

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Dipartimento di Scienze della Salute  
Dottorato in Tecnologie Biomediche XXVII ciclo



**PROTEOMICA DEGLI EXOSOMI URINARI PER LA RICERCA  
DI BIOMARCATORI NELLA NEFROPATIA DIABETICA E  
NELLE TUBULOPATIE EREDITARIE**

Responsabile: Chiar.ma Prof.ssa Marina PITTO

Tesi di Dottorato di:  
Samuele CORBETTA  
Matricola n°: 701577

Anno Accademico 2013 - 2014



# ***Indice***

## **1. INTRODUZIONE**

1.1 NEFROPATIA DIABETICA	pg. 2
1.1.1 Caratteri generali ed epidemiologia	pg. 2
1.1.2 Storia naturale	pg. 3
1.1.3 Patogenesi	pg. 4
1.1.3.1 Modificazioni strutturali renali	pg. 5
1.1.3.2 Cambiamenti emodinamici	pg. 7
1.1.3.3 Ruolo dell'iperglicemia	pg. 8
1.1.3.4 Altri fattori patogenetici	pg. 10
1.1.4 Diagnosi e Prognosi	pg. 14
1.1.5 Terapia	pg. 17
1.1.6 Biomarcatori	pg. 19
1.1.7 Modelli animali	pg. 22
1.2 TUBULOPATIE	pg. 24
1.2.1 Ipopotassiemie di origine reno-tubulare	pg. 24
1.2.2 Sindrome di Gitelman	pg. 26
1.2.3 Sindrome di Bartter	pg. 29
1.2.4 Patogenesi delle principali anomalie biochimico-cliniche	pg. 37
1.2.5 Diagnosi differenziale	pg. 40
1.2.6 Prognosi	pg. 42
1.2.7 Terapia	pg. 42
1.3 EXOSOMI ed EXOSOMI URINARI	pg. 43
1.3.1 Isolamento degli exosomi dai fluidi biologici	pg. 45
1.3.2 Biogenesi	pg. 49
1.3.3 Composizione	pg. 52
1.3.4 Funzioni	pg. 61
1.3.5 Uso clinico degli exosomi	pg. 64
1.3.6 Biomarcatori di malattie renali negli exosomi	pg. 66

## **2. SCOPO DELLA TESI** pg. 71

## **3. MATERIALI E METODI** pg. 73

3.1 Materiali	pg. 74
3.2 Apparecchiature	pg. 75
3.3 Tecniche di frazionamento	pg. 76
3.3.1 Casistica	pg. 76
3.3.2 Raccolta urine	pg. 76

3.3.3	<i>Isolamento degli exosomi mediante ultracentrifugazione</i>	pg. 76
3.3.4	<i>Estrazione delle proteine urinarie mediante ultrafiltrazione</i>	pg. 78
3.4	Elettroforesi monodimensionale	pg. 78
3.5	Elettroforesi bidimensionale diagonale	pg. 80
3.6	Western Blotting	pg. 83
3.7	Immunodecorazione	pg. 84
3.8	Metodi di colorazione dei gel	pg. 85
3.8.1	<i>Colorazione con Simply Blue</i>	pg. 85
3.8.2	<i>Colorazione fluorescente con Sypro Ruby</i>	pg. 85
3.9	Dosaggi proteici	pg. 86
3.9.1	<i>Metodo Bradford Biorad</i>	pg. 86
3.9.2	<i>Dosaggio NanoDrop</i>	pg. 87
3.9.3	<i>Metodo del BCA</i>	pg. 87
3.10	Analisi proteomica mediante spettrometria di massa	pg. 88
3.10.1	<i>Digestione in gel con tripsina</i>	pg. 89
3.10.2	<i>Analisi LC-ESI-MS/MS</i>	pg. 90
3.10.3	<i>Mascot</i>	pg. 92
3.10.4	<i>Digestione gel-free con tripsina</i>	pg. 94
3.12.5	<i>Analisi LC-ESI-MS/MS per quantificazione label-free</i>	pg. 96
3.12.6	<i>Elaborazione dei dati LC-ESI-MS/MS</i>	pg. 97
3.11	Analisi mutazionale <i>in silico</i> tramite software SIFT	pg. 99
3.12	Analisi statistica	pg. 99
<b>4. <u>RISULTATI</u></b>		pg. 100
4.1	Exosomi urinari e Nefropatia Diabetica	pg. 101
4.1.1.	<i>Modello animale di diabete di tipo 2</i>	pg. 101
4.1.2.	<i>Caratterizzazione degli exosomi urinari</i>	pg. 103
4.1.3.	<i>Proteomica degli exosomi urinari</i>	pg. 106
4.1.4.	<i>Analisi bioinformatica</i>	pg. 115
4.1.5.	<i>Validazione del contenuto differenziale di alcune proteine negli exosomi urinari di ratti diabetici e controlli.</i>	pg. 118
4.2	Exosomi urinari e Tubulopatie Ereditarie	pg. 122
4.2.1.	<i>Casistica</i>	pg. 122
4.2.2.	<i>Caratterizzazione degli exosomi urinari</i>	pg. 131
4.2.3.	<i>Ricerca dei trasportatori delle SLTs negli exosomi urinari</i>	pg. 134
4.2.4.	<i>Proteomica degli exosomi urinari</i>	pg. 145
<b>5. <u>CONCLUSIONI</u></b>		pg. 155
<b>6. <u>BIBLIOGRAFIA</u></b>		pg. 160
<b>7. <u>RINGRAZIAMENTI</u></b>		pg. 171

## **Riassunto**

Le urine costituiscono il fluido biologico di elezione nella ricerca di biomarcatori per le patologie renali in quanto possono essere raccolte in modo semplice e non invasivo; una strategia per la semplificazione del proteoma urinario è rappresentata dall'isolamento degli esosomi urinari (UE), nanovesicole di membrana (30-100 nm) rilasciate dalle cellule epiteliali nello spazio urinario. In questo lavoro abbiamo focalizzato l'attenzione sulla nefropatia diabetica (DN), una comune complicazione del diabete ed una delle cause più frequenti di insufficienza renale terminale (ESDR), e sulle tubulopatie ereditarie (SLTs), un gruppo eterogeneo di malattie genetiche rare dell'età pediatrica caratterizzate da difetti in proteine coinvolte nel riassorbimento di sodio-cloruro a livello dell'ansa di Henle e/o dei tubuli renali distali, come i cotrasportatori NCC NKCC2, alterati rispettivamente nella sindrome di Gitelman (GS) e nella sindrome di Bartter1 (B1). L'obiettivo che ci siamo proposti è stato quello di studiare il proteoma degli UE in: 1) un modello animale di DN, i ratti ZDF (Zucker Diabetic Fatty), e corrispondenti controlli, per l'identificazione di potenziali biomarcatori diagnostici/prognostici e 2) pazienti affetti da SLTs e controlli sani al fine di proporre un approccio diagnostico complementare/alternativo all'analisi genetica e fornire un punto di partenza per la ricerca di biomarcatori.

Per quanto riguarda lo studio della DN, sono state raccolte le urine delle 24 ore da 7 ratti ZDF e controlli a differenti età per monitorare l'evoluzione della DN, gli UE sono stati isolati mediante ultracentrifugazione, seguita da caratterizzazione biochimica. Dopo l'allestimento di un pool rappresentativo di UE di ratti ZDF e controlli a 20 settimane, ne è stato analizzato il proteoma tramite LC-ESI-MS/MS portando all'identificazione ed alla quantificazione *label-free* di 286 proteine. Il contenuto differenziale di alcune di queste proteine è stato confermato tramite immunoblotting; il contenuto della Major-Urinary-Protein-1 è risultato significativamente più alto, quello della proteina Xaa-Pro-Dipeptidase più basso e quello della Neprilisina invariato, rispettivamente, negli UE di ratti ZDF rispetto ai controlli.

Per quanto riguarda le SLTs, la casistica era formata da 32 pazienti SLTs già studiati dal punto di vista genetico e biochimico-clinico, da 4 pazienti SLTs non classificabili e da 22 controlli sani. Dopo la raccolta delle seconde urine del mattino, sono stati isolati e caratterizzati gli UE. I risultati hanno mostrato che il segnale relativo al cotrasportatore NCC risulta significativamente ridotto o assente negli UE dei pazienti GS rispetto ai controlli, e allo stesso modo il cotrasportatore NKCC2 per i pazienti B1. Le differenze nei livelli di queste due proteine negli UE ci consentono il riconoscimento dei pazienti GS e B1 rispetto ai controlli e, in combinazione con i dati biochimico-clinici, rispetto agli altri pazienti Bartter. E' stato quindi proposto e validato statisticamente un approccio diagnostico che può risultare utile in casi di SLTs a diagnosi incerta. Per quanto riguarda la proteina NCC è stata inoltre effettuata una correlazione tra la quantità del trasportatore presente negli UE e la gravità della mutazione corrispondente.

Per l'identificazione di biomarcatori delle altre due forme di SLTs studiate, la sindrome di Bartter2 (B2) e di Bartter3 (B3), abbiamo allestito un pool di UE, abbiamo separato le proteine mediante elettroforesi bidimensionale selezionando alcuni spot differenziali da analizzare tramite LC-ESI-MS/MS; il contenuto differenziale negli UE di alcune proteine identificate verrà validato mediante IB.

In conclusione possiamo affermare che la composizione proteica degli UE risulta alterata in maniera riproducibile in presenza di nefropatia diabetica e di tubulopatie ereditarie; le differenze evidenziate possono costituire un punto di partenza per l'identificazione di biomarcatori diagnostici/prognostici e per il chiarimento dei meccanismi patogenetici di tali malattie.





# ***Introduzione***

## 1.1 NEFROPATIA DIABETICA

### 1.1.1. Caratteri generali ed epidemiologia

La nefropatia diabetica (DN) è, nel mondo occidentale, la principale causa di insufficienza renale terminale (ESRD, *end stage renal disease*) ed una delle maggiori cause di morbilità e mortalità correlate al diabete mellito. Si tratta di una sindrome clinica caratterizzata dalla perdita con le urine di una quantità crescente di albumina, da un lento e graduale declino della struttura e della funzione renali, e da ipertensione arteriosa; la presenza di questa patologia si accompagna inoltre ad un più elevato rischio di insorgenza di malattie cardiovascolari e di altre complicanze del diabete (retinopatia e neuropatia diabetica) [*National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*, 2010]. La DN non si associa ad alcun sintomo clinico nelle prime fasi del suo sviluppo, caratterizzate soltanto dalla presenza nelle urine di una quantità moderatamente elevata di albumina (microalbuminuria). In condizioni normali, la quantità di albumina eliminata giornalmente con le urine non supera i 30mg/l; si definisce microalbuminuria una quantità di albumina compresa fra 30 e 300mg/l mentre l'escrezione di una quantità superiore ai 300mg/l viene definita macroalbuminuria o albuminuria franca. Quando questo avviene il danno renale è di tale entità da consentire anche il passaggio di proteine diverse dall'albumina; si parla di proteinuria. Ne deriva una riduzione della concentrazione di albumina nel sangue con conseguente comparsa di edema periferico. La comparsa di microalbuminuria è abitualmente accompagnata da un aumento della pressione arteriosa che contribuisce al progressivo peggioramento della funzione renale. La presenza infine di insufficienza renale si associa ad una sintomatologia complessa che include una marcata riduzione delle forze, mancanza di appetito, nausea e, nelle forme più avanzate, vomito, gonfiore alle caviglie o edemi diffusi, anemia per la mancanza di eritropoietina e dolori ossei per la presenza di una osteodistrofia renale secondaria ad una carenza di vitamina D; in questo stadio sono necessari il trattamento sostitutivo con dialisi o il trapianto renale [Nielsen S *et al.*, 1997].

Questa malattia, descritta per la prima volta nel 1963 da Kimmelstiel e Wilson [Kimmelstiel P *et al.*, 1963], fu identificata nella glomerulosclerosi nodulare. Negli anni successivi, studi eseguiti con la biopsia renale dimostrarono che il coinvolgimento renale nel corso della malattia diabetica evolve in stadi e che la sclerosi glomerulare ne rappresenta solo la fase terminale. Ad oggi è di fatto impossibile prevedere quali pazienti diabetici e quando svilupperanno nefropatia. Oltre agli Stati Uniti, all'Europa e al Giappone, l'incidenza di questa patologia sta rapidamente incrementando anche in India ed in Cina; negli Stati Uniti il 45% dei pazienti con ESRD presenta DN ed il dato è destinato ad incrementare ulteriormente nei prossimi 15 anni, con un tasso di circa 2-2,4% all'anno, a causa del forte aumento del numero di pazienti che soffrono di diabete [US Renal Data System, 2012]. In Italia la prevalenza di pazienti diabetici in terapia sostitutiva è del 9.1% e l'incidenza massima del trattamento sostitutivo è osservabile

nella fascia di età dai 65 ai 74 anni [Registro italiano di dialisi e trapianto, 2009]. Sia i pazienti con diabete di tipo 1 insulino – dipendente sia i pazienti con diabete di tipo 2 non insulino – dipendente possono sviluppare ND; in particolare essa complica il 30 % dei casi di diabete di tipo 1 e il 20 % dei casi di diabete di tipo 2 [Tonolo G *et al.*, 2014] e colpisce maggiormente il genere maschile [Neugarten J *et al.*, 2013]. Tuttavia, la maggioranza dei pazienti diabetici con ESRD è affetta da diabete di tipo 2, a causa della grande prevalenza di questa forma di diabete nel mondo (90 % di tutti i diabetici) [Hasslacher C, 2004].

### 1.1.2. Storia naturale

La storia naturale della DN è stata dettagliatamente descritta nel diabete di tipo 1 da Mogensen *et al.* [Mogensen CE *et al.*, 1983; Mogensen CE *et al.*, 1990]; è possibile delinearla, sebbene meno precisamente, anche nel diabete di tipo 2 (tab. D) [Mogensen CE *et al.*, 1984; Saffioti S *et al.*, 1993; Lebovitz HE *et al.*, 1994].

Nello **stadio I**, la fase preclinica, che si manifesta durante i primi 7-13 anni di malattia, non compaiono alterazioni biochimiche ematiche ed urinarie, ma si sviluppano anomalie della struttura e della funzione renale, prevalentemente a livello glomerulare ed in misura minore anche a livello tubulare, interstiziale ed arteriolare. In questa fase, i pazienti di tipo 1 presentano normale escrezione di albumina nelle urine, normali valori pressori ed è in genere presente anche un aumento del filtrato glomerulare (FG); al contrario, circa la metà dei pazienti con diabete di tipo 2 presenta già ipertensione arteriosa, il 10% microalbuminuria e una piccola quota di pazienti manifesta proteinuria.

Nello **stadio II**, definito della nefropatia silente, non è ancora possibile rilevare anomalie di tipo biochimico, ma si evidenziano ulteriori lesioni strutturali del rene, quali l'ispessimento della membrana basale glomerulare e l'espansione dell'area mesangiale. La microalbuminuria può comparire in presenza di sforzi fisici o abusi alimentari.

Lo stadio successivo, lo **stadio III**, definito della nefropatia incipiente, si caratterizza per la comparsa di microalbuminuria, prima evidenza clinica dello sviluppo della patologia. Nel diabete di tipo 1 la microalbuminuria compare dopo circa 10-15 anni di malattia; in questa fase il filtrato glomerulare si riduce rispetto allo stadio I e sono presenti evidenti alterazioni strutturali a livello del glomerulo; si assiste inoltre ad un lieve e progressivo incremento dei valori pressori nei pazienti con diabete di tipo 1, mentre nel diabete di tipo 2 l'ipertensione arteriosa è presente nell'80% dei casi. Dallo stadio di microalbuminuria una percentuale variabile dal 40 all'80% dei pazienti di tipo 1 e del 40% dei pazienti di tipo 2 progredisce verso la nefropatia clinica nell'arco di 10 anni.

La successiva fase clinica si compone a sua volta degli stadi IV e V. Lo **stadio IV** è caratterizzato da proteinuria persistente, ipertensione arteriosa, un progressivo declino del filtrato glomerulare e da lesioni strutturali renali avanzate e si manifesta, nel diabete di tipo 1, dopo 10-

20 anni di malattia. Una volta comparsa la nefropatia clinica, la progressione verso l'insufficienza renale terminare (ESRD) è pressoché inesorabile nei pazienti non trattati; la caduta del filtrato glomerulare è di 8-10 ml/min per anno. Nei pazienti con diabete di tipo 2 il decorso in questa fase è simile o lievemente più lento rispetto ai diabetici di tipo 1; il filtrato glomerulare declina di 4-7 ml/min per anno e l'incidenza cumulativa di ESRD sembra essere più bassa. Lo **stadio V** è infine caratterizzato dall'insufficienza renale cronica che evolve verso l'uremia terminale ed il conseguente trattamento sostitutivo con dialisi o trapianto renale.

**Tabella 1:** i cinque stadi della DN [modificata da Cristoph Hasslacher, *La DN vol. 1, CIC Edizione Internazionale Roma 2004*].

STADIO	DEFINIZIONE	FGR	AER	PA	ALTERAZIONI
I	ND preclinica	Aumentato	Normale	Normale	Ipertrofia, volume renale aumentato
II	ND silente	Normale/Aumentato	Normale	Normale	Incremento dello spessore della membrana basale e espansione del mesangio
III	ND incipiente	Normale/Aumentato	Microalbuminuria	Aumentata	Incremento dello spessore della membrana basale e espansione del mesangio
IV	ND conclamata	In diminuzione	Macroalbuminuria	Ipertensione	Incremento dell'occlusione glomerulare e grave espansione del mesangio
V	ESDR	< 20ml/min	Macroalbuminuria	Ipertensione	Incremento dell'occlusione glomerulare e grave espansione del mesangio

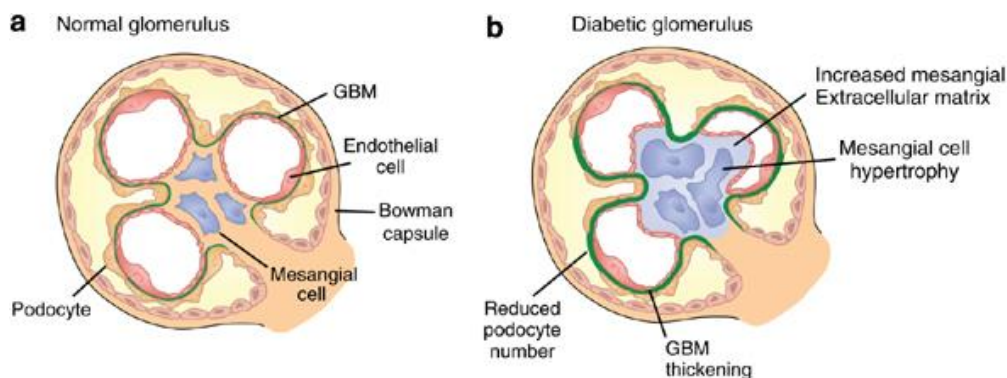
### 1.1.3. Patogenesi

Per anni si è pensato che le DN nei pazienti di tipo 1 e di tipo 2 fossero due entità distinte; oggi si ritiene che i meccanismi fisiopatologici di base siano del tutto comparabili. Tuttavia nei diabetici di tipo 2 altri fattori, correlati o meno al diabete, quali l'ipertensione, l'obesità, la dislipidemia e la presenza di patologie renali ischemiche possono rappresentare elementi aggiuntivi di danno renale [Wolf G *et al.*, 2004]. Nelle fasi precoci di sviluppo della nefropatia si verificano cambiamenti funzionali nel nefrone a livello del glomerulo, in particolar modo iperfiltrazione ed iperperfusione, seguiti da cambiamenti strutturali quali ispessimento della membrana basale glomerulare, ipertrofia glomerulare ed espansione mesangiale. La microalbuminuria presenta un decorso variabile; la sua progressione verso macroalbuminuria e nefropatia clinica è imprevedibile. Inoltre, anche il progressivo declino della funzionalità renale in seguito allo sviluppo di nefropatia è altamente variabile ed influenzato da fattori addizionali inclusi la pressione arteriosa e il controllo glicemico [Wolf G *et al.*, 2004].

### 1.1.3.1. Modificazioni strutturali renali

Sono state descritte diverse alterazioni strutturali renali in pazienti diabetici: sclerosi glomerulare, espansione mesangiale, ispessimento della membrana basale glomerulare (GBM), cambiamenti nell'architettura tubulointerstiziale con atrofia tubulare e fibrosi interstiziale e modificazioni nel numero e nella funzione dei podociti [De Fronzo RA *et al.*, 1995].

Il più precoce cambiamento morfologico è rappresentato dall'espansione dell'area mesangiale (fig 1); all'interno del glomerulo renale il mesangio è costituito dall'insieme di particolari cellule, dette appunto mesangiali, disposte intorno ai capillari glomerulari ed immerse in una matrice amorfa, la matrice mesangiale. L'espansione di quest'area è causata da un incremento della deposizione di matrice extracellulare e da un'ipertrofia delle cellule mesangiali stesse [Mauer SM *et al.*, 1984], indotta da iperglicemia cronica; in coltura, dopo un breve periodo di proliferazione, queste cellule, esposte ad un'alta concentrazione di glucosio, si arrestano nella fase G1 del ciclo cellulare a seguito dell'attivazione, mediata dalla via delle mitogen-activated protein kinases (MAPK), di un inibitore delle chinasi ciclino-dipendenti, p27Kip1 [Wolf G *et al.*, 1997]. L'espansione mesangiale, evolvendo, comporta una progressiva occlusione dei capillari glomerulari, che determina, come evento finale, la sclerosi completa della massa glomerulare [Mauer SM *et al.*, 1984].

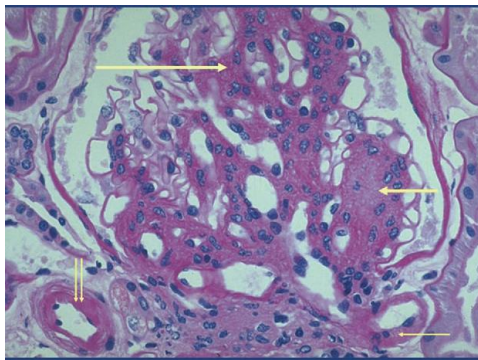


**Figura 1:** a) glomerulo normale; sono mostrate le cellule mesangiali, endoteliali, i podociti e la membrana basale glomerulare (GBM). b) rene di un paziente diabetico con nefropatia; si osservano l'ispessimento della GBM, l'espansione mesangiale per ipertrofia cellulare ed accumulo della matrice extracellulare ed una riduzione del numero di podociti [modificata da Jefferson JA *et al.*, 2008].

Dopo pochi anni dall'insorgenza della patologia si può frequentemente osservare ialinosi arteriolare a carico delle arteriole glomerulari afferente ed efferente (fig. 2) ; il materiale che si accumula progressivamente a livello della parete dei vasi, costituito da proteine plasmatiche quali immunoglobuline, proteine del complemento, fibrinogeno ed albumina, va infine a sostituire del tutto le cellule muscolari lisce dei vasi stessi [Harris RD *et al.*, 1991].

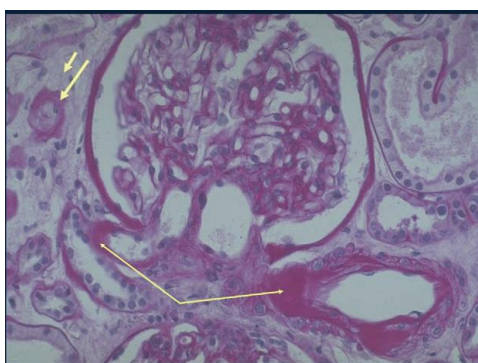
Un altro importante cambiamento strutturale è rappresentato dall'ispessimento della membrana basale glomerulare (GBM), la parte della parete dei capillari glomerulari

maggiormente responsabile del processo di filtrazione. Questo ispessimento si osserva molto precocemente, già dopo un anno dall'insorgenza del diabete di tipo 1, e procede in maniera progressiva; contribuiscono a tale ispessimento sia un incremento della sintesi della matrice extracellulare sia una perdita della capacità di turnover della stessa [Mason RM *et al.*, 2003]. Ad esempio si assiste ad un significativo incremento della deposizione del collagene di tipo IV ma ad una ridotta sintesi di alcuni glicosamminoglicani (GAG) come l'eparan solfato; questo, in aggiunta alla deplezione delle cariche anioniche per ridotta solfatazione, contribuisce alla riduzione della barriera elettrostatica e all'insorgenza di albuminuria [Jensen T *et al.*, 1997].



**Figura 2:** glomerulo di un paziente con diabete di tipo 1 con un'espansione mesangiale diffusa (freccia lunga spessa) e nodulare (freccia corta spessa) e ialinosi dell'arteriola afferente (freccia doppia sottile) ed efferente (freccia singola sottile) (Periodic acid-Schiff [PAS] stain) [modificata da Fioretto P *et al.*, 2007].

Un'ulteriore alterazione strutturale che si verifica progressivamente nella DN è la fibrosi tubulo interstiziale. Contrariamente all'espansione mesangiale, dove l'accumulo di matrice svolge un ruolo cruciale, la fibrosi tubulo interstiziale pare collegata, negli stadi precoci, ad un aumento della componente cellulare dell'interstizio e solo negli stadi più tardivi ad un aumento della componente di matrice.

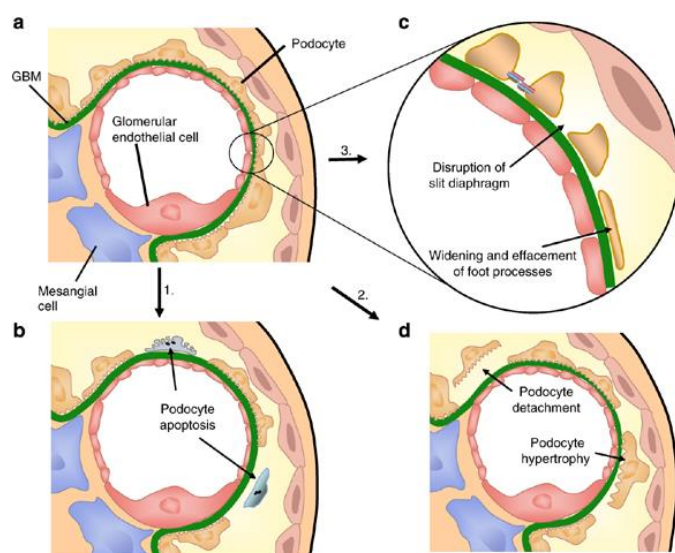


**Figura 3:** biopsia renale di un paziente con diabete di tipo 2 con ialinosi dell'arteriola afferente (freccia sottile verso destra) e efferente (freccia sottile verso sinistra), fibrosi interstiziale (freccia corta spessa) e atrofia tubulare (freccia lunga spessa) (periodic acid-Schiff [PAS] stain) [modificata da Fioretto P *et al.*, 2007].

L'aumento della componente cellulare è, in larga misura, mediato dalla reversione del fenotipo delle cellule epiteliali a mesenchimali, un processo noto come “*epithelial to mesenchymal transition*” (EMT) [Togawa H *et al.*, 2011]. Questa capacità di reversione comporta la perdita delle molecole di adesione cellulare come la caderina E (epiteliale) e delle proteine delle giunzioni occludenti come la zonulina ZO-1 (*zonula occludens protein 1*), che vengono sostituite da marcatori mesenchimali, quali l' $\alpha$ -actina del muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA) e la vimentina, proteina dei filamenti intermedi. La perdita dell'adesione cellulare è accompagnata dal rimodellamento del

citoscheletro e da cambiamenti morfologici che risultano nella rottura della membrana basale tubulare; di conseguenza, queste cellule possiedono la capacità di migrare nell'interstizio favorendo un incremento nella sintesi di matrice extracellulare e contribuendo quindi alla fibrosi interstiziale [Hills CE *et al.*, 2010]. A livello dei tubuli si possono verificare ulteriori modificazioni, quali l'ispessimento della membrana basale tubulare, determinato dall'accumulo di matrice, seguito da processi di atrofia tubulare (fig 3) [Tonolo G *et al.*, 2014].

Recenti studi hanno mostrato che nella DN si verificano precoci alterazioni strutturali e funzionali anche a carico dei podociti (fig. 4). I podociti, cellule epiteliali altamente specializzate che avvolgono i capillari glomerulari, aderiscono alla GBM attraverso le integrine  $\alpha3\beta1$  e  $\alpha2\beta1$ ; l'iperglicemia induce una deregolazione nell'espressione delle integrine, influenzando l'interazione tra podociti e la GBM [White KE *et al.*, 2002]. Diversi studi su pazienti con DN hanno mostrato anche una significativa riduzione del numero di podociti rispetto ad individui sani di controllo suggerendo una correlazione tra il numero di podociti e la progressione della DN [White KE *et al.*, 2002, Steffes MW *et al.*, 2001].



**Figura 4:** anomalie dei podociti nella DN. **a)** normale architettura dei podociti. **b)** alcuni podociti vanno incontro ad apoptosi. **c)** la normale architettura della fessura di filtrazione viene alterata a seguito della perdita/rilocalizzazione di alcune proteine. **d)** la normale funzione dei podociti è anche limitata da un' ipertrofia delle singole cellule con successivo distacco, con riduzione del loro numero [modificata da Jefferson JA *et al.*, 2008].

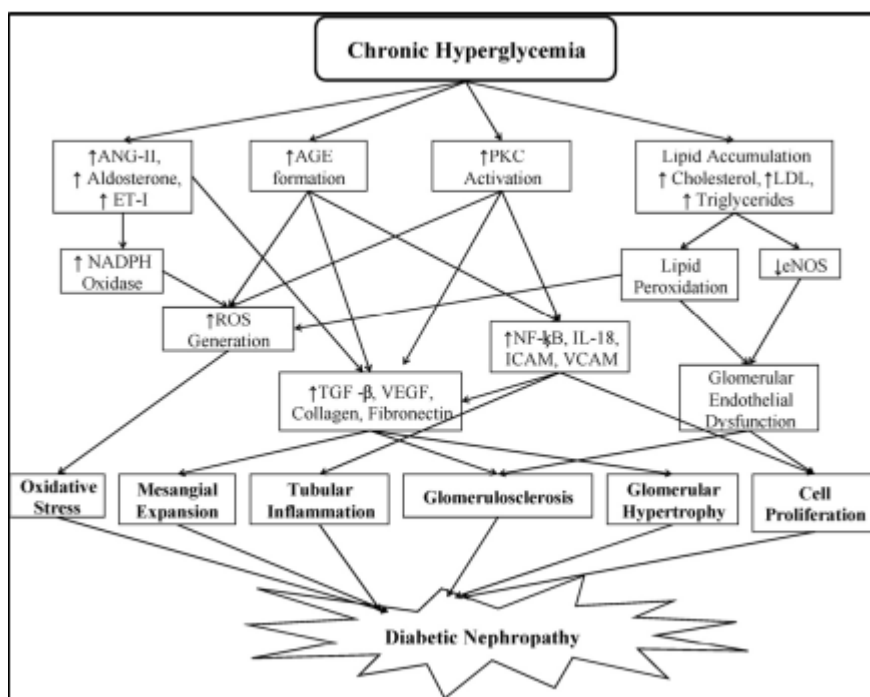
### 1.1.3.2. Cambiamenti emodinamici

I cambiamenti emodinamici glomerulari quali l'iperfiltrazione e l'iperperfusione giocano un ruolo centrale nello sviluppo della DN; insorgono precocemente e derivano da una riduzione della resistenza, e quindi dilatazione, delle arteriole afferente ed efferente del glomerulo. L'arteriola afferente sembra avere un decremento di resistenza maggiore rispetto alla efferente portando così ad un aumento della pressione capillare glomerulare. Diversi fattori sono coinvolti in questo difetto di autoregolazione, tra cui i prostanoidei, l'ossido nitrico (NO), il fattore natriuretico atriale (ANP), i VEGFs, il TGF- $\beta1$ , l'insulina, il glucagone e il sistema renina-

angiotensina, in special modo l'angiotensina II (ANG-II) [Hostetter TH *et al.*, 2003]. Questi precoci cambiamenti emodinamici facilitano la perdita dell'albumina [Wolf G. *et al.*, 2003].

### 1.1.3.3. Ruolo dell'iperglicemia

Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare come l'iperglicemia cronica possa causare danno tissutale: induzione del meccanismo di glicosilazione non enzimatica a generare "advanced glycation end products" (AGEs), stimolazione del pathway dell'aldoso reduttasi ("polyol pathway") e dell' "hexosamine pathway", attivazione della protein chinasi C (PKC); tutti questi pathways sono accomunati dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (fig. 5).



**Figura 5:** panoramica dei meccanismi di signalling coinvolti nella patogenesi della DN indotti dall'iperglicemia cronica [ modificata da Balakumar P *et al.*, 2009].

### Stress ossidativo

Le cellule del mesangio esprimono i trasportatori del glucosio GLUT-4 e GLUT-1 attraverso cui l'eccesso di glucosio extracellulare può facilmente entrare nelle cellule stesse. L'incremento dell'uptake di glucosio stimola la glicolisi ed il ciclo degli acidi tricarbossilici con conseguente overproduzione di donatori di elettroni (NADH e FADH<sub>2</sub>); a livello della membrana mitocondriale interna, questo genera un elevato potenziale di membrana fino a raggiungere una soglia limite ed il trasferimento degli elettroni all'interno del complesso III della catena di trasporto viene bloccato, provocando il ritorno degli elettroni stessi al coenzima Q, il quale li cede uno per volta all'ossigeno molecolare generando l'anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) [Heilig CW *et al.*, 2001; Haneda M *et al.*, 2003]. La formazione dei ROS non avviene solo a livello dei mitocondri; è stato visto infatti che, in presenza di alto glucosio, nei podociti viene stimolato il pathway della 12-lipoxigenasi che porta alla formazione di O<sub>2</sub><sup>-</sup> [Kang SW *et al.*, 2003]. Infine anche una riduzione di antiossidanti come il glutathione, tipica di uno stato diabetico, contribuisce



all'aumento dello stress ossidativo [Morrison J *et al.*, 2004]. Si ritiene che l'overproduzione di ROS sia in grado di attivare le vie alternative di utilizzo dell'eccesso di glucosio [Sawa A *et al.*, 1997; Habib SL, 2013]. Inoltre, è stato dimostrato che lo stress ossidativo stimola la produzione di citochine mediante l'attivazione del fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B [Elmarakby AA *et al.*, 2012].

### **Advanced glycation end-products (AGEs)**

In presenza di iperglicemia cronica, parte del glucosio in eccesso si combina in maniera non enzimatica con i gruppi amminici di proteine, acidi nucleici e lipidi formando i prodotti terminali della glicosilazione avanzata (*advanced glycation end products* o *AGEs*) [Ziyadeh FN *et al.*, 1997; Singh VP *et al.*, 2014]. Nella DN questo processo interessa primariamente le componenti strutturali della GBM e della matrice glomerulare e porta alla formazione dapprima di “*early glycosylation end products*”, reversibili, e successivamente di “*advanced glycosylation end products*”, irreversibili. Questi prodotti glicosilati alterano i processi di trasduzione del segnale modificando il livello di citochine, ormoni e radicali liberi; possono inoltre contribuire allo sviluppo delle alterazioni morfologiche [Heidland A *et al.*, 2001; Sasai Y *et al.*, 2012]. Alcuni degli AGEs meglio caratterizzati sono la pentosidina e la N-carbossimetil-lisina (CML); è stato visto che questi due prodotti si accumulano molto precocemente nell'area mesangiale e nella parete capillare glomerulare [Horie K *et al.*, 1997]. Il recettore degli AGEs, chiamato RAGE, è un recettore di membrana membro della famiglia delle immunoglobuline ed è ampiamente espresso in varie tipologie di cellule renali; la sua stimolazione determina l'attivazione di una via di trasduzione del segnale che porta, attraverso il fattore NF- $\kappa$ B, alla produzione di citochine pro infiammatorie e del TGF- $\beta$  [Yang SF *et al.*, 2003]. Il recettore RAGE può anche contribuire direttamente all'infiammazione in qualità di recettore di adesione endoteliale promuovendo così il reclutamento delle cellule infiammatorie [Chavakis T *et al.*, 2003].

### **Via dell'aldoso reduttasi, via dell'esosamina e protein kinasi C (PKC)**

Nella via dei polioli il glucosio viene convertito in sorbitolo dall'enzima aldoso reduttasi (ADH) e successivamente in fruttosio dall'enzima sorbitolo deidrogenasi (SDH). In seguito all'iperglicemia cronica parte del glucosio viene maggiormente indirizzato verso questa via; la riduzione del glucosio a sorbitolo richiede NADPH, che viene quindi sottratto al pathway di rigenerazione del glutathione, esacerbando lo stress ossidativo intracellulare. Inoltre, nella prima reazione della via dei polioli si forma un intermedio, il 3-deoxyglucone, che è un precursore degli AGEs. [Morrison J *et al.*, 2004].

Anche un aumento del flusso di glucosio attraverso il pathway dell'esosamina è stato correlato ai meccanismi patogenetici della DN, in particolar modo alla produzione del TGF- $\beta$ . In questa via il fruttosio-6-fosfato, intermedio della glicolisi, viene convertito in glucosammina-6-

fosfato e successivamente in *N*-acetilglucosammina. La glicosilazione del fattore trascrizionale Sp-1 mediante aggiunta della *N*-acetilglucosammina così prodotta stimola la trascrizione del TGF- $\beta$  [Kolm-Litty V *et al.*, 1998].

L'accumulo intracellulare di glucosio determina un incremento della sintesi *de novo* di diacilglicerolo (DAG) a partire da intermedi glicolitici come il diidrossiacetone fosfato. Il DAG attiva diverse isoforme di PKC, le quali stimolano le MAPK; queste ultime possono essere anche stimolate dai ROS ed esiste quindi un cross-talk tra i diversi meccanismi molecolari coinvolti. L'attivazione della PKC e delle MAPK produce un aumento della sintesi e della secrezione di prostanoidi, con funzione vasodilatatoria, che contribuiscono all'iperfiltrazione glomerulare [Shakher J *et al.*, 2011].

#### **1.1.3.4. Altri fattori patogenetici**

##### **Citochine e fattori di crescita**

Numerosi fattori di crescita, citochine, chemochine e agenti vasoattivi sono implicati nei cambiamenti strutturali e funzionali che si manifestano nella DN.

Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'IGF-I (*insulin-like growth factor-1*) induce la proliferazione e la produzione di matrice extracellulare in diverse popolazioni di cellule renali [Gooch JL *et al.*, 2001]. Inoltre l'incubazione di cellule mesangiali con il fattore IGF-I induce la sintesi di altri fattori di crescita come il VEGF [Gruden G *et al.*, 2003].

E' stato osservato che la sintesi di TGF- $\beta$  (*transforming growth-factor- $\beta$* ) in presenza di iperglicemia è mediata sia dai prodotti del pathway dell'esosammina sia dall'attivazione dell' ANG-II [Tsuchida KI *et al.*, 2001; Chou CH *et al.*, 2013]. Anche gli AGEs possono favorire la sintesi di questa citochina e l'*up*regolazione dei suoi recettori in diverse tipologie di cellule renali. Infine, l'ipertensione glomerulare rappresenta un ulteriore potente stimolo per l'espressione di TGF- $\beta$  [Kang MJ *et al.*, 2000]. Il TGF- $\beta$  è una citochina profibrogenica che stimola da un lato la produzione di numerose proteine della matrice extracellulare tra cui la fibronectina ed il collagene di tipo I-III e IV e dall'altro previene la degradazione delle componenti della matrice extracellulare attraverso l'inibizione delle metalloproteasi [Tsuchida KI *et al.*, 2002]. Inoltre, il TGF- $\beta$  regola l'espressione del cotrasportatore sodio-glucosio a livello delle cellule del tubulo prossimale [Panchapakesan U *et al.*, 2013; Tonolo G *et al.*, 2014].

Il CTGF (*connective tissue growth factor*) è un peptide di 36-38 KDa ricco in cisteina considerato un mediatore di alcuni effetti che si pensava essere indotti direttamente dal TGF- $\beta$ ; quest'ultimo infatti induce la trascrizione del CTGF in numerose cellule renali [Riser BL *et al.*, 2000]. Si ritiene, ad esempio, che sia il CTGF a mediare l'induzione del fenotipo mesenchimale delle cellule epiteliali del tubulo prossimale [Gore-Hyer E *et al.*, 2002].

Un ruolo importante è svolto anche dal VEGF (*vascular endothelial growth factor*), espresso nei podociti, nelle cellule dei tubuli distali e nel dotto collettore, mentre i suoi recettori VEGFR1 e VEGFR2 sono espressi sulla membrana delle cellule endoteliali, mesangiali e dei fibroblasti interstiziali. Diversi studi indicano un incremento dell'mRNA e della proteina VEGF a livello renale nelle prime fasi dello sviluppo della DN. Al contrario, è stata descritta una riduzione dell'espressione del VEGF nelle fasi avanzate con sclerosi del glomerulo, forse correlata alla perdita di podociti che si verifica al progredire della patologia [Masuda Y *et al.*, 2001]. In presenza di iperglicemia, l'espressione di VEGF è stimolata dal TGF- $\beta$  e dagli AGEs [Iglesias-de la Cruz M *et al.*, 2002; Wendt TM *et al.*, 2003]. Il VEGF stimola la sintesi della catena  $\alpha 3$  del collagene di tipo IV, un importante componente della GBM, contribuendone in tal modo all'ispessimento [Chen ZJ *et al.*, 2007].

### **Inflammation**

Diversi studi hanno preso in considerazione il ruolo della risposta infiammatoria nella patogenesi della DN [Wada T *et al.*, 2013]. Biopsie renali su pazienti con DN e studi su modelli animali hanno rivelato la presenza di cellule infiammatorie nei compartimenti glomerulare e tubulo-interstiziale [Noronha IL *et al.*, 2002]. Infatti nelle cellule mesangiali e tubulari renali l'iperglicemia stimola la sintesi di due chemochine, MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*) e RANTES, che favoriscono il reclutamento locale di macrofagi/monociti. [Mezzano S *et al.*, 2003]. Le citochine pro-infiammatorie che contribuiscono allo sviluppo della DN sono l'interleuchina-1 (IL-1), IL-6, IL-18 e il fattore di necrosi tumorale (TNF) [Duran-Salgado MB *et al.*, 2014]. L'IL-1 modifica l'espressione di fattori chemotattici e di molecole di adesione, ha effetti sull'emodinamica intraglomerulare influenzando la sintesi di prostaglandine da parte delle cellule mesangiali e può incrementare la permeabilità delle cellule endoteliali [Jones S *et al.*, 2001]. Il ruolo dell'IL-6 è fortemente correlato con l'ispessimento della GBM, con l'incremento della permeabilità endoteliale e con la proliferazione delle cellule mesangiali. L'IL-18 induce la produzione di altre citochine proinfiammatorie, quali l'IL-1, l'interferone  $\gamma$  e il TNF. Il TNF stesso causa invece danno renale diretto e influisce sull'apoptosi cellulare, sull'emodinamica glomerulare, sulla permeabilità endoteliale e sull'adesione cellulare.

Nel processo infiammatorio che si instaura durante il decorso della DN giocano un ruolo cruciale le molecole di adesione, quali ICAM-1, VCAM-1 e le selettine-E, la cui forte espressione a livello delle cellule endoteliali favorisce il reclutamento e l'extravasazione dei leucociti ai siti di danno tissutale [Devaraj S *et al.*, 2007, Mima A, 2013; Duran-Salgado MB *et al.*, 2014].

### **Sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS)**

L'iperglicemia cronica induce l'espressione di renina e angiotensinogeno, oltre che nel fegato, anche nelle cellule tubulari e mesangiali del rene, con conseguente incremento locale della concentrazione di ANG-II, che attraverso meccanismi autocrini e paracrini favorisce l'espressione di un'ampia batteria di fattori di crescita e citochine attraverso l'attivazione del fattore NF- $\kappa$ B [Vidotti DB *et al.*, 2004; Kamiyama M *et al.*, 2012]. L' ANG-II stimola l'espressione del TGF- $\beta$ , che favorisce la sintesi di matrice extracellulare da parte delle cellule mesangiali, e dell'inibitore di tipo 1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) con conseguente riduzione della degradazione di matrice [Kagami S *et al.*, 1997]. In aggiunta, l'ANG-II inibisce l'attività della collagenasi prodotta dalle cellule mesangiali, promuovendo anche in tal modo l'accumulo di matrice extracellulare [Singh R *et al.*, 1999]. L'ANG-II contribuisce inoltre all'insorgenza di proteinuria attraverso diversi meccanismi tra cui l'iperfiltrazione glomerulare, modificando la composizione della GBM e riducendo l'espressione della nefrina nei podociti (tab. II) [Wolf G *et al.*, 2003; Lo CS *et al.*, 2012].

**Tabella II:** effetti emodinamici e non-emodinamici mediati dall' ANG-II nella DN [modificata da Wiecek A *et al.*, 2003].

<b>EFFETTI EMODINAMICI</b>	<b>EFFETTI NON EMODINAMICI</b>
Ipertensione sistemica	Ipertrofia renale
Vasocostrizione sistemica e renale	Proliferazione cellulare
Aumento pressione dei capillari glomerulari	Sintesi di matrice extracellulare (ECM)
Aumento permeabilità dei capillari glomerulari	Inibizione della degradazione di ECM
Contrazione cellule mesangiali	Stimolazione produzione di citochine
	Stimolazione stress ossidativo

Recenti evidenze sperimentali hanno mostrato un possibile ruolo dell'aldosterone, in maniera indipendente dall'ANG-II, nell' induzione dello stato infiammatorio e nella sintesi di matrice extracellulare a livello renale di ratti diabetici [Cha DR *et al.*, 2005]. Inoltre è stato dimostrato che, nella DN, il RAAS attiva un secondo asse, mediante l'enzima ACE-2, presente a livello dei podociti, e la conseguente produzione dell'eptapeptide Ang(1-7), che antagonizza il signalling dell'ANG-II possedendo quindi attività renoprotettiva [Sampaio WO *et al.*, 2007; Soetikno V *et al.*, 2014].

### **Nefrina e Metalloproteasi di matrice**

La nefrina è una proteina espressa dai podociti che gioca un ruolo cruciale nel mantenimento dell'integrità strutturale della barriera di filtrazione renale: l'inattivazione del gene corrispondente causa una proteinuria massiva in modelli animali e morte neonatale [Benigni A *et al.*, 2004]. Nei pazienti con DN si assiste ad una marcata riduzione dell'espressione della nefrina

rispetto ad individui sani di controllo con conseguente alterazione della barriera di filtrazione glomerulare ed insorgenza di microalbuminuria; questa riduzione è dipendente in parte da un significativo aumento dell'escrezione urinaria della nefrina (17-30%) nei pazienti diabetici rispetto ad individui sani di controllo. L'escrezione della nefrina potrebbe rappresentare quindi una precoce evidenza del danno a carico dei podociti [Benigni A *et al.*, 2004; Wolf G *et al.*, 2007].

Diversi studi hanno dimostrato che un'alterata regolazione delle metalloproteasi di matrice (MMPs) contribuisce allo sviluppo alle prime fasi della patologia, caratterizzate da anomalie strutturali renali a livello glomerulare ed interstiziale con accumulo di ECM. Ad esempio, si è ipotizzato che la diminuzione del numero di podociti possa essere parzialmente causata dall'ispessimento della GBM, secondario all'alterazione del turnover della ECM mediato dalle MMPs [Wolf G *et al.*, 2005]. E' stato dimostrato inoltre che le MMPs possiedono anche un ruolo nel rilascio e nell'attivazione di diversi fattori di crescita associati all'ipertrofia renale, alla proliferazione delle cellule tubulari ed alla fibrosi tubulo-interstiziale quali il TGF- $\beta$ , il TNF- $\alpha$  e l'IGF [Zhuang S *et al.*, 2008].

### **Mediatori lipidici e microRNAs**

Anche piccoli lipidi che derivano dall'acido arachidonico sono implicati nella patogenesi della DN. La cicloossigenasi 2 (COX-2) trasforma l'acido arachidonico dando origine ai prostanoidi. E' stato visto che in ratti diabetici si assiste ad un incremento dei livelli di prostanoidi coinvolti nell'infiammazione, come le prostaglandine E2 e I2 [Imig JD *et al.*, 2006]. Inoltre, sempre in studi su modelli sperimentali diabetici, è stato riportato anche un aumento dell'espressione della stessa COX-2 a livello dei podociti, che si ritiene possa predisporre il rene al danno glomerulare [Hao CM *et al.*, 2007].

Recentemente, si è dimostrato il ruolo di diversi miRNA nella patogenesi della DN, in particolare delle famiglie dei miR-29 e dei miR-200, in associazione con il miR-192 ed il miR-21; tutti questi miRNA sono regolati, a livello delle cellule renali, dal TGF- $\beta$  ed hanno come bersagli principali gli mRNA che controllano i meccanismi associati alla produzione/distruzione della matrice extracellulare [Mc Clelland *et al.*, 2013]. La famiglia dei miR-200 gioca un ruolo chiave nella EMT inibendo l'espressione di alcuni repressori della E-caderina [Gregory PA *et al.*, 2008]. L'overespressione dei miR-29, che regolano positivamente l'espressione di numerosi tipi di collagene e del miR-21, che ha come target negativo, tra gli altri, anche la MMP-9, sembrerebbe favorire i meccanismi fibrotici [Wang B *et al.*, 2012; Wang J *et al.*, 2013]. Ancora controverso è invece il ruolo del miR-192.

### 1.1.4. Diagnosi e Prognosi

Il primo segno della presenza di DN è spesso un aumento dell'escrezione urinaria di albumina; l'esame delle urine standard è quindi il primo step diagnostico. Qualora l'esame delle urine risulti normale, l'eventuale presenza di nefropatia incipiente deve essere ricercata misurando l'escrezione urinaria di albumina, non rilevabile all'esame delle urine routinario, mediante una determinazione quantitativa con metodo radioimmunologico, nefelometrico o immunoturbidimetrico. Esistono varie metodiche di valutazione dell'albuminuria; la sua variabilità durante la giornata e in rapporto a condizioni fisiologiche quali l'esercizio fisico o i pasti, nonché la complessità delle raccolte temporizzate, fanno sì che il metodo maggiormente raccomandabile per valutazioni di screening sia il rapporto albumina/creatinina (A/C) sulle prime urine del mattino, in assenza di infezioni alle vie urinarie. Con tale metodica si definiscono normoalbuminurici i pazienti con rapporto A/C <2.3 mg/mmol se maschi e di 2.9 mg/mmol se femmine, e microalbuminurici quelli con rapporto compreso tra 2.3 e 19 mg/mmol, se maschi, o 2.9 e 20 mg/mmol, se femmine, in due su tre campioni non consecutivi [Mangili R *et al.*, 1996]. Nei pazienti così sottoposti a screening, l'eventuale incremento del rapporto A/C deve essere confermato con il dosaggio dell'albuminuria su raccolte temporizzate (AER, *albumin excretion rate*) che deve essere positivo in almeno due su tre campioni raccolti nell'arco di sei mesi. Con i metodi quantitativi si definisce microalbuminurico un paziente con valori di AER di 20-200 µg/min (o 30-300 mg/die) e macroalbuminurico un paziente con AER > 200 µg/min (o >300 mg/die).

**Tabella III:** definizione di microalbuminuria

	AER urinaria (mg/24h)	AER urinaria (µg/min)	Albuminuria/Creatinuria (mg/mg)
<b>Normoalbuminuria</b>	<30	<20	<0,02
<b>Microalbuminuria</b>	30-300	20-200	0,02-0,20
<b>Macroalbuminuria</b>	>300	>200	>0,20

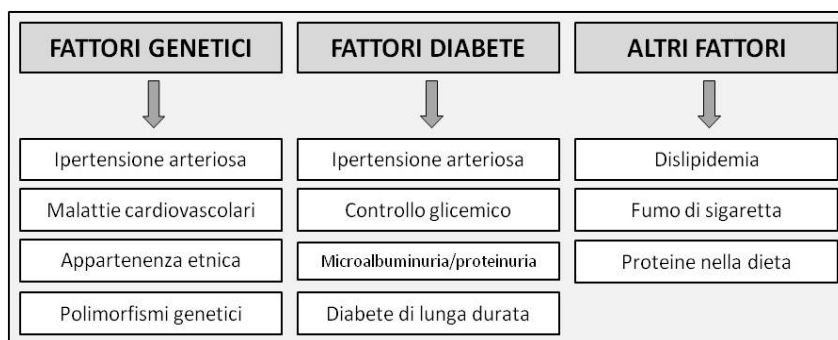
A questo livello di albuminuria è presente, di solito, proteinuria clinicamente rilevabile con i comuni sticks. L'albuminuria (A/C o AER) andrà ricontrollata ogni anno nei pazienti normoalbuminurici e ogni sei mesi in quelli macroalbuminurici. Se l'esame delle urine non rileva la presenza di una proteinuria dosabile, può essere utile eseguire il rapporto proteine/creatinina (P/C) (mg/mg) sulle urine del primo mattino; se è superiore a 1, è necessario procedere ad una valutazione nefrologica approfondita.

Un dato fondamentale per valutare l'entità della compromissione renale in corso di diabete è la stima del filtrato glomerulare (FG). Il metodo più diffuso per il suo calcolo è la misura della clearance della creatinina su urine delle 24 ore; una stima indiretta più agevole è la misura della

creatininemia (mg/dl) e il successivo calcolo del FG con l'opportuna formula. Tale dato deve essere valutato almeno annualmente nei pazienti normoalbuminurici e più frequentemente in presenza di nefropatia incipiente o conclamata [Pontremoli R *et al.*, 1997].

In occasione della prima diagnosi di micro-macroalbuminuria l'ecotomografia del rene e delle vie urinarie è utile a svelare possibili anomalie potenzialmente in grado di influenzare la progressione del danno renale (malformazioni delle vie urinarie, cisti renali etc.). Poiché sia la micro che la macroalbuminuria si associano ad una maggiore incidenza di eventi cardiovascolari, è necessario procedere alla valutazione degli altri fattori di rischio e del danno cardiovascolare (esame obiettivo, ECG, ecocardiogramma etc) [Hakim R *et al.*, 1993].

Sono stati identificati numerosi fattori di rischio per lo sviluppo e la progressione della DN; il loro ruolo relativo e i meccanismi patogenetici da essi evocati non sono tuttavia chiari, anche perché l'effetto di alcuni di essi è spesso interattivo e difficile da dissecare. Alcuni fattori sono non modificabili, mentre altri fattori possono essere modificati con una corretta terapia farmacologica o mediante cambiamenti nello stile di vita (fig.6).



**Figura 6:** fattori di rischio della nefropatia.

L'esistenza di fattori genetici è chiaramente indicata dal fatto che solo un sottogruppo di pazienti diabetici sviluppa danno renale. In tali pazienti è spesso riportata una maggiore frequenza di storia familiare positiva per ipertensione, nefropatie, malattie cardiovascolari. L'insorgenza e la progressione della DN sono considerati tratti genetici complessi; la modalità di trasmissione è poligenica, richiede cioè la presenza di particolari combinazioni di diverse varianti alleliche. L'approccio standard per l'identificazione di marcatori genetici indicativi di una eventuale predisposizione alla DN è rappresentato da studi di associazione su singoli geni candidati; l'attenzione è stata rivolta in particolare ai geni connessi con il sistema RAAS e soprattutto ai polimorfismi del gene codificante per l'enzima che converte l'ANG-I in ANG-II (ACE) [Canani LH *et al.*, 2005, Carpena MP *et al.*, 2010]. Un altro locus candidato che è stato studiato è il gene codificante per la *intestinal fatty acid binding protein-2* (FABP2). Infatti i pazienti con diabete di tipo 2 e microalbuminuria presentano elevati livelli di acidi grassi circolanti se comparati con i valori dei pazienti normoalbuminurici e l'assorbimento intestinale degli acidi grassi a lunga catena è controllato proprio dalla proteina FABP2 [Canani LH *et al.*, 2005]. Numerosi lavori si sono concentrati sul locus SLC2A1, codificante per il trasportatore del

glucosio GLUT-1, in particolare sul polimorfismo XbaI, situato nell'introne 2 [Liu ZH *et al.*, 1999; Ng DP *et al.*, 2005]. Tra gli altri loci che sono stati investigati in qualità di geni candidati troviamo quelli connessi con la resistenza all'insulina, come il gene ENPP1, ed i loci codificanti per: l'enzima aldoso reduttasi (AKR1B1), il PPAR $\gamma$ 2 (*peroxisome proliferator activated-receptor 2*), la catalasi, il recettore glicolico AGE (RAGE) ed un polimorfismo nel gene per la metilentetraidrofolato-reduttasi [Ng DP *et al.*, 2002, Canani LH *et al.*, 2002, Caramori ML *et al.*, 2003, Santos KG *et al.*, 2005, Santos KG *et al.*, 2006, Kumar R *et al.*, 2013]. Recenti studi di associazione genome-wide hanno permesso di identificare altri loci di suscettibilità per la DN, tra cui la *neurocalcina delta* (NCALD), l'*engulfment and cell-motility 1 gene* (ELMO1) e l'*acetyl-coenzyme A carboxylase beta* (ACACB) [Pezzolesi MG *et al.*, 2009; Maeda S *et al.*, 2009; Palmer ND *et al.*, 2012].

Un importante fattore prognostico nella DN è il controllo della glicemia. Trial randomizzati e controllati condotti su casistiche molto numerose sia negli Stati Uniti, il DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) nel diabete di tipo 1, che nel Regno Unito, l'UKPDS (*The UK Prospective Diabetes Study*) nel diabete di tipo 2, hanno dimostrato che l'ottimizzazione del controllo glicemico è in grado di ridurre la comparsa di microalbuminuria in entrambe le forme di diabete. In altri studi si è osservato che il corretto controllo dei valori glicemici contribuisce alla riduzione dell'iperfiltrazione glomerulare nelle fasi iniziali della patologia e può anche prolungare il periodo di tempo che precede l'insorgenza di proteinuria, ma non è in grado di limitare il progressivo decremento della velocità di filtrazione se il danno renale si è già instaurato, probabilmente a causa di fattori genetici predisponenti [Schmitz A *et al.*, 1994].

Inoltre l'ipertensione arteriosa e la DN appaiono strettamente correlate: è stata riscontrata nel 50% dei pazienti con diabete di tipo 1 e nell'80% dei pazienti di tipo 2 microalbuminurici. L'ipertensione in presenza di diabete viene definita dalla presenza di un valore di pressione sistolica  $\geq 130$  mmHg o di pressione diastolica  $\geq 80$  mmHg [Van Buren PN *et al.*, 2011]. E' ancora da chiarire se l'ipertensione preceda o segua gli stadi precoci della nefropatia e tra le varie ipotesi espresse due sembrano le più accreditate: la prima teorizza che l'ipertensione sia preceduta dal danno renale, l'altra che l'ipertensione sia predeterminata in un sottogruppo di soggetti per cause genetiche o ambientali, indipendentemente dalla malattia diabetica, e contribuisca direttamente a causare il danno renale [Deedwania PC, 2000].

In aggiunta, di regola una maggiore assunzione di proteine con la dieta si correla con una maggiore escrezione di albumina nelle urine [Toeller M *et al.*, 1997].

La dislipidemia è un fattore di rischio per lo progressione della DN sia nei pazienti con diabete di tipo 1 sia di tipo 2; essa può insorgere con la comparsa di microalbuminuria o di macroalbuminuria, specialmente nei pazienti di tipo 2, ed è caratterizzata da un aumento dei trigliceridi e del colesterolo-LDL e da una riduzione del colesterolo-HDL. Nei pazienti diabetici di tipo 2 proteinurici, è stata descritta una significativa correlazione tra i livelli sierici medi di trigliceridi ed il declino progressivo della funzionalità renale [Hovind P *et al.*, 2001].



### 1.1.5. Terapia

#### **Terapia farmacologica**

Dal momento che il sistema RAAS gioca un ruolo centrale nella patogenesi della DN, sono stati sviluppati agenti in grado di inibire la formazione dell' ANG-II come gli inibitori dell' enzima ACE (ACE-I) o agenti capaci di bloccare l'azione dell' ANG-II come i bloccanti del recettore AT1 (AIIIRA), che comprendono il captopril, il lisinopril, l'imidapril, mentre i bloccanti del recettore AT1 comprendono il losartan, l'irbesartan e l'olmesartan [Fernandez-Jouarez G *et al.*, 2013]. Il captopril è stato il primo farmaco approvato per il trattamento della DN; è in grado di ridurre la microalbuminuria in ratti diabetici e di prolungare la vita dei pazienti con nefropatia [Ha H *et al.*, 1999, Rodby RA *et al.*, 1996]. Il lisinopril è in grado di ritardare la progressione della DN e di ridurre l'incidenza di proteinuria sopprimendo l'espressione della chemochina MCP-1 [Amann B *et al.*, 2003]. Il losartan, prototipo dei bloccanti del recettore AT1, determina la downregolazione dell'espressione del TGF- $\beta$  e il blocco dell'attività della collagenasi prodotta dalle cellule mesangiali. [Singh R *et al.*, 1999]. La transfezione in ratti diabetici dell'enzima ACE-2, i cui effetti sono in grado di antagonizzare il signalling dell'ANG-II, si è dimostrata molto efficace nel ridurre l'albuminuria e nel preservare intatti i podociti, e potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico [Nadarajah R *et al.*, 2012]

Un'altra classe di farmaci impiegati nella DN è rappresentata dagli antagonisti dell'aldosterone; infatti la produzione renale di aldosterone induce infiammazione e accumulo di matrice extracellulare. E' stato visto che il trattamento con spironolactone, antagonista del recettore dell'aldosterone, determina downregolazione del TGF- $\beta$ , delle metalloproteasi, del VEGF e dell'IGF [Han SY *et al.*, 2006]. E' stato inoltre osservato che il trattamento con spironolactone riduce lo stress ossidativo e attenua la produzione della chemochina MCP-1 [Takebayashi K *et al.*, 2006]. Recentemente, è stato dimostrato che la somministrazione del FAD286, un inibitore dell'aldosterone sintetasi, determina una riduzione dell'espressione renale dell' NF- $\kappa$ B, dell' IL6, del TGF-  $\beta$ , della fibronectina e del collagene di tipo IV [Sirgay HM *et al.*, 2008].

I bloccanti dei canali del calcio rappresentano una classe eterogenea di agenti vasodilatatori antiipertensivi ed è stato visto che il loro utilizzo è in grado di rallentare la progressione della DN; tra i bloccanti più utilizzati troviamo la nicardipina, il verapamil, la nifedipina e il diltiazam. Ad esempio è stato visto che l'utilizzo della nicardipina preserva la funzionalità renale riducendo l'albuminuria nei pazienti ipertesi con DN [Baba T *et al.*, 1990]. Inoltre è stato dimostrato anche il potenziale antiossidante di questi farmaci; infatti in ratti diabetici con nefropatia il trattamento con diltiazam determina protezione renale riducendo primariamente lo stress ossidativo e prevenendo l'ispessimento della GBM e la fibrosi tubulointerstiziale [Muragundla A *et al.*, 2005]. E' anche stato dimostrato che la somministrazione di un anticorpo anti TGF-  $\beta$  o di oligonucleotidi antisense contro il suo trascritto sono in grado di

sopprimere la fibrosi renale e di ridurre l'albuminuria in ratti diabetici con nefropatia [Hill C *et al.*, 2001; Jeong HS *et al.*, 2004].

Un altro bersaglio della terapia farmacologica è costituito dagli AGEs: sono stati infatti proposti diversi agenti inibitori degli AGEs tra cui: l' OPB-9195, l' ALT-946, l' ALT-711, l' aminoguanidina. Ad esempio, la somministrazione dell' OPB-9195 in ratti diabetici con nefropatia è in grado di prevenirne la progressione sopprimendo l'espressione del TGF-  $\beta$ , del VEGF e del collagene di tipo IV [Tsuchida K *et al.*, 1999]. L'ALT-946 e l'aminoguanidina possiedono effetto renoprotettivo, inibendo l'accumulo degli AGEs ed inibendo l'espressione del CTGF, rispettivamente [Forbes JM *et al.*, 2001; Twigg SM *et al.*, 2002].

E' stato osservato che la ruboxistaurina, un inibitore della PKC, possiede effetto renoprotettivo riducendo l'albuminuria, inibendo l'accumulo della ECM e diminuendo l'espressione glomerulare del TGF-  $\beta$  in ratti diabetici con nefropatia [Tuttle KR *et al.*, 2003; Menne J *et al.*, 2013].

Numerosi farmaci agiscono infine rallentando ed inibendo la forte risposta infiammatoria tipica della DN [Mima A, 2013]: la pentoxifillina inibisce l'espressione del TNF- $\alpha$  [Navarro JF *et al.*, 2005], la rapamicina inibisce la migrazione delle cellule infiammatorie quali monociti e macrofagi [Lieberthal W *et al.*, 2009], gli agonisti del fattore PPAR- $\gamma$  (*peroxisome proliferator activator receptor*) determinano la riduzione dell'espressione di marker infiammatori come l'NF-Kb [Ko GJ *et al.*, 2008].

### **Terapia sostitutiva**

I pazienti diabetici presentano in genere una scarsa tolleranza alla dialisi e, mediamente, un'elevata mortalità. Le condizioni nelle quali questi pazienti giungono al trattamento sostitutivo possono influenzarne sensibilmente i risultati. In particolare, un buon controllo glicemico pre-dialisi è in grado di predire una miglior sopravvivenza del paziente [Wu MS *et al.*, 1997]. Nella progressione della DN un avvio precoce del trattamento sostitutivo è reso opportuno da diverse ragioni: il difficile controllo degli edemi e dell'ipertensione arteriosa, i rischi della malnutrizione proteica qui accentuata dalla proteinuria elevata e dalle restrizioni dietetiche, la veloce caduta della funzione renale, che spesso si verifica nelle fasi terminali della DN. Non esiste consenso unanime riguardo l'effetto sulla sopravvivenza del tipo di trattamento depurativo artificiale ma, secondo diversi studi, la dialisi peritoneale (PD) e l'emodialisi (HD) permettono analoghe sopravvivenze almeno a medio termine [Bloembergen WE *et al.*, 1995]. Non sono state inoltre notate differenze tra le due metodiche nei confronti della progressione della neuropatia e della vasculopatia periferica; si può pertanto ritenere che la scelta tra PD e HD debba essere fondamentalmente legata alla preferenza del paziente, ad eventuali opportunità cliniche e, solo subordinatamente, ad esigenze organizzative.

## **Trapianto**

Il trapianto renale e il trapianto combinato rene-pancreas rappresentano attualmente una valida opzione nel paziente diabetico con ESRD. Ciò nonostante, la percentuale di diabetici con ESRD sottoposta a trapianto è limitata. A causa del frequente e rilevante deterioramento cardiovascolare cui è soggetto in corso di terapia dialitica, il paziente diabetico corre un rischio maggiore di essere escluso precocemente da questa opzione di trattamento; è opportuno quindi che il suo inserimento in lista di attesa sia tempestivo, meglio se nella fase predialitica. Pertanto, andrebbe incoraggiato il precoce inserimento di questi pazienti in programmi di trapianto, che sono in grado di garantire un netto incremento dell'aspettativa di vita, oltre che un miglioramento della qualità della vita, rispetto a pazienti in trattamento sostitutivo. L'opzione migliore nei pazienti uremici con diabete di tipo 1 sembra essere rappresentata dal trapianto combinato di rene e pancreas; questo trapianto simultaneo rappresenta infatti la migliore opzione per la sopravvivenza sia degli organi trapiantati sia dei pazienti. Rispetto al solo trapianto renale, il trapianto combinato di rene e pancreas è tuttavia, come ovvio, più problematico per una maggiore morbilità infettiva e chirurgica [Hricik DE *et al.*, 1998].

### **1.1.6. Biomarcatori della DN**

I biomarcatori possono essere definiti come indicatori di eventi clinici importanti come l'inizio di una malattia, la recidiva, la progressione o la morte del paziente; possono inoltre essere utilizzati nella valutazione del rischio, nello screening, nella diagnosi, nella prognosi e nella determinazione dei benefici di specifiche terapie [Sturgeon CM *et al.*, 2008].

La microalbuminuria, prima evidenza clinica di sviluppo della DN, nonostante permetta di identificare la presenza di un danno renale, è un marcatore non specifico, specialmente nei soggetti con diabete di tipo 2; infatti solo il 30-45 % dei pazienti di tipo 2 microalbuminurici sviluppa proteinuria conclamata entro 10 anni ed inoltre la microalbuminuria è stata proposta anche come marcatore di alto rischio cardiovascolare in pazienti diabetici e non [Mancia G *et al.*, 2009]. Tra i biomarkers di danno glomerulare nella DN che possono essere misurati nelle urine troviamo la transferrina e il collagene di tipo IV: alcuni studi hanno rivelato che un significativo aumento dell'escrezione urinaria di transferrina può precedere la comparsa di microalbuminuria [Narita T *et al.*, 2006, Hellemans ME *et al.*, 2012], e che i livelli urinari di collagene di tipo IV possono correlare con l'andamento dell'albuminuria nei pazienti di tipo 2 [Sthaneshwar P *et al.*, 2010]. I biomarcatori di danno tubulare sono invece tipicamente enzimi urinari tra cui: l' $\alpha$ 1-microglobulina, la  $\beta$ 2-microglobulina, la *retinol binding protein* (RBP), la *liver-type fatty acid binding protein* (L-FABP), la *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) e la *kidney injury molecule-1* (KIM-1). Ad esempio, è stato visto che la NGAL urinaria è predittiva del declino del GFR nei pazienti di tipo 2 con micro- o macroalbuminuria [Nielsen SE *et al.*, 2012]. La L-FABP

urinaria risulterebbe invece fortemente incrementata prima della comparsa dei segni di danno glomerulare [Nielsen SE *et al.*, 2009]. Uno studio recente rivela l'importanza di un approccio di tipo multimarker, utilizzando l'associazione di 7 marcatori urinari di infiammazione, per stabilire una corretta prognosi in pazienti con diabete di tipo 2 [Verhave JC *et al.*, 2013].

A partire dal 2004 è stata posta grande attenzione, nella ricerca di biomarcatori della DN, agli approcci di proteomica, che consentono di analizzare l'intero set di proteine espresse in un campione biologico in un determinato momento [Merchant ML *et al.*, 2010, Moresco RN *et al.*, 2013]. In questo contesto le urine rappresentano il fluido biologico di maggior interesse in quanto la loro composizione proteica può riflettere le anomalie funzionali renali associate alla DN; tuttavia, alcuni studi si sono concentrati anche sull'analisi proteomica del siero di pazienti diabetici di tipo 2. Per la separazione ed identificazione delle proteine, viene per lo più utilizzata la tecnica dell'elettroforesi bidimensionale (2D), che fornisce una stima semi-quantitativa dell'ammontare delle proteine separate e consente di avere informazioni relative al loro peso molecolare ed alle loro modificazioni post-traduzionali, seguita poi da analisi di spettrometria di massa (MS) [Thongboonkerd V, 2011]. La maggior parte dei lavori sono stati effettuati sui pazienti con diabete di tipo 2 mentre pochi si sono concentrati sui pazienti di tipo 1. Il disegno sperimentale in entrambi i casi richiede la presenza di gruppi controllo; in generale, uno di questi gruppi è necessariamente costituito da pazienti diabetici ma senza microalbuminuria; si tratta di un controllo obbligatorio in quanto i biomarkers del diabete non devono essere confusi con i marcatori autentici di nefropatia. Poiché nella maggior parte di questi studi, il gruppo target di analisi è rappresentato da pazienti con diabete di tipo 2 con microalbuminuria, il disegno sperimentale non è adeguato per l'identificazione di marcatori più precoci rispetto all'insorgenza di microalbuminuria.

