

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina Sperimentale

Dottorato in Tecnologie Biomediche XXIV° CICLO



STUDI DI PROTEOMICA SUBCELLULARE NELLE PATOLOGIE  
RENALI: CARCINOMA RENALE E NEFROPATIA DIABETICA

Responsabile: Chair.ma Prof.ssa Marina PITTO

Tesi di dottorato di:

Lavinia MOROSI

Matricola n°: 048361

Anno Accademico 2010 - 2011

# INDICE

1. INTRODUZIONE	2
1.1 ILCARCINOMA RENALE	2
1.1.1 Caratteristiche generali	2
1.1.2 Classificazione del carcinoma renale	4
1.1.3 Diagnosi e prognosi	13
1.1.4 Terapia	15
1.2 LA NEFROPATIA DIABETICA	17
1.2.1 Caratteristiche generali	17
1.2.2 Patogenesi	18
1.2.3 Diagnosi e prognosi	23
1.2.4 Terapia	26
1.3 BIOMARCATORI	29
1.4 PROTEOMICA CLINICA	32
1.5 MEMBRANA PLASMATICA E MICRODOMINI DI MEMBRANA	35
1.5.1 La membrana plasmatica	35
1.5.2 I microdomini di membrana	36
1.6 EXOSOMI	43
1.6.1 Biogenesi	45
1.6.2 Composizione	47
1.6.3 Funzioni	53
1.6.4 Isolamento degli exosomi	57
1.6.5 Exosomi urinari	59
2. SCOPO DELLA TESI	65
3. MATERIALI E METODI	67
3.1. MATERIALI	67
3.2. APPARECCHIATURE	68
3.3. TECNICHE DI FRAZIONAMENTO	69
3.3.1 Frazionamento subcellulare	69
3.3.2 Isolamento dei microdomini di membrana	70
3.3.3 Isolamento degli exosomi mediante ultracentrifugazione	72
3.3.4 Estrazione delle proteine urinarie mediante ultrafiltrazione	73
3.4 MICROSCOPIA ELETTRONICA	73
3.5 ELETTROFORESI MONODIMENSIONALE	74
3.6 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE	76

3.6.1 Prima dimensione: 16 BAC	76
3.6.2 Passaggio dalla prima alla seconda dimensione: fissazione, colorazione e riequilibrio	77
3.6.3 Seconda dimensione: SDS-PAGE	78
3.7 WESTERN BLOTTING	78
3.8 IMMUNODECORAZIONE CON ANTICORPI SPECIFICI	79
3.9 METODI DI COLORAZIONE	80
3.9.1 Colorazione con Simply Blue	80
3.9.2 Colorazione fluorescente con Sypro	80
3.10 DOSAGGI PROTEICI	81
3.10.1 Metodo Bradford Biorad	81
3.10.2 Metodo del BCA	82
3.11 TECNICHE DI ISOLAMENTO E ANALISI DEI LIPIDI	83
3.11.1 Estrazione e ripartizione dei lipidi dagli esosomi	83
3.11.2 Metanolisi alcalina	84
3.11.3 Analisi del Colesterolo	84
3.11.4 Analisi dei Fosfolipidi	85
3.11.5 Analisi dei Gangliosidi	85
3.11.6 Analisi del GM1 mediante immunodecorazione con Tossina Colerica	86
3.12 ANALISI DI PROTEOMICA MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA	86
3.12.1 Digestione in gel con tripsina	87
3.12.2 Analisi LC-ESI-MS/MS	88
3.12.3 Elaborazione dei dati LC-ESI-MS/MS	89
3.13 ANALISI LIPIDOMICA MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA	89
3.14 ANALISI STATISTICA	90
4. RISULTATI	92
4.1. CARCINOMA RENALE: EXOSOMI	92
4.1.1 Casistica	92
4.1.2 Profili proteici degli esosomi urinari	95
4.1.3 Validazione del protocollo di isolamento degli esosomi	98
4.1.4 Proteomica degli esosomi urinari	102
4.1.5 Valutazione del contenuto differenziale di alcune proteine negli esosomi urinari di pazienti RCC	124
4.1.6 Studio della composizione lipidica degli esosomi urinari	133
4.1.7 Lipidomica degli esosomi urinari: risultati preliminari	136
4.2 MICRODOMINI NEL CARCINOMA RENALE	141

4.2.1 Casistica	141
4.2.2 Purificazione della frazione arricchita in microdomini (MD)	141
4.2.3 Proteomica dei microdomini di membrana	143
4.2.4 Valutazione del contenuto differenziale di alcune proteine nei microdomini di membrana isolati da tessuto tumorale	150
4.3 NEFROPATIA DIABETICA	155
4.3.1 Casistica	155
4.3.2 Profili proteici degli exosomi urinari	157
4.3.3 Proteomica degli exosomi urinari	159
4.3.4 Valutazione del contenuto differenziale della Major urinary protein 1 negli exosomi urinari di ratti modello di diabete	161
5. CONCLUSIONI	165
6. BIBLIOGRAFIA	170

# 1. INTRODUZIONE

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 ILCARCINOMA RENALE

#### 1.1.1 Caratteristiche generali

Il carcinoma renale (RCC; Renal Cell Carcinoma) è l'ottavo tumore maligno per incidenza, colpisce in età adulta e conta tra il 3% e il 4% di nuovi casi l'anno; è la settima forma di cancro più frequente nei soggetti maschili, e la nona nei soggetti femminili [Jemal A et al., 2007]. Rappresenta la forma più comune di cancro ai reni ed è il più letale tra i tumori urologici [Lam JS et al., 2005]; la probabilità di morte riportata a livello mondiale è compresa tra 0.6/100000 e 14.7/100000 [Parkin DM et al., 1999]. In Europa l'incidenza stimata per anno è di 29600 nuovi casi nel sesso maschile e di 16700 nuovi casi in quello femminile [Gupta K et al., 2008]. Comunque il carcinoma renale potrebbe essere considerato un tumore relativamente raro sebbene la sua incidenza sia stabilmente in crescita con un trend che viene stimato intorno al 2-3% a decade [Mathew A et al., 2002]. I tassi di mortalità connessi a questa neoplasia appaiono anch'essi in crescita, ma meno rapidamente rispetto all'incidenza. Lo stadio del tumore al momento della diagnosi rimane il fattore prognostico di maggiore rilevanza: la probabilità di sopravvivenza a 5 anni, pari all'80-100% nei pazienti con malattia localizzata alla diagnosi, si riduce sino al 12% per quelli che presentano metastasi a distanza, per i quali la sopravvivenza mediana non raggiunge l'anno.

Molti tumori si presentano tra la quinta e la settima decade di vita, con un'età media di diagnosi di 66 anni ed un'età media di morte di 70 anni. Per ragioni ancora non chiare, la sua incidenza risulta essere circa il doppio nel sesso maschile rispetto a quello femminile, con una stima di circa il 62% di nuovi casi fra gli uomini e solo il 38% fra le donne [Amato RJ, 2005]. Si notano differenze anche su base razziale: l'incidenza è maggiore per le popolazioni caucasiche rispetto a quelle asiatiche ed africane [Chow WH et al., 1999].

L'alta mortalità di questa patologia dipende dal decorso spesso asintomatico della malattia stessa: dolore al fianco, ematuria e presenza di una massa palpabile a livello addominale sono in generale gli unici sintomi che si possono correlare a questo tipo di tumore. E' possibile riscontrare altri sintomi di natura non specifica, come senso di fatica, malessere, febbre e sudori notturni, perdita di peso ed anemia. L'effettiva mancanza di sintomi veramente specifici e indicativi per questo tipo di tumore comporta spesso il riscontro di tale patologia quando essa è già presente ad uno stadio avanzato, spesso con metastasi diffuse. Circa un terzo dei pazienti a cui viene

diagnosticato RCC, infatti, si presenta già allo stadio IV della malattia e per loro la probabilità di sopravvivenza a 5 anni è <2% [Godley PA e Taylor M, 2001]. Sono vari i fattori di rischio che favoriscono l'insorgenza del carcinoma renale e possono essere suddivisi in due gruppi: *fattori di rischio modificabili* (tabacco, obesità, pressione sanguigna, ipertensione ed utilizzo dei farmaci anti-ipertensivi, fattori occupazionali, fattori nutrizionali, alcool e altre bevande, nutrienti) [Weikert S et al., 2010] e *fattori di rischio genetici* (la sindrome di von Hippel-Lindau, il cancro renale papillare ereditario e, probabilmente, la sclerosi tubercolosa) [Bjornsson J et al., 1996]. L'RCC si presenta nella malattia di von Hippel-Lindau nel 35-40% dei pazienti, con insorgenza in età giovanile; è frequentemente multifocale (87%) o bilaterale (75%) [Levine et al., 1983]. L'RCC è comune come evoluzione delle patologie renali cistiche acquisite. Trattamenti prolungati con dialisi portano ad un aumento del fattore di rischio da tre a sei volte, se comparato a quello della popolazione normale. L'RCC papillare ereditario è una forma autosomica dominante della patologia associata a tumori renali papillari multifocali con predominanza maschile di 5:1. Tuttavia solo il 2% dei casi di RCC è correlato a sindromi di tipo ereditario [Jemal A et al., 2005].

Dati statistici mostrati dal National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results Program indicano, per questi ultimi anni, un aumento dell'incidenza per i carcinomi renali localizzati: il miglioramento delle tecniche diagnostiche e delle procedure di imaging, come gli ultrasuoni, la tomografia computerizzata (CT) e l'imaging in risonanza magnetica (MTI), hanno permesso di diagnosticare forme più precoci e localizzate di RCC, con possibile aumento di sopravvivenza del paziente grazie anche ai progressi avvenuti nella diagnosi precoce in individui asintomatici, nello sviluppo di tecniche chirurgiche e nell'immunoterapia introdotta per patologie a stadio avanzato. Si è inoltre osservato che la dimensione del tumore è un predittore indipendente dell'esito della patologia e che tumori più grandi hanno una probabilità di sopravvivenza più bassa [American Cancer Society, 2007]. Per quanto riguarda i tumori diagnosticati accidentalmente, la probabilità di sopravvivenza di cinque anni è approssimativamente dell'85%, contro una probabilità del 53% per i casi sintomatici [Luciani LG et al., 2000].

### 1.1.2 Classificazione del carcinoma renale

La classificazione dei carcinomi renali fino al 1997 era basata essenzialmente sulle caratteristiche citomorfologiche del tessuto tumorale e sulla presunta origine cellulare del tumore, comparando il fenotipo tumorale con la controparte sana [Thoenes W et al., 1986]. I tumori maligni erano classificati come adenocarcinomi o RCC e, a seconda della loro morfologia, potevano avere prognosi più o meno favorevoli, anche se ciò in numerose classificazioni non veniva considerato.

L'avvento della genetica molecolare ha avuto un grande impatto nella classificazione dei tumori renali permettendo di correlare alterazioni del genoma a particolari trasformazioni neoplastiche: le alterazioni genetiche colpiscono la biologia delle cellule tumorali, alterandone la proliferazione, la morte, la differenziazione e l'adesione cellulare; queste differenti proprietà giocano un ruolo nel determinare sia la morfologia che il comportamento del tumore. Su questi presupposti è stata pubblicata una nuova classificazione (The Heidelberg Classification of Renal Cell Tumors 1997), che associa la particolare morfologia del tumore alle alterazioni genetiche che ne stanno alla base.

Nel 2004 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha pubblicato una nuova classificazione che rappresenta una sostanziale revisione delle precedenti [Nagashima Y et al., 2004], con i sette principali sottotipi istologici dell'RCC (a cellule chiare, multiloculare cistico, papillare, cromofobo, al dotto collettore, fusiforme mucinoso-tubulare e carcinomi delle cellule renali non classificati) fiancheggiati da diverse nuove entità tumorali. Queste sono state descritte considerando gli aspetti morfologici e le alterazioni cromosomiche ottenute da analisi citogenetiche dei cariotipi neoplastici. Tuttavia è ancora da definirsi se differenti varianti istologiche dell'RCC possano predire diversi esiti della patologia.

#### Carcinoma renale convenzionale o a cellule chiare

Il carcinoma renale a cellule chiare (ccRCC) rappresenta la forma di neoplasia renale più comune (80% dei casi circa) ed anche la più aggressiva [Skubitz KM e Skubitz AP, 2002]. Viene diagnosticato generalmente a pazienti di 60-70 anni con un rapporto uomini rispetto a donne di 5-6 a 1 [Nagashima Y et al., 2004]. Questo isotipo di RCC origina dalle cellule del tubulo prossimale del rene, tende a formare una massa tumorale ben delimitata ed è costituito da cellule color giallo-biancastro. Istologicamente, il ccRCC è composto da architetture alveolari di cellule tumorali associate a uno stroma vascolare sinusoidale (Fig. 1). Le cellule neoplastiche sono generalmente



omogenee e possiedono un caratteristico citoplasma chiaro dovuto all'abbondanza di lipidi e glicogeno. Cellule dal citoplasma chiaro raggruppate in piccoli *foci* si osservano anche in tumori composti prevalentemente da cellule con citoplasma eosinofilo. Il tumore causa frequentemente ialinizzazione e emorragie, tende a invadere il sistema venoso renale causando metastasi specialmente nei polmoni e nelle ossa.

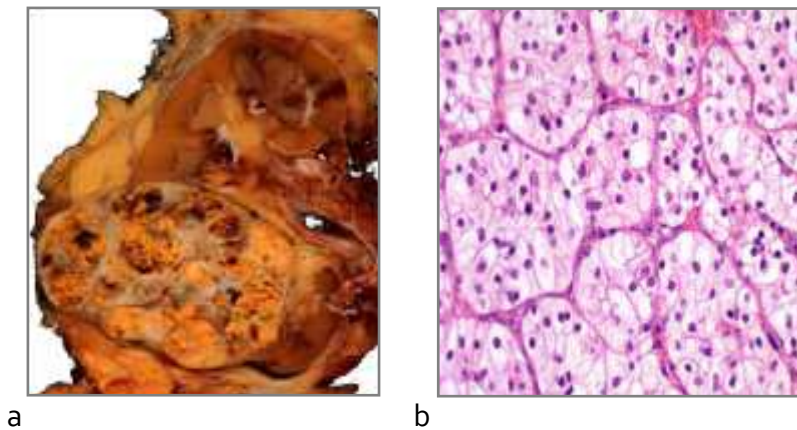


Figura 1. Carcinoma renale a cellule chiare. a) Clear cell carcinoma di 8 cm di diametro, localizzato a livello del polo inferiore del rene. b) Immagine istologica di tessuto renale con RCC a cellule chiare.

Studi di genetica molecolare e di citogenetica svolti negli anni '80 identificarono come comune evento genetico nell'RCC la delezione del cromosoma 3p [Van der Hout AH *et al.*, 1988], e successivamente venne scoperto a livello della regione 3p25 il gene oncosoppressore VHL [Latif F *et al.*, 1993]. Il gene presenta due possibili siti di inizio della trascrizione e infatti possono essere generate due isoforme della proteina VHL con diverso peso molecolare (19 kDa o 30 kDa). L'isoforma più piccola può comunque svolgere le funzioni biologiche della proteina suggerendo che la porzione codificata dalla sequenza tra i due siti di inizio della trascrizione non sia essenziale. Studi genetici sui cromosomi e sul DNA evidenziarono la perdita di eterozigosi del braccio corto del cromosoma 3p nel 96-100% dei casi di RCC, indicando quindi questo evento genetico come punto cruciale per lo sviluppo del tumore [Chudek J *et al.*, 1997].

Mutazioni del gene VHL a livello della linea germinale causano la cosiddetta malattia Von Hippel-Lindau, una rara sindrome cancerosa familiare, autosomica dominante, che causa principalmente angiomi alla retina, emangioblastomi del sistema nervoso, feocromocitomi e carcinomi renali a cellule chiare bilaterali. Queste patologie si manifestano differenzialmente in dipendenza al tipo di mutazione che colpisce il gene VHL. Mutazioni somatiche del gene VHL sono state trovate nel

43-57% delle linee cellulari e nei tumori primari di RCC [Gnarra JR *et al.*, 1994], e un 11-19% addizionale mostra ipermetilazione e silenziamento trascrizionale del gene VHL [Clifford SC *et al.*, 1998]. Secondo esperimenti degli anni 90, la reintroduzione del gene wild-type VHL in linee cellulari RCC VHL<sup>-/-</sup> determina la soppressione della tumorigenicità in vivo [Iliopoulos O *et al.*, 1995]: questo dimostra quindi la grande importanza che il gene VHL ha nella comparsa e nello sviluppo di questo tipo di cancro.

Nella malattia Von Hippel-Lindau, un allele del gene VHL viene ereditato mutato; l'inattivazione o il silenziamento dell'allele normale può determinare la comparsa di RCC. Mutazioni, metilazioni o silenziamento del gene VHL possono incorrere anche nella linea somatica: in questo caso occorrono due eventi mutazionali per determinare la comparsa della sindrome. Il 60-65% dei casi di RCC è di tipo sporadico (non ereditario) [Kim WY e Kaelin WG, 2004] e mostrano una prognosi meno favorevole rispetto ai pazienti con alterazioni ereditarie del gene VHL [Yao M *et al.*, 2002].

La proteina codificata dal gene VHL (pVHL) funziona come un componente del complesso legante l'ubiquitina, lavorando con le elonghine B e C, Cul2 e Rbx per degradare, in condizione di normossia, i fattori indotti dall'ipossia (hypoxia-inducible factors, HIF) 1 $\alpha$  e 2 $\alpha$ . HIF 1 $\alpha$  e 2 $\alpha$  sono le subunità del fattore di trascrizione HIF, che vengono upregolate quando le cellule vengono esposte a condizioni di ipossia. In questo caso esse si associano alla subunità costitutivamente espressa, HIF 1 $\beta$ , per indurre la trascrizione di gene responsabili della risposta all'ipossia che codificano per proteine implicate nell'angiogenesi (es. il fattore di crescita dell'endotelio vascolare VEGF), nella crescita cellulare (es. il fattore di crescita trasformante TGF $\alpha$ ), l'uptake del glucosio (es. il trasportatore per il glucosio GLUT1) e l'equilibrio acido-base (es. l'anidrasi carbonica CAIX).

In condizioni di normossia, HIF 1 $\alpha$  e 2 $\alpha$  sono idrossilati su due residui di prolina nel dominio di degradazione ossigeno-dipendente ad opera di una prolil-idrossilasi che funziona dal sensore dell'ossigeno. L'idrossilazione permette il legame di HIF- $\alpha$  alla proteina VHL, la quale promuove l'ubiquitinazione del fattore di trascrizione stesso e la sua distruzione mediante il complesso del proteasoma. Una volta che le cellule vengono esposte a stress ipossico, il fattore HIF- $\alpha$  non viene più idrossilato e questo porta a un'alterazione conformazionale che gli impedisce di interagire con pVHL e quindi di venir degradato (Fig. 2). Nel caso di mutazioni del gene VHL, la proteina prodotta non è in grado di associarsi agli altri componenti del complesso legante l'ubiquitina e quindi HIF- $\alpha$  si accumula eccessivamente e induce, agendo a livello delle sequenze HRE (hypoxia-response elements), la trascrizione di svariati geni tra cui VEGF, che è un potente mitogeno delle

cellule dell'endotelio vascolare e che si crede sia responsabile delle formazioni delle strutture vascolari sinusoidali caratteristiche del ccRCC e GLUT<sub>1</sub>, che invece accelera l'assorbimento di glucosio da parte delle cellule tumorali per generare il tipico citoplasma chiaro.

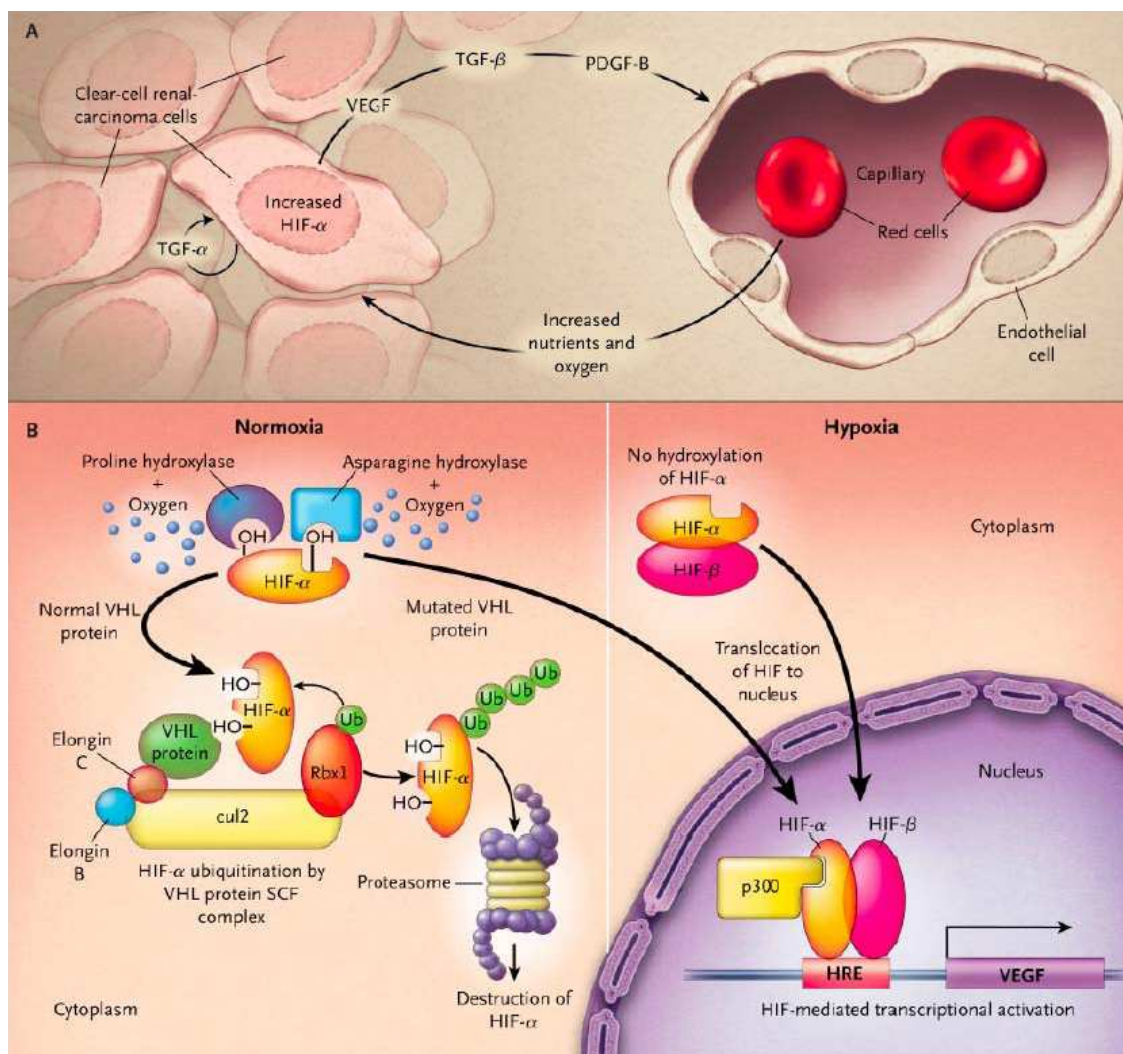


Figura 2. Meccanismi molecolari dello sviluppo di carcinoma renale a cellule chiare. A) Conseguenze dell'aumento di HIF- $\alpha$  in RCC clear cell; B) Meccanismi molecolari mediati da HIF- $\alpha$  in condizioni di adeguato apporto di ossigeno e di ipossia [Cohen HT e McGovern FJ, 2005].

La over-espressione di HIF- $\alpha$  sembra essere necessaria, ma non sufficiente, ad indurre la tumorigenesi renale. HIF- $\alpha$  è comunque di vitale importanza per la patogenesi del tumore: l'inibizione di HIF- $\alpha$  indotta da VHL è sufficiente a sopprimere la crescita di carcinoma renale a cellule chiare in modelli preclinici [Zimmer M *et al.*, 2004].

Oltre alla perdita del cromosoma 3p, in RCC sono state riscontrate molte altre alterazioni genetiche che coinvolgono diversi cromosomi (ad esempio 5q, 8p, 9p, 11p, 13q, 14q e 17p) [Zambrano NR *et al.*, 1999].

Sembra possibile una correlazione tra alterazioni genetiche e parametri clinici in pazienti con RCC convenzionale: la progressione di tumori maligni sembra essere il risultato dell'accumulo di multiple aberrazioni cromosomiche. In tal senso possono essere prese come esempio le mutazioni genetiche che colpiscono i cromosomi 5 e 14.

Nel primo step della tumorigenesi di RCC a cellule chiare, l'inattivazione dell'oncosoppressore VHL può spesso essere in associazione con la perdita allelica.

