5	1.0±0.2	1.0±0.2	0.7±0.1	-44.2±1.4	-31.1±10.8
Lunghezza della cuspidi destra (mm)	0.5±0.2	0.9±0.1	0.8±0.3	0.9±0.3	+66.1±3.4	+7.5±6.1
Valvola mitralica						
Anulus (mm)	2.01±0.3	1.97±0.2	2.17±0.4	3.23±0.1 [†]	+4.7±1.4	+10.2±8.8
Lunghezza del lembo anteriore (mm)	1.0±0.1	1.4±0.1	1.2±1.1	1.7±0.1 [†]	+12.5±2.9	+29.6±16.7
Lunghezza del lembo posteriore (mm)	1.0±0.1	1.2±0.1	1.0±0.1	1±0.1	-5.4±2.3	-3.9±14.4
E (mm/s)	685.3±100.1	430.5±155.4*	812.8±178.1 [†]	844.2±189.1 [†]	+25.9±11.7	+97.6±3.5
A (mm/s)	476.9±132.3	341.5±165.4*	297.1±167.1 [†]	425.3±156.2 [†]	-36.3±3.7	+29.9±3.6
E/A	1.43	1.26	2.74 [†]	1.98 [†]	+52.5±4.5	+170.9±1.3
HR (bpm)	400±24	440±25	450±20	480±22	+13.4±5.9	+9.8±6.1

Abbreviazioni: BW=peso corporeo; LVW=peso del ventricolo sinistro; LVEDD, diametro del ventricolo sinistro a fine diastole; LVESD=diámetro del ventricolo sinistro a fine sistole; FS=frazione di accorciamento; IVSd=spessore del setto interventricolare in diastole; PWd=spessore della parete posteriore ventricolare sinistra a fine diastole; E=onda E della valvola mitralica; A=onda A della valvola mitralica; HR=frequenza cardiaca; (* $p < 0.05$ vs. topi WT di 16 settimane di età, [†] $p < 0.05$ vs. tutti).

I risultati ottenuti dall'ecocardiogramma e dal Doppler sono stati verificati mediante indagini istologiche su campioni di tessuto cardiaco prelevato dai topi sacrificati alla 32esima settimana di età. L'analisi istologica di tali tessuti ha dimostrato un significativo ispessimento della valvola aortica e della cuspidè mitralica con una ridondanza di tessuto evidenziata mediante colorazione H&E (Figura 5). Tali risultati hanno confermato la presenza di difetti delle valvole aortica e mitralica nei topi NAGLU^{-/-}.

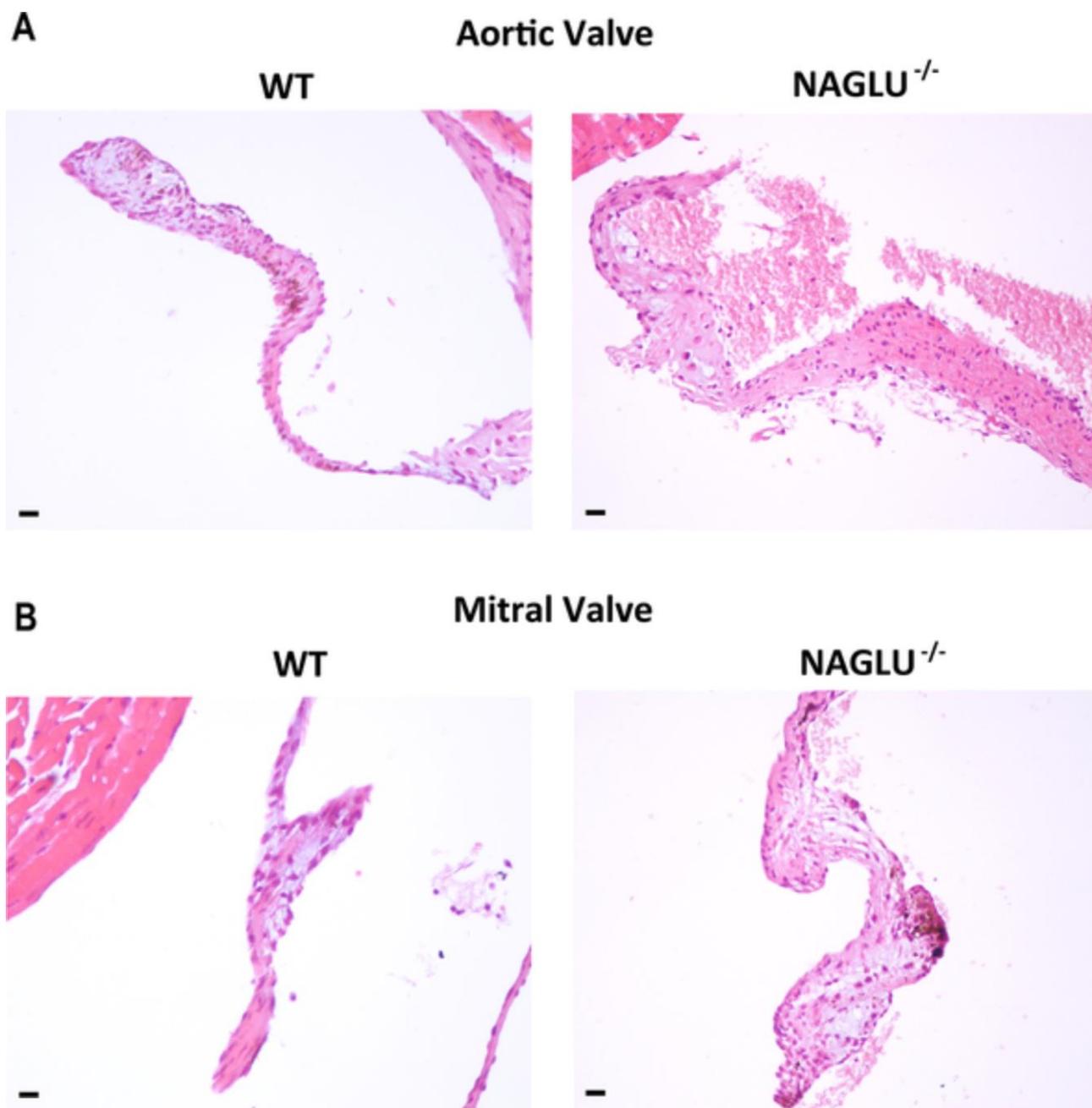
Al fine di stabilire se le disfunzioni strutturali e funzionali osservate nei topi NAGLU^{-/-} influissero sulla durata della vita degli stessi, è stata monitorata la sopravvivenza dei topi affetti e dei topi WT per 35 settimane dopo la nascita. In confronto ai topi WT, i topi NAGLU^{-/-} hanno esibito un incremento della mortalità, in particolare alla 25esima settimana di età (Figura 6). Tali risultati suggeriscono che i topi NAGLU^{-/-} sviluppano disfunzioni cardiache che ne possono influenzare il tasso di sopravvivenza.

Vacuolizzazione, accumulo di HS, infiammazione e fibrosi nel miocardio dei topi NAGLU^{-/-}

Ai fini di una migliore caratterizzazione della patologia cardiaca nel modello murino di MPS IIIB, abbiamo effettuato un'analisi istopatologica di sezioni di miocardio di topi sacrificati alla 32esima settimana di età. I risultati di tale indagine hanno mostrato un aumento significativo della vacuolizzazione delle fibre del miocardio dei topi NAGLU^{-/-} rispetto ai topi WT, come evidenziato tramite colorazione H&E (Figura 7A, pannello a sinistra). La colorazione con Alcian blu-PAS ha, inoltre, evidenziato l'accumulo di HS nei vacuoli delle cellule miocardiche, indicate dalle aree di colore blu, nei topi NAGLU^{-/-} (Figura 7A, pannello a destra).