In particolare, un lavoro di proteomica (2DIGE e LC-MS/MS) del 2007 di Rao PV *et al.* ha permesso di identificare sets distinti di proteine differenzialmente espresse nelle urine di individui diabetici con nefropatia rispetto ad individui diabetici senza nefropatia e a soggetti di controllo sani (Rao PV *et al.*, 2007). In particolare 7 proteine sono risultate significativamente overespresse e 4 proteine significativamente downregolate in pazienti con DN (con macroalbuminuria) rispetto a pazienti diabetici senza albuminuria. Tra le proteine overespresse sono state identificate:  *$\alpha$ -1B glycoprotein*: proteina omologa alla superfamiglia delle immunoglobuline, che ne suggerisce un possibile ruolo nelle risposte immunitarie indotte nella nefropatia.

*Zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein*: stimola la degradazione lipidica negli adipociti e può legare acidi grassi poliinsaturi.

*Fetuin A ( $\alpha$ 2-Heremans-Smith glycoprotein precursor)*: glicoproteina correlata all'infiammazione che agisce come inibitore della calcificazione sistemica.

Hemopexina ( $\beta$ -1B-glycoprotein): lega l'eme e lo trasporta al fegato per la sua degradazione ed il recupero del ferro. Potrebbe agire in qualità di proteasi tossica contribuendo alla proteinuria ed alle alterazioni glomerulari [Bakker WW *et al.*, 2005].

VDBP: proteina multifunzionale che si può associare alle immunoglobuline di membrana dei linfociti B e dei linfociti T, suggerendo un suo possibile ruolo nell'immunopatogenesi della nefropatia.

Calgranulina B: inibitore delle protein chinasi espressa dai macrofagi nei tessuti infiammati. Non è noto il suo possibile ruolo nella DN.

AIAT: inibitore delle serin-proteasi ed il suo target primario è l'elastasi. E' stato riportato che i livelli di questa proteina e della  $\alpha$ 1- acid glycoprotein sono significativamente aumentati nel siero di pazienti con DN rispetto ai controlli sani.

Tra le proteine downregolate sono state identificate:

Transtiretina (prealbumina): proteina secreta dal fegato che trasporta ormoni tiroidei. Il 40 % della proteina circola nel plasma in uno stretto complesso con la retinol-binding-protein (RBP), proposto come marcatore urinario di danno glomerulare [Lisowska-Myjak B, 2010].

AMBP: contiene sia la  $\alpha$ 1-microglobulina sia la bikubina. Quest'ultima ha potenziale antiinfiammatorio; tuttavia non è noto se i livelli di questa proteina siano in grado di modificare la risposta immunitaria nella DN.

ApoA-I: agisce come cofattore dell'enzima lecitina-colesterolo aciltransferasi, che partecipa al trasporto del colesterolo dai tessuti al fegato. Non sono ad oggi state riportate particolari associazioni tra l'ApoA-I e la DN.

In un altro importante lavoro, Kim HJ *et al.* [Kim HJ *et al.*, 2007] hanno utilizzato approcci di proteomica (2DIGE e LC-ESI-MS/MS) al fine di identificare proteine sieriche differenzialmente espresse in pazienti di tipo 2 con microalbuminuria rispetto a pazienti senza microalbuminuria da poter utilizzare come biomarkers per la progressione della DN. Sono state identificate diverse proteine differenzialmente espresse ma l'attenzione è stata primariamente focalizzata sulle proteine eGPx e apoliproteinaE (ApoE). GPx è un enzima antiossidante che catalizza la riduzione del perossido di idrogeno e dei perossidi lipidici a spese del glutatione ed è coinvolto nella difesa contro lo stress ossidativo generato dai ROS. Recenti evidenze indicano che la principale sorgente dell'isoforma extracellulare (eGPx) è rappresentata dalle cellule epiteliali del tubulo prossimale del nefrone; Kim HJ *et al.* hanno osservato una significativa riduzione dell'espressione di questa isoforma nei pazienti di tipo 2 con microalbuminuria rispetto ai pazienti senza microalbuminuria.

L'apoliproteina E (ApoE) è una proteina chiave nel trasporto del colesterolo, possiede proprietà antiossidanti ed una funzione regolatoria nell'infiammazione. L'ApoE è fondamentale anche nella protezione renale in quanto è in grado di regolare la proliferazione delle cellule mesangiali e l'accumulo della matrice extracellulare. E' stato visto che l'ApoE è significativamente

*down*-regolata nei pazienti di tipo 2 con microalbuminuria rispetto ai pazienti senza microalbuminuria.

Altri autori, mediante un approccio proteomico SELDI-TOF/MS, hanno rilevato una significativa escrezione di *β2-microglobulin* nelle urine di pazienti microalbuminurici rispetto a quelli normoalbuminurici [Dihazi H *et al.*, 2007; Papale M. *et al.*, 2010].

Più recentemente, Zurbig P *et al.*, attraverso elettroforesi capillare accoppiata a MS su una coorte di pazienti di tipo 1 e di tipo 2, hanno confermato che i frammenti urinari di collagene rappresentano i più importanti biomarkers di DN prima dell'insorgenza di macroalbuminuria, dimostrando una significativa riduzione di questi frammenti prima che l'albumina nelle urine cominci ad incrementare [Zurbig P *et al.*, 2012]. Infine, ulteriori studi di proteomica su urine di modelli animali di DN propongono come nuovi possibili marcatori precoci di DN l'osteopontina e i livelli urinari di mRNA della fibronectina e della matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) [Alter ML *et al.*, 2012, Zheng M *et al.*, 2012].

### **1.1.7. Modelli animali di DN**

La comprensione dei meccanismi patogenetici coinvolti nella DN ha subito una lenta evoluzione, anche a causa della mancanza di modelli animali che permettessero di mimare completamente le condizioni patologiche umane. Per tale motivo nel 2001 è stato istituito un consorzio sui modelli animali per le complicazioni diabetiche (AMDCC), creato dal National Institute of Health (NIH), in cui sono descritti i modelli murini maggiormente utilizzati per riprodurre le condizioni umane e nel quale vengono inoltre definite le linee guida per ottenere e mantenere tali modelli [Brousius F *et al.*, 2009].

Per studiare i pathway coinvolti nell'insorgenza della DN sono comunque oggi utilizzati diversi modelli animali, primariamente di topo e di ratto. Ad esempio, in un lavoro di Cheng H *et al.*, viene usato un modello murino di diabete di tipo 2 per investigare nei podociti il ruolo della COX-2 nell'incremento dell'espressione del recettore della (Pro)-renina, che contribuisce all'evoluzione del danno tissutale [Cheng H *et al.*, 2011]. Nel dettaglio, vengono utilizzati topi eNOS *-/-* db/db (dove il simbolo “*-/-*” indica la totale mancanza dell'enzima eNOS, ossido nitrico sintasi endoteliale, e “db/db” indica l'omozigosi recessiva della variante allelica del gene che codifica per il recettore della leptina), in cui la COX-2 risulta significativamente *up*-regolata, non solo nella macula densa ma anche nei glomeruli renali, nei podociti e nelle cellule del mesangio. Utilizzando il medesimo modello sperimentale, il gruppo di ricerca di Zhang Y *et al.* ha approfondito il ruolo della pressione sanguigna e del sistema RAAS nello sviluppo della DN [Zhang Y *et al.*, 2012].

Di recente, è stato utilizzato come modello sperimentale per lo studio della DN anche lo *Psammomys obesus*, detto in gergo "topo del deserto" o "topo delle sabbie", un roditore che vive nelle zone sabbiose e desertiche del Nord Africa e del Medio Oriente. Si è visto che tale specie ha

la peculiarità di diventare obesa soltanto quando viene catturata. Per esempio, in un lavoro di Scherzer P, per mimare un modello di diabete di tipo 2, lo *Psammomys obesus* è stato cresciuto seguendo una dieta ad alto contenuto energetico. Passando da un regime dietetico ad alto tenore di fibre ad una ricca in carboidrati sviluppa il diabete con un meccanismo molto simile a quello umano [Scherzer P *et al*, 2011].

Per quanto riguarda i modelli di ratto, vi sono numerosi lavori in cui è stata riprodotta la DN a partire da ratti inoculati con basse dosi multiple di streptozotocina (STZ) o di alloxano, che inducono uno stato iperglicemico, ma questa procedura viene maggiormente utilizzata per indurre il diabete di tipo 1, in quanto entrambi vanno a distruggere le cellule del pancreas secernenti l'insulina. La STZ è naturalmente sintetizzata da *Streptomyces achromogenes*; in seguito alla sua somministrazione, viene internalizzata dalle cellule  $\beta$ -pancreatiche attraverso il trasportatore Glut-2 e causa alchilazione del DNA e produzione di radicali liberi [Szkudelski T *et al.*, 2001, King AJF, 2012]. Alte dosi di STZ vengono invece utilizzate per lo studio di modelli di trapianto delle isole pancreatiche o di putative cellule staminali [Deeeds MC *et al.*, 2011].

Poiché il diabete di tipo 2 è strettamente correlato all'obesità, la maggior parte dei modelli animali ad oggi utilizzati per mimare le condizioni tipiche di questa forma di diabete sono obesi [King AJF *et al.*, 2012]. Il modello di ratto più ampiamente utilizzato è il ratto ZDF (*Zucker Diabetic Fatty rat*), largamente impiegato per studiare i meccanismi associati all'insulino-resistenza. La mutazione responsabile del fenotipo ZDF fu scoperta dai fratelli Zucker nel 1961, in contemporanea con Sherman e Merck; il ratto omozigote per l'allele recessivo "fa" del gene OB-R codificante per il recettore della leptina, ormone importante nel ratto per la regolazione del metabolismo glucidico, diventa notevolmente obeso già a 3-5 settimane, e dopo 14 settimane la composizione corporea è costituita per il 40% da lipidi (Zucker LM & Antoniadis HN, 1972). In particolare, i ceppi ZDF hanno una mutazione puntiforme Gln269Pro a livello del dominio extracellulare del recettore della leptina, che comporta la deregolazione del signalling dell'ormone stesso e, di conseguenza, una difettosa regolazione dell'appetito, iperfagia e ridotta termogenesi. Il diabete di tipo 2 si manifesta in questi ratti maschi se associato alla somministrazione di una particolare dieta, ricca di carboidrati, ed è associato inizialmente ad iperinsulinemia ed iperglicemia. I livelli di glucosio diventano stabilmente elevati attorno alle 10-12 settimane di età, raggiungendo livelli medi di circa 500 mg/dl. Contemporaneamente, i livelli di insulina diminuiscono e si sviluppa la nefropatia. I ratti maschi obesi ZDF sono stati e sono tuttora modelli fondamentali per studiare la cascata di eventi fisiopatologici associati all'instaurarsi ed allo sviluppo del diabete di tipo 2, dato che tali fenomeni nel modello sperimentale mimano molto da vicino non solo l'esordio ma anche la progressione della malattia e delle sue complicanze nell'uomo. Un recente lavoro ha, inoltre, preso in considerazione l'appropriatezza dei ratti Zucker come modello delle complicanze diabetiche di tipo microvascolare tardive ed ha concluso che essi costituiscono un adeguato modello di DN [Hempe

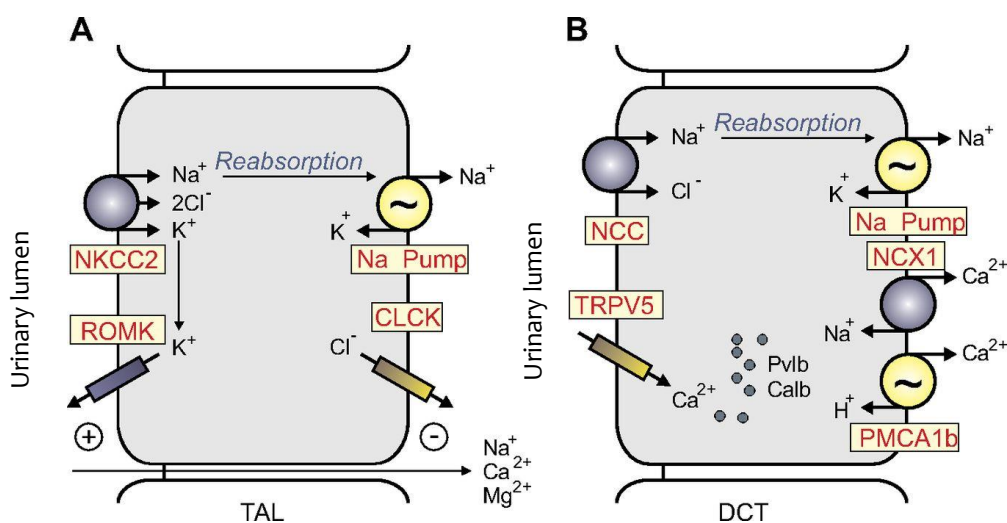
J *et al*, 2012]. Per studiare l'evoluzione delle complicanze renali in presenza di diabete 2 vengono largamente impiegati anche i ratti maschi OLETF (*Otsua Long-Evans Tokushima Fat rat*), in cui è presente una moderata condizione di obesità e l'iperglicemia insorge molto tardivamente, dopo 18 settimane di vita [Lee MY *et al.*, 2011a].

## 1.2. TUBULOPATIE

Per tubulopatia si intende un difetto, acquisito o congenito, anatomico o funzionale del tubulo renale. Le malattie del tubulo renale riguardano soprattutto l'omeostasi idroelettrolitica e l'equilibrio acido-base. Tra le principali tubulopatie ritroviamo acidosi tubulari renali, ipercalciuria idiopatica, rachitismo ipofosfatemico, diabete insipido nefrogenico e le ipopotassiemie di origine reno-tubulare, tra le quali la sindrome di Gitelman e la sindrome di Bartter.

### 1.2.1. Ipotassiemie di origine reno-tubulare

Le ipopotassiemie di origine reno-tubulare configurano un gruppo eterogeneo di malattie rare ereditarie trasmesse con modalità autosomica recessiva e caratterizzate da riduzione del riassorbimento di NaCl a livello dell'ansa di Henle e/o dei tubuli renali distali [Bettinelli A *et al.*, 2008] (fig. 7). Caratteristiche biochimico-cliniche comuni a queste sindromi sono l'ipopotassiemia, l'alcalosi metabolica, l'iperaldosteronismo e l'iper-reninemia con normotensione. L'ipopotassiemia cronica può in alcuni casi determinare l'insorgenza di diarrea e vomito ed un aumentato rischio di rhabdmiolisi ed aritmie cardiache [Cortesi C *et al.*, 2010; Fremont OT *et al.*, 2012].



**Figura 7:** Meccanismi di riassorbimento di Na+Cl- a livello del tratto spesso ascendente dell'ansa di Henle, TAL (A) e del tubulo contorto distale, DCT (B). NKCC2, cotrasportatore Na+K+2Cl- di tipo 2; ROMK, canale renale del potassio; CLCK, canale renale del cloro; TRPV5, canale renale del calcio; NCX1, scambiatore sodio-calcio; PMCA1b, scambiatore sodio-protoni [modificata da Gagnon KB *et al.*, 2013]



Tra le ipopotassiemie di origine reno-tubulare possiamo distinguere due condizioni principali, ossia la sindrome di Bartter (a sua volta suddivisa in 5 sottotipi) e la sindrome di Gitelman (tab. IV). Entrambe le sindromi sono molto rare: la Gitelman ha un'incidenza pari a 25:1.000.000 (Knoers NVAM *et al.*, 2008) mentre la prevalenza dei Bartter è 1:1.000.000 (Framingham Heart Study). Il valore di queste stime risulta ancor più immediato se si considera che negli Stati Uniti la fibrosi cistica, una tra le patologie rare più conosciute, ha una prevalenza di circa 1 su 4.000 bambini [Russel P., 2011].

**Tabella IV:** classificazione tradizionale delle sindromi di Bartter e Gitelman [modificata da Emma F *et al.*, 2011].

Sindrome	Gene	Proteina	Localizzazione principale	Dati biochimici e Sintomi
<b>Bartter I</b>	SCL12A1	NKCC2 (cotrasportatore Na-K-2Cl)	TAL	IpoK, alcalosi metabolica, ipereninemia in normotensione, nefrocalcinosi; parto pre-termine, polidramnios, crampi muscolari, astenia
<b>Bartter II</b>	KCNJ1	ROMK (canale del K)	TAL	IperK neonatale seguita da IpoK, alcalosi metabolica, ipereninemia in normotensione, nefrocalcinosi; parto pre-termine, polidramnios, crampi muscolari, astenia
<b>Bartter III</b>	CLCNKB	CIC-Kb (canale del Cl)	TAL, DCT	IpoK, alcalosi metabolica, ipereninemia in normotensione; deficit di accrescimento, crampi muscolari, astenia
<b>Bartter IV</b>	BSND	Barttina (subunità di CIC-Ka e CIC-Kb)	TAL, orecchio interno	IpoK, alcalosi metabolica, ipereninemia in normotensione; sordità, insufficienza renale cronica, deficit di accrescimento, crampi muscolari, astenia
<b>Bartter V**</b>	CLCNKA & CLCNKB	CIC-Ka e CIC-Kb	TAL, DCT, orecchio interno	IpoK, alcalosi metabolica, ipereninemia in normotensione; sordità, insufficienza renale cronica, deficit di accrescimento, crampi muscolari, astenia
<b>Gitelman</b>	SLAC12A3	NCCT (cotrasportatore Na-Cl)	DCT	IpoK, alcalosi metabolica, ipereninemia in normotensione, ipomagnesemia, ipocalciuria; tetania, crampi muscolari, astenia

\*\*Sindrome digenica

TAL: Tratto Ascendente Spesso dell'Ansa di Henle

DCT: Tubulo Convoluta Distale

Una nuova e differente classificazione, basata sulla farmacologia dei trasportatori e dei canali coinvolti nelle tubulopatie ereditarie, è stata inoltre recentemente proposta da Seyberth HW *et al.* (tab. V) [Seyberth HW *et al.*, 2008; Seyberth HW *et al.*, 2011].

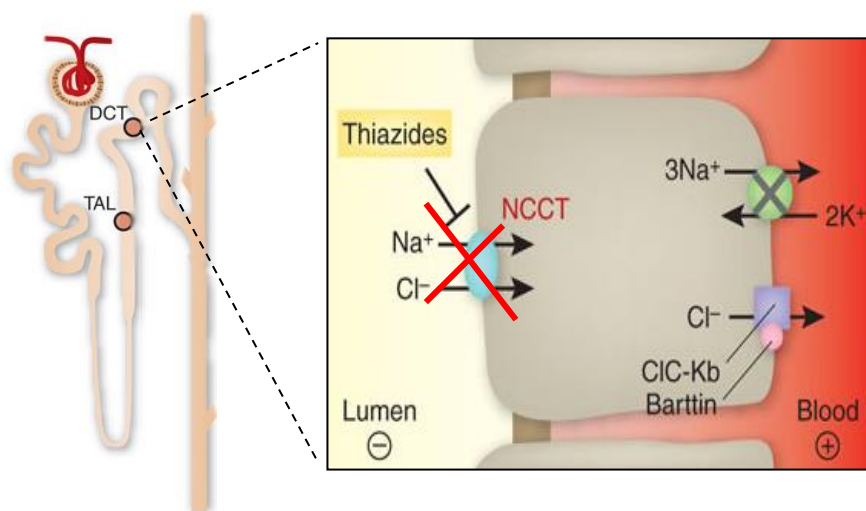
Tipo di disordine	Sensibilità Farmacologica
<b><u>Disordini del TAL</u></b>	
L1 (NKCC2)	Furosemide
L2 (ROMK)	Furosemide-Amiloride
<b><u>Disordini del DCT</u></b>	
DC1 (NCCT)	Tiazidi
DC2 (CIC-Kb)	Tiazidi-Furosemide
<b><u>Disordini combinati</u></b>	
L-DC1 (CIC-Ka + b)	Furosemide-Tiazidi
L-DC2 (barttina)	Furosemide-Tiazidi

**Tabella V:** classificazione delle tubulopatie ereditarie sulla base degli aspetti farmacologici dei trasportatori e dei canali coinvolti [modificata da Seybert HW *et al.*, 2008; Seyberth HW *et al.*, 2011].

### 1.2.2. Sindrome di Gitelman

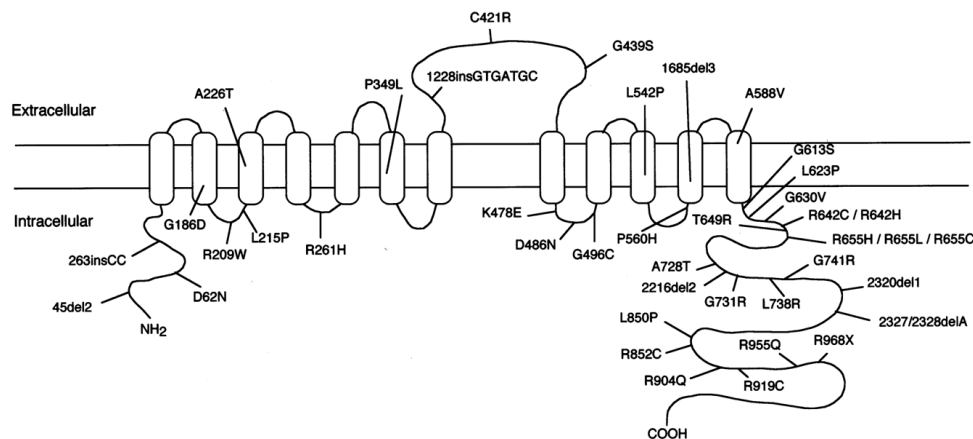
La sindrome di Gitelman, descritta inizialmente nel 1966, è un disordine renale tubulare ereditario a carattere autosomico recessivo e, in alcune famiglie, pseudo-dominante [Bettinelli A, Bianchetti M. *et al.*, 1995], caratterizzato da alcalosi metabolica ipokaliemica in combinazione con ipomagnesemia e bassi livelli di calcio urinario [Knoers NVAM., 2008]; recentemente sono stati anche descritti alcuni casi associati ad ipocalcemia [Desai M *et al.*, 2013]. La sindrome di Gitelman si manifesta tipicamente nel bambino al di sopra dei sei anni di età oppure durante l'adolescenza o nel giovane adulto; l'80% dei pazienti presenta vertigini e stanchezza, il 70% rivela debolezza muscolare e crampi mentre meno del 50% manifesta poliuria [Knoers NVAM *et al.*, 2008; Fremont OT *et al.*, 2012]. Solo i pazienti che presentano un quadro di ipopotassiemia ed ipomagnesemia molto severo possono presentare un ritardo di crescita [Riveira-Munoz E *et al.*, 2007].

Il gene responsabile della sindrome di Gitelman è SLC12A3 (16q13), codificante per il cotrasportatore Na-Cl, NCC, sensibile ai diuretici tiazidici, che è considerato il principale mediatore del riassorbimento di sodio e cloro nel tubulo contorto distale (DCT) [Mastroianni N *et al.*, 1996]. Il DCT è responsabile del riassorbimento del 2-5% del carico filtrato di sodio; NCC trasporta passivamente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  dal lume all'interno della cellula ed il trasporto è mediato dal gradiente di concentrazione tra lume e comparto intracellulare generato dalla pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi basolaterale (fig. 8).



**Figura 8:** Rappresentazione schematica del disfunzionamento di NCC nella sindrome di Gitelman [modificata da Devuyst O *et al.*, 2008].

NCC è un polipeptide di 1021 aminoacidi (112 kDa) con 12 domini transmembrana e lunghi domini amino- e carbossi terminale intracellulari (fig. 9).

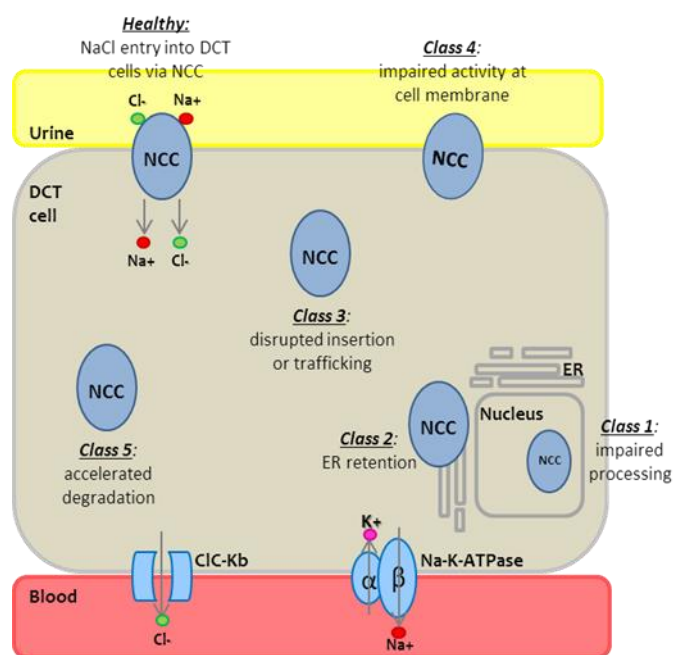


**Figura 9:** Rappresentazione schematica della struttura di NCC e di alcuni siti di mutazioni note [modificata da Karolyi L et al., 1998].

I siti di N-glicosilazione presenti nei residui 406 e 426 (nel loop extracellulare che collega i domini transmembrana 7 e 8) sono necessari per un corretto folding della proteina e per il suo trasporto alla membrana plasmatica [Gamba G, 2009]. La regione N-terminale di NCC presenta diversi siti di fosforilazione; in particolare, il sito Thr60 sembra essere critico per l'attivazione del trasportatore stesso e questo spiegherebbe la manifestazione del fenotipo Gitelman in individui che presentano una mutazione missenso a livello di questo residuo [Lin SH *et al.*, 2005]. Nonostante i meccanismi di regolazione di questo canale siano ancora poco conosciuti, molti studi hanno verificato il coinvolgimento delle serin-treonin protein chinasi WNK. Nello specifico, sembra che NCC sia attivato da WNK3, tramite fosforilazione dei siti Thr53, Thr58 e Ser71 (N-terminale) [Pacheco-Alvarez D *et al.*, 2006]. Il ruolo di WNK4 appare invece controverso; in condizioni basali di bassi livelli circolanti di ANG-II ed aldosterone, WNK4 inibisce l'attività di NCC indirizzandolo verso il compartimento lisosomiale per la sua successiva degradazione [San-Cristobal P *et al.*, 2008; Subramanya AR *et al.*, 2009]. In presenza di ANG-II, si assiste ad un incremento della concentrazione di  $Ca^{2+}$  intracellulare ed al conseguente effetto positivo di WNK4 su NCC, ovvero un aumento del trasporto di NCC verso la membrana apicale; questo avviene attraverso l'attivazione WNK4-dipendente del pathway SPAK/OSR1 (*STE20-related proline-alanine-rich kinase/oxidative stress-response1*) [Vitari AC *et al.*, 2005; Dimke H *et al.*, 2011].

La maggior parte dei pazienti con sindrome di Gitelman presenta mutazioni inattivanti NCC. Queste mutazioni interessano tutte le porzioni della proteina ma è riconosciuto un *hot spot* mutazionale a livello della regione C-terminale. Ad oggi, sono state identificate circa 250 diverse mutazioni loss-of-function (missense, nonsense, frame-shift e splice-site) riguardanti il gene SLC12A3 [Mastroianni N *et al.*, 1996; Simon DB *et al.*, 1996; Lemmink HH *et al.*, 1998; Melander O *et al.*, 2000; Cruz DN *et al.*, 2001; Syren ML *et al.*, 2002; Coto E *et al.*, 2004; Coto E *et al.*, 2009; Syren ML *et al.*, 2011; Vargas-Poussou R *et al.*, 2011]; tuttavia pochi studi si sono focalizzati sulle conseguenze che tali mutazioni comportano su sintesi/trafficking/inserzione in

membrana della proteina NCC [De Jong JC *et al.*, 2002; Sabath E *et al.*, 2004; Riancho JA *et al.*, 2006; Riveira-Munoz E *et al.*, 2007; Glaudemans B *et al.*, 2012]. De Jong JC *et al.* hanno catalogato le mutazioni di SLC12A3 in due ampi gruppi, a loro volta suddivisibili in 5 classi (fig. 10). Il gruppo I comprende quelle mutazioni che causano una completa perdita di funzionalità della proteina ed una sua completa assenza quindi a livello della membrana apicale, a seguito di un non corretto processamento dell'mRNA (classe 1), oppure della ritenzione della proteina NCC mutata nel RE (classe 2) o di un alterato meccanismo di trafficking/inserzione in membrana (classe 3). Il gruppo II invece raggruppa quelle mutazioni che provocano una perdita parziale della funzionalità della proteina; la proteina mutata presenta un normale trafficking verso la superficie cellulare ma risulta avere una ridotta attività (classe 4) oppure subisce un anomalo meccanismo di rapida degradazione (classe 5). NCC mutato è quindi espresso sulla superficie cellulare in minor quantità e questo comporta un ridotto uptake di  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  [De Jong JC *et al.*, 2002, Glaudemans B *et al.*, 2010]. Una delle mutazioni più frequenti, appartenenti al gruppo I, risulta essere la duplicazione di 7bp nell'esone 10 di SLC12A3; questa mutazione è stata definita "mutazione italiana" in quanto riflette la presenza di un antenato comune in un'area che copre il nord Italia e l'est della Francia [Syren ML *et al.*, 2011]. Recentemente, Glaudemans B *et al.* hanno effettuato uno studio funzionale utilizzando come modello sperimentale gli oociti di *Xenopus laevis* al fine di indagare l'effetto delle mutazioni di SLC12A3 sulla localizzazione in membrana di NCC e sul trasporto di  $\text{Na}^+$  da essa mediato. Essi hanno identificato 31 nuove mutazioni responsabili del fenotipo Gitelman confermando che alcune di queste non compromettono per nulla l'inserzione in membrana del cotrasportatore, ma ne riducono completamente o parzialmente l'attività [Glaudemans B *et al.*, 2012].



**Figura 10:** rappresentazione schematica delle classi mutazionali di SLC12A3 in base all'effetto sul cotrasportatore NCC [modificata da Glaudemans B *et al.*, 2010].

Il mancato/ridotto riassorbimento di NaCl nel DCT si traduce in una riduzione del riassorbimento d'acqua e di conseguenza del volume intravascolare che contribuisce alla bassa pressione arteriosa con successiva attivazione dei meccanismi controregolatori, come il RAAS e quello dell'endotelina [Simon DB *et al.*, 1996]. I livelli elevati di aldosterone innescano quindi un marcato riassorbimento di Na<sup>+</sup> a livello delle cellule del dotto collettore corticale tramite il canale epiteliale per il sodio (ENaC). Per mantenere l'omeostasi ionica però questo si riflette in un aumento nella secrezione di K<sup>+</sup> e H<sup>+</sup> che quindi danno ragione dello stato di ipokaliemia ed alcalosi metabolica.

La proteina NCC mutata trovata nel tubulo contorto distale viene significativamente espressa anche nelle cellule mononucleate del sangue (PBMC), le quali, essendo facilmente accessibili, possono facilitare la diagnosi di sindrome di Gitelman [Abuladze N *et al.*, 1998]. Abuladze *et al.* hanno infatti condotto esperimenti di Northern Blot e successiva PCR quantitativa su RNA isolato da PBMC di pazienti GS e controlli, dimostrando che tale analisi può complementare l'indagine di sequenziamento su DNA genomico. Inoltre, l'analisi mediante Northern Blot ha rivelato che la proteina NCC è espressa, sebbene in piccola percentuale, anche a livello del piccolo intestino, della prostata, del colon e della milza [Chang H *et al.*, 1996].

Una minoranza di pazienti con fenotipo Gitelman tuttavia non presenta le mutazioni classiche su NCC, ma presenta mutazioni nel gene CLCNKB, codificante per il canale ClC-Kb localizzato sulla membrana baso-laterale delle cellule del TAL ed anche del DCT, co-localizzando, in quest'ultimo caso, con NCC [Knoers NVAM *et al.*, 2005]. ClC-Kb è responsabile, se mutato, del fenotipo Bartter III; anche le mutazioni in questo canale del cloro determinano un mancato/ridotto riassorbimento di NaCl a livello del DCT, rendendo quindi non semplice la distinzione clinica tra le due forme.

### 1.2.3. **Sindrome di Bartter**

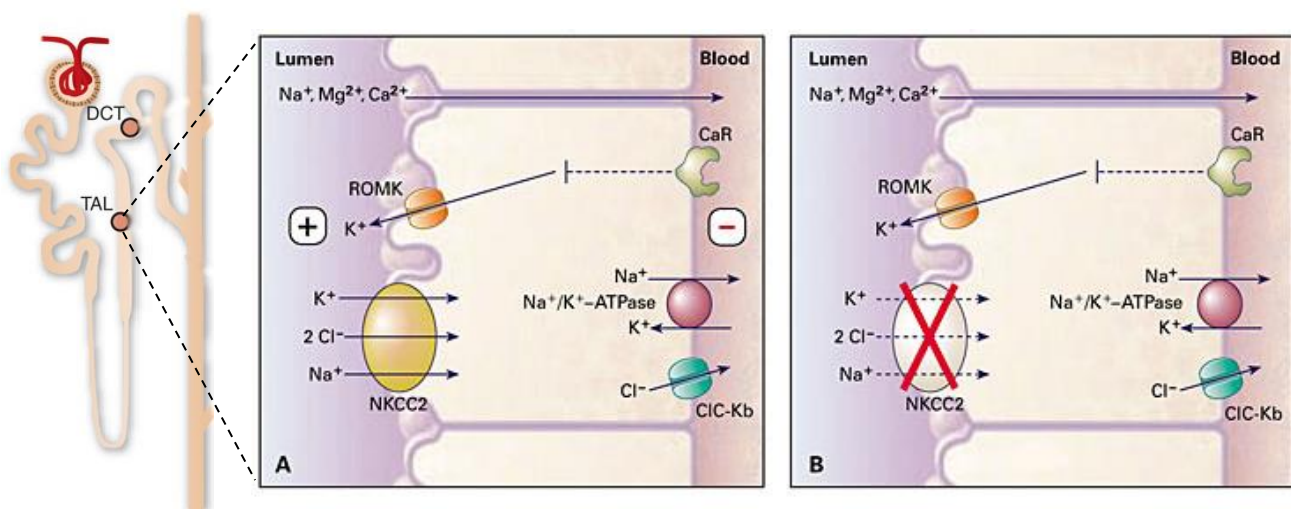
Nel 1962, l'endocrinologo Frederic Bartter descrisse due pazienti afroamericani normotesi con iperaldosteronismo, iperplasia dell'apparato juxtaglomerulare, alcalosi metabolica ipokaliemica, iperreninemia e resistenza agli effetti pressori dell'ANG-II [Bartter F *et al.*, 1962]. Nel 1971 Fanconi e McCredie [Fanconi A *et al.*, 1971; McCredie DA *et al.*, 1971] descrissero, in bambini con sospetta sindrome di Bartter, un quadro di nefrocalcinosi midollare associato ad elevata escrezione urinaria di calcio; negli anni '80 le descrizioni di questa variante divennero sempre più frequenti, soprattutto per il miglioramento della cura dei neonati pretermine in cui era nota una storia di *poli-idramnios* [Ohlsson A *et al.*, 1984]. In questi neonati veniva descritta, subito dopo la nascita, poliuria abbondante capace di determinare disidratazione. La riduzione del volume extracellulare si accompagnava ad un incremento della produzione renale ed extrarenale di PGE<sub>2</sub>. In questa forma antenatale di sindrome di *Bartter* (o sindrome da iperprostaglandina E)

la somministrazione di inibitori della sintesi di PG migliorava la sintomatologia con riduzione di poliuria, ipokaliemia e ripresa della crescita [Seyberth HW *et al.*, 1987].

In presenza di segni e sintomi importanti quali *poli-idramnios*, che porta generalmente ad una nascita prematura (generalmente tra la 27esima e la 35esima settimana), poliuria e disidratazione, è possibile porre una diagnosi neonatale. Nella maggioranza dei casi, invece, la diagnosi viene effettuata durante l'infanzia a seguito della comparsa di crisi tetaniche o ritardo di crescita. Altri pazienti, completamente asintomatici, vengono diagnosticati durante l'adolescenza o l'età adulta in seguito all'esecuzione di esami di routine prescritti per altri motivi [Proesmans W *et al.*, 1987].

- **Sindrome di Bartter I o antenatale**

La forma antenatale di sindrome di *Bartter* si manifesta con alcalosi metabolica ipokaliemica, dispersione di sodio ed ipotensione e si differenzia dalla sindrome di Gitelman per ipercalciuria, normali valori di magnesio ed una presentazione neonatale più severa, contraddistinta da nefrocalcinosi, iperplasia dell'apparato juxtaglomerulare e ritardo di crescita [Seyberth HW *et al.*, 1985]. La forma di Bartter I è causata da mutazioni del cotrasportatore  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (NKCC2) (fig. 11), che si trova nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle (TAL). Tale porzione del tubulo è responsabile di circa il 15-20% del riassorbimento sodico; la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi a livello basolaterale mantiene una bassa concentrazione di sodio all'interno della cellula che richiama lo ione proprio attraverso il cotrasportatore NKCC2, insieme a due ioni  $\text{Cl}^-$  e ad uno ione  $\text{K}^+$ . Il tipo di disordine elettrolitico visto in questi pazienti è simile a quello descritto nei soggetti che assumono diuretici dell'ansa, potenti inibitori di NKCC2.

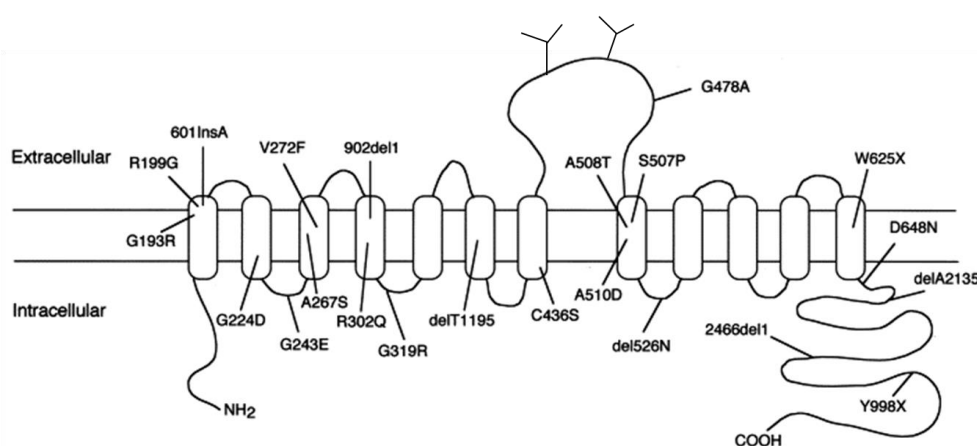


**Figura 11:** Rappresentazione schematica del funzionamento/disfunzionamento di NKCC2 nella sindrome di Bartter I.

Il cotrasportatore NKCC2 è codificato da 26 esoni del gene SLC12A1 (15q15-q21) ed è espresso esclusivamente a livello della membrana apicale delle cellule epiteliali nel TAL.

Questa proteina è costituita da 1099 aminoacidi (121 kDa) ed è strutturata con 12 domini transmembrana connessi tra loro da loops intra ed extra-cellulari e da due estremità N- e C-terminali intracellulari ed è inibita potentemente da furosemide. Il loop extracellulare che collega il settimo e l'ottavo dominio è particolarmente sviluppato e contiene due siti di glicosilazione (aa 446 e 456) che gli conferiscono caratteristiche idrofiliche (fig. 12).

Le mutazioni descritte nei soggetti Bartter I riguardano indistintamente tutte le porzioni della proteina, senza particolari *hot spot* mutazionali. Lo *screening* delle mutazioni a livello dei 26 esoni che la codificano ha consentito di identificare la presenza di mutazioni che alterano in modo drastico la funzionalità della proteina od il suo trafficking verso la membrana cellulare, incluse 3 mutazioni *frame-shift*, dovute all'inserzione/delezione di un singolo paio di basi, che determinano la formazione di prematuri codoni di stop e 3 mutazioni missense che introducono una sostituzione amminoacidica a livello di residui altamente conservati nelle specie [Simon DB *et al.*, 1996]. Tutte queste mutazioni determinano la perdita di funzione di NKCC2, con riduzione del riassorbimento di NaCl, perdita di sodio con le urine, ipovolemia, ipotensione, attivazione del sistema RAAS, e conseguente alcalosi ipokaliemica. Inoltre, il corretto funzionamento di NKCC2 è necessario per determinare a livello luminale del TAL il voltaggio transepiteliale positivo che determina il riassorbimento di ioni calcio, per via paracellulare, nel distretto vascolare [Sutton RAR *et al.*, 1981]. Di conseguenza, la perdita di funzione di NKCC2 impedisce il riassorbimento del calcio ed è responsabile della severa ipercalciuria che si osserva nella sindrome di *Bartter* di tipo I. Successivamente, Vargas-Poussou *et al.*, tramite l'analisi molecolare della sequenza codificante e dei confini tra esoni ed introni del gene NKCC2 in 15 probandi con sindrome di *Bartter* antenatale appartenenti a 13 famiglie, hanno identificato 14 nuove mutazioni, oltre alle 3 isoforme di NKCC2 derivate da splicing alternativo, NKCC2A, NKCC2B e NKCC2F, che differiscono per la loro localizzazione a livello del TAL e per le loro caratteristiche di trasporto [Vargas-Poussou R *et al.*, 1998; Castrop H *et al.*, 2008].

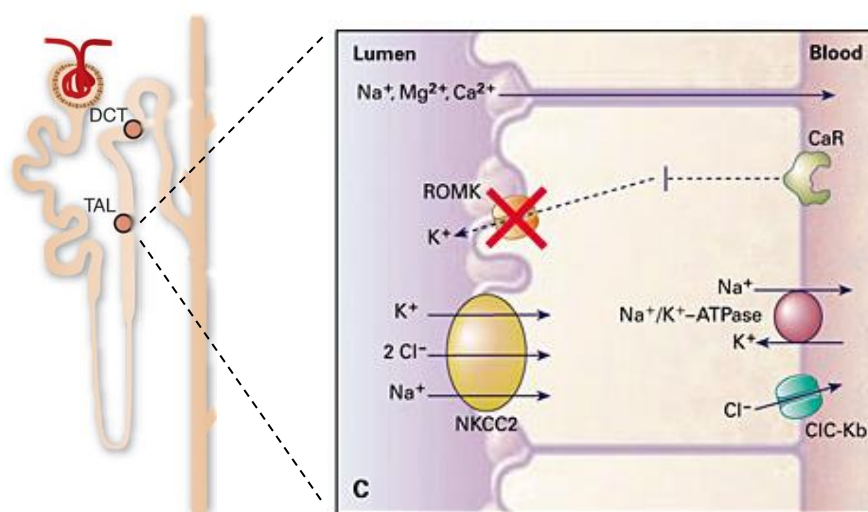


**Figura 12:** Rappresentazione schematica della struttura di NKCC2 e di alcuni siti di mutazioni note [modificata da Karolyi L *et al.* 1998]

- **Sindrome di Bartter II**

I soggetti affetti da sindrome di Bartter II sono clinicamente indistinguibili da quelli con sindrome di Bartter di tipo I, pur non presentando mutazioni a livello di NKCC2. Si è quindi ipotizzato che la sindrome di Bartter potesse anche essere causata da mutazioni a livello delle proteine di regolazione di NKCC2. La proteina responsabile della forma di Bartter II è infatti uno di questi regolatori, ROMK (*renal outer medullary potassium channel*) o Kir 1.1 (*K<sup>+</sup> inwardly rectifying*), codificato dal gene KCNJ1 (11q21-25) (fig. 13). Si tratta di un canale ATP-sensibile, appartenente alla famiglia dei canali Kir, localizzato a livello della membrana apicale delle cellule del TAL e del dotto collettore corticale (CCD), che richiama K<sup>+</sup> dal comparto intracellulare all'interno del lume tubulare [Wang W *et al.*, 1992; Kleta R *et al.*, 2006].

Nel TAL il flusso del potassio attraverso questo canale è necessario per l'attività di NKCC2; infatti se ROMK non estrudesse fuori dalla cellula ioni potassio, il cotrasportatore NKCC2 risulterebbe privo della "pompa" necessaria per trasportare all'interno lo stesso potassio assieme al sodio ed al cloro. Un'ipotesi plausibile che potrebbe giustificare l'uguaglianza di fenotipo nelle sindromi di Bartter I e II è quindi che una perdita di funzione a carico di ROMK possa determinare l'inibizione dell'attività di NKCC2, portando pertanto alle medesime anomalie biochimiche.



**Figura 13:** Rappresentazione schematica del disfunzionamento di ROMK1 nella sindrome di Bartter II.

ROMK è codificato dal gene KCNJ1 (11q21-25), costituito da 5 esoni, che produce 3 isoforme diverse della proteina, dovute anche in tal caso a fenomeni di splicing alternativo, aventi un core identico di 372 aminoacidi e diversa sequenza all'N-terminale (fig. 14).

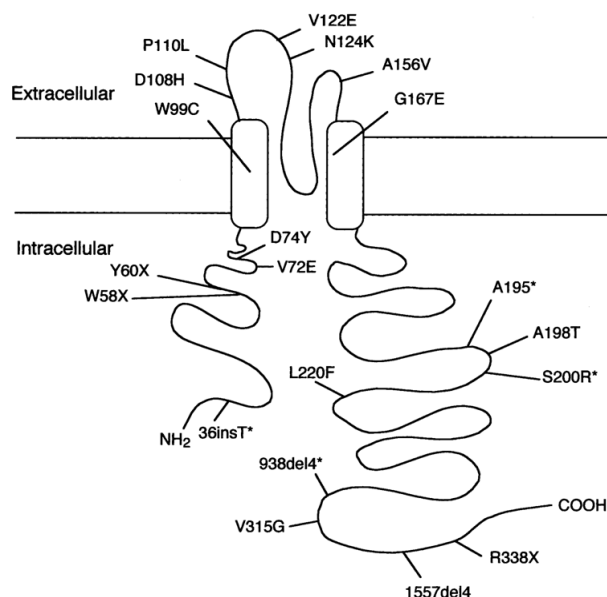
I 392 aa da cui è composto ROMK si strutturano a formare due domini transmembrana (TM1 e TM2), una regione formante il poro (H5) e due estremità citosoliche N- e C-terminale. Si pensa che proprio le porzioni citoplasmatiche siano responsabili del meccanismo di "gating" del canale. Il segmento H5 costituisce invece il filtro di selettività al K<sup>+</sup> e presenta la classica sequenza



aminoacidica tipica di tutti gli altri canali selettivi agli ioni  $K^+$ , T-X-G-Y (F)-G [Bichet D. *et al.*, 2003]. Dal momento che la struttura primaria dei due domini transmembrana è insufficiente a formare un canale ionico completo, i canali Kir funzionali sono costituiti da quattro di queste subunità che si uniscono a formare un complesso tetramerico [Glowatzki E *et al.* 1995]. In virtù della forte omologia e semplicità delle subunità, i canali Kir possono essere sia omomerici, quindi costituiti dall'unione di 4 subunità identiche, che eteromerici, formati da 4 subunità differenti, normalmente appartenenti alla stessa famiglia (per esempio la subunità Kir 2.1 si può associare con un altro membro della famiglia Kir 2.x) [Preisig-Muller R *et al.* 2002; Schram G *et al.* 2002].

Il funzionamento di questa famiglia di canali è caratterizzato da un fenomeno di rettificazione entrante; il comportamento della corrente di  $K^+$  sembra dipendere principalmente dal gradiente elettrochimico del potassio, ovvero, la conduttanza allo ione aumenta in corrispondenza di valori di potenziale di membrana iperpolarizzati. Infatti, la rettificazione inward delle correnti dei canali Kir è dovuta al blocco del poro del canale da parte di ioni  $Mg^{2+}$  e poliammine intracellulari quando il potenziale di membrana è maggiormente depolarizzato rispetto al potenziale di equilibrio del potassio [Takahashi N *et al.*, 2000]. Molti dei residui aminoacidici responsabili di questo blocco sono stati individuati a livello dell'elica interna TM2, ma ne sono stati identificati anche altri a livello della parete del poro nel dominio citoplasmatico.

L'apertura, e quindi l'attività, del canale ROMK sono regolate dal pH-intracellulare (per la protonazione del residuo di lisina in posizione 80), dall'ATP, da alcune sottounità delle proteine G e dal fosfatidil-inositolo [Shulte U *et al.*, 1999].



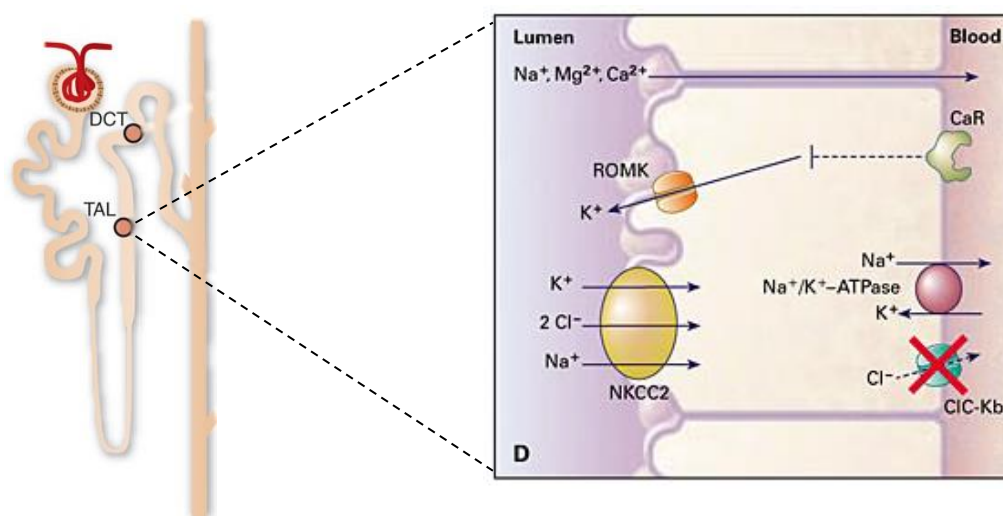
**Figura 14:** Rappresentazione schematica della struttura di ROMK e di alcuni siti di mutazioni note identificate da Simon *et al.* (1996) [modificata da Karolyi L *et al.*, 1998].

Le mutazioni di ROMK descritte nei soggetti Bartter II riguardano indistintamente tutte le porzioni della proteina e possono essere raggruppate in 5 clusters: (1) mutazioni nel "core" (aa 84-180), (2) in N-terminale (aa 40-60), (3) prossime al residuo di lisina in posizione 80 (aa 70-80), (4) nell' "ATP-binding regulatory domain" (aa 190-280) e (5) in C-terminale (prossime al

residuo R311) [Jeck N *et al.*, 2001]. È stato ampiamente dimostrato che mutazioni nel “core” riducono la conduttanza al  $K^+$ . Ad esempio, mutazioni nel dominio TM1 che consistono nella sostituzione di aa idrofobici con aa basici (A103V) o polari (W99C) potrebbero determinare una perdita di funzionalità del canale [Derst C *et al.*, 1997], così come sostituzioni aminoacidiche dei residui prossimi al motivo GYG (ad es. I142T) potrebbero intaccare la selettività al  $K^+$ . La maggioranza delle mutazioni dei gruppi (2), (3) e (5) invece sembrerebbe alterare il meccanismo di “pH sensing”, determinando l’apertura dei canali a valori di pH più alcalini. Infine mutazioni del gruppo (4) potrebbero abolire la fosforilazione in siti specifici del canale (ad es. aa 4 e 201) da parte della PKC e ridurre quindi l’attività del canale per diminuita espressione in superficie dello stesso [Lin D *et al.* 2002]. È interessante notare che la maggior parte delle mutazioni (missense o frameshift) del “core” porta alla sintesi di tetrameri la cui funzione di conduzione di potassio è anomala. Questo ci dice che tali proteine, anche se mutate, vengono normalmente sintetizzate e hanno capacità di oligomerizzazione.

- **Sindrome di Bartter III o Bartter classica**

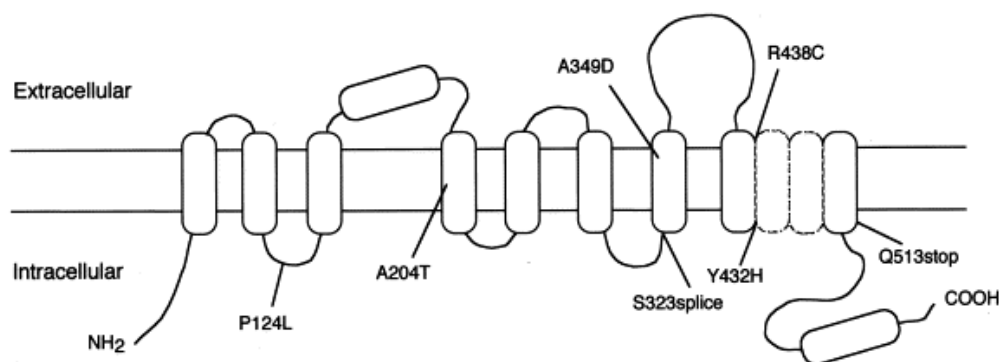
Tramite il reclutamento di pazienti con alcalosi ipokaliemica ereditaria, normomagnesemia e normo o ipercalciuria sono state ricercate altre mutazioni oltre a quelle già descritte. Nella maggioranza di questi soggetti non sono state riscontrate anomalie a carico di NKCC2 o ROMK. L’analisi di linkage condotta su 11 famiglie di consanguinei con sindrome di Bartter non ha trovato infatti alcun linkage con NKCC2 e ROMK, suggerendo l’esistenza di un altro regolatore del riassorbimento del sodio a livello dell’ansa di Henle responsabile per questo fenotipo [Simon DB *et al.*, 1997]. Responsabile della forma di Bartter III, definita anche Bartter classica, è infatti il canale del cloro  $ClC-Kb$ , espresso prevalentemente nel TAL, ma anche a livello del DCT e del CCD e deputato al riassorbimento di ioni cloro dal compartimento intracellulare al lume vasale (fig. 15) [Jeck N *et al.*, 2000].



**Figura 15:** Rappresentazione schematica del disfunzionamento di  $ClC-Kb$  nella sindrome di Bartter III.

Il quadro clinico associato alla Bartter classica risulta eterogeneo; la sintomatologia caratteristica compare tipicamente prima dei sei anni di età e comprende poliuria, polidipsia, vomito, stanchezza e difficoltà di crescita. In alcuni pazienti, tuttavia, la patologia si presenta durante l'adolescenza con episodi convulsivi e debolezza muscolare [Rodriguez-Soriano J *et al.*, 2005; Bettinelli A *et al.*, 2006].

La proteina è codificata dal gene *CLC-Kb*, costituito da 19 esoni, mappato sul cromosoma 1 (1p36), che codifica per 687 aa che si strutturano a livello della membrana basolaterale delle cellule epiteliali mediante 12 domini transmembrana e terminazioni intracitoplasmatiche (fig.16). Considerando *CLCNKA* e *CLCNKB* come possibili geni candidati per la sindrome di Bartter III, sono state evidenziate, in 10 famiglie con soggetti affetti, numerose varianti mutazionali tra le quali delezioni in omozigosi (complete o parziali) del gene *CLCNKB* e un crossing-over asimmetrico tra i geni *CLCNKA* e *CLCNKB* [Simon DB *et al.*, 1997]. La vicinanza sui cromosomi e l'alta omologia tra i due geni *CLCNKA* e *CLCNKB* spiegherebbe il verificarsi di un crossing-over non omologo e conseguentemente la delezione dell'intero gene o l'eventuale formazione di un gene chimerico, dovuto proprio alla fusione di regioni contigue dei due geni [Konrad M *et al.*, 2000]. Inoltre sono state identificate una mutazione nonsense, uno splicing e cinque mutazioni missense [Simon DB *et al.*, 1997]. Recentemente, sono state individuate anche alcune mutazioni responsabili della ritenzione di *CLCNKB* nel reticolo endoplasmatico e della sua conseguente degradazione; questi risultati suggeriscono che la Bartter III possa appartenere alla larga classe delle malattie conformazionali, nelle quali difetti nella stabilità/folding delle proteine implicate rappresentano il principale meccanismo patogenetico [Keck M *et al.*, 2013].



**Figura 16:** Rappresentazione schematica della struttura di *CLC-Kb* e di alcuni siti di mutazioni note [modificata da Karolyi L *et al.* 1998].

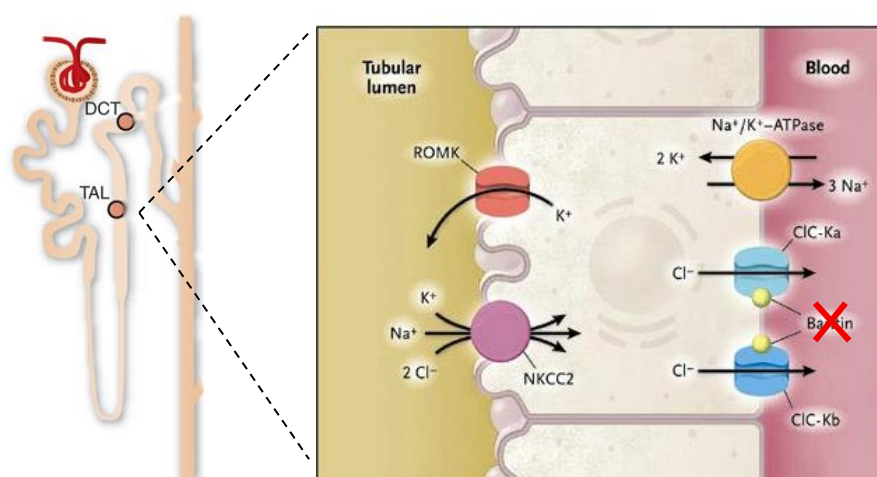
Nessun paziente con sindrome di Bartter con mutazioni in *CLCNKB* presenta ipercalcemia e nefrocalcolosi, così che questo gruppo di pazienti è facilmente distinguibile da quelli aventi mutazioni di *NKCC2* e *ROMK*, mentre, come già accennato, risulta più complessa la distinzione tra Bartter III e Gitelman.

- **Sindrome di Bartter IV**

La sindrome di Bartter IV può essere a sua volta suddivisa in due ulteriori sottoclassi: la Bartter IVA, dovuta a mutazioni a carico di barttin (fig. 17), subunità B dei canali ClC-Ka e ClC-Kb necessaria per il delivery alla membrana plasmatica e per la sensibilità di entrambi i canali e codificata dal gene BSND (1p31) e la Bartter IVB, causata da mutazioni simultanee a livello di entrambi i geni CLCNKA e CLCNKB [Naesens M *et al.*, 2004; Al-Shibli A *et al.*, 2014]

Entrambe le forme producono un fenotipo severo di Bartter con ritardo di crescita estremo, importante perdita renale di sali e scarsa risposta all'indometacina [Waldegger S *et al.*, 2002; Estevez R *et al.*, 2001].

Waldegger e Esteves hanno dimostrato che la coespressione di barttina e ClC-K in oociti di *Xenopus* induce la conduttanza del canale al Cl<sup>-</sup>. Nonostante questa evidenza però, ad oggi, nelle cellule di mammifero, rimane ignoto l'esatto meccanismo di interazione tra le due proteine [Waldegger S *et al.*, 2002; Estevez R *et al.*, 2001].



**Figura 17:** Rappresentazione schematica del disfunzionamento di Barttina in soggetti affetti da sindrome di Bartter IV.

Come riportato dall'analisi di immunoistochimica condotta da Hayama e Uchida, barttina wild-type si localizza nella membrana plasmatica [Hayama A *et al.*, 2003]; al contrario barttine mutate (R8L e G10S) localizzano intracellularmente, precisamente nel RE. In presenza di barttina wt, ClC-K2 (omologo murino di ClC-Kb) viene reclutato sulla membrana plasmatica; al contrario in sua assenza o in presenza di barttine mutate, ClC-K2 rimane all'interno della cellula a livello del Golgi o del RE, dove risiedono le barttine mutate. Si ritiene pertanto che le mutazioni a carico di barttina abbiano un'influenza sulla localizzazione di ClC-K2 [Hayama A *et al.*, 2003].

La variante Bartter IV è inoltre associata a sordità neurosensoriale. Per il corretto funzionamento delle cellule che mediano la sensazione uditiva è richiesta infatti la secrezione di endolinfa ricca di K<sup>+</sup> da parte delle cellule marginali della stria vascolare dell'orecchio interno [Jentsch TJ, 2000]. A livello di queste cellule sono espressi entrambi i canali ClC-K, e barttina è

necessaria per il loro funzionamento [Birkenhager R *et al.*, 2001]. Il passaggio transcellulare di  $K^+$  è mediato da NKCC1 che ne assicura l'ingresso nelle cellule marginali mentre i canali  $K^+$  voltaggio-dipendenti mediano la secrezione di  $K^+$  nell'endolinfa. Per un corretto funzionamento, NKCC1 richiede la presenza di  $Cl^-$  che ricircola dalle cellule all'interstizio; pertanto media questo ricircolo di  $Cl^-$  e di conseguenza alterazioni sia a carico di barttina che dei canali apicali del  $K^+$  possono abolire la secrezione di  $K^+$  nell'endolinfa determinando perciò sordità neurosensoriale [Splawski I *et al.*, 1997].

- **Sindrome di Bartter V**

Due studi recenti hanno permesso di identificare dei soggetti con mutazioni attivanti a carico della proteina CaSR (*calcium sensing-receptor*) responsabili del fenotipo Bartter V (ipocalcemia autosomica dominante) [Vargas-Poussou R *et al.*, 2002; Watanabe S *et al.*, 2002].

Il CaSR è una proteina di membrana appartenente alla superfamiglia delle proteine recettoriali G, possiede un ruolo importante nell'omeostasi minerale e mutazioni a suo carico determinano l'ipocalciuria ipercalcemica familiare e l'ipocalcemia autosomica dominante [Brown EM *et al.*, 1998]. Il CaSR, il cui gene codificante è localizzato sul cromosoma 3 (3q13.3-q21), è attivato dall'incremento della concentrazione extracellulare di  $Ca^{2+}$ . Esso è altamente espresso a livello della membrana basolaterale della parte spessa del TAL [Riccardi D *et al.*, 1996] e la sua attivazione favorisce il trasporto di sodio (furosemide-like effect) [Hebert SC, 1996].

#### **1.2.4 Patogenesi delle principali anomalie biochimico-cliniche**

- **Potassio, sodio e cloro**

L'ipopotassiemia cronica rappresenta il principale segno clinico che porta a ipotizzare la presenza di una sindrome di Bartter o di Gitelman. L'ipopotassiemia, a sua volta, è causa di alterazioni della contrattilità della muscolatura liscia, scheletrica e cardiaca con conseguenti debolezza muscolare e disturbi del ritmo cardiaco. I meccanismi che concorrono all'insorgenza di ipopotassiemia sono due: 1) l'aumento del flusso urinario in conseguenza del diminuito riassorbimento tubulare di NaCl (effetto simil-diuretico); 2) l'iperaldosteronismo secondario allo stato di ipovolemia presente in tutti questi pazienti, che determina l'incremento del riassorbimento di sodio a livello dei tubuli collettori renali e, di conseguenza, anche la secrezione di potassio. In queste sindromi avremo quindi un incremento della frazione escreta con le urine di potassio (FeK) che raggiunge valori superiori al 15%. Tuttavia, l'aumento della FeK non è patognomonico delle sindromi di Bartter e Gitelman, potendo essere riscontrato in tutte le ipovolemie, mentre è più indicativo quello della FeCl (percentuale del cloro filtrato escreto con le urine). L'ipopotassiemia e l'ipomagnesiemia sono anche responsabili di un'anomalia nel

metabolismo del glucosio e nella secrezione di insulina, situazioni comuni nei pazienti GS [Ren H *et al.*, 2007].

L'aumentata eliminazione distale di sodio, combinata con l'attivazione del RAAS, incrementa inoltre la secrezione distale di idrogenioni ( $H^+$ ) causando alcalosi metabolica (bicarbonato plasmatico  $>28$  mmol/l); sia l'aldosterone sia la deplezione di potassio sono infatti responsabili della regolazione dell'espressione della  $K^+/H^+$  ATPasi, la quale, per ogni ione  $K^+$  internalizzato, estrude uno ione  $H^+$ , determinando una situazione di alcalosi [Laroche-Joubert N *et al.*, 2000; Bettinelli A *et al.* 2007].

In alcuni casi di sindrome di Bartter ad esordio neonatale (Bartter tipo II) può peraltro essere presente, nelle prime settimane di vita, uno stato di iperpotassiemia associato ad acidosi che simula lo pseudoipoadosteronismo. Questa situazione si spiega con la particolare funzione della proteina ROMK, codificata dal gene *KCNJ1*, deputata al trasporto del potassio dall'interno della cellula al lume tubulare: mutazioni in questo gene comporterebbero una ritenzione di potassio con conseguente iperpotassiemia [Finer G *et al.*, 2003].

- **PGE<sub>2</sub> e renina**

L'aumentata  $FeCl$  ha un'importanza decisiva nell'iperprostaglandinismo E<sub>2</sub> e nell'iperreninemia. Si ipotizza che la ridotta concentrazione di cloro nelle cellule tubulari, conseguente alle mutazioni dei geni che codificano per la maggior parte dei trasportatori del NaCl, presenti anche nella macula densa dell'apparato iuxtaglomerulare, comporti, attraverso un enzima chinasi, l'attivazione della COX-2; quest'ultima a sua volta, determina iperprostaglandinismo E<sub>2</sub> e un aumentato rilascio di renina dall'apparato iuxtaglomerulare [Jeck N *et al.*, 2005]. Il risultato è un incremento della produzione di angiotensina accompagnata da iperaldosteronismo.

- **Calcio e magnesio**

L'iper calciuria, caratteristica soprattutto delle forme di Bartter I e II, può essere spiegata dal gradiente elettrico negativo che si genera a livello del lume tubulare per il mancato riassorbimento di cloro, responsabile di un ridotto trasporto paracellulare di calcio, con conseguente importante iper calciuria ed, in genere, nefrocalcosi [Bettinelli A *et al.*, 2004].

L'ipocalciuria e l'ipomagnesiemia tipiche della sindrome di Gitelman sono più difficilmente spiegabili. L'ipocalciuria può essere dovuta al fatto che il ridotto riassorbimento di NaCl a livello del tubulo distale comporti una fuoriuscita del cloro a livello della membrana baso-laterale con ingresso di sodio e contemporanea fuoriuscita di calcio verso il comparto extra-cellulare. Tali combinazioni favorirebbero il passaggio di  $Ca^{2+}$  dal lume tubulare al comparto vascolare con conseguente ipocalciuria. Per quanto riguarda l'insorgenza dell'ipomagnesiemia, non sono ancora state prospettate ipotesi convincenti, anche se uno studio ricollega la mancata funzionalità del cotrasportatore NCC con una ridotta espressione ed attività dei trasportatori del magnesio TRPM6 e TRPM7, localizzati anch'essi a livello della membrana apicale del DCT [Nijenhuis T *et al.*, 2005;

Jiang L *et al.*, 2014]. Il deficit di magnesio tipico dei pazienti Gitelman è presente anche in caso di malnutrizione, malassorbimento e aumentata perdita di sali per via renale come in caso di iperaldosteronismo, diabete scompensato, uso di diuretici. I sintomi del deficit di magnesio sono per lo più di natura neuromuscolare (debolezza, irritabilità, alterazioni elettrocardiografiche e convulsioni). Uno studio molto recente condotto sulla popolazione cinese dimostra che, in realtà, una situazione di normomagnesemia nei pazienti Gitelman non è rara; inoltre la magnesemia risulterebbe correlata con la severità della patologia [Jiang L *et al.*, 2014].

- **Pressione arteriosa, diuresi ed accrescimento**

Nei pazienti Bartter e Gitelman viene riscontrata un'attivazione del RAAS con aumento di livelli plasmatici di ANG-II e alti livelli di aldosterone, condizioni cliniche tipiche dell'ipertensione arteriosa, principale fattore di rischio per le patologie cardiovascolari [Calò LA *et al.*, 2008]. Nonostante queste evidenze, gli individui affetti da BS o GS sono normo o ipoteso, presentano ridotte resistenze periferiche e iporesponsività agli agenti pressori.

L'ANG-II media le sue azioni biologiche attraverso il legame a due distinti recettori legati alla membrana cellulare, i recettori AT1 ed i recettori AT2 [De Gasparo M *et al.*, 2000]. Negli studi effettuati su pazienti BS e GS, si è dimostrato che il signalling a breve termine dell'ANG-II attraverso i recettori AT1, quello che media molti degli effetti emodinamici ed endocrini conosciuti del peptide inclusa la vasocostrizione, risulta significativamente ridotto [Calò LA *et al.*, 2005; Davis PA *et al.*, 2006].

Evidenze sperimentali mostrano che i livelli di ACE2 in pazienti BS e GS sono risultati significativamente aumentati sia rispetto ai soggetti sani che ai pazienti ipertesi, mentre tra i soggetti sani ed i pazienti ipertesi non sono state riscontrate significative differenze. Inoltre anche i livelli di ANG 1-7, un peptide che agisce in modo opposto rispetto all'ANG-II, risultano significativamente aumentati nei pazienti BS e GS sia rispetto ai pazienti ipertesi che ai soggetti sani. Questo eptapeptide determina vasodilatazione ed accresce l'effetto inibitorio, contribuendo all'abbassamento della pressione arteriosa. È stato poi recentemente dimostrato che l'attivazione del sistema RhoA/Rho Kinasi, strettamente coinvolto nella regolazione del tono e del remodeling vascolare, risulta essere fortemente diminuita in questi pazienti [Pagnin E *et al.*, 2004]. Tutti questi risultati sono compatibili con le ridotte resistenze periferiche, l'iporeattività vascolare e la normotensione, tipiche delle sindromi di Bartter e Gitelman.

La poliuria osservabile nella sindrome di Bartter può essere spiegata da un deficit dei meccanismi di concentrazione renale dovuto al mancato riassorbimento di NaCl a livello del TAL (per i Bartter I e II), con conseguente ridotta tonicità dell'interstizio midollare renale e quindi minor richiamo di acqua dal tubulo collettore per effetto osmotico [Bichet DG, 2006].

Nella sindrome di Bartter è infine molto frequente un deficit dell'accrescimento che ha una patogenesi multifattoriale: poliuria, ipopotassiemia e, in alcuni casi, coesistenza di deficit dell'ormone della crescita GH [Bettinelli A *et al.*, 2007].

### 1.2.5 Diagnosi differenziale

Da un punto di vista diagnostico, occorre distinguere le ipopotassiemie di origine reno-tubulare da altre forme che, pur presentando ipopotassiemia ed iperaldosteronismo, sono secondarie a cause extra-renali. Nella maggior parte dei casi clinici, i dati anamnestici sono già molto indicativi per discriminare tra le forme di ipopotassiemia renali ed extra-renali; nei casi dubbi è invece di particolare utilità la valutazione degli elettroliti urinari e, in particolare, l'eliminazione urinaria di cloro e la relativa frazione escreta (FeCl). Nelle forme extra-renali l'ipovolemia causa un iperaldosteronismo che tende ad aumentare la perdita di potassio con le urine; il sodio e il cloro sono peraltro riassorbiti normalmente ed in particolare valori di cloro inferiori a 10 mEq/l e una frazione escreta del cloro inferiore allo 0,5% sono indici di un buon compenso renale tubulare. Nelle forme reno-tubulari invece, pur essendo presente ipovolemia, si riscontrano valori di sodio e di cloro urinario elevati (>20 mEq/l) e una FeCl superiore all'1,0 % [Bettinelli A *et al.*, 2008].