Anche se la classificazione istologica e una varietà di nuovi parametri molecolari hanno mostrato un'utilità clinica, la prognosi del carcinoma a cellule chiare è ancora basata sulla valutazione dello stadio clinico-patologico. L'invasione microvascolare sembrerebbe essere un parametro clinico prognostico rilevante per RCC a stadio iniziale, e sembrerebbe essere il solo predittore indipendente di ricorrenza di malattia dopo chirurgia radicale [Lopez-Beltran A *et al.*, 2006].

I pazienti con carcinoma renale a cellule chiare hanno una prognosi peggiore se comparati con pazienti con carcinoma renale papillare o cromofobo, mentre non c'è differenza significativa nella sopravvivenza cancro-specifica tra paziente con carcinoma renale a cellule cromofobe e papillare [Mancini V *et al.*, 2008]. La risposta alla terapia sistemica è invece più elevata rispetto a quella presentata dagli altri tipi istologici [Lopez -Beltran A *et al.*, 2006].

### *Carcinoma renale multiloculare cistico (MCRCC)*

E' una forma tumorale composta interamente da cisti di varie dimensioni, separate dal rene mediante una capsula fibrosa. Le cisti sono circondate e delimitate da un singolo strato di cellule epiteliali dal citoplasma chiaro, che solitamente mostrano anche un grado nucleare basso. I setti sono composti da tessuto fibroso che può contenere anch'esso queste cellule chiare. E' un carcinoma a predominanza maschile (3:1), con età media di manifestazione tra i 20 e i 76 anni. Non sono stati osservati eventi di progressione della malattia e la prognosi è generalmente molto buona [Eble JN *et al.*, 2004].

Carcinoma renale papillare (o cromofilo, PRCC)

E' una forma di cancro ai reni più rara rispetto a quella a cellule chiare (5-10% di tutti i casi di RCC), ed ha un decorso clinico meno aggressivo. Il tumore colpisce in egual modo uomini e donne, con età media di comparsa della malattia tra i 60 e i 70 anni. La massa tumorale si può formare sia nella zona della cortex che nella medulla e appare ben distinta dal tessuto circostante. Istologicamente il tumore è composto da strutture papillari coperte da un epitelio neoplastico caratterizzato da una superficie schiumosa ed eterogenea, a causa di depositi emorragici, e possiede un core fibrovascolare con formazioni calcificate e macrofagi "spugnosi" [Lopez-Beltran A *et al.*, 2006; Nagashima Y *et al.*, 2004] (Fig3). Ci sono due sottotipi di carcinomi renali papillari, distinti su basi istologiche in base alle dimensioni cellulari e allo spessore dello strato cellulare superficiali. Il carcinoma renale papillare di tipo 1 consiste di lesioni papillari coperte da un unico strato di piccole cellule con citoplasma pallido e piccoli nuclei ovali, con nucleoli indistinti. Il carcinoma renale di tipo 2 invece consiste di lesioni papillari coperte da grandi cellule pluristratificate con abbondante citoplasma eosinofilo; possiedono grandi e sferici nuclei con nucleoli distinti. Carcinomi di tipo 2 sono geneticamente più eterogenei, hanno una peggior prognosi e possono originare da carcinomi papillari di tipo 1. Carcinomi papillari localizzati metastatizzano meno frequentemente di carcinomi renali a cellule chiare [Beck SD *et al.*, 2004]; tuttavia la percentuale di sopravvivenza per carcinomi papillari metastatici è inferiore a quella per carcinomi renali convenzionali [Motzer RJ *et al.*, 2002].

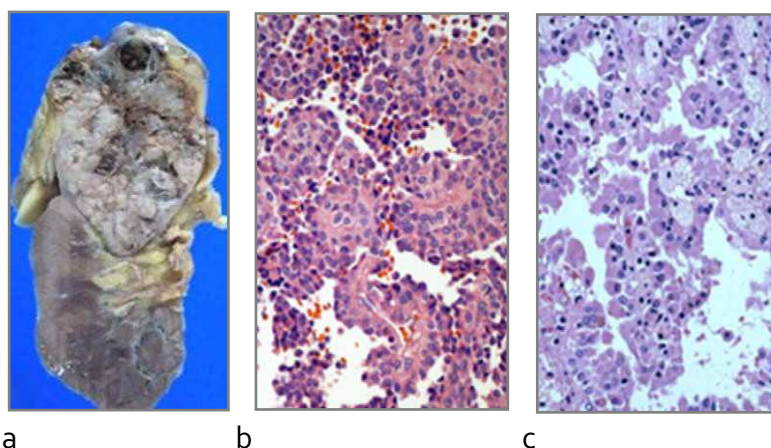


Figura 3. Carcinoma renale papillare a)Aspetto macroscopico di un carcinoma renale papillare b)Immagine istologica di tessuto renale con RCC papillare di tipo 1 e c) di tipo 2.



Carcinomi renali papillari ricorrono in numerose sindromi familiari: il carcinoma renale papillare di tipo ereditario è un disordine autosomico dominante determinato da mutazioni, a livello della linea germinale, del proto-oncogene MET (trisomia del cromosoma 7). Questa aberrazione genetica causa carcinomi renali papillari di tipo multifocale [Zbar B *et al.*, 1995], con sembianze istologiche di tipo 1 (HPRC1) [Lubensky IA *et al.*, 1999]. MET è localizzato sul cromosoma 7 e codifica per un recettore transmembrana tirosin-chinasico che normalmente viene attivato dal fattore di crescita per gli epatociti (HGF) [Schmidt L *et al.*, 1997]. In assenza di ligando, MET normalmente si trova in uno stato auto-inibito. In presenza del ligando (il fattore di crescita degli epatociti), MET omodimerizza e subisce una reciproca fosforilazione e attivazione, determinando uno stimolo di crescita mediante la cascata di RAS. Nella forma ereditaria di carcinoma renale papillare e in occasionali forme sporadiche, mutazioni che attivano il gene MET determinano una disinibizione del recettore, anche in assenza del ligando, promuovendo in questo modo la trasformazione cellulare (proliferazione, motilità, invasione e sopravvivenza cellulare) [Jeffers M *et al.*, 1997]. L'allele MET mutato sul cromosoma 7 si duplica, aumentando l'espressione della proteina MET attivata [Fischer J *et al.*, 1998] (Fig.4). I carcinomi renali papillari sporadici hanno una schiacciante predominanza maschile (5:1) e la percentuale di sopravvivenza a cinque anni è del 90%.

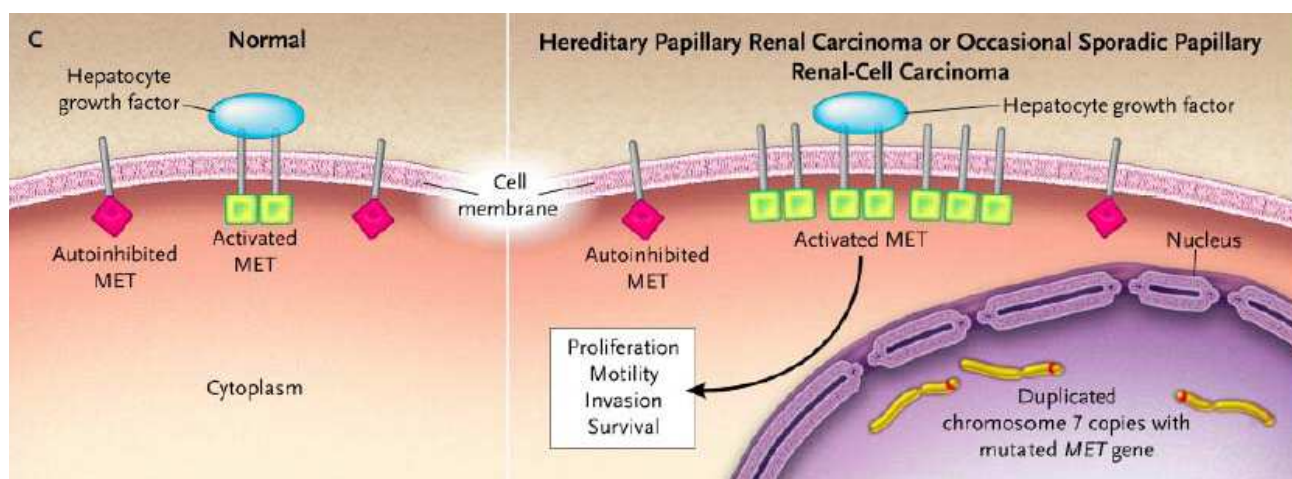


Figura 4. Meccanismi molecolari dello sviluppo di carcinoma renale papillare. Ruolo di MET nell'RCC papillare. [Cohen HT e McGovern FJ, 2005].

Mutazioni somatiche che attivano MET sono poco comuni nella forma sporadica (<10%), di conseguenza la patogenesi risulta essere differente. In aggiunta svariati casi di carcinoma papillare di tipo sporadico hanno traslocazioni cromosomiche che coinvolgono il gene TFE3 a

livello del cromosoma Xp11.2 [Weterman MA *et al.*, 1996] che codifica per un fattore di trascrizione che lega leucina, importante per la stimolazione dell'inibitore dell'attivazione del plasminogeno e per lo sviluppo degli osteoclasti, nonché collegato al prodotto genico del proto-oncogene c-myc. Sono state identificate diverse traslocazioni del gene TFE<sub>3</sub>, e tutte hanno come prodotto una proteina di fusione che contiene un DNA-binding domain e la regione di legame per la leucina di TFE<sub>3</sub>, mancante però della regione N-terminale contenente il dominio transattivante [Weterman MA *et al.*, 1996; Nagashima Y *et al.*, 2004]. Bambini e soggetti di giovane età vengono colpiti da RCC con TFE<sub>3</sub> mutato, indipendentemente dal sesso.

### Carcinoma renale cromofobo

Meno aggressivo degli altri RCC, rappresenta circa il 5% delle lesioni neoplastiche renali [Kovacs G. *et al.*, 1997;]. Questo carcinoma colpisce entrambi i sessi con frequenza paragonabile e un'età leggermente inferiore rispetto al ccRCC. Il tumore tende ad avere un colore beige omogeneo senza emorragia o necrosi, istologicamente è caratterizzato da foglietti solidi di cellule e da un'architettura ghiandolare di cellule di grandi dimensioni dotate di un citoplasma granulare e pallido, o eosinofilo, causato dalla presenza di un numero variabile di microvescicole visibili al microscopio elettronico. Queste cellule sono spesso binucleate o con nuclei hanno irregolare [Nagashima Y *et al.*, 2004]. Trasformazioni sarcomatoidi sono associate a patologia più aggressiva. La relazione tra oncocitoma e carcinoma cromofobo non è ancora chiara. Entrambi hanno origine dalle cellule intercalate del dotto collettore e mostrano alterazioni a livello dei mitocondri. L'oncocitoma si ipotizza essere la controparte benigna del carcinoma renale cromofobo [Lopez-Beltran A *et al.*, 2006].

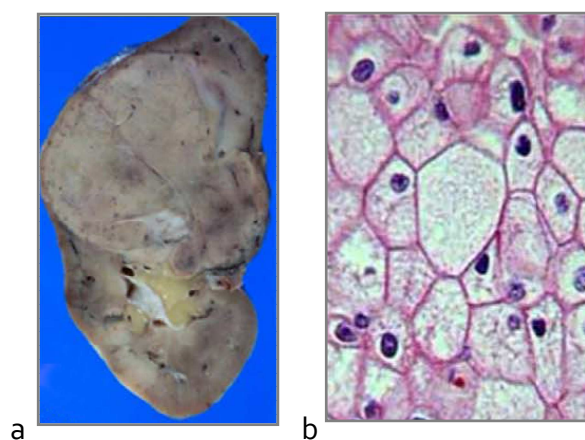


Figura 5. Carcinoma renale cromofobo a)Aspetto macroscopico b)Immagine istologica

Dal punto di vista citogenetico, l'RCC cromofobo mostra frequentemente la perdita di eterozigosi dei cromosomi 1,2,6,10,13,17 e 21 oltre che ipodiploidia dovuta a perdita multipla e non casuale di cromosomi [Speicher MR *et al.*, 1994].

#### Carcinoma del dotto collettore (CDC)

Costituisce circa l'1% delle neoplasie renali. L'età media dei pazienti alla diagnosi è di 55 anni, e ha una leggera predominanza di sviluppo nel sesso maschile. Origina dalle cellule principali del dotto collettore, è posizionato nella parte centrale del rene ed ha una tipica colorazione grigio-bianca [Lopez-Beltran A *et al.*, 2006]. L'aspetto morfologico generalmente accettato per questo tipo di carcinoma è caratterizzato dalla presenza di canali irregolari rivestiti da tessuto epiteliale atipico. I canali sono collocati in uno stroma desmoplastico con infiltrazioni infiammatorie [Fleming S e Lewi H., 1986]. La maggior parte dei carcinomi al dotto collettore viene diagnosticata in stadio avanzato, con presenza ormai di metastasi. Al giorno d'oggi non sono stati riscontrati pattern genetici correlabili a questo tipo di tumore. Recentemente è stata identificata una variante più aggressiva di questo tumore: il *carcinoma renale midollare* che colpisce generalmente giovani maschi e origina dal dotto collettore della midollare [Lopez-Beltran A *et al.*, 2006].

#### Carcinoma a cellule fusiformi, mucinose e tubolari

Questa forma tumorale, inclusa per la prima volta nella classificazione nel 2004, è un tipo di carcinoma a basso grado di aggressività composto da tubuli altamente impacchettati e separati da uno stroma pallido e mucinoso, e da una componente cellulare fusiforme. Sembra derivare dal nefrone distale. A un'analisi con ultrasuoni, si presenta come una massa asintomatica circoscritta. Solo un caso ha presentato metastasi. Sono coinvolti diversi cromosomi, alcuni dei quali subiscono perdita di materiale genico (1, 4, 6, 8, 13 e 14), mentre altri lo acquisiscono (7, 11, 16 e 17). Si può osservare una predominanza di insorgenza della patologia nella popolazione femminile, e l'età media dei soggetti affetti è di 53 anni [Lopez-Beltran A *et al.*, 2006].



### 1.1.3 Diagnosi e prognosi

Il carcinoma renale può rimanere clinicamente occulto per gran parte del suo decorso. La classica triade di presentazione, dolore, ematuria, massa palpabile al fianco, si manifesta solo nel 9% dei pazienti e spesso è indicativa di malattia avanzata. Un tumore del rene può espandersi raggiungendo anche grandi dimensioni nel retroperitoneo, senza dar segni di sé fino alla comparsa di metastasi. La maggior parte dei carcinomi renali viene diagnosticata tramite radiografia. Spesso però questa patologia segue un decorso asintomatico e la diagnosi avviene incidentalmente. La stadiazione del tumore che è, al momento, il più potente indicatore prognostico per RCC, descrive la severità di uno specifico cancro basandosi sulle caratteristiche del tumore primario e sulla sua diffusione nell'organismo [Moch H *et al.*, 2009]. Per il carcinoma renale si utilizza il sistema di stadiazione Tumor Nodes Metastasis (TNM), un dinamico sistema di stadiazione periodicamente aggiornato che definisce l'estensione locale del tumore primario (parametro T), il coinvolgimento dei linfonodi regionale (parametro N) e la presenza di metastasi lontane (parametro M). Si distinguono prima di tutto i tumori localizzati (stadi 1 e 2) da quelli che si sono espansi nelle diverse strutture anatomiche che circondano il rene (stadi 3 e 4). All'interno di questi raggruppamenti vengono poi effettuate classificazioni più fini, in base alle dimensioni del tumore, all'infiltrazione dei linfonodi e alla presenza di metastasi (Tab. 1). La più importante tecnica per la stadiazione è la tomografia computerizzata (TC) dell'intero addome: permette di valutare il volume del tumore, la sua localizzazione e la presenza di linfadenopatie. L'uso della TC e della risonanza magnetica, è risultato indispensabile per diagnosticare carcinomi renali a stadi precoci (I - II stadio). Con il progredire della malattia, la massa tumorale cresce e si allarga, andando a colpire anche gli organi adiacenti. I sintomi che si manifestano a questo stadio avanzato sono molteplici: perdita di peso, febbre, ipertensione e sudori notturni. Si possono riscontrare anche sindromi paraneoplastiche come ipercalcemia ed eritrocitosi. Circa un terzo dei pazienti con RCC sviluppa metastasi diffuse [Flanigan RC *et al.*, 2003]; gli organi maggiormente colpiti sono i polmoni (75%), i tessuti molli (36%), le ossa (20%), il fegato (18%), la pelle (8%) e il sistema nervoso centrale (8%).

Un altro importante indicatore prognostico è il *grading* del tumore basato sulle caratteristiche morfologiche delle cellule neoplastiche. Attualmente il sistema di *grading* più utilizzato per il carcinoma renale è quello nucleare di Fuhrman [Ficarra *et al.*, 2004] che suddivide gli RCC in 4

categorie basate sulla dimensione e la morfologia del nucleo cellulare e sulla presenza o meno di nucleoli, con prognosi progressivamente peggiore. Altri fattori prognostici in grado di predire il rischio di progressione della malattia e la sopravvivenza dei pazienti sono quelli di tipo clinico (es. età alla diagnosi e modalità di esordio della neoplasia) e quelli di laboratorio (es. livelli ematici di calcio, conta delle piastrine e livelli di proteina C reattiva).

Tabella 1. Stadiazione TNM dei tumori del rene: confronto tra la versione del 2002 e la versione del 2009. In corsivo vengono riportati i cambiamenti dell'ultima versione del 2009 [Ficarra V *et al.*, 2010].

	TNM, 2002	TNM, 2009
<b>TUMORE PRIMITIVO (T)</b>		
T <sub>1</sub>		
T <sub>1a</sub>	Tumore ≤ 4 cm, confinato al rene	Tumore > 4 cm ≤ 7 cm, confinato al rene
T <sub>1b</sub>	Tumore ≤ 4 cm, confinato al rene	Tumore > 4 cm ≤ 7 cm, confinato al rene
T <sub>2</sub>	Tumore > 7 cm, confinato al rene	
T <sub>2a</sub>		<i>Tumore &gt; 7 cm ≤ 10 cm, confinato al rene</i>
T <sub>2b</sub>		<i>Tumore &gt; 10 cm, confinato al rene</i>
T <sub>3</sub>	Tumore esteso all'asse venoso, al surrene o al grasso perirenale ma non oltre la fascia di Gerota	
T <sub>3a</sub>	Infiltrazione del grasso perirenale o del seno renale o del surrene	Infiltrazione del grasso perirenale o del seno renale; <i>invasione della vena renale</i>
T <sub>3b</sub>	Trombosi della vena renale o della vena cava inferiore sottodiaframmatica	<i>Invasione della vena cava inferiore sottodiaframmatica</i>
T <sub>3c</sub>	Trombosi della vena cava sopradiaframmatica o infiltrazione della parete della vena cava	Invasione della vena cava inferiore sopradiaframmatica o infiltrazione della parete della vena cava
T <sub>4</sub>	Neoplasia estesa oltre la fascia di Gerota	<i>Neoplasia infiltrante il surrene omolaterale o estesa oltre la fascia di Gerota</i>
<b>LINFONODI (N)</b>		
N <sub>x</sub>	I linfonodi regionali non sono stati valutati	I linfonodi regionali non sono stati valutati
N <sub>0</sub>	Assenza di metastasi linfonodali	Assenza di metastasi linfonodali
N <sub>1</sub>	Metastasi ad un singolo linfonodo regionale	Metastasi ad un singolo linfonodo regionale
N <sub>2</sub>	Metastasi a più di un linfonodo regionale	Metastasi a più di un linfonodo regionale
<b>METASTASI A DISTANZA (M)</b>		
M <sub>x</sub>	Le metastasi a distanza non sono state valutate	Le metastasi a distanza non sono state valutate
M <sub>0</sub>	Metastasi a distanza assenti	Metastasi a distanza assenti
M <sub>1</sub>	Metastasi a distanza presenti	Metastasi a distanza presenti

### 1.1.4 Terapia

#### Terapia chirurgica

Al giorno d'oggi l'intervento più praticato e più efficace in caso di carcinoma renale è la nefrectomia, radicale o parziale. La nefrectomia radicale consiste nell'asportazione del rene in toto, compreso la fascia di Gerota, la capsula surrenalica ipsilaterale e i linfonodi regionali. La nefrectomia parziale invece viene effettuata in caso di tumori il cui diametro misura meno di 4 cm. La nefrectomia parziale viene praticata anche in caso di rene solitario, masse tumorali bilaterali, insufficienza renale, ipertensione, diabete, o in caso di carcinoma renale di tipo ereditario. I risultati ottenuti con la nefrectomia parziale sono simili a quelli ottenuti con la nefrectomia radicale, ma la prima presenta una percentuale di ricorrenza pari al 3-6% [Novick AC *et al.*, 2002]. La nefrectomia, anche se radicale, si rivela comunque inutile in caso di presenza di metastasi.

Esistono approcci chirurgici di natura meno invasiva, come gli interventi in laparoscopia e la tecnica di ablazione percutanea. La prima offre periodi di ospedalizzazione e ricovero più brevi e disagi post-operatori di minor entità. E' una tecnica che potenzialmente può causare maggiori complicazioni preoperatorie. La più recente tecnica di ablazione percutanea viene praticata per tumori di piccole dimensioni e consiste nella distruzione di cellule tumorali tramite l'utilizzo di una sonda che si inserisce dalla pelle all'interno della massa tumorale, a livello della quale emette radiofrequenze per ablazione a caldo [Zlotta AR *et al.*, 1997] o per crioablazione [Uchida M *et al.*, 1995]. Sembrano essere ridotte le complicanze, ma sono stati riportati casi di emorragie intraoperatorie e post-operatorie, danni a livello dell'apparato urinario e lesioni alle strutture adiacenti. Questa tecnica viene effettuata su pazienti che presentano una massa tumorale con diametro inferiore ai 3 cm e su pazienti che sono soggetti a rischi elevati se trattati con altri tipi di chirurgia.

#### Terapia Medica

Numerosi sono i trattamenti non chirurgici, ma i risultati ottenuti con questi ultimi sono scarsi: il carcinoma renale risulta infatti resistente sia alla radioterapia, sia alla chemioterapia ma anche alla terapia con ormoni [Motzer RJ *et al.* 2000]. In uno studio sulla radioterapia con osservazioni in pazienti sottoposti a nefrectomia per RCC allo stadio II e III, non c'erano differenze in termini di riscontro di recidiva o sopravvivenza, e i trattamenti portavano ad una significativa morbilità delle

strutture addominali adiacenti. La probabilità di risposta agli agenti chemioterapici è di circa il 4-6%. Questo scarso successo di risposta è probabilmente correlato all'espressione nelle cellule del carcinoma renale del gene MDR-1 (human multidrug resistance gene-1) che codifica per una proteina di membrana (P-glicoproteina) capace di estrudere i farmaci dalla cellula.

Il medrossiprogesterone acetato, presunto bloccante dei recettori dei glucocorticoidi in alcune cellule di RCC, è risultato inattivo come adiuvante in un trial di 136 pazienti comparati con il gruppo di osservazione [Pizzoccaro *et al.*, 1987], anche se ha un certo valore nel controllo delle metastasi.

Molti trials che esaminano gli effetti dell'interferone, cellule tumorali autologhe miscelate al bacillo di Calmette-Guerin, interleuchina-2, citochine con 5-fluorouracile e combinazioni di queste molecole non hanno mostrato vantaggi di sopravvivenza.

Parziali miglioramenti si sono avuti con l'introduzione dell'immunoterapia, che tenta di offrire una maggior antigenicità al tumore e una maggior sorveglianza all'ospite. L'utilizzo di "modificatori non specifici della risposta biologica" (citochine), come l'interleuchina 2 (IL-2) e l'interferone  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), hanno dato risultati positivi (risposta alla terapia) nel 10-20% dei casi trattati [Amato RJ, 2000] con una durata media di 3-16 mesi: sebbene modesti, questi risultati appaiono nettamente superiori a quelli che si ottengono con la chemioterapia. Immunoterapia in elevate dosi con interleuchina-2 (IL-2) somministrata per endovena mostra risposte complete e durature in circa il 6% dei pazienti, benché questo trattamento sia associato ad elevata tossicità [Di Lorenzo G *et al.*, 2009]. La sopravvivenza a lungo termine comunque si ottiene solo in pochi casi [Motzer RJ *et al.* 2000]. Anche l'immunoterapia cellulare è considerata un'area di grande interesse: [Igarashi T *et al.*, 2004] hanno trovato, in vitro, un'attività citotossica di cellule NK allogeniche in cellule di RCC, identificando in tal modo un potenziale meccanismo di attività anti-tumorale. Un altro tipo di immunoterapia cellulare che viene proposto è la vaccinazione con cellule dendritiche recanti antigeni provenienti dalle cellule tumorali. Il vaccino viene ben tollerato, ma non è stato ancora dimostrato un aumento della sopravvivenza tramite l'utilizzo di questa tecnica.