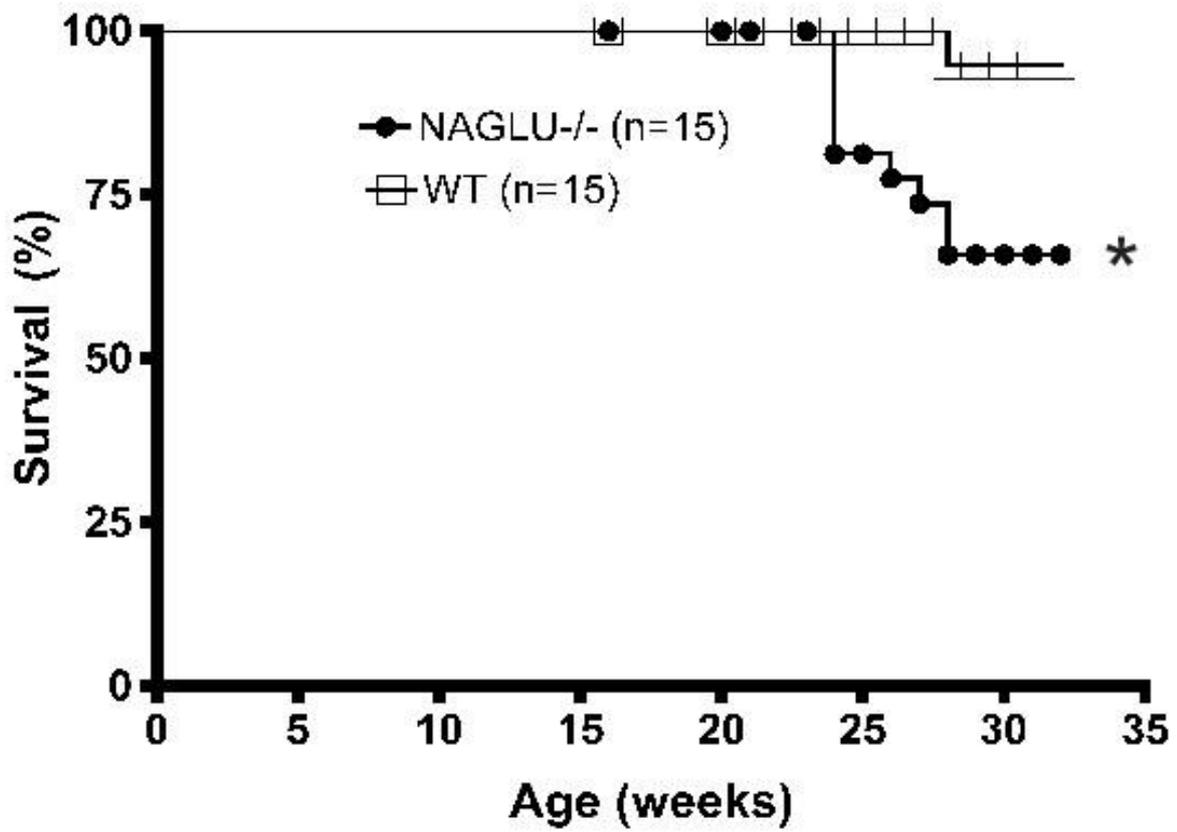
Per valutare la presenza di infiltrati infiammatori e di un eventuale processo fibrotico nel miocardio dei topi affetti, sono state utilizzate sia la colorazione H&E che la colorazione tricromica di Masson. I risultati ottenuti hanno mostrato nel tessuto miocardico dei topi NAGLU^{-/-} la presenza di cellule infiammatorie e di depositi di collagene in quantità significativamente più rilevante rispetto a quella dei topi WT (Figura 7B).

Figura 5



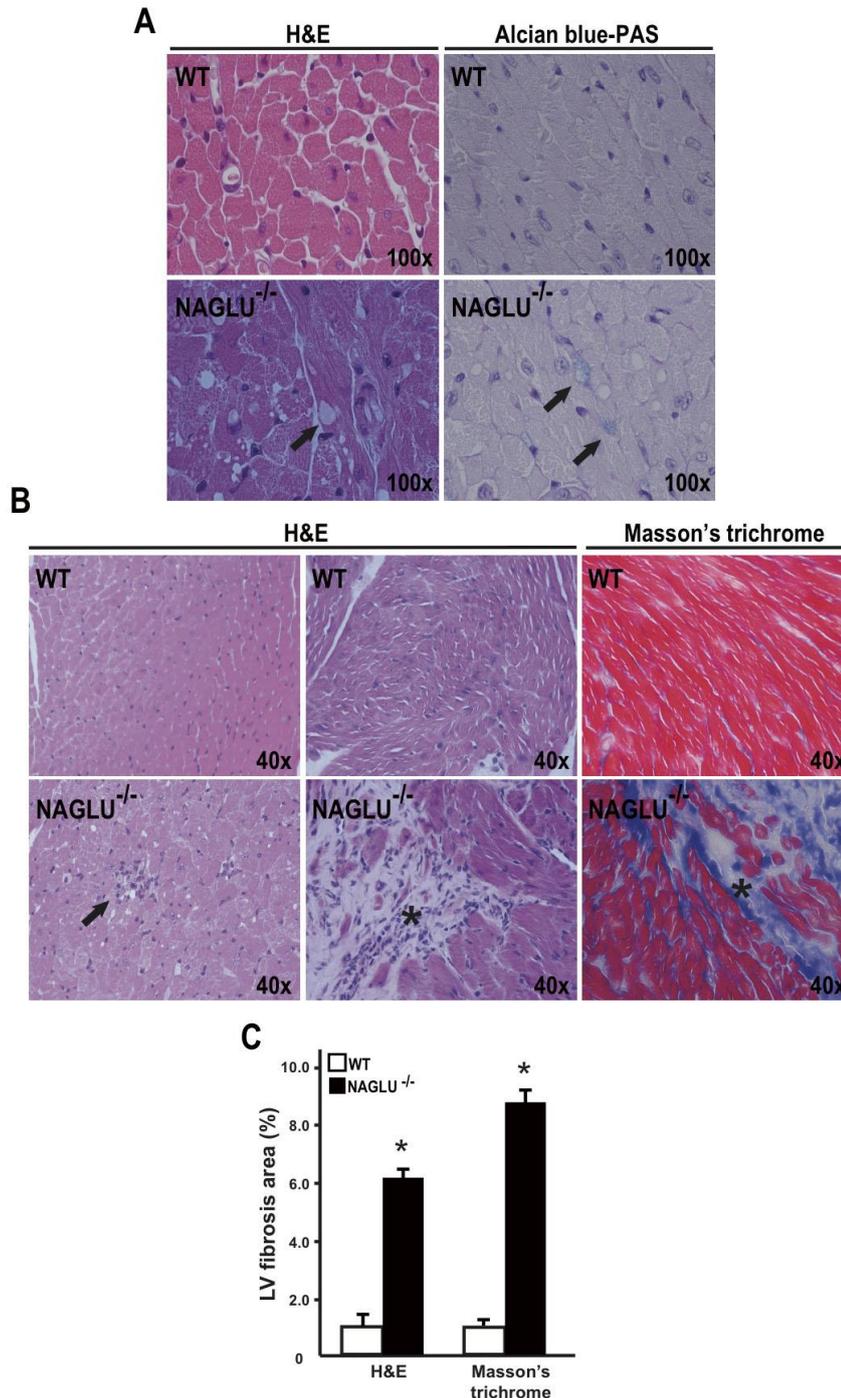
Ispezzimento della valvola aortica e della cuspidè mitralica nei topi NAGLU^{-/-} a 32 settimane di età. A. Analisi istologica mediante colorazione H&E di sezioni della valvola aortica del cuore di topi WT e NAGLU^{-/-} a 32 settimane di età. **B.** Analisi istologica mediante colorazione H&E di sezioni della valvola mitralica del cuore di topi WT e NAGLU^{-/-} a 32 settimane di età. Ingrandimento 20x.

Figura 6



Analisi di sopravvivenza dei topi NAGLU-/- e topi WT con il metodo di Kaplan-Meier. (* $p < 0.05$ vs. WT).

Figura 7



Vacuolizzazione, infiammazione e fibrosi cardiaca nei topi NAGLU^{-/-} rilevata mediante analisi istopatologiche. **A.** Colorazione mediante H&E (pannello a sinistra) and Alcian blue-PAS (pannello a destra) di tessuti di ventricolo sinistro prelevati dai topi WT e NAGLU^{-/-} (ingrandimento 100x). Le frecce indicano i vacuoli presenti nelle fibre miocardiche nel pannello a sinistra (H&E) e l'accumulo di HS nei vacuoli nel pannello a destra (Alcian blue-PAS). **B.** Colorazione H&E (pannello a sinistra e pannello centrale) e colorazione tricromica di Masson (pannello a destra) di tessuti di ventricolo sinistro prelevati dai topi WT e NAGLU^{-/-} (ingrandimento 40x). Le frecce indicano infiltrati infiammatori nelle fibre miocardiche nel pannello a sinistra (H&E); (*) indica sostituzione di tessuto connettivo delle fibre miocardiche. **C.** Dati cumulativi di esperimenti indipendenti volti a valutare l'area fibrotica nel cuore dei topi (*p<0.05 vs WT).