Per quanto riguarda la sindrome di Bartter e Gitelman, nel 1987 Rodriguez-Soriano *et al* elaborarono un'osservazione che risultò poi fondamentale nell'iter diagnostico, distinguendo le due diverse sindromi, entrambe contrassegnate da ipopotassiemia, alcalosi metabolica di origine reno-tubulare e normotensione, a partire dalle conoscenze di due diuretici ampiamente utilizzati nella pratica clinica: la furosemide, attiva a livello del TAL, e i tiazidici, in grado di agire a livello del DCT [Rodriguez-Soriano JA *et al.*, 1987]. Pur favorendo entrambi la riduzione del riassorbimento tubulare di NaCl (provocando un aumento di acqua legato ai soluti), il primo determina l'insorgenza di ipercalciuria, come si osserva nella sindrome di Bartter neonatale, mentre i secondi provocano ipocalciuria associata ad ipermagnesuria, tipiche anomalie cliniche della sindrome di Gitelman [Bettinelli A *et al.*, 1992]. Sulla base di questi riscontri, a partire dalla semplice suddivisione dei pazienti in due gruppi, ipercalciurici da un lato ed ipocalciurici-ipomagnesiemici dall'altro, si sono potute evidenziare importanti differenze cliniche. I primi (Bartter) sono in genere neonati o bambini diagnosticati nel primo anno di età, con severa poliuria, ritardato accrescimento staturo-ponderale e, spesso, nefrocalcosi. Nei secondi (Gitelman), invece, la diagnosi è spesso posta durante il periodo scolastico o in età giovane-adulta; essi manifestano spesso tetania ipomagnesemica e crampi, ma possono risultare anche del tutto asintomatici e solo alcuni presentano un deficit di accrescimento.



**Tabella VI:** Diagnosi differenziale delle sindromi di Bartter e Gitelman sulla base dell'età d'esordio, della sintomatologia e delle analisi di laboratorio [modificata da Viganò SM et al, 2006].

Sindrome	Età di esordio	Sintomi Principali	Dati di laboratorio
<b>Bartter I</b>	Antenatale	Poli-idramnios materno, poliuria, ritardo di crescita	Iso-ipostenuria, iponatremia, ipocloremia, elevato aldosterone nel fluido amniotico
<b>Bartter II</b>	Antenatale/Neonatale	Poli-idramnios materno, nascita prematura, poliuria, nefrocalcinosi	Isostenuria, ipercalciuria, iperaldosteronismo
<b>Bartter III</b>	CLCNKB	Ritardo di crescita, disidratazione, ipotonia muscolare, letargia	Iponatremia, ipocloremia, alcalosi ipokaliemica, iperaldosteronismo
<b>Bartter IV</b>	1 anno	Poli-idramnios materno, poliuria fetale, disidratazione, IR progressiva, sordità neurosensoriale	Ipodremia, ipomagnesemia
<b>Gitelman</b>	Antenatale	Astenia, crampi, affaticamento, ritardo di crescita, condrocalcinosi	Alcalosi ipokaliemica, ipocalciuria, ipomagnesemia

Nonostante questi progressi, tuttavia, non sempre è possibile effettuare una diagnosi differenziale sulla base del fenotipo clinico (tab. VI). Infatti, malgrado la sindrome di Bartter sia tipicamente associata ad ipercalciuria e la sindrome di Gitelman normalmente associata a ipocalciuria, alcuni pazienti affetti da Bartter tipo III presentano una normale escrezione urinaria di calcio, rendendo quindi difficile, come ampiamente ricordato, la classificazione dei pazienti in Gitelman o Bartter III.

La diagnosi di sindrome di Gitelman viene oggi stabilita sulla base dei seguenti criteri biochimici: (1) ipomagnesemia di origine renale definita da valori plasmatici di magnesio  $< 0.65$  mmol/litro (in presenza di frazione escreta di magnesio  $> 4.0\%$ ); (2) ipopotassiemia di origine renale definita da valori plasmatici di potassio  $< 3.6$  mmol/litro (in presenza di una frazione escreta di potassio  $> 16.0\%$ ); (3) ipocalciuria ( $< 2$  mg/kg/die) o rapporto molare calciuria/creatinina  $\leq 0.10$  [Bettinelli A *et al.*, 1995].

I test emodinamici effettuati mediante somministrazione di diuretici possono essere utili nella diagnosi differenziale delle due sindromi. Il “tiazide test”, ad esempio, consiste nella somministrazione orale di idroclorotiazide (1 mg/kg fino a 50 mg) dopo un periodo di 7 giorni durante il quale si sospendono le terapie ad eccezione fatta per la supplementazione di magnesio e potassio [Colussi G *et al.*, 2007]. Nei pazienti con sindrome di Gitelman, che presentano un difetto nel canale tiazide-sensibile NCC, si osserva una scarsa risposta ( $< 2,3\%$ ) all'idroclorotiazide che si manifesta con una piccola riduzione nella frazione escreta del cloro, non osservata invece nei pazienti Bartter. Un uso estensivo del test tiazidico per la diagnosi presenta comunque alcuni problemi pratici come ad esempio la difficoltà nella raccolta continua e corretta delle urine da parte dei bambini o le interferenze con alcune terapie effettuate con farmaci di riassorbimento tubulare che non possono essere sospese.

Ad oggi è possibile effettuare una diagnosi genetica per tutti i geni conosciuti che sono responsabili di GS e BS mediante la tecnica dell'MLPA (*Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*), molto utile per identificare eventuali delezioni, duplicazioni o inserzioni, e mediante sequenziamento genico. Mediante MLPA e sequenziamento, il detection rate mutazionale si aggira comunque intorno all'80% [Vargas-Poussou R *et al.*, 2011]; questo può essere spiegato dal fatto che alcune mutazioni sono presenti in regioni introniche, nelle regioni 3' e 5' UTR, a livello dei promotori oppure in geni ancora sconosciuti che potrebbero essere potenzialmente coinvolti nella patologia o direttamente o mediante effetti modulatori sui geni noti. L'analisi genetica viene comunque abitualmente indirizzata da una prima ipotetica diagnosi basata sui dati di laboratorio: in casi del tutto dubbi si procede generalmente attraverso lo screening dei geni responsabili della sindrome di Gitelman e della Bartter III, che sono le due forme più frequenti e i cui geni implicati sono molto lunghi, per poi continuare, qualora non siano state individuate alterazioni, con lo screening dei geni responsabili della Bartter I e della Bartter II. Nella pratica di tutti i giorni, l'indagine genetica presenta delle limitazioni: non è facilmente disponibile per il clinico e, per il genetista, risulta lunga e costosa a causa della grande dimensione della maggior parte dei geni; inoltre la mancanza di hot-spot mutazionali ed il gran numero di mutazioni descritte non aiuta. Quindi è presente l'esigenza di disporre di marcatori diagnostici biochimici facilmente accessibili e che consentano di differenziare le diverse sindromi.

### 1.2.6 Prognosi

La prognosi di queste forme è discretamente nota a livello pediatrico, ma poco nell'adulto: sono tuttora segnalati, all'interno di famiglie con bambino affetto da sindrome di Bartter, casi di morte durante la vita fetale (associata a polidramnios) ed anche di sincope e morte improvvisa. L'ipopotassiemia (associata o meno a ipomagnesiemia) svolge infatti un ruolo riconosciuto nella genesi di disturbi del ritmo cardiaco, con incremento dell'intervallo QTc all'ECG, fino a gravi aritmie ventricolari. In uno studio multicentrico Europeo [Cortesi C *et al.*, 2003] è stata rilevata un'augmentata prevalenza di morte improvvisa in pazienti pediatriche affette da BS e GS: infezioni intercorrenti (specie disidratazioni gravi in corso di gastroenteriti) possono portare a un'ulteriore riduzione della potassiemia ( $<2,0$  mEq/l) e quindi a severe aritmie e sincope o morte. È quindi di fondamentale importanza che un bambino al quale sia stata diagnosticata una di queste sindromi venga ricoverato e adeguatamente reidratato per via endovenosa in caso di gravi disidratazioni acute. Tra gli altri aspetti connessi alla morbilità di queste sindromi vanno segnalati la possibilità di una riduzione della funzione renale glomerulare, di astenia che condiziona l'attività lavorativa e, più raramente, di episodi di rabdomiolisi secondari all'ipopotassiemia [Bettinelli A *et al.*, 2008].

### 1.2.7 Terapia

La terapia consiste anzitutto in una corretta reidratazione, specie nel neonato e nel bambino al di sotto del primo anno di vita. Alcuni neonati presentano poliurie molto importanti, pertanto le quantità di liquidi ed elettroliti da integrare vanno stabilite in base al singolo caso, con valutazioni che spesso comportano il ricorso ad unità di cure sub intensive con monitoraggio continuo dell'ECG. La dieta riveste particolare importanza poiché questi bambini poliurici tendono ad assumere acqua ma scarse calorie. Una volta raggiunto uno stadio sufficientemente stabilizzato in quasi tutti i pazienti viene instaurata una supplementazione con KCl e NaCl (2 mEq/kg/die, aumentabili) [Bettinelli A *et al.*, 2008].

I pazienti affetti dalla sindrome di Bartter vengono tipicamente trattati con supplemento di KCl e con inibitori della sintesi delle prostaglandine, tra i quali l'indometacina è tuttora considerato il farmaco più potente (dosaggio 0,5-4 mg/kg/die), essendo in grado di ridurre la poliuria e l'ipercalciuria, di aumentare la ritenzione di sodio, di migliorare la potassiemia e di comportare un recupero nell'accrescimento [Bettinelli *et al.*, 2004; Freemont OT *et al.*, 2012]. A causa degli effetti collaterali a lungo termine quali enterocoliti necrotizzanti, ulcere gastriche e gastriti croniche, l'indometacina deve essere somministrata con particolare attenzione nei bambini prematuri [Ataoglu E *et al.*, 2009]. In presenza di effetti collaterali dovuti al trattamento a lungo termine con indometacina, gli inibitori della (COX-2) possono essere presi in considerazione come approccio alternativo, in modo da sopprimere l'elevata sintesi delle PGE2 a livello renale [Luthy C *et al.*, 1995; Seyberth HW *et al.*, 2011].

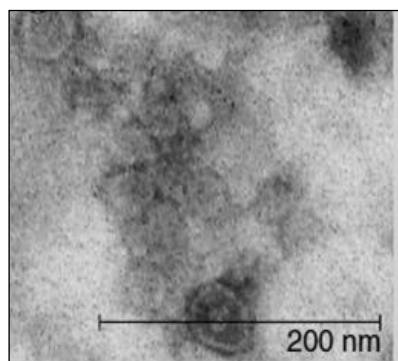
Nella sindrome di Gitelman sintomatica e/o con severa potassiemia, vengono tipicamente utilizzati i diuretici risparmiatori di potassio, come lo spironolattone (50-300 mg/die) e l'amiloride (10-30 mg/die) accompagnati da supplementazione di magnesio. In casi selezionati possono essere impiegati anche gli ACE-inibitori che aumentano la potassiemia [Bettinelli A *et al.*, 2004].

### 1.3 **EXOSOMI ed EXOSOMI URINARI**

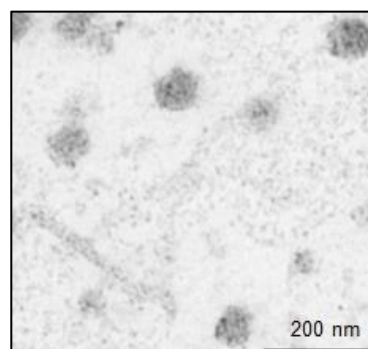
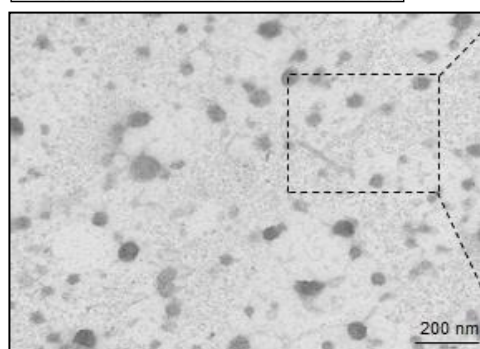
Gli exosomi sono piccole vescicole di membrana di origine endocitotica (delle dimensioni comprese tra 40 e 100 nm), rilasciate nello spazio extracellulare da molteplici tipologie cellulari [Simpson RJ *et al.*, 2008, Dear JW *et al.*, 2013]. Il termine exosomi fu inizialmente utilizzato per descrivere le microvescicole di membrana rilasciate dalle cellule immunitarie e successivamente da altri tipi cellulari, incluse le cellule tumorali [Iero M *et al.*, 2008].

Queste piccole vescicole di membrana contengono proteine, lipidi, RNA [Valadi H *et al.*, 2007; Luo SS *et al.*, 2009] ed anche, occasionalmente, piccoli frammenti di DNA extra-cromosomiale [Kahlert C *et al.*, 2013; Robbins PD *et al.*, 2014; Wang D *et al.*, 2014]. Mediante

flottazione su gradiente di saccarosio si è definita la loro densità compresa tra 1.13 e 1.19 g/cm<sup>3</sup>, in dipendenza dal tipo cellulare di origine [Raposo G *et al.*, 1996; Graner MW *et al.*, 2009]; se analizzati al microscopio elettronico, mostrano una caratteristica morfologia a sfera appiattita o biconcava delimitata da un doppio strato fosfolipidico (fig. 18) [Simpson RJ *et al.*, 2009; Yellon DM *et al.*, 2014].



**Figura 18:** a) micrografia elettronica di exosomi rilasciati da una linea cellulare (LIM1215) umana di carcinoma al colon (colorazione uranil-acetato) [modificata da Simpson RJ *et al.*, 2009]. b) Micrografia elettronica di exosomi urinari isolati da soggetti controllo (colorazione con uranil-acetato) [Raimondo F *et al.*, 2013].



Gli exosomi sono secreti *in-vitro* nei medium di coltura dalla maggior parte dei tipi cellulari sia di origine ematologica (cellule B e T, cellule dendritiche, mastociti, piastrine, macrofagi), sia di origine non ematologica (cellule dell'epitelio intestinale, neuronali, cellule di Schwann, cellule di linee tumorali, di melanoma, del carcinoma all'ovaio e alla prostata, adipociti, cellule timiche, cellule embrionali umane) [Simpson RJ *et al.*, 2009] e si possono ritrovare *in-vivo* nei fluidi corporei fisiologici quali plasma [Caby MP *et al.*, 2005], urine [Pisitkun T *et al.*, 2004], fluido amniotico [Asea AC *et al.*, 2008], fluido di lavaggio broncoalveolare [Admyre C *et al.*, 2003], fluido sinoviale [Vella LJ *et al.*, 2007], latte materno [Simpson RJ *et al.*, 2009], saliva [Ogawa Y *et al.*, 2011], sperma [Aalberts M *et al.*, 2012], bile [Masyuk AI *et al.*, 2010], sia nei fluidi secreti in condizioni patologiche, quali versamenti tumorali [Andre F *et al.*, 2002].

In aggiunta agli exosomi, le cellule possono rilasciare altre forme di vescicole di membrana nell'ambiente extracellulare - "apoptotic blebs" (ABs), "microparticles" (MPs), "shedding microrvescicles" (SMVs) [Majno G *et al.*, 1995; Aupeix K *et al.*, 1997] - dopo vari stimoli biologici, inclusa l'induzione della morte cellulare programmata (tab VII). A differenza degli exosomi, i quali rappresentano una popolazione di vescicole di membrana omogenea in dimensioni (40-100 nm) e forma, "apoptotic blebs", MPs e "shedding microvescicles"

rappresentano una popolazione eterogenea (100-1000 nm, forma variabile) di vescicole che gemmano direttamente dalla membrana plasmatica [Gyorgy B *et al.*, 2011].

**Tabella VII.** Principali caratteristiche dei differenti tipi di vescicole di membrana [Raimondo F *et al.*, 2011].

TYPE	SIZE	DENSITY	SHAPE	ORIGIN	RELEASE	NOTES
EXOSOME	40-100 nm	1.10-1.19 g/cm <sup>3</sup>	Homogeneous	MVB	Constitutive and regulated	Ceramide-dependent sorting
EXOSOME-LIKE	30-90 nm					
SHEDDING VESICLES	0.1-1 μm	~1.16 g/cm <sup>3</sup>	Variable	PM	Regulated	Unknown sorting mechanism
MICROPARTICLES					Induced by various stimuli	
APOPTOTIC BLEBS		1.24-1.28 g/cm <sup>3</sup>			Induced by apoptosis	Contain histones

Le differenze principali tra queste tipologie di vescicole (tab. VIII) riguardano da un lato le dimensioni e la densità, e dall'altro, l'origine, il meccanismo di formazione e le composizioni lipidica e proteica [Thery C *et al.*, 2009; Dear JW *et al.*, 2013].

### 1.3.1 Isolamento degli exosomi dai fluidi biologici

Gli exosomi possono essere secreti *in vitro* da una grande varietà di tipologie cellulari e si ritrovano anche *in vivo* nella maggior parte dei fluidi biologici. L'isolamento degli exosomi può pertanto essere diviso in due categorie: dai medium di coltura cellulari e dai fluidi biologici. In particolare, l'urina è un fluido biologico molto pratico dal punto di vista di studi di proteomica clinica, in quanto è ottenibile in grande quantità da tutti i pazienti in modo semplice e non invasivo; per questa ragione rappresenta una sorgente ideale di biomarcatori per la diagnosi, il trattamento e la classificazione di numerose patologie renali. Tuttavia, ad oggi non sono stati delineati protocolli standardizzati utilizzabili in maniera perfettamente riproducibile nella pratica clinica per la diagnosi precoce di forme patologiche renali. Lo studio ed in particolare le analisi di proteomica comparativa degli exosomi urinari richiedono innanzitutto una corretta preparazione del campione di urine per il successivo isolamento della componente vescicolare stessa.

Vi sono differenti protocolli che possono essere applicati per isolare/concentrare le proteine urinarie, per esempio la precipitazione, la liofilizzazione, l'ultracentrifugazione (impraticabile per studi su grande scala a causa del costo e del tempo necessario per applicarla) e la filtrazione; numerose sono le variabili da tenere in considerazione, sia intra-individuali (le urine del primo mattino contengono il più alto apporto di proteine; alterazioni nel profilo proteomico urinario dovute all'eccessiva assunzione di acqua) che inter-individuali (urine raccolte da pazienti di sesso maschile contengono una quantità di proteine maggiore rispetto ai

soggetti femminili, ma gli spots identificati sui gel sono in numero minore) [Thongboonkerd V *et al.*, 2006].

Shinada M *et al.* [Shinada M *et al.*, 2000] e Zhou H *et al.* [Zhou H *et al.*, 2006] hanno affrontato il tema della standardizzazione della raccolta delle urine e dei protocolli successivi finalizzati all'isolamento e all'analisi proteomica degli esosomi urinari. I risultati di questi studi dimostrano che l'isolamento delle proteine esosomiali da campioni di urine del primo mattino rispetto a campioni freschi o seconde urine comporta una leggera differenza dovuta probabilmente ad una minima degradazione proteica nel tratto urinario/vescica. Le direttive degli organismi internazionali (HKUPP, *Human Kidney Urine Proteome Project*), raccomandano di raccogliere le seconde urine del mattino come campione da sottoporre all'isolamento degli esosomi, consentendo una standardizzazione di raccolta del campione, l'eliminazione dei problemi connessi alla raccolta delle prime urine, come ad esempio una maggior proteolisi dovuta alla permanenza per tempi più lunghi in vescica e una discreta presenza di proteine di origine vescicale. In aggiunta, la raccolta delle seconde urine permette una maggior *compliance* del paziente che si reca in ambulatorio nella prima mattinata. Le urine così raccolte devono essere processate entro 4 ore. E' possibile inoltre rimuovere alcune proteine molto abbondanti nelle urine, quali THP e albumina, che potrebbero mascherare la presenza di proteine meno abbondanti ma di maggior interesse in qualità di biomarcatori [Wang Z *et al.*, 2012]. La THP (*Tamm-Horsfall protein*), conosciuta anche come uromodulina, si trova nelle urine sottoforma di polimeri ad alto peso molecolare a formare filamenti o matrici grazie ai suoi domini ZP (zona pellucida), ricchi in cisteina, in grado di formare ponti disolfuro [Schaeffer C *et al.*, 2009]. L'escrezione della THP è di circa 20-100 mg al giorno e, in virtù della sua abbondanza, oltre ad interferire con l'analisi mediante spettrometria di massa e western blot, può anche intrappolare nei suoi filamenti polimerici altre proteine [Rampoldi L *et al.*, 2011]. Pisitkun T *et al.* [Pisitkun T *et al.*, 2004] e successivamente Gonzales PA *et al.* [Gonzales PA *et al.*, 2009] hanno proposto l'utilizzo di agenti riducenti, come il ditiotreitolo (DTT) o il CHAPS, al fine di ridurre i ponti disolfuro della THP. Uno dei possibili vantaggi dell'utilizzo del CHAPS rispetto al DTT è la conservazione dell'attività delle proteasi associate alle vescicole [Musante L *et al.*, 2012]. Anche se la rimozione della THP potrebbe essere necessaria per l'analisi degli esosomi, è stato mostrato che questa proteina può avere significato fisiopatologico [Bachmann S *et al.*, 2005].

Lo stoccaggio dei campioni può essere necessario sia direttamente dopo l'iniziale raccolta delle urine, sia dopo l'isolamento degli esosomi. Il congelamento dei campioni a  $-80^{\circ}\text{C}$ , dopo l'aggiunta di antiproteasi al fine di prevenire l'eventuale degradazione proteica, risulta essere il metodo migliore per la loro conservazione, anche per lunghi periodi di tempo. Tuttavia il congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  causa una leggera perdita di materiale, seppur decisamente minore rispetto al congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , dovuta in parte all'aggregazione e conseguente co-precipitazione degli esosomi con i componenti urinari, come la THP, in parte all'adesione degli

exosomi sulla superficie delle provette di raccolta. Tuttavia è possibile massimizzare il recupero del materiale perso mediante ampi cicli di agitazione di circa 1 minuto dopo lo scongelamento [Zhou H *et al.*, 2006]. Per brevi periodi di stoccaggio può essere sufficiente una temperatura di +4°C od il congelamento a -20°C; mentre per periodi superiori ad un mese, una conservazione a -70°C/-80°C risulta ottimale [Jacquillet G *et al.*, 2014].

La purificazione, la caratterizzazione e la quantificazione degli exosomi sono tra i principali punti critici nell'analisi di queste vescicole. Un crescente numero di studi ha messo in evidenza il bisogno di produrre preparati con un elevato grado di purezza per poter eseguire le analisi di proteomica nel miglior modo possibile [Ristorcelli E *et al.*, 2009; Welton JL *et al.*, 2010; Mathivanan S *et al.*; 2010; Dear JW *et al.*, 2013]. Devono essere considerati molti fattori nella scelta del metodo da utilizzare: la matrice biologica (ex: colture cellulari o fluidi biologici), la rimozione dei contaminanti, il bisogno di separare differenti sottoinsiemi di particelle di membrana da altri (exosomi, ELVs, microvescicle, apoptotic blebs) ed il tipo di analisi o applicazione che seguiranno l'isolamento. Fra i metodi descritti abbiamo centrifugazioni differenziali, filtrazioni tramite membrane porose, concentrazione, flottazione su gradiente di densità e biglie per l'immunocattura [Simpson RJ *et al.*, 2008].

Il protocollo maggiormente utilizzato nell'isolamento degli exosomi è basato su un processo iniziale di centrifugazioni differenziali a velocità crescenti per eliminare cellule morte, detriti, contaminanti ed aggregati cellulari, seguito da sedimentazione. La purificazione degli exosomi può poi essere completata attraverso la flottazione su un gradiente lineare di saccarosio con equilibratura che si verifica a una densità di 1.15-1.18 g/mL [Raposo G *et al.*, 1996; Andre F *et al.*, 2002; Cantin R *et al.*, 2008; Chen CY *et al.*, 2013], oppure con un protocollo basato sulla separazione su un gradiente di iodixanolo (optiprep TM) [Mathivanan S *et al.*, 2010]. Più recentemente sono stati testati protocolli che prevedono la cattura degli exosomi mediante biglie ricoperte con un anticorpo in grado di riconoscere un epitopo antigenico di un marker arricchito negli exosomi, per es. anticorpi contro molecole di MHC II per exosomi rilasciati dalle APCs [Clayton A *et al.*, 2001], contro l'antigene A33 per exosomi da linee cellulari di carcinoma al colon [Simpson RJ *et al.*, 2008], o contro le tetraspanine CD9, CD63, CD81 e CD82, che possono teoricamente essere utilizzati per tutti gli exosomi indipendentemente dalla loro derivazione [Chen C *et al.*, 2010; Tauro BJ *et al.*, 2012]. Un'altra piattaforma che adotta questo concetto di base è l'ExoTEST™ (HANSABIOMED, Tallinn, Estonia), che consiste di piastre ELISA pre-coperte con specifici anticorpi che consentono la cattura di tutti gli exosomi presenti in un biofluido o di una sottopopolazione di interesse [Momen-Heravi F *et al.*, 2013]. Nonostante la cattura per affinità sia un metodo più rapido rispetto alle procedure convenzionali, questa può risultare non adatta per studiare la biologia degli exosomi in quanto è possibile una loro perdita di funzione durante il rilascio dalla matrice di cattura. Per ovviare a questo problema, Lamparsky H *et al.* [Lamparski H *et al.*, 2002] hanno sviluppato un metodo rapido che fa affidamento su una

combinazione di ultrafiltrazioni e ultracentrifugazioni in un range ideale di densità per arricchire e purificare gli esosomi, prevenendo l'aggregazione di vescicole causata dalla sedimentazione ad elevate velocità [Lamparski H *et al.* 2002]. In molti studi di proteomica, questo approccio è stato scelto per la massima purezza del campione ottenuto [Welton JL *et al.*, 2010].

Un ulteriore metodo, rapido ed altamente sensibile, per isolare gli esosomi è stato descritto da Shao H *et al.* e prevede l'utilizzo della Risonanza Magnetica micro-Nucleare ( $\mu$ NMR); gli esosomi vengono marcati con gli anticorpi di interesse, accoppiati a nanoparticelle magnetiche, e vengono successivamente isolati e quantificati mediante  $\mu$ NMR [Shao H *et al.*, 2012].

Di recente è stato proposto un nuovo protocollo di isolamento degli esosomi basato sull'utilizzo di un composto denominato Exoquick-TC™ (System Biosciences, Mountain View, CA, USA), al fine di precipitare gli esosomi stessi attraverso un unico step di centrifugazione a basse velocità (1500xg), facilitando inoltre l'isolamento di proteine e RNA dagli esosomi in quantità e purezza superiori rispetto alle altre metodiche. Taylor DD *et al.* hanno dimostrato che la precipitazione di esosomi mediante Exoquick-TC™ consente, in particolare, l'ottenimento di un'alta resa di miRNA con elevata purezza rispetto alle metodiche di isolamento convenzionali, risultato confermato anche da Alvarez ML *et al.* ma modificando il protocollo rispetto a quanto riportato dalla ditta produttrice [Taylor DD *et al.*, 2011; Alvarez ML *et al.*, 2012]. I risultati riportati in letteratura circa l'utilizzo di Exoquick-TC™ sono controversi; uno dei punti di maggior criticità consiste nel fatto che con questa metodica non è possibile distinguere con assoluta certezza gli esosomi dalle altre vescicole di membrana; inoltre l'incubazione *overnight* richiesta dal protocollo non lo rende adatto per un utilizzo diagnostico [Salih M *et al.*, 2014]. Per applicazioni cliniche, sarebbe necessario riuscire ad isolare gli esosomi bypassando lo step di ultracentrifugazione, utilizzando quindi metodi di immunisolamento, quali il saggio ELISA e il protein microarray [Sun AL *et al.*, 2012; Isobe K *et al.*, 2013].

La caratterizzazione degli esosomi isolati è tipicamente eseguita mediante microscopia elettronica, FACS, LC-MS/MS e western blotting [van Niel G *et al.*, 2006; Simpson RJ *et al.*, 2008]. In aggiunta una recente metodica per la rapida caratterizzazione morfologico-dimensionale degli esosomi è rappresentata dalla NTA (*Nanosight Tracking Analysis*), sviluppata dalla *Nanosight Ltd*, che viene utilizzata per determinare il profilo della distribuzione delle dimensioni di nanoparticelle in sospensione liquida. La tecnica è usata in combinazione con un ultramicroscopio, che consente di video-monitorare in tempo reale il movimento delle nanoparticelle, irradiate mediante una sorgente laser, sotto l'effetto del moto Browniano; il software del computer tiene traccia dei movimenti delle particelle e permette successivamente di valutarne il raggio idro-dinamico attraverso un'opportuna equazione [Soo CY *et al.*, 2012]. È stato dimostrato che la variabilità interna della misurazione della concentrazione degli esosomi mediante NTA risulta essere fortemente ridotta quando la caratterizzazione è preceduta da uno step di purificazione mediante ultracentrifugazione [Oosthuyzen W *et al.*, 2013]. Inoltre, poiché



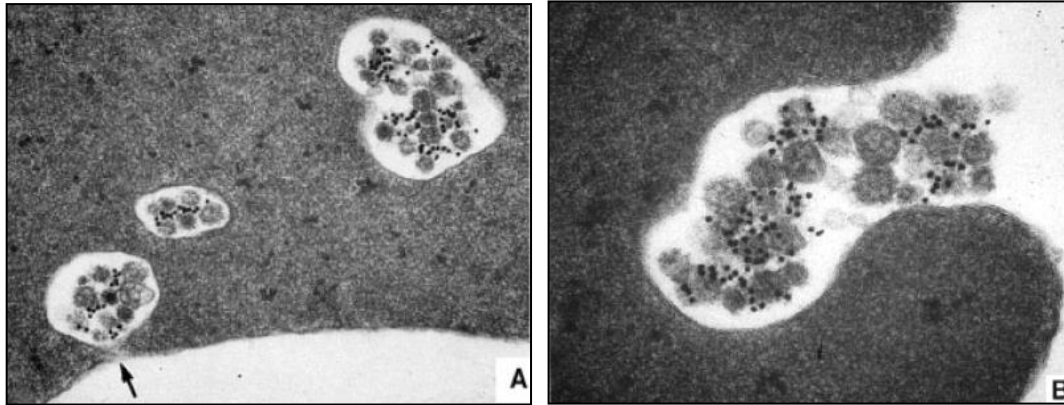
la citometria a flusso convenzionale non permette la distinzione tra vescicole di diametro <300 nm, è stato recentemente sviluppato un metodo specifico ad alta risoluzione basato proprio sulla citometria a flusso per l'analisi quantitativa di nano-vescicole immunomarcate [van der Vlist *et al.*, 2012].

Infine, quando si vuole studiare la proteomica degli esosomi, è fondamentale riuscire ad effettuare una comparazione di tipo quantitativo tra campioni di esosomi isolati in tempi diversi dello stesso soggetto e di soggetti diversi [Dear JW *et al.*, 2013]. Per quantificazioni assolute sarebbe auspicabile avere a disposizione una raccolta delle urine delle 24 ore; questo risulta un metodo poco praticabile in quanto vi è una bassa adesione da parte dei pazienti e quindi i risultati non sono affidabili. Un'alternativa che è stata proposta consiste nella normalizzazione della concentrazione del putativo biomarker esosomiale rispetto alla creatinina, che è secreta nelle urine in quantità relativamente costanti [Pisitkun T *et al.*, 2006]. Questo tipo di normalizzazione tuttavia assume che gli esosomi presenti nel campione di urine siano stati isolati tutti ed in modo assolutamente riproducibile e che il numero degli esosomi purificati sia correlato alla concentrazione del campione di urine [Salih M *et al.*, 2014]. Si potrebbe superare questo limite comparando esattamente lo stesso numero di esosomi dei diversi gruppi in studio, sebbene oggi la conta degli esosomi presenti in un determinato campione sia piuttosto problematica [Soo CY *et al.*, 2012]. Anche la THP è stata proposta come proteina “housekeeper” per la normalizzazione dei dati proteomici ottenuti; tuttavia, l'utilizzo della THP come normalizzatore è impedito dalla sua forte variabilità intra- ed inter-individuale nelle urine, non correlata al quantitativo di esosomi presenti [Lau WY *et al.*, 2008; Fernandez-Llama P *et al.*, 2010]. Sarebbe preferibile utilizzare per questo scopo alcuni noti marcatori esosomiali, quali la flotillina-1 o le tetraspanine, assumendo che tali proteine non subiscano variazioni negli esosomi tra lo stato fisiologico e quelli patologici [Street JM *et al.*, 2011; Dear JW *et al.*, 2013].

### 1.3.2 Biogenesi

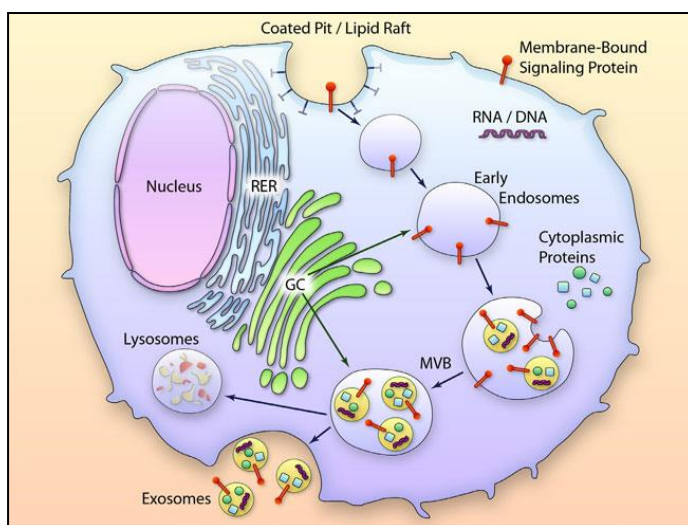
Le proteine secrete costituiscono un'importante classe di molecole, codificate approssimativamente dal 10 % del genoma umano, e possono essere suddivise in tre grosse famiglie: la prima comprende le proteine rilasciate mediante il pathway di secrezione classico, la seconda riguarda proteine rilasciate mediante il meccanismo noto come “*ectodomain shedding*”, dovuto alla proteolisi di specifiche proteine di membrana i cui domini extracellulari sono quindi rilasciati nel mezzo extracellulare [Diehl HC *et al.*, 2007], ed infine una componente importante è dovuta all'esocitosi di piccole vescicole di membrana.

Un pathway di rilascio proteico che coinvolge un meccanismo endocitico e la fusione dei corpi multivescicolari (MVBs) con la membrana plasmatica è stato descritto nel 1983 durante la maturazione dei reticolociti di pecora (fig. 19) [Pan BT e Johnstone RM *et al.*, 1983].



**Figura 19:** fotografie al ME di exosomi durante la maturazione di reticulociti di pecora [modificata da Simpson RJ et al., 2008].

Si è pensato per molti anni che i MBVs rappresentassero esclusivamente una fase tardiva nel processo di maturazione degli endosomi a lisosomi. In realtà si è visto che, sulla base delle loro proprietà biochimiche, i MBVs possono evolvere in lisosomi (“*degradative MBVs*”) oppure possono essere veicolati verso la membrana plasmatica dove, in seguito alla fusione con essa, rilasciano il loro contenuto, le vescicole intraluminari (ILVs), nello spazio extracellulare (“*exocytic MBVs*”); le ILVs rilasciate vengono definite exosomi [Simpson RJ et al., 2009, Raposo G et al., 2013]. Le ILVs sono progressivamente accumulate durante la maturazione dell’endosoma e vengono formate dalla gemmazione di vescicole dalla membrana endosomiale [Babst M et al., 2005]. Durante questo processo alcune proteine citosoliche vengono incorporate nelle invaginazioni della membrana e racchiuse in queste vescicole di 40-100 nm; in tal modo mantengono il medesimo orientamento topologico della membrana plasmatica (fig. 20).



**Figura 20:** processo di formazione e rilascio nell’ambiente extracellulare degli exosomi [modificata da Waldestrom A et al., 2014]

Un ruolo importante nella biogenesi dei MBVs e nello smistamento delle proteine endosomiali all’interno degli stessi è svolto dai complessi proteici ESCRTs (*Endosomal Sorting*

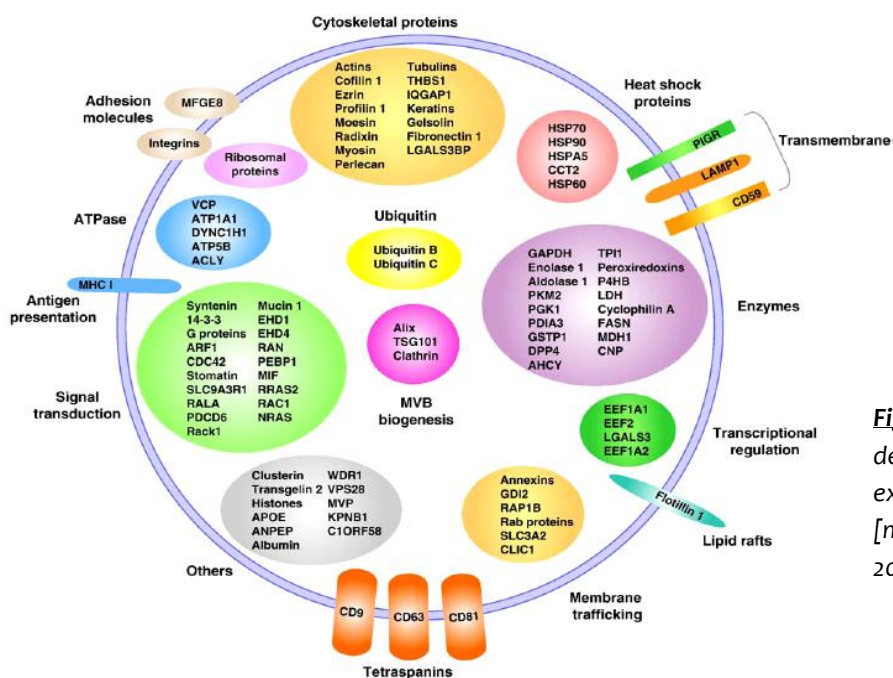
*Complexes Required for Transport*), mediante un processo ubiquitina-dipendente [Hurley JH *et al.*, 2008]; gli ESCRTs comprendono una ventina di proteine che si assemblano a formare quattro complessi (ESCRT-0, -I, -II e -III) insieme ad altre componenti proteiche ad essi associate, quali VPS4 (*Vacuolar Protein Sorting 4*), VTA1 (*Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog*), Alix (*ALG-2 Interacting protein X*) [Henne WM *et al.*, 2011; Colombo M *et al.*, 2013].

Dal punto di vista molecolare, la proteina HRS (*Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate*), facente parte del complesso ESCRT-0, riconosce le proteine mono-ubiquitinate e le sequestra a livello della membrana endosomiale. HRS recluta inoltre la proteina TSG101 del complesso ESCRT-I, che lega quindi le proteine ubiquitinate e favorisce, insieme al complesso ESCRT-II ed alla proteina Alix, la successiva oligomerizzazione del complesso ESCRT-III, che sembra avere un ruolo nella concentrazione delle proteine all'interno dei MVBs. ESCRT-III recluta a sua volta l'enzima deubiquitinante Doa4, che rimuove l'ubiquitina dalle proteine prima che queste vengano internalizzate nei MVBs. Infine, l'ATPasi Vps4 lega il complesso ESCRT-III disassemblandolo in maniera ATP - dipendente [Raiborg C *et al.*, 2003; Fevrier B *et al.*, 2004; Record M *et al.*, 2011; Colombo M *et al.*, 2013]. I complessi proteici ESCRT -I-II e III coinvolti nel sorting delle proteine marcate nei MVBs sono quindi reclutati transientemente sul lato citosolico della membrana dell'endosoma [Katzmann DJ *et al.*, 2002]. È stato visto che alcune proteine associate ai complessi ESCRTs, quali Alix e Tsg101, sono costitutivamente presenti negli exosomi, ma recentemente sono stati anche riportati meccanismi di biogenesi ESCRTs-indipendenti, giustificati dal fatto che il concomitante silenziamento delle subunità dei complessi ESCRT non compromette totalmente la formazione dei MVBs [Stuffers S *et al.*, 2009; Colombo M *et al.*, 2013]; uno di questi pathway potrebbe coinvolgere i metaboliti della sfingomieline, come il ceramide e questa osservazione è supportata dalla presenza, negli exosomi, di alte concentrazioni di ceramide e suoi derivati [Trajkovic K *et al.*, 2008; Brouwers JF *et al.*, 2012]. Di recente è stato proposto un nuovo pathway di biogenesi ESCRT-indipendente che potrebbe coinvolgere l'acido fosfatidico (PA), che andrebbe ad indurre la curvatura interna dei MVBs favorendo la formazione delle ILVs [Ghossoub R *et al.*, 2014]. Non è chiaro inoltre se esistano due classi distinte di MVBs (“*exocytic*” e “*degradative*”) o se i MVBs contengano ILVs “*exocytic*”/“*degradative*” [Kowal J *et al.*, 2014]. Ad oggi, comunque, gli exosomi sono il solo tipo di vescicole di membrana che originano dai compartimenti intracellulari come i MVBs.

I meccanismi coinvolti nella migrazione dei MVBs verso la periferia cellulare e nella loro successiva fusione con la membrana plasmatica sono ancora in gran parte da delucidare [Simpson RJ *et al.*, 2008; Raposo G *et al.*, 2013]; questi processi richiedono le componenti proteiche del citoscheletro, le proteine motrici ad esso associate (kinesina e miosina), le piccole GTPasi della famiglia RAB (RAB27A e RAB27B) ed il macchinario di fusione, in particolare i complessi proteici SNAREs (*Soluble NSF Attachment protein REceptor*) [Cai HK *et al.*, 2007; Ostrowski M *et al.*, 2010; Raposo G *et al.*, 2013; Kowal J *et al.*, 2014]. Il processo di rilascio degli exosomi può essere



proteine del citoscheletro (actina, tubuline, cofilina-1, ezrina, miosina) [Mathivanan S *et al.*, 2009]; proteine di presentazione dell'antigene (HLA di classe I e II) [Denzer K *et al.*, 2000]; antigeni tumorali (HER2, gp100, MelanA/Mart-1); recettori di morte cellulare (FasL, TRAIL) [Huber V *et al.*, 2005]; citochine e recettori associati (TNF- $\alpha$ , TNFR1, TGF  $\beta$ ) [Taylor D *et al.*, 2005]; trasportatori del ferro (TfR) [Johnstone RM *et al.*, 1987]; enzimi (enolasi, aldolasi) [Hegmans JP *et al.*, 2004]; trasportatori dei farmaci (ATP7A, ATP7B, MRP2) [Safei R *et al.*, 2005]; proteine "heat shock" (HSP60, HSP70, HSP90) [Thery C *et al.*, 2002], proteine che garantiscono protezione dalla lisi del complemento (CD55 e CD59) [Robbins PD *et al.*, 2014], proteine dei complessi ESCRT (TSG101, Alix, ESCRT I, II e III) [Février B *et al.*, 2004] (fig. 22). Il database ExoCarta (<http://www.exocarta.org>) raggruppa tutte le proteine che sono state identificate negli exosomi isolati da diverse fonti; questo catalogo è stato recentemente affiancato dal compendio Vesciclepedia che viene costantemente aggiornato da nuovi contributi che provengono da studi di differenti gruppi di ricerca [Karla H *et al.*, 2012].



**Figura 22:** Rappresentazione grafica della composizione proteica degli exosomi classificati per funzione. [modificata da Mathivanan S *et al.*, 2010].

Oltre ad una sostanziale presenza di proteine citosoliche (circa il 50%), nella maggior parte degli exosomi sono molto rappresentate le proteine di membrana. Tra queste ultime vi sono le tetraspanine (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 e CD82), famiglia di proteine di membrana >30 kDa costituite da quattro domini transmembrana, che vengono generalmente utilizzate come markers degli exosomi stessi [Hemler ME *et al.*, 2003; Bard MP *et al.*, 2004; Raposo G *et al.*, 2013]. La loro presenza in queste vescicole è di particolare interesse in quanto è stato recentemente visto che le tetraspanine organizzano le integrine in complessi multiproteici all'interno di specifici domini di membrana, chiamati *tetraspanin-enriched microdomains*

(TEMs). La composizione dei TEMs in differenti tipi cellulari può influenzare la funzione dei recettori di adesione [Hakomori S *et al.*, 2002; Stipp CS *et al.*, 2010].

**Tabella VIII:** Lista delle proteine comunemente trovate in tutti gli exosomi [modificata da Simpson RJ *et al.*, 2008]

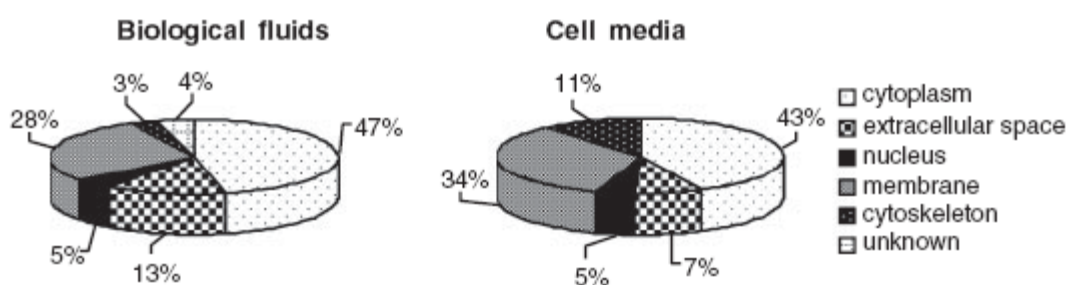
<b>Protein Category and Description</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Protein Category and Description</b>	<b>Gene Symbol</b>
<b>Antigen Presentation</b>		<b>Signalling Proteins</b>	
HLA class-I histocompatibility antigen	HLA	14-3-3 proteins	YWHA
<b>Cell Adhesion</b>		GTPase Hras	HRAS
Lactadherin	MFGE8	Rho GDP dissociation inhibitor 1	ARHGDI1A
Thrombospondin-1	THBS1	Rho related GTP-binding protein RhoC precursor	RHOC
Claudin-1	CLDN1	Ras related protein Rap1b	RAP1B
Integrins	ITG	Ras related protein Rap2b	RAP2B
<b>Cell Structure and Motility</b>		Ras related protein R-Ras2	RRAS2
Actins	ACT	Ras GTPase-activating like protein IQGAP1	IQGAP1
$\alpha$ -actinin-1	ACTN	Syntenin-1	SDCBBP
Cofilin-1	CFL1	Transforming protein RhoA	RHOA
Ezrin	VIL2	<b>Guanine nucleotide binding proteins (G proteins)</b>	
Moesin	MSN	G(I)/G(S)/G(T) subunit beta	GNB
Myosin	MYH	G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma	GNG
Radixin	RDX	G(s) subunit $\alpha$	GNAS
Tubulins	TUB	Subunit $\alpha$	GNA
<b>Heat Shock Proteins and Chaperones</b>		G(i), $\alpha$	GNAI
Heat Shock Cognate 71kDa protein	HSPA8	G(o) subunit $\alpha$	GNAO
Heat Shock Protein hsp90	SP90AB1	G(q) subunit alpha	GNAQ
T-complex protein-1	CCT	<b>Tatraspanins</b>	
<b>Metabolic Enzymes</b>		CD9 antigen	CD9
$\alpha$ -Enolase	ALDOA	CD63 antigen	CD63
Fatty acid Synthase	FASN	CD81 antigen	CD81
Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	GAPDH	CD82 antigen	CD82
Phosphoglycerate kinase-1	PGK1	<b>Transcription and Protein Synthesis</b>	
Phosphoglycerate-mutase-1	PGAM1	Histones	HIST
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	PKM2	Ribosomal proteins	RPS
<b>MVB Biogenesis</b>		Ubiquitin	RPS27A
Alix	PDCD6IP	Elongation factor 1- $\alpha$ 1	EEF1A1
<b>ESCRT I complex</b>		<b>Trafficking and Membrane Fusion</b>	
Tumor susceptibility gene 101	TSG101	Annexins	ANXA
Vacuolar sorting protein 28	VPS28	ADP-ribosylation factor	ARF
Vacuolar protein sorting associated protein 27	VPS37	AP-2 complex subunit $\alpha$ -1	AP2A1
<b>ESCRT II complex</b>		AP-2 complex subunit $\beta$ -1	AP2B1
Vacuolar protein sorting associated protein 25	VPS25	Clathrin heavy chain 1	CLTC
Vacuolar protein sorting associated protein 36	VPS36	Rab GDP dissociation inhibitor $\beta$	GDI2
Vacuolar protein sorting SNF8	SNF8	Ras related protein Rab	RAB
<b>ESCRT III complex</b>		Synaptosomal-associated protein 23	SNAP23
Charged MVB proteins	CHMP	Syntaxin-3	STX3

E' ormai accettata l'esistenza in tutti gli exosomi, indipendentemente dalla loro origine biologica, di un set definito e conservato di proteine comuni, riassunto nella tab. VIII, che ne costituiscono il "core". Considerazioni accurate su questo limitato numero di proteine possono fornire due distinte opportunità: da un punto di vista biologico è possibile far luce sul

meccanismo di biogenesi degli esosomi, e da un punto di vista sperimentale possono fornire un serbatoio di probabili marker che definisca il tipo specifico di vescicole [Raimondo F *et al.*, 2010].

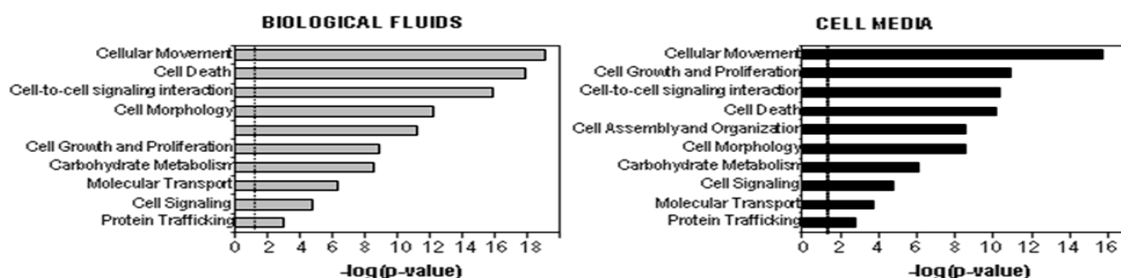
Per stabilire la reale presenza di esosomi in un determinato campione è necessario indagare la contemporanea presenza di più marcatori esosomiali; questa esigenza è stata recentemente sottolineata dalla dimostrazione che la proteina TSG101, frequentemente utilizzata come tipico marcatore esosomiale, può essere in realtà rilasciata anche nelle vescicole gemmanti direttamente dalla membrana plasmatica, risultando, di conseguenza, non esosoma-specifica [Nabhan JF *et al.*, 2012; Dear JW *et al.*, 2013].

È possibile suddividere questo set di proteine comuni in base alla loro localizzazione subcellulare, nei fluidi biologici e nei media di colture cellulari, come mostrato sotto in fig. 23.



**Figura 23:** Classificazione delle proteine comuni in base alla localizzazione subcellulare [Raimondo F *et al.*, 2010].

Osservando i principali processi biologici a cui le proteine presenti negli esosomi prendono parte (fig. 24), si nota una sostanziale presenza di proteine correlate al movimento cellulare, all'aggregazione, all'organizzazione e alla morfologia cellulare (ad es. actina, annessine, TSG101, fibronectina-1, VAMP8, exrina), che dipende dal coinvolgimento dei pathways di sorting degli endosomi e del macchinario citoscheletrico implicato nella biogenesi degli esosomi.



**Figura 24:** Associazione delle funzioni biologiche alle proteine esosomiali comuni (Ingenuity Pathway Analysis Software) [Raimondo F *et al.*, 2010].

La presenza di proteine coinvolte nella morte cellulare (ad es. Alix), molto più marcata nei fluidi biologici rispetto alle colture cellulari, può derivare in parte dalla contaminazione da particelle apoptotiche, ma può essere legata al coinvolgimento degli esosomi nella senescenza [Re RN *et al.*, 2009], nell'apoptosi e nella modulazione della risposta immunitaria [Wieckowski EU *et*

*al.*, 2009]. Risultano essere particolarmente presenti anche proteine coinvolte nel signaling e nell'interazione tra cellule, a testimonianza del possibile ruolo degli exosomi nella comunicazione intercellulare.

In aggiunta ad un set di proteine conservate, gli exosomi mostrano anche proteine specifiche del tipo cellulare di origine: ad esempio gli exosomi derivati da linfociti B presentano il B cell receptor, quelli derivati da linfociti T presentano CD3 [Blanchard N *et al.*, 2002], quelli derivati da cellule dendritiche presentano CD11c, quelli rilasciati dalle cellule presentanti l'antigene (APCs) presentano molecole coinvolte nella stimolazione delle cellule T quali CD86 e ICAM-1 [Thery C *et al.*, 2010]. I profili proteici ottenuti da exosomi isolati da diverse fonti indicano dunque la presenza di proteine che ne riflettono l'origine ed il possibile ruolo fisiologico: ad esempio, attraverso l'analisi del profilo proteico degli exosomi rilasciati da cheratinociti umani in coltura, è stato visto che alcune proteine possono funzionare come fattori di modulazione della matrice extracellulare per i fibroblasti del derma [Chavez-Munoz C *et al.*, 2009].

Il proteoma degli exosomi urinari è stato investigato attraverso spettrometria di massa; sono state identificate proteine provenienti dalle cellule del glomerulo e da tutti i segmenti del nefrone [Pisitkun T *et al.*, 2004]. Gonzales PA *et al.*, utilizzando un approccio LC-MS/MS, hanno identificato 1132 proteine negli exosomi urinari; tuttavia questo consistente risultato è stato ottenuto sottoponendo al processo di purificazione exosomiale circa 400 ml di urine, un volume non disponibile nella pratica clinica [Gonzales PA *et al.*, 2009]. Utilizzando il medesimo protocollo di isolamento descritto da questi autori, uno studio più recente ha analizzato il proteoma degli exosomi urinari mediante un approccio MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*), portando all'identificazione di più di 3000 proteine utilizzando campioni di urine isolati da nove controlli sani. Con questa metodica si riescono ad identificare circa 1000 proteine a partire da 25 ml di urine, rendendola più praticabile per studi clinici [Wang Z *et al.*, 2012].

- **Lipidi**

In aggiunta alle proteine, gli exosomi presentano anche una varia composizione lipidica che è caratteristica del tipo cellulare di origine e che gioca un ruolo determinante nella loro biogenesi [Chu Z *et al.*, 2005]. L'analisi della composizione lipidica è stata eseguita su exosomi derivati da diverse tipologie cellulari quali cellule dendritiche, mastociti, reticolociti e linfociti B [Mathivanan S *et al.* 2010]; questi studi non ne forniscono tuttavia una visione uniforme. Gli exosomi secreti dagli eritrociti, ad esempio, mostrano una composizione lipidica simile a quella della membrana plasmatica [Vidal M *et al.*, 1989], mentre exosomi derivanti da mastociti, cellule dendritiche, linfociti B e oligodendrociti sono arricchiti in sfingomieline rispetto alla plasmamembrana delle cellule di origine [Wubbolts R *et al.*, 2003; Laulagnier K *et al.*, 2004; Trajkovic K *et al.*, 2008]. Gli exosomi secreti da linfociti B, cellule di melanoma ed oligodendrociti



sono inoltre arricchiti in colesterolo, mentre quelli rilasciati da mastociti ed oligodendrociti anche in fosfolipidi saturi (fosfatidil-serina e fosfatidil-etanolamina) [Parolini I *et al.*, 2009].

E' stato osservato un arricchimento in colesterolo nelle ILVs all'interno dei MVBs; sembra, infatti, che sulle vescicole stesse si concentri il 63% del colesterolo localizzato all'interno del lume dell'endosoma [Mobius W *et al.*, 2003]. L'acido lyso-bisfosfatidico (LBPA), che è stato visto associarsi al colesterolo, inizia ad accumularsi nei MVBs e potrebbe essere un prerequisito per la formazione delle ILVs, ma non si è notato arricchimento di questo fosfolipide negli exosomi; si ritiene che il LBPA rimanga associato alla membrana che delimita i MVBs una volta che la ILV è stata espulsa [Fevrier B *et al.*, 2004]. Il LBPA è ottenuto a partire dal fosfatidilglicerolo (PG), la cui biosintesi avviene a livello dei mitocondri; il PG verrebbe quindi trasportato verso i MVBs che sembrano contenere il macchinario enzimatico di conversione del PG stesso a dare LBPA [Bouvier J *et al.*, 2009]. E' stato visto inoltre, a conferma del suo ruolo nella biogenesi delle ILVs, che il LBPA interagisce fortemente con Alix, proteina anch'essa coinvolta nella formazione di queste vescicole [Matsuo H *et al.*, 2004].

Si è osservata negli exosomi la presenza di lipidi bioattivi quali le prostaglandine, che esplicano molteplici effetti biologici correlati all'infiammazione. Esse non sono prodotte nei MVBs, ma a livello del reticolo endoplasmatico, grazie ai due enzimi COX1 e COX2, e sono successivamente inviati al pathway di internalizzazione nelle ILVs [Subra C *et al.*, 2010]. Negli exosomi è stata anche riportata la presenza di un altro enzima coinvolto nella biosintesi delle prostaglandine, la PGE sintasi [Valadi H *et al.*, 2007], e del modulatore del recettore nucleare PPAR $\gamma$ , 15 $\Delta$ -PGJ2 (*15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2*) [Subra C *et al.*, 2010].

Gli exosomi secreti da cellule della guaina mielinica del sistema nervoso centrale di topo mostrano un arricchimento in ceramide, derivato dall'idrolisi della sfingomielinina ad opera di una sfingomielinasi e che si ritiene anch'esso coinvolto nella formazione delle ILVs non destinate ai lisosomi ma alla secrezione sottoforma di exosomi [Trajkovic K *et al.*, 2008]. E' stato anche osservato che la quantità di digliceridi negli exosomi derivanti da mastociti è due volte inferiore rispetto a quella delle cellule di partenza; i digliceridi hanno la funzione di modulare l'impacchettamento dei fosfolipidi nella membrana, e la loro quantità ridotta negli exosomi, insieme ad un alto contenuto di specie desaturate, ha suggerito una loro più elevata rigidità di membrana, associata ad una miglior stabilità in circolo [Fevrier B *et al.*, 2004]. Sulla superficie degli exosomi derivanti da piastrine è stata inoltre osservata la presenza di bassi livelli di fosfatidilserina (PS), un lipide presente normalmente nel lato citosolico della membrana plasmatica cellulare [Heijnen HF *et al.*, 1999].

Un unico studio molto recente relativo alla composizione lipidica degli exosomi urinari ha permesso di osservare l'esistenza di alcune significative differenze tra pazienti RCC (renal cell carcinoma) e controlli; le analisi preliminari hanno evidenziato un arricchimento di particolari

lipidi negli exosomi RCC come ad esempio la lyso-fosfatidiletanolamina (LysoPE) [Del Boccio P *et al.*, 2011].

De Gassart A *et al.* [de Gassart A *et al.*, 2003] hanno ipotizzato la segregazione e l'associazione nella membrana exosomiale di specifici lipidi e proteine che, nella membrana plasmatica, favoriscono la formazione di particolari microdomini chiamati lipid rafts, che possono essere isolati grazie alla loro insolubilità ai detergenti anionici (ad es. il Triton) ed alla flottazione nelle regioni a bassa densità in gradienti di saccarosio [Parolini I *et al.*, 1996]. Queste frazioni sono arricchite in colesterolo e glicosfolipidi, e contengono differenti proteine acilate, come le proteine con ancora GPI e le protein chinasi della famiglia Src [Harder T *et al.*, 1998]. L'ipotesi della presenza di lipid rafts nelle vescicole secrete è basata sul fatto che il rapporto colesterolo/fosfolipidi è simile a quello riscontrato nelle membrane cellulari, considerando l'arricchimento in colesterolo delle membrane e confrontandolo con quello dei compartimenti intracellulari; il ganglioside GM1 è stato trovato negli exosomi, e sia le proteine con ancora GPI, come CD55, CD58, e CD59, sia quelle contenenti domini di proibitine (stomatina e flotillina-1) sono in essi selettivamente arricchite. E' stato proposto che questi microdomini lipidici siano coinvolti nella biogenesi delle ILVs [Fevrier B *et al.*, 2004]; infatti i lipid rafts si sono già stati dimostrati essere elementi chiave nel processo di formazione di vescicole in caso di aumento citosolico di  $Ca^{2+}$ . Un altro possibile ruolo dei lipid rafts nella formazione degli exosomi potrebbe essere correlato alla bassa diffusione laterale delle proteine presenti in questi sottodomini. La presenza dei lipid rafts negli endosomi di riciclo rallenta il fenomeno di riutilizzo delle proteine GPI della membrana plasmatica; queste molecole a basso grado di riciclo hanno quindi maggiori probabilità di essere incorporate nelle ILVs, mentre molecole con una maggior velocità di riutilizzo hanno maggiori possibilità di sfuggire all'inclusione in MVBs. I lipid rafts potrebbero anche servire come piattaforme per il sorting basato sull'azione dell'ubiquitina durante la selezione delle proteine exosomiali; è stato dimostrato infatti che l'ubiquitinazione è da considerarsi un meccanismo di sorting che coinvolge molti effettori che si associano ai domini lipidici durante la formazione dei MVBs. I lipid rafts favorirebbero l'organizzazione della piattaforma lipidica, concentrando proteine trasportatrici ed effettrici all'interno delle ILVs. Infine, i rafts possono essere coinvolti nel processo di fuoriuscita dei virus dalle cellule, visto che proteine con ancora GPI sono incorporate nella membrana dei virioni [de Gassart A *et al.*, 2003].

- **mRNA e microRNA**

I microRNA sono piccoli RNA (22-25 nt) non codificanti in grado di interferire con i mRNA legandosi in maniera specifica, sulla base della loro complementarità, alle regioni 3'UTR dei messaggeri stessi al fine di indurne la degradazione o di regolarne la traduzione. La presenza di mRNA e miRNA negli exosomi rilasciati da mastociti di ratto e umani è stata per la prima volta evidenziata nel 2007 da Valadi H *et al.*, [Valadi H *et al.*, 2007]. Mediante analisi microarray sono

stati identificati negli exosomi di ratto approssimativamente 1300 trascritti, il 21% dei quali non era presente nel citosol della cellula secernente, e 121 miRNA. Un anno dopo, la presenza di mRNA e miRNA è stata confermata anche in exosomi purificati da cellule umane di glioblastoma [Skog J *et al.*, 2008]. Nel complesso queste due analisi hanno mostrato l'assenza negli exosomi di RNA ribosomale (rRNA); al contrario un lavoro recente ha riportato la presenza di rRNA 18S e 28S in exosomi purificati da urine di individui sani [Miranda KC *et al.*, 2010]. Recentemente è stata osservata la presenza anche di una grande varietà di altre specie di RNA non codificanti, tra cui sequenze ripetute, frammenti di tRNA, Y RNA e small interfering RNAs (siRNA) [Bellingham SA *et al.*, 2012, Nolte H *et al.*, 2012].

Si ritiene inoltre che le diverse molecole di RNA vengano incorporate negli exosomi in maniera altamente selettiva, in quanto il loro profilo non riflette quello delle cellule di origine [Rabinowitz G *et al.*, 2009; Mittelbrunn M *et al.*, 2011]; il meccanismo dal quale dipende questo *packaging* selettivo non è chiaro. Gli RNAs presenti negli exosomi sono molto più stabili, maggiormente protetti dall'attacco delle RNasi e molto più resistenti alla degradazione, durante lunghi periodi di congelamento, rispetto agli RNAs cellulari [Keller *et al.*, 2011; Hu G *et al.*, 2012]. È stato osservato che i trascritti contenuti in exosomi murini trasferiti in mastociti umani possono essere tradotti in nuove proteine di topo nelle cellule riceventi, suggerendo la possibilità di un nuovo meccanismo di comunicazione genetica tra cellule di mammifero [Valadi H *et al.*, 2007]; gli exosomi potrebbero allora rappresentare dei veicoli mediante i quali le cellule possono comunicare tra loro trasmettendosi RNA, e, quindi, modulare la sintesi proteica reciproca. È stato ad esempio riportato che specifici mRNA placentali rilasciati tramite gli exosomi possono essere esportati dal trofoblasto placentare alla circolazione materna [Skog J *et al.*, 2008]. Anche mRNA rilasciati negli exosomi urinari da una specifica sottopopolazione di cellule del nefrone possono andare ad influenzare e/o coordinare la sintesi proteica di altre cellule epiteliali del tubulo renale, suggerendo un interessante meccanismo di co-regolazione tra le diverse strutture del nefrone, dipendente dagli RNA exosomalici [Dimov I *et al.*, 2009; Raposo G *et al.*, 2013; Gildea JJ *et al.*, 2014]. Inoltre, se gli exosomi interagiscono con le cellule bersaglio mediante legame con un recettore, questo meccanismo di comunicazione deve essere cellula-specifico. È stato infatti dimostrato che RNA derivato da exosomi di mastociti può essere trasferito ad altri mastociti, ma non a cellule quali quelle CD4 positive [Valadi H *et al.*, 2007]. Sono necessari tuttavia ulteriori studi sui miRNA exosomalici per identificarne, se esiste, un set conservato e per stabilire se questa comunicazione genetica tra le cellule possa avvenire solamente nel microambiente di rilascio, o anche a distanza, in maniera simile agli ormoni, attraverso i sistemi circolatorio e linfatico. Questa nuova capacità, se confermata, potrebbe renderli vettori ideali per la terapia genica [Valadi H *et al.*, 2007].

L'identificazione dei miRNA negli exosomi rilasciati in circolo dal carcinoma al polmone [Rabinowitz G *et al.*, 2009], dal carcinoma all'ovaio [Taylor DD *et al.*, 2008], e dal rene [Saal S *et*

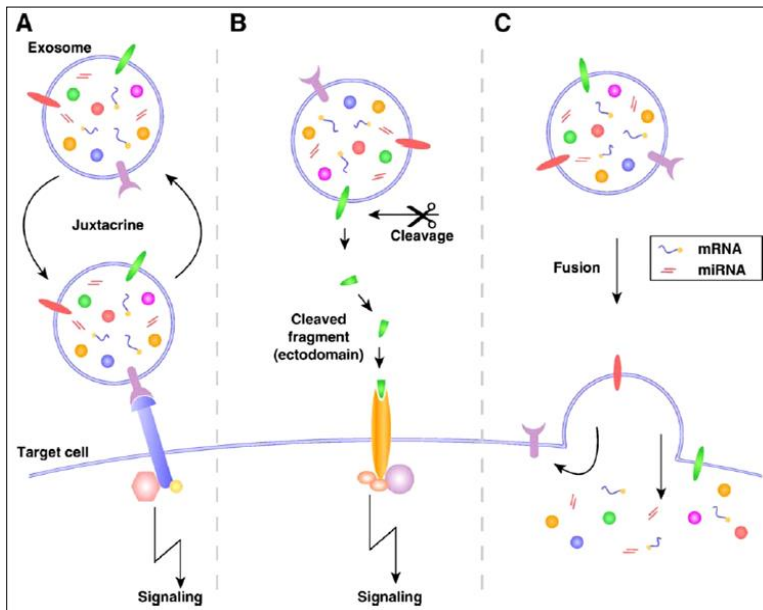
*al.*, 2009], ha suscitato molto interesse, in virtù della loro stabilità, che li rende ideali marcatori di numerosi stati patologici, e della capacità di modulare la sintesi proteica e quindi la funzionalità delle cellule bersaglio [Michael M *et al.*, 2010; Ciesla M *et al.*, 2011; Hu G *et al.*, 2012]. Taylor DD *et al.* hanno osservato, per esempio, che il profilo d'espressione dei miRNA presenti negli esosomi rilasciati in circolo dal tumore all'ovaio rispecchia il profilo del tumore stesso, suggerendo un loro possibile utilizzo nello screening per la rivelazione del cancro all'ovaio in individui asintomatici e per monitorare il rischio di recidiva. Attraverso analisi microarray questi autori hanno anche studiato l'espressione dei miRNA associati agli esosomi tumore-derivati sottolineando il loro potenziale in qualità di indicatori di prognosi e di farmaco-resistenza [Taylor DD *et al.*, 2008]. È stato dimostrato che i macrofagi possono influenzare l'invasività delle cellule tumorali del cancro al seno trasferendo ad esse miRNA con potenziale oncogenico [Yang M *et al.*, 2011]. Anche i miRNA trasportati dagli esosomi rilasciati dai linfociti a livello delle sinapsi immunologiche possono andare ad influenzare ed alterare l'espressione genica della cellule APCs riceventi [Mittelbrunn M *et al.*, 2011]. È stato dimostrato che il trasferimento dei miRNA esosomiali delle cellule stromali del midollo osseo può contribuire allo stato di anergia delle cellule B [Lim PK *et al.*, 2011].

Per quanto concerne gli esosomi urinari, alcuni studi hanno rivelato un possibile ruolo dei miRNA in essi contenuti in ambito diagnostico e prognostico per le patologie renali; Zhou H *et al.* hanno dimostrato che i livelli di specifici miRNA (miR-27b e miR-192) negli esosomi urinari possono permettere di distinguere, tra i pazienti affetti dal lupus eritematoso sistemico, quelli che presentano, in aggiunta, la nefrite [Zhou H *et al.*, 2008]. È stato osservato inoltre che i miRNA sono coinvolti nello sviluppo e nel mantenimento strutturale e funzionale del rene e lo studio dei loro profili d'espressione tissutali ha permesso di identificarne alcuni coinvolti in patologie renali quali, ad esempio, il rene policistico, la nefropatia diabetica, il carcinoma a cellule chiare e il carcinoma cromofobo; tali profili d'espressione potrebbero rappresentare quindi degli utili strumenti diagnostici [Saal S *et al.*, 2009]. In particolare, uno studio recente ha dimostrato per la prima volta il forte arricchimento, negli esosomi urinari di pazienti microalbuminurici rispetto a soggetti sani di controllo, del miR-145, un marcatore delle cellule mesangiali la cui espressione è indotta dal TGF- $\beta$ 1 [Barutta F *et al.*, 2013].

### 1.3.4 Funzioni

Negli ultimi anni molte delle funzioni degli exosomi hanno cominciato ad essere chiarite. La presenza degli exosomi nel siero ed in altri fluidi biologici quali effusioni tumorali, lavaggi broncoalveolari e urine, suggerisce un loro coinvolgimento in processi fisiologici e patologici. Tra queste funzioni le meglio caratterizzate sono le seguenti:

- regolazione della comunicazione intercellulare. Sono stati proposti diversi meccanismi per descrivere le possibili interazioni exosomi/cellule target (fig. 25) [Mathivanan S *et al.*, 2010]. Gli exosomi *a)* potrebbero interagire direttamente con le cellule bersaglio mediante convenzionali interazioni ligando-recettore; ad esempio gli exosomi secreti da DC mature presentano la molecola ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) tramite la quale possono interagire con linfociti T che presentano l'integrina LFA1 (*leukocyte function associated antigen 1*). Gli exosomi esprimono inoltre varie molecole di adesione come VLA-4, l' $\alpha$ M e la  $\beta$ 2 integrina che possono potenzialmente mediare interazioni adesive sia con componenti della matrice extracellulare sia con una moltitudine di ligandi presenti sulla superficie cellulare [Segura E *et al.*, 2007]. Anche diverse proteine di legame per la fosfatidilserina (PS) presenti sulle cellule bersaglio possono essere responsabili dell'interazione con gli exosomi; esse includono diverse classi di recettori scavenger, integrine, recettori del complemento, CD14 e recettori specifici della PS. In particolare sono stati descritti due recettori per la PS, TIM1 (*T-cell Immunoglobulin-Mucin domain containing molecule 1*), espresso sulla superficie dei linfociti Th2, e TIM-4, espresso sulla superficie cellulare di macrofagi e cellule di altri tessuti come la milza, il timo, i linfonodi e le ghiandole salivari; sembra sia soprattutto TIM-4 a mediare l'interazione con gli exosomi [Feng D *et al.*, 2010]. Oppure *b)* le proteine di membrana degli exosomi possono essere tagliate da specifiche proteasi dando luogo a frammenti che potrebbero agire come ligandi solubili per recettori di membrana sulle cellule targets. Inoltre *c)* gli exosomi sono in grado di fondersi con la membrana delle cellule bersaglio trasferendo al loro interno in maniera non selettiva proteine e RNA exosomali; la fusione può modificare alcune caratteristiche di membrana della cellula target, tra cui le composizioni lipidica e proteica. Ad esempio, exosomi rilasciati da piastrine possono trasferire la molecola di adesione CD41 sulla superficie delle cellule endoteliali [Barry OP *et al.*, 1998] o delle cellule tumorali [Janowska-Wieczorek A *et al.*, 2001], conferendo ad esse proprietà pro-adesive. E' stato visto che la fusione della membrana exosomiale con la plasmamembrana di cellule bersaglio può avvenire solo in condizioni di pH acido, come quelle presenti all'interno di una massa tumorale [Parolini I *et al.*, 2009]. La fusione richiede infatti che le due membrane abbiano una fluidità comparabile, garantita a pH 5, ma non a pH neutro, che ne determina una maggiore rigidità [Subra C *et al.*, 2010].