Sono stati avviati trials per vaccini per RCC; in ogni caso, nel trial più grande su adiuvanti per RCC condotto in passato su circa 800 pazienti, l'uso di un vaccino per una heat shock protein non ha aumentato la sopravvivenza. Un trial in fase tre che ha usato un vaccino autologo a cellule renali tumorali adiuvante somministrato per via intradermica ogni 4 settimane per 6 mesi al momento della nefrectomia radicale per carcinoma a cellule renali non metastatico è stato associato ad un

aumento della probabilità di sopravvivenza del 77.4% per i pazienti vaccinati, contro il 67.8% del gruppo controllo [Jocham D *et al.*, 2004].

### Terapie molecolari mirate

Negli ultimi anni sono emerse nuove possibilità terapeutiche basate principalmente su anticorpi monoclonali che agiscono contro i target cellulari responsabili della progressione del carcinoma renale, neutralizzandoli.

Le nuove conoscenze riguardo la biologia molecolare dell'RCC hanno permesso lo sviluppo di diversi nuovi farmaci aventi targets specifici in questi pathways, e vi sono prove convincenti riguardo ai loro benefici clinici. Oggigiorno l'RCC è trattato usando farmaci targets per il fattore di crescita endoteliale (VEGF), il fattore di crescita piastrinico (PDGF) e i pathways di azione della rapamicina in mammiferi (mTOR) [Di Lorenzo G *et al.*, 2009].

Queste nuove molecole sono state testate fino ad oggi solo su pazienti con RCC in stadio avanzato o con presenza di metastasi. Questi farmaci svolgono una duplice azione: una funzione anti-angiogenica (inibendo la crescita dei vasi sanguigni nel tumore e privandolo di ossigeno e nutrienti), e un'altra funzione inibente su proteine presenti nella cellula tumorale che ne stimolano la crescita. Almeno tredici molecole sono attive contro l'RCC; al momento cinque di queste (Temisirolimus, Sunitinib, Sorafenib, Bevacizumab, Everolimus) sono state approvate dalla Food and Drug Administration (FDA) americana.

## **1.2 LA NEFROPATIA DIABETICA**

### **1.2.1 Caratteristiche generali**

La nefropatia diabetica (ND) è, nel mondo occidentale, la principale causa di insufficienza renale terminale (ESRD, end stage renal disease) e una delle maggiori cause di morbidità e mortalità correlate al diabete mellito [Held PJ *et al.*, 1991]. 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 renale, e da ipertensione arteriosa; la presenza di questa patologia si accompagna inoltre ad un più elevato rischio di malattie cardiovascolari e di altre complicanze tipiche del diabete (retinopatia e neuropatia diabetica) [National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2010]. La nefropatia diabetica 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). 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 a 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 a una carenza di vitamina D; in questo stadio sono necessari il trattamento sostitutivo con dialisi o il trapianto renale [Nielsen S *et al.*, 1997]. 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 [Rossing P, 2006]; nel 2007 la US Renal Data System ha stimato che negli Stati Uniti il 36.9 % dei pazienti con ESRD presenta nefropatia diabetica ed il dato è destinato ad incrementare ulteriormente nei prossimi 15 anni a causa del forte aumento del numero di pazienti che soffrono di diabete. Sia i pazienti con diabete di tipo 1 insulino – dipendente sia i pazienti con diabete di tipo 2 non insulino – dipendente possono sviluppare nefropatia diabetica; in particolare essa complica il 30 % dei casi di diabete di tipo 1 e il 20 % dei casi di diabete di tipo 2. 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) [Fioretto P *et al.*, 1996].

### 1.2.2 Patogenesi

Lo sviluppo patogenetico della nefropatia diabetica è stato dettagliatamente descritto nel diabete di tipo 1 da Mogensen *et al.* [Mogensen CE *et al.*, 1983, Mogensen CE *et al.*, 1984, Mogensen CE *et al.*, 1990]; è possibile delinearla, sebbene meno precisamente, anche nel diabete di tipo 2 [Mogensen CE *et al.*, 1984, Alzaid AA *et al.*, 1994, Lebovitz HE *et al.*, 1994]. Nello stadio I (Tab.2), 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 (iperfiltrazione e iperperfusione) 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'ipertrofia glomerulare, 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 (escrezione di albumina compresa tra 20 e 200 µg/min o 30-300 mg/l), prima evidenza clinica dello sviluppo della patologia. Inoltre sono presenti evidenti alterazioni strutturali a livello del glomerulo; si assiste poi 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. 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 ,2004]. 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. Una volta comparsa la nefropatia clinica, la progressione verso l'insufficienza renale terminale (ESRD) è pressoché inesorabile nei pazienti non trattati. Lo stadio V è infine caratterizzato dall'insufficienza renale cronica che evolve verso l'uremia terminale e il conseguente trattamento sostitutivo con dialisi o trapianto renale.

Tabella 2. I V stadi della nefropatia diabetica: FGR (tasso di filtrazione glomerulare); AER (escrezione urinaria di albumina); PA (pressione arteriosa) [Cristoph Hasslacher, La Nefropatia Diabetica 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

### Alterazioni emodinamiche

Nell'evoluzione della malattia quindi si verificano fondamentali cambiamenti emodinamici a livello renale, tramite processi strettamente correlati alla condizione diabetica: l'angiotensina II ad esempio, la cui sintesi viene indotta dall'iperglicemia, esercita sia effetti emodinamici sia effetti trofici, infiammatori e profibrogenici [Wolf G. , 2003]. Ulteriori fattori che vengono maggiormente espressi nel paziente diabetico come i VEGFs e le citochine quali il TGF- $\beta$  possono influenzare l'emodinamica glomerulare [Chen S *et al.*, 2001]. I cambiamenti emodinamici glomerulari quali l'iperfiltrazione e l'iperperfusione giocano un ruolo centrale nello sviluppo della nefropatia diabetica; insorgono molto precocemente e derivano da una riduzione della resistenza, e quindi dilatazione, sia dell'arteriola afferente sia di quella efferente del glomerulo [Hostetter TH *et al.*, 2003]. Questi precoci cambiamenti emodinamici facilitano sia la perdita dell'albumina attraverso i capillari glomerulari contribuendo all'insorgenza di microalbuminuria sia le progressive modificazioni strutturali del rene che accompagnano l'evoluzione della nefropatia diabetica [Ziyadeh FN *et al.*, 2008].

### Alterazioni strutturali

Sono state descritte diverse alterazioni strutturali renali nei pazienti diabetici sia a livello glomerulare (Fig. 6) sia a livello tubulare.

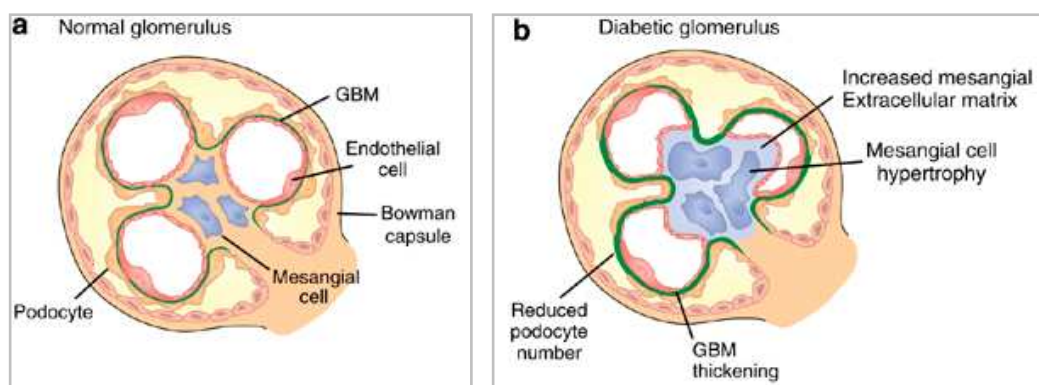


Figura 6. a) glomerulo normale e b) diabetico con nefropatia. Si osservano: l'ispessimento della GBM e l'espansione mesangiale per ipertrofia cellulare e accumulo della matrice extracellulare. La superficie di filtrazione risulta ridotta in seguito all'espansione mesangiale. I podociti vanno incontro a diversi cambiamenti, principalmente si osserva una riduzione del loro numero [Jefferson JA *et al.*, 2008].



Il più precoce cambiamento morfologico è rappresentato dall'espansione dell'area mesangiale; 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]. L'iperglicemia cronica, tipica di una condizione diabetica, è infatti in grado di indurre ipertrofia delle cellule mesangiali [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].

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, 1997].

Un'ulteriore alterazione strutturale che si verifica progressivamente nella nefropatia diabetica 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. L'aumento della componente cellulare può essere mediato dalla reversione del fenotipo delle cellule epiteliali a mesenchimali, un processo noto come "*epithelial to mesenchimal transition*" (EMT), che comporta 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 in maniera determinante 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 1.3). Recenti studi hanno mostrato che nella nefropatia diabetica si verificano precoci alterazioni strutturali e funzionali anche a carico dei podociti, riassunte nella figura 1.4. I podociti, cellule epiteliali altamente specializzate che avvolgono i capillari glomerulari, aderiscono alla GBM attraverso le integrine  $\alpha_3\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_1$ ; 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 nefropatia diabetica 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 nefropatia diabetica [Steffes MW *et al.*, 2001].

### Fattori coinvolti nelle alterazioni renali

Le alterazioni a livello renale sono prevalentemente causate dall'iperglicemia cronica tramite diversi processi: induzione del meccanismo di glicosilazione non enzimatica a generare gli "advanced glycation end products" (AGEs), stimolazione del pathway dell'aldoso reductasi ("polyol pathway") e dell' "hexosamine pathway", attivazione della protein chinasi C (PKC). Tutti questi pathway (Fig.7) sono accomunati dall'overproduzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) indotta dall' iperglicemia stessa [Brownlee M, 2001].

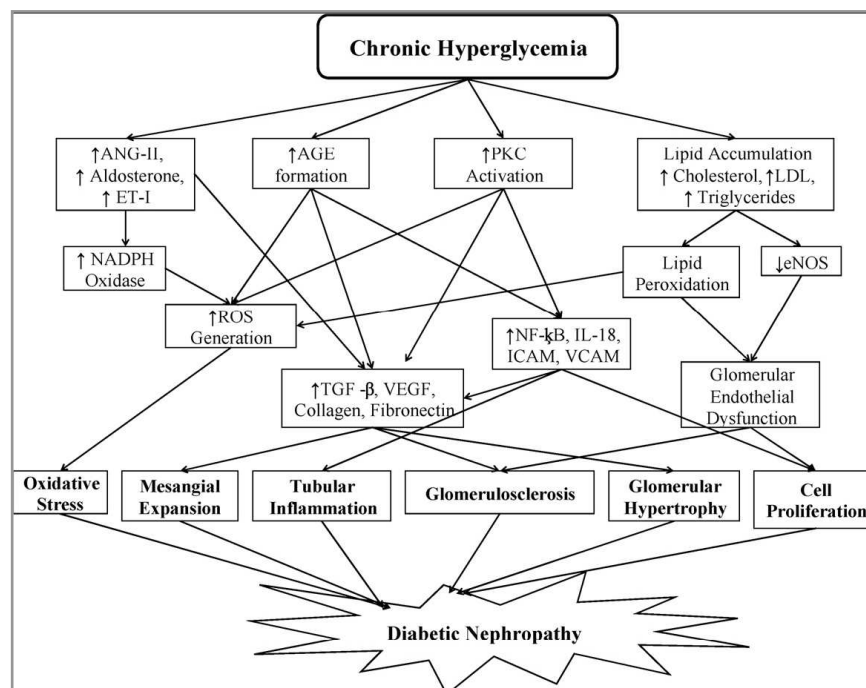


Figura 7. Panoramica dei meccanismi di signalling coinvolti nella patogenesi della nefropatia diabetica indotti dall'iperglicemia cronica [Balakumar *et al.*, 2009]

Un altro importante fattore è però l'azione di numerosi fattori di crescita, citochine, chemochine e agenti vasoattivi (es. l'ormone della crescita e gli insulin-like growth factors) implicati nei cambiamenti strutturali e funzionali che si manifestano nella nefropatia diabetica [Gooch JL *et al.*, 2001]. Inoltre alcuni studi clinici hanno evidenziato che una condizione di lieve anemia incrementa il rischio di progressione della nefropatia in pazienti con diabete di tipo 2 [Gouva C *et al.*, 2004]. L'esatto meccanismo attraverso cui l'anemia favorisce la progressione della nefropatia non è ancora stato chiarito, tuttavia l'anemia causa ipossia renale, un fattore che va ad aggravare la fibrosi interstiziale in quanto determina l'attivazione di un fattore trascrizionale, l'hypoxia-inducing factor-1 (HIF-1), che favorisce l'espressione di citochine e fattori di crescita con effetti fibrogenici. [Fine LG *et al.*, 2000, Wolf G *et al.*, 2004]. Biopsie renali su pazienti con nefropatia diabetica e studi su modelli animali hanno rivelato la presenza di cellule infiammatorie nei compartimenti glomerulare e tubulo-interstiziale [Noronha IL *et al.*, 2002]. E' stato poi osservato che nei pazienti con nefropatia diabetica si assiste ad una marcata riduzione dell'espressione della nefrina nei podociti rispetto ad individui sani di controllo alterando così la barriera di filtrazione glomerulare e contribuendo all'insorgenza di microalbuminuria [Benigni A *et al.*, 2004]. Inoltre, nei pazienti con diabete (con o senza albuminuria), è presente un significativo aumento dell'escrezione della nefrina (17-30 %) rispetto ad individui sani di controllo. L'escrezione della nefrina potrebbe rappresentare allora una precoce evidenza del danno a carico dei podociti [Wolf G *et al.*, 2007]. Diversi studi hanno anche dimostrato che un'alterata regolazione delle metalloproteasi (MMP) che costituiscono una famiglia di proteasi zinco-dipendenti con capacità di degradazione di tutte le componenti della matrice extracellulare, contribuisce allo sviluppo della nefropatia diabetica ed in particolar modo alle prime fasi della patologia, caratterizzate da anomalie strutturali renali a livello glomerulare ed interstiziale con accumulo di matrice extracellulare IGF [Fowlkes JL *et al.*, 1995, Zhuang S *et al.*, 2008]. Infine il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) risulta attivato nella nefropatia diabetica [Ballerman BJ *et al.*, 1984] causando ipertensione sistemica e glomerulare oltre che l'induzione nelle cellule renali di diverse citochine, chemochine e fattori di crescita con effetti proinfiammatori e profibrogenici [Wolf G *et al.*, 1997].

### 1.2.3 Diagnosi e prognosi

Il primo segno di nefropatia diabetica 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. A tal fine dovrà essere adottata 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 urine emesse al mattino al risveglio 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). A questo livello di albuminuria è presente, di solito, proteinuria clinicamente rilevabile con i comuni sticks.

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 [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 nefropatia diabetica. Esistono prima di tutto vari fattori genetici la cui esistenza 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 nefropatia diabetica 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 nefropatia diabetica è rappresentato da studi di associazione su singoli geni candidati; l'attenzione è stata rivolta in particolare ai geni connessi con il sistema RAS e soprattutto ai polimorfismi del gene codificante per l'enzima che converte l'angiotensina (ACE), I (ANG-I) in angiotensina II (ANG-II) [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). 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 del gene. Tra gli altri loci che sono stati investigati in qualità di geni candidati troviamo i loci connessi con la resistenza all'insulina, come il gene ENPP1, il locus codificante per l'enzima aldoso reductasi (AKR1B1), il locus codificante per il PPAR $\gamma$ 2 (peroxisome proliferator activated-receptor 2), il locus che codifica per la catalasi, e il locus codificante per il recettore glicoproteico AGE (RAGE) [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].

Un altro importante fattore che influenza la prognosi dei pazienti 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 l'abbassarsi dei valori glicemici può comunque favorire la 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 per fattori genetici predisponenti [Schmitz A *et al.*, 1994].

Inoltre l'ipertensione arteriosa e la nefropatia diabetica appaiono strettamente correlate. 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]. L'ipertensione è stata riscontrata nel 50 % dei pazienti con diabete di tipo 1 e nell'80 % dei pazienti di tipo 2 microalbuminurici. E' ancora da chiarire se essa 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]. Di regola una maggiore assunzione di proteine con la dieta si correla con una maggiore escrezione di albumina nelle urine. E' noto che l'incidenza della nefropatia è superiore nelle popolazioni nordiche dove la percentuale di proteine animali nel cibo è maggiore rispetto alle popolazioni dell'Europa occidentale, nelle quali la dieta contiene più grassi e carboidrati [Toeller M *et al.*, 1997]. La dislipidemia è un fattore di rischio per lo progressione della nefropatia diabetica 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 e il declino progressivo della funzionalità renale [Hovind P *et al.*, 2001]. Pur non essendo ben definito il suo meccanismo patogenetico, il fumo può causare vasocostrizione, anomalie nell'aggregazione piastrinica, alterazione nella regolazione della pressione arteriosa e della coagulazione, accelerando pertanto quei processi responsabili di danno vascolare aterosclerotico.

#### **1.2.4 Terapia**

##### Terapia farmacologica

Dal momento che il sistema renina-angiotensina-aldosterone gioca un ruolo centrale nella patogenesi della nefropatia diabetica, 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 AT<sub>1</sub> (AIIIRA). Gli inibitori dell'ACE comprendono il captopril, il lisinopril, l'imidapril, mentre i bloccanti del recettore AT<sub>1</sub> comprendono il losartan, l'irbesartan. Il captopril è stato il primo farmaco approvato per il trattamento della nefropatia diabetica; 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 nefropatia diabetica 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 AT<sub>1</sub>, determina la downregolazione dell'espressione del TGF-β e il blocco dell'attività della collagenasi prodotta dalle cellule mesangiali. [Singh R *et al.*, 1999].

La produzione renale di aldosterone, poi, induce infiammazione e accumulo di matrice extracellulare. E' stato visto che il trattamento con spironolattone, antagonista del recettore dell'aldosterone, determina la downregolazione di fattori in grado di favorire la produzione di matrice extracellulare, come il TGF-β, le metalloproteasi, il VEGF e l'IGF [Han SY *et al.*, 2006]. E' stato inoltre osservato che il trattamento con spironolattone 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-κB, dell'IL6, del TGF-β, della fibronectina e del collagene di tipo IV [Siragy HM, 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 nefropatia diabetica; 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 nefropatia diabetica [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]. È anche stato dimostrato che la somministrazione di un anticorpo anti TGF-β è in grado di sopprimere la fibrosi renale e di ridurre l'albuminuria in ratti diabetici con nefropatia [Hill C *et al.*, 2001]. In più in topi diabetici con nefropatia, la somministrazione dell'hepatocyte growth factor (HGF) riduce l'incidenza di albuminuria, sclerosi glomerulare, ipertrofia glomerulare e fibrosi tubulointerstiziale, sopprimendo la produzione renale di TGF-β [Mizuno S *et al.*, 2004]; infine la somministrazione di oligonucleotidi antisenso contro l'mRNA del TGF-β, in grado di inibirne la traduzione, si è dimostrata efficace, in modelli animali, nella protezione renale [Jeong HS *et al.*, 2004].

Un'altro bersaglio della terapia farmacologica sono i prodotti terminali della glicosilazione avanzata (AGE), un gruppo eterogeneo di composti implicati nelle complicazioni del diabete. Sono stati proposti diversi agenti inibitori degli AGE 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-β, del

VEGF e del collagene di tipo IV [Tsuchida K *et al.*, 1999]. L'ALT-946 possiede effetto renoprotettivo riducendo l'albuminuria e inibendo l'accumulo degli AGEs in ratti diabetici con nefropatia [Forbes JM *et al.*, 2001]. Anche l'aminoguanidina ha mostrato effetti renoprotettivi inibendo l'accumulo della matrice extracellulare e attenuando l'espansione mesangiale mediante l'inibizione dell'overespressione del CTGF [Twigg SM *et al.*, 2002].

La PKC, infine, determina upregolazione del TGF- $\beta$ , incrementa la sintesi di proteine della matrice extracellulare ed è implicata nell'overespressione di VEGF nei podociti indotta dall'iperglicemia.

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

### 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 nefropatia diabetica 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 nefropatia diabetica. E' fondamentale l'adeguata informazione del paziente sulle prospettive e le opzioni del trattamento sostitutivo: sono auspicabili programmi *ad hoc*, e può essere utile un intervento psicologico istituzionale. 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 pre-dialitica. 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 [Hricik DE *et al.*, 1998].

### **1.3 BIOMARCATORI**

I biomarcatori possono essere definiti come segnali misurabili nei tessuti o nei liquidi biologici, 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].

#### Biomarcatori per il carcinoma renale

Uno dei traguardi più importanti della ricerca sul cancro è predire l'invasività e il potenziale metastatico del tumore ad uno stadio precoce. Nel carcinoma renale la predizione delle metastasi utilizzando marcatori prognostici tumorali rimane ancora uno dei problemi principali. I marcatori tumorali sono sostanze prodotte direttamente dal tumore, in quantità dosabile, come ormoni, enzimi o altre proteine, più o meno correlate con la crescita numerica delle cellule tumorali oppure sono sostanze prodotte dall'organismo in risposta al tumore, come le proteine della fase acuta dell'infiammazione. Dato che si può affermare con sufficiente sicurezza che non esiste un solo tipo di tumore associato ad uno specifico organo [Conley BA *et al.*, 2004], ne consegue che non esiste neppure il marcatore tumorale "ideale" ad esso correlato, ma che invece ogni tipo di marcatore deve essere inquadrato nella complessa situazione dell'evento tumorale in atto. I più larghi consensi sull'utilità clinica dei marcatori tumorali convergono pertanto sul loro impiego nel monitoraggio dell'evoluzione e dell'andamento della patologia neoplastica. La strada migliore da percorrere per un ottimale utilizzo dei marcatori tumorali si è nella realtà rivelata essere anche

l'associazione di più marcatori, al fine di cumularne l'efficacia diagnostica [Ahlquist DA *et al.*, 2000]. La fase nella quale i marcatori tumorali trovano migliore applicazione è l'identificazione precoce di recidive o metastasi nel paziente neoplastico libero da malattia. Un innalzamento del marcatore è fortemente significativo di ripresa di malattia, purché il valore del marcatore sia confermato da altri due o tre dosaggi successivi e sia stata esclusa qualsiasi patologia benigna concomitante. Purtroppo non è vero il contrario, cioè non sempre un valore negativo di marcatore esclude la presenza di malattia. Il marcatore tumorale può essere richiesto dal clinico anche durante il monitoraggio della terapia in quanto le variazioni della concentrazione del marcatore riflettono per lo più il successo o l'insuccesso di una terapia. Anche in questo caso, però, valori negativi di marcatore non sono sempre significativi di risposta alla terapia. Ad oggi sono stati analizzati numerosi biomarkers putativi per RCC ma nessuno di questi è utilizzato nella gestione clinica dei pazienti.

Sono stati valutati numerosi marcatori tissutali con intenti principalmente prognostico come predire l'eventuale insorgenza di metastasi o recidive e la risposta a terapie di pazienti sottoposti a nefrectomia. Tra questi STAT è un attivatore della trascrizione che promuove la progressione del ciclo cellulare; p53 è considerato un importante inibitore della proliferazione cellulare ed un induttore dell'apoptosi [Masuda A *et al.*, 2009]. Il Tumor Associated Trypsin Inibitor (TATI) è proposto come marcatore serico dell'RCC [Kashyap MK *et al.*, 2005]. Il valore di TATI in questo studio correla con lo stadio della patologia e può quindi essere utile per il follow-up post operatorio.

Tissue Polypeptide-Specific Antigen (TPS) è un marcatore tissutale tumorale che indica la velocità di proliferazione tumorale più che la gravità del tumore [Chang CH *et al.*, 2002]. La gamma enolasi o fosfopiruvato idratasi (o NSE, Neuron-specific enolase) è un marcatore tissutale dell'RCC il cui possibile utilizzo sarebbe quello di valutare lo stadio della patologia e monitorare la risposta al trattamento [Takashi M *et al.*, 1989]. L'attività del biomarcatore tissutale tumorale dell'RCC, timidilato sintetasi, potrebbe essere associata con il potenziale di malignità dell'RCC [Mizutani Y *et al.*, 2003].

L'anidrasi carbonica IX (CAIX) regola la proliferazione cellulare in risposta ad ipossia ed è stato ipotizzato un suo coinvolgimento nella carcinogenesi [Zhou GX *et al.*, 2009]. Nel 1999 Murakami *et al.*, hanno osservato che l'espressione tissutale di CAIX è un potenziale biomarcatore diagnostico per ccRCC [Murakami Y *et al.*, 1999]. CAIX riflette modificazioni significative nella biologia del tumore, il che potrebbe essere utilizzato per predire l'esito clinico e identificare i

pazienti ad alto rischio per sottoporli alle terapie con adiuvanti. La produzione dei VEGF(R)s è fortemente incrementata nei pazienti RCC con alterazioni del gene VHL e risulta essere anche associata ad un fenotipo tumorale più aggressivo [Negrier S e Raymond E, 2011]. Infine MMP-2 e MMP-9 (metallo proteinasi della matrice 2 e 9) sono largamente espresse in numerosi tumori maligni e si ritiene siano in grado di favorire l'insorgenza di metastasi degradando le componenti della matrice extracellulare un aumento dei loro livelli di espressione correla con l'aggressività, il grading tumorale, la sopravvivenza e anche con l'insorgenza di sintomi precoci nei tumori localizzati [Kallakury BV *et al.*, 2001].