Entrambe le colorazioni hanno dimostrato la presenza di un maggiore numero di aree fibrotiche nel miocardio dei topi affetti rispetto ai topi WT (Figura 7C). Gli infiltrati infiammatori nel tessuto miocardico sono stati anche evidenziati mediante l'impiego di marcatori specifici quali CD3, CD4, CD8 e CD68 (Figura 8).

Aumento dei livelli di espressione di marcatori molecolari di disfunzioni cardiache nei topi NAGLU^{-/-}

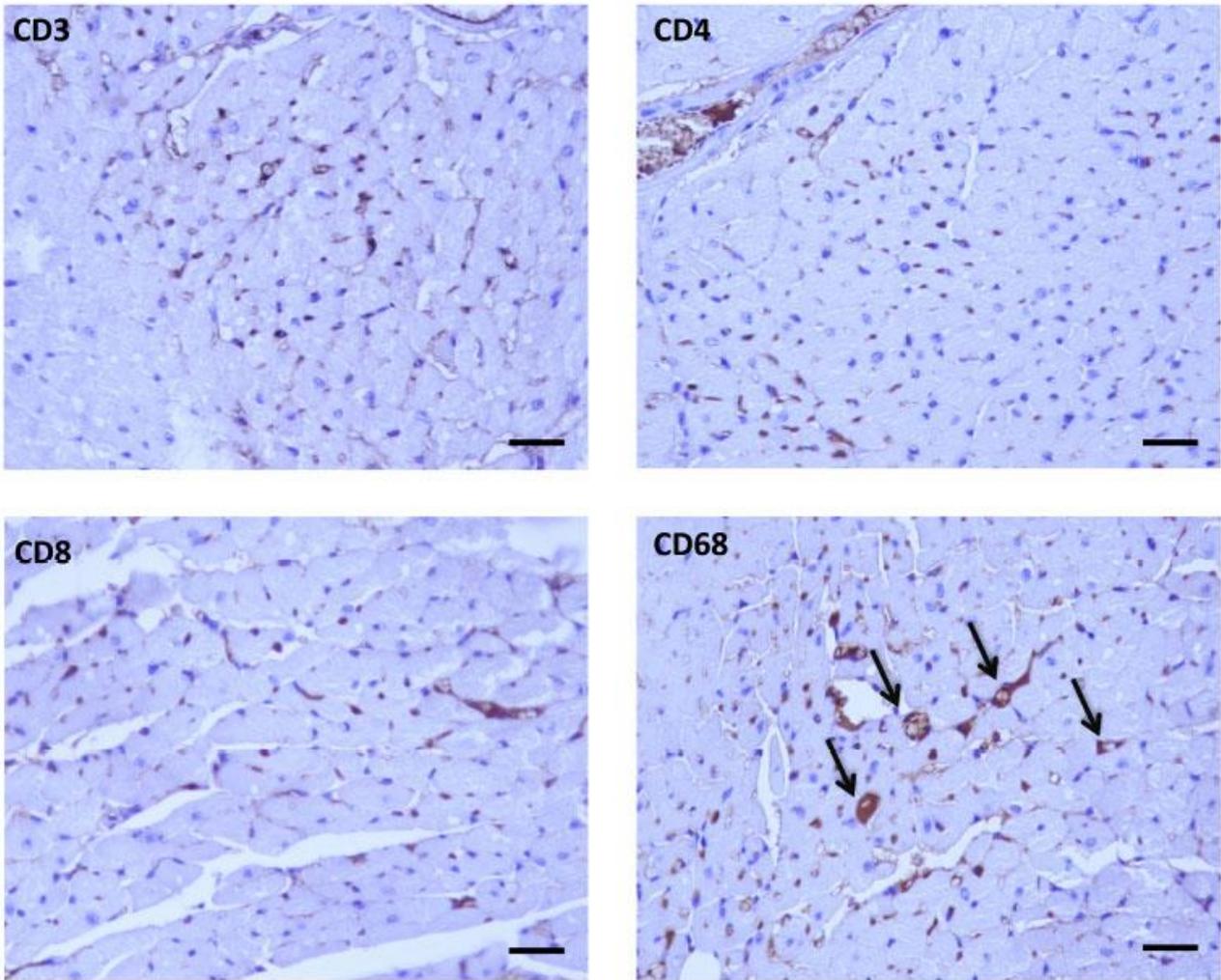
Allo scopo di confermare le alterazioni cardiache strutturali e funzionali riscontrate nel modello murino MPS IIIB, abbiamo effettuato indagini biochimiche sui campioni di tessuto cardiaco dei topi NAGLU^{-/-} e WT volte a misurare i livelli di espressione di proteine generalmente associate a disfunzioni cardiache. I risultati di tali analisi hanno mostrato, innanzitutto, un aumento dell'espressione dei marcatori molecolari di ipertrofia e fibrosi nel tessuto cardiaco dei topi NAGLU^{-/-} rispetto ai topi WT, come risulta dagli aumentati livelli di proteina chinasi II calcio/calmodulina-dipendente (CaMKII) (Mohamed et al., 2012), connexina43 (Cx43) (Severs et al., 2006), α -actinina e α -actina del muscolo liscio (α -SMA) (Pavone et al., 2009) (Figura 9A).

Nei tessuti cardiaci dei topi affetti sono stati, inoltre, riscontrati aumentati livelli di mRNA codificanti per il peptide natriuretico atriale (ANP), il peptide natriuretico cerebrale (BNP) (Sergeeva et al., 2013) e il polipeptide 7 della catena pesante della miosina (MYH7, β -MHC) (Wendel et al., 2000), noti marcatori di disfunzioni cardiache ed infarto (Figura 9B).