**Figura 25:** Possibili vie di comunicazione intercellulare mediate dagli esosomi; **a)** interazione con i recettori della cellula target ed attivazione del segnale intracellulare; **b)** taglio da proteasi nell'ambiente extracellulare e formazione di ligandi solubili; **c)** fusione con la membrana delle cellule target e rilascio del contenuto all'interno della cellula ricevente [modificata da Mathivanan S et al., 2010].

- **modulazione della risposta immunitaria.** L'attivazione di una risposta immunitaria richiede la presentazione ai linfociti di peptidi antigenici caricati sui complessi di istocompatibilità MHC I e MHC II da parte delle *antigen-presenting cells* (APCs). Poiché gli esosomi derivati da cellule dendritiche (DCs), le principali APCs, esprimono alti livelli di MHC I e II in associazione a molecole costimolatorie, quali CD86, si è pensato che possano sostituire le DC nel provocare l'attivazione della risposta immunitaria [Simpson RJ et al., 2008]. Oltre agli MHC ed alle molecole costimolatorie, gli esosomi portano anche altre proteine che possono modulare la risposta immunitaria stessa, stimolandola o inibendola, in maniera non-antigene specifica. Ad esempio, gli esosomi secreti dalle cellule neoplastiche potrebbero consentire al tumore stesso, attraverso molteplici azioni, l'evasione della sorveglianza immunitaria e la formazione di metastasi [Tickner JA et al., 2014; Roma-Rodriguez C et al., 2014]. È stato osservato che esosomi tumorali isolati da pazienti sono in grado, *in vitro*, di indurre l'apoptosi dei linfociti T citotossici attraverso i pathways di FasL e di TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis induced ligand*) [Andreola G et al., 2002], di inibire la proliferazione dei linfociti T indotta dall'IL 2 [Clayton A et al., 2007], e/o promuoverne il differenziamento in cellule T regolatorie (Tregs) [Thery C et al., 2001]. Ancora, gli esosomi tumore-derivati possono ridurre anche il numero di APCs; infatti è stato osservato che essi sono in grado di inibire transientemente la maturazione delle DCs immature [Liu C et al., 2007; Zhang HG et al., 2011] e di impedire il differenziamento dei monociti CD14<sup>+</sup> ad APCs [Valenti R et al., 2006, Zhang HG et al., 2011].

Infine, gli esosomi secreti dalle cellule tumorali potrebbero favorire, insieme a fattori solubili, l'aumento del numero di MDSCs (*myeloid-derived suppresser cells*) nella milza,

nel sangue e all'interno della massa tumorale stessa; è stato visto che la presenza di queste cellule correla con la sopravvivenza e la progressione tumorale stimolando la soppressione dei linfociti TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e NK [Xiang X *et al.*, 2009; Zhang HG *et al.*, 2011].

In alcune circostanze, gli exosomi rilasciati da diversi tipi cellulari, primariamente dalle cellule immunocompetenti, possono avere anche proprietà immuno-attivatorie; ad esempio, è stato visto che macrofagi infettati da diversi agenti patogeni rilasciano exosomi contenenti determinanti molecolari pro-infiammatori in grado di indurre la secrezione di citochine pro-infiammatorie da parte di altri macrofagi bersaglio [Bhatnagar S *et al.*, 2007]. E' stata riportata un'eventuale attività pro-immune anche degli exosomi secreti dalle stesse cellule tumorali, dopo averle però sottoposte a stress; ad esempio si è osservato che cellule neoplastiche sottoposte a shock termico rilasciano exosomi esprimenti ad alti livelli la proteina Hsp70, che promuove l'attività delle cellule NK e la secrezione della citochina TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) da parte dei macrofagi [Gastpar R *et al.*, 2005; Vega VL *et al.*, 2008]. Inoltre, poiché gli exosomi contengono sia la prostaglandina PGE2, che stimola la crescita tumorale, sia la prostaglandina 15 $\Delta$ -PGJ2, che sembra invece inibirne la crescita, alcuni autori sostengono che il bilancio nel livello di queste due molecole potrebbe essere un fattore cruciale nel definire il ruolo degli exosomi stessi nel microambiente tumorale [Subra C *et al.*, 2010].

- veicoli di molecole patologiche. Poiché le cellule tumorali rilasciano exosomi, queste li possono utilizzare per trasportare materiale genetico durante la comunicazione cellulare nel microambiente. E' stato suggerito che il rilascio degli exosomi da parte delle cellule tumorali potrebbe proteggere le cellule stesse dall'apoptosi e renderle maggiormente resistenti alla chemioterapia mediante l'estrusione rispettivamente delle proteine che inducono l'apoptosi e degli agenti chemioterapici [Abid Hussein MN *et al.*, 2007]. Inoltre, questi exosomi potrebbero contribuire al rimodellamento della matrice extracellulare favorendo l'invasività tumorale [Graves LE *et al.*, 2004]. E' stato visto che i macrofagi umani accumulano particelle di HIV-1 nei compartimenti di MHC II, così come i MVBs [Raposo G *et al.*, 2002] e gli endosomi tardivi [Pelchen-Matthews A *et al.*, 2003], e che lo sviluppo dell'HIV si verifica attraverso il pathway di rilascio degli exosomi [Nguyen DG *et al.*, 2003]. Questi studi hanno portato alla provocatoria ipotesi dell' "exosoma-cavallo di Troia", suggerendo che i retrovirus con envelope, come HIV, si nascondano negli exosomi secreti da cellule infette [Pelchen-Matthews A *et al.*, 2004]. Sono state fornite prove del ruolo degli exosomi nei meccanismi patologici a partire dai lavori di Fèvrier B *et al.*, i quali hanno mostrato la presenza della proteina prionica cellulare (PrPc) e della proteina transconformata infettiva PrPscrapie (PrPsc) negli exosomi secreti nel medium di coltura di cellule non infettate e infettate. Si è visto che gli exosomi contenenti PrPsc sono infettivi,

suggerendo il loro possibile coinvolgimento nella diffusione dei prioni all'interno dell'organismo [Fèvrier B. *et al.*, 2005].

Per quanto riguarda gli esosomi urinari, si è inizialmente ipotizzato che potessero rappresentare esclusivamente un veicolo per l'eliminazione di proteine senescenti più semplice rispetto alla degradazione via proteasoma [Van Balkom BM *et al.*, 2011]. Nuove evidenze sottolineano che gli esosomi urinari potrebbero svolgere ulteriori importanti funzioni; come già accennato, essi potrebbero costituire un meccanismo di signalling e co-regolazione tra le diverse strutture del nefrone, mediante la secrezione ed il successivo *reuptake* a valle di specifici mRNA o miRNA in grado di alterare la sintesi proteica delle cellule epiteliali tubulari riceventi [Dimov I *et al.*, 2009; Raposo G *et al.*, 2013; Gildea JJ *et al.* 2014]. Questa ipotesi stata dimostrata *in vitro* ma non ancora *in vivo*: gli esosomi rilasciati da una linea cellulare di cellule murine del dotto collettore (mCCDC11) contengono la proteina AQP2 solo dopo stimolazione con vasopressina. Quando cellule mCCDC11 non stimolate vengono messe in coltura insieme ad esosomi contenenti AQP2, le stesse cellule cominciano ad esprimere sulla propria membrana questo canale per l'acqua funzionale con conseguente aumento del flusso di acqua attraverso le cellule stesse. Gli esosomi presenti in coltura hanno trasferito la proteina AQP2 o il suo mRNA alle cellule bersaglio, oppure hanno indotto la sintesi di AQP2 endogena stimolando uno specifico recettore ed attivando quindi una cascata di signalling intracellulare, o mediante il trasferimento di specifici miRNA nelle cellule bersaglio [Street JM *et al.*, 2011]. Recentemente è stato descritto un nuovo potenziale ruolo degli esosomi urinari: Hiemstra TF *et al.*, tramite analisi proteomica, hanno dimostrato che gli esosomi urinari contengono proteine dell'immunità innata con attività antimicrobica, e sono in grado di inibire la crescita di *Escherichia coli*, la principale causa delle infezioni del tratto urinario, inducendo la lisi delle cellule batteriche [Hiemstra TF *et al.*, 2014].

### 1.3.5 Uso clinico degli esosomi

L'approccio proteomico mostra una notevole potenzialità nell'identificazione di proteine differenzialmente espresse e quindi di potenziali biomarcatori patologici in fluidi biologici facilmente accessibili come il siero, il plasma e le urine. Il proteoma dei più comuni fluidi biologici contiene però proteine molto abbondanti che riducono la possibilità di analisi delle cosiddette "*low abundance proteins*", proteine meno rappresentate dal punto di vista quantitativo ma di significato fisio-patologico. L'isolamento degli esosomi contribuisce a minimizzare la presenza delle "*high abundance proteins*" e ad arricchire invece il contenuto di quelle che hanno la probabilità di essere informative dal punto di vista sia diagnostico sia prognostico. [Smalley D *et al.*, 2008].

L'analisi degli esosomi può rivelarsi molto utile per la diagnosi di tumori solidi [Mathivanan S *et al.*, 2010]; Taylor DD *et al.* hanno effettuato la caratterizzazione molecolare



degli exosomi circolanti in pazienti affetti da tumori al polmone e da carcinoma ovarico riportando un significativo arricchimento di alcune proteine exosomiali in tali condizioni patologiche e suggerendo che specifici miRNA presenti negli exosomi secreti dalle cellule neoplastiche potrebbero essere utilizzabili come biomarkers per la diagnosi di questi due tipologie tumorali [Taylor DD *et al.*, 2008]. Sono stati isolati anche exosomi contenuti nel liquido amniotico che potrebbero consentire l'identificazione di marcatori per la diagnosi di eventuali patologie prenatali [Keller S *et al.*, 2007].

In ambito terapeutico, ha recentemente suscitato molto interesse l'applicazione degli exosomi in qualità di potenziali vaccini nell'immunoterapia clinica; gli exosomi derivati dalle DCs sono infatti arricchiti nelle componenti necessarie per funzionare in qualità di entità presentanti l'antigene. Sono stati avviati trials clinici in pazienti con cancro al polmone e melanoma; gli studi di fase I hanno mostrato che l'iniezione degli exosomi isolati dalle DCs è sicura ed associata, in alcuni pazienti, ad una regressione della massa tumorale e ad una stabilizzazione a lungo termine [Escudier B *et al.*, 2005; Morse MA *et al.*, 2005].

Vaccini basati su exosomi potrebbero essere sviluppati anche per combattere malattie infettive; ad esempio è stato osservato che gli exosomi secreti da macrofagi infettati da batteri e parassiti (ad es. *Mycobacterium tuberculosis*) esprimono antigeni derivati dagli agenti patogeni infettanti [Giri PK *et al.*, 2010] e possono indurre la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte di macrofagi *naive* e cellule dendritiche [Bhatnagar S *et al.*, 2007].

Lo studio degli exosomi, in particolare della loro modulazione qualitativa e quantitativa, può, inoltre, consentire di intervenire sugli effetti biologici da essi mediati per contrastare numerose patologie. Ad esempio si ritiene che gli exosomi rilasciati dalle cellule neoplastiche possano portare a distanza molecole immunosoppressive in essi contenute, come le prostaglandine (PGE<sub>2</sub>), contribuendo all'insorgenza delle nicchie pre-metastatiche [Record M *et al.*, 2011]. L'inibizione del rilascio degli exosomi tumore-derivati potrebbe dunque rivelarsi una strategia terapeutica per prevenire l'insorgenza di metastasi. In un altro lavoro è stato osservato che gli exosomi ottenuti da linee cellulari di carcinoma ovarico e da asciti maligne sono arricchiti in proteine correlate alla progressione del tumore stesso [Keller S *et al.*, 2009]. Le cellule di carcinoma renale che esprimono la proteina CD105 rilasciano exosomi che possono stimolare la neoangiogenesi [Grange C *et al.*, 2011, Borges FT *et al.*, 2013]. Inoltre alcuni morfogeni, quali Wnt ed il ligando DII di Notch, sono in grado di associarsi alle membrane exosomiali e di attivare i rispettivi meccanismi di signalling a livello delle cellule bersaglio; attraverso la cascata del fattore Wnt, gli exosomi rilasciati da fibroblasti possono promuovere le dinamiche delle cellule neoplastiche [Luga V *et al.*, 2012; Beckett K *et al.*, 2013]. Uno studio recente ha dimostrato che la riduzione del rilascio degli exosomi tumorali attraverso la dimetil-amiloride, un inibitore dello scambiatore Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, è in grado di potenziare l'effetto di agenti chemioterapici [Chalmin F *et al.*, 2010]; questa osservazione suggerisce che i bloccanti dei canali del sodio potrebbero

rappresentare una classe di farmaci in grado di inibire il rilascio di esosomi tumorali. Tuttavia un trattamento di tipo generale per contrastare la secrezione esosomiale sarebbe responsabile anche dell'insorgenza di effetti collaterali, in quanto gli esosomi secreti dalle cellule immunocompetenti possono in realtà contribuire al riconoscimento del tumore da parte del sistema immunitario [Zitvogel L *et al.*, 1998]. Un trattamento ottimale dovrebbe richiedere l'uso di differenti agenti terapeutici per inibire selettivamente il rilascio degli esosomi da parte delle cellule tumorali potenziandone invece la secrezione da parte delle cellule immunocompetenti [Record M *et al.*, 2011]. Diversi studi hanno inoltre evidenziato che, in alcuni modelli sperimentali, le cellule staminali mesenchimali, facilmente accessibili in vitro, aventi una grande capacità espansiva e non-immunogeniche, possono favorire la reversione di un danno renale acuto o cronico e questo effetto sembra essere in larga parte mediato dal contenuto di RNA esosomiale rilasciato dalle stesse staminali [Biancone L *et al.*, 2012; Yu B *et al.*, 2014].

Infine, gli esosomi, grazie alle loro uniche proprietà, rappresentano un ideale sistema di distribuzione/targeting di farmaci diretti contro specifiche cellule. Essi possono infatti essere caricati sia con materiale proteico che genetico, sono ben tollerati dall'organismo, hanno una lunga emivita in circolo e sono in grado di interagire direttamente con le cellule bersaglio attraversando anche direttamente le membrane biologiche; inoltre la loro doppia struttura lipidica protegge il loro contenuto dalla degradazione, facilitando il raggiungimento del target desiderato [Fang DYP *et al.*, 2013; Lai RC *et al.*, 2013]. L'ingegnerizzazione artificiale degli esosomi rappresenta una naturale estensione del successo di alcuni approcci terapeutici basati sull'uso di liposomi; per molte patologie renali un primo target della terapia basata su esosomi ingegnerizzati potrebbe essere costituito dalle cellule endoteliali, facilmente accessibili agli esosomi stessi attraverso il circolo [Alvarez-Erviti L *et al.*, 2011; Fang DYP *et al.*, 2013].

### **1.3.6 Biomarcatori di malattie renali negli esosomi**

Gli esosomi urinari rappresentano un materiale di partenza adatto (non invasivo) per la scoperta di biomarkers relativi ad una varietà di processi renali. Per questo motivo, il prefrazionamento degli esosomi dalle urine può essere utile come mezzo di arricchimento per i marcatori di particolari tipi di malattie. Molti studi hanno focalizzato l'attenzione sul significato patologico e fisiopatologico degli esosomi urinari, portando all'identificazione di alcune proteine con potenziale valore diagnostico (tab. IX) [Zhang Y *et al.*, 2010]. Non è chiaro inoltre se e in quale misura gli esosomi presenti in circolo contribuiscano alla composizione del proteoma urinario; il potenziale degli esosomi urinari nell'identificazione di biomarkers potrebbe essere esteso anche oltre le patologie strettamente renali [Li Y *et al.*, 2011; Dear JW *et al.*, 2013].

**Tabella IX:** proteine identificate negli exosomi urinari associate a patologie renali od ipertensione [modificata da Pisitkun T et al., 2004]

Protein Name	Kidney diseases or hypertension
<i>Aquaporin 2 (AQP2)</i>	Autosomal recessive nephrogenic diabetes insipidus, type 1 Autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus, type 1
<i>Sodium potassium chloride cotransporte-2 (NKCC2)</i>	Antenatal Bartter syndrome type 1
<i>Sodium chloride cotransporter (NCC)</i>	Gitelman syndrome
<i>Epithelial sodium channel <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math></i>	Autosomal recessive pseudohypoaldosteronism type 1 Liddle syndrome
<i>FXD domain-containing ion transport regulator-2</i>	Familial renal hypomagnesemia Autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis
<i>Carbonic anhydrase II (CA2)</i>	
<i>Carbonic anhydrase IV (CA4)</i>	Proximal renal tubular acidosis
<i>Polycystin-1 and 2</i>	Autosomal dominant polycystic kidney disease type 1 and 2
<i>Uromodulin</i>	Medullary cystic kidney disease 2 Hyperuricemic nephropathy, familial juvenile
<i>Podocin</i>	Autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome
<i>Nonmuscle myosin heavy chain IIA</i>	Fechtner syndrome Epstein syndrome
<i>Adenine phosphoribosyltransferase</i>	2,8-Dihidroxyadenine urolithiasis
<i>Angiotensin I converting enzyme isoform-1</i>	Hypertension
<i>Aminopeptidase A</i>	Hypertension
<i>APN</i>	Hypertension
<i>Aminopeptidase P</i>	Hypertension
<i>Nepilysin</i>	Hypertension
<i>Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)</i>	Hypertension
<i>Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1</i>	Hypertension

Tramite nanospray/full LC-tandem MS è stato possibile identificare negli exosomi urinari proteine di tutte le diverse porzioni del nefrone: proteine dei podociti glomerulari (podocina e podocalixina), delle cellule epiteliali del tubulo prossimale (APN, AQP1, megalina, cubilina, anidrasi carbonica IV), del tratto ascendente dell'ansa di Henle (THP, CD9 e il cotrasportatore Na-K-2Cl), del tubulo convoluto distale (NCC) e del dotto collettore (AQP-2, mucina-1) [Pisitkun T et al., 2004]. Nel complesso lo studio di Pisitkun T et al. ha identificato 295 proteine, incluse alcune già note per essere responsabili di malattie renali e sistemiche, quali ad esempio la policistina-1 (per il rene policistico autosomico dominante), la proteina NCCT (nella sindrome di Gitelman), il cotrasportatore NKCC2 (nella sindrome di Bartter di tipo I), la proteina FXD (nell'ipomagnesemia renale familiare), la proteina AQP-2 (per il diabete insipido tipo-I nefrogenico autosomico dominante/recessivo), i canali epiteliali del Na<sup>+</sup> (per lo pseudoipoadosteronismo di tipo-1 autosomico recessivo), l'anidrasi carbonica IV (nell'acidosi del tubulo renale prossimale), l'uromodulina (per il rene cistico midollare), le aminopeptidasi A e P (per l'ipertensione) [Pisitkun T et al., 2004]. L'identificazione di tali proteine suggerisce la possibilità di utilizzare gli exosomi come fonte di informazione sullo stato fisiopatologico dell'intero tubulo renale.

Attraverso la tecnica 2D seguita da analisi MALDI-TOF Zhou H *et al.* hanno analizzato la composizione proteica degli esosomi urinari di ratti 8h dopo la somministrazione di cisplatino quale induttore di danno renale acuto (AKI, *acute kidney injury*). Tra le proteine *up*-regolate in tale condizione rispetto ai controlli è stata identificata la fetuina-A, che può quindi rappresentare un possibile biomarcatore di malattia renale acuta [Zhou H *et al.*, 2006] Gli stessi autori hanno anche identificato due fattori di trascrizione, ATF3 (*activating transcription factor 3*) e WT-1 (*Wilms tumor 1*), come possibili biomarkers di malattia renale acuta e cronica; entrambi i biomarkers richiedono però una più ampia validazione [Zhou H *et al.*, 2008].

Ulteriori studi hanno dimostrato che il danno da ischemia-riperfusion (I/R) renale si associa ad una significativa riduzione dell'escrezione della proteina AQP-1 negli esosomi urinari di ratti; il dato è stato confermato in un paziente sottoposto a trapianto renale e suggerisce la AQP1 come nuovo biomarker esosomiale per questo tipo di danno renale [Sonoda H *et al.*, 2009].

Gonzales PA *et al.*, attraverso l'analisi LC-MS/MS, hanno identificato anche la presenza di 14 proteine fosforilate su siti specifici; la fosforilazione, una delle più comuni modificazioni post-traduzionali delle proteine, regola i meccanismi di signalling cellulare e può contribuire a determinare la struttura, la funzione e la localizzazione subcellulare delle proteine stesse. La capacità di identificare proteine fosforilate in siti specifici negli esosomi urinari potrebbe fornire indizi su meccanismi fisiologici ma anche patologici che potrebbero aiutare nella diagnosi e nel trattamento di numerosi disordini renali. Ad esempio, negli esosomi urinari di alcuni individui è stata abbondantemente trovata la proteina AQP2 fosforilata sul residuo di serina-256; poiché questo evento di fosforilazione è significativamente incrementato in seguito all'attivazione, vasopressina stimolata, della via dell'adenilato ciclasi, la misura dell'ammontare dell'AQP2 fosforilata su tale residuo negli esosomi potrebbe contribuire a valutare lo stato di attivazione della vasopressina [Gonzales PA *et al.*, 2009].

Smalley *et al.*, hanno di recente condotto un'analisi proteomica tramite LC-MS/MS sugli esosomi urinari originati dalle cellule neoplastiche della vescica per ricercare biomarkers diagnostici di cancro vescicale [Smalley DM *et al.*, 2008]. Alcune proteine tra le quali CD36, CD44, 5T4, Basigin e CD73, identificate negli esosomi derivati da cellule di cancro alla vescica HT1376, sono state confermate positive anche nell'analisi in spettrometria sugli esosomi urinari. Ad oggi, un unico recente lavoro del nostro gruppo di ricerca ha indagato la differenziale composizione proteica degli esosomi urinari di pazienti con carcinoma renale e corrispondenti controlli sani. In questo studio sono state identificate 261 proteine nel pool di esosomi urinari controllo e 186 nel pool di esosomi delle urine dei pazienti; il contenuto differenziale di alcune proteine, tra cui alcune metalloproteasi di membrana e proteine specificamente renali (MMP9, EMMPRIN, DPEP1, PODXL) è stato confermato mediante quantificazione label-free e Western Blotting [Raimondo F *et al.*, 2013].

Oltre al rene ed alla vescica, gli studi sugli exosomi urinari hanno permesso di identificare proteine significativamente alterate in pazienti con carcinoma prostatico. Molte proteine, tra le quali citiamo CD9 e Proteasoma  $\beta$ 1 (PSMZB1), sono state identificate nella frazione exosomiale isolata da una linea cellulare di cancro alla prostata PC346C [Jansen FH *et al.*, 2009]. Il gruppo di lavoro ha mostrato che questi exosomi contenevano anche RNAs, incluso il prodotto di fusione TMPRSS2-ERG e PCA-3, i quali, poiché identificati anche in exosomi urinari di pazienti con carcinoma prostatico [Nilsson J *et al.*, 2009], suggeriscono la possibilità dell'identificazione di nuovi biomarkers di tumore alla prostata.

In un lavoro recentissimo Zubiri I *et al.* hanno focalizzato l'attenzione sullo studio dei cambiamenti a cui il proteoma degli exosomi urinari va incontro in presenza di DN. Tramite LC-MS/MS sono state identificate e quantificate, in totale, 254 proteine. Tra le proteine significativamente variate in presenza di DN, ne sono state selezionate tre, già riportate in letteratura per essere coinvolte nella patogenesi della DN, la cui espressione differenziale negli UE di pazienti DN rispetto ai controlli sani è stata confermata mediante SRM (*selected reaction monitoring*). In particolare, l' $\alpha$ -microglobulin/bikubin precursor (AMBP) è risultato significativamente aumentato negli UE dei pazienti nefropatici rispetto ai controlli. AMBP è una glicoproteina di membrana espressa a livello del fegato e del rene; l'incremento di AMBP negli UE potrebbe da un lato riflettere l'aumento di produzione, da parte del fegato, della proteina stessa, che può quindi essere filtrata dal glomerulo ed aderire agli exosomi, oppure potrebbe essere correlato ad un incremento della produzione locale di AMBP, selettivamente poi incorporata negli exosomi. Un'altra proteina fortemente incrementata negli UE dei pazienti diabetici rispetto ai controlli è risultata essere la MLL3, una istone metiltransferasi, correlata all'espressione del PPAR $\gamma$ , che gioca a sua volta un ruolo importante nella fisiopatologia renale; in particolare, è stato visto che gli agonisti del PPAR $\gamma$  possiedono effetto protettivo nei confronti di alcune patologie renali, tra cui anche la DN. I livelli di VDAC1, chiamata anche porina 1, sono risultati invece significativamente diminuiti negli UE dei pazienti DN. VDAC1 è coinvolta nella regolazione dei processi apoptotici per via mitocondriale; la downregolazione exosomiale di VDAC1 nelle urine dei pazienti diabetici potrebbe dunque essere correlata ai meccanismi di apoptosi delle cellule del tubulo renale che si verificano durante la DN, anche se la presenza di questa proteina in molti tipi cellulari ne limita l'utilizzo in qualità di marcatore di danno renale in presenza di DN [Zubiri I *et al.*, 2014].

In letteratura sono presenti diversi studi di proteomica delle urine di pazienti affetti da disordini tubulari ereditari, al fine di chiarire quali sono i cambiamenti nel proteoma urinario come conseguenza della patologia e di comprenderne i meccanismi fisiopatologici di base [Pereira PC *et al.*, 2009]. Per cercare di comprendere maggiormente i meccanismi molecolari che inducono al fenotipo caratteristico della sindrome di Gitelman, nel lavoro pionieristico di Vilasi A

*et al.* sono stati utilizzati tre diversi e complementari approcci di proteomica. Essi sono stati finalizzati alla caratterizzazione delle proteine a basso peso molecolare, normalmente filtrate dal glomerulo (frazione solubile) ed alle proteine di membrana escrete nelle urine attraverso gli exosomi. Nel primo gruppo di esperimenti, la frazione proteica solubile di pazienti GS è stata confrontata con quella di soggetti normali mediante due diverse strategie analitiche di proteomica: a) elettroforesi bidimensionale (2D) seguita da analisi mediante spettrometria di massa MALDI-TOF; b) elettroforesi monodimensionale (1D-SDS-PAGE) seguita da analisi mediante spettrometria di massa tandem (nano-ESI-LC-MS/MS). Nel secondo gruppo di esperimenti la frazione exosomiale urinaria estratta da pazienti GS e soggetti controllo è stata analizzata mediante: a) 1D-SDS-PAGE seguita da nano-ESI-LC-MS/MS e b) shotgun: digestione in soluzione della miscela proteica seguita da analisi nano-ESI-LC-MS/MS. L'analisi proteomica sulla frazione solubile ha evidenziato un significativo incremento, in pazienti GS, nell'espressione di alcune proteine, membri della famiglia S100, deputate al trasporto di calcio e coinvolte in attività regolatorie sia intracellulari che extracellulari: S100A7, S100A8, S100A9, S100A11. L'analisi proteomica sulla frazione exosomiale urinaria ha, al contrario, evidenziato una sensibile riduzione, nei pazienti affetti da GS rispetto ai controlli sani, delle proteine periferiche di membrana appartenenti alla famiglia Rab-GTPase: RAB1A, RAB1B, RAB3A, RAB3D, RAB7A e RAB10. Questa classe di proteine, la GTPase, è coinvolta in numerosi meccanismi di traffico proteico e molecolare a partire dalla formazione di vescicole, al movimento delle vescicole stesse e alla loro fusione con la membrana cellulare. Gli esperimenti hanno inoltre consentito di sottolineare una consistente riduzione dell'AQP2 ed un'alterata espressione di altri trasportatori tra cui la calbindina, la megalina e la cubilina. In conclusione, i risultati hanno mostrato tangibili differenze nel pattern polipeptidico urinario, che caratterizza i pazienti GS, in grado di elucidare alcuni aspetti del fenotipo di questa patologia [Vilasi A *et al.*, 2010]. In letteratura non sono invece ad oggi presenti studi di proteomica effettuati su urine o frazione vescicolare urinaria di pazienti Bartter.

**Scopo**

Il mio progetto di dottorato si inserisce in un più ampio lavoro finalizzato alla ricerca di nuovi potenziali biomarcatori per le patologie renali, in particolare per la nefropatia diabetica (DN) e per le tubulopatie ereditarie (SLTs), mediante tecnologie di tipo proteomico.

Abbiamo focalizzato l'attenzione sullo studio del proteoma degli exosomi urinari (UE), vescicole di membrana delle dimensioni comprese tra i 30 ed i 100 nm, rilasciate da tutte cellule epiteliali che si affacciano sul lume urinario e la cui composizione molecolare riflette quella delle cellule di origine, rappresentando quindi una ideale fonte di biomarcatori.

Lo scopo di questa tesi di dottorato è quindi quello di indagare la composizione proteica degli UE al fine di identificare eventuali differenze tra le condizioni fisiologiche e quelle patologiche analizzate, in modo da: 1) fornire un punto di partenza per la ricerca di biomarcatori diagnostici/prognostici, 2) contribuire alla comprensione dei loro meccanismi fisiopatologici e, nel caso delle SLTs, 3) proporre un approccio diagnostico complementare, ed eventualmente alternativo, all'analisi genetica.

Nello studio della DN, abbiamo utilizzato un modello animale di diabete di tipo 2, ovvero ratti ZDF, e corrispondenti controlli. Abbiamo isolato gli exosomi urinari mediante ultracentrifugazione, ne abbiamo effettuato una caratterizzazione biochimica per verificarne il grado di purezza ed abbiamo analizzato il loro pattern proteico mediante spettrometria di massa allo scopo di individuare significative differenze nel proteoma degli UE tra la condizione fisiologica e quella patologica analizzata. Il contenuto differenziale di alcune proteine negli exosomi di ratti ZDF rispetto ai controlli è stato validato mediante immunoblotting.

Gli exosomi isolati dalle seconde urine di pazienti affetti da SLTs e corrispondenti controlli sono stati anche in tal caso caratterizzati dal punto di vista biochimico ed analizzati mediante western blotting (WB), allo scopo di indagare la presenza/assenza dei trasportatori le cui alterazioni genetiche sono coinvolte nella patogenesi delle SLTs stesse; il proteoma degli exosomi urinari di pazienti SLTs e controlli è stato invece studiato mediante un particolare approccio elettroforetico bidimensionale, con l'obiettivo di migliorare la risoluzione delle proteine altamente idrofobiche tipiche degli exosomi, seguito da excisione di alcuni spot differenziali ed analisi del loro contenuto proteico mediante spettrometria di massa; dalle identificazioni così ottenute sono state selezionate alcune proteine interessanti, potenzialmente coinvolte nella patogenesi delle SLTs, il cui contenuto differenziale negli UE verrà in seguito validato mediante WB ed immunodecorazione.



# ***Materiali & Metodi***

### **3.1 MATERIALI**

- Tris-base, Triton X-100, Tween-20, Bovin serum albumin (BSA), Sodiodecilsolfato (SDS),  $\beta$ -Mercaptoetanolo, Metanolo, Isopropanolo, Dietil-Etere, DL-Ditiotreitolo (DTT), Iodoacetammide (IAA), Acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), Tripsina (Promega Trypsina, liofilizzata), Acido trifluoroacetico ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ), Temed, NaCl, KCl, Ammonio-persolfato (APS), Acido bicinconinico, Solfato di Rame 4%, Rosso Ponceau, Pyronina Y, 16BAC, Glicina, Acido ascorbico, Bis-Acrilammide 2%,  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (1:1200) e (1:750), Solfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ), acqua HPLC-grade (SIGMA).
- Glicerolo (Calbiochem).
- NaOH, Saccarosio, EDTA, Acido Fosforico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), Acido Acetico, Alcool 100%,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck).
- Filtri Amicon Ultra-0,5 mL 30k (Millipore)
- Vivaspin 500 (Sartorius Stedim Biotech)
- Acrilamide 30%, Reattivo per dosaggio Bradford, Urea (Biorad)
- Complete, cocktail di inibitori delle proteasi (Roche).
- Membrana di Nitrocellulosa Hybond ECL (GE Healthcare).
- Materiale per NuPAGE Electrophoresis System: 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mm 12 pozzetti, MES e MOPS SDS Running Buffer 20X, Sample Reducing Agent 10X, LDS Sample Buffer 4X, Anti-oxidant Agent, Simply Blue Safe Stain, Sypro Ruby protein gel stain, Standard dei Pesì Molecolari Proteici (Novex Sharp) (Life Technologies).
- Anticorpo monoclonale anti-aquaporina1 (anti-AQP-1) (Santa Cruz Biotechnology).
- Anticorpo monoclonale anti-flotillin 1 (anti-Flot1) (BD Transduction Laboratories)
- Anticorpo monoclonale anti-tumor susceptibility gene 101 (anti-TSG-101), anticorpo monoclonale anti-Motility-Related Protein 1 (anti-MRP1/CD9), anticorpo monoclonale anti-SLC12A3 (anti-NCC), anticorpo monoclonale anti-neprilysin (CD10) (Abcam).
- Anticorpo monoclonale anti-Alg-2 Interacting protein X (anti-Alix), anticorpo monoclonale anti-Aquaporina2 (anti-AQP-2) (Cell Signaling).
- Anticorpo monoclonale anti-SLC12A1 (anti-NKCC2), anticorpo monoclonale anti-C1C-Kb (SIGMA).
- Anticorpo monoclonale anti syntenin-1 (SDCBP) (Abnova)
- Anticorpo monoclonale anti-KCNJ1 (anti-ROMK) (ThermoScientific).
- Anticorpi secondari anti-Mouse, anti-Rabbit, anti-Goat, HRP-coniugati, ECL SuperSignal West -pico, -dura, -femto (PIERCE).

### **3.2 APPARECCHIATURE**

- Centrifuga Preparativa Avanti J-25 (Beckman), rotor: a braccio oscillante JS-13.1/ad angolo fisso JA-25,15;
- Ultracentrifuga Optima L-90 (Beckman), rotor: ad angolo fisso Kontron TFT 55.38/“swing-out” SW 41;
- Centrifuga da banco (Jouan Laboratory-Equipment), rotore a braccio oscillante S40;
- Ultracentrifuga Optima max-E (Beckman), rotore ad angolo fisso TLA-110;
- Centrifuga da vuoto *HETOVAC VR-I* (*Heto Lab. Equipment*, Allerød, Danimarca);
- Microcentrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf), rotore F45-12-11;
- Spettrofotometro V-530 (Jasco);
- Densitometro GS-710 (Biorad);
- Apparecchiatura per Western Blotting, Mini Transfer Tank (Hoefer);
- Thermomixer Comfort (Eppendorf);
- Sonicatore, modello 2510 (Branson);
- CCD Camera Image Quant LAS4000 (GE Healthcare);
- Stufa, modello FD 53 (Binder);
- Lettore di piastre, modello 550 (Biorad);
- Apparecchiatura per NuPage 4-12% Bis-Tris Gel (LifeTechnologies);
- Apparecchiatura per SDS-PAGE (Atto);
- pHmetro, model 420A (Orion) e modello 3510 (Jenway);
- Piastra basculante, Polymax 1040 (Heidolph);
- Bilancia analitica, modello PA114C (Pioneer);
- Bilancia tecnica, modello PA2102C (Pioneer);
- Microscopio elettronico CM 10 (FEI, Eindhoven, the Netherlands) (Philips);
- Apparecchiatura per SDS-PAGE/16-BAC grande, PROTEAN II xi Cell (Biorad);
- Spettrometro di massa Proxeon Easy-nLC System (*Proxeon Biosystems, Odense, Denmark*) accoppiato con un MaXis hybrid UHR-QToF system (*Bruker Daltonics, Bremen, DE*).
- Spettrometro di massa nESI Ion Trap AmaZon ETD (Bruker Daltonics GmbH)

### **3.3 TECNICHE DI FRAZIONAMENTO**

#### **3.3.1 Casistica**

Per quanto riguarda lo studio relativo alla nefropatia diabetica (DN), abbiamo utilizzato come modello animale i ratti ZDF (*Zucker Diabetic Fatty*), aventi una mutazione in omozigosi nel gene codificante per il recettore dell'ormone leptina (fa/fa), che determina un fenotipo molto simile a quello del diabete di tipo 2 nell'uomo, tra cui anche lo sviluppo di DN. In particolare, gli esperimenti sono stati effettuati su 7 ratti maschi ZDF (fa/fa) e 7 ratti maschi controllo (fa/+) (Charles Rivers, Calco, Italia), stabulati individualmente in condizioni di temperatura controllata (22°C) e nutriti con un regime dietetico ben definito (Purina 2008 diet, Charles Rivers).

Per quanto concerne le tubulopatie ereditarie (SLTs), in collaborazione con il reparto di Pediatria dell'ospedale San Leopoldo Mandic di Merate (LC) abbiamo raccolto e studiato una casistica formata da 36 pazienti, appartenenti a 33 famiglie tra di loro non imparentate, affetti da SLTs, in particolare 19 pazienti affetti da Sindrome di Gitelman (GS), 5 da Sindrome di Bartter1 (B1), 3 da Bartter2 (B2), 5 da Bartter3 (B3) e 4 pazienti non classificabili secondo i test genetici attualmente in uso, e da 22 controlli sani paragonabili per sesso e fascia di età.

#### **3.3.2 Raccolta urine**

Dai ratti ZDF e corrispondenti controlli sono state raccolte le urine delle 24 ore per cinque giorni consecutivi a 6,12 e 20 settimane di età.

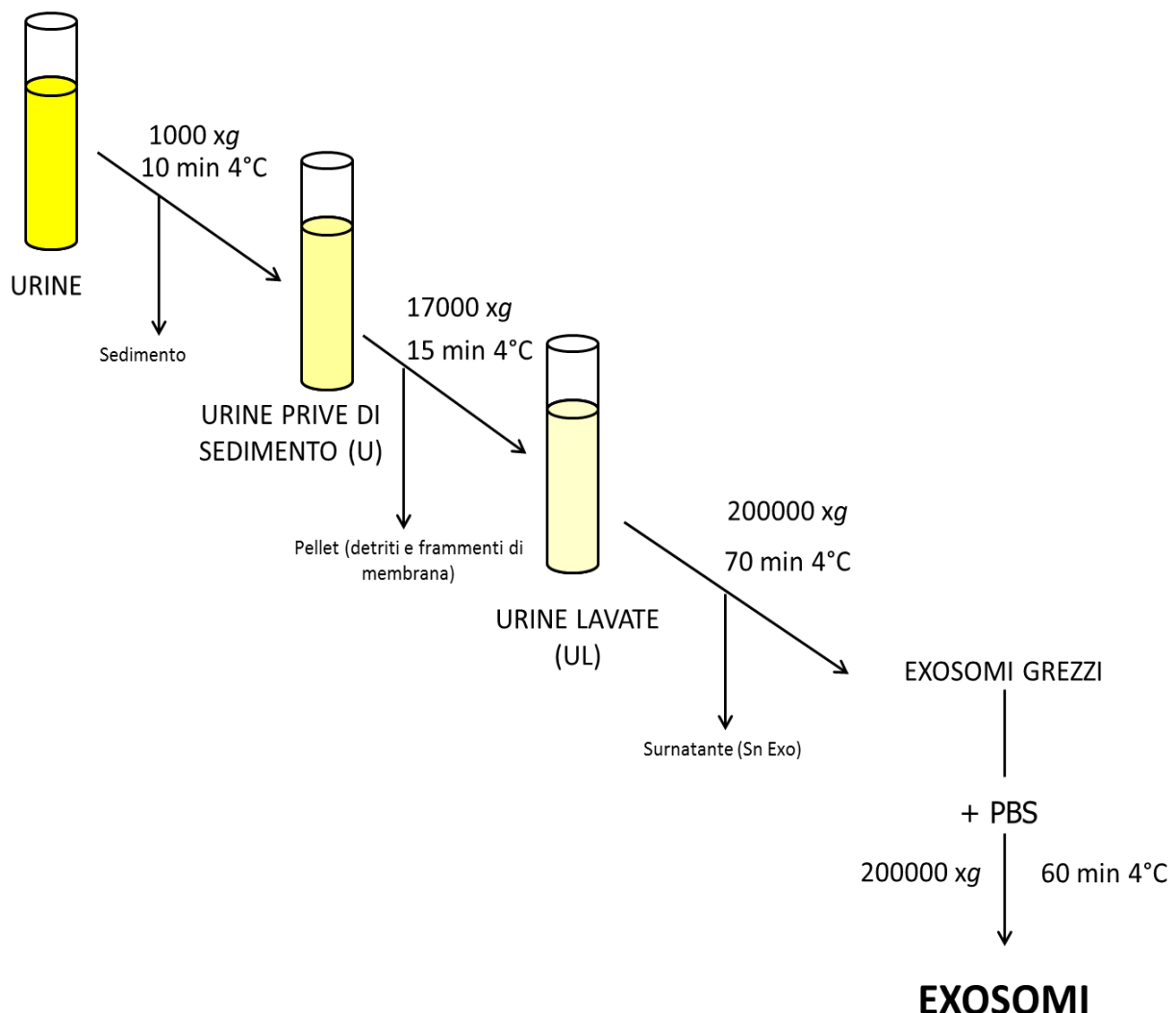
Dai pazienti affetti da tubulopatie ereditarie e corrispondenti controlli sani sono state invece raccolte le seconde urine del mattino secondo un protocollo rigorosamente standardizzato, come raccomandato dall'organizzazione internazionale HKUPP, *Human Kidney and Urine Proteome Project* ([www.hkupp.com](http://www.hkupp.com)); le urine sono state processate entro 4 ore dalla raccolta.

#### **3.3.3 Isolamento degli exosomi mediante ultracentrifugazione**

Gli exosomi sono stati isolati a partire dalle urine mediante il protocollo maggiormente utilizzato in letteratura, basato su centrifugazioni differenziali (fig. 26). Le urine sono state inizialmente centrifugate a 1000 xg per 10 minuti a 4°C (centrifuga per eppendorf Jouan Laboratory-Equipment) al fine di eliminare il sedimento; il surnatante chiarificato è stato quindi prelevato e, dopo aver aggiunto gli inibitori delle proteasi (Complete, Roche) in modo da evitare l'eventuale degradazione delle proteine, è stato conservato a -80°C.

Prima del processamento le urine vengono fatte scongelare a temperatura ambiente e, non appena iniziano a sciogliersi, vengono agitate vigorosamente per cicli da 1 minuto seguiti da almeno 1 minuto di pausa al fine di massimizzare il recupero del materiale. Da qui in poi tutte le operazioni vengono eseguite in ghiaccio in modo da prevenire il possibile deterioramento dei

campioni. Le urine vengono quindi centrifugate a 17000 xg per 15 minuti a 4°C (Centrifuga Preparativa Avanti J-25 Beckman, rotore JS-13.1). Il pellet, costituito da pezzi di membrana derivanti da epitelii desquamati e detriti, viene separato dal surnatante, chiamato per nostra convenzione “urine lavate” (UL). Queste vengono ultracentrifugate a 200000 xg per 70 min a 4°C (Ultracentrifuga Optima L-90 Beckman, rotore Kontron). Il precipitato ottenuto contiene gli exosomi i quali, dopo aver eliminato il surnatante, vengono risospesi in PBS (*Phosphate Buffered Saline*) con inibitori delle proteasi e nuovamente ultracentrifugati a 200000 xg per 1 ora a 4°C (Ultracentrifuga Optima max-E Beckman, rotore ad angolo fisso TLA-110) in modo da ottenere un maggior grado di purezza. Gli exosomi così isolati vengono infine risospesi in acqua bidistillata contenente gli inibitori delle proteasi e conservati a -80°C.



**Figura 26:** procedura di isolamento degli exosomi dalle urine mediante ultracentrifugazione.

### **3.3.4 Estrazione delle proteine urinarie mediante ultrafiltrazione**

Le proteine totali delle urine e/o dei surnatanti ottenuti durante la procedura di isolamento degli exosomi sono state concentrate mediante ultrafiltrazione, utilizzando provette munite di nanomembrane ultrafiltranti in PES con un cut-off di 3.000 Da, VivaSpin® 500 (Sartorius Stedim Biotech). I dispositivi ultrafiltranti, VivaSpin® 500, vengono inizialmente lavati con 500 µl di acqua bidistillata e centrifugati a 15000 xg per 10 minuti a 4°C. Dopo aver svuotato la base delle provette, le nanomembrane vengono condizionate aggiungendo 500 µl di Triton X-100 al 5% in acqua bidistillata ed incubate a temperatura ambiente per 2 ore. Questo pre-trattamento delle membrane filtranti (passivazione) consente di incrementare il recupero di proteine da campioni molto diluiti, come le urine. Al termine dell'incubazione, si svuotano i dispositivi e si effettuano quindi 4 lavaggi con acqua bidistillata per eliminare eventuali residui di detergente. Infine si aggiungono altri 500 µl di acqua bidistillata e si centrifuga a 15000 xg per 10 min a 4 °C; i VivaSpin® sono pronti per essere utilizzati per concentrare i campioni di interesse.

Sono stati utilizzati 500 µl di urine lavate e di surnatante degli exosomi ottenuti dalle urine di ratti ZDF/controllo e da pazienti affetti da tubulopatie ereditarie/controlli. I campioni vengono ultrafiltrati centrifugando a 15000 xg per 45 min. a 4 °C; in seguito, il filtrato viene eliminato mentre ciò che è stato trattenuto dalle membrane viene trasferito in provette pulite, disidratato con una centrifuga da vuoto (Hetovac) e risospeso con 50 µl di acqua bidistillata.

### **3.4 ELETTROFORESI MONODIMENSIONALE**

Per separare ed identificare le proteine contenute nei campioni in analisi si esegue una corsa elettroforetica in cui le proteine, sottoposte ad un campo elettrico direzionato, migrano in base al loro peso molecolare attraverso le maglie di un gel di poli-acrilammide, e possono essere confrontate con uno standard proteico a peso molecolare (PM) noto.

Per la corsa elettroforetica abbiamo utilizzato gel pre-cast in gradiente di concentrazione di acrilammide (4-12%) usando il sistema NuPage (Life Technologies). Questo sistema lavora a pH neutro (pH 7.0), garantendo così alle proteine ed alla matrice la massima stabilità durante tutta la corsa; ciò permette una miglior risoluzione delle bande proteiche rispetto ad altri sistemi. Il gradiente di concentrazione dei gels (4-12%) consente di separare nel medesimo gel proteine a basso ed alto peso molecolare. È inoltre possibile usare, a seconda delle esigenze, due diversi tamponi di corsa che permettono una migliore separazione di proteine l'uno ad alto peso molecolare (NuPAGE MOPS SDS Running Buffer), l'altro a basso peso (NuPAGE MES SDS Running Buffer).

- **Materiali:**

**NuPAGE MES SDS Running Buffer**

Mes pH 7.2	50 mM
Tris Base	50 mM
SDS	0,10%
EDTA	1 Mm

**NuPAGE MOPS SDS Running Buffer**

MOPS	50 mM
Tris Base	50 mM
SDS	0,10%
EDTA	1 Mm

**NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)**

Glicerolo	10%
Tris Base	14 mM
Tris HCl	106 mM
LDS	2%
EDTA	0.51 mM
Serva Blue G250	0.22 mM
Phenol Red pH 8.5	0.175 mM

**NuPAGE Sample Reducing Agent:** Ditiotreitolo (DTT) 500 mM

**NuPAGE Antioxidant Agent**

- **Metodica**

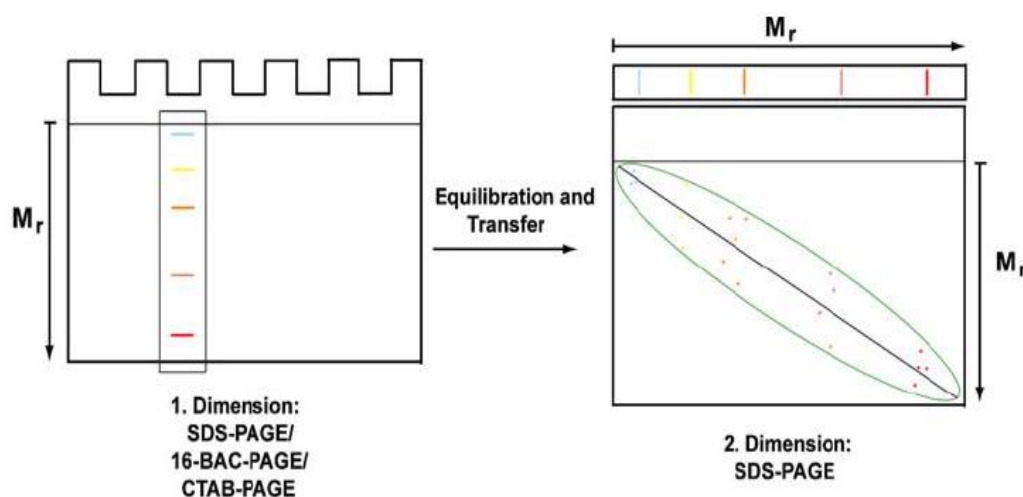
La solubilizzazione del campione prevede il trattamento con opportuni volumi di NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) contenente: un detergente anionico, litiododecilsolfato (LDS), glicerolo per appesantire il campione e facilitarne quindi il caricamento sul gel e coloranti per permettere di visualizzare l'andamento della corsa elettroforetica. Il LDS denatura le proteine e conferisce loro la carica negativa che ne permette la migrazione verso il polo positivo. Ai campioni si aggiunge anche un agente riducente, il ditiotreitolo (DTT 500 mM), che permette la rottura dei ponti disolfuro responsabili della struttura terziaria delle proteine. La denaturazione è necessaria per garantire che la migrazione avvenga solamente in base al peso molecolare specifico delle proteine e non in base alla loro conformazione nativa. I campioni così preparati vengono quindi agitati vigorosamente ed incubati per 10 minuti a 70°C (Thermomixer, Eppendorf) per consentire il completamento della denaturazione proteica. Si procede raffreddando in ghiaccio per pochi secondi e, dopo aver centrifugato brevemente (MiniSpin Plus, Eppendorf) per eliminare eventuale

materiale insolubile, i campioni sono pronti per il caricamento nei pozzetti del gel insieme agli standard a peso molecolare noto. Entrambe le camere di corsa, che si creano inserendo i gel nella vasca principale, vengono riempite completamente con i tamponi di corsa; l'antiossidante NuPAGE viene aggiunto solo al tampone che andrà a riempire la camera interna dell'apparato elettroforetico (500  $\mu$ l per 200 ml) e ha la funzione di impedire il processo di riossidazione durante la corsa elettroforetica. L'apparecchiatura viene infine collegata ad un generatore di corrente applicando un voltaggio costante pari a 200V. La corsa dura circa un'ora se il tampone utilizzato è il MOPS, altrimenti, per il MES, il tempo di corsa è inferiore. Grazie alla presenza del colorante Blu di Bromofenolo nella soluzione in cui sono risospesi i campioni, è possibile seguire la corsa e fermarla prima che il fronte della corsa fuoriesca dal gel. Una volta spento il generatore di corrente si procede con l'estrazione del gel dalle armature; quest'ultimo può essere poi colorato o sottoposto a Western Blotting.

### 3.5 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE DIAGONALE

L'elettroforesi bidimensionale (2DE) è un metodo utilizzato per aumentare la risoluzione della separazione di campioni proteici complessi. Essendo gli esosomi arricchiti in proteine di membrana, la 2DE classica (IEF/SDS-PAGE) non è adatta a questo tipo di campione, in quanto le proteine idrofobiche sono scarsamente solubilizzate.

Per ovviare a questo problema abbiamo utilizzato una tecnica di 2DE alternativa, detta diagonale (16-BAC/SDS-PAGE). Questo tipo di elettroforesi utilizza detergenti ionici sia in 1a sia in 2a dimensione; le proteine vengono separate in base al loro peso molecolare in entrambe le dimensioni e sono disperse come spot intorno ad una diagonale (fig. 27).



**Figura 27:** Rappresentazione schematica di un sistema di elettroforesi bidimensionale diagonale. I campioni vengono separati in 1a dimensione in base al loro peso molecolare; dopo la corsa, le "lanes" relative a ciascun campione vengono ritagliate e caricate in 2a dimensione. Il risultato che si ottiene è la separazione delle proteine disperse lungo la diagonale del gel.



**Prima dimensione: 16 BAC**

Il 16-BAC è un detergente cationico che si lega alle proteine in rapporto costante, come il SDS. Questo detergente conferisce una carica positiva alle proteine e genera un rapporto massa/carica costante. La separazione avviene in ambiente acido (Stacking buffer a pH 4 e Separating buffer a pH 2) e dipende dalla massa proteica. I tempi di corsa sono lunghi e si ha un basso potere di impaccamento delle proteine.

- **Materiali (per preparare due gels)**

	<b><u>Separating Gel</u></b>	<b><u>Stacking Gel</u></b>
Urea	3.6 g	1 g
Acrilammide 30%	5 mL	1.33 mL
Separating Buffer	5 mL	
Stacking Buffer		2.5 mL
H <sub>2</sub> O bd	5.1 mL	3.2 mL
Bis-Acrlammide 2%	595 µl	1.2 ml
Acido ascorbico 80 mM	1 mL	500 µl
FeSO <sub>4</sub>	32 µl	8.5 µl
16-BAC	200 µl	70 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1:1200) 30%	800 µl	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1:700) 30%		800 µl

**Sample Buffer (2x)**

Urea	7.5 M
16-BAC	250 Mm
Glicerolo	10%
DTT	1.5 M
Pyronina-Y	5%

**Running Buffer**

16-BAC	2.5 mM
Glicina	150 mM
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM

- **Metodica:**

I campioni vengono ripresi in volumi opportuni con Sample Buffer 2X ed incubati per 5 minuti in un Thermomixer a 60°C per avere la massima solubilizzazione. Dopo aver lasciato

polimerizzare per circa un'ora il separating gel nelle armature, si cola e si lascia polimerizzare lo stacking gel. La vasca per la corsa elettroforetica viene riempita con il running buffer e dopo aver caricato i campioni si collega il generatore di corrente e si applica un voltaggio di 10 mA/per gel per il tempo necessario affinché i campioni entrino nel separating gel, quindi si aumenta il voltaggio a 20 mA/per gel.

### **3.5.2 Passaggio dalla prima alla seconda dimensione**

- **Materiali**

**Fissativo**

Isopropanolo, Acido Acetico, H<sub>2</sub>O 3,5:1:5,5

**Colorante**

Coomassie Blue R205 (0,15% in fissativo)

Prima di passare alla seconda dimensione il 16-BAC deve essere eliminato e le proteine devono essere fissate sul gel. Si eseguono lavaggi con il fissativo (isopropanolo: acido acetico: acqua in proporzione 3,5:1:5,5) per circa 1 ora (6 lavaggi da 10 minuti). A questo punto il gel può essere colorato con Coomassie Blue R205 (0.15% in fissativo) per 15 minuti; per una migliore colorazione il gel viene lasciato nel colorante tutta la notte su un agitatore basculante in camera fredda a 4°C. Al termine della colorazione il gel viene decolorato effettuando diversi lavaggi con il fissativo e l'immagine viene acquisita tramite CCD camera (LAS4000, GE Healthcare Life Sciences). Per passare alla seconda dimensione il gel deve essere equilibrato con Tris-HCl pH 6.8 (100 mM), cambiando la soluzione ogni 10 minuti per 3 volte. A questo punto è possibile tagliare le strisce di gel di interesse per passare alla seconda dimensione.

### **3.5.3 Seconda dimensione: SDS-PAGE**

Per la seconda dimensione vengono utilizzati i gel pre-cast NuPage 4-12% (Bis-Tris Gel 1.0 mm con pozzetti per IPG strip). La "lane" precedentemente tagliata viene posizionata sopra il gel facendola aderire bene. Una volta posizionata correttamente, viene incubata per 5 minuti con il Nu-Page LDS sample buffer 3X/DTT 150 mM per il Nu-Page. La corsa viene poi effettuata come per una normale NuPAGE elettroforesi. Il gel ottenuto viene colorato con le colorazioni opportune.

### 3.6 WESTERN BLOTTING

La tecnica del Western Blotting consente di trasferire le proteine, separate per mezzo della corsa elettroforetica, dal gel di poliacrilammide ad una membrana di nitrocellulosa rispecchiando il grado di risoluzione ottenuto nel gel. La membrana è poi sottoposta ad immunodecorazione con anticorpi specifici, permettendo così di rilevare e quantificare le proteine di interesse. Il trasferimento avviene mediante un campo elettrico diretto perpendicolarmente al gel ed alla membrana, inseriti in una griglia a formare un “sandwich”.

- **Materiali:**

**Transfer Buffer**

CAPS pH11	10 mM
Metanolo	10%

- **Metodica:**

La membrana di nitrocellulosa deve essere dapprima attivata in acqua bidistillata per 5 minuti e successivamente equilibrata per 10 minuti nel Transfer Buffer; anche il gel deve essere fatto equilibrare per 5 minuti nel Transfer Buffer. Si può quindi assemblare il “sandwich” nella griglia disponendo le componenti nel modo seguente: una spugnetta, 2 fogli di carta assorbente 3M (10 X 10 cm), membrana di nitrocellulosa, gel, altri 2 fogli di carta 3M ed un'altra spugnetta. Sia le spugnette che la carta 3M devono essere prima imbevute di Transfer Buffer. Si eliminano eventuali bolle d'aria, si chiude la griglia e si inserisce quindi il “sandwich” nella camera per il Western Blotting (Mini Transfer Tank - Hoefer), facendo attenzione che la membrana sia rivolta verso il polo positivo: in tal modo le proteine, che hanno acquisito una carica negativa durante al corsa elettroforetica, migrano dal gel verso la membrana, legandosi quindi ad essa. Dopo aver riempito la camera del blot con il tampone di trasferimento, si collega l'apparecchiatura ad un generatore di corrente; il trasferimento avviene a 250 mA per 2 ore e 15 minuti in camera fredda a 4°C. La durata del trasferimento stesso può variare in base alle dimensioni delle proteine che si desiderano studiare.

Ultimato il trasferimento, il “sandwich” viene smontato e la presenza e l'integrità delle proteine su nitrocellulosa vengono verificate mediante colorazione con Rosso Ponceau (SIGMA) per circa un minuto. Si tratta di una colorazione reversibile in quanto, una volta acquisita l'immagine delle proteine tramite CCD camera (ImageQuant™LAS4000, GE Healthcare Life Sciences), si elimina ogni traccia del colorante mediante un lavaggio con PBS.

### 3.7 IMMUNODECORAZIONE

L'immunodecorazione consiste nell'analisi specifica delle proteine trasferite dal gel di poliacrilammide alla membrana di nitrocellulosa, utilizzando anticorpi in grado di riconoscere uno specifico epitopo antigenico delle proteine di cui si vuole studiare il profilo di espressione.

- **Materiali:**

**Blocking Solution**

Latte in polvere	5%
Tween	0.2%
sciolti in PBS	

- **Metodica:**

Al termine del Western Blotting la membrana viene incubata per un'ora, in agitazione (piastra basculante Heidolph, Polymax 1040), nella soluzione di blocking (25 ml), in modo che le proteine del latte vadano a saturare gli eventuali siti liberi della membrana che potrebbero interagire in modo non specifico con l'anticorpo primario. Si procede poi incubando la membrana con gli specifici anticorpi primari, opportunamente diluiti nella stessa soluzione di blocking, per 2 ore a temperatura ambiente (RT) o a 4°C tutta la notte (*overnight, o.n.*) (diluizione anticorpi utilizzati: anti-PEPD 1:500, anti-CD10 1:2000, anti-MUP1 1:200, anti-NCC 1:1000, anti-NKCC2 1:2000, anti-ROMK 1:250, anti-CLCNKB 1:2000, anti-AQP2 1:1000, anti-TSG101 1:800, anti-CD9 1:200, anti-Flot1 1:250, anti-Alix 1:1000). Al termine dell'incubazione, si eseguono 5 lavaggi da 10 minuti l'uno con la soluzione di blocking e si procede quindi all'incubazione con i rispettivi anticorpi secondari per 1 ora e 30 minuti a RT o a 4°C per tutta la notte (O/N). Gli anticorpi secondari utilizzati sono coniugati con un enzima, la perossidasi di rafano (*Horse radish peroxidase, HRP*) e vengono anch'essi diluiti nella soluzione di blocking (1:10000). Dopo aver eliminato l'eccesso di anticorpo secondario sempre mediante 5 lavaggi da 10 minuti con la soluzione di blocking ed un lavaggio terminale in PBS, si procede con la rivelazione delle proteine di interesse mediante un saggio di chemiluminescenza (ECL, *Enhanced Chemiluminescence Assay*); in presenza di perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e luminolo (substrato chemiluminescente), miscelati in quantità equimolari, la perossidasi coniugata all'anticorpo secondario ossida il luminolo producendo luce dove è presente la proteina corrispondente. La membrana viene incubata con la miscela per 5 min e la luce emessa viene visualizzata posizionando la membrana in una CCD camera (Image Quant LAS4000, GE Healthcare Life Sciences), che consente di visualizzare ed acquisire l'immagine dell'emissione di luce direttamente sul PC.

### 3.8 METODI DI COLORAZIONE DEI GEL

#### 3.8.1 Colorazione con Simply Blue

Il SimplyBlue™ SafeStain è un colorante pronto all'uso, utile per rivelazioni sensibili e veloci. Le proteine colorate con SimplyBlue™ SafeStain sono compatibili con le analisi di spettrometria di massa. Il limite di sensibilità di questo colorante (riferito alla BSA) è di 3 ng.

Ultimata la corsa elettroforetica, il gel viene smontato e sottoposto dapprima a 5 lavaggi da 5 minuti con acqua bidistillata per eliminare l'eccesso di SDS; successivamente si immerge il gel nel colorante SimplyBlue (Life Technologies) per 2 ore a temperatura ambiente ed in costante agitazione. Segue poi la decolorazione, effettuata lasciando il gel immerso in acqua bidistillata per almeno 1 ora; in questo caso l'acqua del lavaggio non viene cambiata. Se si lascia a decolorare per un tempo più lungo si ottiene un migliore contrasto (l'aggiunta di sali aumenta significativamente la sensibilità). Il gel così colorato viene acquisito mediante CCD camera (LAS4000, GE Healthcare Life Sciences)

#### 3.8.2 Colorazione fluorescente con Sypro Ruby

Il colorante per proteine SYPRO® Ruby è un colorante fluorescente pronto all'uso e dotato di elevata sensibilità. Viene utilizzato per la rivelazione di proteine separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide ed ha un limite di sensibilità di 0.25-1 ng.

- **Materiali:**

**Fix Solution**

Metanolo	50%
Acido Acetico	7%
H2O	43%

**Wash Solution**

Metanolo	10%
Acido Acetico	7%
H2O	83%

- **Metodica:**

Al termine della corsa elettroforetica il gel viene sottoposto a fissazione mediante due lavaggi da 30 minuti in *fix solution* e successivamente immerso in SYPRO® Ruby gel stain *overnight* a temperatura ambiente ed in costante agitazione. Il giorno seguente il gel viene immerso nella *wash solution* per 30 minuti e quindi per due volte in acqua bi-distillata per 5 min cadauno. Tutti i passaggi dall'aggiunta del colorante in poi vengono eseguiti al buio.

Le proteine colorate con SYPRO® Ruby sono visualizzabili utilizzando una sorgente di raggi UV o una sorgente di luce blu. Nel nostro caso viene utilizzata una CCD camera, Image Quant LAS4000 (GE Healthcare Life Science) dotata di sorgente luminosa UV ed un filtro per l'acquisizione del segnale fluorescente.

### **3.9 DOSAGGI PROTEICI**

I metodi usati per dosare le proteine sono distinguibili in due gruppi principali;

- metodi basati sull'assorbimento della luce UV;
- metodi basati sulle reazioni chimiche delle proteine a dare un prodotto colorato (saggi colorimetrici).

Questi metodi permettono di ottenere solo una misura relativa, e richiedono l'uso di uno standard a peso molecolare noto attraverso cui viene costruita una retta di taratura dalla quale viene poi ricavata la concentrazione della miscela proteica presente nel campione in analisi.

L'albumina di siero bovino (BSA) viene quasi universalmente usata come standard per il suo basso costo, l'elevato grado di purezza e la sua facile disponibilità in commercio.

#### **3.9.1 Metodo Bradford Biorad**

Questo metodo consiste nella determinazione del contenuto proteico attraverso la misurazione dell'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. Le aliquote dei campioni da dosare vengono portate ad un volume finale di 800 µl con acqua bidistillata; si preparano 2 bianchi (800 µl di acqua bidistillata) e 3 standard di albumina (10 µg/50 µl). Ai campioni così diluiti, agli standard ed ai bianchi vengono addizionati 200 µl di reattivo Biorad. Il reattivo contiene il colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, il suo legame alle proteine determina uno spostamento del suo picco di assorbimento da 495 nm a 595 nm in soluzioni acide. Tale colorante forma forti complessi non covalenti con le proteine tramite interazioni elettrostatiche con gruppi amminici e carbossilici e tramite interazioni di van der Waals. Il *Coomassie Brilliant Blue G-250* è preparato come soluzione stock in acido fosforico; la quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteine presenti in soluzione, pertanto l'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione proteica. In genere quantità uguali di proteine differenti legano la stessa quantità di colorante, di conseguenza il saggio è indipendente dal tipo di proteina; i vantaggi di questo tipo di dosaggio consistono nella semplicità di preparazione del reattivo, nella rapidità dello sviluppo di colore, nella formazione di complessi stabili con le proteine e nella elevata sensibilità.

Dopo aver aggiunto il reattivo Biorad, si agitano delicatamente le cuvette e si lasciano i campioni in incubazione per 5 minuti prima di procedere alla lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro azzerando sul bianco ( $\lambda = 595 \text{ nm}$ ).

### 3.9.2. Dosaggio NanoDrop

Il dosaggio con NanoDrop (*NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific*) permette una rapida quantificazione del contenuto proteico con un consumo minimo del campione. Lo strumento utilizza la tensione superficiale del campione liquido per creare una colonna attraverso la quale viene misurata l'assorbanza. Uno o due  $\mu\text{l}$  di campione vengono depositati direttamente sul basamento di misura. La misurazione, per i campioni proteici, viene effettuata a 280 nm tramite due fibre ottiche in meno di 10 secondi e lo spettro e la relativa analisi vengono visualizzati sullo schermo del PC ed archiviati in esso. Si calibra lo strumento effettuando una prima misurazione con 1  $\mu\text{l}$  di acqua, ed una seconda misurazione con 1  $\mu\text{l}$  del bianco. Una volta calibrato lo strumento, viene eseguita la misurazione, in doppio, sui vari campioni. Il software restituisce come valore, oltre all'assorbanza, la concentrazione del campione (mg/ml).

### 3.9.3 Metodo del BCA

Un'ulteriore modalità per effettuare il dosaggio delle proteine ottenute è rappresentata dal metodo dell'Acido Bicinconinico introdotto da Smith nel 1985, seguendo il protocollo per piccole quantità di proteine (micrometodo) e utilizzando i reagenti forniti dalla ditta SIGMA.

L'Acido Bicinconinico (BCA), sotto forma del suo sale sodico solubile in acqua, è un reagente sensibile, stabile ed altamente specifico per ioni  $\text{Cu}^+$ . Il reattivo è costituito da una soluzione di solfato di rame alcalino contenente tartrato di sodio. Gli ioni  $\text{Cu}^{2+}$  presenti vengono ridotti dai residui amminoacidici dei campioni proteici, primariamente da cisteina, cistina, triptofano e tirosina, a ioni  $\text{Cu}^+$ . La reazione di due molecole di BCA con uno ione  $\text{Cu}^+$  sviluppa un colore violaceo con un massimo di assorbimento a 562 nm.

La composizione dei reagenti impiegati è la seguente:

- **Soluzione A:** reagente di base che contiene carbonato di sodio, bicarbonato di sodio, reagente BCA e tartrato di sodio in NaOH 0.2 N.
- **Soluzione B:** soluzione di solfato di rame 4%.

Si utilizza un'apposita piastra (microplate) contenente 96 pozzetti disposti in 12 righe e 8 colonne. Nei primi due pozzetti viene posizionato il bianco, costituito da 10  $\mu\text{l}$  di acqua bidistillata. Nei successivi è depositato in doppio uno standard di riferimento opportuno (BSA) nel seguente modo:

- BSA 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ : 0.4  $\mu\text{g}$ ; 0.8  $\mu\text{g}$ ; 2  $\mu\text{g}$ .
- BSA 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ : 4  $\mu\text{g}$ ; 6  $\mu\text{g}$ ; 10  $\mu\text{g}$ ; 16  $\mu\text{g}$ .

Nei pozzetti restanti vengono seminate le opportune quantità di campioni, tutte in doppio. I campioni in ogni pozzetto sono portati ad un volume finale di 10  $\mu\text{l}$  con acqua bidistillata. Si prepara la miscela di reazione (miscelando le soluzioni A e B nel rapporto 50:1) e se ne aggiungono 200  $\mu\text{l}$  ad ogni pozzetto. Dopo un'incubazione in stufa a 37°C per 30 minuti

agitando delicatamente la piastra ad intervalli regolari, si esegue la lettura dell'assorbanza nel lettore di piastre Biorad (modello 550), ad una lunghezza d'onda di 562 nm. Il contenuto proteico dei campioni è quantificato per mezzo di un'analisi di regressione lineare da una retta di taratura costruita grazie agli standard.

### 3.10 ANALISI PROTEOMICA MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica analitica potente usata per identificare prodotti incogniti, per determinazioni quantitative di composti noti e per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole; si basa sulla ionizzazione di una molecola e sulla sua successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa/carica ( $M/z$ ).

Il principio su cui si fonda è il seguente: una molecola è ionizzata per espulsione di un elettrone; il catione radicalico che si forma (*ione molecolare*) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (che lo strumento non rileva), in parte generando cationi e/o radicali cationi (*ioni frammento*). Lo ione molecolare ed i vari ioni che si originano per frammentazione (cationi e radicali cationi) vengono discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica da un analizzatore e rivelati da un detector. L'esperimento di spettrometria di massa consiste dunque nella *ionizzazione* di molecole in fase gassosa, nella *separazione* dei diversi ioni prodotti e nella loro *rivelazione*; uno spettrometro di massa è quindi costituito da una camera di ionizzazione, un analizzatore ed un rivelatore.

Il risultato dell'esperimento è lo spettro di massa, che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica. Questa tecnica consente di misurare le masse molecolari e di ottenere dei profili di frammentazione che sono specifici per ciascun composto, di cui costituiscono quindi un'impronta digitale.

Nei nostri esperimenti abbiamo dapprima digerito con la tripsina le proteine presenti nelle singole bande/spot dei gel (digestione *gel-based*) oppure direttamente nel campione di partenza (digestione *gel-free* o *shotgun*), ed i peptidi così ottenuti sono stati analizzati mediante LC-ESI-MS/MS (*liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry*). Questa metodica consente di:

- accoppiare le capacità di separazione fisica di campioni complessi della cromatografia liquida (LC o HPLC) e le capacità di analisi della spettrometria di massa (MS).
- accoppiare due analizzatori in serie, separati da una camera di collisione (MS-MS); il primo analizzatore consente di selezionare uno ione avente un determinato rapporto  $m/z$ , denominato ione "genitore" o "precursore", la camera di collisione serve a provocare la frammentazione dello ione precursore a formare ioni "figli" o "prodotto", la cui massa viene misurata dal secondo analizzatore.