Sono stati studiati anche marcatori serici che potrebbero invece avere maggiori applicazioni nella diagnosi precoce del tumore o durante il follow up del paziente [Kashyap MK *et al.*, 2005]. Tra questi la ferritina è considerata un possibile biomarcatore serico dell'RCC in quanto il suo livello di espressione correla con lo stadio dell'RCC [Singh KJ *et al.*, 2005].

La ricerca insegue da sempre lo "specifico" del tumore, una caratteristica cioè che il tumore abbia in più, e non in meno, rispetto al normale e sulla quale fare leva per colpire la cellula tumorale. Purtroppo al momento nessun marcatore tumorale per l'RCC ha caratteristiche di sensibilità e specificità tali da essere usato nella diagnosi precoce e/o screening di massa di una neoplasia per l'RCC.

### Biomarcatori per la nefropatia diabetica

Nel campo della nefropatia diabetica la necessità di biomarcatori specifici si articola su più livelli: prima di tutto sarebbero necessari dei marcatori di suscettibilità che permettano di discriminare quali pazienti diabetici svilupperanno, e quali no, il danno renale, ma anche marcatori che permettano di monitorare la risposta alla terapia intrapresa. Come per il carcinoma renale, però, non sono ancora disponibili biomarcatori specifici [Ameur RB *et al.*, 2010]. 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 nefropatia diabetica; le urine sono facilmente ottenibili in grandi quantità ed in maniera semplice e non invasiva. Marcatori tissutali, invece, avrebbero una scarsa utilità dato che i pazienti diabetici generalmente non vanno incontro a interventi chirurgici a livello renale per cui sarebbe difficile valutarne i livelli e trarne quindi conclusioni prognostiche e/o diagnostiche.

La microalbuminuria, prima evidenza clinica di sviluppo della nefropatia diabetica, 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 e Grassi G 2009]. La transferrina è una proteina plasmatica leggermente più grande dell'albumina la cui presenza nelle urine indica una disfunzione glomerulare [Hong CY *et al.*, 1998]. L'escrezione urinaria di transferrina risulta elevata nei pazienti diabetici anche se ancora normoalbuminurici, per cui la transferrina potrebbe essere un marcatore più sensibile e precoce del danno al glomerulo rispetto alla comparsa di microalbuminuria [Narita T *et al.*, 2006]. Inoltre il collagene di tipo IV, principale componente strutturale della membrana basale glomerulare, viene escreto a livelli maggiori rispetto a i controlli nei pazienti diabetici microalbuminurici e potrebbe essere un segnale più specifico degli stadi precoci della nefropatia diabetica, essendo un segnale delle alterazioni nella matrice extracellulare [Kotajima N *et al.*, 1998]. Infine anche la fibronectina, altro componente della matrice extracellulare, viene escreta a tassi più elevati nei pazienti diabetici e potrebbe essere quindi un utile segnale di danno al glomerulo, anche se non è stata ancora accertata la sua rilevanza rispetto all'albuminuria [Takahashi M 1995]. È interessante notare che sia il collagene di tipo IV sia la fibronectina sono componenti della matrice mesangiale glomerulare e della membrana basale e quindi la loro alterata escrezione potrebbe riflettere il tasso di sintesi/degradazione della matrice nel rene danneggiato [Kanwar YS *et al.*, 2008].

#### **1.4 PROTEOMICA CLINICA**

Lo sviluppo tecnologico, applicato alla pubblicazione dell'intero genoma umano su una banca dati di dominio pubblico, così come la disponibilità di interi genomi di altri organismi, ha dato inizio ad una nuova era nella ricerca scientifica: la proteomica.

Il termine proteomica, coniato per analogia con il vocabolo genomica, indica lo studio di tutte le proteine espresse da un organismo, tessuto o cellula in una determinata condizione e in un preciso istante. Il proteoma completo non è ancora stato caratterizzato per alcun organismo, al contrario del genoma; non è statico e identico per tutte le cellule di un organismo, ma varia a seconda del tessuto, del tipo cellulare, dell'ambiente in cui la cellula è inserita ma anche in funzione dell'età della cellula stessa. L'espressione proteica non cambia solo quantitativamente ma anche qualitativamente nel corso della vita di una cellula. Poiché le proteine sono coinvolte in quasi tutte le attività biologiche, il proteoma è una fonte fondamentale di informazioni per comprendere la biologia cellulare e i suoi meccanismi.

Gli strumenti e le tecniche per l'analisi proteomica sono diversi. L'elettroforesi monodimensionale permette la separazione di proteine in base al loro peso molecolare.

Questo tipo di elettroforesi ha il vantaggio di essere molto veloce e di ottenere facilmente una separazione delle proteine a partire da campioni complessi; contemporaneamente però risulta insufficiente nel momento in cui si vogliono identificare molte proteine e soprattutto se si vogliono separare i singoli tipi proteici.

L'elettroforesi bidimensionale, al giorno d'oggi è la tecnica che viene utilizzata per avere un profilo di tipo quantitativo e qualitativo di una miscela complessa di proteine, così come possono essere i lisati cellulari [Görg A *et al.*, 2004]. La 2-DE permette la separazione delle proteine in base al loro punto isoelettrico (pI), alla loro massa molecolare (Mr). Inoltre offre una mappa piuttosto dettagliata delle proteine stesse, mostrando differenze nei livelli di espressione e la presenza di isoforme o di modificazioni post-traduzionali di particolari proteine. Con questa tecnica, a seconda delle dimensioni del gel e del gradiente di pH utilizzato, si possono risolvere più di 5000 proteine contemporaneamente; la sensibilità di risoluzione è inferiore a 1 ng di proteine per spot [Görg A *et al.*, 2004]. L'elettroforesi bidimensionale è una potente tecnica analitica, ma presenta delle complicanze e delle limitazioni. Innanzitutto bisogna prestare attenzione alla preparazione del campione; i tre step fondamentali sono: la lisi cellulare, l'inattivazione o la rimozione delle sostanze interferenti, e la solubilizzazione delle proteine.

La solubilizzazione e l'analisi di proteine molto idrofobiche, come quelle integrali di membrana, rimane comunque un punto debole dell'elettroforesi bidimensionale. Per questo nonostante l'importanza delle membrane in qualsiasi sistema vivente sia evidente, l'analisi della composizione del subproteoma di membrana è ancora limitato. Per cercare di ovviare a queste limitazioni tecniche sono state sperimentate tecniche di solubilizzazione più efficaci (es. l'utilizzo combinato di urea 5-7M e di tiourea 2M) oppure delle separazioni elettroforetiche alternative alla classica elettroforesi bidimensionale, ad esempio, 16-benzyltrimethyl-n-hexadecylammonium chloride (16-BAC) e Blue Native-PAGE (BN-PAGE) più adatte alle proteine idrofobiche [Braun RJ *et al.*, 2007; Shagger H & Von Jagow G, 1991]. Un altro problema riguarda proteine poco espresse e poco abbondanti nelle cellule, come possono essere proteine tipiche di particolari compartimenti cellulari. In questo caso si ricorre ad una semplificazione del campione: si tratta il campione prima della 2-DE in modo da semplificare il pattern proteico ed arricchirlo della specie proteica di interesse e poco abbondante.

Da ciò è nata la proteomica clinica è la scienza che si prefigge di sviluppare tecnologie per la cura dei pazienti attraverso l'analisi e lo studio dei proteomi delle diverse cellule, sane e malate. In ambito oncologico la proteomica può quindi essere un utile strumento per la ricerca di biomarcatori tumorali, poiché la cellula tumorale stravolge le sue funzioni, il suo metabolismo, la sua struttura, il rapporto con l'ambiente e gli stimoli esterni e quindi altera il pattern d'espressione proteica. Indagando il proteoma differenziale del tessuto sano e tumorale si possono scoprire molecole differenzialmente espresse nelle due condizioni, proteine che possono essere caratterizzate e successivamente utilizzate come marker tumorali. Inoltre, questa tecnologia di ricerca viene usata allo scopo di individuare proteine che possano essere utilizzate come marker nei tessuti o nei liquidi biologici, o che possano predire la risposta alla terapia o la probabilità della ricaduta dopo un trattamento. Il cancro è una malattia complessa, ed è quindi improbabile che un unico biomarker possa essere usato con successo per la diagnosi precoce di questo tipo di patologia [Colantonio DA & Chan DW 2005]. Più promettente sembra essere quello dell'approccio a più marker. Su queste tecniche separative si innesta poi la spettrometria di massa che permette con tecniche sempre più sofisticate e sensibili l'identificazione (ed ora anche la quantificazione) delle proteine.

L'approccio proteomico mostra quindi una notevole potenzialità nell'identificazione di proteine differenzialmente espresse in tessuti renali sani e in omologhi tessuti patologici, ma anche in fluidi biologici facilmente accessibili come il siero e il plasma. Numerosi studi sono ora volti alla ricerca di proteine marker per RCC e DN, che possano essere utilizzate per la diagnosi precoce, lo staging e il monitoraggio della risposta alla terapia.

## 1.5 MEMBRANA PLASMATICA E MICRODOMINI DI MEMBRANA

### 1.5.1 La membrana plasmatica

Le membrane sono strutture sovramolecolari lipo-proteiche i cui componenti sono assemblati, in un foglietto sottile, con legami non covalenti [Simons K e Ikonen E, 1997; Brown DA e London E, 1998]. La membrana plasmatica separa la cellula dall'ambiente in cui vive; fornisce una barriera selettiva che consente lo scambio di alcune sostanze ma impedisce il passaggio di altre; contiene i recettori per rispondere all'ambiente esterno ed infine fornisce una struttura di sostegno. Le membrane sono quindi strutture dinamiche e complesse che regolano, in modo estremamente selettivo, il traffico di molecole dall'esterno verso l'interno della cellula e viceversa. Queste importanti caratteristiche sono strettamente legate alla particolare struttura delle membrane che sono tenute insieme essenzialmente da interazioni di tipo idrofobico. La natura delle membrane in genere è prevalentemente lipidica. Tuttavia, le membrane contengono anche una notevole varietà di proteine specializzate che promuovono o catalizzano un gran numero di eventi molecolari. Le proteine ed i lipidi polari rappresentano quindi la quasi totalità della massa delle membrane biologiche; le piccole quantità di carboidrati, presenti soprattutto nella membrana plasmatica delle cellule eucariote, sono costituiti, in genere, da glicoproteine e glicolipidi [Brown DA e London E, 1998]. Le quantità relative di lipidi e di proteine variano a seconda del tipo di membrana e riflettono le differenze nelle loro funzioni biologiche. Le proteine sono immerse nel doppio strato lipidico formato da fosfolipidi anfipatici e dagli steroli e sono tenute nella posizione corretta da interazioni idrofobiche tra le code apolari dei lipidi di membrana ed i domini idrofobici delle proteine (Fig. 8).

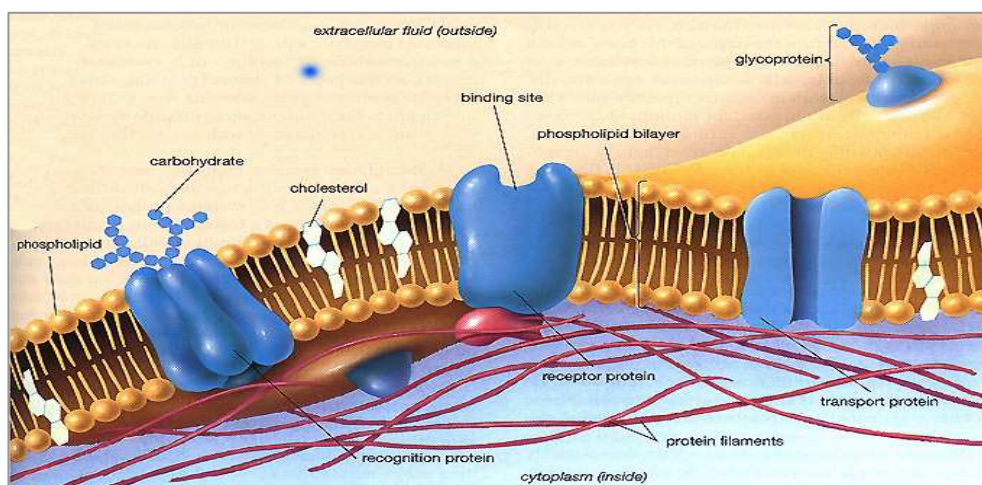


Figura 8. Modello "a mosaico fluido" della struttura della membrana.

Alcune proteine sporgono da un lato o dall'altro della membrana, altre invece la attraversano completamente. I domini di una proteina esposti su un lato della membrana sono diversi da quelli esposti sull'altro lato e questo orientamento asimmetrico rende le due facce della membrana diverse l'una dall'altra. Le subunità lipidiche e proteiche sono in continuo movimento, con caratteristiche di fluidità che dipendono dalla composizione lipidica e dalla temperatura.

Anche se il doppio strato fosfolipidico fa da struttura base alla membrana plasmatica, sono le proteine di membrana che esplicano quasi tutte le funzioni di questa struttura.

Le proteine di membrana svolgono svariate funzioni che le rendono fondamentali per la vita della cellula. Nel doppio strato fosfolipidico sono infatti presenti: proteine strutturali che stabiliscono le connessioni tra più cellule organizzate in tessuti e organi; proteine coinvolte nel riconoscimento e legame di altre molecole esterne alla cellula; proteine concorrenti alla formazione di canali e pompe per il trasporto di sostanze all'interno e all'esterno della cellula; enzimi.

In base ai rapporti e alle posizioni delle proteine nella membrana possiamo suddividere le proteine in diverse classi: proteine integrali o transmembrana che attraversano completamente il doppio strato lipidico e sono generalmente anfipatiche; proteine periferiche situate sulla superficie esterna della membrana o su quella citoplasmatica, non completamente immerse nel bilayer e legate tramite legami non covalenti alle teste idrofiliche dei fosfolipidi oppure alle porzioni idrofiliche delle proteine integrali; proteine ancorate ai lipidi del doppio strato. Se ne distinguono di due tipi: quelle che si affacciano sul versante esterno e si legano alla membrana mediante un breve oligosaccaride legato ad una molecola di glicofosfatidilinositolo (GPI); quelle sul versante interno che invece si legano mediante lunghe catene idrocarburiche.

### **1.5.2 I microdomini di membrana**

Le plasmamembrane in genere si presentano in uno stato fluido, definito "liquid-disordered phase" ( $L_d$ ), caratterizzato dalla libera mobilità dei lipidi di membrana, che risultano essere debolmente legati tra loro. Studi effettuati sia su liposomi [Schroeder R et al., 1994; Ahmed SN et al., 1997] che su modelli di membrana plasmatica [Dietrich C et al., 2001], hanno mostrato che alcuni lipidi tendono ad associarsi tra loro, segregandosi in questo modo dalla " $L_d$ ". Tali lipidi sono il colesterolo e gli sfingolipidi, insieme ai grassi saturi e glicerofosfolipidi saturi. Il loro stretto legame permette la formazione di "liquid-ordered phase" ( $L_o$ ) all'interno del classico modello fluido di membrana. Studi recenti hanno suggerito che la composizione della plasma membrana sia finemente regolata in modo da essere vicina a un punto di miscibilità critico nel quale  $L_d$  e  $L_o$



coesistono in una continua e interscambiabile fluttuazione [Hnerkamp-Smith et al., 2009; Vactch et al., 2007]. Le porzioni di membrana, arricchite di colesterolo, sfingolipidi e glicerofosfolipidi dotati di acidi grassi saturi, possiedono delle proprietà chimico-fisiche particolari e prendono il nome di microdomini di membrana [Pani B & Singh BB, 2009].

La più nota proprietà dei microdomini è la resistenza al trattamento con detergenti non ionici (come il Triton-X 100) a basse temperature (4°C) che permette l'isolamento di tali porzioni di membrana, le quali, a causa della loro bassa densità, flottano nel gradiente di saccarosio formando una banda discreta e ben visibile [Brown DA & Rose JK, 1992; Hooper NM, 1999]. In questo modo è stato possibile isolare DRM (detergent-resistant membrane) da svariati tipi di cellule, come le cellule epiteliali ed endoteliali, i fibroblasti, le cellule del sangue, gli adipociti, e le cellule muscolari [Galbiati F et al., 2001].

Esistono due tipi di microdomini: i lipid rafts e le caveolae. Queste strutture hanno una composizione lipidica simile, essendo entrambe altamente arricchite in colesterolo e glicosfingolipidi [Anderson RG, 1998], ma mentre i lipid rafts sono porzioni piatte della membrana particolarmente arricchite in proteine con ancora GPI (glicosil-fosfatidil-inositolo) e molecole coinvolte nei processi di trasduzione del segnale, le caveolae sono invaginazioni della membrana a forma di fiasco, non ricoperte da clatrina, arricchite in proteine appartenenti alla famiglia delle caveoline, la cui oligomerizzazione determina la forma di queste strutture [Matveev S et al., 2001]. Le caveolae, a differenza dei lipid rafts, sono visibili al microscopio ottico o elettronico (Fig. 9), ma i lipid rafts sono stati recentemente visualizzati grazie a innovative tecniche quali la stimulated emission depletive microscopy (STED), la photoactivated localization microscopy (PALM) e la stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [Simons K & Gerl M, 2011]. Dal punto di vista funzionale, l'ipotesi più accreditata è che i microdomini forniscano la compartimentalizzazione della membrana in cui si concentrano specifiche proteine, andando così a creare un supporto dinamico per determinati processi cellulari quali possono essere la trasduzione del segnale, la transitosi, il trasporto del colesterolo, l'internalizzazione di batteri, tossine o virus [Blonder J et al., 2004]. Dato il loro coinvolgimento in molti ed importanti processi che riguardano la fisiologia della cellula, i microdomini sembrano giocare un ruolo fondamentale nell'insorgenza e sviluppo di svariate malattie quali il cancro, disordini neurodegenerativi come l'Alzheimer e le malattie da prione [Cohen AW et al., 2004; Simons K & Ehehalt R, 2002; Quest AF et al., 2004]. Date queste peculiari caratteristiche, i microdomini di membrana risultano di

particolare interesse anche in campo terapeutico nello sviluppo di nuove strategie di drug-targeting [Lisanti MP et al., 1994; Schnitzer JE, 2001].

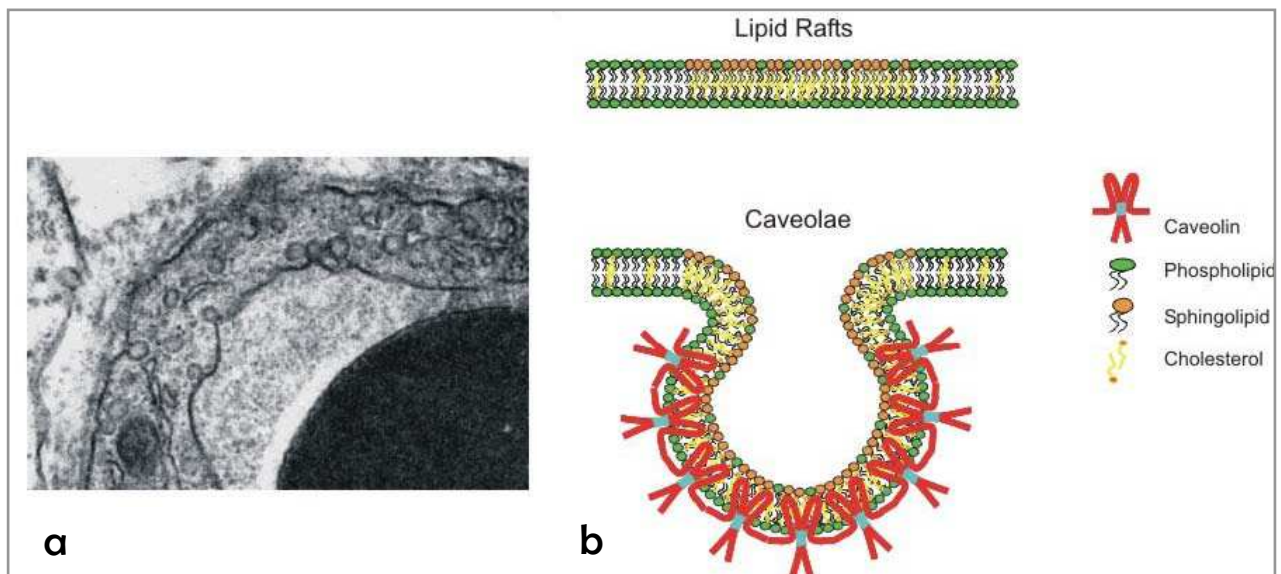


Figura 9. a) micrografia elettronica di una cellula endoteliale mostrante le caveolae; b) schema comparativo della composizione biochimica dei lipid rafts e delle caveolae (adattato da Galbiati F et al., 2001).

### Caveolae

Le caveolae sono delle invaginazioni della membrana plasmatica a forma di fiasco delle dimensioni di 50-100 nm non ricoperte da clatrina. Sono caratterizzate dalla presenza di particolari proteine tipiche di queste strutture, da cui hanno preso il nome, le caveoline. Queste ultime guidano la biogenesi delle caveolae stesse e sono proteine integrali di membrana con entrambe le estremità situate nella porzione citoplasmatica, e nessuna porzione extracellulare. La famiglia delle caveoline è costituita da tre specie proteiche: Cav-1, Cav-2 e Cav-3 [Glenney JR, 1992; Rothberg KG et al., 1992; Scherer PE et al., 1996; Tang ZL et al., 1994] che forma oligomeri di ordine superiore, e strutturalmente stabilizza l'invaginazione della membrana [Pani B & Singh BB, 2009]. Cav-1 e Cav-2 sono co-presenti in molti tipi cellulari, in particolar modo sono espresse ad alto livello in cellule endoteliali, adipociti, e pneumociti di tipo I; Cav-3 invece è espressa esclusivamente in cellule del muscolo scheletrico e cardiaco [Scherer PE et al., 1994; Scherer PE et al., 1996; Tang ZL et al., 1996]. Inoltre, le caveolae sono altamente arricchite in colesterolo in confronto alle altre porzioni di membrana e la Cav-1 lega il colesterolo con alta affinità (una molecola di colesterolo per molecola di caveolina) [Murata M et al., 1995; Thiele C et al., 2000].

L'ossidazione del colesterolo da parte della colesterolo-ossidasi oltre a causare perdita dell'equilibrio intracellulare del colesterolo causa la traslocazione della Caveolina-1 dalla membrana plasmatica al reticolo endoplasmatico/Golgi ed una riduzione del numero di caveolae; la rimozione della colesterolo-ossidasi tuttavia permette il ritorno della Caveolina-1 e del colesterolo libero alle caveolae [Conrad PA et al, 1996]. Tali risultati indicano che l'espressione di Caveolina-1 e la sua distribuzione intracellulare sono dipendenti dai livelli intracellulari di colesterolo. Recentemente è stata caratterizzata un'altra famiglia di proteine, quella delle cavine, profondamente coinvolta nella regolazione della struttura e nelle funzioni delle caveolae. La cavina 1 in particolare avrebbe un ruolo parallelo a quella della caveolina 1 [Briand N et al., 2010].

I principali ruoli funzionali che sono stati attribuiti alle caveolae sono:

- processi di endocitosi : le caveolae sono implicate nel trasporto selettivo di molecole e ioni tramite un processo di endocitosi che può seguire due meccanismi: dinamina dipendente o indipendente. Le prime evidenze di questa funzione caveolare derivarono dall'osservazione che le tossine del colera e del tetano erano preferenzialmente legate ed internalizzate tramite le caveolae e che il trattamento delle cellule con agenti in grado di legare il colesterolo (nistatina o filipina) era in grado di eliminare l'internalizzazione di alcune macromolecole (albumina) senza influenzare l'endocitosi dipendente dalla clatrina [Schnitzer JE et al, 1994]. Studi successivi hanno dimostrato che tale selettività è dovuta alla localizzazione dei recettori specifici per le varie molecole endocitate. In seguito al legame del ligando con lo specifico recettore si ha l'invaginazione dalla membrana plasmatica a formare un compartimento chiuso (caveosoma) mediante un processo che richiede l'idrolisi del GTP ed i classici componenti molecolari coinvolti nella formazione delle vescicole (proteine SNARE, VAMP, SNAP-25, dinamina); successivamente le molecole endocitate vengono trasportate nel reticolo endoplasmatico o in altri compartimenti intracellulari [Cohen AW et al, 2004]. Una crescente lista di patogeni, inclusi virus, batteri e loro tossine, funghi e anche prioni può interagire con i domini di membrana delle caveolae; il traffico intracellulare di questi agenti tramite le caveolae differisce notevolmente dalla classica internalizzazione dei ligandi tramite endocitosi mediata da clatrina in quanto tale via permette loro di evitare la degradazione lisosomiale [Norkin LC, 2001].