Alterazioni del processo autofagico lisosomiale nel cuore di topi NAGLU^{-/-}

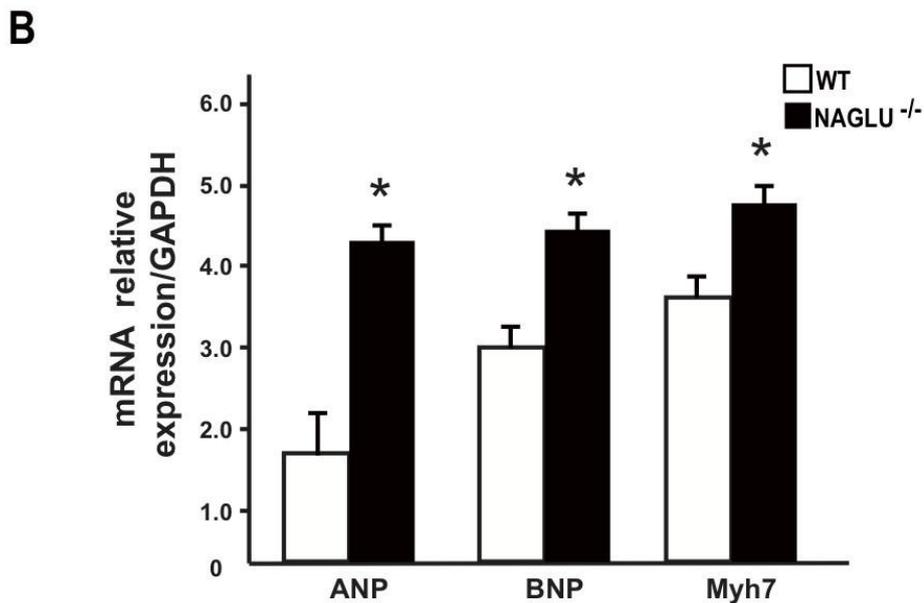
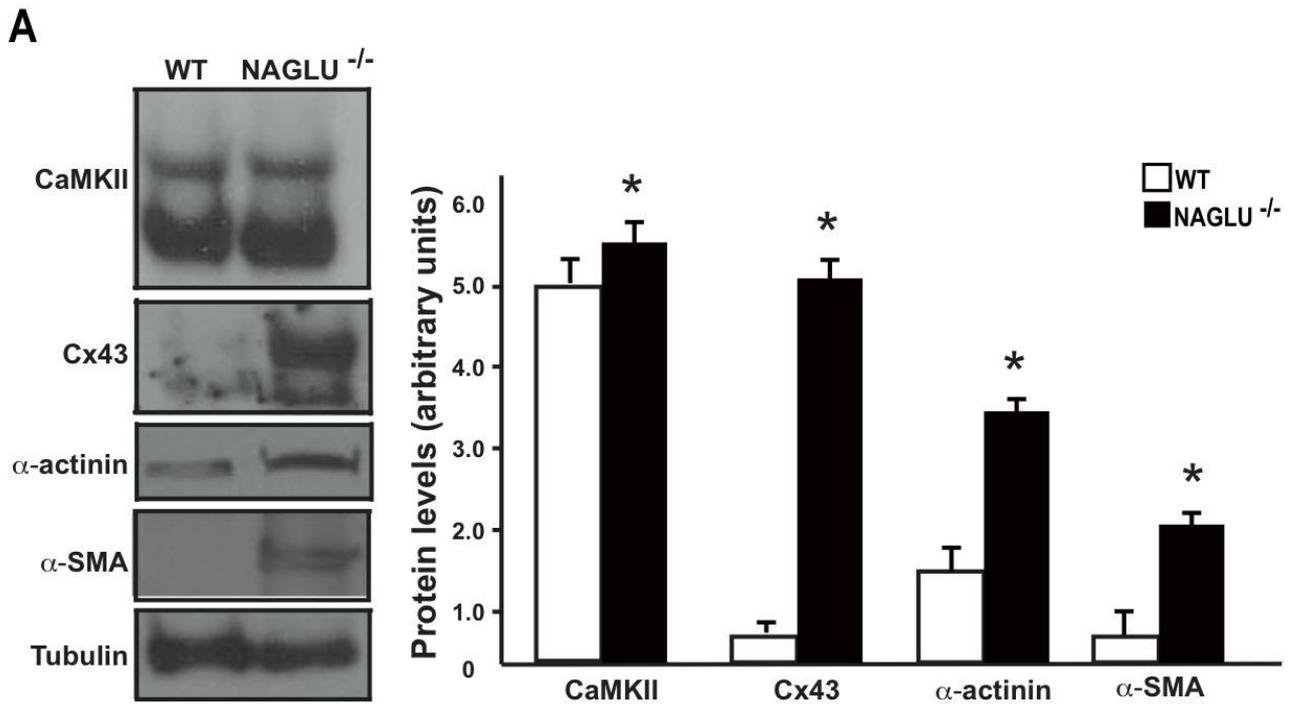
Sebbene alterazioni dell'attività autofagica siano state recentemente considerate tra i meccanismi patogenetici di alcune LSD compreso alcune MPS (Settembre et al., 2008- Tessitore et al., 2009), il processo autofagico, tuttavia, non è stato mai studiato in connessione ai problemi cardiaci nelle MPS.

Figura 8



Immunoistochimica di cellule infiammatorie su sezioni di cuore di topi *NAGLU*^{-/-}. Ingrandimento 40x.

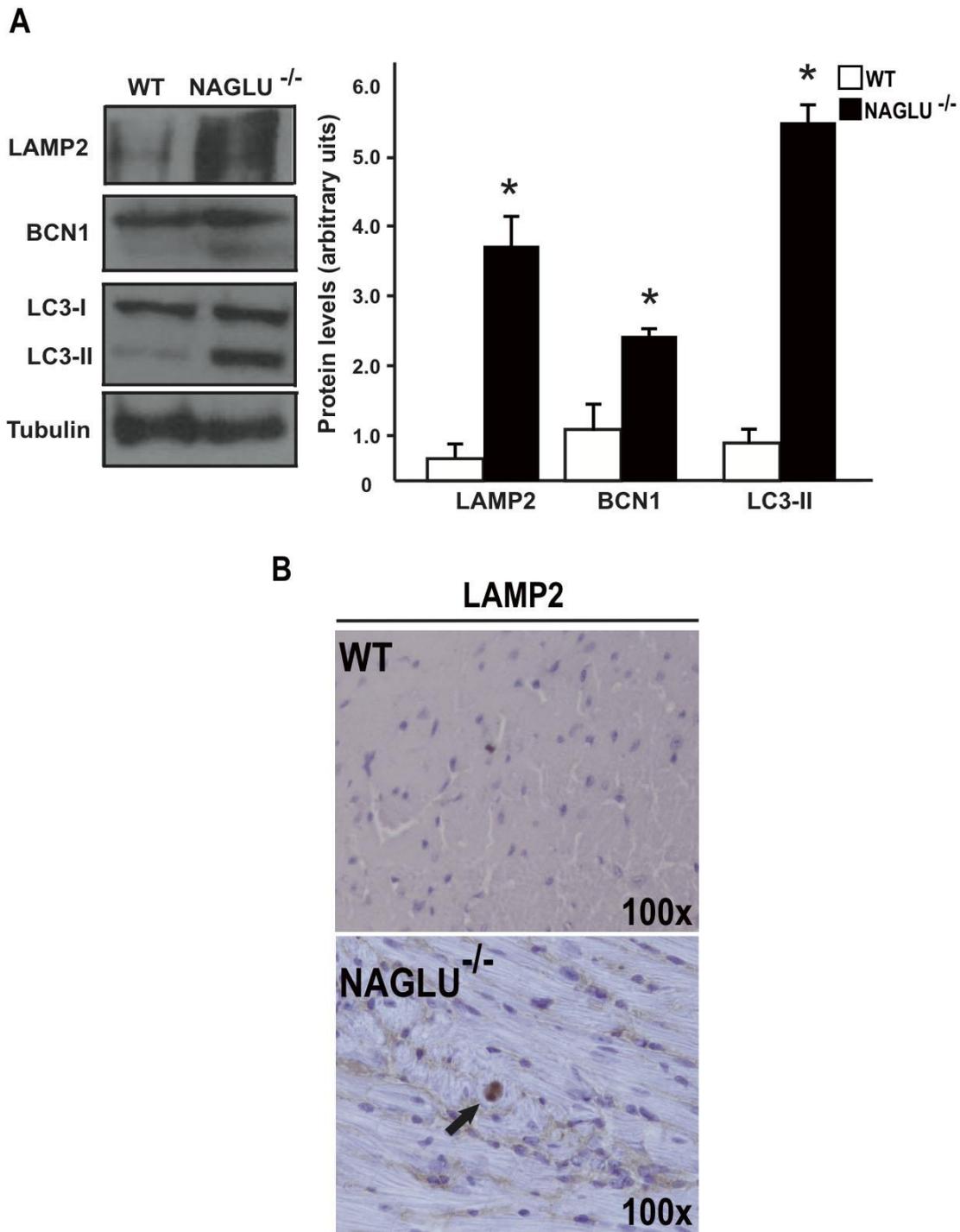
Figura 9



Valutazione biochimica dei marcatori di insufficienza cardiaca nel cuore dei topi NAGLU^{-/-}. **A.** Immunoblot e densitometria rappresentativi di 4 esperimenti indipendenti volti a valutare i livelli di espressione di CaMKII, Cx43, α -actinin and α -SMA nel cuore dei topi WT e NAGLU^{-/-} alla 32esima settimana di età (*p < 0.05 vs. WT). I livelli di tubulina non variano significativamente tra i campioni analizzati. **B.** Livelli di espressione di ANP, BNP and Myh7 mRNA nei tessuti cardiaci dei topi WT e NAGLU^{-/-} alla 32esima settimana di età (*p < 0.05 vs. WT).

In questo studio, abbiamo studiato il coinvolgimento del sistema lisosomiale nei cuori di topi $NAGLU^{-/-}$, valutando i livelli di proteina lisosomiale LAMP2, proteina di membrana associata al lisosoma (Bandyopadhyay et al., 2008). I livelli cardiaci di LAMP2 sono risultati significativamente aumentati nei topi $NAGLU^{-/-}$, rispetto a topi WT, come evidenziato sia tramite Western blotting (Figura 10A) che analisi istochimica dei tessuti (Figura 10B). La Figura 10B mostra che i vacuoli cardiaci contenenti HS sono specificamente marcati dalla proteina lisosomiale LAMP2. Nei campioni di cuore dei topi $NAGLU^{-/-}$ abbiamo, inoltre, riscontrato un aumento rispetto ai topi WT dell'espressione di Beclin-1 (BCN1), una proteina della Classe III fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K), complesso che media la prima fase dell'autofagia (Salminen et al., 2013) (Figura 10A). Infine, sono stati valutati i livelli di espressione dell'isoforma II di LC3 (LC3-II) associata all'autofagosoma (Kaminsky et al., 2012) e sono stati trovati significativamente aumentati nei campioni cardiaci dei topi $NAGLU^{-/-}$ rispetto ai topi WT (Figura 10A). Questi risultati dimostrano che un'alterata attività autofagica lisosomiale nei tessuti cardiaci del modello murino della MPS IIIB.