Queste analisi sono state eseguite in collaborazione con il laboratorio di Spettrometria di Massa, coordinato dal Prof. Fulvio Magni, del Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università degli studi di Milano-Bicocca.

### 3.10.1 Digestione in gel con tripsina

- **Materiali**

NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM

Ditiotreitolo (DTT) 10 mM in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

Iodoacetammide (IAA) 55 mM in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

Tripsina 0,125 µg/µl in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

- **Metodica:**

Dopo la colorazione del gel mediante CoomassieBlue, gli spot ottenuti dall'elettroforesi bidimensionale 16BAC/SDS-PAGE degli exosomi urinari di pazienti affetti da tubulopatie ereditarie e corrispondenti controlli sono stati excisi, trasferiti in eppendorf e conservati a 4°C, per essere quindi sottoposti all'analisi tramite spettrometria di massa.

I singoli spot sono stati lavati con una soluzione costituita da 100 µl di NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM e 100 µl di CH<sub>3</sub>CN ed incubati nel thermomixer a temperatura ambiente per 15 minuti (700 rpm); questo lavaggio consente di rimuovere parzialmente la colorazione delle bande del gel. I campioni vengono quindi brevemente centrifugati ed il surnatante ottenuto viene eliminato. Si procede aggiungendo ai campioni stessi 50 µl di ditiotreitolo (DTT) 10 mM sciolto in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM ed incubandoli quindi nel thermomixer a 56 °C per 35 minuti al fine di ridurre i ponti disolfuro responsabili della struttura terziaria delle proteine presenti. Al termine dell'incubazione essi vengono nuovamente centrifugati ed il surnatante viene eliminato.

Quindi si aggiungono ai campioni 75 µl di Iodoacetammide 55 mM sciolta in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM e si incubano quindi al buio a temperatura ambiente per 30 min. La Iodoacetammide è un alchilante che si lega ai gruppi sulfidrilici precedentemente ridotti dal DTT bloccandoli in uno stato non reattivo di modo che i ponti disolfuro non possano riformarsi.

Dopo aver brevemente centrifugato ed eliminato il surnatante, si effettua un ulteriore lavaggio del gel per completarne la decolorazione; successivamente si incuba nel thermomixer a 700 rpm a temperatura ambiente per 15 minuti (700 rpm). Se le bande del gel non si sono ancora del tutto decolorate dopo il primo lavaggio, è possibile eseguirne un secondo. Ultimata la decolorazione, ai campioni così ottenuti si aggiungono 100 µl di CH<sub>3</sub>CN, un solvente che consente la completa disidratazione del gel, e si incubano poi nel thermomixer per 10 minuti (700 rpm). Di nuovo i campioni vengono centrifugati ed il surnatante viene eliminato.

La digestione delle proteine presenti nelle bande del gel viene effettuata anche in tal caso con tripsina; si aggiungono ad ogni campione 8  $\mu\text{l}$  di tripsina 0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (*Promega Trypsin, liofilizzata*), diluita con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM (diluizione 1:7); la tripsina è un enzima appartenente alla classe delle serin proteinasi che catalizza il taglio proteolitico, con specificità per gli amminoacidi arginina e lisina, a generare peptidi. Il gel assorbe la soluzione e viene lasciato rigonfiare per 10 minuti a temperatura ambiente; se il gel ha riassorbito tutta la soluzione, è necessario aggiungerne un ulteriore volume. I campioni vengono quindi incubati *overnight* in stufa a 37°C.

Dopo digestione, si effettua l'estrazione dei peptidi. Si trasferisce il surnatante in una nuova eppendorf da 0,5 ml. Si aggiungono al gel 20  $\mu\text{l}$  di TFA all'1% e si incuba per 20 min a temperatura ambiente, agitando occasionalmente. Si unisce il liquido surnatante al primo. Viene aggiunta al gel una miscela di 25  $\mu\text{l}$  di 0,1% di TFA in 50% di  $\text{CH}_3\text{CN}$  e si incuba nuovamente per 20 minuti a temperatura ambiente. Si unisce quindi il liquido surnatante ai due precedenti. A questo punto, si concentrano i surnatanti riuniti in *HETOVAC VR-I* (*Heto Lab. Equipment, Allerod, Danimarca*) fino ad ottenere un volume compreso tra 2 e 5  $\mu\text{l}$ . Si aggiungono 20  $\mu\text{l}$  di 0,1% di TFA e si concentra di nuovo fino ad un volume di circa 2  $\mu\text{l}$ . Si aggiungono quindi 10  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  e il campione è quindi pronto per essere iniettato in LC-MS/MS per le successive analisi.

### 3.10.2 Analisi LC-ESI-MS/MS

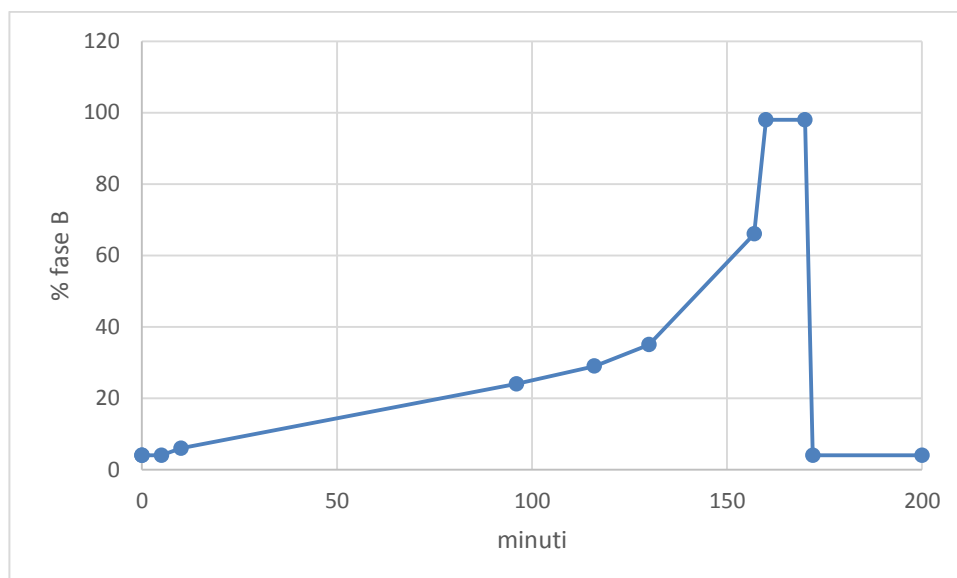
I campioni proteici dopo digestione proteolitica ed estrazione sono stati concentrati in centrifuga *Heto Speed-Vac* e successivamente desalificati utilizzando puntali da pipetta *Ziptip™*  $\mu\text{-C18}$  seguendo il protocollo standard fornito dalla ditta produttrice, e successivamente iniettati con una velocità di 1,8  $\mu\text{L}/\text{min}$  nel sistema *Dionex UltiMate 3000 rapid separation (RS) LC nano system* accoppiato *on-line* allo spettrometro *Impact HD™* UHR-qToF (Ultra High Resolution-qTOF).

Le analisi HPLC sono state eseguite tramite configurazione della valvola del comparto colonna che prevedeva l'utilizzo di tutte le 10 vie in modo da inserire un segmento di calibrazione di 10 minuti prima del gradiente, una fase di desalificazione e concentrazione su precolonna, e infine una separazione con gradiente su colonna analitica, con le seguenti condizioni operative:

- Pre-colonna per la desalificazione/concentrazione (*Dionex, Acclaim PepMap 100 C18, cartridge, 300  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  5 mm, 5  $\mu\text{m}$ );*
- Pre-colonna per i calibranti (*Dionex, Acclaim PepMap 100 C18, nanoviper, 75  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  2 cm, 3  $\mu\text{m}$ );*
- Colonna analitica: nano colonna da 50 cm (*Dionex, 0.075 mm ID, Acclaim PepMap100, C18, 2  $\mu\text{m}$ );*

- Fase mobile *loading pump*: H<sub>2</sub>O + 2% CH<sub>3</sub>CN + 0,1% Acido Trifluoroacetico;
- Fase mobile A *nano pump*: H<sub>2</sub>O + 0,1% Acido Formico;
- Fase mobile B *nano pump*: H<sub>2</sub>O + 80% CH<sub>3</sub>CN + 0.08% Acido Formico;
- Miscela di calibrazione: MMI-L *Low concentration Tuning Mix*;
- Flusso della nanopompa: 300 nl/min;
- Flusso di caricamento del campione su pre-colonna di concentrazione (*loading pump*): 10µl/min;
- Flusso della pompa siringa per calibranti: 30 µl/min;
- Temperatura: 40°;
- gradiente *multistep* con *run-time* della durata di 200 minuti (tab. X)

Minuti	% fase B
0	4
0	4
5	4
10	6
96	24
116	29
130	35
157	66
160	98
170	98
172	4
200	4



**Tabella X:** Gradiente utilizzato per l'analisi HPLC. Fase mobile B nano pump: H<sub>2</sub>O + 80% CH<sub>3</sub>CN + 0.08% Acido Formico.

La colonna era connessa ad una sorgente di tipo *CaptiveSpray*<sup>TM</sup>, funzionante in modalità *Enhanced*, ossia con l'ausilio di un gas di solvatazione arricchito con acetonitrile in modo da facilitare la ionizzazione dei campioni poco concentrati, aumentando lo stato di carica e riducendo di conseguenza il rapporto *m/z*.

Lo spettrometro di massa ha operato in modalità *data-dependent-acquisition* in modo tale da alternare automaticamente una scansione completa MS all'acquisizione degli spettri MS/MS. Le analisi sono state eseguite utilizzando i seguenti parametri:

- *Funnel 1* RF = 400 Vpp;
- *Funnel 2* RF = 600 Vpp;
- *Hexapole* RF = 400 Vpp;
- *Prepuls* = 10µs.

Il numero di ioni precursori è stato regolato automaticamente dal *software* al fine di mantenere costante la frequenza di campionamento sul picco cromatografico, con cicli fissi di 5 secondi.

Le funzionalità IDAS (*Intensity Dependent Acquisition Speed*) e RT2 (*RealTime Re-Think*) sono state applicate in una finestra di acquisizione MS/MS di 300-1221 e 1125-2000 *m/z*. Impostando la funzionalità IDAS è possibile fissare il *cycle time* ovvero il tempo che intercorre tra una scansione MS e quella successiva. Di conseguenza il numero di ioni precursori MS/MS in un singolo *cycle time* e il relativo tempo di acquisizione MS/MS varia automaticamente sulla base dell'intensità dello ione precursore, al fine di ottenere risultati indipendenti sia dalla quantità che dalla complessità del campione. La funzionalità RT2 permette di effettuare la frammentazione dello ione precursore in *cycle time* consecutivi solo se si verifica un determinato aumento dell'intensità di quello ione, ottimizzando la qualità degli spettri MS/MS e il numero di identificazioni particolarmente nei campioni complessi.

La fase di elaborazione dei dati è stata effettuata in modo automatico eseguendo un appropriato *script* implementato nel *software Compass DataAnalysis™* v.4.1 Sp4. I dati MS/MS grezzi sono stati ricalibrati internamente su un iniziale segmento di analisi corrispondente all'uscita dei picchi della miscela dei calibranti e successivamente la curva di calibrazione corretta con la *lock-mass* (*m/z* 1221.9906) depositata su un apposito filtro del gas di solvatazione in entrata nella sorgente. I dati sono stati poi convertiti in una lista di picchi, deconvoluti e salvati in *file* di tipo .mgf e .xlm. Per eseguire l'identificazione, i dati MGF sono stati esaminati utilizzando il motore di ricerca *Mascot* (versione 2.4.1) attraverso lo strumento *Mascot Daemon*. La ricerca è stata ristretta alla sezione umana del *database Swissprot* (ultimo accesso Aprile 2014, 544996 sequenze; 193815432 residui); sono stati impostati come parametri di ricerca *Mascot*:

- tripsina come enzima proteolitico utilizzato;
- la modificazione fissa “*carbamidometyl*” poichè questo tipo di modificazione chimica è stata introdotta sui peptidi durante la fase di alchilazione con IAA durante la digestione proteolitica.
- le tolleranze relative all'errore in MS e MS/MS sono state in generale impostate rispettivamente a 20-5 ppm e 0.5-0.05 Da.
- ricerca con DECOY Database che permette di ottenere informazione su False Discovery Rate (FDR), un valore percentuale che esprime la probabilità di falsi positivi nella lista di identificazioni.

Infine, è stato utilizzato l'algoritmo “Percolator” per determinare la soglia di significatività di identificazione delle proteine (*p* value < 0.05). Consideriamo identificata una proteina che possieda almeno un peptide significativo secondo lo score fornito dopo Percolator.

### 3.10.3 Mascot

Mascot è un potente motore di ricerca che utilizza, confrontandoli con banche dati di sequenze proteiche primarie, dati provenienti da analisi in spettrometria di massa per l'identificazione di proteine. Uno dei vantaggi di Mascot è quello di poter integrare al suo interno diversi metodi di ricerca, ognuno adatto ad una determinata esigenza analitica.

I metodi principali sono:

- *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) in cui i dati inseriti sono i valori di massa di peptidi provenienti dalla digestione, enzimatica o chimica, di una o più proteine;
- *MS/MS Ion Search* in cui i dati inseriti provengono da analisi MS/MS per ottenere informazioni su una o più sequenze aminoacidiche;
- *Sequence Query* in cui ad uno o più peptidi, utilizzati per il PMF, possono essere associate informazioni parziali sulla sequenza, sulla composizione aminoacidica, valori di massa/carica di ioni provenienti da analisi MS/MS o altri ancora.

In particolare, per poter effettuare la ricerca *MS/MS Ion Search* devono essere fornite al programma informazioni supplementari su come è stata condotta l'analisi in spettrometria di massa. Ci sono informazioni che devono essere fornite al programma per poter ottenere un'identificazione corretta, mentre altre informazioni sono facoltative, ma la loro mancanza non inficia il risultato della ricerca. È necessario scegliere la banca dati all'interno della quale effettuare la ricerca (es. *SwissProt*, che rappresenta il database meno ridondante e quindi più accurato), inserire i valori di massa dello ione *parent* e dei frammenti generati a partire da quest'ultimo durante l'analisi, inserire il tipo di spettrometro di massa con il quale si è eseguita l'analisi, indicare il tipo di frammentazione avvenuta e la carica degli ioni, infine specificare che le masse sperimentali fanno riferimento al valore di massa monoisotopica dei peptidi. Un'ulteriore informazione richiesta da Mascot è l'eventuale presenza di modificazioni fisse e variabili introdotte durante la preparazione del campione.

Una variabile da fornire al programma e molto importante per l'identificazione corretta della proteina è la tolleranza, ovvero la misura dello scarto massimo che ci può essere tra i dati sperimentali e quelli teorici. La tolleranza può essere espressa in *Dalton*, in percentuale o in parti per milione (ppm); minore è il valore di tolleranza utilizzato per la ricerca, maggiore è l'affidabilità del risultato ottenuto, mentre un margine di errore troppo ampio potrebbe portare all'identificazione di un falso positivo e non della proteina corretta. I valori di tolleranza da inserire sono quindi due: quello per il peptide *parent* (*Mass Tol MS*) e quello per i singoli ioni frammento che insieme influenzeranno l'identificazione finale (*MS/MS Tol*). Gli intervalli di tolleranza possono comunque essere ristretti o allargati a piacere, al fine di aumentare o diminuire la significatività statistica dell'analisi. Dunque se diminuisce la tolleranza, aumenta la significatività e viceversa.

Fra i parametri che non sono necessari al fine della ricerca, ma che possono essere inseriti vi è la tassonomia, se conosciuta, dell'organismo da cui la proteina di interesse proviene.

In tutti i metodi forniti da Mascot, l'algoritmo, chiamato MOWSE (*Molecular Weight Search scoring algorithm*), classifica le proteine risultanti dalla ricerca in banca dati in base ad uno score che rappresenta una misura della probabilità assoluta (P) che la proteina identificata sia frutto di un evento casuale (un falso positivo) e non la proteina effettivamente analizzata. Lo score è quindi definito come:

$$\text{score} = -10 \cdot \text{Log}_{10} (P)$$

In questo modo, una proteina identificata con uno score elevato, ad esempio 200, avrà una probabilità molto bassa,  $10^{-20}$ , di essere un falso positivo. Nel caso di analisi MS/MS, non solo viene dato uno score alla proteina identificata ma anche ad ogni singolo ione riconosciuto (*Ion Score*), per ognuno dei quali ci sarà un valore soglia variabile in base a diversi parametri tra cui la lunghezza della sequenza e la tolleranza scelta per lo ione *parent*. Ogni score è accompagnato da un valore chiamato *expectation value* (E.V.), che indica il numero di eventi casuali che potrebbero verificarsi ed essere uguali o migliori; questo indice è equivalente al valore *E-value* ottenuto in una ricerca con la banca dati BLAST. Logicamente, più è basso il valore E.V. più è significativo lo score. Posizionando il cursore su un peptide è visualizzabile un pop-up dove sono indicate rispettivamente le soglie d'identità o omologia di quel peptide. Abbiamo già descritto la semplice formula matematica con il quale viene calcolato lo score; il match migliore può ottenere un ottimo score secondo un test statistico effettuato dal software. Questo metodo è definito "*target decoy*": il test considera la distribuzione di 1500 *scores* raccolti in modo random fra tutti quelli calcolati; se lo score del peptide d'interesse è l'unico *outlier* rispetto a questa distribuzione, il peptide avrà una soglia di identità più bassa (*identity threshold*); se sono presenti altri *outlier* lo score del peptide d'interesse supererà solo la soglia di omologia (*homology threshold*). In una ricerca Decoy è possibile scegliere il processo di calcolo dello score di Mascot attraverso Percolator. Questo utilizza un algoritmo di tipo SVM per ritestare i matches e ottenere un nuovo *false discovery rate*. I calcoli di probabilità revisionati sono convertiti in un nuovo score e un'unica soglia di significatività ( $p < 0.05$ ). Quando selezioniamo "*Show Percolato Scores*" sul pannello di Mascot, gli scores calcolati in precedenza sono sostituiti da nuovi valori calcolati come segue:

- $\text{Score} = -10 \log(\text{PEP})$  ,
- $\text{Expect Value} = \text{PEP}$  ;
- $\text{Identity Threshold Score } (p < 0.05) = 13$

dove PEP (*Posterior Error Probabilities*) è la probabilità che un singolo match corretto sia un evento casuale.

### 3.10.4 Digestione gel-free con tripsina

La digestione FASP (*Filter Aided Sample Preparation*) [Wisniewski JR *et al.*, 2009] è un metodo di preparazione del campione per l'analisi in spettrometria di massa che permette l'utilizzo di un detergente anionico come il SDS per la solubilizzazione del campione, mantenendo contemporaneamente la robustezza contro le contaminazioni della digestione in soluzione, poiché l'eliminazione del detergente e la digestione delle proteine sono assistite da un filtro.

La digestione FASP è caratterizzata da quattro steps fondamentali:

- *Eliminazione di componenti a basso peso molecolare presenti nel campione prima della digestione*
- *Carbammidometilazione dei tioli*
- *Digestione delle proteine*
- *Eluizione dei peptidi*

- **Materiali**

#### **Lysis Buffer**

Tris HCl pH 7.4	50 mM
NP40	1%
Sodio Deossicolato (DOC)	0.25%
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM

NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM

Ditiotreitolo (DTT) 400 mM in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

Iodoacetammide (IAA) 100 mM in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

Tripsina 0,5 µg/µl in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

- **Metodica:**

Per l'identificazione delle proteine degli esosomi urinari attraverso spettrometria di massa (MS) sono stati allestiti pool rappresentativi ottenuti a partire dalle urine di 4 ratti diabetici e 3 controlli, al fine di ottenere una sufficiente quantità di materiale per le analisi (150µg di proteine per pool), minimizzando inoltre eventuali differenze intra-individuali. Il pool di esosomi viene poi sottoposto a lisi tramite incubazione 30 minuti in ghiaccio con un apposito buffer di lisi, Lysis Buffer. Il lisato viene trasferito su provette munite di nanomembrane ultrafiltranti Amicon ultra 0.5 ml, 10KDa (Millipore), in precedenza preparati lavando sequenzialmente con H<sub>2</sub>O/NaOH/H<sub>2</sub>O, e vi si aggiunge ditiotreitolo (DTT) sciolto in NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> e si porta a 500 µl con il medesimo tampone. Le provette vengono incubate a 95°C per 5 minuti al fine di ridurre i ponti disolfuro responsabili della struttura terziaria delle proteine presenti. Si centrifuga poi per 15

minuti a 14000xg in modo che attraverso il filtro passino e vengano eliminati i detergenti del *lysis buffer* e il DTT, mentre le proteine rimangono al di sopra del filtro. Si esegue poi un lavaggio con 300 µl di tampone NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> centrifugando nuovamente per 10 minuti a 14000xg. Si aggiungono quindi 80 µl di Iodoacetammide sciolta in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> e si incubano al buio a temperatura ambiente per 30 minuti. Si centrifuga poi per 5 minuti a 14000xg per eliminare la Iodoacetammide. La membrana filtrante viene poi lavata con 200 µl di tampone NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> per 5 volte centrifugando per 10 minuti ogni volta. Si aggiungono infine 12 µl di tripsina 0,5 µg/µl (Promega Trypsin, liofilizzata) e si incuba *overnight* a 37°C. Il giorno successivo si aggiungono 40 µl di acqua HPLC-grade (Sigma-Aldrich), si centrifuga per 10 minuti a 14000xg, si aggiungono altri 100 µl di acqua HPLC-grade (Sigma-Aldrich) e si centrifuga di nuovo. I peptidi a questo punto possono passare attraverso la membrana; quindi il filtrato (circa 200 µl) viene recuperato in una eppendorf pulita e la quantità opportuna viene iniettata nello spettrometro di massa.

### 3.10.5 Analisi LC-ESI-MS/MS per quantificazione label-free

L'analisi LC-ESI-MS/MS per l'identificazione di proteine a partire dai digeriti triptici ottenuti è stata eseguita mediante Proxeon Easy-nLC System (*Proxeon Biosystems, Odense, Denmark*) accoppiato con un MaXis hybrid UHR-QToF system (*Bruker Daltonics, Bremen, DE*).

I campioni iniettati in nLC sono stati prima caricati su una pre-colonna lunga 2 cm (ID 100µm, 5 µm, C18-A1, *Easycolumn™, Proxeon*) per il *desalting* e separati on-line con flusso di 300 nl/min su una colonna analitica micro-capillare di silice fusa lunga 10 cm (ID 75µm, 3 µm, C18-A2, *Easycolumn™, Proxeon*). Sono state utilizzate le seguenti fasi:

- *fase A*: H<sub>2</sub>O + 5% CHCN + 0,1% HCOOH
- *fase B*: ACN + 0,1% HCOOH

La corsa HPLC della durata di 190 minuti ha previsto il gradiente di CHCN descritto nella seguente tabella:

Tempo (minuti)	% fase A	% fase B
0	98	2
180	65	35
181	2	98
190	2	98

La colonna LC è stata direttamente connessa alla sorgente ESI attraverso un sistema di tipo nanosprayer™ (*Bruker Daltonics, Bremen, DE*) con le seguenti impostazioni:



- End plate offset: -500V
- Capillary: 5000V
- Nebulizer: 0.7bar
- Dry gas: 4l/min
- Dry temperature: 150°C

Per migliorare l'accuratezza è stato utilizzato come *lockmass* standard direttamente in sorgente il composto “*Hexakis(1H,1H,3Htetrafluoropropoxy)phosphazene*” a  $m/z$  1221.9906 (Agilent).

Gli spettri MS sono stati acquisiti in un intervallo di 50-2200 $m/z$  a 1 Hz (5000 ToF *summations*). Gli spettri MS/MS ottenuti mediante tecnica CID con N<sub>2</sub> come gas di collisione sono stati acquisiti in un intervallo di 400-1600 $m/z$ , ad esclusione dell'intervallo di massa dello standard (1221.5-1224  $m/z$ ). Per ciascuna scansione MS vengono scelti massimo 5 precursori tra i più intensi, con priorità per gli stati di carica da +2 a +4, con una soglia di intensità minima di 2000 *counts*. I precursori scelti sono automaticamente esclusi dall'analisi MS/MS per 30 secondi. E' stata attivata la funzione di *collision sweeping*.

I parametri di trasmissione e di focalizzazione degli ioni usati sono i seguenti:

- Funnel RF: 400Vpp
- Multipole RF: 400Vpp
- Quadrupole Ion Energy: 4eV
- Collision RF: 1200Vpp
- Ion cooler RF: 400Vpp
- Transfer time: 100 $\mu$ s
- Pre puls storage: 8  $\mu$ s

### 3.10.6 Elaborazione dei dati LC-ESI-MS/MS

Gli spettri MS/MS grezzi sono stati corretti mediante utilizzo della calibrazione con lock mass, deconvoluti e convertiti in peaklist mediante Compass DataAnalysis v.4.0 Sp4 (*BrukerDaltonics*). L'algoritmo (sumpeaks) usato per l'elaborazione delle peaklist è stato impostato in modo da escludere tutti gli ioni che hanno un rapporto segnale/rumore inferiore a 1 e con una intensità inferiore a 20 conte ioniche. I dati ottenuti sono stati sottoposti alla ricerca in banca dati tramite il motore di ricerca Mascot (v2.3.02) usando la banca dati di *Swissprot* ristretta alla tassonomia “rat”. Sono stati utilizzati i seguenti parametri per la ricerca:

- Enzyme: trypsin
- Fixed Modification: carbamidomethylation (C)
- MS tolerances: 5-10 ppm

- *MS/MS tolerance: 0.1-0.5 Da*

- *Instrument: ESI-QUAD-TOF*

Le metodiche di quantificazione *label-free* confidano su una riproducibilità a lungo termine del segnale e una linearità del segnale stesso rispetto alla concentrazione molecolare. Questo approccio è applicabile ugualmente allo studio di proteine e metaboliti, oltre che a tutti i fluidi biologici e tessuti. La quantificazione *label-free* può essere effettuata adottando due diverse strategie: la prima è denominata conteggio degli spettri (*spectra counting*) e si basa sul numero di spettri ottenuti dalla frammentazione MS/MS di un dato peptide; la seconda prevede la misurazione delle aree dei picchi cromatografici degli ioni precursori dei peptidi. Il primo approccio si basa sull'osservazione empirica per cui il numero degli spettri MS/MS di un particolare peptide aumenta all'aumentare della proteina corrispondente, permettendo una quantificazione relativa tra diversi campioni. Nonostante questo metodo sia oggetto di controversie poiché si affida al semplice conteggio degli spettri, è oggi ampiamente usato dopo essere stato ottimizzato nel corso degli anni. Il secondo approccio prevede la misurazione dell'area dei picchi cromatografici degli ioni precursori; a seconda del metodo di separazione cromatografica, i peptidi vengono separati in base alle loro proprietà chimico-fisiche, successivamente ionizzati, ed infine rilevati dallo spettrometro di massa. Nello spettro di massa acquisito, ciascun peptide avente determinata massa e carica genera un picco di massa mono-isotopico; le intensità di questi picchi in funzione del tempo di ritenzione possono essere visualizzati nel cromatogramma degli ioni estratti (*extracted ion chromatogram, XIC*) e le aree sotto la curva (*area under the curve, AUC*) calcolate. Queste correlano linearmente con l'abbondanza relativa delle proteine, rendendo questi dati utili per misurazioni quantitative [Bondarenko PV *et al.*, 2002]. Recentemente è stato introdotto il *normalized spectral index* ( $SI_N$ ) che tiene conto di tre caratteristiche quantitative della MS e cioè la conta dei peptidi, la conta degli spettri, e l'intensità degli ioni frammento; questo approccio ha permesso di eliminare la variazione tra misurazioni ripetute, e di ottenere una riproducibilità significativa nella quantificazione [Neilson KA *et al.*, 2011].

Nella nostra analisi quantitativa di tipo *label-free*, ogni tipologia di campione è stata analizzata in triplicato per garantire la sicurezza statistica necessaria. I rapporti proteici delle proteine tra esosomi dei ratti diabetici e controlli sono stati determinati mediante il software IDEAL-Q (versione 1.6.0.2, *From the Institutes of Information Science, Chemistry, and Biomedical Science, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan*) [Tsou CC *et al.*, 2010]; si tratta di un tool automatizzato per la proteomica quantitativa *label-free* XIC-based che utilizza un efficiente algoritmo (*IDEAL, ID-based Elution time prediction by frAgmentAL regression*) di predizione del tempo di eluizione e di allineamento dei picchi per quantificare il maggior numero di peptidi tra

corse LC-MS/MS diverse. L'abbondanza relativa delle proteine negli exosomi è stata determinata utilizzando tutti i peptidi unici appartenenti a ciascuna proteina.

### 3.11 Analisi mutazionale in silico tramite il software SIFT

Gli studi dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) permettono di identificare le sostituzioni amminoacidiche nelle regioni codificanti delle sequenze proteiche; ogni sostituzione può determinare un'alterazione della funzionalità proteica. Il software SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) è un programma che predice l'effetto di una sostituzione amminoacidica sulla funzione della proteina e quindi, potenzialmente, sul fenotipo, sfruttando l'allineamento di sequenza; SIFT utilizza una sequenza *query* e sfrutta le informazioni provenienti da allineamenti multipli per predire sostituzioni tollerate o deleterie per ogni posizione della sequenza *query* [Ng PC *et al.*, 2001; Ng PC *et al.*, 2003]. SIFT assume che gli amminoacidi importanti devono essere conservati all'interno della famiglia proteica di appartenenza e di conseguenza i cambiamenti a livello di posizioni amminoacidiche altamente conservate saranno classificate come deleterie. Ad esempio, se una posizione in un allineamento contiene esclusivamente l'amminoacido isoleucina, il software presume che quel residuo sia importante per la funzione della proteina stessa e quindi ogni sostituzione sarà classificata come deleteria. Se una posizione in un allineamento può contenere gli amminoacidi idrofobici isoleucina, valina e leucina, SIFT assume che quella posizione può contenere unicamente amminoacidi con caratteristiche idrofobiche; cambiamenti con altri amminoacidi idrofobici saranno classificati come tollerati mentre sostituzioni con residui polari o carichi saranno considerati come dannosi [Ng PC *et al.*, 2001; Ng PC *et al.*, 2003].

### 3.12. ANALISI STATISTICA

Per quanto riguarda lo studio sul modello animale di DN, l'analisi statistica dei dati ottenuti mediante Immunoblotting è stata eseguita utilizzando il *t*-test (GraphPad Prism 5.0, GraphPad software).

Per quanto riguarda le SLTs, per la valutazione delle differenti distribuzioni dei valori di densità ottica (DO) delle bande analizzate mediante IB tra tutti i diversi gruppi in esame è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis, analogo non parametrico dell'ANOVA a una via utilizzato quando non è possibile supporre una distribuzione normale della popolazione, mentre per la comparazione statistica a due a due è stato utilizzato il Mann-Whitney test (GraphPad Prism 5.0, GraphPad software). La valutazione della performance diagnostica dei marcatori presi in esame è stata effettuata mediante curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e successivo calcolo dell'area sotto la curva (AUC) e della likelihood ratio (GraphPad Prism 5.0, GraphPad software).

# ***Risultati e Discussione***

## 4.1. EXOSOMI URINARI E NEFROPATIA DIABETICA

### 4.1.1. Modello animale di diabete di tipo 2

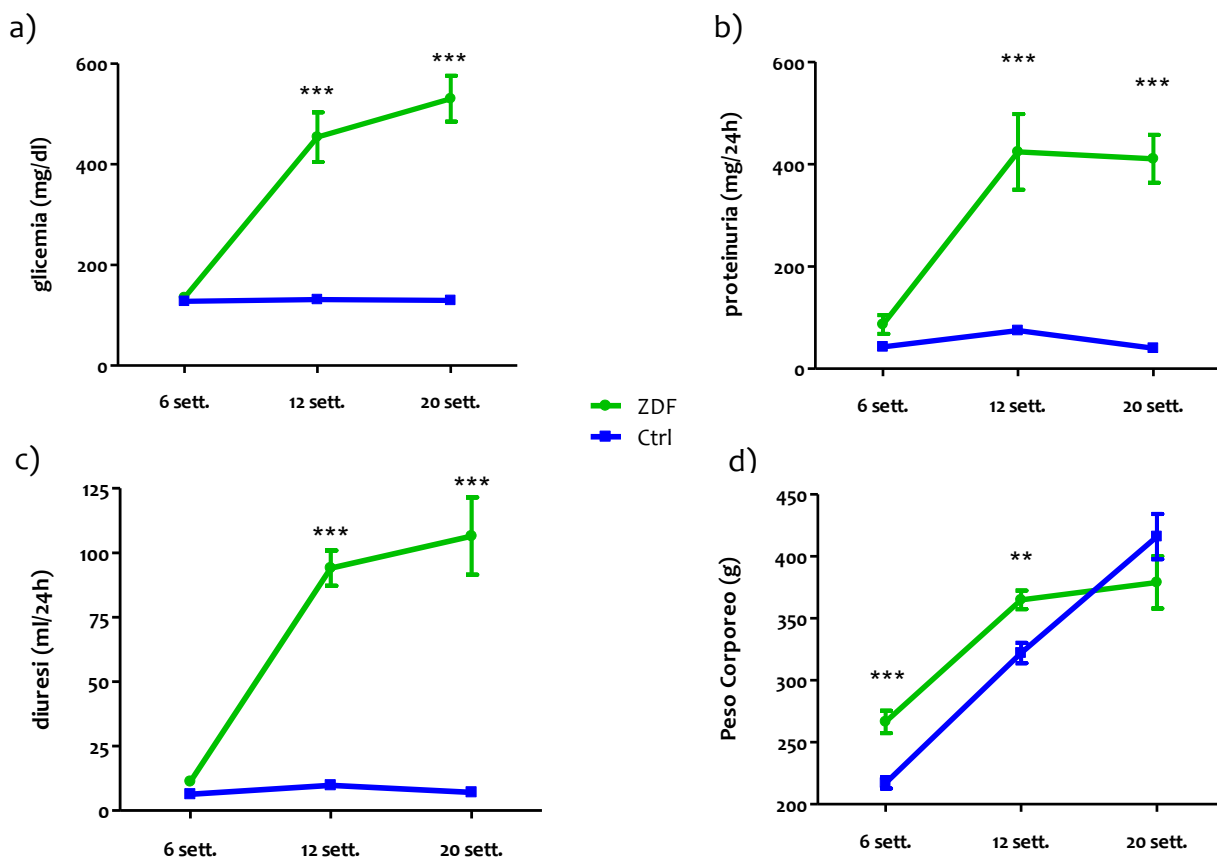
Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in accordo con la Guida per la salute ed il trattamento degli Animali da Laboratorio, pubblicata dall'US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Come modello animale di diabete di tipo 2 sono stati utilizzati i ratti ZDF (Zucker Diabetic Fatty), aventi una mutazione in omozigosi nel gene codificante per il recettore dell'ormone leptina (fa/fa), che determina un fenotipo molto simile a quello del diabete di tipo 2 nell'uomo, tra cui anche lo sviluppo di Nefropatia Diabetica (ND) [Janssen U *et al.*, 1999]. In particolare, gli esperimenti sono stati effettuati su 7 ratti maschi ZDF (fa/fa) e 7 ratti maschi controllo (fa/+) (Charles Rivers, Calco, Italia), stabulati individualmente in condizioni di temperatura controllata (22°C) e nutriti con un regime dietetico ben definito (Purina 2008 diet, Charles Rivers). Sono state raccolte le urine delle 24 ore per 5 giorni consecutivi a tre diverse età: a 6 settimane di vita, ovvero nella fase di insorgenza del diabete, a 12 settimane, corrispondenti alla fase di DN conclamata e a 20 settimane, rappresentative di uno stato patologico molto avanzato. Per monitorare l'effettiva insorgenza del diabete e la conseguente evoluzione della DN nei ratti ZDF sono state valutate e misurate nel tempo glicemia, proteinuria, diuresi e peso corporeo, rapportando quest'ultimo anche al peso del rene, asportato immediatamente dopo il sacrificio mediante sovradosaggio di anestetico (sodium pentobarbital) (tab. XI). Il rene è stato quindi pesato e conservato per le analisi istopatologiche successive.

**Tabella XI:** caratteristiche metaboliche degli animali sperimentali utilizzati.

Età	6 settimane		12 settimane		20 settimane	
	Ctrl	ZDF	Ctrl	ZDF	Ctrl	ZDF
Ratto	n=7	n=7	n=7	n=7	n=3	n=4
Glicemia (mg/dl)	127±4,2	135±6,5	131±7,0	544±49,3	129±4,1	530±45,5
Peso corporeo(g)	217±4,4	266±9,1	322±8,2	365±7,4	416±18,2	379±21,1
Proteinuria (mg/24h)	42,7±5,2	86,8±18,4	74,7±6,3	424±74,1	39,9±2,1	411±46,3
Diuresi (ml/24h)	6,4±0,17	11,3±1,2	9,8±0,33	86,9±12,8	7,1±0,94	119±12,4
Peso rene/Peso corporeo (mg/g)	---	---	n=4 3,79±0,05	n=3 4,14±0,45	n=3 3,18±0,20	n=4 4,67±0,35

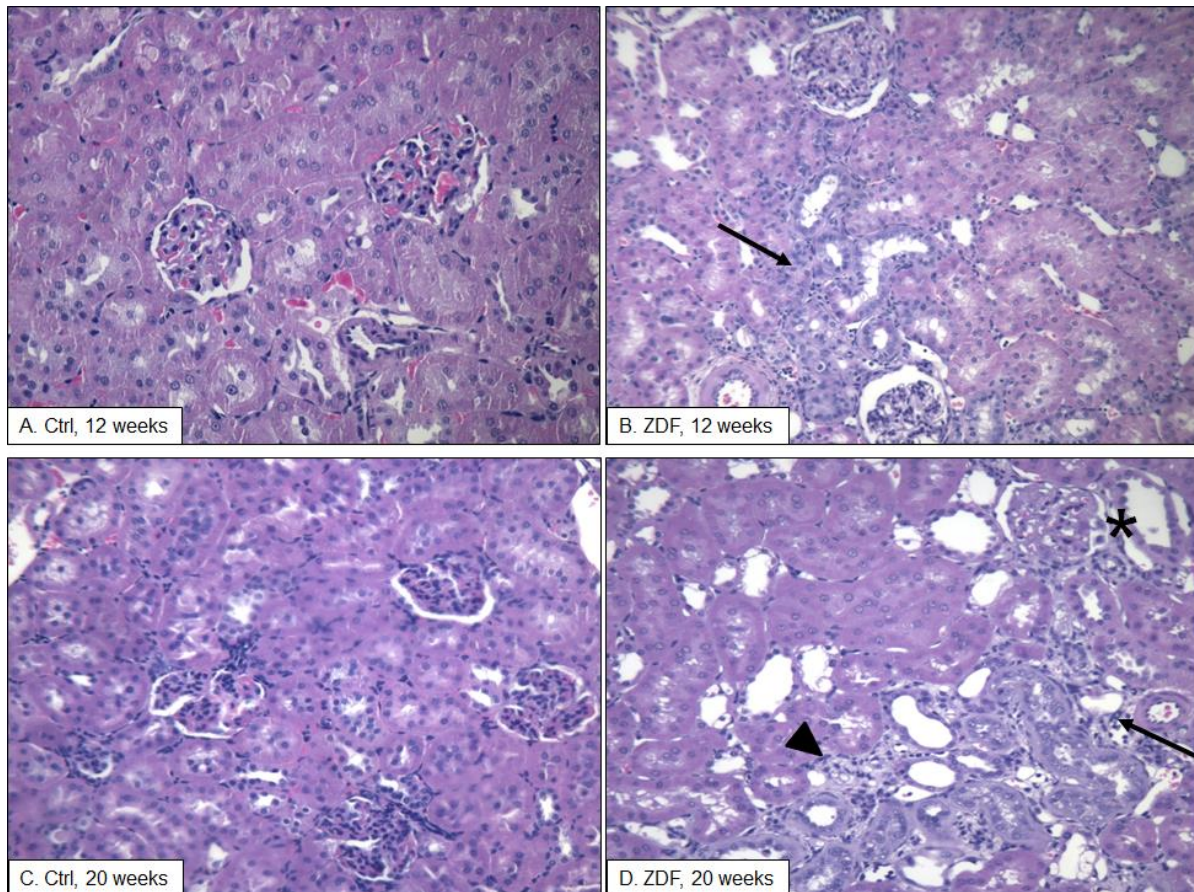
t-test Ctrl vs ZDF: \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

La figura 28 riporta il *time course* delle caratteristiche metaboliche valutate, consentendo di visualizzarne le variazioni all'aumentare dell'età dei ratti e quindi al progredire della DN. Come atteso, durante la fase di insorgenza del diabete, a 6 settimane di vita, i ratti ZDF mostrano livelli di glucosio comparabili rispetto ai ratti controllo, mentre a 12 e 20 settimane manifestano iperglicemia, così come si assiste ad un significativo aumento della proteinuria e della diuresi nei ratti ZDF. Anche il loro peso corporeo risulta essere significativamente incrementato rispetto ai ratti controllo a 6 e 12 settimane, mentre a 20 settimane esso non aumenta ulteriormente, e risulta anzi inferiore a quello dei ratti controllo: questo si verifica molto probabilmente a seguito di una fase molto avanzata della DN e della conseguente compromissione dello stato metabolico generale a cui gli animali diabetici vanno incontro. Anche il rapporto tra il peso del rene e il peso corporeo è maggiore nei ratti ZDF a 12 e 20 settimane.



**Figura 28:** time course delle caratteristiche metaboliche valutate nel modello sperimentale all'aumentare dell'età dei ratti. **a)** glicemia (mg/dl), **b)** proteinuria (mg/24h), **c)** diuresi (mg/24h), **d)** peso corporeo (g). t-test Ctrl vs ZDF: \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Questi risultati dimostrano che l'utilizzo di un appropriato modello animale e di un corretto e tempisticamente mirato protocollo di raccolta delle urine consentono di fornire un'adeguata rappresentazione della progressione naturale della DN come avviene anche nell'uomo, in assenza di qualsiasi approccio terapeutico.



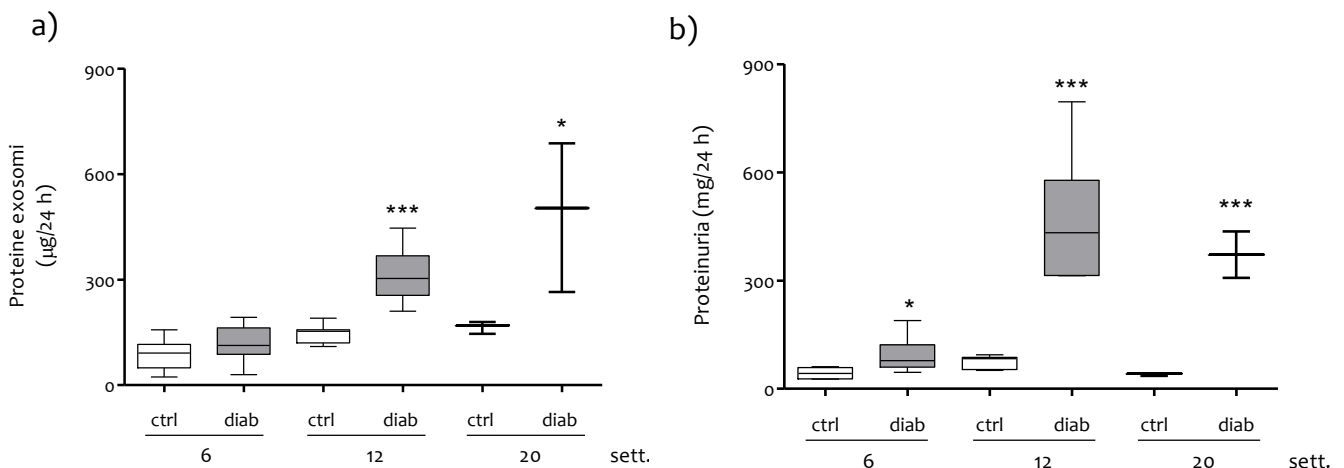
**Figura 29:** microfotografie rappresentative delle sezioni renali di ratti ZDF e corrispondenti controlli (colorazione con ematosillina-eosina). (↑) cellule infiammatorie mononucleari interstiziali, tubuli dilatati e tubuli con epitelio degenerate; (▶) fibrosi focale associata ad atrofia tubulare; (\*) ispessimento della membrana basale glomerulare ed incremento della matrice del mesangio.

In collaborazione con il gruppo di clinica nefrologica dell'ospedale San Gerardo di Monza è stata eseguita l'analisi istopatologica delle sezioni renali dei ratti ZDF e dei corrispondenti ratti controllo dopo il sacrificio a 12 e 20 settimane (colorazione con ematosillina-eosina, fig.29). Rispetto ai ratti controllo (fig. 29A e 29C), le sezioni renali dei ratti ZDF a 12 e a 20 settimane evidenziano la presenza di cellule infiammatorie mononucleate interstiziali, tubuli renali dilatati e tubuli renali con epitelio degenerato (fig. 29B e fig. 29D). I ratti ZDF a 20 settimane mostrano inoltre fibrosi focale associata ad atrofia tubulare, ispessimento della membrana basale glomerulare ed un incremento della matrice mesangiale, modificazioni morfologiche tipiche di una condizione di DN avanzata (fig. 29D).

#### 4.1.2. Caratterizzazione degli exosomi urinari

Dalle urine delle 24 ore di ratti ZDF e controlli sono stati quindi isolati gli exosomi mediante ultracentrifugazione, il protocollo più frequentemente utilizzato in letteratura [Pisitkun T *et al.*, 2004]. Abbiamo innanzitutto misurato il contenuto proteico degli exosomi urinari così

purificati (fig. 30a). Risulta evidente che, in tutte le condizioni, la quantità delle proteine associate alle vescicole è trascurabile (0,1-0,4%) rispetto alla quantità totale delle proteine urinarie, (proteinuria, fig. 30b); infatti la quantità delle proteine vescicolari risulta essere nell'ordine delle centinaia di  $\mu\text{g}$ , mentre la proteinuria è nell'ordine delle centinaia di  $\text{mg}$  (fig. 30). Questo contribuisce a confermare che il proteoma vescicolare è estremamente compartimentalizzato rispetto a quello urinario globale, con la possibilità di focalizzare quindi l'attenzione su proteine renali normalmente poco abbondanti nelle urine stesse. Il contenuto proteico vescicolare rispecchia le eventuali differenze a livello di tessuto renale, dalle cui cellule derivano gli exosomi urinari, senza essere influenzato dalle differenze associate al filtrato glomerulare: per questa ragione essi potrebbero costituire una fonte molto importante per l'ulteriore comprensione delle alterazioni che si verificano a carico delle cellule renali in presenza di DN, al fine di contribuire a chiarirne i meccanismi fisiopatologici e di identificare potenziali biomarcatori diagnostici e prognostici. Tuttavia, va sottolineato che una piccola interferenza sulla quantità di proteine vescicolari è dovuta alla massiccia perdita di proteine plasmatiche che si verifica durante la progressione della DN, con l'eventualità che alcune di queste possano aderire in maniera aspecifica alle vescicole stesse, come suggerito infatti dal significativo incremento delle proteine vescicolari nei ratti diabetici, rispetto ai controlli, a 12 e 20 settimane.

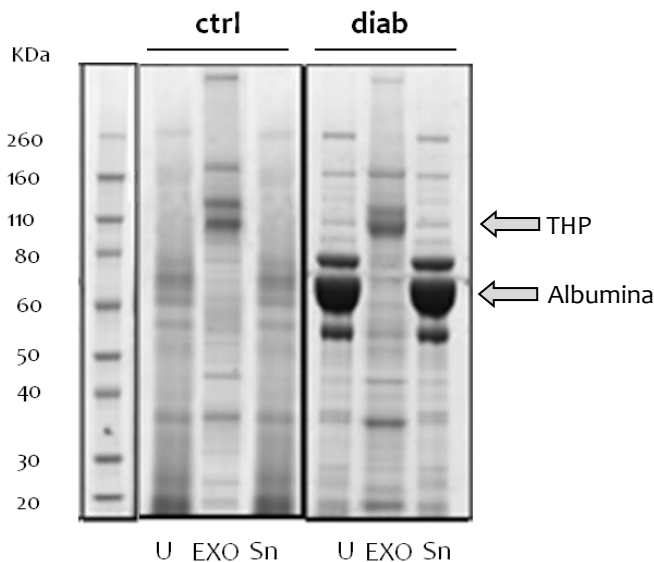


**Figura 30:** a) box plot rappresentante le proteine associate agli exosomi ( $\mu\text{g}/24\text{h}$ ) rispetto alle proteine urinarie totali (b) ( $\text{mg}/24\text{h}$ ) all'aumentare dell'età dei ratti ZDF e controlli. t-test Ctrl vs Diab: \* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Abbiamo quindi caratterizzato i profili proteici globali delle vescicole da noi purificate, mediante elettroforesi monodimensionale (fig. 31). I risultati mostrano che il pattern proteico della componente vescicolare è completamente differente rispetto a quello delle urine di partenza e del surnatante ottenuto dopo ultracentrifugazione, che invece appaiono tra di loro comparabili. In particolare, come atteso, l'albumina costituisce la specie proteica più abbondante nelle urine

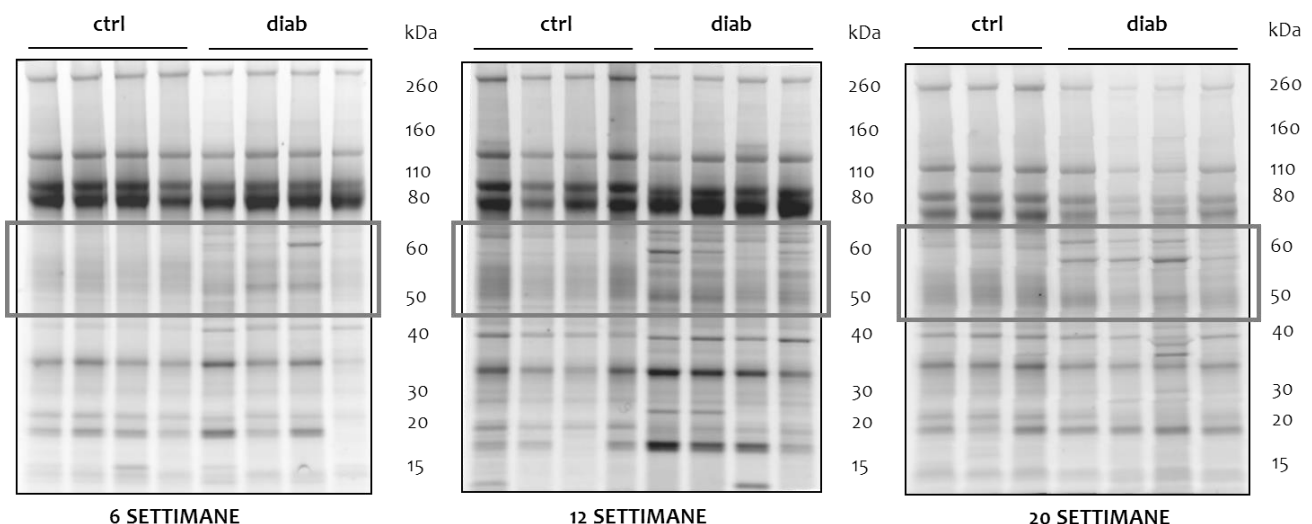


dei ratti diabetici, mentre risulta scarsamente presente nei profili vescicolari, nei quali invece la proteina maggiormente presente è la THP (*Tamm-Horshfall-Protein*) o uromodulina, visualizzabile come una banda di variabile intensità ad un peso molecolare di circa 80-100 kDa.



**Figura 31:** profili proteici delle frazioni vescicolari (EXO), delle urine totali (U) e dei surnatanti degli exosomi (Sn) di ratti ZDF e controlli a 12 settimane (EF monodimensionale e colorazione con CBB).

Queste osservazioni confermano nuovamente che le vescicole isolate dalle urine di ratti diabetici hanno un proteoma specifico e distinto, e suggeriscono che esse possano quindi fornire una migliore rappresentazione dei cambiamenti glomerulari e tubulari tipici della DN rispetto all'intero proteoma urinario.

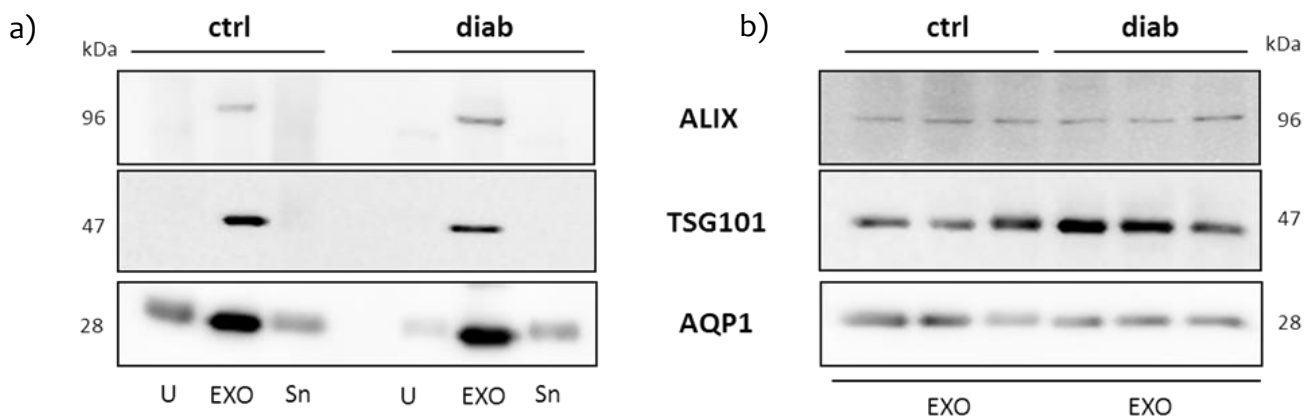


**Figura 32:** profili proteici, analizzati mediante 1-DE e colorazione con CBB, di campioni di exosomi isolati da urine di ratti diabetici e controlli alle tre diverse settimane. I riquadri indicano alcune differenze tra i due gruppi.

Il confronto dei profili proteici globali degli exosomi urinari alle varie età rivela la presenza, soprattutto tra le proteine a peso molecolare intermedio, di alcune differenze nel

pattern proteico degli esosomi isolate dalle urine di ratti ZDF e controlli, visibili soprattutto a 12 e 20 settimane, e che tali differenze risultano riproducibili (fig. 32).

La successiva caratterizzazione biochimica delle vescicole è stata eseguita valutando la presenza di protein identificate ed accettate in letteratura come marcatori esosomiali, quali Alix (*Alg2-interacting protein X*), TSG101 (*tumor susceptibility gene 101*) e AQP1 (*Acquaporin-1*), mediante immunoblotting [Zhou H *et al.*, 2006, Mathivanan S *et al.*, 2010]; in particolare Alix è una proteina associata ai complessi ESCRTs coinvolta nel sorting delle protein all'interno dei MVBs, TSG101 è invece una componente del complesso ESCRT-I che riconosce le proteine ubiquitinate per la loro successiva inclusione nei MVBs. AQP-1 è invece un marcatore specifico degli esosomi urinari in quanto è abbondantemente espressa a livello del tubulo renale prossimale. I risultati mostrano che tali marcatori sono fortemente arricchiti nella frazione vescicolare rispetto alle urine totali ed al surnatante degli esosomi ed in maniera assolutamente riproducibile tra diabetici e controlli (fig. 33 a) e b)); ciò dimostra che il protocollo di ultracentrifugazione da noi adottato è efficace ed è in grado, quindi, di permettere l'isolamento di veri esosomi urinari, con un elevato grado di purezza e riproducibilità.



**Figura 33:** a) EF e IB con anticorpi contro marcatori proteici degli esosomi urinari (ALIX/TSG101/AQP1), nelle frazioni vescicolari (EXO), nelle urine totali (U) e nei surnatanti degli esosomi (Sn) ottenuti dopo ultracentrifugazione, di ratti ZDF e controllo a 12 settimane. b) IB per gli stessi marcatori in campioni di esosomi urinari di 3 diversi ratti diabetici e controlli, sempre a 12 settimane.

#### 4.1.3 Proteomica degli esosomi urinari: identificazione delle proteine mediante LC-MS e quantificazione label-free

Proprio in virtù della succitata differenza nei pattern proteici degli esosomi urinari dei ratti diabetici e controlli, la nostra ricerca è proseguita con l'analisi, mediante spettrometria di massa (MS), dell'intero proteoma degli esosomi stessi, al fine di fornire un serbatoio proteico di partenza per la successiva individuazione e validazione di significative differenze tra diabetici e controlli da proporre come possibili biomarcatori di DN.

E' stato quindi allestito un pool di esosomi urinari a partire dalle urine di 4 ratti diabetici e 3 ratti controllo a 20 settimane, che, in virtù dello stato avanzato della patologia, ci aspettiamo

contenere le maggiori differenze in composizione proteica. Gli exosomi sono stati lisati, sottoposti a digestione diretta con tripsina (gel-free) e quindi analizzati mediante LC-ESI-MS/MS. Per la quantificazione label-free, di ogni proteina identificata è stata misurata la ratio differenziale tra pool diabetico e controllo mediante l'applicazione del software Ideal-Q. Le proteine sono state considerate presenti in quantità significativamente maggiore (*up*) o minore (*down*) negli UE dei ratti ZDF rispetto ai controlli quando la ratio tra pool diabetico e controllo è risultata  $>1,5$  e  $<0,5$ , rispettivamente [Nanni P *et al.*, 2009, Gianazza E *et al.*, 2012]. Nelle tabelle XII, XIII e XIV è riportato, per ogni proteina identificata, lo score ottenuto in Mascot. Questo rappresenta una misura della probabilità assoluta (P) che l'identificazione sia frutto di un evento casuale (un falso positivo); poiché la formula di questo score è  $-10\log_{10}(P)$ , una proteina identificata con uno score alto avrà una bassa probabilità di essere un falso positivo. Sono anche riportate la massa molecolare della proteina (in Dalton), la copertura della sequenza proteica garantita dai peptidi identificati ed il loro numero. La lista include anche proteine identificate con un solo peptide al fine di fornire una migliore copertura del proteoma exosomiale.

**Tabella XII:** Proteine identificate negli exosomi urinari con una ratio (Diabetico/Controllo)  $> 1,50$  (Up)

Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Copertura (%)	Peptidi
$\alpha$ -1-antiproteinase	A1AT_RAT	670,88	46277,59	25,95	10
$\delta$ -1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	AL4A1_RAT	23,96	62285,83	1,41	1
Serum albumin	ALBU_RAT	1858,92	70681,83	53,74	30
Protein AMBP	AMBP_RAT	59,59	39738,31	3,88	1
Glutamyl aminopeptidase	AMPE_RAT	1206,09	108440,15	34,62	27
Apolipoprotein A-I	APOA1_RAT	306,48	30100,23	24,54	6
Apolipoprotein A-IV	APOA4_RAT	506,57	44428,71	23,08	8
Apolipoprotein C-I	APOC1_RAT	32,87	9854,27	10,11	1
Apolipoprotein E	APOE_RAT	162,86	35788,35	13,54	4
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit $\alpha$ -1	AT1A1_RAT	254,78	114293,36	6,93	6
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit $\beta$ -1	AT1B1_RAT	203,34	35578,11	15,79	4
Biliverdin reductase A	BIEA_RAT	242,76	33715,58	15,69	5
BRO1 domain-containing protein BROX	BROX_RAT	23,49	46675,74	4,48	1
Cadherin-related family member 5	CDHR5_RAT	99,41	91261,73	3,02	2
Ceruloplasmin	CERU_RAT	416,04	121562,10	11,58	10
Clathrin heavy chain 1	CLH_RAT	22,89	193187,23	0,51	1
Caseinolytic peptidase B protein homolog	CLPB_RAT	19,16	76054,32	1,30	1
Clusterin	CLUS_RAT	231,40	51969,54	17,37	6
Complement C3	CO3_RAT	1966,36	187824,96	27,30	38
Complement component C9	CO9_RAT	678,51	63495,12	30,50	14
Cofilin-1	COF1_RAT	131,39	18748,75	39,41	4
C-reactive protein	CRP_RAT	72,97	25736,83	9,44	2
Fumarylacetoacetase	FAAA_RAT	219,47	46231,15	12,62	4

Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Copertura (%)	Peptidi
$\alpha$ -2-HS-glycoprotein	FETUA_RAT	428,35	38756,51	28,13	6
Fetuin-B	FETUB_RAT	331,83	42361,26	26,75	8
Fidgetin-like protein 1	FIGL1_RAT	60,56	74891,38	1,76	1
Fibronectin	FINC_RAT	48,57	275990,13	0,52	1
Ferritin light chain 1	FRIL1_RAT	68,87	20792,71	8,47	1
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit $\alpha$ -1	GNAI1_RAT	172,67	40889,45	7,55	3
Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2	GP2_RAT	126,85	60380,75	7,12	3
Glutamate receptor-interacting protein 1	GRIP1_RAT	29,59	121135,65	0,73	1
Histone H2A type 1-C	H2A1C_RAT	58,86	14096,94	7,03	1
Histone H4	H4_RAT	128,45	11360,38	31,07	3
Hemopexin	HEMO_RAT	730,06	52059,56	39,32	16
Heparin cofactor 2	HEP2_RAT	209,01	54744,95	12,47	6
Haptoglobin	HPT_RAT	393,08	39051,73	26,20	9
Histidine-rich glycoprotein	HRG_RAT	481,84	59981,05	19,45	10
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDHC_RAT	59,97	47046,66	5,15	2
Ig gamma-2A chain C region	IGG2A_RAT	301,21	35676,60	14,20	5
Ig gamma-2B chain C region	IGG2B_RAT	181,54	37101,44	16,02	4
Ig gamma-2C chain C region	IGG2C_RAT	21,38	37061,61	2,98	1
Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_RAT	86,44	65190,24	2,03	1
Ig kappa chain C region, B allele	KACB_RAT	120,57	11764,60	28,30	2
Calcium-activated potassium channel subunit $\beta$ -2	KCMB2_RAT	21,30	27705,72	3,19	1
T-kininogen 1	KNT1_RAT	641,40	48828,02	36,79	11
T-kininogen 2	KNT2_RAT	476,89	48756,85	27,09	8
Ig lambda-2 chain C region	LAC2_RAT	61,78	11481,67	26,92	2
LIM and SH3 domain protein 1	LASP1_RAT	18,23	30350,53	2,55	1
mRNA cap guanine-N7 methyltransferase	MCES_RAT	30,45	53353,51	1,65	1
Mitogen-activated protein kinase 3	MK03_RAT	17,35	43395,26	2,03	1
Ecto-ADP-ribosyltransferase 5	NAR5_RAT	29,13	34578,58	2,55	1
Nuclear pore complex protein Nup93	NUP93_RAT	25,03	93756,60	0,94	1
Probasin	PBAS_RAT	198,18	20994,86	20,00	4
Peflin	PEF1_RAT	128,12	30221,31	9,49	2
Xaa-Pro dipeptidase	PEPD_RAT	22,21	55684,28	1,98	1
Pleckstrin	PLEK_RAT	19,92	40312,61	6,56	1
Plasminogen	PLMN_RAT	1010,67	93213,94	36,13	20
Parathyroid hormone	PTHY_RAT	17,77	12770,70	8,62	1
Sodium/nucleoside cotransporter 1	S28A1_RAT	19,50	72095,33	1,37	1
Serum amyloid P-component	SAMP_RAT	235,15	26273,15	16,81	4
Sodium/glucose cotransporter 2	SC5A2_RAT	45,56	73940,23	2,53	1
SMR1 protein	SMR1_RAT	209,04	16017,24	25,52	2
Serine protease inhibitor A3K	SPA3K_RAT	452,31	46760,21	26,82	8
Serine protease inhibitor A3L	SPA3L_RAT	472,73	46419,14	24,94	8
Serine protease inhibitor A3M (Fragment)	SPA3M_RAT	91,70	46180,17	4,77	2
Serine protease inhibitor A3N	SPA3N_RAT	909,78	46793,39	44,71	15

Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Copertura (%)	Peptidi
Sucrase-isomaltase, intestinal	SUIS_RAT	43,43	211470,76	0,62	1
Synaptojanin-2	SYNJ2_RAT	26,90	166414,48	0,46	1
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B	TR11B_RAT	17,51	47587,80	3,24	1
Serotransferrin	TRFE_RAT	1756,69	78512,46	45,30	29
tRNA guanosine-2'-O-methyltransferase TRM11 homolog	TRM11_RAT	21,21	53468,23	1,44	1
Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	TRXR1_RAT	19,99	55150,78	1,60	1
Thioredoxin domain-containing protein 3	TXND3_RAT	24,09	67781,76	1,95	1
Vascular endothelial growth factor receptor 2	VGFR2_RAT	19,32	152179,52	0,58	1
Vitamin D-binding protein	VTDB_RAT	74,95	55105,63	6,00	2
Protein Z-dependent protease inhibitor	ZPI_RAT	25,09	50325,81	2,19	1

**Tabella XII:** proteine identificate negli exosomi urinari con una ratio (Diabetico/Controllo) < 0.50 (Down)

Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Copertura (%)	Peptidi
3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	3HAO_RAT	212,22	32846,36	18,79	5
$\beta$ -1-macroglobulin	A1M_RAT	1704,68	168387,92	32,55	35
Kynurenine/ $\alpha$ -aminoadipate aminotransferase, mitochondrial	AADAT_RAT	491,16	48095,79	25,17	10
Cytoplasmic aconitate hydratase	ACOC_RAT	149,12	98749,59	5,46	4
$\alpha$ -actinin-1	ACTN1_RAT	65,21	103465,79	1,06	1
Aminoacylase-1A	ACY1A_RAT	599,00	46060,20	41,87	15
Aspartoacylase-2	ACY3_RAT	105,54	35795,80	5,85	2
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	AL9A1_RAT	71,36	54530,38	5,25	2
Pancreatic $\alpha$ -amylase	AMYP_RAT	47,68	57825,05	4,19	2
ADP-ribosylation factor 4	ARF4_RAT	60,20	20497,66	11,29	2
Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	ARK73_RAT	393,14	37122,48	17,51	6
Carboxylesterase 3	CES3_RAT	22,09	62392,85	1,59	1
$\beta$ -Ala-His dipeptidase	CNDP1_RAT	43,64	55120,91	3,59	2
Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2_RAT	449,69	53115,76	24,07	9
Coactosin-like protein	COTL1_RAT	120,14	16036,02	21,38	3
Mu-crystallin homolog	CRYM_RAT	18,40	33704,15	5,88	1
N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	DDAH1_RAT	76,38	31805,08	6,92	2
Sorbitol dehydrogenase	DHSO_RAT	49,16	38780,01	2,56	1
Dipeptidyl peptidase 2	DPP2_RAT	31,91	55649,23	1,98	1
Elongation factor 2	EF2_RAT	74,66	96192,24	2,29	2
Pro-epidermal growth factor	EGF_RAT	330,40	127410,34	6,04	7
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3	ENPP3_RAT	427,17	100946,23	14,83	11
Ectonucleotide	ENPP6_RAT	176,35	51010,60	8,64	3

Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Copertura (%)	Peptidi
pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6					
PDZ domain-containing protein GIPC1	GIPC1_RAT	55,68	36224,69	5,17	1
PDZ domain-containing protein GIPC2	GIPC2_RAT	75,71	34351,99	12,18	2
Glutamine synthetase	GLNA_RAT	77,53	42981,58	6,41	2
Guanine nucleotide-binding protein subunit $\alpha$ -11	GNA11_RAT	58,35	42284,66	7,81	2
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit $\alpha$	GNAI3_RAT	193,98	41066,46	10,19	4
Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	GSH0_RAT	270,16	30870,70	23,93	5
Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	GSH1_RAT	1321,69	73371,32	45,43	25
Glutathione synthetase	GSHB_RAT	323,51	52597,02	15,27	7
Glutathione S-transferase P	GSTP1_RAT	215,88	23652,15	38,60	5
Glutathione S-transferase theta-2	GSTT2_RAT	30,21	27592,60	2,80	1
Hemoglobin subunit $\alpha$ -1/2	HBA_RAT	367,05	15489,83	60,71	7
Hemoglobin subunit $\beta$ -1	HBB1_RAT	621,94	16083,29	65,07	9
Hemoglobin subunit $\beta$ -2	HBB2_RAT	387,29	16086,34	43,15	7
Histamine N-methyltransferase	HNMT_RAT	29,23	34262,25	1,93	1
Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	IAH1_RAT	36,76	28385,58	3,88	1
Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	LRP2_RAT	2136,39	537696,60	11,70	48
Meprin A subunit $\beta$	MEP1B_RAT	808,77	80154,77	24,31	12
Major urinary protein	MUP_RAT	319,74	21008,61	36,32	7
Nitrilase homolog 1	NIT1_RAT	26,57	32697,19	5,72	1
Nuclear receptor subfamily 4 group A member 3	NR4A3_RAT	18,83	69717,69	1,26	1
Plastin-3	PLST_RAT	51,33	71148,28	2,17	1
Phosphotriesterase-related protein	PTER_RAT	119,09	39462,17	13,13	3
Quinone oxidoreductase	QOR_RAT	269,84	35295,27	18,75	5
Ras-related protein Rap-1A	RAP1A_RAT	184,85	21315,84	20,73	4
Ras-related protein Rab-11A	RB11A_RAT	117,21	24492,46	14,41	3
Solute carrier family 12 member 3	S12A3_RAT	174,37	111566,65	4,83	4
Solute carrier family 15 member 2	S15A2_RAT	204,54	82008,54	10,20	7
Solute carrier family 22 member 4	S22A4_RAT	25,23	62834,71	1,40	1
Multidrug and toxin extrusion protein 1	S47A1_RAT	63,62	62254,96	2,48	1
Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(o)AT3	S6A18_RAT	221,48	70479,89	6,88	3
Sodium- and chloride-dependent transporter XTRP3	S6A20_RAT	61,31	69724,41	2,53	2
Solute carrier family 7 member 13	S7A13_RAT	58,88	54085,78	2,85	1
Selenium-binding protein 1	SBP1_RAT	43,42	53068,67	2,07	1
Sodium/glucose cotransporter 1	SC5A1_RAT	30,20	73987,26	0,89	1
Sodium/myo-inositol cotransporter 2	SC5AB_RAT	32,54	74241,54	1,63	1
Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	SLC31_RAT	2065,37	78913,06	47,14	35
Solute carrier organic anion transporter family member 1A1	SO1A1_RAT	177,70	75782,22	9,30	5
Solute carrier organic anion transporter family member 1A3	SO1A3_RAT	97,97	75365,02	4,67	3

Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Copertura (%)	Peptidi
Syntaxin-binding protein 2	STXB2_RAT	44,36	67109,87	5,90	2
Tubulin $\alpha$ -1B chain	TBA1B_RAT	58,61	50803,86	3,04	1
Threonine synthase-like 2	THNS2_RAT	19,58	54843,56	2,81	1
Triosephosphate isomerase	TPIS_RAT	252,16	27344,94	23,39	5
Thiopurine S-methyltransferase	TPMT_RAT	76,42	27959,25	12,20	3
Urinary protein 1	UP1_RAT	72,34	11522,55	10,58	1
Urinary protein 2	UP2_RAT	88,68	11630,46	13,33	1

**Tabella XIV:** proteine identificate negli exosomi urinari con una ratio (Diabetico/Controllo) compresa tra 0.50 e 1.50 (Non variate)

Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Copertura (%)	Peptidi
14-3-3 protein $\epsilon$	1433E_RAT	169,13	29326,48	10,90	3
14-3-3 protein $\zeta/\delta$	1433Z_RAT	234,33	27924,81	31,23	6
Cystatin-related protein 2	22P2_RAT	193,52	21455,77	26,15	4
$\alpha$ -1-inhibitor 3	A1I3_RAT	118,75	165038,21	2,53	3
ATP-binding cassette sub-family G member 2	ABCG2_RAT	331,17	73427,10	11,69	6
Abhydrolase domain-containing protein 14B	ABHEB_RAT	82,34	22717,74	9,22	2
Actin, cytoplasmic 1	ACTB_RAT	1097,32	42051,86	57,33	17
Actin, $\alpha$ cardiac muscle 1	ACTC_RAT	669,63	42334,01	31,25	12
Aspartoacylase	ACY2_RAT	28,60	35746,99	2,78	1
Alcohol dehydrogenase [NADP+]	AK1A1_RAT	340,33	36710,99	20,12	7
Fructose-bisphosphate aldolase B	ALDOB_RAT	446,32	40049,39	21,98	8
Cytosol aminopeptidase	AMPL_RAT	43,81	56513,83	3,90	2
Aminopeptidase N	AMPN_RAT	2171,54	109779,02	36,41	29
Angiotensinogen	ANGT_RAT	37,59	52176,99	1,90	1
Annexin A3	ANXA3_RAT	52,53	36568,67	2,71	1
Annexin A4	ANXA4_RAT	388,97	36168,16	23,78	6
Annexin A5	ANXA5_RAT	124,36	35779,32	5,54	2
Annexin A6	ANXA6_RAT	281,13	76105,63	9,99	6
Aquaporin-1	AQP1_RAT	152,58	29066,37	27,27	4
ADP-ribosylation factor 1	ARF1_RAT	57,60	20740,69	15,43	2
Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	ARK72_RAT	96,43	41105,46	6,97	2
Argininosuccinate synthase	ASSY_RAT	116,86	46752,01	11,06	4
Autophagy-related protein 101	ATGA1_RAT	20,59	25284,87	3,06	1
Brain acid soluble protein 1	BASP1_RAT	45,49	21777,44	7,11	1
Carbonic anhydrase 2	CAH2_RAT	126,02	29266,66	13,16	3
Calbindin	CALB1_RAT	189,47	30203,14	19,71	4
Calmodulin	CALM_RAT	78,05	16826,83	11,18	1
Uncharacterized protein C4orf51 homolog	CD051_RAT	23,14	23722,93	4,65	1

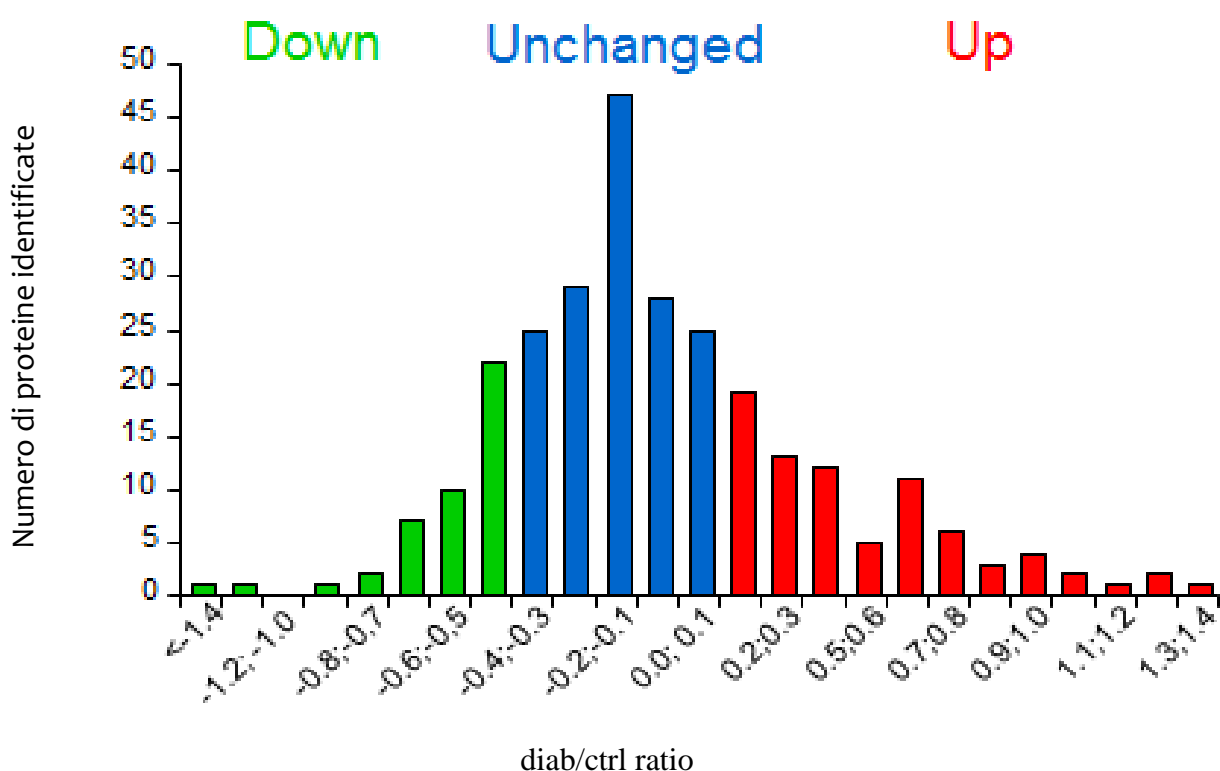
Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Copertura (%)	Peptidi
Leukocyte surface antigen CD47	CD47_RAT	20,74	33486,98	2,63	1
CD59 glycoprotein	CD59_RAT	168,61	14465,24	22,14	3
CD63 antigen	CD63_RAT	28,24	26536,56	7,47	1
CD9 antigen	CD9_RAT	34,05	25768,09	4,27	1
Cell division control protein 42 homolog	CDC42_RAT	202,01	21587,15	26,02	4
Cystathionine gamma-lyase	CGL_RAT	399,06	44261,53	28,36	9
Ester hydrolase C11orf54 homolog	CK054_RAT	162,59	35426,60	18,01	4
Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1_RAT	336,08	27305,89	29,84	7
Chloride intracellular channel protein 4	CLIC4_RAT	206,10	28842,79	14,50	3
Complement C4	CO4_RAT	149,58	193638,91	4,60	5
Catechol O-methyltransferase	COMT_RAT	21,02	29806,36	8,52	1
Copine-9	CPNE9_RAT	50,23	62228,19	1,59	1
Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform	CPT1B_RAT	14,91	89128,59	2,10	1
$\lambda$ -crystallin homolog	CRYL1_RAT	24,24	35717,15	2,16	1
Choline transporter-like protein 4	CTL4_RAT	197,47	80224,80	5,62	3
Destrin	DEST_RAT	43,58	18806,65	16,47	2
Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)	DHAK_RAT	84,37	59691,39	6,83	3
Dihydropteridine reductase	DHPR_RAT	24,82	25763,97	4,70	1
Deoxyribonuclease-1	DNAS1_RAT	45,20	32272,26	3,07	1
D-dopachrome decarboxylase	DOPD_RAT	28,10	13238,88	6,67	1
Dipeptidyl peptidase 4	DPP4_RAT	1646,39	88773,85	30,11	25
Elongation factor 1- $\alpha$ 1	EF1A1_RAT	407,95	50424,23	24,24	9
EH domain-containing protein 1	EHD1_RAT	245,97	60621,65	12,16	5
$\alpha$ -enolase	ENOA_RAT	292,92	47440,37	20,88	7
S-formylglutathione hydrolase	ESTD_RAT	35,06	31970,60	9,31	2
Ezrin	EZRI_RAT	1100,35	69461,68	36,93	23
Protein FAM151A	F151A_RAT	65,82	67543,70	1,63	1
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	F16P1_RAT	78,38	40040,30	15,66	3
Ferritin heavy chain	FRIH_RAT	31,70	21284,38	3,63	1
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_RAT	458,20	36090,27	32,32	7
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	G3PT_RAT	117,69	47362,02	5,81	2
Glucose-6-phosphate isomerase	G6PI_RAT	29,48	62958,19	2,62	1
Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2	GABR2_RAT	29,22	106710,01	1,03	1
Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit $\beta$ -1	GBB1_RAT	196,62	38151,31	12,72	4
Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit $\beta$ -2	GBB2_RAT	299,28	38048,34	22,32	6
Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit $\beta$ -3	GBB3_RAT	62,93	38125,31	2,89	1
Rab GDP dissociation inhibitor $\beta$	GDIB_RAT	304,21	51017,88	18,57	7
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	GDIR1_RAT	82,60	23449,84	19,25	2
Gamma-glutamyltranspeptidase 1	GGT1_RAT	1142,20	61912,83	29,89	15
Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit	GNAS1_RAT	189,32	123836,42	4,53	4



Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Copertura (%)	Peptidi
$\alpha$ isoforms XLas					
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	GPX41_RAT	38,67	22838,07	5,31	1
Glutathione S-transferase $\alpha$ -1	GSTA1_RAT	265,08	25704,59	22,75	6
Glutathione S-transferase $\alpha$ -3	GSTA3_RAT	337,69	25360,33	42,61	8
Glutathione S-transferase $\mu$ -2	GSTM2_RAT	170,42	25857,03	21,28	4
Glutathione S-transferase $\omega$ -1	GSTO1_RAT	91,24	27936,08	7,51	2
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5	GTR5_RAT	86,41	55849,44	4,34	2
Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1_RAT	40,78	13882,14	11,11	1
Hippocalcin-like protein 1	HPCL1_RAT	22,32	22438,05	3,94	1
Heat shock protein HSP 90- $\alpha$	HS90A_RAT	49,49	85160,93	1,55	1
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_RAT	502,53	71055,30	18,29	11
IST1 homolog	IST1_RAT	127,48	40087,67	6,87	3
Integral membrane protein 2B	ITM2B_RAT	37,63	30807,52	3,57	1
Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_RAT	134,69	56698,57	5,05	3
Keratin, type I cytoskeletal 15	K1C15_RAT	124,55	49011,16	5,17	3
Ketohexokinase	KHK_RAT	100,11	33298,74	5,63	1
Kinesin heavy chain isoform 5A	KIF5A_RAT	26,39	117641,73	0,65	1
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	LAMP1_RAT	260,01	44397,34	8,19	4
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_RAT	266,68	36631,11	16,22	5
Meprin A subunit $\alpha$	MEP1A_RAT	1149,50	86209,13	34,36	21
Monoglyceride lipase	MGLL_RAT	146,10	33820,36	11,40	3
Macrophage migration inhibitory factor	MIF_RAT	62,47	12640,23	7,89	1
TRAF3-interacting protein 1	MIPT3_RAT	15,42	74297,16	1,63	1
Meckelin	MKS3_RAT	18,49	113491,75	1,36	1
Moesin	MOES_RAT	1146,30	67867,85	36,36	24
Myosin light polypeptide 6	MYL6_RAT	16,15	17135,21	8,39	1
Myosin-Ic	MYO1C_RAT	189,19	120535,05	5,21	5
Myosin-IId	MYO1D_RAT	119,44	116819,67	2,36	2
Nephrilysin	NEP_RAT	1949,18	86425,17	51,34	32
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	NHRF1_RAT	463,95	39148,70	27,81	7
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3	NHRF3_RAT	1393,21	57164,03	50,87	25
Sodium-dependent phosphate transport protein 2A	NPT2A_RAT	115,66	69346,84	6,83	4
Programmed cell death 6-interacting protein	PDC6I_RAT	434,84	97140,71	11,89	9
Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis	PDILT_RAT	16,86	68508,73	2,89	1
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1_RAT	74,22	20902,43	6,84	1
Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_RAT	43,27	28927,91	5,34	1
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_RAT	99,52	44909,14	8,58	2
Podocalyxin	PODXL_RAT	84,47	52025,87	6,99	2
Lysosomal acid phosphatase	PPAL_RAT	32,51	48744,61	4,51	2
Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	PPBT_RAT	131,43	57965,01	5,70	3

Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Copertura (%)	Peptidi
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_RAT	218,03	18090,89	42,07	6
Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT	307,10	22323,41	28,71	6
Peroxiredoxin-5, mitochondrial	PRDX5_RAT	89,50	22506,70	10,29	2
Peroxiredoxin-6	PRDX6_RAT	182,90	24860,00	20,80	4
Profilin-1	PROF1_RAT	62,85	15118,58	21,90	2
Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein 1	PTTG_RAT	122,06	20685,28	9,04	2
Ras-related protein Rab-7a	RAB7A_RAT	58,72	23773,96	6,48	1
Ras-related protein Rab-8A	RAB8A_RAT	180,93	23824,25	16,67	3
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	RAC1_RAT	239,35	21835,39	22,22	5
Regucalcin	RGN_RAT	239,27	33938,59	16,88	5
Transforming protein RhoA	RHOA_RAT	139,00	22110,22	16,42	3
Peripheral-type benzodiazepine receptor-associated protein 1	RIMB1_RAT	15,50	202474,58	0,92	1
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_RAT	219,20	18281,60	28,31	5
Protein S100-A6	S10A6_RAT	75,59	10085,32	8,79	1
Sulfotransferase 1C2A	S1C2A_RAT	423,83	35178,45	29,78	9
Solute carrier family 23 member 1	S23A1_RAT	222,88	66133,08	9,65	5
Sulfated glycoprotein 1	SAP_RAT	213,39	62908,24	10,86	5
Sodium-dependent multivitamin transporter	SC5A6_RAT	39,52	69508,78	1,74	1
Syntenin-1	SDCB1_RAT	53,69	32630,82	7,77	1
Secretoglobin family 2A member 2	SG2A2_RAT	51,26	11008,43	9,00	1
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC_RAT	129,50	16072,86	17,12	2
Prostatic spermine-binding protein	SPBP_RAT	24,19	31232,44	3,53	1
Sulfotransferase 1C2	ST1C2_RAT	332,42	34961,45	25,55	7
Tubulin $\beta$ -2A chain	TBB2A_RAT	44,25	50274,11	8,75	2
Thioredoxin	THIO_RAT	84,40	12007,79	20,18	2
Prothrombin	THRB_RAT	34,03	71792,22	1,69	1
Collectrin	TMM27_RAT	127,80	25320,09	12,61	2
Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1_RAT	43,29	61750,03	3,74	1
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8	TRPM8_RAT	15,28	129029,54	0,68	1
E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	UBR4_RAT	38,98	580497,98	0,15	1
Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	UFD1_RAT	20,03	34748,39	2,54	1
Ribonuclease UK114	UK114_RAT	387,65	14351,58	60,58	6
Uromodulin	UROM_RAT	1245,41	73751,84	32,54	19
V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	VATB2_RAT	48,18	56856,98	6,01	2
V-type proton ATPase subunit E 1	VATE1_RAT	54,61	26168,86	5,91	1
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1_RAT	93,67	30850,62	11,07	2

In seguito all'analisi MS sono stati identificati 3400 e 4000 peptidi, rispettivamente, nei pool di exosomi urinari dei ratti diabetici e controlli. Tali peptidi appartengono, globalmente, a 286 specie proteiche: tra queste, il contenuto di 76 proteine (il 26,6%) è risultato significativamente aumentato (*up*, ratio >1,5) nel pool diabetico rispetto al controllo, mentre 68 proteine (il 23,8%) sono risultate presenti in quantità significativamente ridotta (*down*, ratio <0,5); il contenuto della maggior parte delle proteine identificate (n=142, il 49,8%) risulta invece invariato nei due pool (*unchanged*, 0,5 < ratio < 1,5). Questo è un risultato atteso, in quanto una buona parte delle specie proteiche presenti negli exosomi urinari è necessaria per il corretto mantenimento della loro struttura.

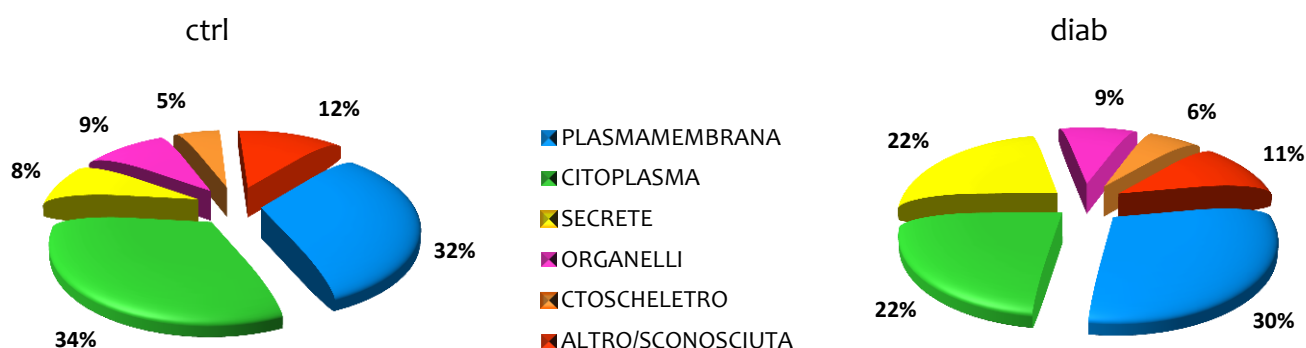


**Figura 34:** distribuzione delle proteine identificate per intervalli di “ratio”, suddivise in down-regolate, unchanged (non variate) e up-regolate.

#### 4.1.4 Analisi bioinformatica

Di ogni proteina sono state successivamente ricercate la localizzazione subcellulare e la funzione mediante il database UniProtKB di ExPASy. I risultati dimostrano che la maggior parte delle proteine identificate (66% nel pool ctrl e 52% nel pool diabetico) sono citoplasmatiche o associate alla membrana plasmatica. L'abbondanza di queste due classi proteiche è pienamente

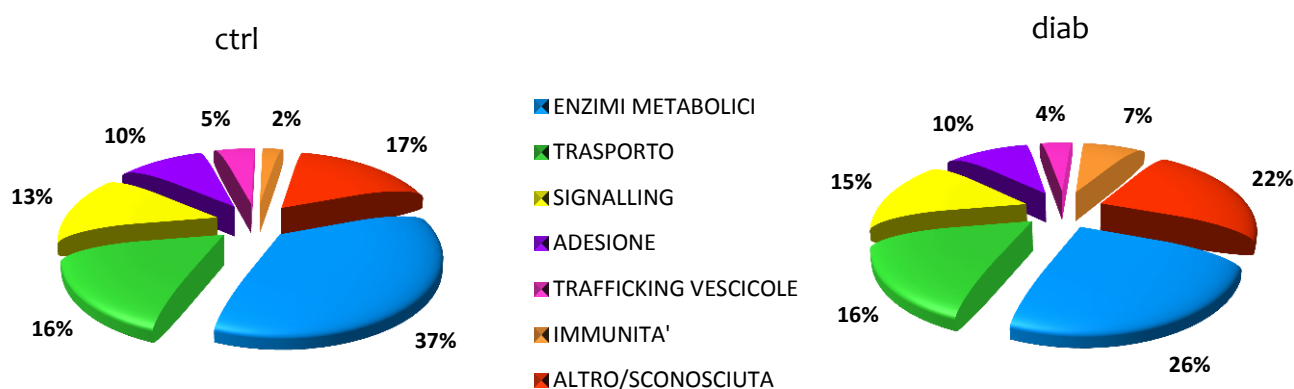
giustificata dalle caratteristiche strutturali delle vescicole exosomaliali, delimitate da un doppio strato lipidico [Raimondo F *et al.*, 2011]. Il 9% delle proteine identificate in entrambi i pool ha sede a livello degli organelli intracellulari, in particolar modo a livello di mitocondri e lisosomi, mentre una più piccola percentuale di proteine fa parte del citoscheletro (5% nel pool ctrl e 6% nel pool diabetico). Negli exosomi urinari dei ratti ZDF si riscontra una elevata percentuale di proteine normalmente secrete (22%) che risulta invece decisamente più ridotta negli exosomi dei ratti controllo (8%); questa diversità può dipendere dal fatto che alcune proteine filtrate attraverso il glomerulo danneggiato, tipico di una condizione diabetica, possono rimanere adese o intrappolate in maniera aspecifica negli exosomi (fig. 35).



**Figura 35:** analisi bioinformatica della localizzazione subcellulare delle proteine identificate negli exosomi urinari suddivise tra ratti diabetici e controlli.

Le proteine sono state analizzate anche dal punto di vista funzionale (fig. 36); in entrambi i pool sono state identificate numerose proteine tipiche degli exosomi, tra le quali specie proteiche che mediano il trafficking delle vescicole verso la plasmamembrana (5% nel pool ctrl e 4% nel diabetico), le componenti dei complessi ESCRTs, le annexine e le tetraspanine. L'identificazione di questa classe di proteine era attesa, in quanto strettamente correlate al meccanismo di biogenesi degli exosomi [Hurley JH *et al.*, 2008, Simpson RJ *et al.*, 2009]. Sono state identificate anche altre classi funzionali tra cui: enzimi metabolici (rispettivamente il 37% e il 25%) come la *phosphoglycerate kinase 1*, la *triosephosphate isomerase* e la *glucose-6 phosphate isomerase*, proteine coinvolte nel signalling intracellulare (rispettivamente il 13% e il 15%) come la *Ras-related proteins*, proteine del citoscheletro o implicate nell'adesione cellulare (10% in entrambi i pool) come la *Ezrin* e la *Syntenin-1*, proteine coinvolte nel trasporto di molecole o ioni (16% nei due pool) come la pompa Na/K ATPasi e proteine appartenenti alla famiglia dei trasportatori di sodio, cloro e potassio, espressi tipicamente nelle cellule tubulari renali. La principale differenza per quanto riguarda l'aspetto funzionale concerne la percentuale di proteine implicate nella risposta immunitaria, che nel pool diabetico costituiscono il 7% mentre nel pool controllo

solamente il 2%. Questa diversità potrebbe derivare dall'attivazione del sistema immunitario in presenza di ND, il cui meccanismo patogenetico è contraddistinto da una forte componente infiammatoria [Kanasaki K *et al.*, 2013]. Inoltre, è stato dimostrato che una delle principali funzioni degli esosomi riguarda proprio la regolazione della risposta immunitaria [Chaput N *et al.*, 2010, Record M *et al.*, 2011]. Poiché le proteine immunitarie maggiormente rappresentate nel nostro pool di esosomi urinari sono le catene delle immunoglobuline rilasciate dalle cellule nell'ambiente extracellulare, questo potrebbe anche spiegare l'elevato contenuto di proteine secrete negli esosomi dei ratti diabetici, come precedentemente riportato.



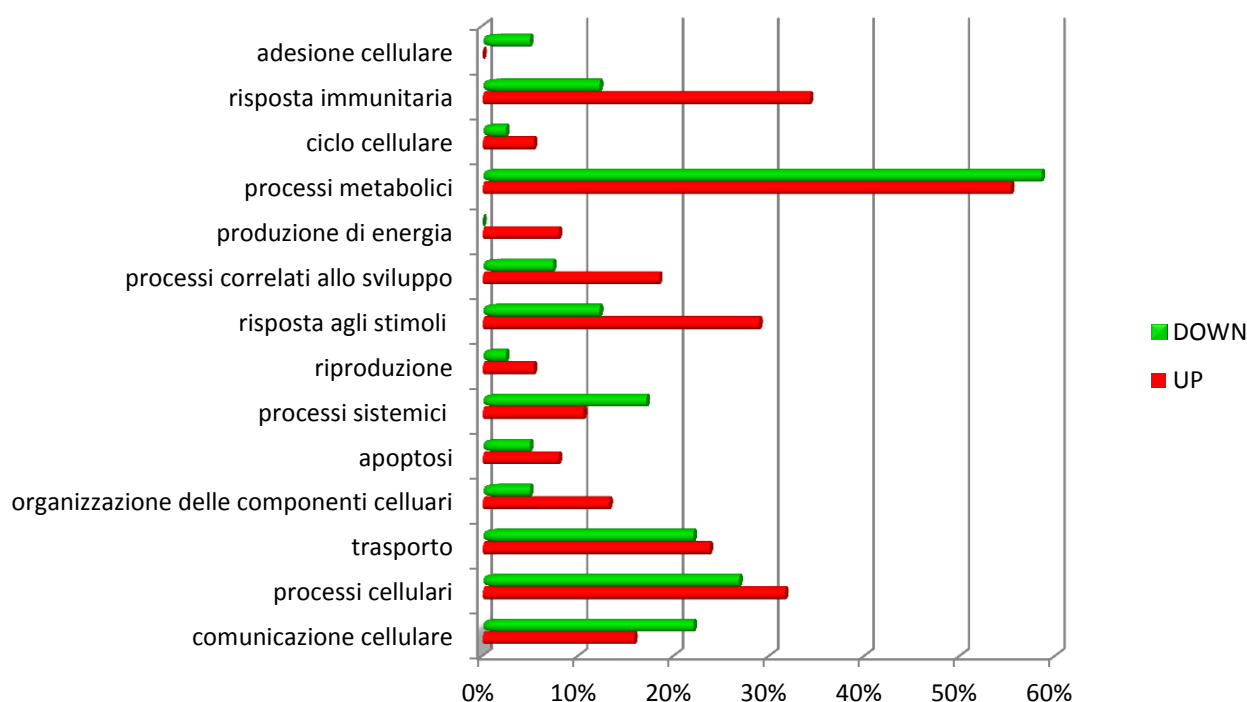
**Figura 36:** analisi bioinformatica della funzione delle proteine identificate negli esosomi urinari suddivise tra ratti diabetici e controlli.

Va comunque considerato che questa suddivisione funzionale tiene conto esclusivamente del numero delle proteine identificate per ciascuna funzione e non prende invece in esame l'abbondanza delle singole proteine coinvolte nello svolgimento della funzione stessa; risulta perciò difficile interpretare le differenze individuate tra ratti ZDF e controlli e fare quindi ipotesi circa un'eventuale funzione degli esosomi rilasciati dalle cellule renali in presenza di DN nel contribuire e/o nel rallentare lo sviluppo e l'evoluzione della nefropatia stessa.

Per un'ulteriore, più elaborata e maggiormente confrontabile rappresentazione delle eventuali differenze nei processi biologici a cui partecipano le proteine *up* e *down*, i dati della quantificazione sono stati analizzati usando Panther (*Protein Analysis THrough Evolutionary Relationship*) (fig. 37).

Le proteine risultate differenziali, soprattutto le *up*-, sono per lo più associate alla risposta cellulare agli stimoli, alla risposta immunitaria ed alla produzione di energia, tutti meccanismi che sono fortemente attivati nelle cellule renali in presenza di una condizione patologica come la ND. Una buona percentuale di proteine *up*- negli esosomi diabetici sono invece strettamente correlate ai cambiamenti morfogenetici che si verificano durante lo sviluppo: l'alta rappresentatività di questo processo biologico potrebbe dipendere dal fenomeno della *epithelial to*

*mesenchymal transition* (EMT), che comporta una reversione del fenotipo delle cellule epiteliali renali a mesenchimali associate ad una forte perdita delle molecole di adesione cellulare [Togawa H *et al.*, 2011], spiegando così anche la differenza di distribuzione delle proteine up- e down-, in tal caso in favore delle seconde, correlate proprio ai meccanismi biologici di adesione cellulare. Questi risultati concorrono a confermare che il pattern proteico degli esosomi urinari riflette le caratteristiche delle cellule epiteliali che li rilasciano in un determinato istante e può quindi costituire un'importante fonte di informazioni sui cambiamenti a cui le cellule renali vanno incontro durante la progression della DN.



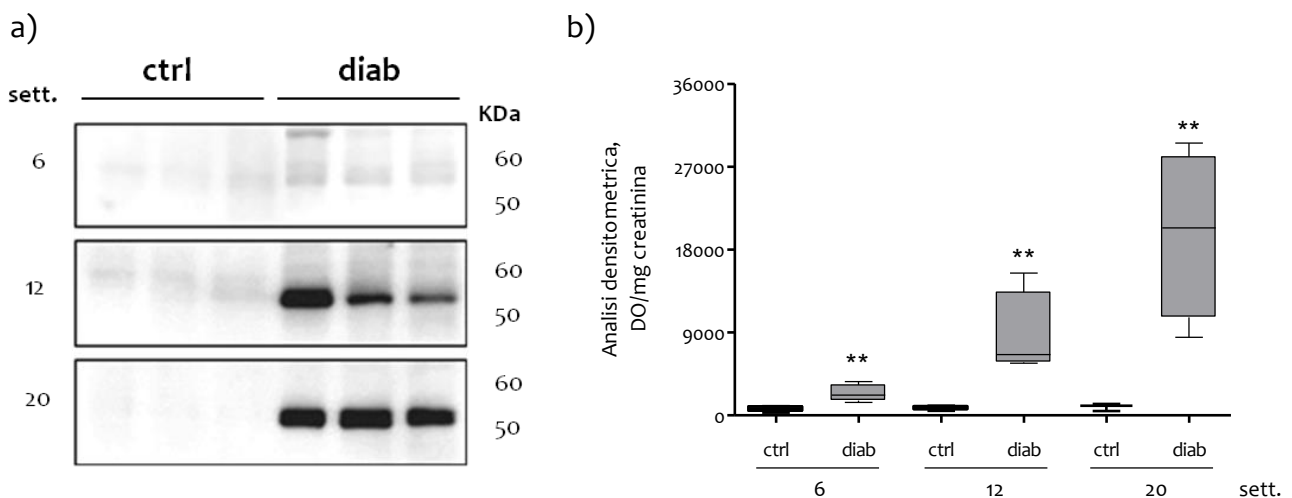
**Figura 37:** istogramma che rappresenta la quantità, in percentuale, di proteine up- e down- regolate identificate negli esosomi urinari associate ai diversi processi biologici (Panther).

#### 4.1.5 Validazione del contenuto differenziale di alcune proteine negli esosomi urinari di ratti diabetici e controlli

Sulla base di un'accurata analisi dei risultati ottenuti mediante la quantificazione label-free e delle informazioni reperite in letteratura, sono state selezionate alcune proteine il cui contenuto differenziale negli esosomi urinari dei ratti diabetici e controlli è stato quindi validato mediante immunoblotting, non solo a 20 settimane come nell'approccio label-free, ma anche a 6 e 12 settimane. L'intensità delle bande è stata quantificata mediante densitometria, dopo normalizzazione rispetto alla quantità di proteine caricate, ed i risultati sono stati visualizzati

sottoforma di box-plot. Le proteine scelte sono la Xaa-Pro-Dipeptidase (PEPD), la neprilisina (CD10) e la Major-Urinary-Protein-1 (MUP1).

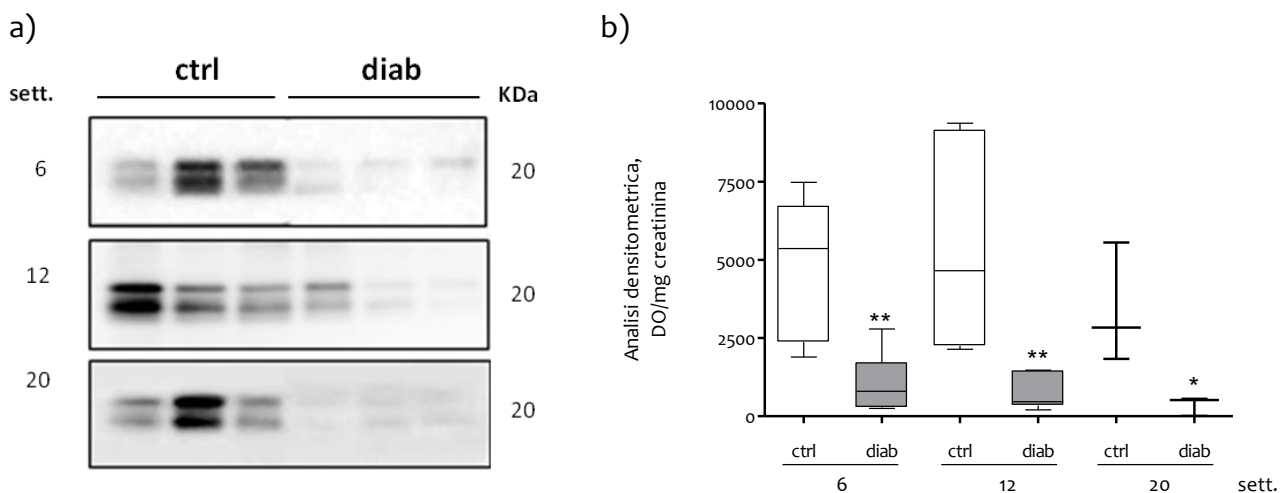
La Xaa-Pro-Dipeptidase (o Prolidase o PEPD) è una proteina del peso molecolare di 54,8 kDa facente parte delle metalloproteasi di matrice, è espressa a livello dei tubuli renali e ha un ruolo chiave nel riciclaggio della prolina per la sintesi del collagene [Nirmalan NJ *et al.*, 2011]. I livelli di questo enzima sono risultati significativamente incrementati negli exosomi dei ratti diabetici rispetto ai controlli; questo risultato è stato replicato e quindi validato mediante IB (fig. 38), dal quale emerge anche che il contenuto di PEPD sembra correlare fortemente con l'avanzamento della DN, essendo progressivamente più elevato all'aumentare dell'età dei ratti ZDF. PEPD potrebbe quindi costituire un promettente marcatore di progressione della patologia. È noto che l'attività di PEPD nel siero risulta fortemente aumentata in pazienti diabetici con neuropatia, rispetto a pazienti diabetici senza neuropatia e ad individui sani di controllo [Uzar E *et al.*, 2012]. Questi dati sono considerati di grande interesse, in quanto l'attività di PEPD, riflettendo il metabolismo del collagene e quindi della matrice extracellulare, potrebbe essere considerata come un promettente marcatore candidato di microangiopatia e di altre modificazioni tissutali che riguardano la matrice stessa, in presenza di diabete.



**Figura 38:** a) validazione, mediante IB, del contenuto differenziale di PEPD negli exosomi urinari di ratti diabetici e controlli. b) Quantificazioni densitometriche delle bande relative a PEPD, normalizzate rispetto alla quantità di proteine caricate (unità arbitrarie). t-test ctrl vs diab: \*\* $p < 0,01$ .

La Major Urinary Protein-1 (MUP-1) è una proteina a basso peso molecolare appartenente alla famiglia delle lipocaline, proteine secrete coinvolte nel legame e nel trasporto di ferormoni o altre molecole idrofobiche a basso peso molecolare [Beynon RJ *et al.*, 2004]. Il contenuto di questa proteina risulta fortemente ridotto negli exosomi urinari dei ratti diabetici rispetto ai controlli alle diverse età, confermando il dato ottenuto dalla quantificazione label-free (fig. 39). Nel ratto, la

proteina MUP-1 è in grado di regolare il metabolismo glucidico e lipidico, anche se il meccanismo di base con cui questo avviene non è noto [Zhou Y *et al.*, 2009]; è stato però suggerito che l'assenza o la ridotta espressione di MUP-1 potrebbe contribuire alla globale alterazione metabolica presente nei topi obesi/diabetici. Sembra inoltre che la MUP-1 sia correlata con la sensibilità all'insulina; ristabilendo, mediante clonaggio genico, la normale espressione di questa proteina in un modello murino di diabete di tipo 2, vengono ridotte la concentrazione di insulina nel sangue ed il contenuto lipidico dei muscoli scheletrici [Hui X *et al.*, 2009]. È stato visto che a seguito della diminuzione dell'espressione di geni importanti coinvolti nella gluconeogenesi e nella lipogenesi, la proteina MUP-1 è in grado di bloccare la gluconeogenesi e la lipogenesi a livello epatico [Hui X *et al.*, 2009; Zhou Y *et al.*, 2009; Giller K *et al.*, 2013]. I risultati da noi ottenuti mediante MS e Western Blotting ci permettono di ipotizzare che una compromissione nella produzione di tale proteina o del suo inserimento negli esosomi si accompagni alla progressione della nefropatia nei ratti ZDF. Nell'uomo non è ancora stata dimostrata l'esistenza di questa proteina anche se è stato osservato che il genoma umano contiene un gene omologo (accession number: XM\_001723632) che dovrebbe codificare per una proteina MUP-1 like (denominate hMUP) avente una sequenza aminoacidica identica al -50% rispetto alla MUP-1 murina; quindi è possibile ipotizzare che anche hMUP possa svolgere una funzione nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico [Zhou Y *et al.*, 2009; Zhou Y *et al.*, 2010; Giller K *et al.*, 2013].

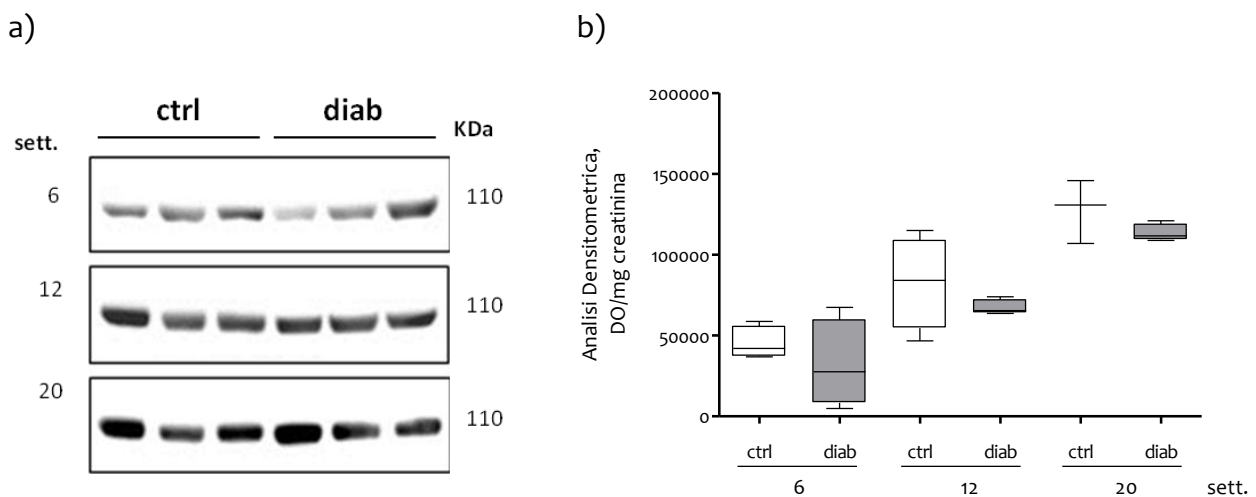


**Figura 39:** a) validazione, mediante IB, del contenuto differenziale di MUP1 negli esosomi urinari di ratti diabetici e controlli. b) quantificazioni densitometriche delle bande relative a MUP1, normalizzate rispetto alla quantità di proteine caricate (unità arbitrarie). t-test ctrl vs diab: \* $P < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ .

Infine, CD10, conosciuta anche come neprilisina o *common acute lymphoblastic lymphoma antigen* (CALLA), è una glicoproteina di membrana del peso molecolare di 100 kDa, già descritta come componente degli esosomi urinari e coinvolta nel taglio e nell'inattivazione di



molti peptidi fisiologicamente attivi [Merchant ML *et al.*, 2010, Conde-Vancells J *et al.*, 2010]. Questa proteina è stata originariamente identificata a livello dei linfoblasti di pazienti con leucemia linfoblastica acuta di tipo pre-B [Ritz J *et al.*, 1980] ed utilizzata, da quel momento, come marcatore di alcune forme di leucemia e linfoma [Ohshmia K *et al.*, 2001]. E' normalmente espressa anche nei tessuti non ematopoietici, in particolare nel polmone e nel rene, dove è presente a livello dei tubuli prossimali e dell'epitelio glomerulare. Proprio a livello renale, si ritiene che CD10 contribuisca ad inattivare peptidi quali la bradichinina, l'angiotensina, la sostanza P [Sahli S *et al.*, 2005]. La quantificazione label-free mostrava che CD10 è presente in quantità statisticamente non differenziale negli exosomi urinari dei ratti ZDF e dei corrispondenti controlli a 20 settimane, e questo risultato viene confermato mediante IB anche a 6 e 12 settimane (fig. 40). In accordo con questo risultato, il contenuto exosomiale di CD10 potrebbe essere usato come standard per la normalizzazione, una sorta cioè di proteina housekeeping, tra due set sperimentali, come confermato in un lavoro di Rood IM *et al.* che suggeriscono CD10 come marcatore specifico degli exosomi [Rood IM *et al.*, 2010].



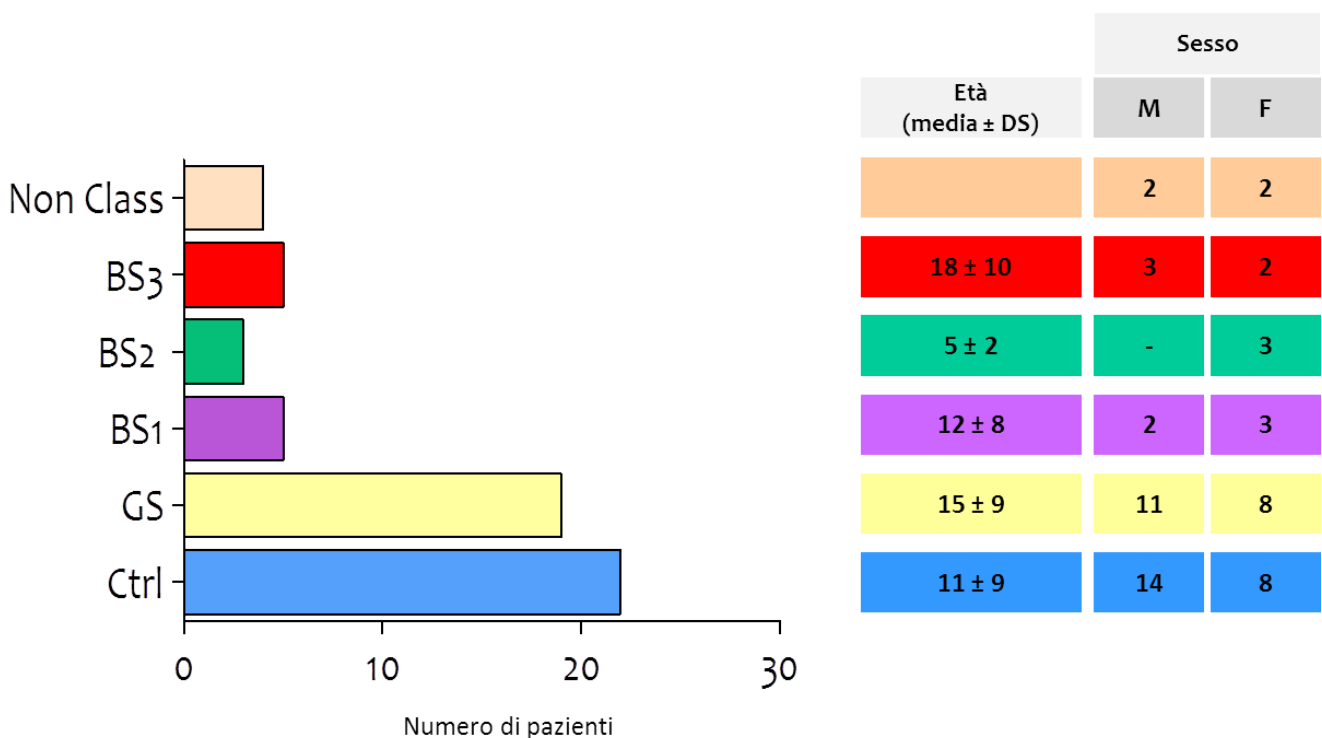
**Figura 40:** a) validazione, mediante IB, del contenuto differenziale di CD10 negli exosomi urinari di ratti diabetici e controlli. b) quantificazioni densitometriche delle bande relative a CD10, normalizzate rispetto alla quantità di proteine caricate (unità arbitrarie).

## 4.2. EXOSOMI URINARI E TUBULOPATIE EREDITARIE

### 4.2.1. Casistica

In collaborazione con il reparto di Pediatria dell'ospedale San Leopoldo Mandic di Merate (LC) abbiamo raccolto e studiato una casistica formata da 36 pazienti, appartenenti a 33 famiglie tra di loro non imparentate, affetti da tubulopatie ereditarie (SLTs): in particolare 19 pazienti affetti da Sindrome di Gitelman (GS), 5 da Bartter1 (B1), 3 da Bartter2 (B2), 5 Bartter3 (B3). Sono stati inclusi nella casistica anche 4 pazienti non classificabili secondo i test genetici attualmente in uso (tab. XV). Tutti i pazienti sono stati confrontati con 22 controlli sani paragonabili per sesso e fascia di età (tab. XVI).

L'età media dei pazienti B1 ( $12 \pm 8$ ) e B2 ( $5 \pm 2$ ), la cui insorgenza è generalmente antenatale o neonatale, risulta minore rispetto a quella dei pazienti GS ( $15 \pm 9$ ) e B3 ( $18 \pm 10$ ), che vengono invece tipicamente diagnosticate nell'adolescente o nel giovane adulto (fig. 41).



**Figura 41:** casistica dei pazienti SLTs e dei soggetti controllo. M = maschi; F = femmine.

**Tabella XV:** casistica dei pazienti SLTs arruolati. Sono riportate età, sesso e mutazioni identificate.

Codice Paziente	Età	Sesso	Gene mutato	Mutazione	Effetto sulla proteina	Tipo di Mutazione
<b>Sindrome di Gitelman</b>						
5GE01^	10	M	SLC12A3	c.[1196_1202dup7bp] c.[1424C>G]	p.[Ser402*] p.[Ser475Cys]	N M
5GF01^	10	M	SLC12A3	c.[1196_1202dup7bp] c.[1424C>G]	p.[Ser402*] p.[Ser475Cys]	N M
5TG03	8	M	SLC12A3	c.[1963C>T] c.[1742T>A]	p.[Arg655Cys] p.[Met581Lys]	M M
6CP95	16	M	SLC12A3	c.[2191G>A] c.[2661-2A>G]	p.[Gly731Arg] p.[Ala887fs]	M F
5NA99	11	M	SLC12A3	c.[1180+1G>T] c.[2883+1G>T]	p.[Gly394fs] p.[His916fs]	F F
5CE94	17	F	SLC12A3	c.[1844C>T] c.[1925G>A]	p.[Ser615Leu] p.[Arg642His]	M M
5CM97	14	M	SLC12A3	c.[2981G>A] c.[2981G>A]	p.[Cys994Tyr] p.[Cys994Tyr]	M M
5SA05^	6	F	SLC12A3	c.[1175C>T] c.[1844C>T]	p.[Thr392Ile] p.[Ser615Leu]	M M
5SB05^	6	F	SLC12A3	c.[1175C>T] c.[1844C>T]	p.[Thr392Ile] p.[Ser615Leu]	M M
5BT06	5	M	SLC12A3	c.[1924C>G] c.[2981G>A]	p.[Arg642Gly] p.[Cys994Tyr]	M M
5PG97	13	F	SLC12A3	c.[283delC] c.[2612G>C]	p.[Gln95fs] p.[Arg871Pro]	F M
5AS72	38	F	SLC12A3	c.[?] c.[1844C>T]	p.[Gly463Glu] p.[Ser615Leu]	M M
5BL94	16	M	SLC12A3	c.[2029G>A] c.[506-?_741+?del]	p.[Val677Met] p.[Val169_Gln2474del]	M LD
5DV85	26	M	SLC12A3	c.[2899A>G] c.[2899A>G]	p.[Arg967Gly] p.[Arg967Gly]	M M
5MR86	25	F	SLC12A3	c.[2560delC]; c.[1180+1G>T]	p.[Leu854fs] p.[Gly394fs]	F F
3BR04	7	M	SLC12A3	c.[2981G>A] c.[506-?_741+?del]	p.[Cys994Tyr] p.[Val169_Gln2474del]	M LD
5RT94	18	M	SLC12A3	c.[238dupCC] c.[2952-?_3090+?del]	p.[Arg80fs] p.[Ile984fs_Gln1030del]	F LD
5BS81	30	F	SLC12A3	c.[1650T>C] c.[=]	p.[Leu542Pro] -	M -
5ML84	27	F	SLC12A3	c.[582G>A] c.[650C>T]	p.[Gly186Asp] p.[Arg209Trp]	M M

Codice Paziente	Età	Sesso	Gene mutato	Mutazione	Effetto sulla proteina	Tipo di Mutazione
<b>Sindrome di Bartter di tipo 1</b>						
1PD90	21	M	SLC12A1	c.[347G>A]	p.[Arg116His]	M
				c.[1954G>A]	p.[Gly652Ser]	M
3GG07	4	M	SLC12A1	c.[730dupG]	p.[Ala244fs]	F
				c.[1432G>A]	p.[Gly478Arg]	M
1TR02	9	M	SLC12A1	c.[551T>A]	p.[Leu184Gln]	M
				c.[611T>C]	p.[Val204Ala]	M
6BA09	5	F	SLC12A1	c.[572T>A]	p.[Ile191Asn]	M
				c.[1493C>T]	p.[Ala498Val]	M
1DS94	18	F	SLC12A1	c.[904delC]	p.[Arg302fs]	F
				c.[1493C>T]	p.[Ala498Val]	M
<b>Sindrome di Bartter di tipo 2</b>						
2GA04^	6	M	KCNJ1	c.[572C>T]	p.[Thr191Ile]	M
				c.[572C>T]	p.[Thr191Ile]	M
2GN03^	7	M	KCNJ1	c.[572C>T]	p.[Thr191Ile]	M
				c.[572C>T]	p.[Thr191Ile]	M
2ED04	3	M	KCNJ1	c.[133A>G]	p.[Lys45Glu]	M
				c.[?]	p.[Glu334fs]	F
<b>Sindrome di Bartter di tipo 3</b>						
3BS07	4	F	CLCNKB	c.[725C>A]	p.[Ala242Glu]	M
				c.[1-?_2064+?del]	p.[0]	LD
3SS82	29	M	CLCNKB	c.[1-?_2064+?del]	p.[0]	LD
				c.[1-?_2064+?del]	p.[0]	LD
3DL91	20	F	CLCNKB	c.[1-?_2064+?del]	p.[0]	LD
				c.[1-?_2064+?del]	p.[0]	LD
3BD82	29	M	CLCNKB	c.[371C>T]	p.[Pro124Leu]	M
				c.[371C>T]	p.[Pro124Leu]	M
5BE99	12	F	CLCNKB	c.[1101G>A]	p.[Trp367*]	N
				c.[1?_2064+?del]	p.[0]	LD
<b>Non classificati</b>						
6GI09	2	M	SLC12A1	c.[=];[=]	p.[=];[=]	-/-
			KCNJ1	c.[=];[=]	p.[=];[=]	-/-
			CLCNKB	c.[=];[=]	p.[=];[=]	-/-
6CM96	15	F	SLC12A1	c.[=];[=]	p.[=];[=]	-/-
			KCNJ1	c.[=];[=]	p.[=];[=]	-/-
			CLCNKB	c.[=];[=]	p.[=];[=]	-/-
2BG03	8	F	SLC12A1	c.[=];[=]	p.[=];[=]	-/-
			KCNJ1	c.[=];[=]	p.[=];[=]	-/-
			CLCNKB	c.[=];[=]	p.[=];[=]	-/-
6CG84	27	M	SLC12A3	c.[=];[=]	p.[=];[=]	-/-
			CLCNKB	c.[=];[=]	p.[=];[=]	-/-

**Note:** il simbolo ^ indica la presenza di gemelli; [=] e (-/-) indicano l'assenza di mutazioni identificate; p[0] indica la produzione di una proteina nulla a causa di grosse delezioni del gene corrispondente. M: mutazione missenso; N: mutazione nonsense (codone di stop prematuro). F: mutazione frameshift. LD: grossa delezione. c.[?]: paziente analizzato precedentemente in un altro laboratorio, i cui dati relativi al cDNA non sono disponibili.

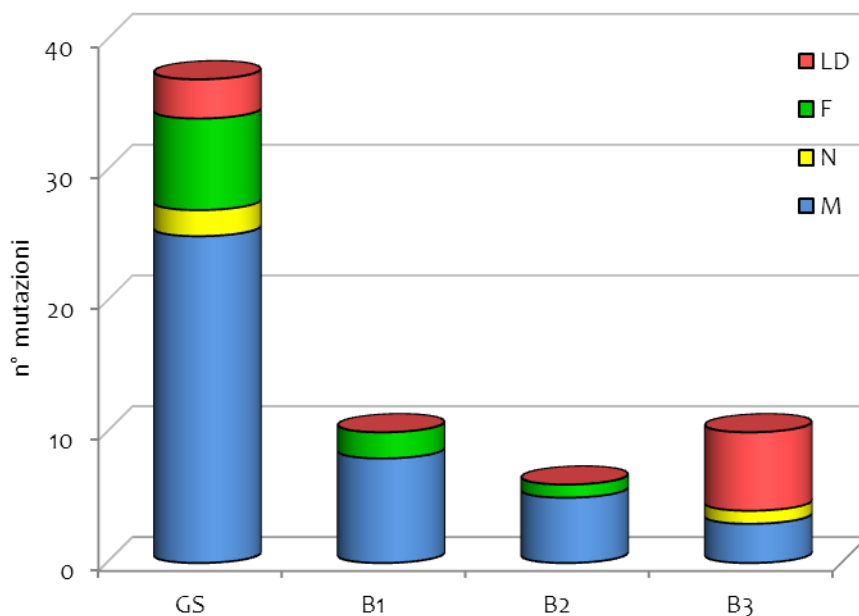
**Tabella XVI:** soggetti controllo arruolati nel nostro studio di età e sesso paragonabili ai pazienti SLTs

<b>Codice Controllo</b>	<b>Età</b>	<b>Sesso</b>
C1	12	F
C2	10	M
C4	9	M
C5	12	M
C6	16	F
C7	13	M
C8	14	M
C9	10	M
C10	18	M
C12	21	F
C13	21	M
C14	4	F
C16	13	M
C17	5	F
C20	5	F
C21	13	M
C22	8	F
C23	4	F
C24	7	M
C25	10	F
C27	26	M
C39	10	M

Il laboratorio di Genetica Medica della fondazione IRCSS Ca' Granda dell'ospedale Policlinico di Milano, centro di riferimento in Italia per le indagini genetiche delle SLTs, ha eseguito l'analisi genetica utilizzando il DNA genomico isolato dalle cellule di sangue periferico, mediante la tecnica MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) per l'identificazione di consistenti delezioni/inserzioni e successivamente tramite sequenziamento genico delle regioni codificanti e dei confini esone-introne dei geni implicati nella patogenesi delle SLTs. In base al sospetto biochimico-clinico del paziente, viene scelto il gene da analizzare per primo; in caso di screening negativo o di mutazioni in eterozigosi anche altri geni pertinenti vengono sequenziati.

La maggioranza delle mutazioni identificate nei geni SLC12A3 (GS), SLC12A1 (B1) e KCNJ1 (B2) dei nostri pazienti risultano essere mutazioni puntiformi, in particolare mutazioni missenso (in omozigosi od in eterozigosi composta), nonsense (che portano alla formazione di un codone di stop prematuro), mutazioni nei siti di splicing o piccole inserzioni/delezioni, mentre la

mutazione più frequente per quanto concerne il gene CLCNKB (B3) è la delezione dell'intero gene, come riportato in letteratura [Konrad M *et al.*, 2000]. L'istogramma (fig.42) riporta il numero delle diverse tipologie di mutazioni presenti nella nostra casistica suddivise per ogni forma di SLTs.

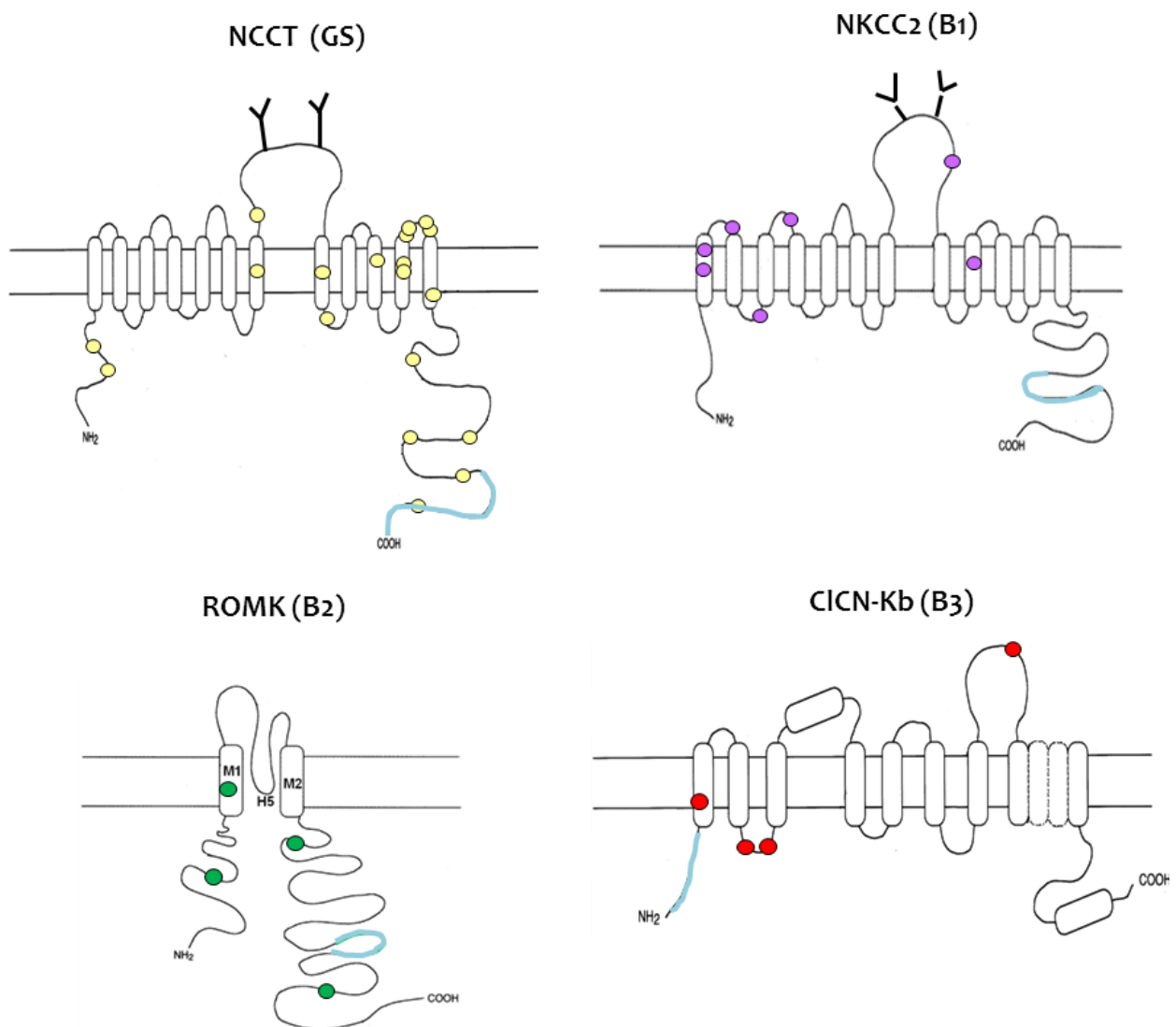


**Figura 42:** tipologia di mutazione per ogni variante di SLTs. Legenda: M = mutazione missenso, N = mutazione nonsense, F = mutazione frameshift, LD = grossa delezione.

La fig. 43 schematizza invece la localizzazione a livello proteico delle mutazioni puntiformi, missenso e nonsense, riportate nei nostri pazienti, rivelando l'assenza di particolari *hot-spot* mutazionali. Per tutti i pazienti SLTs sono state identificate due mutazioni su entrambi gli alleli del gene implicato, siano esse identiche (omozigoti) o distinte (eterozigoti composti); nel gruppo GS è stato incluso un paziente, 5BS81, per il quale è stata identificata una singola mutazione in eterozigosi nel gene SLC12A3. Per quattro pazienti (non classificabili), diagnosticati come SLTs sulla base delle caratteristiche biochimico-cliniche, non è stata invece riscontrata alcuna mutazione nei diversi geni oggetto di screening.

Tutte le mutazioni identificate sono state considerate mutazioni di tipo *loss-of-function*. Nel dettaglio, tra le 57 varianti alleliche identificate nelle 33 famiglie arruolate nel nostro studio, 21 risultano essere mutazioni nonsense, frameshift, sui siti di splicing o grosse delezioni, che determinano la formazione di proteine tronche. Le restanti 36 sono mutazioni missenso in parte già descritte precedentemente. Alcune sono state studiate funzionalmente in qualità di mutazioni inattivanti che impediscono il corretto *folding* della proteina, determinandone una precoce degradazione oppure impedendone la corretta localizzazione in membrana, o, qualora il trasportatore riesca a posizionarsi correttamente a livello della plasmamembrana, riducendone

fortemente l'attività [Mastroianni N *et al.*, 1996; Simon DB *et al.*, 1996; Lemmink HH *et al.*, 1998; Vargas-Poussou R *et al.*, 1998; Melander O *et al.*, 2000; Cruz DN *et al.*, 2001; Syren ML *et al.*, 2002; Coto E *et al.*, 2004; Riancho JA *et al.*, 2006; Riveira-Munoz E *et al.*, 2007; Ji W *et al.*, 2008; Coto E *et al.*, 2009; Puricelli E *et al.*, 2010; Syren ML *et al.*, 2011; Vargas-Poussou R *et al.*, 2011; Glaudemans B *et al.*, 2012]. Le restanti mutazioni, non ancora descritte in letteratura, risultano essere nuove varianti che colpiscono residui amminoacidici fortemente conservati tra le specie e nella maggior parte dei casi classificate come dannose o gravi tramite l'applicazione di modelli di previsione *in-silico* (*SIFT software analysis & PolyPhen, Polymorphism Phenotyping 2.0*).



**Figura 43:** struttura schematica dei trasportatori/canali implicati nella patogenesi delle SLTs a livello della plasmamembrana; sono indicati i siti delle mutazioni missenso e nonsense identificate nei pazienti della nostra casistica e le sequenze riconosciute dagli anticorpi da noi utilizzati (in azzurro). NCC, NKCC2 e ROMK sono inseriti a livello della membrana apicale delle cellule epiteliali che si affacciano sul lume urinario, mentre CICN-Kb è localizzato a livello della membrana basolaterale.

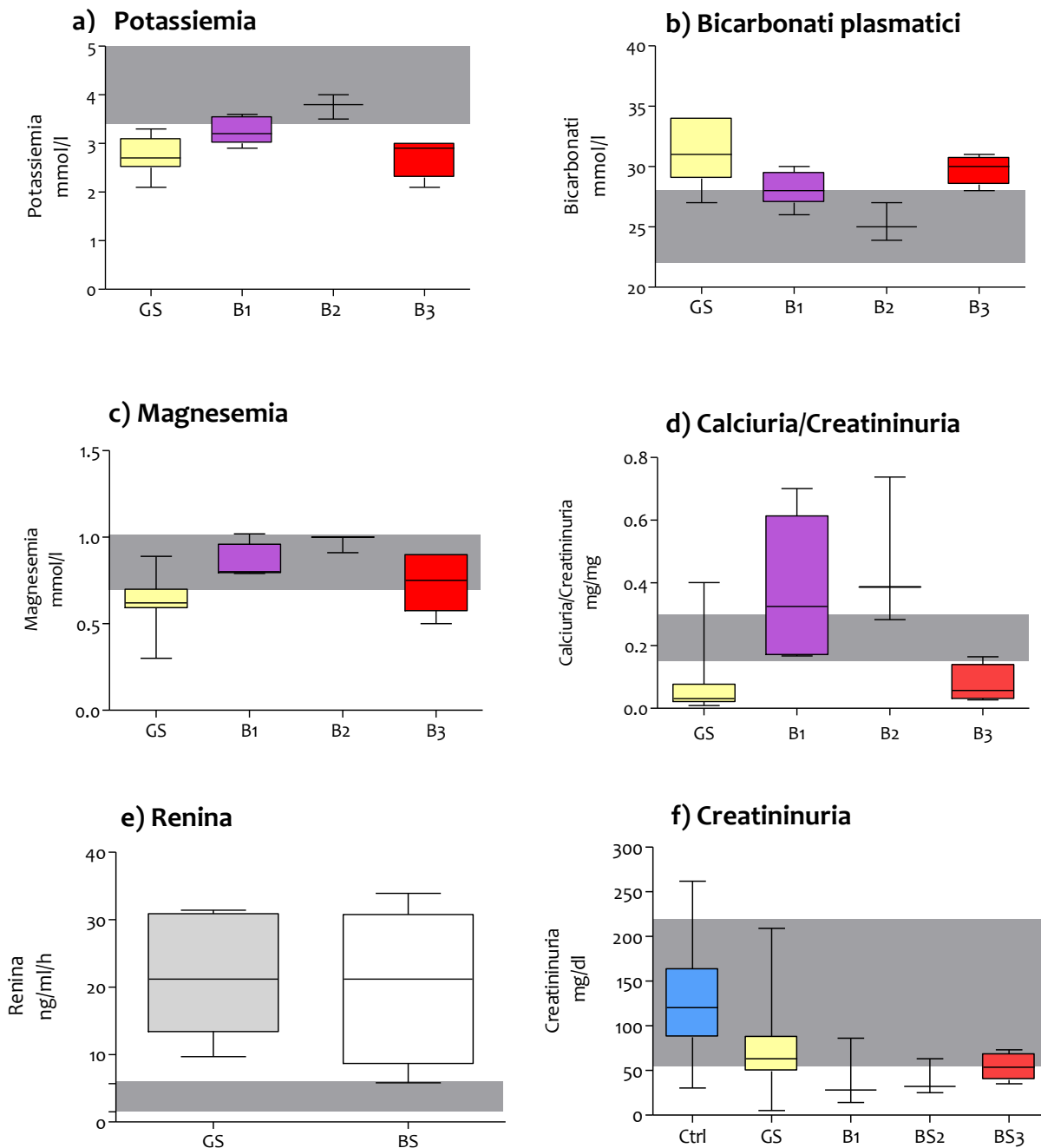
Abbiamo raccolto le seconde urine del mattino di pazienti e controlli ( $\approx 50$  ml), dalle quali abbiamo successivamente isolato gli exosomi. La scelta di utilizzare sempre le seconde urine del mattino è fortemente raccomandata dalle direttive dell'organismo internazionale HKUPP (*Human Kidney Urinary Proteome Project*), in quanto non solo consente una maggior standardizzazione della raccolta del campione, ma permette anche di eliminare le problematiche connesse alla raccolta delle prime urine, quali ad esempio un maggior fenomeno di proteolisi dovuto alla permanenza delle urine per tempi prolungati in vescica e di conseguenza anche una maggior contaminazione da parte di proteine vescicali. In aggiunta, la raccolta delle seconde urine permette una maggior *compliance* di piccoli pazienti, che possono provvedere alla raccolta direttamente in ambulatorio durante la visita di controllo che avviene di norma nella mattinata. L'aggiunta di anti-proteasi a tutti in campioni in qualsiasi fase del trattamento pre-analitico assicura inoltre la corretta conservazione del contenuto proteico.

In collaborazione con il Laboratorio di Biochimica Clinica dell'ospedale San Leopoldo Mandic di Merate, è stata preventivamente eseguita l'analisi chimico-fisica delle urine su un'aliquota prelevata da ogni raccolta, valutando parametri fisici (volume, peso specifico, aspetto, colore, odore) e parametri chimici (pH, proteine, glucosio, corpi chetonici, nitriti, sangue, bilirubina, urobilinogeno). Tutti i pazienti ed i controlli hanno mostrato negatività per quanto concerne proteinuria, glicosuria, chetonuria, leucocituria, urobilinogeno, pigmenti biliari, emoglobinuria e sangue nelle urine eccezion fatta per due pazienti GS che presentano una debole proteinuria ( $<37$  mg/dl, dati non mostrati). Inoltre, sono stati eseguiti dosaggi specifici sui campioni urinari e plasmatici di tutti i pazienti con quantificazione di creatinina urinaria, proteinuria, calciuria, magnesemia, potassiemia, bicarbonati ematici e attività della renina. Utilizzando i dati anagrafici, clinici ed i risultati degli esami di laboratorio ricavati dalle cartelle cliniche dei pazienti, è stato quindi allestito un database interattivo di semplice consultazione che facilita la classificazione dei pazienti e che permette un rapido accesso a tutti i dati da parte del personale sanitario e dei ricercatori.

Come mostrato nella fig. 44, i pazienti affetti da SLTs presentano alterazioni degli esami di laboratorio che attestano la corrispondenza con il fenotipo patologico, in particolare ipopotassiemia ( $K^+$  plasmatico  $<3,4$  mmol/l), alcalosi metabolica (bicarbonati plasmatici  $> 30$  mmol/l) ed iperreninemia (attività reninica plasmatica  $> 5,7$  ng/ml/h). Tuttavia l'iperreninemia riscontrata nei pazienti SLTs è associata a normotensione (dati non mostrati), come riportato in letteratura [Bettinelli A *et al.*, 2008]. Inoltre, nei pazienti GS e B3 sono presenti ipomagnesemia ( $Mg^{2+}$  plasmatico  $< 0,7$  mmol/l) ed ipocalciuria ( $Ca^{2+}$  urinario  $< 1$  mmol/l) mentre i pazienti B1 e B2 sono caratterizzati da ipercalciuria ( $Ca^{2+}$  urinario  $> 12,5$  mmol/l) e normomagnesemia ( $0,7$  mmol/l  $< Mg^{2+}$  plasmatico  $< 1$  mmol/l); il dosaggio del calcio viene di norma eseguito sulle urine delle 24 ore, tuttavia una stima attendibile può essere ottenuta attraverso una misurazione



su un campione di urine estemporaneo, riportando in seguito i valori ottenuti rispetto alla concentrazione di creatinina urinaria.



**Figura 44:** caratteristiche biochimico-cliniche dei pazienti SLTs e dei controlli della nostra casistica. **a)** valori di potassio plasmatico, **b)** bicarbonati plasmatici, **c)** magnesio plasmatico, **d)** calcio urinario rapportato alla creatinina urinaria, **e)** attività della renina plasmatica, **f)** creatinina urinaria. I riquadri in grigio rappresentano i valori dell' intervallo di riferimento per ogni parametro misurato.

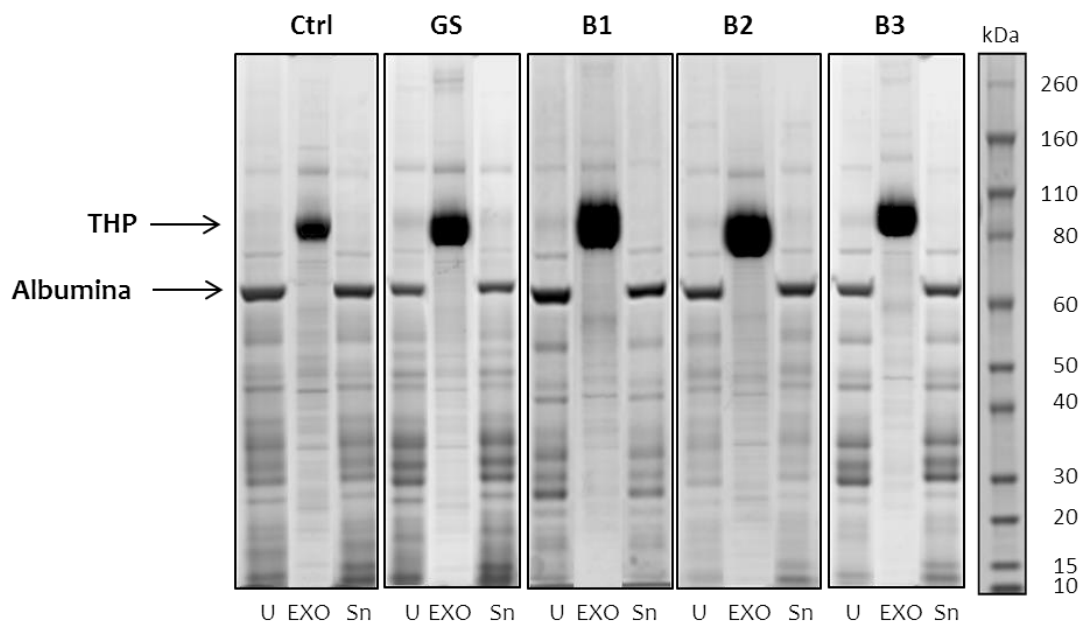
Dal punto di vista diagnostico, tramite la valutazione di magnesemia e calciuria, quindi attraverso la semplice analisi biochimico-clinica, è possibile, nella maggior parte dei casi, effettuare una prima preliminare classificazione dei pazienti con ipopotassiemia ed alcalosi metabolica nelle due categorie B1/B2 o B3/GS [Bettinelli A *et al.*, 1992; Bettinelli A *et al.*, 2004; Viganò SM *et al.*, 2006]. Nessun paziente della nostra casistica è stato sottoposto a test diagnostici mediante l'uso di diuretici (furosemide e tiazidici), in quanto il loro utilizzo estensivo presenta diverse limitazioni pratiche, in particolare per quei pazienti che sono già in terapia con altri farmaci che agiscono sui meccanismi di riassorbimento tubulare [Colussi G *et al.*, 2007].