- trasduzione del segnale: la scoperta che i microdomini caveolari purificati biochimicamente contenevano numerose molecole di segnale ha portato Lisanti MP et al. (1994) ad ipotizzare che le caveolae svolgessero un ruolo importante nella trasduzione dei segnali cellulari raggruppando numerose molecole e permettendo così una rapida ed efficiente

trasmissione del segnale (Caveolae Signaling Hypothesis). Secondo tale ipotesi le caveolae servirebbero come punto di attracco per numerosi recettori della superficie cellulare, che, quando attivati dal legame con lo specifico ligando, vengono reclutati nelle caveolae dove interagiscono con i loro specifici componenti del segnale. In alcuni casi la via di segnalazione mediata dai recettori e gli adattatori "intrappolati" nelle caveolae viene inibito, mentre in altri il nuovo riarrangiamento spaziale dei componenti di signalling contribuisce all'amplificazione del segnale [Staubach & Hanish, 2011]. Le caveolae sono molto arricchite in proteine di membrana, specialmente proteine segnale come H-ras, tirosin chinasi della famiglia Src, proteine G eterotrimeriche, eNOS, ecc. [Lisanti MP et al., 1994; Smart EJ et al., 1999]. Sembra che le caveoline siano in grado di legare e regolare (soprattutto inibire) molte di queste molecole, attraverso il loro "scaffolding domain", un dominio juxtramembrana formato da 20 aminoacidi che media questi legami funzionali [Okamoto T et al., 1998].

- tumorigenesi: a livello delle caveolae sono localizzate e inibite da Cav-1 molte proteine implicate nei fenomeni di signalling pro-proliferativo e anti-apoptotico, quali ad esempio EGFR, Her2/Neu, recettori tirosin-chinasici di PDGF, componenti della cascata di Ras/p42/44 MAP chinasi, e membri della cascata di PI-3-chinasi [Couet J et al., 1997; Engelman JA et al., 1998; Liu P et al., 1996; Yamamoto M et al., 1999; Zundel W et al., 2000]. Queste proteine possono determinare proliferazione cellulare incontrollata e alla fine formazione di neoplasie. A questo proposito, la loro inibizione ad opera delle caveole e in particolar modo della Cav-1 avrebbe effetti oncosoppressori [Koleske et al., 1995]. Il ruolo oncosoppressivo di Cav1 è una funzione condizionale in quanto è dipendente dall'espressione di vari altri effettori molecolari [Partidge et al., 2004]. Al contrario è stato evidenziato anche che Cav1 può promuovere la progressione tumorale in seguito alla fosforilazione del residuo amminoacidico Y12 ad opera delle tirosin chinasi Src, Fyn e cAbl [Williams TM et al., 2005]. Cav1 quindi riguardo allo sviluppo e alla progressione tumorale presenta effetti conflittuali: l'inattivazione di Cav1 sembra essere necessaria per la trasformazione cellulare e l'induzione del tumore, mentre la sua riespressione faciliterebbe l'avanzamento tumorale e la meta- statizzazione [Patra SK, 2008].

### Lipid rafts

I lipid rafts sono porzioni non invaginate della membrana plasmatica prive di specifiche caratteristiche morfologiche particolarmente arricchite in colesterolo e sfingolipidi. Queste regioni sono comunque presenti in uno stato fluido, ma appaiono più "ordinate e impaccate"

rispetto alle zone di membrana circostante. La differenza di "packaging" è causata dalla presenza di catene idrocarburiche sature nei sfingolipidi e fosfolipidi dei rafts, al contrario degli acidi grassi e fosfolipidi insaturi del restante bilayer lipidico [Brown DA e London E, 1998]. Al contrario delle caveolae, i lipid rafts non sono visibili al microscopio ottico o elettronico. I lipid rafts vengono originariamente assemblati a livello del complesso di Golgi e in seguito trasportati alla membrana plasmatica [Brown DA e London E, 1998]. Appaiono come strutture mobili e dinamiche che non solo si muovono nel piano del bilayer lipidico, ma sono anche in grado di muoversi dalla plasmamembrana a compartimenti interni della cellula. Infatti essi si ritrovano anche all'interno di strutture membranose intracellulari quali il Golgi, i fagosomi, gli endosomi e gli exosomi [Nichols BJ, et al., 2001]. La famiglia proteica delle flotilline risulta indispensabile per la formazione dei lipid rafts, in quanto la flotillina 1 (Flot1) e la flotillina 2 (Flot2) promuovono l'assemblamento di specifiche proteine con ancora GPI nella membrana plasmatica e permettono l'interazione di varie molecole di signalling [Browman DT, et al., 2007; Stuermer CA, 2010]. Nelle cellule viventi i rafts possono essere stabilizzati grazie all'oligomerizzazione di specifiche proteine o lipid con un piccolo input di energia. In questo modo vengono generate piattaforme più ampie e stabili contenenti prevalentemente proteine correlate a una specifica funzione (es. trasduzione del segnale o pathway endocitotici) [Simons K e Ehehalt R, 2002; Simons K & Sampaio JL, 2011]. Quante più proteine coinvolte nel segnale risiedono all'interno dei rafts, tanto più alta sarà la risposta a tale segnale [Simons K e Ehehalt R, 2002]. A causa dell'eterogeneità della composizione di ogni singolo raft, le strutture devono essere clusterizzate secondo modalità specifiche al fine di permettere la trasmissione di un particolare segnale. A livello cellulare la clusterizzazione viene percepita come un segnale di endocitosi, assemblaggio di componenti del citoscheletro o trafficking cellulare. Il blocco della trasmissione del segnale e la disaggregazione dei rafts avviene tramite fenomeni di downregolazione e defosforilazione [Xu K et al., 1998]. A livello dei lipid rafts risiedono in maniera costitutiva diverse proteine quali proteine con ancora GPI, proteine doppiamente acilate (come le tirosin-chinasi appartenenti alla famiglia Src), subunità  $\alpha$  di proteine G eterotrimeriche, ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), proteine transmembrana in particolare quelle palmitoilate [Simons K e Toomre D, 2000]. Alcune proteine hanno bassa affinità per i rafts quando presenti in uno stato "non legato". In seguito al legame con un ligando, esse subiscono un cambiamento conformazionale e/o oligomerizzano. In questo stato aumenta la loro affinità per i rafts [Harder T et al., 1998]. La ripartizione delle proteine all'interno o all'esterno dei rafts è dunque strettamente regolata, ad esempio la palmitoilazione reversibile

delle proteine di membrana a livello di residui di cisteina sembra essere importante come meccanismo dinamico per il targeting ai lipid rafts [Levental I et al., 2010]. La palmitoilazione non è però sufficiente per l'associazione ai lipid rafts ed esistono molte proteine non palmitoilate nei rafts, lasciando presupporre l'esistenza di altri meccanismi di regolazione e indirizzamento, come l'associazione mediata da lipidi quali il colesterolo o gli sfingolipidi [Contreras FX et al., 2011]. I lipid rafts sono strettamente legati al citoscheletro e in particolare interagiscono con l'actina tramite specifiche proteine quali l'annexina 2, l'ezrina e la E-caderina [Oliferenko S et al., 1999]. Numerosi sono i ruoli funzionali attribuiti ai lipid rafts, tra cui i principali sono:

- trafficking intracellulare tramite un meccanismo di endocitosi sia clatrina sia caveolina indipendente che necessita della presenza di Flot1 e CDC42 [Sabharanjak S et al., 2002]. La fagocitosi è inoltre un processo complesso mediato da lipid rafts che coinvolge il legame di patogeni a recettori di superficie, seguito dalla riorganizzazione dello scheletro di actina, sotto la regolazione di proteine Rho GTPase, e il reclutamento di vescicole lisosomiali. Studi di proteomica effettuati su lipid rafts di monociti [Li N et al., 2003] hanno evidenziato la presenza di proteine quali l'actina e la vimentina (componenti del citoscheletro), la rho GTPase Rac-1 (una molecola di "switch" che regola l'assemblaggio dell'actina nelle protrusioni di membrana), la proteina di fusione di membrana SNAP-23, l'ATPasi vacuolare e numerose GTP binding proteins eterotrimeriche. Da queste evidenze appare che il trasporto vescicolare, l'assemblaggio di actina e il signalling mediato dalle proteine G eterotrimeriche siano generiche attività dei lipid rafts. Un altro punto importante è che da questi studi è risultato che 27 delle 52 proteine identificate nei lipid rafts sono componenti riconosciuti dei fagosomi [Garin J et al., 2001].

- trasduzione del segnale: come già detto precedentemente le flotilline sono in grado di reclutare e far interagire svariate proteine coinvolte nel signalling. Esse infatti interagiscono con le tirosin chinasi Src (Src, Fyn e Lck) così come le proteine della famiglia delle piccole Rho GTPasi attraverso il complesso di signalling associato a CAP e regolano così le dinamiche citoscheletriche. Nella regolazione dell'adesione cellulare, la flotillina 2 viene fosforilata da Src in seguito a stimolazione delle cellule con EGF e questo incrementa la migrazione cellulare coinvolgendo la polimerizzazione dell'actina e la contrazione della miosina [Neumann-Giesen C et al., 2007]. Inoltre Fyn svolge un ruolo interessante nella cancerogenesi, in quanto è importante per la normale crescita cellulare ed un noto mediatore dell'attività antiapoptotica indotta da fattori di crescita Akt/PKB. In più ha un compito chiave nelle interazioni integrina-dipendenti delle cellule tumorali epiteliali con la matrice extracellulare, nel controllo delle adesioni focali, della

migrazione cellulare e della disseminazione delle cellule cancerose. Il segnale di adesione inizialmente induce un'auto-fosforilazione del complesso Fyn-chinasi delle adesioni focali (FAK) che porta al sorting nei lipid rafts dove Fyn fosforila FAK su un altro residuo causando così la traslocazione di FAK fuori dai rafts e quindi l'attivazione del pathway PI3K/Akt che rinforza l'adesione delle cellule cancerose [Baillat G et al., 2008].

- patogenesi di alcune malattie: l'importante ruolo d'internalizzazione di complessi ligando-recettore diventa pericoloso nel caso di patogeni, parassiti, batteri e virus, che si attaccano alle membrane cellulari preferenzialmente in regioni lipid rafts e utilizzano queste porzioni per costituire poi i loro envelope. Esempi sono il virus dell'influenza [Scheiffele P et al., 1999] e il virus HIV-1 [Campbell SM et al., 2001]. Le caratteristiche uniche dei lipid rafts possono inoltre contribuire a condizioni patofisiologiche quali la formazione di placche senili e l'accumulo di proteina  $\beta$ -amiloide nell'Alzheimer, malattia nella quale i lipid rafts partecipano nell'ospitare al loro interno enzimi ( $\beta$ -secretasi e  $\gamma$ -secretasi) implicati nel clivaggio del precursore amiloide APP [Ehehalt R et al., 2003].

## 1.6 EXOSOMI

Gli exosomi sono piccole vescicole di membrana di origine endocitotica (delle dimensioni comprese tra 30 e 100 nm), rilasciate nello spazio extracellulare da molteplici tipi cellulari (fig. 1.12) [Simpson RJ et al., 2008]. 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 lipid rafts, RNA e miRNA [Valadi H et al., 2007; Luo SS et al., 2009], ma sono prive di DNA [Thery C et al., 2001]. 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]; se analizzati al microscopio elettronico, mostrano una caratteristica morfologia a sfera appiattita delimitata da un doppio strato fosfolipidico.

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, urine, fluido amniotico, fluido di lavaggio broncoalveolare, fluido

sinoviale e latte materno [Simpson RJ *et al.*, 2009], saliva, sperma, 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), "microparticle" (MPs), "shedding microvesicle" (SMVs) [Majno G *et al.*, 1995; Aupeix K *et al.*, 1997] - dopo vari stimoli biologici, inclusa l'induzione della morte cellulare programmata. 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 microvesicle" rappresentano una popolazione eterogenea (100 → 1000 nm, forma variabile) di vescicole che gemmano direttamente dalla membrana plasmatica.

Molti tipi di queste vescicole sono stati riconosciuti e descritti. Storicamente i termini exosomi, "vescicole exosome-like", MPs, MVs, "apoptotic blebs", "shedding vesicle", erano spesso utilizzati in modo intercambiabile. In ogni modo, questa terminologia non distingue tra le varie entità. Come spiegato da Thery *et al.* [Thery C *et al.*, 2009], una differenza chiave tra queste subunità cellulari è da un lato, la grandezza e la densità, e dall'altro, l'origine ed il meccanismo di formazione. Le caratteristiche principali sono descritte nella tabella 3.

Tabella 3. Principali caratteristiche dei differenti tipi di vescicole di membrana [Raimondo F *et al.*, 2011].

TYPE	SIZE	DENSITY	SHAPE	ORIGIN	RELEASE	NOTES
<b>1) EXOSOME</b>	40-100 nm	1.10-1.19 g/cm <sup>3</sup>	Homogeneous	MVB	Constitutive and regulated	Ceramide-dependent sorting
1.1) EXOSOME-LIKE	30-90 nm					No lipid rafts
<b>2) SHEDDING VESICLES</b>	0.1-1 μm	~1.16 g/cm <sup>3</sup>	Variable	PM	Regulated	Unknown sorting mechanism
2.1) MICROPARTICLES					Induced by various stimuli	
2.2) APOPTOTIC BLEBS		1.24-1.28 g/cm <sup>3</sup>			Induced by apoptosis	Contain histones



### 1.6.1 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 da Pan e Johnstone [Pan BT e Johnstone RM *et al.*, 1983] durante la maturazione dei reticolociti di pecora (fig. 1.13). Si è pensato per molti anni che i MVBs 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 (MVB degradativi) oppure possono essere indirizzati verso la membrana plasmatica dove, in seguito alla fusione con essa, rilasciano il loro contenuto, le vescicole intraluminali (ILVs), nello spazio extracellulare ("*exocytic MBVs*"); le ILVs rilasciate vengono definite exosomi [Simpson RJ *et al.*, 2009]. 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 30-100 nm; in questo modo mantengono lo stesso orientamento topologico della membrana plasmatica (Fig. 10). E' stato visto che un ruolo importante nella biogenesi dei MVBs e nello smistamento delle proteine endosomali all'interno degli stessi è svolto dai complessi proteici ESCRTs (*endosomal sorting complexes required for transport*), mediante un processo ubiquitina-dipendente [Hurley JH, 2008]; in seguito alla mono-ubiquitinazione, le proteine vengono indirizzate all'interno dei corpi multivescicolari per la successiva degradazione lisosomiale ("*degradative MVBs*") [de Gassart A *et al.*, 2004].

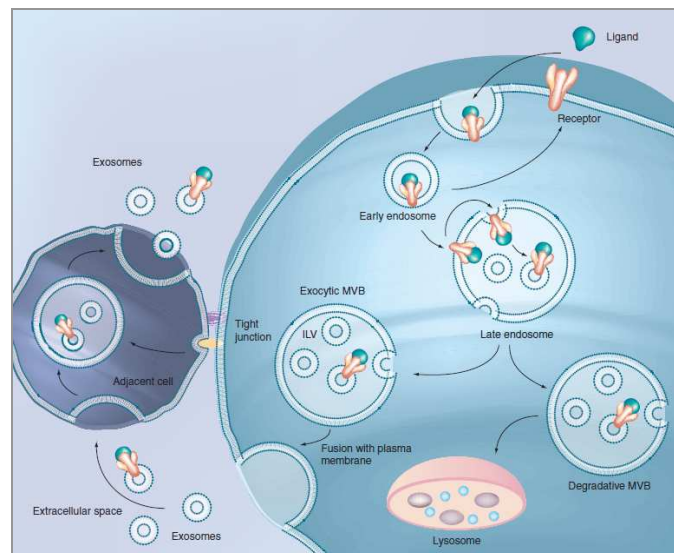


Figura 10. Meccanismo di formazione degli esosomi [Simpson RJ *et al.*, 2009].

Dal punto di vista molecolare, la proteina *Vps27* (*vacuolar protein sorting*) recluta il complesso ESCRT-I, che lega le proteine ubiquitinate ed attiva il complesso ESCRT-II. Successivamente ESCRT-II inizia il processo di oligomerizzazione e formazione del complesso ESCRT-III, che sembra avere un ruolo nella concentrazione delle proteine all'interno dei MVBs. ESCRT-III recluta poi 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]. 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]. Non è ancora invece ben chiaro il pathway che guida il traffico dei MVBs verso la membrana plasmatica con conseguente fusione e rilascio delle ILVs (MVB exocitici) [Simpson RJ *et al.*, 2008]; è stato visto che alcune proteine associate ai complessi ESCRTs, quali *Alix* (*ALG-2 interacting protein X*) e *Tsg101* (*Tumor susceptibility gene 101*), sono costitutivamente presenti negli esosomi, ma recentemente sono stati anche riportati meccanismi ESCRTs -indipendenti che potrebbero coinvolgere i metaboliti della sfingomielina, come il ceramide [Trajkovic K *et al.*, 2008]. Non è chiaro inoltre se esistano due classi distinte di MVBs (exocitici o degradativi) o se i MVBs contengano ILVs exocitici/degradativi. Ad oggi, comunque, gli esosomi sono il solo tipo di vescicole di membrana che originano dai compartimenti intracellulari come i MVBs. Il processo di rilascio degli esosomi può essere inoltre costitutivo o inducibile, in dipendenza dalla tipologia cellulare e dallo stato di attivazione delle cellule secernenti [Thery C *et al.*, 2009]; ad esempio cambiamenti nella concentrazione di  $Ca^{2+}$

intracellulare possono indurre la secrezione degli exosomi da parte dei mastociti; anche la depolarizzazione indotta dagli ioni  $K^+$  sembra favorire la fusione dei MVBs con la membrana plasmatica di cellule neuronali [Savina A *et al.*, 2003].

## 1.6.2 Composizione

### Proteine

Negli ultimi 10 anni, in aggiunta alla metodica del western blotting, lo sviluppo di tecniche in grado di permettere l'identificazione delle proteine in una miscela complessa, attraverso la spettrometria di massa dopo digestione con tripsina, ha permesso di determinare la composizione proteica degli exosomi secreti da cellule dendritiche (DC) [Thery C *et al.*, 2001] e successivamente degli exosomi purificati da diversi tipi cellulari e da fluidi biologici. L'analisi degli exosomi da un'ampia varietà di colture cellulari, tra cui cellule dell'epitelio intestinale [van Niel G *et al.*, 2001], epatociti [Conde-Vancells J *et al.*, 2008], cellule dendritiche [Wubbolts R *et al.*, 2003], mastociti [Valadi H *et al.*, 2007], cellule neurogliali [Fevrière B *et al.*, 2004] e fluidi biologici, tra i quali urine [Pisitkun T *et al.*, 2004; Gonzales PA *et al.*, 2009], siero [Graner MW *et al.*, 2009] e plasma [Looze C *et al.*, 2009], ha permesso di identificare le seguenti classi di proteine: di adesione (integrine); di trasporto/trafficking di membrana (annexina, proteine della famiglia Rab) [Mears R *et al.*, 2004]; markers lisosomiali (CD3, LAMP-1/2); proteine ribosomiali (RPS3) [Mathivanan S *et al.*, 2009]; 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 DD *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 del complesso ESCRT (TSG101, Alix, ESCRT 1, 2 e 3) [Février B *et al.*, 2004] (Fig. 11). 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, CD63, CD81 e CD82), che vengono generalmente utilizzate come markers degli exosomi stessi [Bard MP *et al.*, 2004]. 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, 2002; Stipp CS *et al.*, 2010].

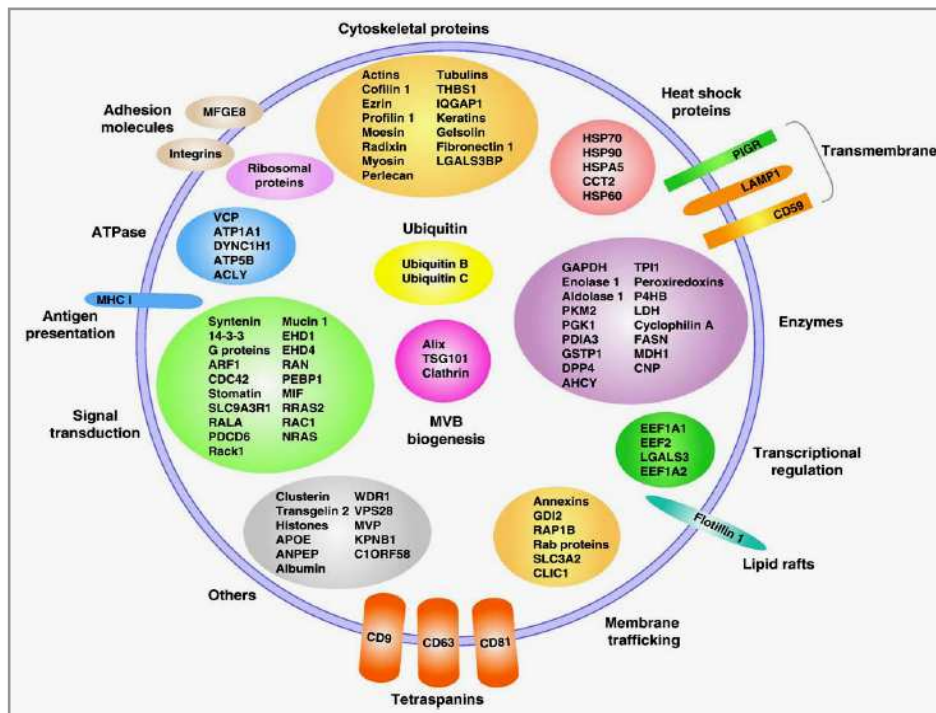


Figura 11. Rappresentazione della composizione proteica degli exosomi classificati per funzione [Mathivanan S *et al.*, 2010].

E' ormai accettata l'esistenza in tutti gli exosomi, indipendentemente dalla loro origine biologica, di un set definito e conservato di proteine comuni che ne costituiscono il "core" e sono generalmente coinvolte in processi quali l'adesione e la motilità cellulare, la biogenesi degli MVB, il signalling o il trafficking vescicolare [Simpson RJ *et al.*, 2008]. Considerazioni accurate su questo limitato numero di proteine, o famiglia di proteine, possono fornire due distinte opportunità: da un punto di vista biologico è possibile far luce sul meccanismo comune di biogenesi degli exosomi, e da un punto di vista sperimentale può fornire un serbatoio di probabili marker che definisca il tipo specifico di vescicole, e può consentire di normalizzare i dati quantitativi in studi di proteomica comparativa [Raimondo F *et al.*, 2010]. 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 in figura 12.

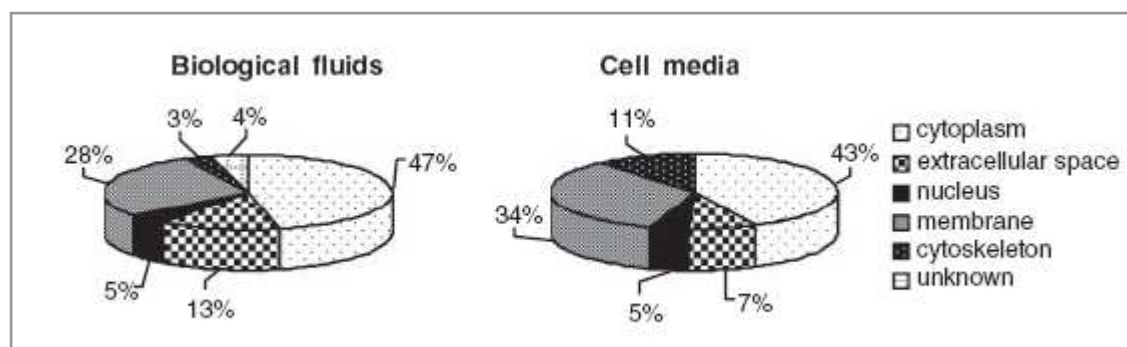


Figura 12. Classificazione delle proteine comuni in base alla localizzazione subcellulare [Raimondo F et al., 2010].

Osservando i principali processi biologici a cui le proteine presenti negli esosomi prendono parte (Fig. 13), 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, ezrina), che dipende dal coinvolgimento dei pathway di sorting (selezione) degli endosomi e del macchinario citoscheletrico implicato nella biogenesi degli esosomi. 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 signalling e nell'interazione tra cellule, a testimonianza del possibile ruolo degli esosomi nella comunicazione intercellulare.