Figura 10



Valutazione dell'attività autofagica lisosomiale nel cuore dei topi NAGLU^{-/-}. **A.** Immunoblot e densitometria rappresentativi di 4 esperimenti indipendenti volti a valutare i livelli di espressione di LAMP2, BCN1 and LC3-II nel cuore dei topi WT e NAGLU^{-/-} alla 32esima settimana di età (*p<0.05 vs. WT). I livelli di tubulina risultano costanti nei campioni analizzati. **B.** Analisi istologica di LAMP2 nel ventricolo sinistro dei topi e NAGLU^{-/-} (ingrandimento 100x). Le frecce indicano i vacuoli delle fibre miocardiche positivi alla colorazione.

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio dimostrano per la prima volta la presenza di una patologia cardiaca nel modello murino della MPS IIIB. Il progressivo accumulo di GAG non degradati negli organi dei pazienti affetti da MPS si traduce in molteplici disfunzioni che variano in base al particolare GAG depositato e alla carenza dell'enzima specifico. Nel cuore, l'accumulo di GAG provoca disfunzioni cardiache che sono state evidenziate in quasi tutti i tipi di MPS e che contribuiscono significativamente alla mortalità precoce di questi pazienti (Braunlin et al., 2011).

Poiché le MPS sono malattie rare, studi relativi alla patologia cardiaca che comprendano un numero elevato di pazienti sono pochi. Il coinvolgimento cardiaco, tuttavia, è stato riscontrato nel 60-100% dei soggetti esaminati, ed in particolare nei pazienti affetti da MPS I, II e VI (Chen et al., 2005; Dangel, 1998; Fesslová et al., 2009; Leal et al., 2010; Martins et al., 2009; Pastores et al., 2007; Wippermann et al., 1995). Nell'ambito di un particolare tipo di MPS, la patologia cardiaca si sviluppa più precocemente nei soggetti affetti dai tipi di MPS che progrediscono rapidamente, quale ad esempio la sindrome di Hurler (Hirth et al., 2007), mentre può comparire tardivamente nelle forme di MPS a lenta progressione (Soliman et al., 2007). La patologia cardiaca, tuttavia, è sempre un processo progressivo che diventa più grave all'avanzare dell'età. I disordini cardiaci più frequentemente osservati comprendono difetti valvolari, ipertrofia ventricolare sinistra in combinazione con grave stenosi della valvola aortica e fibrillazione atriale, alterazioni del sistema di conduzione, occlusioni coronariche ed alterazioni vascolari (Braunlin et al., 2011; Brands et al., 2013)

Ad oggi, pochissimi studi relativi alla patologia cardiaca nella MPS IIIB sono disponibili; questo lavoro di tesi è stato, pertanto, rivolto alla valutazione del coinvolgimento cardiaco nella MPS IIIB, utilizzando il modello murino della malattia disponibile (Li et al.,

1999). Topi nulli per il gene *NAGLU* (*NAGLU*^{-/-}) e topi WT sono stati sottoposti ad analisi ecocardiografiche a partire dalla 16esima fino alla 32esima settimana di età. I topi *NAGLU*^{-/-} hanno mostrato un aumento delle dimensioni del cuore e ridotta funzionalità cardiaca rispetto ai topi WT. Nei topi affetti sono stati anche riscontrati difetti valvolari quali un aumento delle dimensioni dell'annulus aortico e mitralico accompagnato da un progressivo allungamento ed ispessimento del lembo della valvola mitralica anteriore. L'analisi Doppler ha evidenziato una grave insufficienza mitralica nei topi *NAGLU*^{-/-}. In accordo con tali risultati, uno studio retrospettivo effettuato su 99 pazienti di MPS riporta che l'insufficienza mitralica si verifica più frequentemente nei tipi MPS I, II e III, mentre l'insufficienza aortica è più comune nella MPS II e IV, ed entrambe le insufficienze della valvola mitralica e aortica esibiscono un'associazione positiva con l'età (Mohan et al., 2002).

L'analisi istologica di campioni di tessuto cardiaco prelevato dai topi *NAGLU*^{-/-} sacrificati alla 32esima settimana di età ha confermato un significativo ispessimento della valvola aortica e della cuspidè mitralica. L'ispessimento delle valvole mitralica e aortica è stato riportato nella MPS VII del cane (Sleeper MM et al., 2004), così come nei modelli murini di MPS I e VI (Strauch et al., 2003; Jordan et al., 2005). La maggior parte degli studi effettuati sui disordini cardiaci nei pazienti MPS ha mostrato che essi presentano maggiormente insufficienza valvolare piuttosto che stenosi della valvola mitralica piuttosto che dell'aorta (Braunlin et al., 2011). Inoltre sono maggiormente affette le valvole localizzate a sinistra (mitrale e aortica) piuttosto che quelle destre (tricuspide e polmonare) (Dangel 1998; Fesslová et al. 2009; Krovetz et al. 1965; Rigante and Segni 2002; Thomas et al. 2010). I nostri risultati indicano che le alterazioni nella morfologia delle valvole dei topi *NAGLU*^{-/-} sono associate ad una progressiva riduzione della funzione cardiaca nel tempo e che l'anormale morfologia e funzione della valvola mitralica produce disfunzioni sia diastoliche che sistoliche, suggerendo che l'insufficienza mitralica sia il "primum movens" della disfunzione cardiaca nei topi MPS IIIB. Nel nostro studio abbiamo anche verificato che i topi

NAGLU^{-/-} hanno un tasso di sopravvivenza significativamente più basso rispetto ai topi non affetti con un aumento della mortalità osservata in particolare dopo 25 settimane di età. Tali risultati suggeriscono che le disfunzioni cardiache possano influenzare il tasso di sopravvivenza dei topi MPS IIIB.

Nella MPS IIIB, l'unico prodotto di accumulo nei tessuti è rappresentato dall'HS a causa del difetto enzimatico specifico che caratterizza tale malattia rispetto ad altre MPS in cui l'accumulo di GAG è misto (Neufeld et al., 2001). L'accumulo di HS nel tessuto cardiaco può, pertanto, rappresentare la principale causa dei difetti delle valvole e della disfunzione miocardica osservata nel modello murino della MPS IIIB. I risultati di analisi istopatologiche effettuate su campioni di tessuti cardiaci dei topi NAGLU^{-/-} hanno confermato un significativo aumento dell'accumulo di HS nei vacuoli nelle fibre miocardiche rispetto ai topi non affetti. Negli stessi campioni è stata rilevata anche la presenza di una notevole quantità di collagene localizzata principalmente in prossimità delle valvole e nella porzione più bassa del miocardio. Numerose evidenze sono riportate in letteratura relative ad un'elevata deposizione di collagene nei tessuti cardiaci di modelli animali e pazienti MPS (Rigante et al., 2002; Sleeper et al., 2004; Jordan et al., 2005; Golda et al., 2012; Bigg et al., 2013). In particolare, i nostri risultati sono consistenti con osservazioni precedenti che mostrano fibrosi miocardica nei modelli murini di MPS I (Jordan et al., 2005) e MPS II (Lee et al., 2014) e la deposizione di grandi quantità di collagene nelle valvole e nel miocardio di pazienti affetti da sindrome di Hurler (Renteria et al., 1976).

Fra le ipotesi relative al ruolo dei GAG nella patologia cardiaca delle MPS è stata presa in considerazione anche l'attivazione da parte dei GAG accumulati nel tessuto cardiaco di processi infiammatori, quale ad esempio l'iper-regolazione di proteasi degradative mediata dal recettore Toll-like 4 (Simonaro, 2010). In questo studio, l'utilizzo di metodiche istologiche e di marcatori specifici ha consentito di evidenziare infiltrati infiammatori nel tessuto miocardico dei topi NAGLU^{-/-}.

Indagini biochimiche, inoltre, hanno mostrato un incremento dell'espressione dei marcatori molecolari di ipertrofia e fibrosi nel tessuto cardiaco dei topi *NAGLU*^{-/-} rispetto ai topi WT, oltre ad aumentati livelli di mRNA codificanti per proteine quali ANP, BNP e MYH7, marcatori di disfunzioni cardiache ed infarto. Infine, abbiamo studiato il coinvolgimento del sistema autofagico lisosomiale nel cuore dei topi *NAGLU*^{-/-}, evidenziando un'alterata attività autofagica lisosomiale nei tessuti cardiaci del modello murino della MPS IIIB.