E' stata inoltre misurata la creatinina urinaria nei pazienti ed anche nei controlli (metodo di Jaffè, Roche, fig. 44f); la concentrazione di creatinina urinaria oscilla fra 5 mg/dl e 209 mg/dl (media 59,3 mg/dl  $\pm$  43,4 mg/dl) nei pazienti e fra 30,4 mg/dl e 261,9 mg/dl (media 124,9 mg/dl  $\pm$  51,3 mg/dl) nei controlli. Il contenuto di creatinina subisce quindi significative variazioni tra un soggetto e l'altro. Nonostante ciò, i valori medi rientrano comunque nell'intervallo di riferimento per la creatinina urinaria (50-220 mg/dl) sia per quanto riguarda i soggetti controllo sia per quanto concerne i pazienti. Infatti, è noto che la creatinina viene filtrata a livello renale in funzione della sua concentrazione plasmatica, che è relativamente costante, e non subisce poi né riassorbimento né secrezione a livello tubulare. La sua concentrazione urinaria, quindi, si modifica sulla base del variabile riassorbimento d'acqua a livello dei segmenti inferiori del nefrone, e ciò è, con buona approssimazione, rappresentativo dello stato di idratazione del soggetto, a patto che la funzione renale sia integra. Assumendo quindi che la concentrazione della creatinina rappresenti una stima del maggiore o minore livello di concentrazione delle urine, riusciamo a spiegare la presenza di valori di creatinuria molto bassi in alcuni dei pazienti, i quali, in dipendenza della loro patologia, sono affetti da poliuria ed emettono urine fortemente diluite (fig. 29 f). Abbiamo quindi deciso di utilizzare questo parametro come ulteriore fattore di normalizzazione dell'intensità delle bande relative alle proteine studiate negli exosomi tramite immunoblotting (IB). L'utilizzo della creatinina urinaria come parametro di normalizzazione è condiviso in letteratura [Moon PG *et al.*, 2011]; tuttavia sono stati proposti metodi alternativi come, ad esempio, la normalizzazione rispetto all'escrezione di uno dei marker exosomiali come ALIX, TSG101 o Flot1 o rispetto alla loro media [Gonzales PA *et al.*, 2008; Dear JW *et al.*, 2013].

#### 4.2.2. Caratterizzazione degli exosomi urinari

##### Studio dei profili proteici

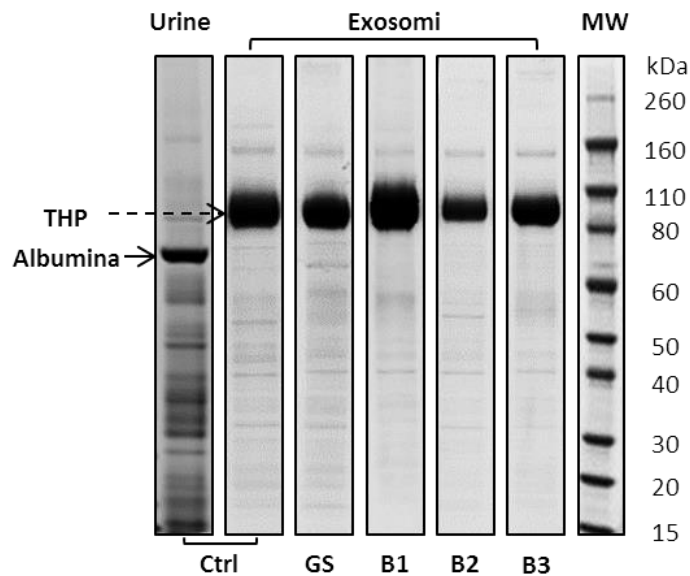
Dalle seconde urine di pazienti e controlli è stata isolata la componente vescicolare tramite ultracentrifugazione (UC); come già riportato precedentemente per quanto riguarda il modello animale utilizzato per lo studio della nefropatia diabetica, anche in questo caso i profili proteici della frazione vescicolare di pazienti SLTs e controlli, analizzati mediante 1DE seguita da colorazione con CBB, risultano notevolmente differenti rispetto ai pattern proteici delle urine di partenza (U) e dei surnatanti ottenuti dopo la separazione delle vescicole stesse (Sn), suggerendone un diverso arricchimento (fig. 45). In particolare, è possibile notare l'impoverimento di proteine plasmatiche, come l'albumina, ed un arricchimento in proteine di origine renale, come la THP, visualizzabile anche in tal caso come la banda di maggiore intensità, ed il cui contenuto presenta forti variazioni inter- ed intraindividuali (fig. 45). I profili delle proteine urinarie e dei surnatanti delle vescicole sia dei soggetti sani di controllo sia dei pazienti SLTs risultano invece molto simili tra di loro.



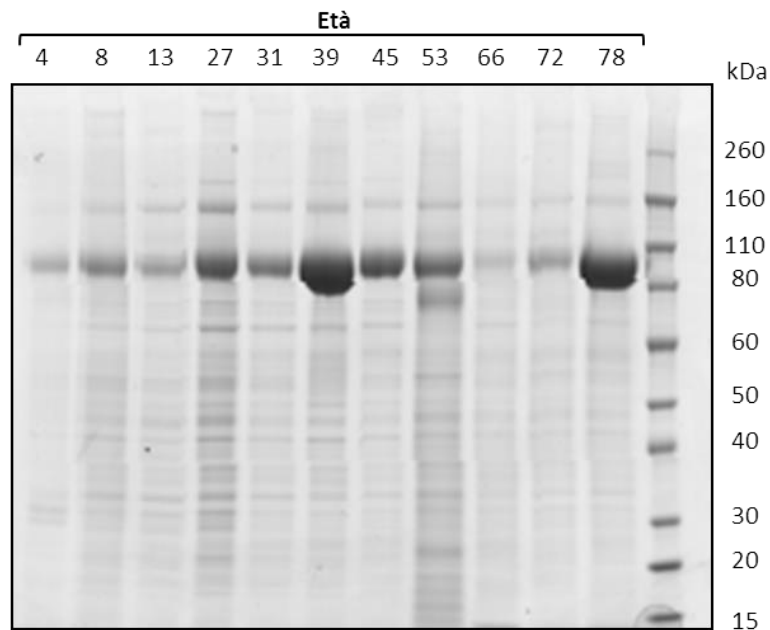
**Figura 45:** confronto tra i profili proteici delle urine (U), delle frazioni vescicolari (EXO) e del surnatante ottenuto dopo l'isolamento delle vescicole (Sn) di un paziente rappresentativo per ogni forma di SLTs e di un soggetto controllo. 1DE e colorazione con CBB.

Confrontando tra loro le composizioni proteiche delle frazioni vescicolari di controlli e dei diversi pazienti SLTs (fig. 46) si riscontrano lievi differenze che suggeriscono una differente composizione proteica; ciò potrebbe riflettere le alterazioni dei meccanismi di secrezione/riassorbimento a livello del tubulo renale che si verificano in presenza delle diverse

sindromi in studio. Questa osservazione rafforza quindi ulteriormente l'ipotesi che negli exosomi stessi possano essere rilevabili alterazioni a livello del proteoma tali da poter essere utilizzate a scopo diagnostico. Tuttavia, malgrado queste piccole diversità tra i diversi gruppi, i pattern vescicolari di controlli e pazienti SLTs risultano globalmente riproducibili e non influenzati dall'età dei pazienti al momento della raccolta delle urine (fig. 47).



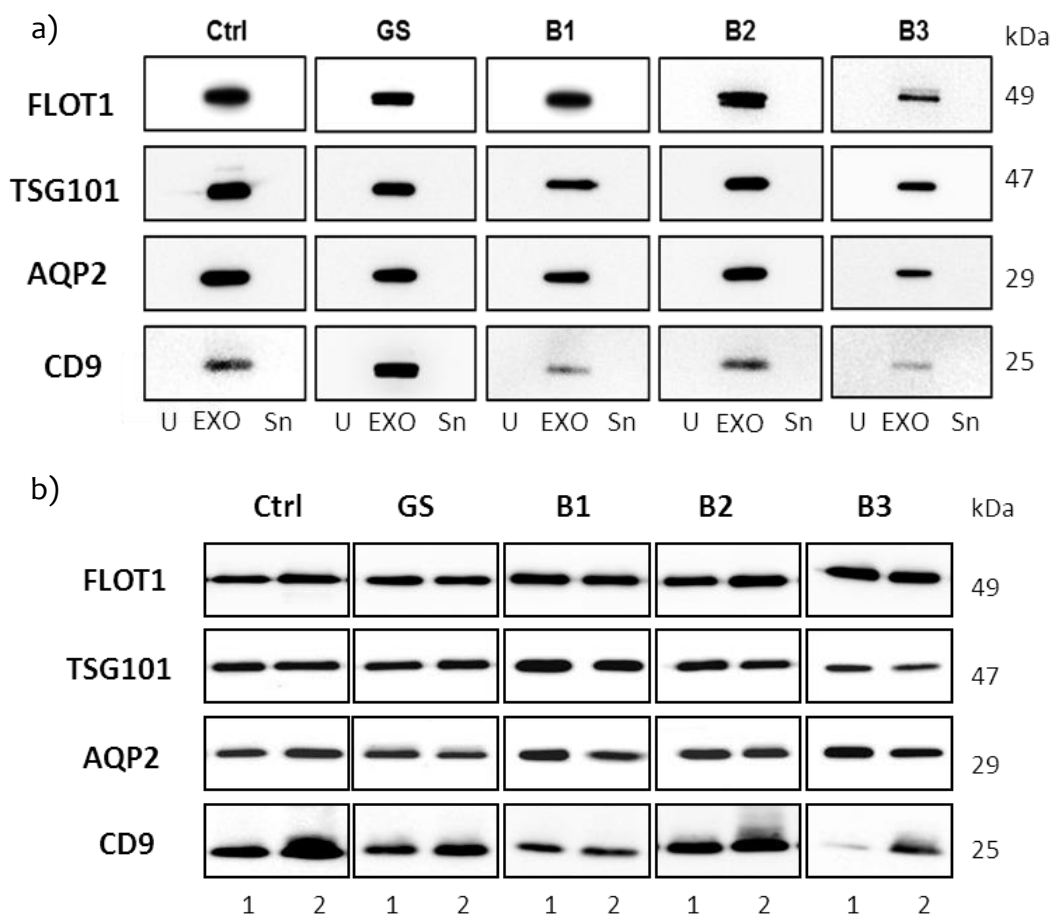
**Figura 46:** profilo proteico delle urine di un soggetto controllo e delle frazioni vescicolari dello stesso e di pazienti SLTs (1 caso rappresentativo per sindrome). 1DE e colorazione con CBB.



**Figura 47:** profilo proteico di UE di soggetti controllo a differenti età. 1DE e colorazione con CBB.

### Caratterizzazione biochimica

Al fine di verificare l'effettiva presenza degli esosomi urinari nel preparato ottenuto mediante UC, presupposto per l'utilizzo di tale materiale biologico come fonte di biomarcatori per le SLTs, ne abbiamo effettuato una caratterizzazione biochimica ricercando nei nostri campioni, tramite EF/IB, la presenza di proteine identificate ed accettate in letteratura in qualità di marcatori degli esosomi, FLOT1, TSG101, CD9 e AQP2 [Zhou H *et al.*, 2006; Dear JW *et al.*, 2013]. FLOT1 è una proteina tipica dei microdomini di membrana (*lipid rafts*) recentemente proposto anche come marcatore degli esosomi in quanto potrebbe essere coinvolta nel loro meccanismo di biogenesi [Okabayashi S *et al.*, 2010]; TSG101, già precedentemente menzionato, è un componente del complesso ESCRT-I mentre CD9 fa parte della superfamiglia delle tetraspanine. FLOT1, TSG101 e CD9 sono considerati marcatori esosomiali ubiquitari. L'aquaporina-2 (AQP2) è invece un canale di membrana dell'acqua specificamente espresso a livello renale, in particolare a livello delle cellule del dotto collettore, e risulta di conseguenza essere un marcatore specifico degli esosomi urinari [Zhou H *et al.*, 2006; Dear JW *et al.*, 2013].



**Figura 48:** IB di noti marcatori esosomiali (FLOT1, TSG101, AQP2, CD9) in campioni di urine (U), esosomi (EXO) e surnatante degli esosomi (Sn) in un soggetto controllo e in paziente rappresentativo per ogni forma di SLTs (a) e in campioni di esosomi urinari di due controlli e due pazienti rappresentativi per ogni forma di SLTs (b).

I risultati dimostrano il forte arricchimento dei quattro marcatori nelle frazioni vescicolari di controlli e pazienti SLTs, rispetto alle urine di partenza (U) ed ai supernatanti ottenuti dopo la separazione delle vescicole (Sn), permettendo di concludere che, anche in tal caso, il protocollo di isolamento adottato è adeguato e ci consente di ottenere una frazione purificata di esosomi (fig. 48a). L'estensione dell'analisi dei marcatori esosomiali alle frazioni vescicolari di tutti i controlli e di tutti i pazienti SLTs della nostra casistica dimostra che il loro grado di purezza risulta comparabile in tutte le preparazioni ottenute, indipendentemente dalle differenze individuali, dimostrando elevata riproducibilità (fig. 48b).

#### **4.2.3. Ricerca dei trasportatori delle SLTs negli esosomi urinari**

Dal momento che le SLTs sono causate da mutazioni nei geni codificanti per specifici trasportatori di membrana delle cellule tubulari renali, ci siamo proposti di indagare la presenza/assenza o l'eventuale contenuto differenziale di tali proteine negli esosomi urinari di pazienti e controlli mediante Western Blotting ed immunodecorazione con anticorpi specifici, al fine di proporre un approccio diagnostico complementare all'analisi genetica, dispendiosa in termini di tempo e denaro.

Il trasportatore NCC è implicato nell'insorgenza della GS mentre il trasportatore NKCC2 è responsabile, se mutato, della B1; entrambi i trasportatori si localizzano a livello delle membrana apicale, ma NCC nelle cellule del DCT e NKCC2 nelle cellule del TAL; i livelli di queste due proteine sono stati valutati negli esosomi isolati dalle urine di tutti i 36 pazienti SLTs e dei 22 controlli sani.

E' già stato riportato in letteratura che l'abbondanza di alcune proteine negli UE, tra le quali NCC e NKCC2, è rappresentativa del loro contenuto a livello renale [Esteva-Font C *et al.*, 2010]. Infatti, è già stato più volte suggerito il possibile ruolo degli UE nella classificazione dei processi patologici che coinvolgono il tubulo renale, tra cui proprio la GS e la BS1 [Pisitkun T *et al.*, 2004; Hoorn EJ *et al.*, 2005; Joo KW *et al.*, 2007; Gonzales PA *et al.*, 2009; Esteva-Font C *et al.*, 2010; van Balkom BW *et al.*, 2011; Isobe K *et al.*, 2013]. Inoltre, recentemente alcuni lavori hanno evidenziato che il contenuto di NCC negli UE non solo riflette la quantità del trasportatore a livello delle cellule del DCT, ma può conferire una stima anche della sua attività biologica *in vivo*, attraverso la valutazione del suo stato di fosforilazione [Esteva-Font C *et al.*, 2010; van der Lubbe N *et al.*, 2012; Isobe K *et al.*, 2013]. Tuttavia, nei lavori precedenti presenti in letteratura la casistica analizzata era solitamente scarsa ed i pazienti non erano accuratamente caratterizzati dal punto di vista biochimico, clinico e genetico, come nel nostro caso.

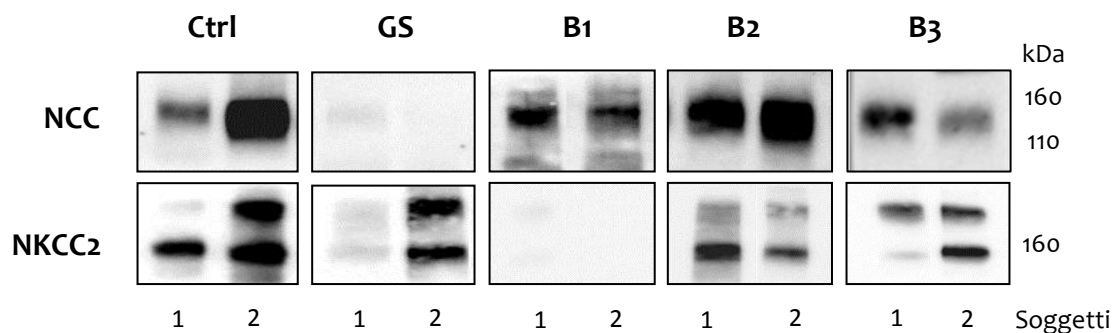
I risultati ottenuti negli esperimenti condotti sulla nostra casistica dimostrano che i segnali relativi ai due trasportatori NCC e NKCC2 risultano ben visibili negli UE di tutti i soggetti controllo, mentre sono pressochè assenti o comunque non rilevabili nelle frazioni urinarie da cui

essi derivano (U e Sn, fig. 49). Il segnale della proteina NKCC2 è presente come una doppia banda, in dipendenza dal processo di N-glicosilazione a cui il trasportatore stesso va incontro a livello dei residui amminoacidici 446 e 456 [Paredes A *et al.*, 2005].



**Figura 49:** IB dei trasportatori NCC e NKCC2 in campioni di urine (U), exosomi (EXO) e surnatante (Sn) di un controllo rappresentativo.

Analizzando gli UE dei pazienti, invece, il segnale relativo a NCC risulta non rilevabile o debolmente presente in tutti i pazienti affetti da GS, mentre appare ben visibile in tutti i soggetti controllo e in tutti i pazienti affetti da altre forme di SLTs. Lo stesso comportamento viene evidenziato per il trasportatore NKCC2, pressoché assente negli UE di tutti i pazienti B1 ma ben riscontrabile invece negli UE dei soggetti controllo e dei pazienti affetti dalle altre SLTs (fig. 50).



**Figura 50:** IB di NCC e NKCC2 in campioni di UE di controlli e pazienti rappresentativi delle varie forme di SLTs.

A differenza del lavoro di Isobe K *et al.*, noi non ci siamo focalizzati sullo studio dello stato di fosforilazione e quindi dell'attività del trasportatore NCC in quanto tutti i pazienti GS presentano segnali di NCC negli UE molto deboli o assenti, ed inoltre non è stata riscontrata alcuna mutazione a livello dei siti di fosforilazione del trasportatore.

Abbiamo successivamente eseguito l'analisi densitometrica delle bande di NCC e NKCC2 negli UE di tutti i pazienti ed i controlli, normalizzate rispetto alla concentrazione della creatinina urinaria (OD/uCr), in relazione alla tipologia di mutazioni identificate ed alla valutazione *in silico* della loro gravità effettuata tramite il software di previsione SIFT (tab. XVII).

**Tabella XVII:** mutazioni dei pazienti SLTs nella nostra casistica e valori densitometrici, normalizzati rispetto alla concentrazione di creatinina urinaria, delle bande di NCC e NKCC2 negli UE di pazienti e controlli.

Codice paziente	Mutazioni a livello proteico	Tipo di mutazione	SIFT	DO/mg creatinina urinaria	
				NCC	NKCC
<b>Gitelman</b>					
5GE01^	p.[Ser402*];[Ser475Cys]	N/M	dam	5	215
5GF01^	p.[Ser402*];[Ser475Cys]	N/M	dam	17	362
5TG03	p.[Arg655Cys];[Met581Lys]	M/M	dam/dam	3	210
6CP95	p.[Gly731Arg];[Ala887fs]	M/F	dam	0	109
5NA99	p.[Gly394fs];[His916fs]	F/F		0	48
5CE94	p.[Ser615Leu];[Arg642fs*2]	M/F	dam	0	5
5CM97	p.[Cys994Tyr];[Cys994Tyr]	M/M	dam/dam	1	116
5SA05^	p.[Thr392Ile];[Ser615Leu]	M/M	tol/dam	48	3
5SB05^	p.[Thr392Ile];[Ser615Leu]	M/M	tol/dam	106	197
5BT06	p.[Arg642Gly];[Cys994Tyr]	M/M	dam/dam	0	152
5PG97	p.[Gln95fs];[Arg871Pro]	F/M	dam	0	56
5AS72	p.[Gly463Glu];[Ser615Leu]	M/M	dam/dam	0	80
5BL94	p[Val677Met]; [Val169_Gln2474del]	M/LD	dam	0	30
5DV85	p.[Arg967Gly];[Arg967Gly]	M/M	dam/dam	0	12
5MR86	p.[Leu854fs];[Gly394fs]	F/F		0	98
3BR04	p.[Cys994Tyr];[Val169_Gln2474del]	M/LD	dam	13	3822
5RT94	p.[Arg80fs]; [Ile984fs_Gln1030del]	F/LD		0	73
5BS81	p.Leu542Pro/-	M/-	dam	61	124
5ML84	p.[Gly186ASP]; [Arg209Trp]	M/M	dam/dam	6	93
<b>Bartter tipo 1</b>					
1PD90	p[Arg116His];[Gly652Ser]	M/M		13	21
3GG07	p.[Ala244fs];[Gly478Arg]	F/M		33	0
1TR02	p.[Leu184Gln];[Val204Ala]	M/M		135	4
6BA09	p.[Ile191Asn];[Ala498Val]	M/M		315	61
1DS94	p.[Arg302fs];[Ala498Val]	F/M		27	0
<b>Bartter Tipo 2</b>					
2GA04^	p.[Thr191Ile];[Thr191Ile]	M/M		2020	237
2GN03^	p.[Thr191Ile];[Thr191Ile]	M/M		547	252
2ED04	p.[Lys45Glu];[Glu334fs]	M/F		81	325
<b>Bartter Tipo 3</b>					
3BS07	p.[Ala242Glu];[0]	M/LD		11	41
3SS82	p.[0];[0]	LD/LD		37	23
3DL91	p.[0];[0]	LD/LD		26	60
3BD82	p.[Pro124Leu];[Pro124Leu]	M/M		6	46
5BE99	p.[Trp367*];[0]	N/LD		66	307
<b>Non class</b>					
6GI07	na	na		131	303
6CM96	na	na		660	105
2BG03	p.[Thr86Ala];[=]	M/-		651	411
6CG84	=/=	-/-		17	196

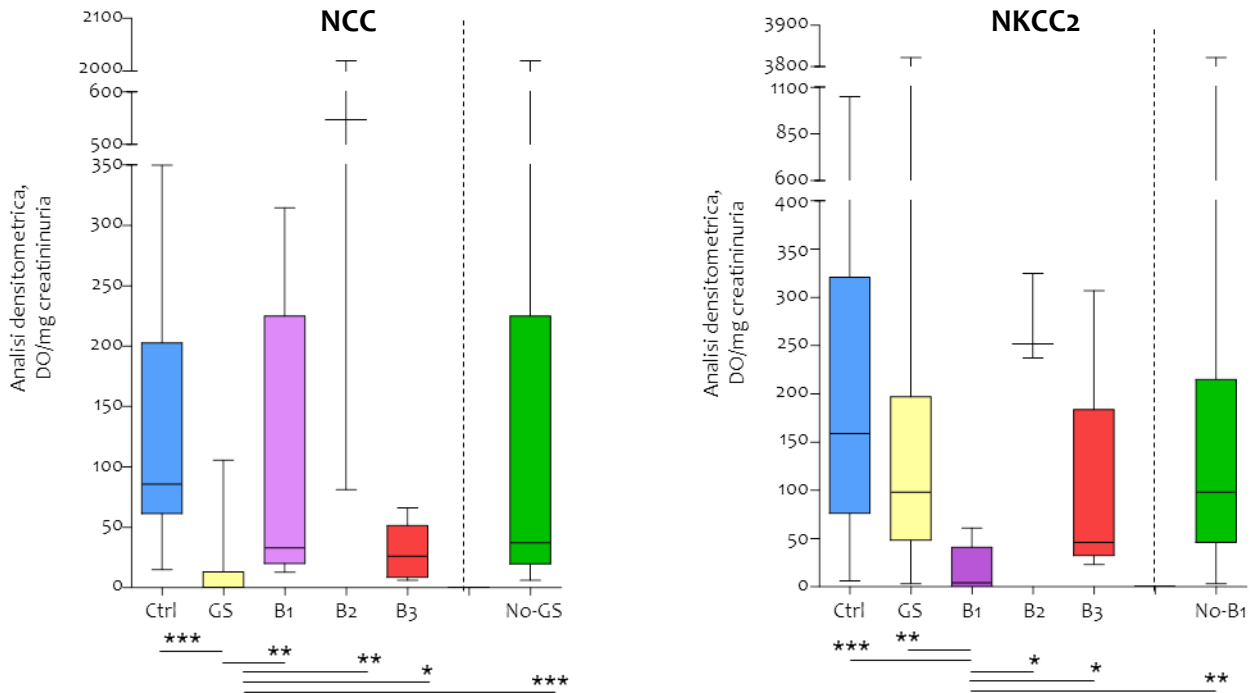


Codice paziente	Mutazioni a livello proteico	Tipo di mutazione	SIFT	DO/mg creatinina urinaria	
				NCC	NKCC
<b>Controlli</b>					
C1				61	101
C10				92	65
C12				15	6
C13				89	200
C14				202	38
C16				70	68
C17				111	157
C2				63	187
C20				61	162
C21				208	234
C22				315	730
C23				82	146
C24				59	129
C25				96	310
C27				41	111
C39				62	77
C4				350	73
C5				44	353
C6				193	621
C7				73	161
C8				205	965
C9				207	1050

**Note:** il simbolo ^ indica la presenza di gemelli; [=] e (-/-) indicano l'assenza di mutazioni identificate; [o] indica la produzione di una proteina nulla a causa di grosse delezioni. M: mutazione missenso; N: mutazione nonsense (codone di stop). F: mutazione che dà origine ad un frameshift. LD: grossa delezione. SIFT è il software che è stato utilizzato per prevedere l'effetto della mutazione, dam= dannosa, tol=tollerata.

Raj DA *et al.* hanno mostrato che l'abbondanza di alcune proteine exosomiali varia in relazione all'età [Raj DA *et al.*, 2012]; tuttavia, nella nostra casistica, la stratificazione dei livelli di NCC e NKCC2 in relazione all'età e al sesso non ha rivelato alcuna variazione significativa (dati non mostrati).

Le differenze delle analisi densitometriche della bande di NCC e NKCC2 negli UE sono risultate statisticamente significative, (Mann-Whitney test, fig. 51). In particolare, un dato interessante è che per quanto riguarda NCC le differenze maggiormente rilevanti si osservano tra pazienti GS e pazienti B2 ( $p = 0,0033$ ).



**Figura 51:** analisi densitometriche delle bande dei trasportatori NCC e NKCC2 negli UE di controlli e pazienti SLTs normalizzate rispetto alla concentrazione di creatinina urinaria. No-GS = B1+B2+B3. No-B1 = GS+B2+B3. Analisi statistica (Mann-Whitney test): \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

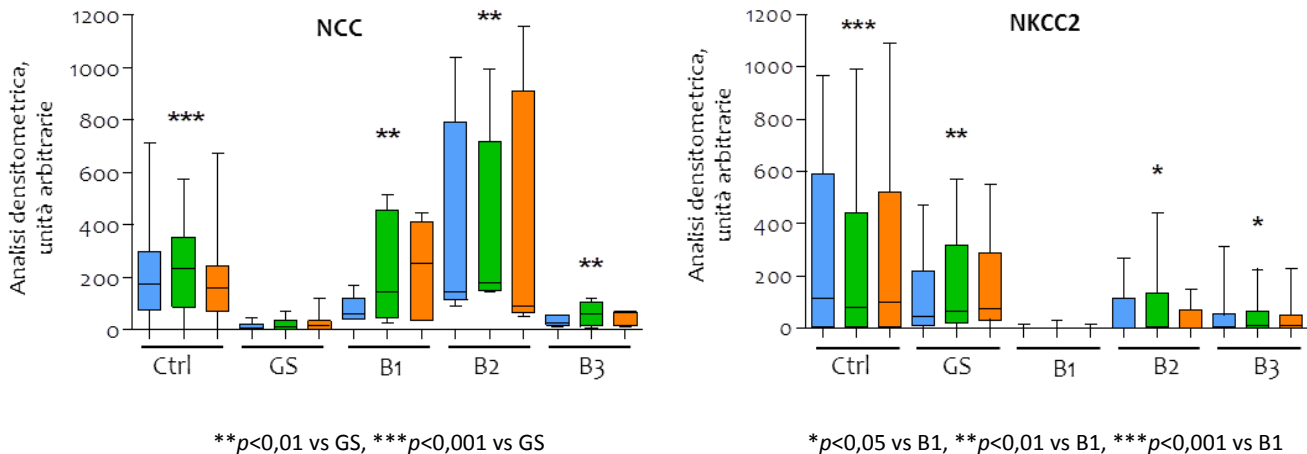
**Tabella XVIII:** statistica descrittiva dei livelli di NCC e NKCC2 (OD/uCr) negli UE isolati da pazienti e controlli.

	NCC						NKCC2				
	N	Media	SE	Mediana	25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> percentile	$p$ value <sup>^</sup>	Media	SE	Mediana	25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> percentile	$p$ value <sup>^</sup>
<b>Ctrl</b>	22	122.7	19.41	85.70	61.16-202.7	<0.0001	270.2	63.38	159.1	76.00-320.8	0.0007
<b>GS</b>	19	13.65	6.440	0.0	0.0-13.07		305.5	196.4	98.20	48.00-197.0	0.0043
<b>B1</b>	5	104.4	56.58	32.85	19.82-224.8	0.0040	17.20	11.62	4.052	0.0-41.00	
<b>B2</b>	3	882.6	584.2	547.0	81.23-2020	0.0033	271.3	27.18	252.0	237.0-325.0	0.0179
<b>B3</b>	5	29.20	10.71	26	8.500-51.50	0.0162	95.40	53.23	46.33	32.00-183.5	0.0468

**Note:** Analisi della varianza tra i vari gruppi eseguita con il test di Kruskal-Wallis  $p < 0,0001$ ; <sup>^</sup> = la significatività delle differenze dai pazienti GS, per NCC, e dai pazienti B1, per NKCC2, è stata determinata utilizzando il test di Mann-Whitney. SE = errore standard

Al fine di conferire una maggiore robustezza ai dati densitometrici ottenuti, abbiamo utilizzato e quindi confrontato ulteriori parametri per la normalizzazione delle bande di NCC e NKCC2 negli UE mediante IB, come suggerito in letteratura [Gonzales PA *et al.*, 2008; Dear JW *et al.*, 2013]; le intensità densitometriche dei due trasportatori sono state quindi normalizzate rispetto all'intensità dei profili proteici corrispondenti (colorazione mediante Rosso Ponceau), rispetto all'escrezione exosomiale della proteina Flot1, marcatore ubiquitario degli exosomi, e

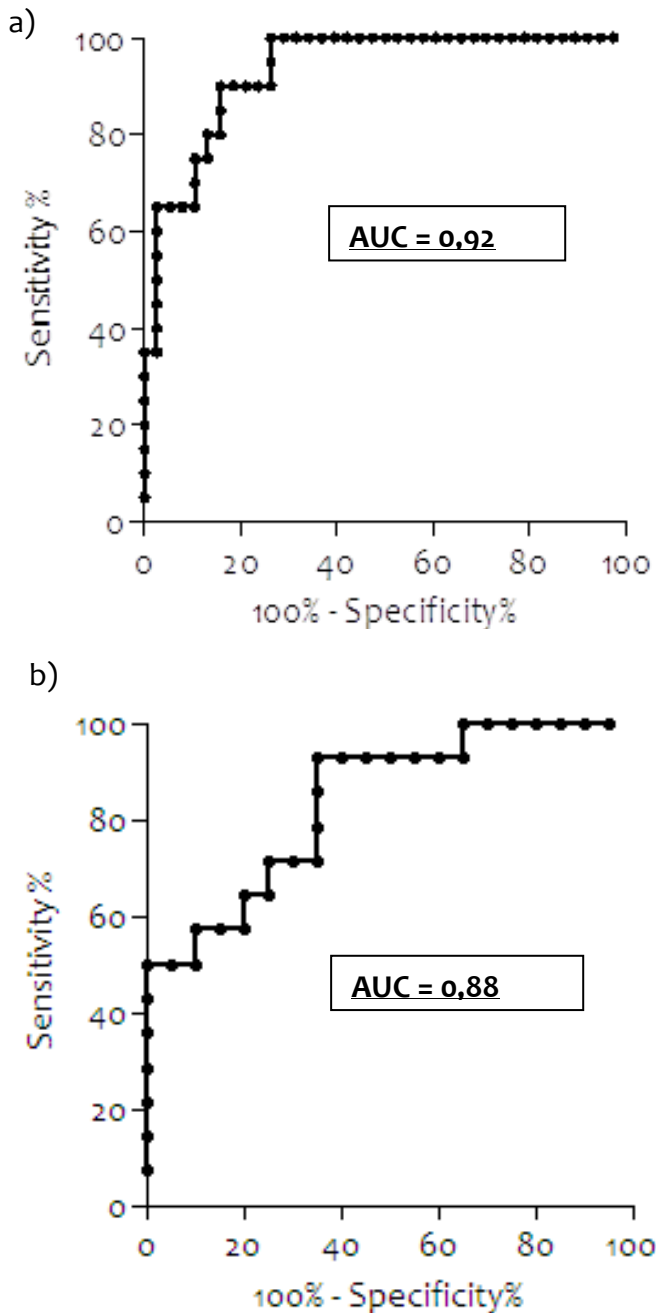
rispetto all'intensità media dell'escrezione negli UE dei tre noti marcatori exosomal Flot1, TSG101 e CD9. I risultati dimostrano che il contenuto di NCC negli UE dei pazienti GS e di NKCC2 nei pazienti B1 viene mantenuto significativamente differenziale rispetto ai soggetti controllo e agli altri pazienti SLTs con tutti e tre i metodi di normalizzazione adottati (fig. 52).



**Figura 52:** analisi densitometriche delle bande di NCC e NKCC2 negli UE normalizzate rispetto all'intensità dei profili proteici ottenuti mediante colorazione con Rosso Ponceau (■), rispetto al contenuto di Flot1, noto marcatore exosomiale (■), e rispetto alle intensità medie dei tre marcatori Flot1, TSG101 e CD9 (■). Analisi statistica (Mann-Whitney test).

Tuttavia, è possibile notare una sovrapposizione parziale di alcuni valori tra i pazienti (GS e B1) e gli altri gruppi in esame (ad es. controlli con valori bassi di NCC, con livelli simili ad alcuni pazienti GS), probabilmente a causa della variabilità biologica ed analitica.

Per meglio valutare l'affidabilità diagnostica complessiva del test basato sugli UE per la diagnosi di sindrome di Gitelman, abbiamo eseguito l'analisi tramite curva ROC (*receiver operating characteristic*), comparando i valori densitometrici di NCC negli UE dei pazienti GS rispetto ai pazienti non GS (BS e controlli). Il risultato dimostra che il nostro test possiede elevate sensibilità (84,2%) e specificità (88,6%) diagnostiche, considerando come valore di *cut-off* una DO = 21,3; l'AUC (area sotto la curva) risulta pari a 0,92 (fig. 53a) e una *likelihood ratio* = 7,37. I rapporti di verosimiglianza (*likelihood ratio*, LR) indicano quanto la probabilità di malattia o condizione cambi, rispetto alla condizione precedente l'esecuzione del test, quando il risultato del test è positivo (+LR) o negativo (-LR). In particolare, una +LR va presa in considerazione quando risulta  $> 2$ , ed assume un potenziale significato clinico quando è  $> 5$ . Nei nostri risultati, una +LR = 7,37 significa che un risultato positivo del test (assenza di NCC nel nostro caso) è 7,37 volte più probabile che provenga da un soggetto affetto dalla condizione in esame piuttosto che da un soggetto non affetto (tab. XIXa e XX).



**Tabella XIX:** tabella di contingenza 2x2 del numero dei soggetti diagnosticati come pazienti GS confrontati con a) pazienti Non-GS e soggetti controllo e b) unicamente pazienti Non-GS, e considerando un valore di cut-off di densità ottica (DO) delle bande di NCC mediante IB pari a 21,3.

	DO < 21.3	DO > 21.3	Numero soggetti
GS	VP = 16	FN = 3	19
Ctrl + Not-GS	FP = 5	VN = 30	35

	DO < 21.3	DO > 21.3	Numero soggetti
GS	VP = 16	FN = 3	19
BS	FP = 3	VN = 10	13

**Note:** VP = veri positivi; FP = falsi positivi; VN = veri negativi; VP = veri positivi.

**Figura 53:** curva ROC ottenuta utilizzando i valori di intensità delle bande di NCC (normalizzati rispetto alla concentrazione di creatinina urinaria) negli UE dei pazienti GS confrontati con a) pazienti Non-GS e soggetti controllo e b) unicamente pazienti Non-GS.

Al fine di mimare una situazione la più vicina possibile alla reale una condizione clinica, in cui esclusivamente i soggetti “sospetti” di malattia sarebbero sottoposti al test, abbiamo costruito una curva ROC comparando i valori delle intensità densitometriche di NCC di pazienti GS con i soli pazienti Non-GS (cioè B1+B2+B3). Mantenendo come valore di *cut-off* una DO = 21,3, l’AUC della curva ROC risulta pari a 0,88 con una sensibilità pari a 84,2%, specificità del 79,6% ed una *likelihood ratio* pari a 9,58 (fig. 53b, tab. XIXb e XX).

L'analisi tramite curva ROC dimostra quindi l'utilità diagnostica del nuovo test, che presenta un ottimo potere discriminante. Per fissare in maniera definitiva un *cut-off* appropriato e quindi stabilire solidi valori predittivi sarebbe tuttavia necessario avere a disposizione un numero decisamente maggiore di pazienti.

Non è possibile invece eseguire l'analisi della performance diagnostica del nuovo test per quanto riguarda NKCC2, in quanto nella nostra casistica abbiamo a disposizione solo 5 pazienti B1; tuttavia va tenuto in considerazione che risulta comunque difficile sviluppare una casistica più robusta, per la B1 e per la B2, in quanto si tratta di patologie molto rare.

**Tabella XX:** risultati dell'analisi statistica mediante curva ROC utilizzando i valori densitometrici di NCC negli UE per comparare i pazienti GS rispetto ai controlli ed ai pazienti non-GS.

	Valore di cut-off	AUC	95% CI		%	95% CI	Likelihood ratio
GS vs Ctrl + Not-GS	21.3	0.92	0.84-1.00	Sensibilità	84.2	60.4-96.6	7.37
				Specificità	88.6	73.3-96.8	
GS vs Not-GS	21.3	0.88	0.76-1.00	Sensibilità	84.2	60.4-96.6	9.58
				Specificità	88.6	73.3-96.8	

**Note:** AUC = area sotto la curva; CI = intervallo di confidenza

Per quel che riguarda le proteine coinvolte nelle altre due sindromi in esame, B2 e B3, i risultati non sono stati altrettanto soddisfacenti.

La ricerca del canale ROMK, localizzato a livello della membrana luminale del TAL e responsabile della sindrome B2, se mutato, ha portato alla visualizzazione di un segnale a doppia banda (dati non mostrati), dovuto alla presenza delle isoforme di splicing alternativo della proteina, presente tuttavia con variabile intensità sia nei pazienti B2 sia nei controlli che negli altri soggetti SLTs; questo genera il sospetto che gli anticorpi anti-ROMK utilizzati non siano specifici, ovvero che il segnale da noi seguito possa non essere quello corretto.

Non è stato possibile rilevare negli UE, mediante IB, la proteina ClC-Kb, le cui mutazioni, spesso grosse delezioni, sono responsabili del fenotipo B3; questo può essere spiegato dal fatto che il canale ClC-Kb è localizzato a livello della membrana basolaterale del TAL e del DCT, e potrebbe di conseguenza, in virtù del meccanismo di biogenesi degli exosomi, non entrare a farne parte (dati non mostrati), anche se in letteratura è riportato che gli UE possono contenere una piccola quantità di proteine tipicamente basolaterali [Peake PW *et al.*, 2014]. Ad oggi questi risultati impediscono l'utilizzo di ROMK e ClC-Kb come biomarcatori per la B2 e la B3, rispettivamente.

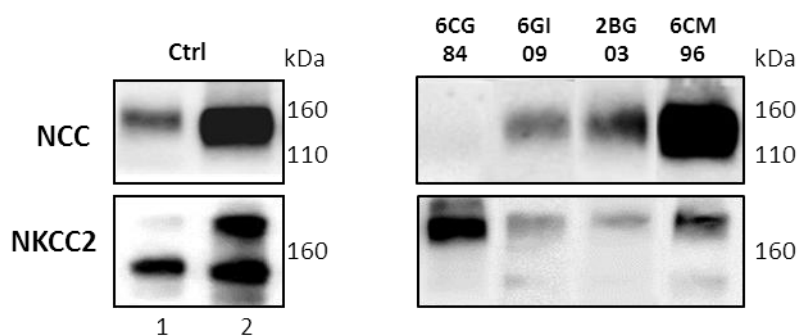
Nella casistica a nostra disposizione, 4 pazienti diagnosticati clinicamente come SLTs sono risultati di difficile classificazione, in quanto non hanno rivelato alcuna mutazione nei geni SLTs

studiati: 6CM94, 2BG03, 6GI09 e 6CG84. In questi casi, molto spesso il clinico si trova in difficoltà nel porre una diagnosi differenziale tra B1/B2 ed, in particolare, tra B3/GS, in quanto queste forme di SLTs presentano le medesime caratteristiche sintomatologiche e biochimico-cliniche. Il test basato sullo studio degli UE può essere allora di aiuto. Per quanto riguarda la distinzione B1/B2, la rilevabilità del trasportatore NKCC2 negli UE permette di indirizzare la diagnosi verso la B2, come nel caso dei pazienti 6CM96 e 2BG03 (fig. 54).

Più critica e, forse ancor più importante, è la discriminazione B3/GS, le due forme di SLTs più frequenti, in quanto alla sovrapposizione fenotipica corrisponde anche, come già menzionato, una parziale sovrapposizione dei livelli del trasportatore NCC negli UE, anche se la differenza tra i valori delle mediane tra i due gruppi è risultata statisticamente significativa (Mann-Whitney test,  $p=0,0162$ ); tale sovrapposizione può riflettere lo stretto accoppiamento tra i meccanismi di trasporto ionico a livello delle cellule epiteliali renali, in cui mutazioni di un elemento chiave del processo (NCC) determinano un'alterazione globale dei meccanismi di riassorbimento nel DCT che vanno ad interessare altri canali o trasportatori, come ClC-Kb.

Dopo uno screening genetico negativo dei geni SLC12A3 e CLCNKB, due situazioni possono quindi presentarsi dopo l'applicazione del test negli UE; qualora NCC risulti ben rilevabile negli UE, la GS può essere esclusa ed è allora possibile ipotizzare il coinvolgimento di ulteriori geni causativi di B3 oppure di geni secondari (geni modificatori).

Nel caso di assenza di NCC a livello degli UE, come nel caso del paziente 6CG84 ( $DO/uCr = 17$ , fig. 54), che clinicamente appare come un GS, è possibile evitare l'analisi genetica approfondita e dispendiosa del gene della B3 ed ipotizzare difetti nelle regioni regolatorie del gene della GS, SLC12A3, o il coinvolgimento di meccanismi di natura epigenetica (miRNAs) [Paulmurugan R *et al.*, 2013].



**Figura 54:** IB di NCC e NKCC2 in UE di controlli rappresentativi e di pazienti SLTs a diagnosi incerta per i quali l'indagine genetica ha mostrato l'assenza di mutazioni in tutti i geni SLTs.

La storia clinica del paziente 6GI09 mostra invece un comportamento peculiare; la patologia ha avuto un esordio molto precoce, a 2 mesi, che lascerebbe ipotizzare una diagnosi B1/B2, ma l'analisi genetica ha rivelato negatività per i geni SLC12A1, KCNJ1 ed anche per il gene CLCNKB: lo studio da noi effettuato sugli UE mostra positività sia per NCC ( $DO/uCr = 131$ )

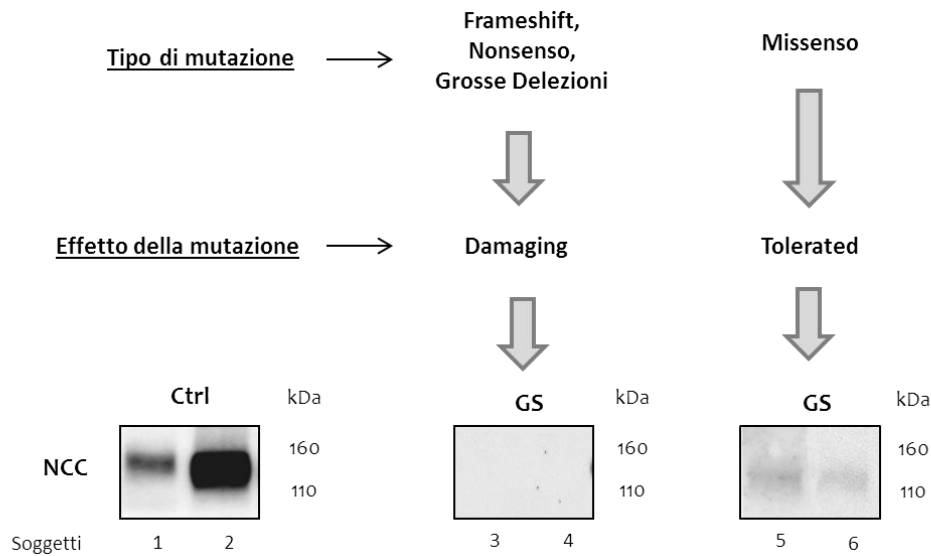
sia per NKCC2 (DO/uCr = 303), permettendo di escludere B1 e GS, e indirizzando in ultima analisi la diagnosi verso la B2 (fig. 54).

La principale applicazione dei nuovi test proposti, relativi ai trasportatori NCC e NKCC2 negli UE di pazienti SLTs, consiste nella possibilità di escludere la GS e la B1. Questo potrebbe essere utile in particolar modo per quei pazienti adulti che si rivolgono alle unità di nefrologia a seguito di un quadro clinico di ipopotassiemia, primo elemento che porta ad ipotizzare la presenza di SLTs. Molte analisi genetiche vengono richieste inutilmente in questi casi: infatti sono molto più frequenti risultati negativi nei pazienti adulti (35%) rispetto ai pazienti in età pediatrica (19%). In tali casi, se i trasportatori NCC e NKCC2 risultano assenti negli UE, il test genetico può essere evitato e l'iter diagnostico modificato.

Nel caso di NCC, abbiamo infine cercato di stabilire l'esistenza di una possibile correlazione tra la severità della mutazione GS ed il segnale negli UE visualizzato tramite IB, corrispondente alla quantità del trasportatore presente a livello delle cellule del DCT. Infatti, le mutazioni *loss-of-function* del gene SLC12A3 possono determinare molteplici effetti a livello proteico; NCC può non essere sintetizzata oppure può non raggiungere la membrana ed in tal caso il segnale relativo negli UE dovrebbe risultare assente. Altre mutazioni invece provocano una minore localizzazione di NCC in membrana e ne alterano la funzionalità; in questo caso un segnale NCC negli UE potrebbe essere visibile [Glaudemans B *et al.*, 2010]. Alcune mutazioni presenti nella nostra casistica sono state precedentemente studiate dal punto di vista funzionale attraverso l'espressione eterologa di NCC opportunamente mutata in oociti di *Xenopus laevis*, valutando non solo la quantità di proteina in grado di raggiungere la membrana plasmatica ma anche la sua eventuale attività [Riancho JA *et al.*, 2006; Glaudemans B *et al.*, 2012]. Esempi di queste mutazioni sono: la Ser475Cys, presente su uno dei due alleli del locus SLC12A3 dei fratelli 5GE01 e 5GF01 presenti nella nostra casistica, e la Thr392Ile, in eterozigosi composta nei due pazienti Gitelman 5SA05 e 5SB05, anch'essi fratelli [Glaudemans B *et al.*, 2012].

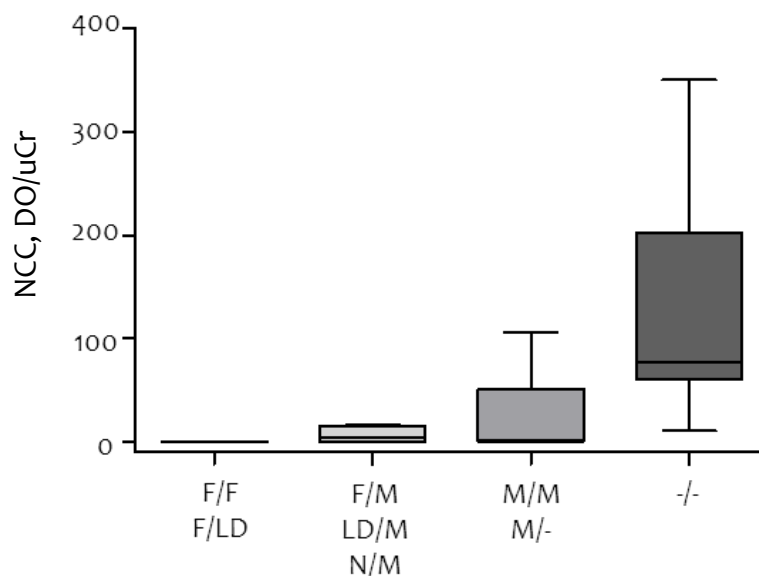
I risultati dimostrano che, quando le mutazioni su entrambi gli alleli del gene SLC12A3 sono severe, ovvero si tratta di mutazioni nonsense, frameshift, grosse delezioni oppure due varianti missenso entrambe classificate come dannose (*damaging*) dal software SIFT, non è rilevabile nessun segnale di NCC negli UE (fig.55) ed i valori delle analisi densitometriche corrispondenti risultano pari a 0 (tab. XVII); NCC non è quindi sintetizzata, va incontro ad un errato processo di *folding* o viene trattenuta nel RER. Quando invece vengono riscontrate mutazioni missenso su entrambi gli alleli ed una delle due viene classificata come tollerata (*tolerated*) dal software SIFT, è possibile visualizzare un debole segnale di NCC negli UE ed i valori densitometrici si discostano dallo 0: il trasportatore potrebbe essere almeno in parte sintetizzato correttamente e raggiungere la membrana, seppur in minor quantità e con funzionalità ridotta o nulla. Ad esempio, la mutazione Thr392Ile dei due fratelli GS 5SA05 e 5SB05 risulta "*tolerated*"

in seguito all'applicazione del SIFT; conseguentemente, negli exosomi isolati dalle urine di questi due pazienti è visibile un segnale di NCC (DO/uCr = 48 e 106, rispettivamente), seppur molto debole se paragonato a quello dei pazienti BS e dei soggetti controllo.



**Figura 55:** correlazione tra la severità della mutazione a livello del gene *SLC12A3* ed i corrispondenti livelli del trasportatore NCC negli UE.

L'esistenza di una relazione di proporzionalità inversa tra la gravità delle mutazioni negli alleli del gene *SLC12A3*, schematicamente raggruppate in quattro classi, ed i livelli medi di NCC negli UE di tutti i nostri pazienti e dei soggetti controllo (*wild type*), è chiaramente indicata dal *correlation plot* sottostante (fig. 56).

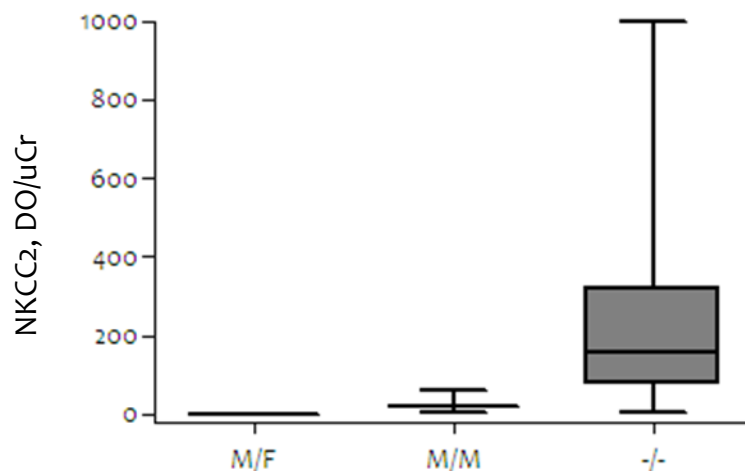


**Figura 56:** correlation plot tra la gravità della mutazione sui due alleli del gene *SLC12A3* ed i livelli di NCC negli UE (DO/uCr) Legenda: F = frameshift, LD = grossa delezione, N = mutazione nonsense, M = mutazione missenso, -/- = nessuna mutazione, soggetti controllo.



Infatti, quanto più la mutazione del gene SLC12A3 si rivela severa, tanto più la corrispondente DO di NCC negli UE corrispondenti risulta vicina allo 0.

Lo stesso tipo di correlazione genotipo/fenotipo può essere estesa anche alla proteina NKCC2, sebbene il numero di pazienti B1 presenti nella nostra casistica sia insufficiente per consentire una conclusione; è comunque possibile osservare che, tra i nostri cinque pazienti B1, nei due che presentano le mutazioni più severe (mutazioni *frameshift*) il cotrasportatore NKCC2 negli UE è assente, con una DO corrispondente pari a 0 (fig 57).



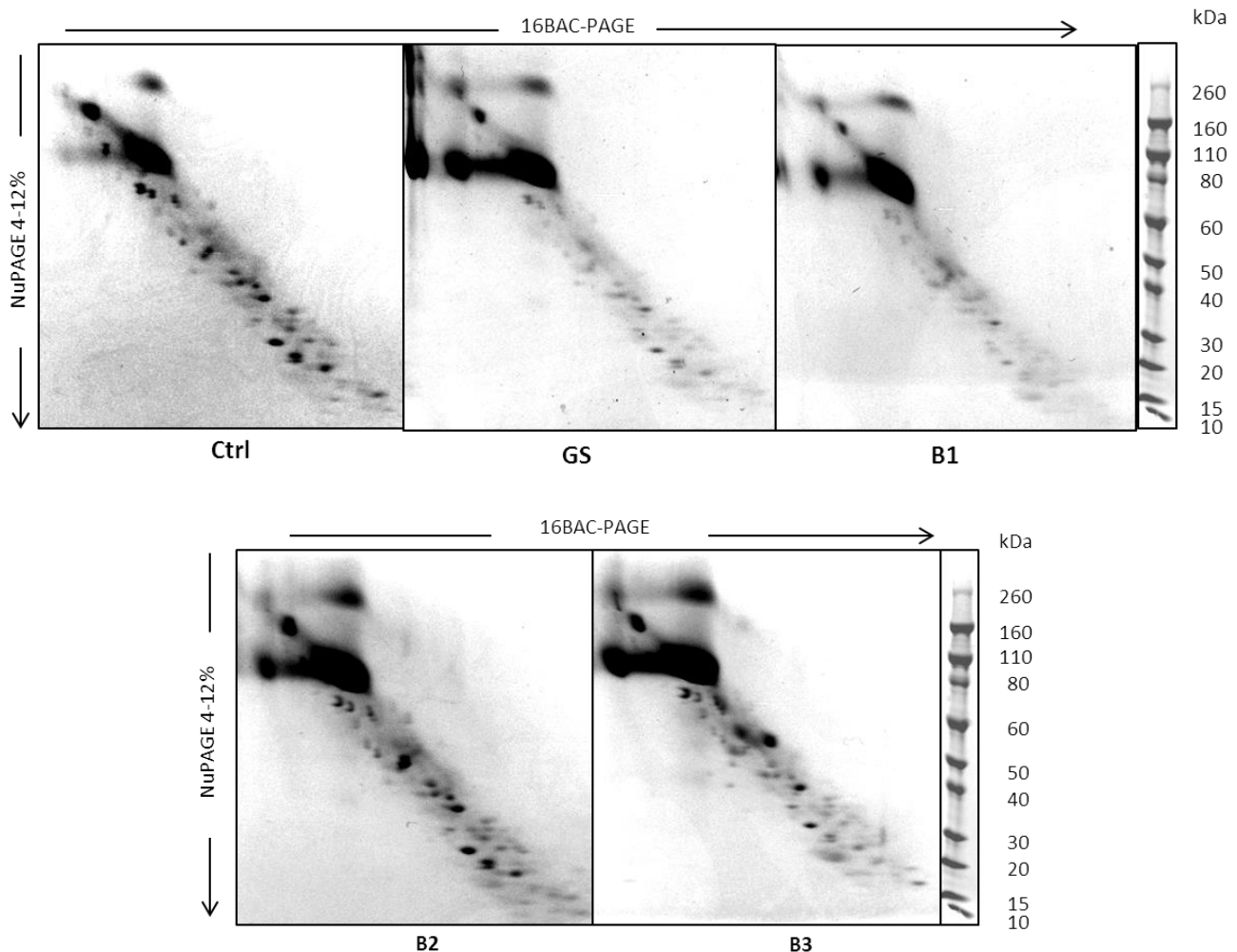
**Figura 57:** correlation plot tra la gravità della mutazione sui due alleli del gene SLC12A1 ed i livelli di NKCC2 negli UE (DO/uCr) Legenda: F = frameshift, M = mutazione missenso, -/- = nessuna mutazione, soggetti controllo.

#### 4.2.4. Proteomica degli exosomi urinari

Al fine di cercare di identificare differenze molecolari che ci permettessero di riconoscere i pazienti affetti da B2 e B3 e ci consentissero una miglior comprensione dei meccanismi patogenetici associati alle diverse varianti di SLTs, abbiamo effettuato l'analisi del proteoma globale degli UE di pazienti e controlli tramite un approccio di elettroforesi bidimensionale particolare, 16BAC/SDS-PAGE, seguito da colorazione mediante Blue Coomassie. L'elettroforesi 16BAC/SDS-PAGE è una tecnica separativa sviluppata appositamente per la separazione di proteine di membrana con elevata idrofobicità, di cui gli exosomi sono arricchiti e che normalmente risultano sottorappresentate nelle comuni mappe proteomiche ottenute mediante la elettroforesi bidimensionale classica. Le proteine vengono separate sulla base del loro peso molecolare in entrambe le dimensioni, ma l'utilizzo di due detergenti con caratteristiche differenti, di % di poliacrilammide e tamponi di corsa diversi fa sì che alcuni spot si localizzino a lato della diagonale permettendo così l'aumento della risoluzione di separazione.

Per ottenere una quantità di proteine sufficienti alla visualizzazione degli spot nei gel e per minimizzare le differenze intraindividuali, abbiamo allestito pool di UE di 4 pazienti per ogni tipologia di SLTs ed un pool di UE di 4 soggetti controllo, corrispondenti a circa 40 µg totali di proteine.

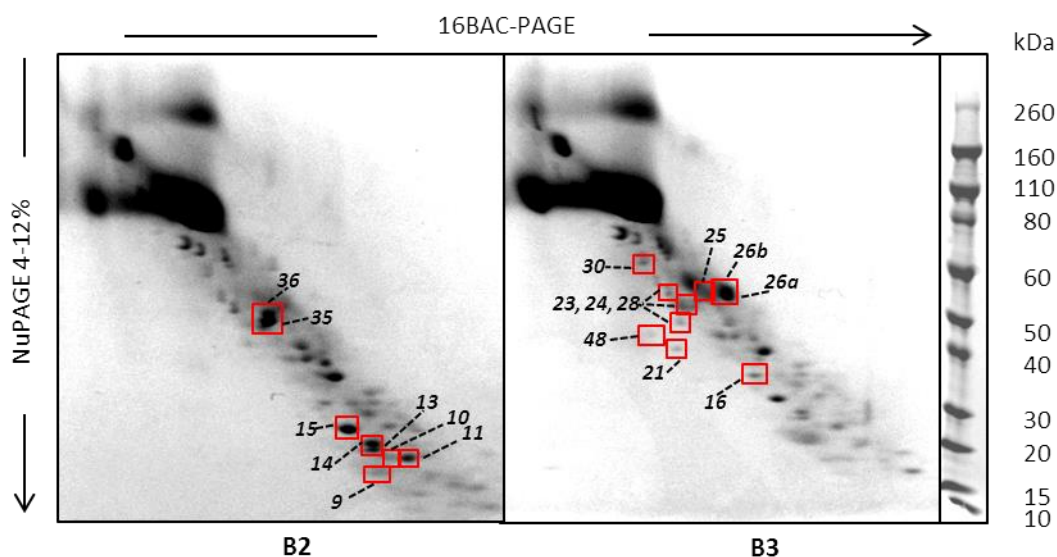
L'analisi dei profili diagonali evidenzia la presenza di diversi spot differenziali tra i pool di UE delle diverse tipologie di SLTs e dei controlli (fig. 58).



**Figura 58:** profili proteici di pool di UE di pazienti SLTs e controlli analizzati mediante 16BAC/SDS-PAGE, seguita da colorazione con CBB.

Tutti gli spot, differenziali e non, sono stati excisi e conservati a 4°C. Ci siamo concentrati preliminarmente sullo studio del proteoma dei pazienti B2 e B3 per i quali l'analisi tramite IB delle proteine ROMK e ClC-Kb non aveva dato risultati soddisfacenti, selezionando alcuni spot differenziali, riquadrati in rosso nella fig. 59. Poiché un punto critico nella diagnosi differenziale delle SLTs è la distinzione B3/GS, gli spot B3 sono stati selezionati prestando particolare attenzione al confronto tra i profili proteomici degli UE dei pool B3 e GS.

Gli spot B2 e B3 scelti sono stati analizzati mediante digestione *in gel* con tripsina e nLC-ESI-MS/MS per l'identificazione delle specie proteiche presenti.



**Figura 59:** profili proteici diagonali di pool di UE dei pazienti B2 e B3; i riquadri rossi indicano gli spot selezionati e successivamente analizzati mediante MS.

La tab. XXI riporta l'elenco delle proteine identificate nei diversi spot. Per ogni proteina identificata vengono riportati: lo score di Mascot, che, come già menzionato, rappresenta la probabilità che l'identificazione della proteina sia frutto di un evento casuale, la massa molecolare stimata (Dalton), ed il numero di peptidi significativi.

**Tabella XXI:** elenco delle proteine identificate negli spot selezionati dei profili 16BAC/SDS-PAGE dei pool di UE B2 o B3.