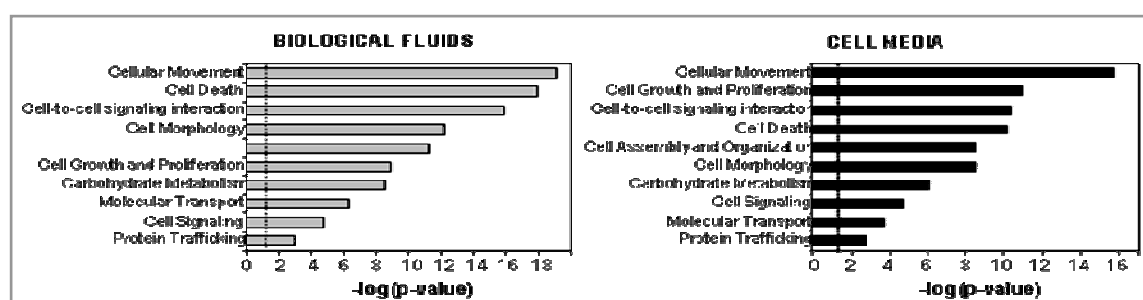


Figura 13. Associazione delle funzioni biologiche alle proteine esosomali comuni (Ingenuity Pathway Analysis Software) [Raimondo F et al., 2010].

In aggiunta ad un set di proteine conservate, gli esosomi mostrano anche proteine specifiche del tipo cellulare di origine: ad esempio gli esosomi 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) contengono molecole coinvolte nella stimolazione delle cellule T come CD86 e ICAM-1 [Chaput N & Thery C, 2010]. I profili proteici ottenuti da esosomi isolati da diverse fonti indicano dunque la presenza di proteine che ne riflettono l'origine e il possibile ruolo fisiologico: ad esempio, attraverso l'analisi del profilo proteico degli esosomi 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].

### Lipidi

In aggiunta alle proteine, gli esosomi 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 esosomi 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. 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 [Moebius 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 esosomi; si ritiene che il LBPA rimanga associato alla membrana che delimita i MVBs una volta che la vescicola intraluminale 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 (Fig.14) [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 esosomi la presenza di lipidi bioattivi quali le prostaglandine, che esplicano molteplici effetti biologici correlati all'infiammazione. Essi non sono prodotti 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 esosomi 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 $\Delta$ -PGJ<sub>2</sub> (15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J<sub>2</sub>) (Fig. 14) [Subra C *et al.*, 2010].

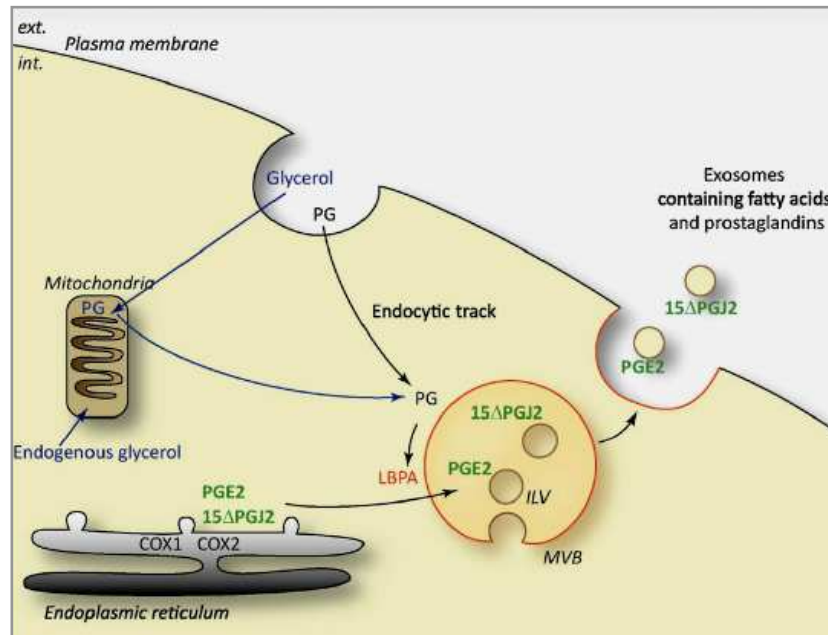


Figura 14. Esempio di sorting dei lipidi nei MVBs e negli exosomi. Il LBPA viene formato a livello dei MVBs, mentre il suo precursore, il PG, è biosintetizzato nei mitocondri. Il PG esogeno viene convertito in LBPA a livello dei MVBs. Il LBPA regola il turnover delle ILVs all'interno dei MVBs stessi. Lipidi bioattivi come le prostaglandine sono arricchiti negli exosomi e sono quindi trasportati all'esterno della cellula [Record M *et al.*, 2011].

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 sotto forma di exosomi [Trajkovic K *et al.*, 2008]. È 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].

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 dei lipid rafts. 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 selettivamente arricchite degli exosomi. È stato proposto che questi microdomini lipidici siano coinvolti nella biogenesi delle ILVs [Fevrier B *et al.*, 2004]; infatti i lipid rafts si sono già dimostrati elementi chiave nel processo di formazione di vescicole in caso di aumento citosolico di  $Ca^{2+}$ . Un altro possibile ruolo dei lipid rafts durante la formazione degli exosomi riportato nello studio 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 in vescicole intraluminali, 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, presenti a livello delle membrane endosomiali, possono essere coinvolti nell'organizzazione della piattaforma lipidica, concentrando proteine trasportatrici ed effettrici all'interno delle vescicole intraluminali dei MVBs che sono destinati alla degradazione lisosomiale o alla secrezione extracellulare [de Gassart A *et al.*, 2003].

### miRNA e microRNA

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]. 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. Sono necessari tuttavia ulteriori studi sui miRNA exosomal 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]. MiRNA sono stati trovati negli exosomi rilasciati in circolo dal carcinoma al polmone [Rabinowits G *et al.*, 2009], dal carcinoma all'ovaio [Taylor DD *et al.*, 2008], e dal rene [Saal S *et al.*, 2009]. Taylor DD *et al.* hanno osservato, per esempio, che il profilo d'espressione dei miRNA presenti negli exosomi 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. E' 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].

### 1.6.3 Funzioni

Negli ultimi anni sono emerse alcune funzioni biologiche svolte dagli exosomi, in dipendenza dal tipo cellulare di origine. La presenza degli exosomi nel siero [Caby MP *et al.*, 2005] ed in altri fluidi biologici quali effusioni tumorali [Bard MP *et al.*, 2003], lavaggi broncoalveolari [Admyre C *et al.*, 2003] e urine [Pisitkun T *et al.*, 2004], 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. 15) [Mathivanan S *et al.*, 2010]. Gli exosomi potrebbero interagire direttamente con le cellule bersaglio mediante convenzionali interazioni ligando-recettore; 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 LFA<sub>1</sub> (*leukocyte function associated antigen 1*). Gli esosomi 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 esosomi; 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 esosomi [Feng D *et al.*, 2010]. Oppure le proteine di membrana degli esosomi possono essere tagliate da specifiche proteasi dando luogo a frammenti che potrebbero agire come ligandi solubili per recettori di membrana sulle cellule targets.

Inoltre gli esosomi sono in grado di fondersi con la membrana delle cellule bersaglio trasferendo al loro interno in maniera non selettiva proteine e RNA esosomali; la fusione può modificare alcune caratteristiche di membrana della cellula target, tra cui la composizione lipidica e proteica. Ad esempio, esosomi 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 esosomiale 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].

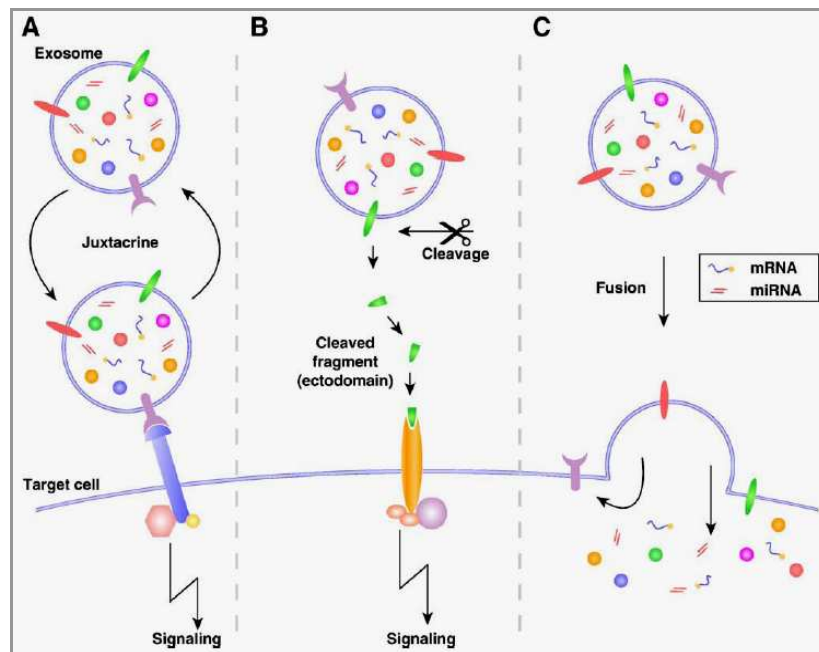


Figura 15. Possibili vie di comunicazione intercellulare mediate dagli exosomi; a) interazione con i recettori della cellula target ed attivare il segnale intracellulare; b) taglio da parte di proteasi nell'ambiente extracellulare. I frammenti così formati possono agire come ligandi solubili i quali legano i recettori di superficie della cellula target; c) fusione con la membrana delle cellule target e rilascio il loro contenuto all'interno della cellula ricevente in modo non-selettivo. [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 exosomi derivati da cellule dendritiche (DCs), le principali APCs, esprimono alti livelli di MHC I e II in associazione a molecole co-stimolatorie, 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 co-stimolatorie, gli exosomi portano anche altre proteine che possono modulare la risposta immunitaria stessa, stimolandola o inibendola, in maniera non-antigene specifica. Ad esempio, gli exosomi secreti dalle cellule neoplastiche potrebbero consentire al tumore stesso, attraverso molteplici azioni, l'evasione della sorveglianza immunitaria. E' stato osservato che exosomi 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., 2008], e/o promuoverne il differenziamento in cellule T regolatorie (Tregs) [Thery C et al., 2001]. In aggiunta, gli exosomi esprimenti il TGF- $\beta$ 1 favoriscono la downregolazione del recettore

NKG2D, implicato nell'attivazione delle cellule NK e TCD8<sup>+</sup> [Clayton A *et al.*, 2008]. Ancora, gli exosomi 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 exosomi 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 PGE<sub>2</sub>, che stimola la crescita tumorale, sia la prostaglandina 15 $\Delta$ -PGJ<sub>2</sub>, 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'estruzione 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 PrP-scrapie (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].

#### 1.6.4 Isolamento degli exosomi

I due principali punti critici nello studio delle vescicole di membrana e degli exosomi sono la loro purificazione e caratterizzazione. Un numero crescente di studi sottolinea la necessità di ottenere preparati con un elevato grado di purezza e qualità al fine di effettuare le analisi di proteomica nel miglior modo possibile [Welton JL *et al.*, 2010; Mathivanan S *et al.*; 2010; Ristorcelli E *et al.*, 2009]. 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 seguirà l'isolamento. A differenza degli organelli intracellulari, i quali sono purificati da omogenati tissutali complessi, gli organelli extracellulari, come gli exosomi, sono relativamente semplici da purificare. Ad esempio, mediante centrifugazioni differenziali, filtrazioni di membrana, concentrazione, flottazione su gradiente di densità e biglie per l'immunocattura, gli exosomi possono essere isolati da una moltitudine di linee cellulari e fluidi biologici [Simpson RJ *et al.*, 2008].

La caratterizzazione degli exosomi isolati è tipicamente eseguita mediante microscopia elettronica, FACS, LC-MS/MS e western blotting [Simpson RJ *et al.*, 2008; van Niel G *et al.*, 2006]. Una nuova metodica per la rapida caratterizzazione morfologico-dimensionale degli exosomi è rappresentata dalla NTA (*Nanosight Tracking Analysis*), che consente di misurarne le dimensioni e la concentrazione video-monitorando in tempo reale il moto Browniano delle particelle,

illuminate mediante una sorgente laser e visualizzate attraverso un microscopio. Il movimento è influenzato dalla viscosità del liquido in cui le microvescicole sono presenti, dalla temperatura e, appunto, dalle dimensioni delle particelle stesse.

Il protocollo maggiormente utilizzato nell'isolamento degli exosomi è basato su uno step iniziale di centrifugazioni differenziali a velocità crescenti per eliminare cellule morte, detriti, contaminanti ed aggregati cellulari, seguito da una sedimentazione a 60-100000 xg per un'ora o più al termine della quale si ottiene un pellet contenente gli exosomi, i quali possono essere conservati a -80°C. Queste centrifugazioni possono essere sostituite da filtrazioni di membrana, utilizzando filtri da 0.22 µm [Thery C *et al.*, 2001] o da 0.1 µm [Ji H *et al.*, 2008]. Per incrementare il grado di purezza, può essere eseguito un ulteriore step di flottazione su gradiente di saccarosio (saccarosio 2.0-0.25M), con equilibratura che si verifica a ca. 1.15-1.18 g/ml [Raposo G *et al.*, 1996; Andre F *et al.*, 2002]. Per permettere invece una più corretta separazione degli exosomi da particelle virali o da altre vescicole (di dimensioni in nm) che potrebbero essere presenti nel medium di coltura, è stato messo a punto un protocollo basato sulla separazione su un gradiente di iodixanolo (optiprep TM), un derivato non-ionico dell'acido metrizoico che forma gradienti isoosmotici con ampio range di densità ed è inerte nei confronti dei materiali biologici [Mathivanan S *et al.*, 2010].

Altri protocolli 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 CD63, che può teoricamente essere utilizzato per tutti gli exosomi indipendentemente dalla loro derivazione [Chen C *et al.*, 2010]. Mentre le biglie ricoperte di anticorpo possono essere utilizzate come strumento sperimentale per l'isolamento degli exosomi e per la caratterizzazione del fenotipo, questa procedura può non risultare 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; gli exosomi vengono isolati mediante un gradiente di densità formato da saccarosio al 30% e ossido di deuterio (D<sub>2</sub>O); questo permette la formazione di un minigradiente tra 1.10 e 1.18 g/cm<sup>3</sup>, in un range ideale di densità per arricchire e purificare gli exosomi, prevenendo l'aggregazione di vescicole causata dalla sedimentazione ad elevate velocità [Lamparski H *et al.* 2002].

### 1.6.5 Exosomi urinari

#### Caratteristiche e biogenesi

Grazie a studi di proteomica mediante spettrometria di massa, si è dimostrato che le urine normali contengono migliaia di proteine, anche se a bassa concentrazione, incluse proteine integrali di membrana, che possono originare dalla filtrazione glomerulare di proteine plasmatiche, dalla secrezione renale di proteine solubili, da effusioni di cellule intere o della membrana plasmatica apicale, dallo smaltimento di proteine ancorate al glicosilfosfatidil inositolo (ad esempio la proteina di Tamm-Horsfall, THP), oppure dalla secrezione di esosomi. In dipendenza dalla sindrome clinica indagata, potrebbe essere utile scegliere uno o più di questi tipi proteici come materiale di partenza per la ricerca di biomarcatori.

La presenza degli esosomi urinari è stata per la prima volta identificata da Pisitkun T *et al.* nel 2004 [Pisitkun T *et al.*, 2004]; il loro processo di secrezione, basato sempre sulla fusione dei corpi multi vescicolari mediata dal complesso ESCRT, nelle urine è schematizzato nella figura 16.

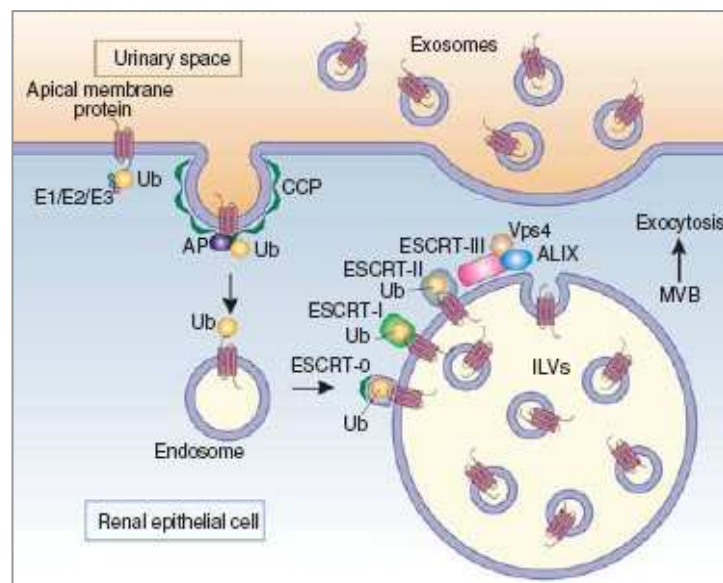


Figura 16 Processo di formazione e rilascio degli esosomi nelle urine. Ub: ubiquitina; AP: proteina adattatrice; ESCRT: endosomal sorting complex richiesto per il trasporto [van Balkom W M *et al.*, 2011].

#### Proteomica degli esosomi urinari (per la ricerca di biomarcatori)

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 exosomi urinari, portando all'identificazione di alcune proteine con potenziale valore diagnostico [Zhang Y *et al.*, 2010].

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, AQP<sub>1</sub>, megalina, cubilina, anidrasi carbonica IV), del tratto ascendente dell'ansa di Henle (THP, CD9 e il cotrasportatore Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>), 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 NCC (nella sindrome di Gitelman), il cotrasportatore Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (nella sindrome di Bartter di tipo I), la proteina FX<sub>YD</sub> (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 informazioni sullo stato fisiopatologico dell'intero tubulo renale. Per esempio, Gonzales PA *et al.*, in uno studio di proteomica degli exosomi urinari su larga scala, hanno mostrato l'utilità delle analisi su queste vescicole confrontando l'espressione proteica del gene SLC12A1, codificante per il cotrasportatore Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>, di controlli sani e pazienti aventi sindrome di Bartter di tipo I. Gli studi di immunoblotting hanno mostrato l'assenza della banda proteica corrispondente al cotrasportatore per quanto riguarda i pazienti affetti dalla sindrome, e la presenza della proteina per i controlli sani [Gonzales PA *et al.*, 2009]. Attraverso la tecnica 2-DE seguita da analisi MALDI-TOF Zhou H *et al.* hanno analizzato la composizione proteica degli exosomi 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]. In uno studio del 2008 Zhou H *et al.* hanno 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]. Altri lavori mostrano invece che proteine come resistina, GTPasi NRas o proteine che legano la galectina 3, sono espresse ad elevati livelli nelle vescicole di pazienti con cancro alla vescica, rispetto ai controlli [Smalley DM et al., 2008]. Una recente analisi degli esosomi urinari in pazienti con tumore alla prostata ha riportato inoltre la presenza di markers prostatici, come PSA e PMSA, e del marker 5T<sub>4</sub> correlato con questo tumore [Mitchell PJ et al., 2009]. Sempre 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].

#### Preparazione del campione di urine per l'isolamento degli esosomi

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. Studi recenti hanno infatti applicato la proteomica delle urine per la ricerca di biomarcatori nelle malattie renali ed in altri disordini che possono causare alterazioni sistemiche nel metabolismo e nel profilo biochimico delle proteine riscontrabili nelle urine. 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; questo a causa della difficoltà nell'analisi dell'intero proteoma urinario,

nella concentrazione del materiale proteico evitando la perdita del campione durante la sua preparazione e nella messa a punto di un protocollo adeguato per l'isolamento e la concentrazione delle proteine e per l'eliminazione degli interferenti (specialmente sali).

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].

Per una comparazione di tipo quantitativo è necessario misurare la velocità di escrezione del marcatore putativo ed osservare se questa differisce tra pazienti e controlli. Misure della concentrazione del solo biomarcatore sono insufficienti, in quanto l'acqua assunta può concentrare o diluire le proteine urinarie. 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 nel raccogliere campioni di urine e normalizzare la concentrazione del biomarker per la concentrazione della creatinina, che è secreta nelle urine in quantità relativamente costanti [Pisitkun T et al., 2006]. Anche senza una valutazione quantitativa, l'analisi degli exosomi urinari può essere utile in presenza di malattie genetiche, come la sindrome di Bartter di tipo I, dove una specifica proteina, quella codificata dal gene mutato, può risultare completamente assente negli exosomi urinari [Gonzales PA et al., 2009].

Shinada M et al. [Shinada M et al., 2000] e più recentemente 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 exosomi urinari. I risultati di questi studi dimostrano che l'isolamento delle proteine exosomiali da campioni di urine del primo mattino rispetto a campioni freschi comporta una leggera differenza dovuta probabilmente ad una minima degradazione proteica nel tratto urinario/vescica. Dopo la raccolta delle urine è inoltre necessario effettuare centrifugazioni a bassa velocità al fine di rimuovere detriti e cellule aggiungendo poi gli inibitori delle proteasi per evitare la proteolisi e quindi per preservare le proteine associate agli exosomi. 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. La THP (*Tamm-Horsfall protein*), conosciuta anche come uromodulina, si trova nelle urine sottoforma di polimeri ad alto peso molecolare legati fra di loro da ponti disolfuro a formare filamenti o matrici. In virtù della sua abbondanza, la THP, oltre ad interferire con l'analisi mediante spettrometria di massa e western blot, può anche intrappolare nei suoi filamenti polimerici altre proteine. Pisitkun T *et al.* [Pisitkun T *et al.*, 2004] e successivamente Gonzales PA *et al.* [Gonzales PA *e al.*, 2009] hanno proposto l'utilizzo di agenti riducenti, come il ditiotreitolo (DTT), al fine di ridurre i ponti disolfuro della THP. Anche se la rimozione della THP potrebbe essere necessaria per l'analisi degli exosomi, 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 exosomi. Il congelamento dei campioni a -80° C risulta essere il metodo migliore per la loro conservazione, anche per lunghi periodi di tempo. Tuttavia il congelamento a -80°C causa una leggera perdita di materiale, seppur decisamente minore rispetto al congelamento a -20°C, dovuta in parte all'aggregazione e conseguente co-precipitazione degli exosomi 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].

## 2. SCOPO DELLA TESI

## 2. SCOPO DELLA TESI

Il mio progetto di dottorato si inserisce in uno studio finalizzato alla ricerca di nuovi potenziali biomarcatori per le patologie renali: il carcinoma renale (RCC) e la nefropatia diabetica (DN) tramite tecnologie di tipo proteomico. Al fine di evidenziare differenze di composizione proteica, ci siamo concentrati sull'analisi di esosomi urinari e microdomini di membrana, un piccolo e altamente selezionato sottoinsieme del proteoma. Nello studio dell'RCC, abbiamo raccolto campioni di urine e di tessuto da pazienti affetti da questo tumore e corrispondenti controlli sani da cui abbiamo isolato gli esosomi e i microdomini di membrana. Per lo studio relativo alla DN invece abbiamo utilizzato un modello animale di diabete di tipo I, ratti trattati con streptozotocina, dalle cui urine abbiamo isolato gli esosomi. Gli esosomi sono vescicole di membrana, di dimensioni comprese fra i 30 e i 100 nm, rilasciate dalle cellule epiteliali nello spazio urinario e capaci di riflettere lo stato fisiopatologico delle cellule d'origine; sono quindi una promettente fonte di biomarcatori anche perché facilmente isolabili dalle urine. I microdomini di membrana, porzioni di membrana con particolari caratteristiche chimico-fisiche, svolgono un ruolo fondamentale in svariati processi biologici e patologici e possono essere purificati grazie alla loro caratteristica densità. Inoltre le membrane, affacciandosi sul lume extracellulare sono un'ottima fonte di possibili biomarcatori.

Lo scopo di questa tesi è quindi quello di indagare la composizione proteica di questi compartimenti e le eventuali modificazioni che questa subisce in condizioni patologiche, correlando le alterazioni a livello tissutale con quelle nei fluidi biologici.