In conclusione, questi risultati dimostrano, per la prima volta, che il silenziamento del gene *NAGLU*, con il conseguente accumulo di HS non degradato nel cuore, provoca alterazioni strutturali e funzionali delle valvole cardiache nel modello murino di MPS IIIB che nel corso del tempo portano a vari tipi di disordini cardiaci. I topi *NAGLU*^{-/-} sviluppano disfunzioni cardiache in funzione dell'età che, probabilmente insieme ad altri fattori, risultano in un aumento del tasso di mortalità dei topi affetti rispetto ai topi sani. Tra i meccanismi patogenetici dell'insorgenza della malattia cardiaca nei topi affetti, è compresa l'alterazione dell'attività autofagica lisosomiale nel cuore dei topi MPS IIIB. Ipotizziamo infatti un possibile meccanismo molecolare che mette in relazione le alterazioni del processo autofagico-lisosomiale e l'insufficienza cardiaca osservata nei topi MPS IIIB. Tale meccanismo si basa sull'ipotesi che, in seguito all'accumulo di HS nei lisosomi, si attiva il processo di autofagia con formazione dell'autofagosoma. L'autofagosoma, tuttavia, non viene eliminato, come dimostrato dall'accumulo di LAMP-2 ed LC3 II nei campioni di tessuto cardiaco analizzato. Ciò si traduce in una iper-espressione della proteina CAMKII, il mediatore principale dell'insufficienza cardiaca che provoca i difetti cardiaci riscontrati. Sebbene ulteriori studi siano necessari ai fini di una migliore comprensione della patologia cardiaca nella MPS IIIB, i nostri risultati, consistenti con precedenti osservazioni relative al possibile blocco o malfunzionamento del flusso autofagico nella MPS IIIA e MPS VI (Settembre et al., 2008; Tessitore et al., 2009), suggeriscono che anomalie dell'attività

autofagica lisosomiale possano rappresentare un importante fattore che contribuisce alla patologia cardiaca nel modello murino delle MPS IIIB ed è molto probabile che ciò si verifichi anche nei pazienti umani.

Un'approfondita conoscenza della patofisiologia dei disordini cardiaci nella MPS IIIB è essenziale per un'adeguata valutazione e trattamento nel tempo di tali pazienti allo scopo di migliorarne la prognosi e la qualità della vita. I nostri risultati sono rilevanti anche ai fini dello "screening" di nuove terapie per il trattamento della MPS IIIB. Attualmente, pochi studi hanno analizzato gli effetti delle terapie disponibili sui disordini cardiaci nelle MPS (Christensen et al., 1997; Braunlin et al., 2011; Brands et al., 2013). Uno studio condotto su 24 bambini affetti da MPS I, II e VI ha dimostrato l'inefficacia della terapia enzimatica sostitutiva a migliorare la funzionalità cardiaca in questi pazienti (Brands et al., 2013). Uno studio più recente ha, invece, dimostrato che il trattamento con laronidasi ha effetti benefici sulla funzionalità miocardica in un paziente con MPS I (Harada et al., 2014). Nuove terapie sono in corso di studio per i pazienti MPS, incluso la terapia sostitutiva enzimatica intratecale (Dickson, 2009) e la terapia genica (Tardieu et al., 2014). Alla luce dei risultati ottenuti in questo lavoro di tesi che dimostrano la presenza di disordini cardiaci nel modello murino della MPS IIIB, sarebbe utile investigare gli effetti di tali terapie sulla funzionalità cardiaca nei pazienti MPS IIIB.

BIBLIOGRAFIA

Archer LD, Langford-Smith KJ, Bigger BW, Fildes JE. 2014. *Mucopolysaccharide diseases: a complex interplay between neuroinflammation, microglial activation and adaptive immunity*. J Inherit Metab Dis. 37(1):1-12.

Ballabio A. 2009. *Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders*. Int J Clin Pharmacol Ther. 47 Suppl 1:S34-8.

Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM. 2008. *The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane*. Mol Cell Biol. 28:5747-63.

Bax MC, Colville GA. 1995. *Behaviour in mucopolysaccharide disorders*. Arch Dis Child. 73(1):77-81.

Bigg PW, Baldo G, Sleeper MM, O'Donnell PA, Bai H, Rokkam VR, et al. 2013. *Pathogenesis of mitral valve disease in mucopolysaccharidosis VII dogs*. Mol Genet Metab. 110:319–328.

Bradford MM. 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 72:248-254

Brands MM, Frohn-Mulder IM, Hagemans ML, Hop WC, Oussoren E, Helbing WA, van der Ploeg AT. 2013. *Mucopolysaccharidosis: cardiologic features and effects of enzyme-replacement therapy in 24 children with MPS I, II and VI*. J Inherit Metab Dis. 36:227-34

Braunlin EA, Harmatz PR, Scarpa M, Furlanetto B, Kampmann C, Loehr JP, Ponder KP, Roberts WC, Rosenfeld HM, Giugliani R. 2011. *Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis: presentation, diagnosis and management*. J Inherit Metab Dis. 34:1183-97.

Chaplin MF; Kennedy JF, Hollak CE, Wijburg FA. 2014. *Treatment of lysosomal storage disorders: successes and challenges*. J Inherit Metab Dis. 37(4):587-98.

Cheitlin MD, Armstrong WF, Aurigemma GP, Beller GA, Bierman FZ, Davis JL, Douglas PS, Faxon DP, Gillam LD, Kimball TR, Kussmaul WG, Pearlman AS, Philbrick JT, Rakowski H, Thys DM, Antman EM, Smith SC Jr, Alpert JS, Gregoratos G, Anderson JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Fuster V, Jacobs AK, Gibbons RJ, Russell RO. 2003. *Guideline update for the clinical application of echocardiography: summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. Circulation. 108:1146–62.

Chen MR, Lin SP, Hwang HK, Yu CH. 2005. *Cardiovascular changes in mucopolysaccharidoses in Taiwan*. Acta Cardiol. 60:51–53.

- Christensen G, Wang Y, Chien KR. 1997. *Physiological assessment of complex cardiac phenotypes in genetically engineered mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 272:H2513–H2524.
- Cleary MA, Wraith JE. 1993. *Management of mucopolysaccharidosis type III*. Arch Dis Child. 69(3):403-6.
- Dangel JH. 1998. *Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide storage diseases and related disorders — clinical and echocardiographic findings in 64 patients*. Eur J Pediatr. 157:534–8.
- de Duve C. 1983. *Lysosomes revisited*. Eur.J Biochem. 137:391-97
- Dickson PI. 2009. *Novel treatments and future perspectives: outcomes of intrathecal drug delivery*. Int J Clin Pharmacol Ther. 47:S124-127.
- Di Natale P, Salvatore D, Daniele A, Bonatti S. 1985. *Biosynthesis of alpha-N-acetylglucosaminidase in cultured human kidney carcinoma cells*. Enzyme 33(2):75-83.
- Di Natale P, Di Domenico C, Gargiulo N, Castaldo S, Gonzalez Y Reyero E, Mithbaokar P, De Felice M, Follenzi A, Naldini L, Villani GR. 2005. *Treatment of the mouse model of mucopolysaccharidosis type IIIB with lentiviral-NAGLU vector*. Biochem J. 388:639-46.
- Di Domenico C, Villani GR, Di Napoli D, Nusco E, Calì G, Nitsch L, Di Natale P. 2009. *Intracranial gene delivery of LV-NAGLU vector corrects neuropathology in murine MPS IIIB*. Am J Med Genet A. 2:639-46.
- Ernst S, Langer R, Cooney CL, Sasisekharan R. 1995. *Enzymatic degradation of glycosaminoglycans*. Crit Rev Biochem Mol Biol. 30(5):387-444.
- Ferrari S, Ponzin D, Ashworth JL et al. 2011. *Diagnosis and management of ophthalmological features in patients with mucopolysaccharidosis*. Br J Ophthalmol 95:613–619.
- Fesslová V, Corti P, Sersale G et al. 2009. *The natural course and the impact of therapies of cardiac involvement in the mucopolysaccharidoses*. Cardiol Young 19:170–178.
- Fu H, DiRosario J, Kang L, Muenzer J, McCarty DM. 2010. *Restoration of central nervous system α -N-acetylglucosaminidase activity and therapeutic benefits in mucopolysaccharidosis IIIB mice by a single intracisternal recombinant adeno-associated viral type 2 vector delivery*. J Gene Med. 12:624–633.
- Gandhi NS, Mancera RL. 2008. *The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins*. Chem Biol Drug Des. 72(6):455-82.