Spot	B2	B3	Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Peptidi
9	x		Triosephosphate isomerase	TPIS_HUMAN	225	31057	9
9	x		Mucin-1	MUC1_HUMAN	153	122200	7
9	x		3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2	BDH2_HUMAN	86	27049	5
9	x		Serum amyloid P-component	SAMP_HUMAN	41	25485	2
9	x		Solute carrier family 12 member 3	S12A3_HUMAN	40	114207	3
9	x		Proteasome subunit alpha type-6	PSA6_HUMAN	32	27838	1
9	x		Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	29	42052	1
9	x		Serum albumin	ALBU_HUMAN	26	71317	2
9	x		Polyubiquitin-B	UBB_HUMAN	24	25803	1
9	x		Carbonic anhydrase 2	CAH2_HUMAN	20	29285	2
9	x		Neutrophil elastase	ELNE_HUMAN	19	29127	2
9	x		Tumor susceptibility gene 101 protein	TS101_HUMAN	18	44088	1
9	x		Protein MAL2	MAL2_HUMAN	16	19341	1
9	x		Gamma-glutamyltranspeptidase 1	GGT1_HUMAN	14	61714	1

Spot	B2	B3	Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Peptidi
10	x		Mucin-1	MUC1_HUMAN	363	122200	4
10	x		MIT domain-containing protein 1	MITD1_HUMAN	250	29638	6
10	x		Sodium leak channel non-selective protein	NALCN_HUMAN	90	202196	1
10	x		6-phosphogluconolactonase	6PGL_HUMAN	55	27815	1
10	x		Proteasome subunit alpha type-6	PSA6_HUMAN	45	27838	1
10	x		SLIT and NTRK-like protein 3	SLIK3_HUMAN	28	110062	1
10	x		Protocadherin gamma-B5	PCDGH_HUMAN	26	100555	1
10	x		Apolipoprotein D	APOD_HUMAN	14	21547	1
10	x		Uncharacterized protein C4orf21	CD021_HUMAN	13	238905	1
10	x		Elongation factor 1-alpha 1	EF1A1_HUMAN	13	50451	3
10	x		VPS9 domain-containing protein 1	VP9D1_HUMAN	13	69882	1
13	x		Elongation factor 1-alpha 1	EF1A1_HUMAN	39	50451	1
13	x		Carbonic anhydrase 2	CAH2_HUMAN	19	29285	1
13	x		Protein FAM179B	F179B_HUMAN	18	190611	1
13	x		Zinc finger protein 736	ZN736_HUMAN	16	51774	1
13	x		Zinc finger protein 595	ZN595_HUMAN	15	76751	1
14	x		MAP7 domain-containing protein 2	MA7D2_HUMAN	20	82371	1
14	x		1-phosphatidylinositol4,5-bisphosph beta3	PLCB3_HUMAN	20	139511	1
14	x		Mucin-16	MUC16_HUMAN	17	2359682	1
15	x		Protein MROH8	MROH8_HUMAN	177	55580	1
15	x		Prestin	S26A5_HUMAN	105	81725	1
15	x		L-amino-acid oxidase	OXLA_HUMAN	45	63070	2
15	x		40S ribosomal protein S14	RS14_HUMAN	40	16434	1
15	x		Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 3	ACSL3_HUMAN	35	81338	1
15	x		Hypermethylated in cancer 2 protein	HIC2_HUMAN	35	67140	1
15	x		Neuropathy target esterase	PLPL6_HUMAN	31	151383	1
15	x		Membrane-associated guanylate kinase	MAGI1_HUMAN	25	165450	1
15	x		Uncharacterized protein C16orf11	CP011_HUMAN	23	60001	2
15	x		Solute carrier family 26 member 10	S2610_HUMAN	23	60648	1
15	x		Neogenin	NEO1_HUMAN	21	160658	1
15	x		Deoxyguanosine kinase, mitochondrial	DGUOK_HUMAN	19	32150	1
15	x		IgGFC-binding protein	FCGBP_HUMAN	19	596443	1
15	x		Nuclear autoantigenic sperm protein	NASP_HUMAN	17	85471	1
15	x		Leucine-rich repeat-containing protein 47	LRC47_HUMAN	16	64004	1
16		x	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	482	36201	17
16		x	PDZ domain-containing protein GIPC2	GIPC2_HUMAN	124	34504	6
16		x	Clusterin	CLUS_HUMAN	110	53031	4
16		x	Aldose reductase	ALDR_HUMAN	63	36230	6
16		x	Prostate stem cell antigen	PSCA_HUMAN	46	13474	2
16		x	Apolipoprotein E	APOE_HUMAN	29	36246	3
16		x	Sorbitol dehydrogenase	DHSO_HUMAN	24	38927	2
16		x	Polyubiquitin-B	UBB_HUMAN	20	25803	1
16		x	Fructose-bisphosphate aldolase B	ALDOB_HUMAN	18	39961	1
16		x	Axin interactor, dorsalization-associated protein	AIDA_HUMAN	16	35172	1

Spot	B2	B3	Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Peptidi
16		x	Folate receptor alpha	FOLR1_HUMAN	16	30712	2
16		x	Alcohol dehydrogenase class-3 Progesterin and adipoQ receptor family member 6	ADHX_HUMAN	16	40554	1
16		x		PAQR6_HUMAN	15	38705	1
21		x	Apolipoprotein A-IV	APOA4_HUMAN	155	45371	11
23		x	Flotillin-1	FLOT1_HUMAN	44	47554	1
23		x	Ankyrin and fibronectin type-III	ANKF1_HUMAN	22	88461	2
23		x	Protein maelstrom homolog	MAEL_HUMAN	19	49872	1
23		x	Delta-sarcoglycan	SGCD_HUMAN	19	32393	2
24		x	Brain acid soluble protein 1	BASP1_HUMAN	26	22680	2
24		x	Protocadherin-23	PCD23_HUMAN	14	323744	1
24		x	Moesin	MOES_HUMAN	14	67892	1
24		x	Kininogen-1	KNG1_HUMAN	13	72996	1
25		x	Dipeptidase 1	DPEP1_HUMAN	121	46101	9
25		x	Tyrosine-protein kinase FRK	FRK_HUMAN	68	58673	5
25		x	Alpha-1-antichymotrypsin	AACT_HUMAN	52	47792	2
25		x	Alpha-1-antitrypsin	A1AT_HUMAN	51	46878	1
25		x	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	26	56577	3
25		x	Annexin A11	ANX11_HUMAN	23	54697	4
25		x	Copine-3	CPNE3_HUMAN	17	60947	1
25		x	Coiled-coil domain-containing protein 116	CC116_HUMAN	16	57588	1
25		x	Puromycin-sensitive aminopeptidase	PSA_HUMAN	16	103895	2
25		x	Suppression of tumorigenicity 18 protein	ST18_HUMAN	16	116850	1
25		x	Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1_HUMAN	14	52325	1
26		x	Alpha-1-antitrypsin	A1AT_HUMAN	423	46878	18
26		x	Prostatic acid phosphatase	PPAP_HUMAN	102	44880	5
26		x	Plasma serine protease inhibitor	IPSP_HUMAN	93	45760	5
26		x	Dipeptidase 1	DPEP1_HUMAN	86	46101	5
26		x	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase V-type proton ATPase subunit B, kidney isoform	SERA_HUMAN	79	57356	4
26		x		VATB1_HUMAN	73	57196	8
26		x	Retinal dehydrogenase 1	AL1A1_HUMAN	72	55454	5
26		x	Protein FAM151A Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta	F151A_HUMAN	48	64329	2
26		x		PTPRJ_HUMAN	46	147048	3
26		x	Xaa-Pro dipeptidase	PEPD_HUMAN	45	55311	3
26		x	BPI fold-containing family B member 1	BPIB1_HUMAN	42	52580	5
26		x	Glycerol kinase	GLPK_HUMAN	40	62060	1
26		x	Alpha-1-antichymotrypsin	AACT_HUMAN	39	47792	2
26		x	Dipeptidyl peptidase 2	DPP2_HUMAN	39	54763	1
26		x	Cytosol aminopeptidase V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	AMPL_HUMAN	33	56530	2
26		x		VATB2_HUMAN	33	56807	2
26		x	Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN_HUMAN	32	58993	1
26		x	Acid sphingomyelinase-like phosph 3b	ASM3B_HUMAN	29	51237	3
26		x	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydr	AL7A1_HUMAN	28	59020	3

Spot	B2	B3	Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Peptidi
26	x		Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA	MA1A1_HUMAN	27	73150	2
26	x		Serine/threonine-protein kinase ULK3	ULK3_HUMAN	27	53753	1
26	x		Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	26	39851	1
26	x		IST1 homolog	IST1_HUMAN	26	39897	2
26	x		Annexin A7	ANXA7_HUMAN	24	52991	1
26	x		Thyroxine-binding globulin	THBG_HUMAN	23	46637	2
26	x		Tumor susceptibility gene 101 protein	TS101_HUMAN	23	44088	1
26	x		Monocyte differentiation antigen CD14	CD14_HUMAN	20	40678	3
26	x		IgGfc-binding protein	FCGBP_HUMAN	19	596443	1
26	x		Galectin-3-binding protein	LG3BP_HUMAN	19	66202	1
26	x		Serine/threonine-protein kinase 24	STK24_HUMAN	19	49562	1
26	x		TOM1-like protein 1	TM1L1_HUMAN	17	53127	1
26	x		Aldehyde dehydrogenase family 8 member A1	AL8A1_HUMAN	16	54165	2
26	x		Carboxypeptidase Q	CBPQ_HUMAN	15	52083	1
26	x		Dermcidin	DCD_HUMAN	15	11391	1
26	x		Ectonucleotide pyrophosph/phosphodiester family member 6	ENPP6_HUMAN	15	50551	1
26	x		G-protein coupled receptor family C group 5 member C	GPC5C_HUMAN	14	48732	1
26	x		Abhydrolase domain-containing protein 15	ABH15_HUMAN	13	52594	1
26	x		Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A	BAZ1A_HUMAN	13	180246	1
26	x		Target of Myb protein 1	TOM1_HUMAN	13	54070	1
26	x		Alpha-1-antitrypsin	A1AT_HUMAN	2131	46878	58
26	x		Dipeptidase 1	DPEP1_HUMAN	446	46101	17
26	x		Beta-galactosidase	BGAL_HUMAN	90	76483	3
26	x		V-type proton ATPase sub B, kidney isoform	VATB1_HUMAN	36	57196	2
26	x		Next to BRCA1 gene 1 protein	NBR1_HUMAN	33	108486	1
28	x		Ezrin	EZRI_HUMAN	268	69484	6
28	x		Brain acid soluble protein 1	BASP1_HUMAN	211	22680	5
28	x		Drebrin-like protein	DBNL_HUMAN	140	48463	2
28	x		Dihydropyrimidinase	DPYS_HUMAN	56	57107	1
28	x		Radixin	RADI_HUMAN	37	68635	2
28	x		Pyruvate kinase PKLR	KPYR_HUMAN	27	62191	2
28	x		5-hydroxytryptamine receptor 3A	5HT3A_HUMAN	26	55701	1
28	x		Hornerin	HORN_HUMAN	24	283140	1
28	x		5-hydroxytryptamine receptor 2A	5HT2A_HUMAN	22	53424	1
28	x		Treslin	TICRR_HUMAN	22	212721	1
28	x		Zinc finger protein 445	ZN445_HUMAN	21	121282	1
28	x		Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2	ERAP2_HUMAN	18	111075	1
28	x		Kininogen-1	KNG1_HUMAN	17	72996	1
28	x		Homeobox protein SIX3	SIX3_HUMAN	17	35750	1
28	x		Glucose-6-phosphate isomerase	G6PI_HUMAN	15	63335	1
28	x		NACHT, LRR and PYD domains-cont pr 13	NAL13_HUMAN	14	121144	1

Spot	B2	B3	Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Peptidi
30		x	Pyruvate kinase PKM	KPYM_HUMAN	230	58470	11
30		x	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein2	BAIP2_HUMAN	192	61115	10
30		x	Ezrin	EZRI_HUMAN	37	69484	4
30		x	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein	BI2L1_HUMAN	34	57189	3
30		x	Gamma-glutamyltranspeptidase 1	GGT1_HUMAN	28	61714	1
30		x	TBC1 domain family member 10A	TB10A_HUMAN	15	57595	1
30		x	Putative PDZ domain-containing protein 1P	PDZ1P_HUMAN	13	44199	1
35	x		Annexin A11	ANX11_HUMAN	103	54697	17
35	x		Kininogen-1	KNG1_HUMAN	28	72996	2
35	x		Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	VPS4B_HUMAN	20	49443	3
35	x		Tyrosine-protein kinase FRK	FRK_HUMAN	17	58673	2
35	x		Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	AT1B1_HUMAN	17	35438	1
35	x		IgGFC-binding protein	FCGBP_HUMAN	15	596443	1
35	x		Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2	ES8L2_HUMAN	14	81197	1
36	x		Annexin A11	ANX11_HUMAN	645	54697	50
36	x		Dipeptidase 1	DPEP1_HUMAN	153	46101	13
36	x		Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	115	56577	7
36	x		Tyrosine-protein kinase FRK	FRK_HUMAN	83	58673	8
36	x		Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	SRC_HUMAN	57	60310	5
36	x		Copine-3	CPNE3_HUMAN	74	60947	7
36	x		V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	VATB2_HUMAN	64	56807	5
36	x		Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA	MA1A1_HUMAN	60	73150	5
36	x		Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	AT1B1_HUMAN	55	35438	2
36	x		Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN_HUMAN	54	58993	5
36	x		Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	VPS4B_HUMAN	52	49443	6
36	x		Vacuolar protein sorting-associated protein 4A	VPS4A_HUMAN	39	49152	4
36	x		Multidrug resistance protein 1	MDR1_HUMAN	47	141788	3
36	x		Polyubiquitin-B	UBB_HUMAN	37	25803	2
36	x		Protein tweety homolog 3	TTYH3_HUMAN	37	58477	2
36	x		Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1_HUMAN	34	52325	2
36	x		Kininogen-1	KNG1_HUMAN	33	72996	4
36	x		One cut domain family member 3	ONEC3_HUMAN	32	50234	3
36	x		Aquaporin-2	AQP2_HUMAN	27	29047	2
36	x		Antithrombin-III	ANT3_HUMAN	25	53025	1
36	x		Pro-epidermal growth factor	EGF_HUMAN	25	137613	1
36	x		Retinoic acid-induced protein 3	RAI3_HUMAN	25	40624	1
36	x		cGMP-dependent protein kinase 2	KGP2_HUMAN	25	88061	1

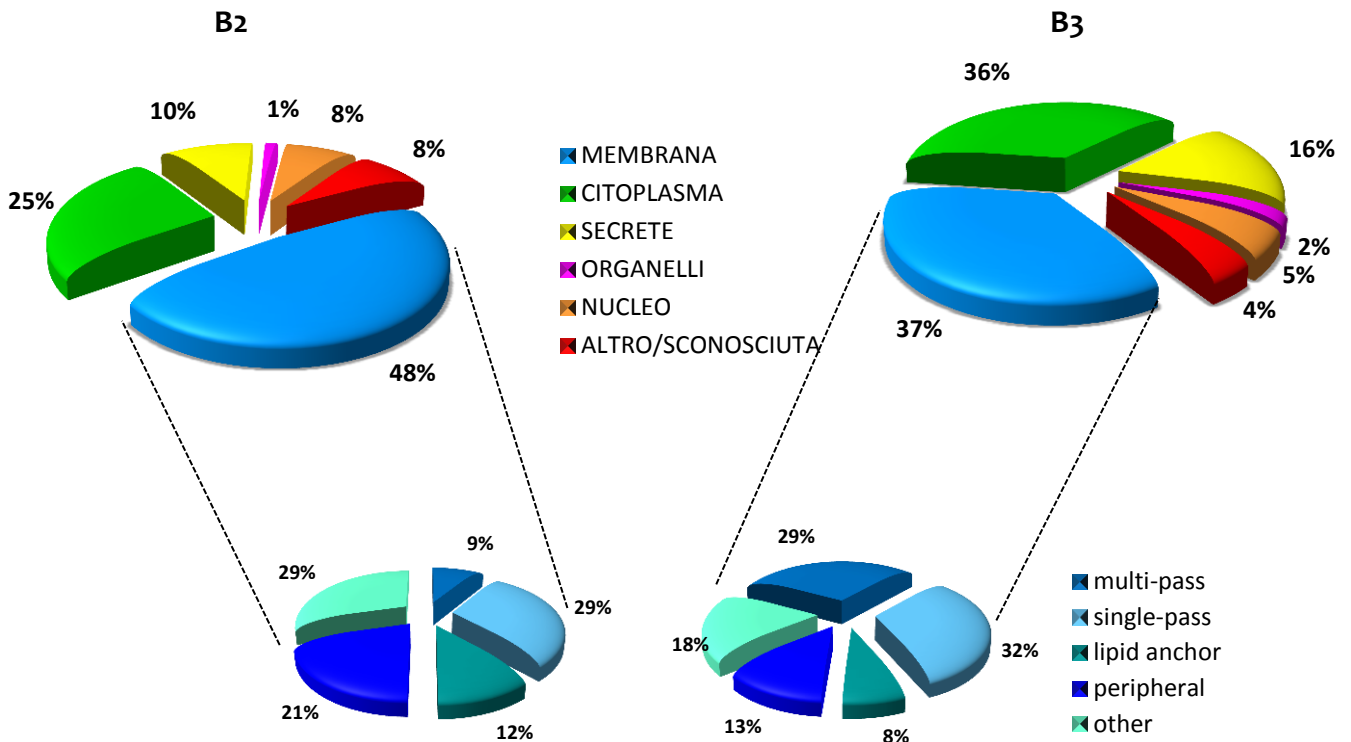
Spot	B2	B3	Nome	Accession (UNIPROT)	Score	MW (Da)	Peptidi
36	x		Puromycin-sensitive aminopeptidase	PSA_HUMAN	25	103895	1
36	x		26S protease regulatory subunit 4	PRS4_HUMAN	24	49325	1
36	x		V-type proton ATPase subunit S1	VAS1_HUMAN	24	52164	1
36	x		Uncharacterized protein C19orf82	CS082_HUMAN	24	11765	1
36	x		UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	UGPA_HUMAN	23	57076	1
36	x		IgGfc-binding protein	FCGBP_HUMAN	22	596443	1
36	x		Ammonium transporter Rh type C	RHCG_HUMAN	20	53600	1
36	x		Carboxypeptidase M	CBPM_HUMAN	20	50938	1
36	x		Tumor necrosis factor ligand superfamily member 12	TNF12_HUMAN	20	7427	1
36	x		Hydroperoxide isomerase ALOXE3	LOXE3_HUMAN	18	81860	1
36	x		Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2	ES8L2_HUMAN	16	81197	1
36	x		IST1 homolog	IST1_HUMAN	15	39897	1
36	x		Myeloperoxidase	PERM_HUMAN	15	84784	1
36	x		Coiled-coil domain-containing protein KIAA1407	K1407_HUMAN	14	111012	1
48		x	Specifically androgen-regulated gene protein Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor	SARG_HUMAN	47	64211	2
48		x	NHE-RF1	NHRF1_HUMAN	29	39130	2
48		x	Moesin	MOES_HUMAN	23	67892	1

Abbiamo exciso ed analizzato 7 spot dei profili diagonali del pool di UE dei pazienti B2 e 9 spot dei profili del pool B3 identificando in totale 172 diverse specie proteiche, di cui 79 proteine nel pool B2 e 93 proteine nel pool B3. Alcune proteine sono state identificate in più spot del medesimo pool e sono quindi state considerate nel conteggio una sola volta. La localizzazione subcellulare delle proteine identificate, assegnata attraverso i database UniprotKB (*UniProt KnowledgeBase*) di ExPASy e LocDB (*Subcellular Localization DataBase*) rivela che le proteine identificate sono, in maggioranza, proteine di membrana, in particolare il 48% del pool B2 e il 37% del B3, mentre il 25% e il 36% delle proteine identificate, rispettivamente, appartiene alla categoria delle proteine citoplasmatiche ed il 10% e il 16% risultano proteine fisiologicamente secrete. Le proteine transmembrana (*single pass + multi pass*) sono le più rappresentate in entrambi i gruppi, con una percentuale del 38% nel pool B2 e del 61% nel pool B3 (fig. 60).

Tra le proteine identificate, troviamo diverse proteine fisiologicamente presenti negli exosomi in quanto coinvolte nel loro meccanismo di biogenesi o importanti per la conservazione della loro struttura, come TSG101 e Flot-1 e le *Vacuolar protein sorting (VPS)*, numerose proteine tipicamente renali, quali l'*Aquaporin-2*, la *Dipeptidase-1* e la *Carbonic Anhydrase 2 (CA2)*, alcune proteine appartenenti alla classe delle Annexine, quali l'*Annexina-A7 (ANXA7)* e l'*Annexina-A11 (ANXA11)*, e numerose proteine canale o trasportatrici di membrana, come il



*Specifically Androgen-Regulated Gene protein* (SARG) e il *Na(+)/H(+)* exchange regulatory cofactor *NHE-RF1* (NHRF1), identificato unicamente nel pool B3 e il *Solute carrier family 26 member 10* (S2610) e l'*Ammonium transporter Rh type C* (RHCG), identificati unicamente in uno spot del pool B2.



**Figura 60:** analisi bioinformatica della localizzazione subcellulare delle proteine identificate negli spot 16BAC/SDS-PAGE degli exosomi urinari del pool di pazienti B2 e B3.

Va comunque considerato che tali analisi bioinformatiche sono limitate ai soli spot analizzati, per altro non *matchati* nei profili diagonali dei due pool. Tuttavia questi dati preliminari evidenziano che la tecnica elettroforetica da noi utilizzata risulta adatta al fine di migliorare la separazione e la successiva identificazione di proteine di membrana (fig. 60); inoltre l'elenco di proteine identificate costituisce un preliminare serbatoio di partenza per l'individuazione di potenziali biomarcatori per la B2 e la B3 e per cercare di comprenderne i meccanismi fisiopatologici.

***Conclusioni***

Le urine costituiscono una fonte facilmente accessibile di biomarcatori, in quanto possono essere isolate in maniera semplice e non invasiva. Una strategia per la semplificazione del proteoma urinario, ricco di proteine filtrate dal plasma, come l'albumina, è rappresentata dall'isolamento degli exosomi, nanovesicole di membrana (30-100 nm) rilasciate nell'ambiente extracellulare da diverse tipologie cellulari, tra le quali le cellule dell'epitelio renale, glomerulare e tubulare. La composizione proteica e lipidica degli exosomi presenti nel lume urinario risulta strettamente correlata a quella delle cellule di origine; per questa ragione le indagini di proteomica e lipidomica degli exosomi urinari (UE) si rivelano estremamente valide anche per la comprensione dei meccanismi di danno renale associati a diverse condizioni patologiche. In particolare, in questo lavoro abbiamo focalizzato l'attenzione sulla nefropatia diabetica (DN), una comune complicazione del diabete ed una delle cause più frequenti di insufficienza renale terminale, e sulle tubulopatie ereditarie (SLTs), un gruppo eterogeneo di malattie genetiche rare dell'età pediatrica caratterizzate dalla riduzione del riassorbimento di sodio-cloruro a livello dell'ansa di Henle e/o dei tubuli renali distali.

Alcuni studi hanno già focalizzato l'attenzione sul significato fisiopatologico degli UE nella ND e nelle SLTs; Moon PG *et al.* hanno validato l'abbondanza differenziale, negli UE, di quattro proteine, tra cui la vasorina e la ceruloplasmina, nelle fasi precoci di diverse forme di nefropatia, consentendone la potenziale diagnosi differenziale [Moon PG *et al.*, 2011]. In un lavoro recentissimo, Zubiri I *et al.* hanno studiato i cambiamenti a cui il proteoma degli UE va incontro in pazienti con DN rispetto a controlli sani validando il contenuto differenziale di alcune di queste proteine, come AMBP e VDAC1, tramite SRM (*Selected Reaction Monitoring*) [Zubiri I *et al.*, 2014]; tuttavia gli studi effettuati su pazienti non risultano riproducibili come in un modello animale di malattia, non consentono un monitoraggio costante nel tempo dell'evoluzione della DN e richiedono grandi quantità di urine di partenza per l'isolamento di una quantità sufficiente di exosomi per gli studi successivi.

Gonzales PA *et al.* hanno invece suggerito il possibile ruolo degli UE nella diagnosi delle SLTs confrontando il contenuto proteico dei trasportatori NCC e NKCC2, le cui mutazioni *loss-of-function* sono responsabili della sindrome di Gitelman (GS) e della sindrome di Bartter1 (B1) rispettivamente, dei pazienti corrispondenti rispetto a controlli sani [Gonzales PA *et al.*, 2009]; alcuni lavori recenti hanno inoltre evidenziato che il contenuto della proteina NCC negli UE può fornire una stima dello stato di attivazione del trasportatore stesso *in vivo*, tramite la valutazione del suo stato di fosforilazione [Esteva-Font C *et al.*, 2010; Isobe K *et al.*, 2013].

Date queste premesse, l'obiettivo che ci siamo proposti è stato quello di studiare il proteoma degli UE in: 1) un modello animale di DN, i ratti ZDF (Zucker Diabetic Fatty), e corrispondenti controlli, al fine di contribuire all'identificazione di potenziali biomarcatori diagnostici/prognostici e 2) pazienti affetti da SLTs e controlli sani al fine di proporre un

approccio diagnostico complementare/alternativo all'analisi genetica ed anche in tal caso fornire un punto di partenza per la ricerca di biomarcatori. Abbiamo inoltre cercato di indagare ed approfondire i meccanismi fisiopatologici ed i cambiamenti composizionali a cui le cellule renali vanno incontro in seguito alla comparsa delle due condizioni patologiche.

Per quanto riguarda l'indagine relativa alla DN, l'utilizzo dei ratti ZDF mette a disposizione un modello efficace e riproducibile di DN evolutiva in assenza di alcun tipo di approccio terapeutico, come testimoniato dai valori elevati e crescenti nel tempo di glicemia e proteinuria e come riportato in letteratura.

Per lo studio concernente le SLTs, la casistica raccolta risulta molto ben definita e controllata, sia per la definizione molecolare del difetto genetico sia per le alterazioni delle caratteristiche biochimico-cliniche; la raccolta delle seconde urine del mattino dai pazienti (spesso bambini), effettuata aderendo ad un rigoroso protocollo, assicura inoltre la corretta standardizzazione dei campioni e la minimizzazione della contaminazione da parte di proteine della vescica.

Tra i diversi metodi di isolamento degli UE proposti in letteratura, il protocollo di ultracentrifugazione (UC) rimane la procedura più frequentemente utilizzata, riproducibile ed in grado di garantire un sufficiente grado di purezza delle vescicole ottenute. La proteina più abbondante presente negli UE è la THP o uromodulina, che forma aggregati polimerici co-precipitando insieme agli exosomi stessi [Thongboonkerd V *et al.*, 2006]. Diversi lavori sottolineano l'importanza quindi di una messa a punto di protocolli di deplezione della THP che, tuttavia, determinano anche un minor recupero di materiale vescicolare e quindi la necessità di partire da un volume decisamente più cospicuo di urine, strategia però non praticabile quando si ha a che fare con pazienti, in particolare in età pediatrica, come nel caso delle SLTs [Pisitkun T *et al.*, 2004; Hogan MC *et al.*, 2009; Hiemstra TF *et al.*, 2011; Kosanovic M *et al.*, 2014].

La caratterizzazione biochimica delle vescicole così isolate mediante UC, effettuata valutando nei nostri preparati l'arricchimento di alcuni marcatori, quali Alix, TSG101, Flot1, CD9 e AQP2, ci ha permesso di confermare la correttezza e riproducibilità del protocollo di isolamento adottato, presupposto per l'utilizzo di tale materiale biologico per gli studi di proteomica. Inoltre, avevamo già precedentemente dimostrato mediante microscopia elettronica che le dimensioni delle vescicole da noi isolate risulta coerente con quanto riportato per gli exosomi in letteratura [Pisitkun T *et al.*, 2004; Gonzales PA *et al.*, 2009; Raimondo F *et al.*, 2011].

Per quanto riguarda la DN, il successivo approccio proteomico di tipo *shotgun*, seguito da quantificazione *label-free*, effettuato a partire da un pool di UE di ratti ZDF in presenza di DN avanzata e corrispondenti ratti controlli, ci ha permesso di confrontare il differente pattern proteico degli UE stessi in presenza/assenza di una condizione di nefropatia conclamata e di misurarne eventuali differenze quantitative; il buon numero di proteine differenziali identificate (il 26,6% di proteine upregolate ed il 23,8% di specie proteiche downregolate negli UE di ratti

ZDF rispetto a controlli) ci fornisce un ampio serbatoio di partenza per lo studio delle alterazioni a cui le cellule renali vanno incontro in presenza di DN. La successiva validazione, tramite IB, del contenuto differenziale di un pannello proteico (PEPD, MUP1 e CD10) negli UE di ratti ZDF e controlli a diverse età ha confermato che lo studio degli UE può rappresentare una strategia promettente per l'identificazione di marcatori diagnostici e soprattutto prognostici, al fine quindi di monitorare nel tempo la progressione del danno renale conseguente alla comparsa della DN.

Per quanto concerne lo studio delle SLTs, è stato proposto e validato statisticamente un approccio diagnostico, basato sugli UE, complementare all'analisi genetica, che rappresenta oggi il *gold standard* per queste patologie, e che può risultare estremamente utile in casi a diagnosi incerta, permettendo, in alcune situazioni, di evitare l'esecuzione del test genetico stesso e suggerendo quindi una successiva eventuale modifica dell'iter diagnostico. In particolare l'approccio si rivela estremamente valido nell'esclusione della GS e della B1 a seguito alla rilevazione negli UE, mediante IB, dei trasportatori corrispondenti, NCC e NKCC2. Non solo, l'associazione dei dati densitometrici di NCC e NKCC2 negli UE con i dati biochimico-clinici del paziente in esame permette di suggerire una diagnosi differenziale tra le diverse varianti di SLTs. Inoltre, la possibilità di stabilire una correlazione genotipo-fenotipo, riuscendo ad associare la gravità della mutazione alla quantità dei trasportatori NCC e NKCC2 presenti negli UE, ci consente di confermare ulteriormente che il contenuto proteico exosomiale è rappresentativo dello stato fisiopatologico delle cellule da cui gli exosomi stessi originano.

L'analisi proteomica successiva, in tal caso di tipo *gel-based*, di alcuni spot differenziali di pool di UE di pazienti B2 e B3, separati mediante un tipo particolare di elettroforesi bidimensionale adatto alla focalizzazione di proteine altamente idrofobiche, garantisce un punto di partenza per la selezione di proteine interessanti per l'identificazione di eventuali marcatori utili nel facilitare la diagnosi della sindrome di Bartter2 (B2) e della Bartter3 (B3), per le quali l'analisi mediante IB delle proteine direttamente implicate nella patogenesi, ROMK e CIC-Kb rispettivamente, non aveva portato a risultati soddisfacenti, e per cercare di comprenderne i meccanismi fisiopatologici di base. Un punto critico nella diagnosi delle SLTs è la diagnosi differenziale tra GS e B3; non è stato possibile analizzare mediante spettrometria di massa tutti gli spot excisi e di conseguenza la scelta degli spot differenziali è stata prevalentemente indirizzata in questa direzione. L'analisi degli spot selezionati (7 spot dal profilo diagonale dei pazienti B2 e 9 spot dei pazienti B3) ci ha portato all'identificazione di alcune proteine interessanti, in quanto possibilmente implicate nella fisiopatologia del tubulo renale e nei meccanismi di secrezione/riassorbimento tubulare, il cui contenuto differenziale tra i vari gruppi di pazienti SLTs verrà in futuro verificato mediante IB.

In conclusione, possiamo affermare che la composizione proteica degli exosomi urinari risulta alterata in maniera riproducibile in presenza di condizioni patologiche che colpiscono il sistema renale, come la nefropatia diabetica e le tubulopatie ereditarie; lo studio del proteoma

exosomiale risulta particolarmente interessante in quanto consente di correlare le modificazioni a livello tissutale con quelle che si riscontrano nei fluidi biologici. Le differenze evidenziate possono costituire un punto di partenza per l'identificazione di biomarcatori diagnostici/prognostici e per il chiarimento di alcuni meccanismi patogenetici di queste malattie.

# ***Bibliografia***

- Abid Hussein M.N., Böing A.N., *et al.*, 2007. *Thromb Haemost*, 98(5):1096-107.
- Abuladze N., Yanagawa N., *et al.*, 1998. *J Am Soc Nephrol*, 9(5):819-26.
- Achard J.M., Disse-Nicodeme S., *et al.*, 2001. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28:1048-52.
- Admyre C., Grunewald J., Thyberg J., *et al.*, 2003. *Eur Respir J*, 22,578-583
- Akao Y., Iio A., Itoh T *et al.*, 2011. *Mol Ther*, 19:395-399.
- Alter M.L., Kretschmer A., Von W. *et al.*, 2012. *Clin Lab*, 58:659-671.
- Alvarez M.L., Khosroheidari M., Kanchi Ravi R. *et al.*, 2012. *Kidney Int*, 82:1024-1032.
- Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H. *et al.*, 2011. *Nat Biotechnol*, 29:341-345.
- Amann B., Tinzmann R. & Angelkort B., 2003. *Diabetes Care*,26(8):2421-2425.
- Andre F., Schartz N.E., Movassagh M., Flament C., 2002. *Lancet*,360:295–305.
- Andreola G., Rivoltini L., Castelli C. *et al.*, 2002. *Exp Med*,195(10):1303-16.
- Ataoglu E., Civilibal M. *et al.*, 2009. *Indian J Pediatr*, 76(3):322-3.
- Aupeix K., Hugel B., Martin T., Bischoff P.J., 1997. *Clin Invest*, 99:1546–1554.
- Baba T., Murabayashi S., Tomiyama T. *et al.*, 1990. *Exp Med*, 161, 311–318.
- Babst M., 2005. *Traffic*, 6:2–9.
- Bachmann S., Mutig K. *et al.*, 2005. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288(3):F559-67.
- Balaj L. *et al.*, 2011. *Nature Commun*, 2:180.
- Balboni G. *et al.* Anatomia Umana, 3<sup>a</sup> ed., Milano, edi-ermes [1976], Ristampa 2000.
- Ballermann B.J., Skorecki K.L. & Brenner B.M., 1984. *The American Journal of Physiology*, 247(1 Pt 2), pagg.F110-116.
- Bard M.P., Hegmans J.P., Hemmes A. *et al.*, 2004. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31:114-121.
- Barry O.P., Pratico D., Savani R.C., FitzGerald G.A., 1998. *J Clin Invest*, 102:136-44.
- Bartter F.C. *et al.*, 1962. *Am J Med*, 33:811-28.
- Barutta F., Tricarico M., Corbelli A. *et al.*, 2013. *Plos One*, 8(11):e73798.
- Beckett K., Monier S., Palmer L. *et al.*, 2013. *Traffic*, 14:82-96.
- Bellingham S.A., Coleman B.M. & Hill A.F. 2012. *Nucleic Acid Res*, 40:10937-10494.
- Berckmans R.J., Neiuwland R., Boing A.N., Romijn F.P., 2001. *Thromb Haemost*, 85:639–646.
- Berne Robert M. *et al.*, Fisiologia, Milano, Ambrosiana, 2000.
- Bettinelli A., Bianchetti M.G. *et al.*, 1995. *Kidney Int*, 47(2):547-51.
- Bettinelli A., Borsa N. *et al.*, 2007. *Am J Kidney Dis*, 49(1):91-8.
- Bhatnagar S., Schorey J.S., 2007. *J Biol Chem*, 282:25779-8.
- Biancone L., Bruno S., Deregibus M.C. *et al.*, 2012. *Nephrol Dial Transplant*, 27:3037-42.
- Bichet D., Haass FA., *et al.*, 2003. *Nat rev Neurosci*, 4:957-967.
- Bichet D.G., 2006. *Semin Nephrol*, 26:224-33.
- Birkenhager R. *et al.*, 2001. *Nat Genet*, 29:310-4.
- Blanchard N., Lankar D., Faure F., Regnault A., 2002. *J Immunol*, 168:3235–3241.
- Bloembergen W. E., Port F. K., Mauger E. A. & Wolfe R. A. J., 1995. *J Am Soc Nephrol*, 6:177–183.
- Bondarenko P.V., Chelius D. & Shaler T.A., 2002. *Anal Chem*, 74(18):4741-9.
- Bouvier J., Zemski Berry K.A., Hullin-Matsuda F. *et al.*, 2009. *J Lipid Res*, 50(2):243-55.
- Brousius F.C., Alpers C.E., Bottinger E.P., 2009. *J Am Soc Nephrol*, 20(12):2503-12.



- Brown E.M. *et al.*, 1998. *Recent Progr Horm Res*, 53:257-80.
- Brownlee M., 2001. *Nature*, 414(6865):813-820.
- Caby M.P., Lankar D., Vincendeau-Scherrer C. *et al.*, 2005. *Int Immunol*, 17:879-87.
- Cai H., Reinisch K. & Ferro Novick S., 2007. *Dev Cell*, 12:671-682.
- Calcutt N.A., Cooper M.E., Kern T.S., Schmidt A.M., 2009. *Nat Rev Drug Discov*, 8(5):417-29.
- Calò L.A., Pessina A.C. *et al.*, 2005. *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 12:17-26.
- Calò L.A., Marchini F. *et al.*, 2003. *J Nephrol*, 16(1):144-7
- Calò L.A., Puato M. *et al.*, 2008. *Nephrol Dial Transplant*, 23(9):2804-9.
- Canani L.H. *et al.*, 2002 *Diabetes*; 51(4) :1188-1193.
- Canani L.H. *et al.*, 2005. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*; 22(9):1167-1172.
- Caramori M.L. *et al.*, 2003. *Diabetes*; 52(12) :3010-3013.
- Carpena M.P. *et al.*, 2010. *Arquivos Brasileiros De Endocrinologia e Metabologia*;54(3):253-261.
- Castrop H. & Schnermann J., 2008. *Am J Physiol Renal Physiol*; 295(4):F859-66.
- Cha D. R. *et al.*, 2005. *Diabet Med*; 22:14-20.
- Cha D. R. *et al.*, 2005. *Nephrology (Carlton)*; 10 Suppl:S37-39
- Chavakis T. *et al.*, 2003. *J Exp Med*, 198:1507-1515.
- Chavez-Munoz C., Kilani R.T., Ghahary A., 2009. *J Cell Physiol*, 221:221-231.
- Chen S., Wolf G. & Ziyadeh F.N., 2001. *Contributions to Nephrology*, 135:212-221.
- Chen Y.C., Cadnapaphornchai M.A. & Schrier R.W., 2005. *Biol Cell*, 97:357-371.
- Chen C.Y., Hogan M.C., Ward C.J., 2013. *Methods Enzymol*; 524:225-241.
- Cheng H. F., Burns K. D. & Harris R. C., 1994. *Kidney Int*, 46:1603-1610.
- Chou C.H., Chuang L.Y., Lu Y. *et al.*, 2013. *Mol and Cell Endocrinology*, 366(1):21-30.
- Chu Z., Witte D.P., Qi X., 2005. *Exp Cell Res*, 303:300-7.
- Clayton A., Court J., Navabi H. *et al.*, 2001. *J Immunol Methods*, 247:163-74.
- Clayton A., Mitchell J.P., Court J. *et al.*, 2007. *Cancer Res*, 67(15):7458-66.
- Clayton A., Turkes A., Dewitt S., Steadman R., 2004. *FASEB J*, 18:977-979.
- Colombo M., Moita C., van Niel G. *et al.*, 2013. *J Cell Sci*, 126:5553-5565.
- Colussi G., Bettinelli A. *et al.*, 2007. *Clin J Am Nephrol*, 2(3):454-60.
- Conde -Vancells J., Rodriguez-Suarez E., Embade N. *et al.*, 2008. *J Prot Res*, 7:5157-66.
- Conde-Vancells J., Rodriguez-Suarz E., Gonzales E. *et al.*, 2010. *Proteomics: Clin Appl*, 4, 416-425.
- Cortesi C., Foglia P.E. *et al.*, 2003. *Pediatr Nephrol*, 18(8):729-30.
- Cortesi C., Lava S.A., Bettinelli A., 2010. *Pediatr Nephrol*, 25(10):2005-2008.
- Coto E., Arriba G., Garcia-Castro M. *et al.* 2009. *Am J Nephrol*, 30:218-221.
- Coto E., Rodriguez J., Jeck N. *et al.*, 2004. *Kidney Int*;65:25-29.
- Cruz D.N., Shaer A.J., Bia M.J. *et al.*, 2001. *Kidney Int*, 59:710-717.
- Davis P.A., Mussap M. *et al.*, 2006. *Nephrol Dial Transplant*, 21(6):1697-701.
- De Gasparo M., Catt K.J. *et al.*, 2000. *Pharmacol Rev*, 52(3):415-72.
- De Gassart A., Geminard C., Hoekstra D., Vidal M., 2004. *Traffic*, 5:896-903.
- De Gassart A., Gérminard C., Février B., 2003. *Blood*, 102:4336-4344.

- De Jong J.C., Can der Vliet W.A. *et al.*, 2002. *JASN*; 13(6):1442–1448.
- Dear J.W., Street J.M. & Bailey M.A., 2013. *Proteomics*, 13: 1572-1580.
- Deeds M.C., Anderson J.M., Armstrong A.S. *et al.*, 2011. *Lab Anim*, 45:131-140.
- Deedwania P.C., 2000. *Archives of Internal Medicine*, 160(11):1585-1594.
- Del Boccio P., Pieragostino D. *et al.*, 2011. *J Proteomics*, 74(12):2826-36.
- Denzer K., Kleijmeer M.J., Heijne H., 2000. *J Cell Sci*, 113:3365-3374.
- Derst C., Konrad M. *et al.*, 1997. *Biochem Biophys Res Commun*, 230(3):641-5.
- Desai M., Kolla P.K. & Reddy P.L., 2013. *Case Rep Med*, 2013:197374
- Devaraj S., Cheung A.T., Jialal I. *et al.*, 2007. *Diabetes*, 56(11):2790-2796.
- Dihazi Z., Muller G.A., Lindner S *et al.*, 2007. *Clin Chem*; 53:1636-1645.
- Dimke H., 2011. *Eur J Physiol*, 462:767-777.
- DiPetrillo K., Coutermarsh B. & Gesek F., 2003. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284:F113-121.
- Duran-Salgado M.B., Rubio-Guerra A.F., 2014. *World J Diabetes*, 5(3):393-398.
- Elmarakby A.A., Sullivan J.C., 2012. *Cardiovasc Ther*, 30(1):49-59.
- Escudier B., Eisen T., Stadler W.M., 2009. *J Clin Oncol*, 27(20):3312-3318.
- Escudier B., Eisen T., Stadler W.M., 2007. *N Engl J Med*, 356(2):125-134.
- Esteva-Font C., Wang X., Ars E. *et al.*, 2010. *Nephron Physiol*, 114:25-34.
- Estevez R. *et al.*, 2001. *Nature*, 414: 558-61.
- Fanconi A. *et al.*, 1971. *Helv Paediat Acta*, 2:144-63.
- Fang D.Y.P., King H.W., Li J.Y.Z., 2013. *Nephrology*, 18:1-10.
- Favaro S. *et al.*, 2002. *Anatomia e fisiologia del rene -Policlinico Universitario– Padova*.
- Fend D., Zhao W.L., Ye Y.Y. *et al.*, 2010. *Traffic*, 11:675-87.
- Fernandez-Juarez G., Luno J., Barrio V. *et al.*, 2013. *Am J of Kidney Dis*, 61(2):211-218.
- Février B. & Raposo G., 2004. *Curr Opin in Cell Biol*, 14:415-421.
- Février B., Villette D., Archer F., 2004. *Proc Natl Acad Sci*, 101(26):9683-88.
- Finer G., Shalev H. *et al.*, 2003. *J Pediatr*, 142(3):318-23.
- Fioretto P. *et al.*, 1996. *Diabetologia*, 39(12):1569-1576.
- Forbes J.M. *et al.*, 2001. *Diabetologia*, 44(1):108-114.
- Fowlkes J.L. *et al.*, 1995. *Progress in Growth Factor Research*, 6(2-4):255-263.
- Fremont O.T. & Chan J.C., 2012. *World J Pediatr*, 8(1):25-30.
- Gagnon K.B. & Delpire E., 2013. *Am J Physiol Cell Physiol*, 304(8):C693-714.
- Gamba G., 2009. *Am J Phys Renal Phys*, 297(4):F838–48.
- Gastpar R., Gehrman M., Bausero M.A. *et al.*, 2005. *Cancer Res*, 65(12):5238-47.
- Ghossoub R., Lembo F., Rubio A. *et al.*, 2014. *Nat Commun*, 5:3477.
- Gianazza E., Chinello C., Mainini V. *et al.*, 2012. *J Proteomics*, 76:125-40.
- Gildea J.J., Seaton J.E., Victor K.G. *et al.*, 2014. *Clin Biochem*, S0009-9120(14):00414-7.
- Giller K., Huebbe P., Doering F. *et al.*, 2013. *Proc R Soc B*, 280:20130101.
- Giri P.K., Kruh N.A., Dobos K.M., Schorey J.S., 2010. *Proteomics*, 10(17):3190-202.
- Glowatzki E., Fakler G. *et al.*, 1995. *Proc Biol Sci*, 261(1361):251-61.
- Gonzales P.A., Pisitkun T., Hoffert J.D. *et al.*, 2009. *J Am Soc Nephrol*, 20:363-379.
- Gooch J.L. *et al.*, 2001. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(45):42492-42500.
- Gore-Hyer E. *et al.*, 2002. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283:F707-716.

- Graner M.W., Alzate O., Dechkovskaia A.M., Keene J.D., 2009. *Faseb J*, 23:1541-1557.
- Graves L.E., Aritzia E.V., Navari J.R. *et al.*, 2004. *Cancer Res*, 64(19):7045-9.
- Gruden G. *et al.*, 2003. *Kidney Int*, 63:1249-1255.
- Gyorgy B., Szabò T.G., Pasztoi M. *et al.*, 2011. *Cell Mol Life Sci*, 68:2667-2668.
- Ha, H. & Kim, K.H., 1999. *Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, 19 Suppl 2:S228-233.
- Habib S.L., 2013. *World J Diabetes*, 4(2):27-30.
- Hakim R.M., 1993. *Kidney Int*, 44(3):484-94.
- Hakomori S., Handa K., 2002. *Leff*, 531:88-92.
- Han S.Y. *et al.*, 2006. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 21(9):2406-2416.ans
- Haneda M., Koya D., Isono M. & Kikkawa R., 2003. *J Am Soc Nephrol*, 14:1374-1382.
- Hao C. M., Komhoff M., Guan Y. *et al.*, 1999. *Am J Physiol*, 277:F352-359.
- Harder T., Scheiffele P., Verkade P., 1998. *J Cell Biol*, 141:929-942.
- Harris R. D., Steffes M. W., Bilous R. W. *et al.*, 1991. *Kidney Int*, 40:107-114.
- Hayama A., Rai T. *et al.*, 2003. *Histochem Cell Biol*, 119(6):485-93.
- Hebert S.C., 1996. *Kidney Int*, 50:2129-39.
- Hegmans J.P., Bard M.P. *et al.*, 2004. *Am J Pathol*, 164(5):1807-15.
- Heidland A., Sebekova K. & Schinzel R. 2001. *Am J Kidney Dis*, 38:S100-106.
- Heijnen H.F., Schiel A.E., Fijnheer R. *et al.*, 1999. *Blood*, 94:3791-9.
- Heilig C. W. *et al.*, 2001. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280:F657-666.
- Hellemans M.E., Kerschbaum J., Bakker S.I. *et al.*, 2012. *Diabet Med*, 29:567-577.
- Hempe J., Elvert R., Schmidts H.L. *et al.*, 2012. *Lab Anim*, 46:32-39.
- Henne W.M., Buchkovich N.J. & Emr S.D., 2011. *Dev Cell*, 21:77-91.
- Hiemstra T.F., Charles P.D., Garcia T. *et al.*, 2011. *J Am Soc Nephrol*, 25(9):2017-2027.
- Hill C. *et al.*, 2001. *The Journal of Endocrinology*, 170(3):647-651.
- Hills C.E. & Squires P.E., 2010. *Am J Nephrol*, 31(1):68-74.
- Hogan M.C., Manganelli L., Woollard R.J. *et al.*, 2009. *J Am Soc Nephrol*, 20:278-288.
- Hoorn E.J., Pisitkun T., Zietse R. *et al.*, 2005. *Nephrology (Carlton)*, 10:283-290.
- Horie K. *et al.*, 1997. *J Clin Invest*, 100:2995-3004.
- Hostetter T.H. & Ibrahim H.N., 2003. *J Am Soc Nephrol: JASN*, 14(9):2395-2401.
- Hovind P. *et al.*, 2001. *Kidney Int*, 59(2):702-709.
- Hricik D. E., 1998. *Kidney Int*, 53:1091-1102.
- Hu G., Drescher K.M. & Chen X.M., 2012. *Frontiers in Genetics*, 20:3-56.
- Huber V., Fais S., Iero M. , 2005. *Gastroenterology*, 128:1796-1804.
- Hui X., Zhu W., Wang K. *et al.*, 2009. *J Biol Chem*, 284:14050-14057.
- Hurley J.H., 2008. *Curr Opin Cell Biol*, 20(1):4-11.
- Iglesias-de la Cruz M. C. *et al.*, 2002. *Kidney Int*, 62:901-913.
- Imig J.D., 2006. *Cardiovasc. Drug Rev*; 24(2):169-88.
- Isobe K., Mori T., Asano T. *et al.*, 2013. *Renal Physiol*, 305:F1374-F1381.
- Jacquillet G., Hoorn E.J., Vilasi A. *et al.*, 2013. *Nephrol, Dialysis, Transpl*, 28:1425-1433.

- Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M. *et al.*, 2005. *Int J Cancer*; 113:752–60.
- Jansen F.H., Krijgsveld J. *et al.*, 2009. *Mol Cell Proteomics*, 8(6):1192-205.
- Janssen U., Phillips A.O. & Floege J., 1999. *Kidney Blood Pressure Res*, 22:81-97
- Jeck N., Konrad M. *et al.*, 2000. *Pediatr Res*,48(6):754-8.
- Jeck N. *et al.*, 2005. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 288(4):R782-95.
- Jeck N., Derst C. *et al.*, 2001. *Kidney Int*, 59(5):1803-11.
- Jefferson J.A., Shankland S.J. & Fichler R.H., 2008. *Kidney Int*; 74(1):22-36.
- Jensen, T., 1997. *Diabetes*, 46 Suppl 2:S98-100.
- Jeong, H.S. *et al.*, 2004. *Journal of Korean Medical Science*, 19(3):374-383.
- Ji W., Foo J.N. *et al.*, 2008. *Nat Genet*, 40(5):592-9.
- Jiang L., Chen C., Yuan T. *et al.*, 2014. *Am J of Nephrol*, 39:357-366.
- Johnstone R.M., Adam M., Hammond J.R., 1987. *J Biol Chem*, 262:9412-9420.
- Joo K.W., Lee J.W., Jang H.R. *et al.*, 2007. *Am J Kidney Dis*, 50:765-773.
- Kagami S., Kuhara T., Okada K. *et al.*, 1997. *Kidney Int*; 51(3):664-71.
- Kamiyama M., Zsombok A. & Kobori H., 2012. *J Pharm Sciences*, 119(4):314-323.
- Kanasaki K., Tadari G. & Koya D., 2013. *Frontiers in Endocr*, 4:7.
- Kang M. J., Ingram A., Ly H. *et al.*, 2000. *Kidney Int*, 58, 1677–1685.
- Kang S.W. *et al.*, 2003. *J Am Soc Nephrol*, 14:3178–3187.
- Karet F.E., Finberg K.E. *et al.*, 1999. *Nat Genet*, 21(1):84-90.
- Karet F.E., 2002. *J Am Soc Nephrol*, 13:2178-2184.
- Karolyi L., Koch M.C. *et al.*, 1998. *J Mol Med*, 76:317–325
- Katzmann D.J., Bbst M. & Emr S.D., 2001. *Cell*, 106:145-155.
- Keller S., Rupp C., Stoeck A. *et al.*, 2007. *Kidney Int*, 72:1095-1102.
- Keller S., Ridinger J., Rupp A.K. *et al.*, 2011. *J Transl Med*, 9:86.
- Kieferle S., *et al.*, 1994. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91:6943-7.
- Kim H.J. *et al.*, 2007. *J Proteome Res*, 6:735–743.
- Kimmelstiel P., 1963. *Minn Med*, 46:1097-103.
- King A.J.F., 2012. *British Journal Of Pharmacology*, 166:877-894.
- Kleta R. & Bockenhauer D., 2006. *Nephron Physiol*; 104(2):p73-80.
- Knoers N.V.A.M., Levtchenko E.N., 2008. *Orphanet J Rare Diseases*, 3:22.
- Knoers N.V.A.M., Starremans P.G.J.F. *et al.*, 2005. *In Oxford Textbook in Clinical Nephrology Third edition. Oxford University Press*, 2005:995-1004.
- Ko G.J., Kang Y.S., Han S.Y. *et al.*, 2008. *Nephrol Dial Transplant*, 23(9):2750-60
- Kolm-Litty V., Sauer U., Nerlich A. *et al.*, 1998. *J Clin Invest*, 101:160–169.
- Kolm-Litty V., Tippmer S., Haring H. U. *et al.*, 1998. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 106:377–383.
- Konrad M., Vollmer M. *et al.*, 2000. *J Am Soc Nephrol*, 11(8):1449-59.
- Kosanovic M., Jankovic M. *et al.*, 2014. *Biotechniques*, 57:143-149.
- Koster J.C., Bentle K.A. *et al.*, 1998. *Biophys J*, 74(4):1821-9.
- Kowal J., Tkach M., Thery C., 2014. *Curr Opin in Cell Biol*, 29:116-125.
- Kumar R., Sharma R.K. & Agarwal S., 2013. *Biochem Genet*, 51(11-12):865-75.
- Lai R.C., Ye R.W., Tan K.H. *et al.*, 2013. *Biotechnol Adv*, 31:543-551.

- Lamparski H.G., Looze C., Yui D. *et al.*, 2009. *Biochem Biophys Res Commun*, 378:433-438.
- Laulagnier K., Motta C., Hamdi S. *et al.*, 2004. *Biochem J*, 380:161–71.
- Lebovitz H.E., 1994. *Diabetes Care*, 17(12):1542-4.
- Lee M.Y., Shim M.S., Kim B.I.I. *et al.*, 2011a. *Diabetes Metab J*, 35:130-137.
- Lemmink H.H., Knoers N.V., Karolyi L. *et al.*, 1998. *Kidney Int*, 54:720–730.
- Li Y., Zhang Y., Qiu F., Qiu Z., 2011. *Electrophoresis*, 32(15):1976-83.
- Lieberthal W., Levine J.S., 2009. *J Am Soc Nephrol*, 20(12):2493-502.
- Lim P.K., Bliss S.A., Patel S.A. *et al.*, 2011. *Cancer Res*, 71: 1550-1560.
- Lin S.H., Shiang J.C., Huang C.C. *et al.*, 2005. *J Clin Endocrinol Metab*, 90:2500-2507
- Liu C., Yu S., Kappes J. *et al.*, 2007. *Blood*, 109:4336–42.
- Liu Z. H., Guan T. J., Chen Z. H. & Li L. S., 1999. *Kidney Int*, 55:1843–1848.
- Lo C.S., Liu F., Shi Y. *et al.*, 2012. *Am J of Physiol: Renal Physiol*, 302(7):F840-F852.
- Looze C., Yui D., Leung L. *et al.*, 2009. *Biochem Biophys Res Commun*, 378:433-8.
- Luga V., Zhang L., Vilorio-Petit A.M. *et al.*, 2012. *Cell*, 151:1542-1556.
- Luo S.S., Ishibashi O., Ishikawa G., Ishikawa T., 2009. *Biol Reprod*, 81:717-729.
- Luthy C., Bettinelli A., Iselin S. *et al.*, 1995. *J. Kidney Dis*, 25:828-829.
- Maeda S., Kobayashi M.A., Araki S. *et al.*, 2010. *Plos Genet*, 6(2):e1000842.
- Majno G., Joris I.J., 1995. *Pathol*, 146:3–15.
- Malafronte C., Borsa N. *et al.*, 2004. *Pediatr Nephrol*, 19(12):1413-5.
- Mancia G. & Grassi G., 2009. *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*, 27(1):S19-23.
- Mason R.M. & Wahab N.A., 2003. *JASN*, 14(5):1358-1373.
- Mastroianni N., Bettinelli A. *et al.*, 1996. *Am J Hum Genet*, 59(5):1019-26.
- Masyuk A.I., Huang B.Q., Ward C.J. *et al.*, 2010. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299(4):G990-9.
- Mathivanan S., Lim J.W., Tauro B.J., Ji H., 2010. *Mol Cell Proteomics*, 9:197-208.
- Matsuo H., Chevallier J., Mayran N. *et al.*, 2004. *Science*, 303(5657):531-4.
- Mauer S.M. *et al.*, 1984. *The Journal of Clinical Investigation*, 74(4):1143-1155.
- McCredie D.A. *et al.*, 1971. *Med J Aust*, 1:129-35.
- Mears R., Craven R.A., Hanrahan S. *et al.*, 2004. *Proteomics*, 4(12):4019-31.
- Melander O., Orho-Melander M., Bengtsson K. *et al.*, 2000. *Hypertension*, 36:389–394.
- Menne J., Shushakova N, Bartels J *et al.*, 2013. *Diabetes*, 62(4):1167-1174.
- Merchant M.L., Powell D.W., Wilkey D.W. *et al.*, 2010. *Proteomics: Clin. Appl*, 4:84-96.
- Mezzano S. *et al.*, 2003. *Kidney Int Suppl*, S64-70.
- Mima A., 2013. *J Diabetes Res*, 2013:248563.
- Miranda K.C., Bond D.T., McKee M. *et al.* 2010. *Kidney Int*, 78:191-199.
- Mittelbrunn M., Gutierrez-Vazquez C., Villaroya-Beltri C. *et al.*, 2011. *Nat Commun*, 2:282.
- Mizuno S. & Nakamura T., 2004. *Am J Phys Renal Phys*, 286(1):F134-143.
- Mobius W., van Donselaar E., Ohno-Iwashita Y., 2003. *Traffic*, 4:222-231.
- Mogensen C.E. & Christensen C.K., 1984. *The New England Journal of Medicine*, 311(2):89-93.

- Mogensen C.E. *et al.*, 1990. *The Journal of Diabetic Complications*, 4(4):159-165.
- Mogensen C.E., 1984. *The New England Journal of Medicine*, 310(6):356-360.
- Mogensen C.E., Christensen C.K. & Vittinghus E., 1983. *Diabetes*, 32 Suppl 2:64-78.
- Momen-Heravi F., Balaj L., Alian S. *et al.* 2013. *Biol Chem*, 394(10):1253-1262.
- Montecalvo A., Larregina A.T., Shufesky W.J. *et al.*, 2012. *Blood*, 119:756-766.
- Moresco R.N., Sangoi M.B., De Carvalho J.A. *et al.*, 2013. *Clin Chim Acta*, 421:17-30.
- Morse M.A., Chui S. *et al.*, 2005. *Nat Clin Pract Oncol*, 2(2):108-13.
- Musante L., Saraswat M., Duriez E. *et al.*, 2012. *Plos One*, 7:e37279.
- Nabham J.F., Hu R., Oh R.S. *et al.*, 2012. *Proc Natl Acad Sci*, 109:4146-4151.
- Nadarajah R., Milagres M., Dilauro M. *et al.*, 2012. *Kidney Int*, 82(3):292-303.
- Naesens M. *et al.*, 2004. *Nephron Physiol*, 96(3):65-78.
- Nanni P., levander F., Roda G. *et al.*, 2009. *J Chrom B Anal Technol Biomed Life Sci*, 877:3127-3136.
- Narita T. *et al.*, 2006. *Diabetes Care*, 29(1):142-144.
- Navarro J.F., Milena F.J., Mora C. *et al.*, 2005. *Kidney Int Suppl*, (99):S98-102.
- Navarro-Gonzalez J. F. & Mora-Fernandez C., 2008. *J Am Soc Nephrol*, 19:433-442.
- Ng D.P.K. *et al.*, 2002. *Diabetes*, 51(7):2264-2269.
- Ng P.C. & Henikoff S., 2001. *Genome Res*, 11:863-874.
- Ng P.C. & Henikoff S., 2003. *Nucleic Acids Res*, 31(13):3812-3814.
- Nguyen D.G., Booth A., Gould S.J. *et al.*, 2003. *J Biol Chem*, 278:52347-52354.
- Neilson K.A., Ali N.A., Muralhidaran S., 2011. *Proteomics*, 11(4):535-53.
- Neugarten J. & Golestaneh L., 2013. *Advances In Chronic Kidney Diseases*, 20(5):390-395.
- Nielsen S.E., Reinhard H., Zdunek D. *et al.*, 2012. *Diabetes Res Clin*, 97:71-6.
- Nielsen S.E., Sugaya T., Tarnow L.E. *et al.*, 2009. *Diabetes Care*, 32:1684-8.
- Nielsen S., Frokiaer J. *et al.*, 2002. *Physiol Rev*, 82(1):205-44
- Nilsson J., Skog J., Nordstrand A. *et al.*, 2009. May 19;100(10):1603-7.
- Nirmalan N.J., Hughes C., Peng J. *et al.*, 2011. *J Proteome Res*, 10:896-906.
- Nolte-<sup>4</sup> Hoen E.N., Buermans H.P. Waasdorp M. *et al.*, 2012a. *Nucleic Acid Res*, 40:9272-9285.
- Nolte-<sup>4</sup> Hoen E.N., van der Vlist E.J., Aalberts M. *et al.*, 2012b. *Nanomedicine*, 8:712-720.
- Ohlsson A. *et al.*, 1984. *Acta Paediatr Scand*, 73:868-74.
- Oosthuyzen W., Sime N.E., Ivy J.R. *et al.*, 2013. *J Physiol*, 591(Pt 23):5833-5842.
- Ostrowski M., Carmo N.B., Krumenich S. *et al.*, 2010. *Nat Cell Biol*, 12:19-30.
- Pacheco-Alvarez D., Cristobal P.S. *et al.*, 2006. *J Biol Chem*, 281(39):28755-63.
- Pagnin E., Davis P.A. *et al.*, 2004. *J Hypertens*, 22(10):1963-9.
- Palmer N.D., Freedman B.I., 2012. *Curr Diab Rep*, 12(4):423-431.
- Pan B.T. e Johnstone R.M., 1983. *Cell*, 33(3):967-978.
- Panchapakesan U., Pegg K., Gross S. *et al.*, 2013. *Plos One*, 8(2):e54442.
- Papale M., Di Paolo S., Magistrone R. *et al.*, 2010. *Diabetes Care*, 33(11):2409-2415.
- Paredes A, Plata C, Rivera M *et al.* 2006. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290:F1094-1102.
- Parolini I., Sangiacomo M., Lisanti M.P., 1996. *Peschle C Blood*, 87:3783-3794.

- Paulmurugan R., 2013. *Theranostics*, 3:927-929.
- Peake P.W., Pianta T.J., Succar L. *et al.*, 2014. *Plos One*, 11:9(2):e98644.
- Pelchen-Matthews A., Raposo G., Marsch M., 2004. *Trend Microbiol*, 12:310-316.
- Pereira P.C., Miranda D.M., Oliveira E.A. *et al.*, 2009. *Curr Genomics*; 10:51-59.
- Pezzolesi M.G., Poznik G.D., Mychaleckyj J.C. *et al.*, 2009. *Diabetes*; 58(6):1403-1410.
- Pisitkun T., Shen R.F., Knepper M.A., 2004. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101:13368–13373.
- Pontremoli R. *et al.*, 1997. *Kidney Int Supplement*, 63:S163-165.
- Preisig-Müller R., Schlichthörl G. *et al.*, 2002. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99(11):7774-9.
- Puricelli E., Bettinelli A., Borsa N. *et al.*, 2010. *Nephrol Dial Transplant*, 25:2976-2981.
- Quaggin S.E. *et al.*, 1995. *Mamm Genome*, 6:557-61.
- Rabinowits G., Gerçel-Taylor C., Day J.M., 2009. *Clin Lung Cancer*, 10(1):42-46.
- Raimondo F., Morosi L., Chinello C. *et al.*, 2011. *Proteomics*, 11:709-720.
- Rampoldi L., Scolari F., Amoroso A. *et al.*, 2011. *Kidney Int*, 80:338-347.
- Rao P. V. *et al.*, 2007. *Diabetes Care*; 30:629–637.
- Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W., Liejendekker R., 1996. *J Exp Med*, 183:1161–1172.
- Raposo G. & Stoorvogel W., 2013. *J Cell Biol*, 200(4): 373-383.
- Raval R.R., Lau K.W., Tran M.G. *et al.*, 2005. *Mol Cell Biol*, 25:5675–5686.
- Re R.N., Cook J.L., 2009. *J Cell Sci Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297:H893-901
- Record M., Subra C., Silvente-Poirot S., 2011. *Biochem Pharmac*, 81(10):1171-82.
- Reeves W.B. *et al.*, 1994. *Adv Nephrol*, 23:177-90.
- Reis L.A., Borges F.T., Simoes M.J. *et al.*, 2012. *PLoS One*, 7:e44092.
- Riancho J.A., Saro G., Sanudo C. *et al.*, 2006. *Nephrol Dial Transplant*, 21:217-220.
- Riccardi D., Lee W.S. *et al.*, 1996. *Am J Physiol*, 271:F951-F956.
- Riser B.L., Cortes P. & Yee J., 2000. *Nephrol Hypertens*, 9:43–47.
- Ristorcelli E., Beraud E., Mathieu S. *et al.*, 2009. *Int J Cancer*, 125:1016-1026.
- Ritz J., Pesando J.M., Notis-McConarty J. *et al.*, 1980. *Nature*, 283(5747):583-5.
- Riveira-Munoz E., Chang Q., Bindels R.J., Devuyst O., 2007. *Pediatr Nephrol*, 22:326–332
- Robbins P.D. & Morelli A.E., 2014. *Nat Rev Immunol*, 14(3):195-208.
- Rodby R.A., Lewis E.J., 1996. *Pharmacoeconomics*, 10(4):315-20.
- Rodriguez-Soriano J., Vallo A., Perez de Nanclares G. *et al.*, 2005. *Pediatr Nephrol*; 20(7):891-6.
- Roma-Rodrigues C., Fernandes A.R., Baptista P.V., 2014. *Biomed Res Int*, 2014:179486.
- Rood I.M., Deegens J.K., Merchant M.L. *et al.*, 2010. *Kidney Int*, 78:810-816.
- Russell P., *Biology : the dynamic science.*, 2nd ed., Belmont, CA, Brooks/Cole, Cengage Learning, 2011, pp. 304.
- Saal S., Harvey S.J. , 2009. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 18(4):317-323.
- Safaei R., Larson B.J., Cheng T.C., 2005. *Mol Cancer Ther*, 4:1595-1604.
- Sahli S., Stump B., Welti T. *et al.*, 2004. *Chembiochem*, 5(7):996-1000.
- Saito-Ohara F. *et al.*, 1996. *Genomics*, 36:372-4.
- Salih M., Zietse R., Hoorn E.J., 2014. *Am J Physiol Renal Physiol*, 306:F1251-1259.
- San-Cristobal P., De los Heros P. *et al.*, *Am J Nephrol*, 28 (5):860–70.

- Santos K.G. *et al.*, 2005. *J Nephrol*; 18(6):733-738.
- Sasai Y., Iwakawa K., Yanagida K. *et al.*, 2012. *Biosci, Biotech and Biochem*; 76(9):1741-1745.
- Savina A., Furlan M., Vidal M., Colombo M.I., 2003. *J Biol Chem*; 278:20083-90.
- Schram G., Melnyk P. *et al.*, 2002. *J Physiol*; 544(Pt 2):337-49.
- Schulte U., Hahn H. *et al.*, 1999. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96(26):15298-303.
- Scriver C. *et al.*, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Eighth Edition.
- Segura E., Guerin C., Hogg N. *et al.*, 2007. *J Immunol*; 179:1489-96.
- Seok S.J., Lee E.S., Kim G.T. *et al.*, 2013. *Nephrol Diab Transplant*; 28(7), 1700-10.
- Seyberth H.W. *et al.*, 1987. *Pediatr Nephrol*; 1:491-497.
- Seyberth H.W. *et al.*, 1985. *J Pediatr*; 107(5):694-701.
- Shakher J., Stevens M.J., 2011. *Diabetes Metab Syndr Obes*; 4:289-305.
- Shao H., Min C., Issadore D. *et al.*, 2012. *Theranostic*; 2:55-65.
- Shinada M., Akdeniz A. *et al.*, 2000. *J Clin Endocrinol Metab*; 85:1163-1169.
- Shinada M. *et al.*, 2000. *J Clin Endocr Metab*, 85(3):1163-1169.
- Simon D.B. *et al.*, 1996. *Nat Genet*; 13:183-8.
- Simon D.B. *et al.*, 1997. *Nat Genet*; 17:171-8.
- Simpson R.J., Jensen S.S. & Lim J.W.E., 2008. *Proteomics*; 8:4083-4099.
- Simpson R.J., Lim J.W.E., Moritz R.L., 2009. *Expert Rev Proteomics*; 6(3):267-283.
- Singh R. *et al.*, 1999. *Diabetes*; 48(10):2066-2073.
- Singht V.P., Bali A., Singh N. & Jaggi A.S., 2014. *Korean J Physiol Pharmacol*; 18(1):1-14.
- Siragy H.M., 2008. *Current Hypertension Reports*; 10(4):261-267.
- Skog J., Wurdinger T., van Rijn S. *et al.*, 2008. *Nat Cell Biol*; 10(12):1470-6.
- Smalley D.M., Sheman N.E., Nelson K., Theodorescu D., 2008. *J Proteome Res*; 7:2088-2096.
- Soetikno V., Arozal W., Louisa M. & Setiabudy R., 2014. *Int J of Endocrin*; 2014:968681.
- Soo C.Y., Song Y., Zheng Y *et al.*, 2012. *Immunology*; 136:192-197.
- Splawski I. *et al.*, 1997. *N Eng J Med*; 336:1562-7.
- Steffes M.K. *et al.*, 2001. *Kidney Int*; 59(6):2104-2113.
- Sthaneshwar P., Chan S.P., 2010. *Malays J Pathol*; 32:43-47.
- Stipp CS., 2010. *Expert Rev Mol Med*; 12:e3.
- Street J.M., Birkhoff W., Menzies R.I. *et al.*, 2011. *J Physiol*; 589:6119-6127.
- Stuffers S., Sem Wegner C., Stenmark H. *et al.*, 2009. *Traffic*; 10:925-937.
- Sturgeon C.M. *et al.*, 2008. *Clinical Chemistry*; 54(8):e1-e10.
- Subra C., Grand D., Laulagnier K. *et al.*, 2010. *J Lipid Res*; 51(8):2105-20.
- Subrayama A.R., Liu J., Ellison D.H. *et al.*, 2009. *J Biol Chem*; 284:18471-18480.
- Sun A.L., Deng J.T., Guan G.J. *et al.*, 2012. *Diab Vasc Dis Res*; 9:301-308.
- Sutton R.A.R. *et al.*, 1981. *In The Kidney*, 2nd edition. Philadelphia: Saunders; 551-618.
- Syren M.L., Ghiringhelli N.B., Bettinelli A. *et al.*, 2011. *Nephrol Dial Transplant*; 26(2):557-61.
- Syren M.L., Tedeschi S., Cesareo L. *et al.*, 2002. *Hum Mutaz*; 20:78.
- Szabo C., 2009. *Br J Pharmacol*; 156(5):713-27.



- Szkudelski T., 2001. *Physiol Res*, 50:537-546.
- Takahashi M., Rhodes D.R., Furge K.A. *et al.*, 2001. *PNAS*, 98(17):9754-9759
- Takahashi N. *et al.*, 2000. *Proc Nat Acad Sci*, 97:5434-9.
- Takebayashi K. *et al.*, 2006. *J Clin Endocrin Metab*, 91(6):2214-2217.
- Tauro B.J., Greening D.W., Mathias R.A. *et al.*, 2012. *Methods*, 56:293-304.
- Taylor D.D. & Gercel-Taylor C., 2005. *Br J Cancer*, 92:305-311.
- Taylor D.D. & Gercel-Taylor C., 2008. *Gynecol Oncol*, 110(1):13-21.
- Thery C., Boussac M., Veron P., Ricciardi-Castagnoli P., 2001. *J Immunol*, 166:7309-7318.
- Thery C., Ostrowski M., Segura E., 2009. *Nat Rev Immunol*, 9:581-593.
- Thongboonkerd V., 2011. *Contrib Nephrol*, 170:172-83.
- Thongboonkerd V., Chutipongtanate S. & Kanlaya R., 2006. *J Prot Res*, 5:183-191.
- Tickner J.A., Urquhart A.J., Stephenson S.A. *et al.*, 2014. *Front Oncol*, 4:127.
- Toeller M. *et al.*, 1997. *Diabetologia*, 40(10):1219-1226.
- Togawa H., Nakanishi K., Mukaiyama H. *et al.*, 2011. *Am J Physiol Renal Physiol*, 300(2):F511-20.
- Tomasoni S., Longaretti L., Rota C. *et al.*, 2013. *Stem Cell Dev*, 22:772-780.
- Tonolo J & Cherchi S., 2014. *Int J Nephrol Renovasc Diseases*, 7:107-115.
- Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S., Rajendran L., 2008. *Science*, 319:1244-1247.
- Tsilibary E.C., 2003. *J Pathol*, 200:537-546.
- Tsou C.C., Tsai C.F., Tsui Y.H., 2009. *Mol Cell Proteomics*, 9(1):131-44.
- Tsuchida K. *et al.*, 1999. *Diabetologia*, 42(5):579-588.
- Tuttle K.R. & Anderson, P.W., 2003. *Am J Kidney Dis*, 42(3):456-465.
- Twigg S.M. *et al.*, 2002. *Endocrinology*, 143(12):4907-4915.
- Uzar E., Tamam Y., Evliyaoglu O. *et al.*, 2012. *Neurol Neurophysiol NeuroSci*, 33:875-880.
- Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., 2007. *Nat Cell Biol*, 9:654-659.
- Valenti R., Huber V., Filipazzi P. *et al.*, 2006. *Cancer Res*, 66:9290-8.
- Van Balkom B.W., Pisitkun T., Verhaar M.C., Knepper M.A., 2011. *Kidney Int*, 80:1138-1145.
- Van Buren P. N., Adams-Huet B. & Toto R. D., 2010. *J Investig Med*, 58:950-956.
- Van der Lubbe N., Jansen P.M., Salih M. *et al.*, 2012. *Hypertension*, 60:741-748.
- Van Niel G., Raposo G., Candalh C., Boussac M., 2006. *Gastroenterology*, 121:337-349.
- Vargas-Poussou R. *et al.*, 1998. *Am J Hum Genet*, 62:1332-40
- Vargas-Poussou R. *et al.*, 2002. *JASN*, 13:2259-66.
- Vargas-Poussou R., Dahan K., Kahila D. *et al.*, 2011. *J Am Soc Nephrol*, 22: 693-703.
- Verhave J.C., Bouchard J., Goupil R. *et al.*, 2013. *Diabetes Res Clin Pract*, S0168-8227(13)00245-3.
- Vezzoli G., Soldati L. *et al.*, 2000. *Am J Kidney Dis*, 36(4):855-8.
- Vidal M., Sainte-Marie J., Philippot J.R., Bienvenue A., 1989. *J Cell Physiol*, 140:455-62.
- Vidotti D. B. *et al.*, 2004. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286:F1039-1045.
- Vilasi A. & Capasso G., 2010. *J Nephrol*, 23(S16):S221-S227.
- Vitari A.C., Deak M., Morrice N.A. *et al.*, 2005. *Biochem J*, 391:17-24.

- Wada T., 2013. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*; 10;102(5):1152-8.
- Waldegger S. *et al.*, 2000. *J Biol Chem*; 275(32):24527-33
- Waldegger S. *et al.*, 2002. *Pflugers Arch*; 444:411-8.
- Waldenstrom A. & Ronquist G., 2014. *Circ Res*; 114(2):315-324.
- Wang D. & Sun W., 2014. *J Proteomics*; *in press*.
- Wang W. *et al.*, 1992. *Annu Rev Physiol*; 54:81-96
- Wang Z., Hill J.S., Luther J.M. *et al.*, 2012. *Proteomics*; 12:329-338.
- Watanabe S. *et al.*, 2002. *Lancet*; 360:692-4.
- Welton J.L., Khanna S., Giles P.J., 2010. *Mol Cell Proteomics*; 9:1324-1338.
- Wendt T. M. *et al.*, 2003. *Am J Pathol*; 162, 1123–1137.
- White K.E. *et al.*, 2002. *Diabetes*; 51(10):3083-3089.
- Wieckowski E.U., Visus C., Snajzik M. *et al.*, 2009. *J Immunol*; 183:3720-3730.
- Wilson F.H., Disse-Nicodeme S. *et al.*, 2001. *Science*; 293:1107-12.
- Wolf G. *et al.*, 1997. *Am J Phys*; 273(3 Pt 2):F348-356.
- Wolf G. *et al.*, 2007. *Clin Nephrol*; 68(2):81-86.
- Wolf G., 2004. *Europ J Clin Invest*; 34(12):785-796.
- Wu M.S. *et al.*, 1997. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*; 12(10):2105-2110.
- Wubbolts R., Leckie R.S., Veenhuizen P.T. *et al.*, 2003. *Biol Chem*; 278:10963–72.
- Xiang X., Poliakov A., Liu C. *et al.*, 2009. *Int J Cancer*; 124:2621–33.
- Yamada T., Inoshima Y., Matsuda T *et al.*, 2012. *J Vet Med Sci*; 72:1523-1525.
- Yamagishi S.I. & Matsui T., 2010. *Oxid Med Cell Longev*; 3:101–108.
- Yamamoto Y., Watari Y. *et al.*, 2008. *Hypertens Res*; 31(6):1241-9.
- Yang J.M. & Gould S.J., 2013. *Bioch Soc Transactions*; 41:277-281.
- Yang M., Chen J. Su F., *et al.* 2011. *Mol Cancer*; 10:117.
- Yu B., Zhang X. & Li X., 2014. *Int J Mol Sci*; 7;15(3):4142-57.
- Zhang H.G., Kim H., Liu C., Yu S., 2007. *Biochim Biophys Acta*; 1773:1116–1123.
- Zhang Y., Li Y., Qui Y., Qui Z., 2010. *Electrophoresis*; 31:1-11.
- Zhang Y., Luo C.L., He B.C. *et al.*, 2010. *Intern J of Onc*; 36:133-140.
- Zhang Y., Zhang D., Zhang M., 2012. *J Tradit Chin Med*; 32(4):669-73.
- Zheng M., Lv L.L., Cao Y.H. *et al.*, 2012. *Clin Endocrinol*; 76:657-664.
- Zhou H., Cheruvanky A., Hu X. *et al.*, 2008. *Kidney Int*; 74(5):613-621.
- Zhou H., Yuen P.S.T., Pisitkun T. *et al.*, 2006. *Int society of nephrology*; 69:1471-76.
- Zhou Y., Jiang L. & Rui L., 2009. *J Biol Chem*; 284:11152-11159.
- Ziyadeh F.N. & Wolf G., 2008. *Current Diabetes Reviews*; 4(1):39-45.
- Zubiri I., Posada-Ayala M., Sanz-Maroto A. *et al.*, 2014. *J Proteomics*; 96:92-102.
- Zurbig P., Jerums G., Hovind P. *et al.*, 2012. *Diabetes*; 64:3304-3313.

Grazie

...alla Prof.ssa Marina Pitto per avermi dato la possibilità di svolgere questo dottorato nel suo laboratorio, per l'aiuto ed il supporto...

...al Dottor Alberto Bettinelli per la collaborazione e la disponibilità...

...alla Fra, per avermi insegnato moltissimo, per l'infinita pazienza e per non avermi mandato a quel paese dopo le varie cavolate combinate...

...ai miei splendidi compagni di viaggio in questi tre anni nel lab.2.10, rigorosamente in ordine cronologico: Lavinia, Matteo, Elisa, Guido, Andrea, Cristian, Veronica, Chiara, Davide, Ramona, Stefania, Michele, Lucrezia con i quali ho condiviso la vita in laboratorio tra lavoro e tante, tante, tantissime risate...

...ai laboratori adiacenti, in particolare il lab. 2.9, per avermi sopportato nelle mie frequenti invasioni, mai di carattere lavorativo, il lab di gas cromatografia ed il lab. dei massisti per l'allegria, il supporto e le millemila tabelle...

...a tutti gli altri abitanti dell'US per la collaborazione e la simpatia...

...a mamma e papà che mi sopportano sempre e non so come fanno...

...alle mie sorellone Veronica e Francesca ed ai tutti i miei amici per il continuo supporto...