Per quanto riguarda l'RCC, abbiamo caratterizzato dal punto di vista biochimico e morfologico gli esosomi urinari da noi isolati per ultracentrifugazione e validato il protocollo di frazionamento subcellulare utilizzato per isolare i microdomini di membrana. Dopo di che, il materiale ottenuto è stato utilizzato per uno studio di proteomica comparativa tramite spettrometria di massa, al fine di identificare l'intero pattern proteico degli esosomi urinari da una parte e dei microdomini dall'altra. Abbiamo poi valutato mediante immunoblotting l'eventuale espressione differenziale, negli esosomi e nei microdomini isolati da controlli e da pazienti, di proteine significative per il RCC in quanto già riportate come differenzialmente espresse nel tessuto tumorale o perché già oggetto di studi presenti in letteratura. Nello studio della DN, tramite spettrometria di massa sono state identificate le proteine contenute nelle bande e spot che apparivano differenziali nei profili proteici dei nostri campioni di esosomi e tramite WB è stata confermata l'alterazione del loro contenuto nei diabetici rispetto ai controlli.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. MATERIALI

- Tris-base, Triton X-100, Tween-20, Bovin serum albumin (BSA), Sodiodecilsolfato (SDS),  $\beta$ -Mercaptoetanolo, Metanolo, Isopropanolo, Dietil-Etere, Tripsina (Promega Trypsin, liofilizzata), DL-Ditiotreitolo (DTT), Iodoacetammide (IAA), Acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), acido trifluoroacetico ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ), Temed, NaCl, KCl, ammonio-persolfato (APS), OptiPrep Density Gradient Medium 60% (w/v), acido bicinconinico, Solfato di Rame 4%, Rosso Ponceau, Paraformaldeide 4%, Uranile (SIGMA).
- NaOH, Saccarosio, EDTA, Acido Fosforico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ),  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merk).
- Acido Acetico, Alcool 100% (VWR).
- Complete, cocktail di inibitori delle proteasi (Roche).
- Membrana di Nitrocellulosa Hybond ECL e PlusOne Mini Dialysis Kit (GE Healthcare).
- Acrilamide 30%, Glicina, Reattivo per dosaggio Bradford (Biorad)
- Gluteraldeide, Tampone cacodilato, Tetrossido di osmio, Resina LRW (Electron Microscopy Sciences).
- Materiale per NuPAGE Electrophoresis System: 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mm 12/15 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), anticorpo anti-Emmprin (Invitrogen).
- Anticorpo anti-P-Glicoproteina, clone C219 (anti-PgP), Glicerolo (Calbiochem).
- Anticorpo anti-anidrasi carbonica IX (anti-CAIX), gentilmente donato dalla Dr. Silvia Pastorekova (Bratislava, Slovak Republic).
- Anticorpo monoclonale anti-Aquaporina1 (anti-AQP-1) (Santa Cruz Biotechnology).
- Anticorpo anti-metallo proteasig (anti-MMP9), anticorpo monoclonale anti-dipeptidase1 (anti-DPEP1) (BD-BIOSCIENCE).
- Anticorpo monoclonale anti-dipeptidase1 (anti-DPEP1) (GeneTex)
- Anticorpo monoclonale anti-tumor susceptibility gene 101 (anti-TSG-101), anticorpo monoclonale anti-Motility-Related Protein 1 (anti-MRP1/CD9) (Abcam).
- Anticorpo monoclonale anti-Alg-2 Interacting protein X (anti-Alix) (Cell Signaling).
- Anticorpi secondari anti-Mouse, anti-Rabbit, HRP-coniugati, ECL SuperSignal West –pico, -dura, -femto (PIERCE).

### 3.2. APPARECCHIATURE

- Centrifuga Preparativa Avanti J-25 (Beckman), rotori: a braccio oscillante JS-13.1/ad angolo fisso JA-25,15;
- Ultracentrifuga Optima L-90 (Beckman), rotori: 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 (Biostad);
- 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);
- KODAK ds Image station 2000 R (KODAK);
- Stufa, modello FD 53 (Binder);
- Lettore di piastre, modello 550 (Biorad);
- Apparecchiatura per NuPage 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen);
- Apparecchiatura per SDS-PAGE (Atto);
- pHmetro, model 420A (Orion);
- 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);**



### 3.3 TECNICHE DI FRAZIONAMENTO

#### 3.3.1 Frazionamento subcellulare

Il frazionamento subcellulare è un procedimento che permette di ottenere, tramite centrifugazioni differenziali, frazioni arricchite in determinati organelli subcellulari a partire da cellule o pezzi (frustoli) di tessuto. A questo scopo vengono utilizzati campioni di tessuto renale (Renal Cell Carcinoma, RCC) e il corrispondente tessuto peritumorale normale (Adjacent Normal Kidney, ANK), provenienti da pazienti affetti da RCC sottoposti a nefrectomia totale o parziale all'Ospedale "Maggiore" di Milano. Durante il trasporto i campioni devono essere conservati e trasportati a 4°C in tampone saccarosio.

TAMPONE SACCAROSIO	
Saccarosio	250 mM
Tris-HCl pH 7.4	10 mM
EDTA	1 mM
NaF	50 mM

Tutte le operazioni di frazionamento subcellulare vengono effettuate in ghiaccio e, possibilmente, in camera fredda alla temperatura di 4°C, questo per impedire che le proteine presenti nel campione vengano degradate dall'attività delle proteasi. Prima di incominciare il frazionamento subcellulare, i frustoli di tessuto vengono asciugati per l'eccesso di tampone, pesati e sottoposti ad una prima frantumazione grezza mediante forbicine e pinzette. Per eliminare i residui di sangue, si eseguono almeno tre lavaggi in tampone saccarosio contenente un cocktail di inibitori delle proteasi (Complete, Roche) seguiti da centrifugazioni a 2900 xg per 2-3 min a 4°C (centrifuga Juan Laboratory Equipment), ogni volta eliminando il surnatante fino a quando il supernatante è limpido. Al pellet ottenuto si aggiungono 9 volumi di tampone saccarosio (rispetto al peso iniziale) e si procede all'omogenizzazione mediante un potter di vetro. Lo stantuffo, una volta inserito il tessuto nel tubo, viene fatto scorrere in maniera ritmica e ripetitiva in direzione verticale e contemporaneamente viene roteato. Si ottiene così l'omogenato (Hom), dal quale si preleva una piccola aliquota rappresentativa del tessuto in toto. Il restante campione è sottoposto a centrifugazioni differenziali che consentono un'adeguata separazione degli organelli in base alla loro densità, dimensione e diversa velocità di sedimentazione. Dalla prima centrifugazione, effettuata a 1000 xg per 10 min a 4°C (centrifuga Juan Laboratory Equipment), si ottiene un pellet (P1) costituito da materiale nucleare e da cellule non rotte. Questo pellet deve essere

nuovamente omogeneizzato aggiungendo metà del volume inizialmente utilizzato di tampone saccarosio e centrifugato nelle medesime condizioni per altre 2 volte. I surnatanti (Sn1) recuperati dalle tre centrifugazioni vengono uniti in un'unica provetta e sottoposti ad un'ulteriore centrifugazione a 14500 xg per 30 min a 4°C (centrifuga Preparativa Beckman Avanti J-25). Il pellet che si ottiene (P2) costituisce la frazione arricchita in plasmamembrane, mitocondri e lisosomi. Il relativo surnatante (Sn2) viene sottoposto ad ultracentrifugazione a 196000 xg per 40 min a 4°C (Ultracentrifuga Beckman Optima L-90), attraverso la quale si ottengono i microsomi (P3) e il citosol (Sn3) che viene trasferito (Fig.17).

Allo scopo di determinare la quantità di materiale a disposizione per i passaggi successivi, la P2 viene risospesa in un piccolo volume di tampone saccarosio in modo da ottenere una preparazione molto concentrata, ed un'aliquota viene opportunamente diluita e sottoposta al dosaggio delle proteine con il metodo di Bradford.

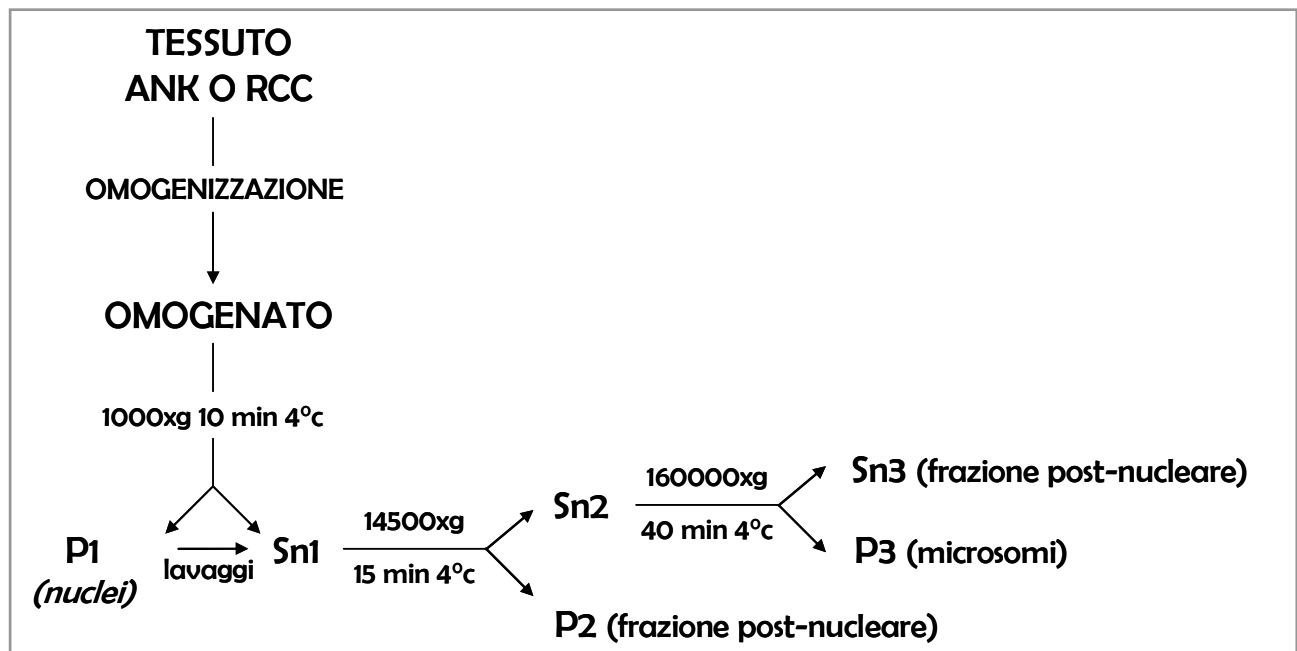


Figura 17 Protocollo di frazionamento subcellulare

### 3.3.2 Isolamento dei microdomini di membrana

I microdomini di membrana vengono isolati dalla frazione arricchita in plasmamembrane, mitocondri e lisosomi, sfruttando una loro caratteristica chimico-fisica peculiare: l'insolubilità in detergenti non ionici a 4°C, principalmente dovuta al loro arricchimento in glicosfingolipidi e colesterolo.

TAMPONE MBS	
Mes pH 6.5	25 mM
NaCl	150 mM

TAMPONE MBS-T	
Mes pH 6.5	25 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1%

La frazione post-nucleare P<sub>2</sub> viene trattata con TritonX-100 1%, detergente non ionico che solubilizza la membrana plasmatica ma lascia intatti i microdomini. Di fondamentale importanza è il rapporto tra detergente e quantità di campione. Affinché il detergente operi in maniera ottimale, per ogni gradiente si preleva un volume di P<sub>2</sub> contenente 5-6 mg di proteine, e questo viene solubilizzato in un volume finale di 1 ml con una soluzione di MBS-T 1%, contenente inibitori delle proteasi. Dopo un'incubazione di 10 minuti in ghiaccio, si favorisce la lisi cellulare meccanicamente con una pipetta automatica. Si allestisce dunque un gradiente di densità attraverso tecnica discontinua, stratificando con cautela soluzioni di densità decrescente l'una sopra l'altra nella provetta. Al campione viene miscelato 1 ml di Saccarosio 80% in MBS, in modo da ottenere una soluzione al 40% (Volume finale di 2 ml), sopra alla quale si stratificano in ordine: 4,5 ml di Saccarosio 30% in MBS e 4,5 ml Saccarosio al 5% in MBS per un volume finale di 11 ml. Il gradiente viene centrifugato a 250000 xg per 19h a 4°C (Ultracentrifuga Beckman Optima L-90, rotore SW41).

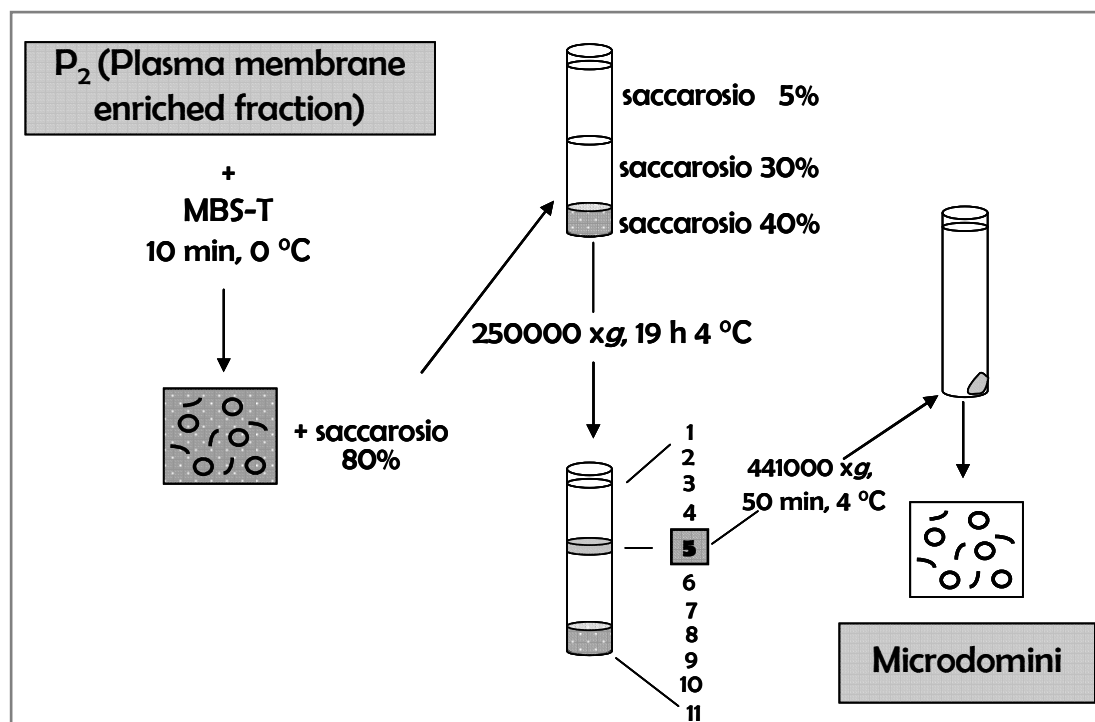


Figura 18 Isolamento dei micro domini di membrana

I microdomini di membrana, essendo costituiti da aggregati lipidici, hanno una bassa densità e risalgono lungo il gradiente, posizionandosi all'interfaccia tra le soluzioni di saccarosio al 30% e al 5%, formando una banda che può essere facilmente recuperata. A partire dall'alto della provetta vengono raccolte 11 frazioni di circa 1 ml ciascuna: la banda dei microdomini corrisponde alla frazione 5 ed è visibile come una banda opalescente. Questa frazione viene diluita con Tris-HCl 10 mM pH 7,4 e centrifugata a 441000 xg per 50 minuti (ultracentrifuga Beckman Optima Max-E, rotore TLA-110) ottenendo un pellet all'interno del quale sono contenuti i microdomini (Fig.18).

### 3.3.3 Isolamento degli exosomi mediante ultracentrifugazione

Gli exosomi sono stati isolati a partire dalle urine di pazienti affetti da RCC sottoposti a terapia chirurgica (nephrectomia totale o parziale a seconda dei casi) e di controlli paragonabili per fascia di età e sesso mediante un protocollo basato su centrifugazioni differenziali (Fig.19). La raccolta dei fluidi biologici è stata effettuata pre e post intervento per i pazienti, e raccogliendo invece le prime urine della mattina per i controlli.

Le urine raccolte 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.

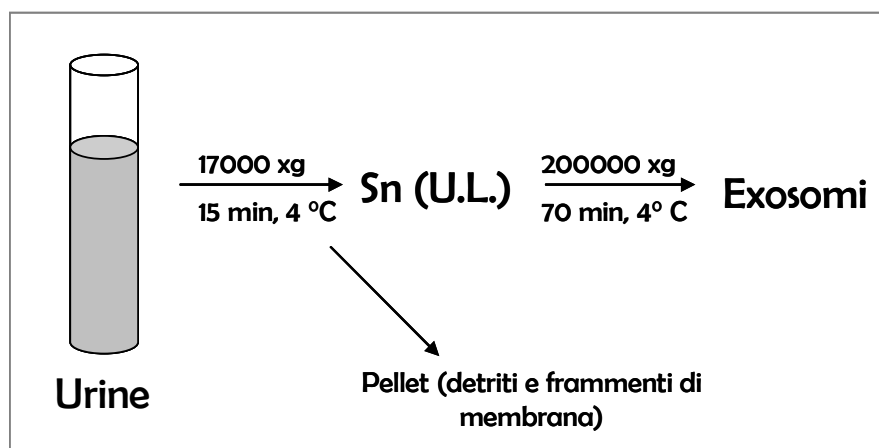


Figura 19 Metodo di separazione degli exosomi dalle urine in toto.

Tutte le operazioni vengono eseguite in ghiaccio in modo da prevenire il possibile deterioramento dei campioni. Prima del processamento le urine vengono fatte scongelare a temperatura ambiente e, non appena iniziano a sciogliersi, vengono vortexate per cicli da 1 minuto seguiti da almeno 1 minuto di pausa al fine di massimizzare il recupero del materiale. Le urine vengono quindi centrifugate a 17000 xg per 15 minuti a 4°C (Centrifuga Preparativa Avanti J-25 Beckman,

rotore JS-13.1). I pellet, costituiti da pezzi di membrana derivanti da epitelii desquamati e detriti, vengono separati dai surnatanti, che vanno a costituire le cosiddette "urine lavate". Queste vengono ultracentrifugate a 200000 xg per 1 ora 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 1X (*Phosphate Buffered Saline*) contenente gli inibitori delle proteasi (Complete, Roche) 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 (Complete, Roche) e conservati a -80°C.

### **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 min. 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 bi distillata 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 surnatanti degli exosomi. 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 MICROSCOPIA ELETTRONICA**

Gli exosomi isolati mediante il protocollo di ultracentrifugazione vengono inizialmente fissati in paraformaldeide che è in grado di cross-linkare le proteine di membrana mantenendo la struttura/morfologia delle vescicole. Al pellet contenente gli exosomi si aggiungono 500 µL di paraformaldeide 4% e si incuba per 20-30 minuti a temperatura ambiente. Si centrifuga quindi a

200000 xg (Ultracentrifuga Beckman Optima max-E, rotor TLA-110) per 1h a 4°C; il pellet ottenuto viene risospeso in PBS. Si depositano 10 µL di campione su griglie di nichel rivestite di carbonio (Formvar); dopo 20-30 minuti a temperatura ambiente, si eseguono una serie di lavaggi in PBS 0.12 M e successivamente si fissa il campione sulle griglie con gluteraldeide 2%. Il campione viene nuovamente lavato con PBS 0.12 M e viene poi preparato al trattamento con tetrossido osmio effettuando dei lavaggi mediante una soluzione di tampone cacodilato 0.12 M. Si continua fissando il campione con tetrossido di osmio 1% per 10 minuti a cui seguono una serie di lavaggi con cacodilato 0.12 M. Prima dell'inclusione in resina, il campione viene colorato con uranile (100%), lavato con acqua (per eliminare l'eccesso di uranile), disidratato in alcool (concentrazioni crescenti 20-50-70-95-100%) ed infine immerso prima in resina al 50% e poi in resina pura. Dopo aver lasciato le griglie in stufa tutta la notte a 60°C (per permettere alla resina di polimerizzare), si effettua una colorazione di contrasto utilizzando prima l'uranile (50% in alcool) e poi il piombo. Il campione viene accuratamente lavato e asciugato ed osservato al microscopio elettronico .

### **3.5 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-Acrlammide, e possono essere confrontate con uno standard proteico a peso molecolare (PM) noto.

Per la corsa elettroforetica abbiamo utilizzato gel pre-cast al 12% di acrilamide o in gradiente di concentrazione (4-12%) usando il sistema NuPage (Invitrogen). Questo sistema prevede 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).

NuPAGE MES SDS RUNNING BUFFER	
Mes pH 7.2	50 mM
Tris Base	50 mM
SDS	0.1%
EDTA	1mM

NuPAGE MOPS SDS RUNNING BUFFER	
MOPS	50 mM
Tris Base	50 mM
SDS	0.1%
EDTA	1mM

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 pH8.5	0.175 mM

I campioni sono trattati con opportuni volumi di NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) contenete un detergente anionico, il 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. L' LDS denatura le proteine e conferisce loro la carica negativa che permette di farle migrare tutte verso il polo positivo. Ai campioni si aggiunge anche un agente riducente, il ditiotreitrolo (DTT 500 mM), che permette rottura dei ponti disolfuro. 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 vortexati ed incubati per 10 minuti a 70°C (Thermomixer, Eppendorf) al fine di consentire il completamento della denaturazione proteica. Si procede raffreddando in ghiaccio per pochi secondi e, dopo aver centrifugato brevemente (MiniSpin Plus, Eppendorf), i campioni sono pronti per il caricamento nei pozzetti del gel insieme agli standard a peso molecolare noto. Entrambe le camere vengono riempite completamente con i tamponi di corsa, NuPAGE Antioxidant viene aggiunto solo al tampone che andrà a riempire la camera interna dell'apparato elettroforetico (500 µl 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.

### 3.6 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

L'elettroforesi bidimensionale (2DE) è un metodo utilizzato per aumentare la risoluzione della separazione di campioni proteici complessi. Essendo gli exosomi 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 allineate come spot su una diagonale (Fig. 20).

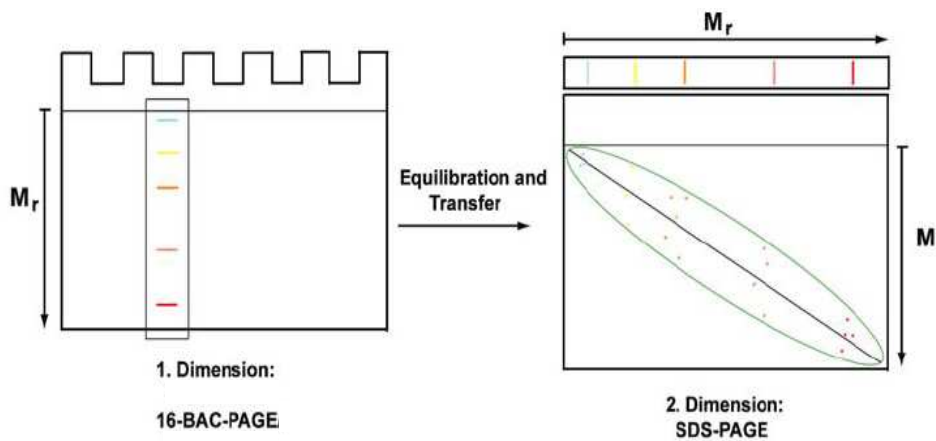


Figura 20 Rappresentazione schematica di un sistema di elettroforesi bidimensionale diagonale. I campioni vengono separati in 1a dimensione in base al loro peso molecolare; dopo la corsa, le lane relative a ciascun campione vengono ritagliate e caricate in 2a dimensione. Il risultato ottenuto è una separazione in diagonale delle proteine in base al loro peso molecolare.

#### 3.6.1 Prima dimensione: 16 BAC

Il 16-BAC è un detergente cationico che si lega alle proteine in rapporto costante, come 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. I tempi di corsa sono lunghi e si ha un basso potere di impaccamento delle proteine



Materiali (per preparare due gels):

SEPARATING GEL	
Urea	3.6 g
Acrilammide 30%	5 mL
Separating Buffer	5 mL
H <sub>2</sub> O bd	5,1 mL
Bis-Acrilammide 2%	595 µL
Acido ascorbico (80 mM)	1 mL
FeSO <sub>4</sub> 5 mM	32 µL
16 BAC 250mM	200 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1:1200) 30%	800 µL

STACKING GEL	
Urea	1 g
Acrilammide 30%	1,33 mL
Stacking Buffer	2,5 mL
H <sub>2</sub> O bd	3,207 mL
Bis-Acrilammide 2%	1.2 mL
Acido ascorbico (80 mM)	500 µL
FeSO <sub>4</sub> 5 mM	8,5 µL
16 BAC 250mM	70 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1:750) 30%	800 µL

RUNNING BUFFER	
16 BAC	2,5 mM
Glicina	150 mM
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	50mM

SAMPLE BUFFER (2x)	
Urea	7.5 M
16 BAC	250 mM
Glicerolo	10%
DTT	1,5 M
Pironina Y	5%

I campioni vengono ripresi in volumi opportuni con Sample Buffer 2X e 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 (25 mA/per gel grande) per il tempo necessario affinché i campioni entrino nel running gel, seguito da circa due ore a 20 mA/per gel (circa 4 ore a 80 mA/per gel grande).

### 3.6.2 Passaggio dalla prima alla seconda dimensione: fissazione, colorazione e riequilibrio

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 Comassie Blue R205 0.15% in fissativo per 15 minuti (20 mL); per una migliore

colorazione il gel viene lasciato nel colorante tutta la notte su bascula in camera fredda a 4°C. Al termine della colorazione il gel viene decolorato effettuando diversi lavaggi con il fissativo e si acquisisce l'immagine con il densitometro. Per passare alla seconda dimensione il gel deve essere equilibrato con Tris-HCl pH 6.8 (100 mM). Il gel viene incubato nella soluzione per tre volte (10 minuti cad). A questo punto è possibile tagliare le strisce di gel di interesse per passare alla seconda dimensione.

### 3.6.3 Seconda dimensione: SDS-PAGE

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

## 3.7 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 e alla membrana, inseriti in una griglia a formare un "sandwich".

TRANSFER BUFFER	
CAPS pH11	10 mM
Metanolo	10%

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 ed un'altra spugnetta. Sia le spugnette che la carta 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, 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 (Mini Transfer Tank (Hoefer), fig. 3.4) 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 desidera studiare.