- Garcia P, Sousa SB, Ling TP et al. 2010. *Skeletal complications in mucopolysaccharidosis VI patients: case reports*. J Pediatr Rehabil Med. 3:63–69.
- Golda A, Jurecka A, Tylki-Szymanska A. 2012. *Cardiovascular manifestations of mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy syndrome)*. Int J Cardiol. 158:6–11.
- Haskins ME. 2007. *Animal models for mucopolysaccharidosis disorders and their clinical relevance*. Acta Paediatr. 96(455):56-62.
- Hamano K, Hayashi M, Shioda K, Fukatsu R, Mizutani S. 2008. *Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue*. Acta Neuropathol. 115(5):547-59.
- Harada H, Niiyama H, Katoh A, Ikeda H. 2014. *Laronidase replacement therapy and left ventricular function in mucopolysaccharidosis I*. JIMD Rep. 16:39-45.
- Heldermon CD, Hennig AK, Ohlemiller KK, Ogilvie JM, Herzog ED, Breidenbach A, Vogler C, Wozniak DF, Sands MS. 2007. *Development of sensory, motor and behavioral deficits in the murine model of Sanfilippo syndrome type B*. PLoS One. 2(8):e772.
- Heldermon CD, Ohlemiller KK, Herzog ED, Vogler C, Qin E, Wozniak DF, Tan Y, Orrock JL, Sands MS. 2010. *Therapeutic efficacy of bone marrow transplant, intracranial AAV-mediated gene therapy, or both in the mouse model of MPS IIIB*. Mol Ther. 18(5):873-80.
- Hirth A, Berg A, Greve G. 2007. *Successful treatment of severe heart failure in an infant with Hurler syndrome*. J Inher Metab Dis. 30:820.
- Hishitani T, Wakita S, Isoda T, Katori T, Ishizawa A, Okada R. 2000. *Sudden death in Hunter syndrome caused by complete atrioventricular block*. J Pediatr. 136:268–269.
- Hoffmann B, Mayatepek E. 2005. *Neurological manifestations in lysosomal storage disorders - from pathology to first therapeutic possibilities*. Neuropediatrics. 36(5):285-9.
- Hollak CE, Wijburg FA. 2014. *Treatment of lysosomal storage disorders: successes and challenges*. J Inher Metab Dis. 37(4):587-98.
- Jones SA, Almássy Z, Beck M et al. 2009. *Mortality and cause of death in mucopolysaccharidosis type II - a historical review based on data from the Hunter Outcome Survey (HOS)*. J Inher Metab Dis. 32:534–543.
- Jordan MC, Zheng Y, Ryazantsev S, Rozengurt N, Roos KP, Neufeld EF. 2005. *Cardiac manifestations in the mouse model of mucopolysaccharidosis I*. Mol Genet Metab. 86:233–243.
- Kaminsky V, Zhivotovsky B. 2012. *Proteases in autophagy*. Biochim Biophys Acta. 1824:44-50.

- Karageorgos L, Brooks DA, Pollard A et al. 2007. *Mutational analysis of 105 mucopolysaccharidosis type VI patients*. Hum Mutat. 28:897–903.
- Klein AD, Futerman AH. 2013. *Lysosomal storage disorders: old diseases, present and future challenges*. Pediatr Endocrinol Rev. 11 Suppl 1:59-63.
- Krovetz LJ, Lorincz AE, Schiebler GL. 1965. *Cardiovascular manifestations of the Hurler syndrome. Hemodynamic and angiocardiographic observations in 15 patients*. Circulation 31:132–141.
- Lachman R, Martin KW, Castro S, Basto MA, Adams A, Teles EL. 2010. *Radiologic and neuroradiologic findings in the mucopolysaccharidoses*. J Pediatr Rehabil Med. 3:109–11.
- Leal GN, de Paula AC, Leone C, Kim CA. 2010. *Echocardiographic study of paediatric patients with mucopolysaccharidosis*. Cardiol Young 20:254–261.
- Lee SC, Lee J, Jin DK, Kim JS, Jeon ES, Kwun YH, et al. 2014. *Improvement of cardiac function by short-term enzyme replacement therapy in a murine model of cardiomyopathy associated with Hunter syndrome evaluated by serial echocardiography with speckle tracking 2-D strain analysis*. Mol Genet Metab. 112: 218–223.
- Li HH, Yu WH, Rozengurt N, Zhao HZ, Lyons KM, Anagnostaras S, Fanselow MS, Suzuki K, Vanier MT, Neufeld EF. 1999. *Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-acetylglucosaminidase*. Proc Natl Acad Sci. 96(25):14505-10.
- Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. 2007. *Lysosomes: fusion and function*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8: 622-63.
- Ma X, Tittiger M, Knutsen RH, Kovacs A, Schaller L, Mecham RP, Ponder KP. 2008. *Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice*. Mol Genet Metab. 94(3):298-304.
- Malinowska M, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, Langford-Smith A, Brown JR, Crawford BE, Vanier MT, Gryniewicz G, Wynn RF, Wraith JE, Wegrzyn G, Bigger BW. 2010. *Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative metabolic disease*. PLoS One 5(12):e14192.
- Martins AM, Dualibi AP, Norato D et al. 2009. *Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I*. J Pediatr. 155:S32–S46.
- Matte U, Yogalingam G, Brooks D et al. 2003. *Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients*. Mol Genet Metab. 78:37–43.

Meikle PJ, Ranieri E, Ravenscroft EM, Hua CT, Brooks DA, Hopwood JJ. 1999. *Newborn screening for lysosomal storage disorders*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2:104-10.

Metcalf JA, Linders B, Wu S, Bigg P, O'Donnell P, Sleeper MM, Whyte MP, Haskins M, Ponder KP. 2010. *Upregulation of elastase activity in aorta in mucopolysaccharidosis I and VII dogs may be due to increased cytokine expression*. Mol Genet Metab. 99:396–407.

Mohamed BA, Barakat AZ, Zimmermann WH, Bittner RE, Mühlfeld C, Hünlich M, Engel W, Maier LS, Adham IM. 2012. *Targeted disruption of Hspa4 gene leads to cardiac hypertrophy and fibrosis*. J Mol Cell Cardiol. 53:459-68.

Mohan UR, Hay AA, Cleary MA, Wraith JE, Patel RG. 2002. *Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide disorders*. Acta Paediatr. 91:799–804.

Neufeld EF. 1991. *Lysosomal storage diseases*. Annu Rev Biochem. 60:257-80.

Neufeld EF, Muenzer J, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. 2001. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill. p.3421–3452.

Ohmi K, Greenberg DS, Rajavel KS, Ryazantsev S, Li HH, Neufeld EF. 2003. *Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB*. Proc Natl Acad Sci USA. 100(4):1902-7.

Pan C, Nelson MS, Reyes M, Koodie L, Brazil JJ, Stephenson EJ, Zhao RC, Peters C, Selleck SB, Stringer SE, Gupta P. 2005. *Functional abnormalities of heparan sulfate in mucopolysaccharidosis-I are associated with defective biologic activity of FGF-2 on human multipotent progenitor cells*. Blood 106(6):1956-64.

Pastores GM, Arn P, Beck M et al. 2007. *The MPS I registry: design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with mucopolysaccharidosis type I*. Mol Genet Metab. 91:37–47.

Pavone LM, Spina A, Rea S, Santoro D, Mastellone V, Lombardi P, Avallone L. 2009. *Serotonin transporter gene deficiency is associated with sudden death of newborn mice through activation of TGF-beta1 signalling*. J Mol Cell Cardiol. 47:691-7.

Pereira VG, Martins AM, Micheletti C, D'Almeida V. 2008. *Mutational and oxidative stress analysis in patients with mucopolysaccharidosis type I undergoing enzyme replacement therapy*. Clin Chim Acta. 387(1-2):75-9.

Perrino C, Schiattarella GG, Sannino A, Pironti G, Petretta MP, Cannavo A, Gargiulo G, Iardi F, Magliulo F, Franzone A, Carotenuto G, Serino F, Altobelli GG, Cimini V, Cuocolo A, Lombardi A, Goglia F, Indolfi C, Trimarco B, Esposito G. 2013. *Genetic deletion of uncoupling protein 3*

exaggerates apoptotic cell death in the ischemic heart leading to heart failure. J Am Heart Assoc. 2:e000086.

Rentería VG, Ferrans VJ, Roberts WC. 1976. *The heart in the Hurler syndrome: gross, histologic and ultrastructural observations in five necropsy cases.* Am J Cardiol. 38:487–501.

Reolon GK, Reinke A, de Oliveira MR, Braga LM, Camassola M, Andrades ME, Moreira JC, Nardi NB, Roesler R, Dal-Pizzol F. 2009. *Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS I mice.* Cell Mol Neurobiol. 29(4):443-8.

Richard M, Arfi A, Rhinn H, Gandolphe C, Scherman D. 2008. *Identification of new markers for neurodegeneration process in the mouse model of Sly disease as revealed by expression profiling of selected genes.* J Neurosci Res. 86(15):3285-94.

Rigante D, Segni G. 2002. *Cardiac structural involvement in mucopolysaccharidoses.* Cardiology 98:18–20.

Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A, Ojala J, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M. 2013. *Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome.* Prog Neurobiol. 106-107:33-54

Salvatore D, Bonatti S, Di Natale P. 1984. *Lysosomal α -N-acetylglucosaminidase: purification and characterisation of the human enzyme.* Bull Mol Bio Med. 9: 111-121.

Sasaki T, Sukegawa K, Masue M, Fukuda S, Tomatsu S, Orii T. 1991. *Purification and partial characterisation of α -N-acetylglucosaminidase from human liver.* Biochem. J. 110:842-846.

Sergeeva IA, Christoffels VM. 2013. *Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease.* Biochim Biophys Acta. 1832:2403-13.

Severs NJ, Dupont E, Thomas N, Kaba R, Rothery S, Jain R, Sharpey K, Fry CH. 2006. *Alterations in cardiac connexin expression in cardiomyopathies.* Adv Cardiol. 42:228-42.

Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampinato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC and Ballabio A 2008. *A block of autophagy in lysosomal storage disorders.* Hum. Mol. Genet. 17:119-129.

Simonaro CM, D'Angelo M, Haskins ME, Schuchman EH. 2005. *Joint and bone disease in mucopolysaccharidoses VI and VII: identification of new therapeutic targets and biomarkers using animal models.* Pediatr Res. 57:701-7.

Simonaro CM, Ge Y, Eliyahu E, He X, Jepsen KJ, Schuchman EH. 2010. *Involvement of the Toll-like receptor 4 pathway and use of TNF-alpha antagonists for treatment of the mucopolysaccharidoses.* Proc Natl Acad Sci U S A. 107(1):222-7.

- Sleeper MM, Fornasari B, Ellinwood NM, Weil MA, Melniczek J, O'Malley TM, et al. 2004. *Gene therapy ameliorates cardiovascular disease in dogs with mucopolysaccharidosis VII*. *Circulation* 110:815–820.
- Soliman OII, Timmermans RGM, Nemes A et al. 2007. *Cardiac abnormalities in adults with the attenuated form of mucopolysaccharidosis type I*. *J Inher Metab Dis*. 30:750–757.
- Strauch OF, Stypmann J, Reinheckel T, Martinez E, Haverkamp W, Peters C. 2003. *Cardiac and ocular pathologies in a mouse model of mucopolysaccharidosis type VI*. *Pediatr Res*. 54:701–708.
- Tardieu M, Zérah M, Husson B, de Bournonville S, Deiva K, Adamsbaum C, Vincent F, Hocquemiller M, Broissand C, Furlan V, Ballabio A, Fraldi A, Crystal RG, Baugnon T, Roujeau T, Heard JM, Danos O. 2014. *Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial*. *Hum Gene Ther*. 25:506-516.
- Tessitore A, Pirozzi M, Auricchio A. 2009. *Abnormal autophagy, ubiquitination, inflammation and apoptosis are dependent upon lysosomal storage and are useful biomarkers of mucopolysaccharidosis VI*. *Pathogenetics*. 2(1):4.
- Thomas JA, Beck M, Clarke JTR, Cox GF. 2010. *Childhood onset of Scheie syndrome, the attenuated form of mucopolysaccharidosis I*. *J Inher Metab Dis*. 33:421–427.
- Vellodi A. 2005. *Lysosomal storage disorders*. *Br J Haematol*. 128:413-431.
- Villani GR, Gargiulo N, Faraonio R, Castaldo S, Gonzalez Y, Reyero E, Di Natale P. 2007. *Cytokines, neurotrophins, and oxidative stress in brain disease from mucopolysaccharidosis IIIB*. *J Neurosci Res*. 85(3):612-22.
- Von Figura K., Hasilik A, Steckel F, Van de Kamp JJ. 1984. *Biosynthesis and maturation of alpha-N-acetylglucosaminidase in normal and Sanfilippo B fibroblast*. *Am J Hum Genet*. 36: 93-100.
- Walkley SU, Vanier MT. 2009. *Secondary lipid accumulation in lysosomal disease*. *Biochim Biophys Acta*. 1793:726–736.
- Weber B, Blanch L, Clements PR, Scott HS, Hopwood JJ. 1996. *Cloning and expression of the gene involved in Sanfilippo B syndrome (mucopolysaccharidosis III B)*. *Hum Mol Genet*. 5(6):771–777.
- Wendel B, Reinhard R, Wachtendorf U, Zacharzowsky UB, Osterziel KJ, Schulte HD, Haase H, Hoehe MR, Morano I. 2000. *The human beta-myosin heavy chain gene: sequence diversity and functional characteristics of the protein*. *J Cell Biochem*. 79:566-75.

Wippermann CF, Beck M, Schranz D, Huth R, Michel-Behnke I, Jüngst BK. 1995. *Mitral and aortic regurgitation in 84 patients with mucopolysaccharidoses*. Eur J Pediatr. 154:98–101.

Wraith JE. 1995. *The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management*. Arch Dis Child. 72:263–267.

Yogalingam G, Weber B, Meehan J, Rogers J, Hopwood JJ. 2000. *Mucopolysaccharidosis type IIIB: characterisation and expression of wild-type and mutant recombinant alpha-N-acetylglucosaminidase and relationship with sanfilippo phenotype in an attenuated patient*. Biochim Biophys Acta. 1502(3):415-25.

Yu WH, Zhao KW, Ryazantsev S, Rozengurt N, Neufeld EF. 2000. *Short-term enzyme replacement in the murine model of Sanfilippo syndrome type B*. Mol Genet Metab. 71(4):573-80.

Zhao HG, Li HH, Bach G, Schmidtchen A, Neufeld EF. 1996. *The molecular basis of Sanfilippo syndrome type B*. Proc Natl Acad Sci USA. 93(12):6101-5.

RINGRAZIAMENTI

Per questo lavoro di tesi, in primo luogo desidero ringraziare il mio tutor, prof. Luigi Michele Pavone, per avermi accolta nel suo gruppo di ricerca e avermi dato la possibilità di lavorare su un progetto molto interessante offrendomi l'opportunità di accrescere le mie conoscenze e competenze scientifiche acquisite durante lo svolgimento della tesi di laurea.

Ringrazio la prof.ssa Paola Di Natale, che oltre a fornirci il modello murino, ha messo a nostra disposizione la sua profonda conoscenza scientifica riguardante la tematica di ricerca, dimostrando sempre ampia disponibilità alla discussione sulle strategie sperimentali da adottare e sull'interpretazione critica dei risultati.

Ringrazio il Dott. Gabriele Schiattarella che ha contribuito, con le sue competenze in campo cardiologico, alla realizzazione della sperimentazione ecocardiografica sul modello murino.

Ringrazio la prof.ssa Angela Maria Acquaviva senza la quale non avrei potuto avvicinarmi a questa nuova esperienza universitaria e la ringrazio per tutto il background scientifico che mi ha fornito durante il periodo di tesi sperimentale.

Ringrazio la mia famiglia che mi ha sostenuto in questo percorso, standomi sempre vicina, offrendomi amore e conforto.

Ringrazio particolarmente mia sorella che con la sua forza, il suo coraggio e la sua voglia di vivere mi ha insegnato a lottare e a combattere per ottenere ciò che voglio.

Ringrazio Gennaro, il mio fidanzato, che ha gioito con me nei momenti felici, ma ha saputo starmi accanto in quelli difficili, cercando di farmi vedere sempre il lato positivo della vita.