Ultimato il trasferimento, il "sandwich" viene smontato e la presenza e l'integrità delle proteine nella nitrocellulosa vengono verificate mediante colorazione con Rosso Ponceau (SIGMA) per circa un minuto. Si tratta di una colorazione in quanto, una volta acquisita l'immagine delle proteine al densitometro (Biorad GS-710), si elimina ogni traccia del colorante mediante un lavaggio con PBS 1X.

### 3.8 IMMUNODECORAZIONE CON ANTICORPI SPECIFICI

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.

BLOCKING SOLUTION	
LATTE	5%
Tween	0.2%
Sciolto in PBS 1x	

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 da 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: anti-AQP1 1:100, anti-PgP 1:500, anti-MMP9 1:1000, anti-EMMP 1:250, anti-CAIX 1:25, anti-DPEP-1 1:1000, anti-Alix 1:1000, anti-TSG-101 1:800, anti-CD9 1:2000). 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. 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 e un lavaggio terminale in PBS 1X, si procede con la rivelazione delle proteine di interesse mediante un saggio di chemiluminescenza (ECL Assay Enhanced Chemiluminescence); 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 la proteina corrispondente è presente. La membrana viene incubata con la miscela per 5 min. e la luce emessa viene visualizzata posizionando la membrana su una CCD camera, Kodak dS Image station 2000R, che consente di visualizzare e acquisire l'immagine dell'emissione di luce direttamente sul PC. Questa tecnica di rivelazione è preferibile all'esposizione della membrana di nitrocellulosa ad una lastra fotografica, in quanto l'intervallo di linearità della misura della densità ottica che si ottiene è maggiore.

### **3.9 METODI DI COLORAZIONE**

#### **3.9.1 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 per 2 ore nel colorante SimplyBlue (Invitrogen) 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 al densitometro (Biorad GS-710).

#### **3.9.2 Colorazione fluorescente con Sypro**

SYPRO® Ruby protein gel stain è un colorante pronto all'uso, ultrasensibile e fluorescente. Viene utilizzato per la rivelazione di proteine separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide ed è ideale per l'utilizzo in prima e seconda dimensione (limite di sensibilità: 0.25-1 ng).

FIX SOLUTION	
Metanolo	50%
Acido acetico	7%
H <sub>2</sub> O	43%

WASH SOLUTION	
Metanolo	10%
Acido acetico	7%
H <sub>2</sub> O	83%

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<sup>®</sup> Ruby gel stain overnight a temperatura ambiente ed in costante agitazione. Il giorno seguente il gel viene immerso nella *wash solution* per 30 minuti. Seguono poi due lavaggi da 5 minuti ciascuno con acqua bidistillata. Tutti i passaggi dall'aggiunta del colorante in poi vengono eseguiti al buio.

Le proteine colorate con SYPRO<sup>®</sup> Ruby protein gel stain sono facilmente visualizzabili utilizzando una sorgente di raggi UV o una sorgente di luce blu. Nel nostro caso viene utilizzata una CCD camera, Kodak dS Image station 2000R, dotata di sorgente luminosa UV, ed un filtro per l'acquisizione del segnale fluorescente.

### 3.10 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.

#### 3.10.1 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 (10 µl) 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 *Comassie 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 *Comassie Brilliant Blue G-250* è preparato come soluzione stock in acido fosforico; la quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente 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 ( $\lambda = 595 \text{ nm}$ ).

### 3.10.2 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:

PRIMO STANDARD (Albumina 0.2 µg/ µl)	
2 µl	0.4 µg
4 µl	0.8 µg
10µl	2 µg

SECONDO STANDARD (Albumina 2 µg/ µl)	
2 µl	4 µg
3 µl	6 µg
5 µl	10 µg
8 µl	16 µg

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 µl con acqua bidistillata. Si prepara la miscela X di reazione (miscelando le soluzioni A e B nel rapporto 50:1) e se ne aggiungono 200 µl 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), a 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.

### 3.11 TECNICHE DI ISOLAMENTO E ANALISI DEI LIPIDI

#### 3.11.1 Estrazione e ripartizione dei lipidi dagli exosomi

Al fine di caratterizzare la composizione lipidica degli exosomi si è proceduto con l'estrazione dei lipidi totali, ed in seguito alla ripartizione in lipidi idrofobici e idrofilici.

Sono stati estratti e ripartiti i lipidi degli exosomi provenienti da 30-40 mL ca. di urine di 7 pazienti RCC e 7 soggetti controllo (CTRL), paragonabili per sesso ed età, che sono stati uniti per formare un pool RCC e un pool CTRL; sono stati analizzati anche i lipidi estratti dagli exosomi ottenuti dalle urine (150 mL) di un singolo paziente RCC e un singolo soggetto CTRL.

I campioni vengono estratti utilizzando la miscela tetraidrofurano/acqua, THF:H<sub>2</sub>O (4:1 v/v), agitati su vortex, sonicati ed infine centrifugati a 18400 xg per 10 minuti a 4°C. I surnatanti vengono trasferiti mentre i pellets vengono sottoposti a tre ulteriori estrazioni con la stessa miscela; i quattro surnatanti riuniti rappresentano l'estratto lipidico totale (ET). I pellets delle proteine delipidizzate vengono fatti asciugare all'aria e conservati a -20 °C per ulteriori analisi.

Si prosegue quindi con la ripartizione dell'ET in acqua e dietil-etero per separare i gangliosidi, idrofilici, da fosfolipidi e colesterolo, idrofobici.

All'estratto lipidico totale viene inizialmente aggiunto il 30% in volume di dietil-etero e, dopo aver opportunamente agitato con l'aiuto di un vortex, si centrifuga a 18400 xg per 5 minuti a 4°C per facilitare la separazione delle due fasi: la fase acquosa (FA, fase inferiore) viene prelevata e trasferita in una provetta pulita, mentre la fase organica (FO, fase superiore) viene ulteriormente ripartita aggiungendo il 10% in volume di acqua bidistillata rispetto all'ET. Dopo agitazione e centrifugazione, la nuova FA viene aggiunta alla precedente e la ripartizione con acqua viene ripetuta altre due volte. Al termine, le fasi acquose e le fasi organiche dei 7 campioni provenienti da circa 30-40 mL di urine di pazienti e di controlli si riuniscono nei rispettivi "pool RCC" e "pool CTRL", man mano che vengono tirate a secco sotto un flusso di azoto.

Le FA dei pool e dei campioni singoli devono essere ulteriormente purificate: perciò vengono disciolte in 200 µl di acqua bidistillata e dializzate contro acqua per 4 giorni a 4 °C, cambiando l'acqua due volte al giorno. Al termine i campioni sono stati liofilizzati e sottoposti a metanolisi alcalina al fine di ripulire i gangliosidi da eventuali contaminanti fosfolipidici.

### **3.11.2 Metanolisi alcalina**

Alle FA liofilizzate si aggiungono 250 µl di NaOH 0.1 N in Metanolo, si vortexa e si sonica in modo da disgregare l'eventuale pellet formatosi. I campioni vengono incubati a 37°C per 2 ore in continua agitazione nel Thermomixer, vortexando e sonicando ogni 30 minuti. Al termine di questo ciclo si aggiunge 1/10 in volume di HCl 1 N in Metanolo distillato (25 µl), si vortexa e si tira nuovamente a secco con azoto. Si riprende ciascun pellet con 200 µl di acqua bidistillata e si procede dializzando i campioni per una notte ed un giorno intero, cambiando l'acqua due o tre volte. Al termine della dialisi i campioni vengono liofilizzati e conservati a -20 °C. Sono stati quindi spediti in ghiaccio secco all'Unità di Biochimica Analitica e Proteomica, dell'Università degli Studi "G.D'Annunzio" di Chieti e Pescara per le analisi di Lipidomica .

### **3.11.3 Analisi del Colesterolo**

L'analisi prevede la separazione del colesterolo dagli altri lipidi della fase organica mediante cromatografia su strato sottile e rivelazione di tipo colorimetrico.

Le fasi organiche sciolte in Cloroformio:Metanolo 2:1 sono state seminate su una lastrina HP-TLC di alluminio in presenza di uno standard per il colesterolo a concentrazione nota. Il solvente di corsa (Esano:Dietili-etero:Acido Acetico in rapporto 20:35:1) deve essere lasciato equilibrare per circa un'ora nella vasca di corsa ascendente, affinché l'atmosfera si saturi del suo vapore. La



lastrina è quindi posta nella camera di corsa; al termine della separazione la lastrina viene estratta dalla vasca e fatta asciugare in modo che la miscela di corsa evapori. La rivelazione avviene mediante colorazione con anisaldeide (50ml Acido Acetico, 1ml Acido Solforico, 0,5ml 4-Metossibenzaldeide); dopo 7 minuti in stufa a 180°C si sviluppa il colore. L'immagine viene acquisita al densitometro e le bande corrispondenti al colesterolo possono essere quantificate.

#### **3.11.4 Analisi dei Fosfolipidi**

Come il Colesterolo, anche i Fosfolipidi vengono isolati a partire dalla fase organica mediante cromatografia su strato sottile, e visualizzati tramite rivelazione colorimetrica.

La miscela di corsa (Cloroformio:Metanolo:Acido Acetico:Acqua in rapporto 30:22:5:2:1) viene fatta "stagionare" per 24 ore nella vasca prima di procedere con la separazione lipidica. La semina dei campioni, la corsa e la visualizzazione si svolgono come prima descritto per l'analisi del colesterolo. In questo caso vengono utilizzati due standard: il primo è rappresentato da un campione di sfingomielina (SM) a concentrazione nota, il secondo da una miscela di diversi fosfolipidi d'identità e concentrazione note. La rivelazione avviene mediante colorazione con anisaldeide; dopo 7 minuti in stufa a 180°C si sviluppa il colore. L'immagine viene acquisita al densitometro e le bande corrispondenti ai fosfolipidi possono essere quantificate.

#### **3.11.5 Analisi dei Gangliosidi**

I gangliosidi contenuti nella fase acquosa vengono mediante cromatografia su strato sottile, e visualizzati tramite rivelazione colorimetrica.

Le fasi acquose disciolte in Cloroformio:Metanolo 2:1 vengono seminate su una lastrina di gel di silice su supporto di alluminio; sulla stessa lastrina vengono seminati anche uno standard per il GM<sub>1</sub> a concentrazione nota ed una miscela di gangliosidi noti (Mix Fidia). In questo caso vengono allestite e lasciate saturare due camere, una per la precorsa (miscela di pre-corsa: Cloroformio:Metanolo in rapporto 2:1) e l'altra per la corsa ( miscela di corsa: Cloroformio:Metanolo:CaCl<sub>2</sub> 0.2% in rapporto 50:42:11). Al termine della separazione la lastrina viene fatta asciugare in modo che la miscela di corsa evapori, e viene colorata utilizzando il reattivo di Earlich (6g di Paradimetilaminobenzaldeide in 800ml di Alcool Etilico, 200ml HCl al 37%). In questo caso la TLC si pone tra due vetri e si incuba in stufa a 180°C per 20 minuti.

L'immagine viene acquisita al densitometro e le bande corrispondenti ai gangliosidi possono essere quantificate.

### **3.11.6 Analisi del GM<sub>1</sub> mediante immunodecorazione con Tossina Colerica**

Per il Blotting con la tossina colerica, si usa una lastrina di plastica. La TLC, dopo la separazione dei gangliosidi, viene immersa in Metacrilato(1.25g in 100ml di Cloroformio):Esano in rapporto 1:4 per 1-2 minuti per 3 volte, lasciando sempre asciugare, in modo tale che il gel di silice aderisca al supporto di plastica anche in presenza di soluzioni acquose. Si procede quindi con due passaggi di equilibratura in PBS/BSA 1% di 5 minuti ciascuno facendo attenzione a non formare bolle sulla superficie di silice, e quindi con l'incubazione con la subunità B della Tossina Colerica diluita in PBS/BSA 1% 1:4000 coniugata alla perossidasi (HRP), per 2 ore al buio. L'eccesso di Tossina Colerica viene eliminato eseguendo tre lavaggi in PBS da 1-2 minuti ciascuno. Il ganglioside GM<sub>1</sub> può essere quindi identificato mediante saggio di chemiluminescenza (ECL) ed acquisizione con la CCD camera KODAK ds Image station 2000 R.

### **3.12 ANALISI DI 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).

Nei nostri esperimenti abbiamo dapprima digerito con la tripsina le proteine presenti nelle singole bande del gel oppure depositate su filtro in seguito a ultrafiltrazione, 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 "precursore", la camera di collisione serve a provocare la frammentazione dello ione precursore a formare ioni "prodotto", la cui massa viene misurata dal secondo analizzatore.

### 3.12.1 Digestione in gel con tripsina

Dopo la colorazione e l'acquisizione al densitometro, le singole bande presenti nel gel vengono tagliate, trasferite in eppendorf da 1,5 ml, lavate con una soluzione costituita da 100  $\mu\text{l}$  di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM e 100  $\mu\text{l}$  di  $\text{CH}_3\text{CN}$  ed incubate nel thermomixer 700 rpm a temperatura ambiente per 15 min.; 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  $\mu\text{l}$  di ditioneitrato (DTT) 10 mM sciolto in  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  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.

Si aggiungono ai campioni 75  $\mu\text{l}$  di Iodoacetammide 55 mM sciolta in  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  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 700 rpm a temperatura ambiente per 15 minuti. 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  $\mu\text{l}$  di  $\text{CH}_3\text{CN}$ , un solvente che consente la completa disidratazione del gel, e si incubano poi nel thermomixer 600 rpm per 10 min. Di nuovo i campioni vengono centrifugati ed il surnatante viene eliminato. La digestione delle proteine presenti nelle bande del gel viene effettuata con tripsina, un enzima appartenente alla classe delle serin proteinasi che catalizza il taglio proteolitico, con specificità per gli amminoacidi arginina e lisina, a generare peptidi. 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); il gel assorbe la soluzione e viene lasciato rigonfiare per 10 min. a temperatura ambiente. Se il gel ha riassorbito tutta la soluzione, è necessario addizionarne un ulteriore volume; i campioni vengono quindi incubati overnight in stufa a 37 °C. Terminata l'incubazione, viene prelevato il surnatante, che contiene i peptidi generati dall'azione della tripsina; quest'ultimo viene diluito con la soluzione TFA 0.1 % in modo da arrivare a circa 12  $\mu\text{l}$  ed è quindi pronto per essere iniettato nello spettrometro per le successive analisi.

### 3.12.2 Analisi LC-ESI-MS/MS

L'analisi LC-ESI-MS/MS per l'identificazione di proteine a partire dai digeriti triptici ottenuti dagli esosomi urinari 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 su una colonna analitica micro-capillare di silice fusa lunga 10 cm (ID 75µm, 3 µm, C18-A2, Easycolumn™, Proxeon) con flusso di 300 nL/min in 0.1% acido formico con un gradiente di CH<sub>3</sub>CN da 2% a 56 % in 30min, poi da 56% ta 98% in 10 min e di nuovo a 2% in 5 min.

La colonna LC è stata direttamente connessa alla sorgente ESI attraverso un sistema di tipo nanosprayer™ (Bruker Daltonics, Bremen, DE).

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 50-2200m/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 400-1600m/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.

L'analisi dei digeriti triptici ottenuti invece dai microdomini di membrane è stata eseguita tramite il sistema HPLC Ultimate 3000 nano-flow HPLC (Dionex). 20 µL di ciascun campione sono stati iniettati da un autocampionatore WPS3000, desalati online utilizzando una colonna preparativa di 5cm, 300µm ID LC-packing C<sub>18</sub> PepMap trap cartridge sottoposta a un gradiente da 0.1 a 5% di CH<sub>3</sub>CN per 5min (a un flusso 20 µL/min) e poi eluiti da una colonna analitica di 5cm, 75 µm ID, 3.5 µm Agilent C<sub>18</sub> Eclipse plus a un flusso di 0.3 µL/min in 0.1% acido formico con un gradiente di CH<sub>3</sub>CN da 2% a 56 % in 25min e poi da 56% ta 80% in 10 min. Questo sistema era accoppiato con uno spettrometro a trappola ionica Esquire 3000plus from Bruker Daltonics equipaggiato con una sorgente nanoESI. L'elio è stato utilizzato come gas di collisione. I peptidi sono stati analizzati in modalità ioni positivi in un range m/z di 300-1800 Da. Il ciclo dello spettrometro è composto da una scansione MS seguita, per gli ioni più intensi, da due scansioni consecutive MS/MS. Gli spettri MS/MS sono limitati a tre scansioni per ione precursore seguite da 0,15 minuti di esclusione.

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

Gli spettri MS/MS grezzi, per quanto riguarda i dati degli esosomi urinari, 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 (v2.2.07) usando la banca dati di Swissprot ristretta alla tassonomia umana. La carbamidometilazione delle cisteine viene impostata come modificazione fissa e la tripsina come enzima utilizzato per la digestione. Viene scelta una tolleranza di 5-10 ppm per lo ione precursore e di 0,1-0,5 Da per i frammenti. ESI-QUAD-TOF è stato selezionato come strumento. Sono state considerate identificate le proteine secondo due criteri: uno più stringente (almeno due peptidi identici) e uno meno selettivo (almeno un peptide identico).

Per quanto riguarda invece i dati dei microdomini di membrana, i cromatogrammi ottenuti sono stati elaborati con DataAnalysis®, vers. 3.3, (Bruker Daltonics) e la risultante lista di masse è stata usata per il motore di ricerca Mascot® 2.2. usando la banca dati di Swissprot ristretta alla tassonomia umana. La carbamidometilazione delle cisteine viene impostata come modificazione fissa e la tripsina come enzima utilizzato per la digestione. Viene scelta una tolleranza di 2 Da per lo ione precursore e di 1 Da per i frammenti. ESI-TRAP è stato selezionato come strumento. Sono state considerate identificate le proteine con almeno un peptide identico.

### 3.13 ANALISI LIPIDOMICA MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA

I campioni (FO) sono stati sciolti in 20 µl di metanolo contenente lo standard interno, la sfingomielinina deuterata (PSMd<sub>31</sub>; 2,5 µg/ml). L'analisi è stata effettuata mediante un HPLC Capillare (CapLC Systems, Waters) interfacciato con uno spettrometro di massa Q-TOF Ultima (Waters) equipaggiato con una sorgente nanoLockSpray in modalità ioni positivi. Per ogni campione è stato iniettato 1 µl. L'eluizione è stata effettuata con un flusso di 3 µl/min, utilizzando una colonna C<sub>18</sub>, 150 mm x 300 µm (diametro interno) (Jupiter, Phenomenex), con un gradiente di H<sub>2</sub>O/THF, 0.2% acido formico. Per lo screening dei lipidi è stata effettuata l'acquisizione in modalità "MS scan" selezionando un range di m/z compreso tra 300 e 2000 Th, mentre le analisi di identificazione in spettrometria di massa tandem (MS/MS) sono state effettuate mediante modalità "product ion scan", "neutral loss" e "parent ion scan" selezionando di volta in volta la più opportuna. Ogni analisi è stata effettuata in triplicato (n=3).

Le prestazioni analitiche del metodo sono state testate usando un surrogato di matrice biologica (Albumina bovina 4%) fortificata con standard lipidici aventi concentrazioni differenti. I dati sono stati processati mediante markerLynx software (Waters).

### **3.14 ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica è stata effettuata mediante t-test usando il software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism).

## 4. RISULTATI

## 4. RISULTATI

### 4.1. CARCINOMA RENALE: EXOSOMI

#### 4.1.1 Casistica

Abbiamo raccolto una casistica formata da 29 pazienti (età media  $62 \pm 14,4$ ) affetti da ccRCC, come verificato dal gruppo di anatomia patologica dell'ospedale San Paolo di Milano, e da 28 controlli paragonabili per età e sesso; per ogni paziente (prima della nefrectomia) e per ogni controllo è stata raccolta una media di 50 ml di urine, a partire dalle quali sono stati poi isolati gli exosomi tramite un protocollo di ultracentrifugazione.

E' stata preventivamente eseguita l'analisi chimico-fisica delle urine su un'aliquota prelevata da ogni raccolta. Nessun paziente né controllo ha mostrato positività patologica per quanto concerne proteine, glicosuria, chetonuria, leucocituria, urobilinogeno, pigmenti biliari, emoglobinuria e sangue nelle urine.

Abbiamo quindi determinato il contenuto proteico degli exosomi ottenuti per millilitro di urine di partenza ( $\mu\text{g/ml}$ ) e la concentrazione di creatinina urinaria ( $\text{mg/dl}$ ) (Tab. 4a e 4b). Dalle tabelle si osserva che la concentrazione di proteine exosomali riferita ad unità di volume di urine (1 ml) oscilla fra 0,99 e 16,0  $\mu\text{g/ml}$  (media  $4,98 \mu\text{g/ml} \pm 3,38 \mu\text{g/ml}$ ) per i pazienti e fra 2,78 e 11,8  $\mu\text{g/ml}$  (media  $6,56 \mu\text{g/ml} \pm 3,22 \mu\text{g/ml}$ ) per i controlli. Ciò indica una tendenza alla riduzione del contenuto di proteine negli exosomi urinari dei pazienti rispetto ai controlli (Fig. 21a), che però, data l'elevata variabilità, non risulta statisticamente significativa. Questa osservazione è in accordo con quanto riportato da Mitchell PJ et al., che hanno riscontrato un'ampia variazione nel contenuto di proteine negli exosomi purificati da urine raccolte da donatori sani e pazienti affetti da cancro alla prostata [Mitchell PJ et al., 2009].

La concentrazione di creatinina oscilla invece fra 5,96  $\text{mg/dl}$  e 236  $\text{mg/dl}$  (media  $80,5 \text{mg/dl} \pm 60,0 \text{mg/dl}$ ) per quanto riguarda i pazienti (Tab. 4a) e fra 53,8  $\text{mg/dl}$  a 206  $\text{mg/dl}$  (media  $138,3 \text{mg/dl} \pm 46,4 \text{mg/dl}$ ) per quanto riguarda i controlli (Tab. 4b). Il contenuto di creatinina subisce quindi significative variazioni fra un soggetto e l'altro e risulta inoltre statisticamente più elevato nei controlli rispetto ai pazienti (Fig. 21b).



Tabella 4a. contenuto di proteine totali degli exosomi urinari e concentrazione di creatinina urinaria dei pazienti ccRCC pre-intervento.

CODICE PAZIENTE	PROTEINE TOTALI ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	CREATININA (mg/dl)	PER POOL
34	6,82	161	
40	7,91	29,6	
46	2,11	32,8	
51	16,0	115	x
56	3,17	58,0	x
58	7,46	47,1	
61	3,00	57,5	x
63	10,4	182	
65	2,11	60,9	x
67	7,85	62,8	x
70	non dosabile	5,96	
74	non dosabile	208	
76	3,56	177	
84	3,33	27,1	
85	3,09	69,4	x
86	5,74	236	
91	5,00	63,0	x
93	2,22	129	
97	3,49	54,4	
98	10,5	99,5	
103	3,40	66,1	x
111	non dosabile	69,7	
112	2,95	81,8	
113	4,15	92,6	
120	0,99	26,3	
136	3,35	26,1	
146	3,25	29,9	
147	5,43	32,6	x
152	2,29	34,6	

Nota: con una x sono contrassegnati i pazienti che sono stati successivamente selezionati per l'allestimento del pool rappresentativo di exosomi urinari da sottoporre alle analisi di spettrometria di massa.

Nonostante questa differenza, 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 RCC; per questo tale variazione non assume alcun particolare significato patologico. 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. Dal momento che tutti i pazienti ed i controlli arruolati nella nostra casistica non manifestavano alcuna alterazione della funzionalità renale, noi assumiamo che la concentrazione della creatinina rappresenti una stima del maggiore o minore livello di concentrazione delle urine. Pertanto abbiamo deciso di utilizzare questo parametro come fattore di normalizzazione dell'intensità delle bande relative alle proteine studiate tramite immunoblotting (IB).

Tabella 4b. contenuto di proteine totali degli exosomi urinari e concentrazione di creatinina urinaria dei soggetti controllo.

CODICE PAZIENTE	PROTEINE TOTALI ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	CREATININA ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	PER POOL
DB	10,2	198	
PK	non dosabile	132	
MK	10,4	206	
AR	4,67	177	
VC	3,00	108	
LR	4,33	173	
ET	5,53	177	
SN	8,55	145	x
PG	3,03	180	x
NG	4,95	117	x
GG	4,78	173	x
OA	7,59	155	x
PL	3,94	63,4	x
CC	11,8	168	
AC	2,78	53,8	
ZC	11,1	146	
EB	11,1	68,8	
BC	10,7	87,9	
MB	3,36	94,1	x
MI	4,69	173	x
PP	3,49	110	
FM	9,70	190	x
CS	4,57	85,7	

Nota: con una x sono contrassegnati i pazienti che sono stati successivamente selezionati per l'allestimento del pool rappresentativo di exosomi urinari da sottoporre alle analisi di spettrometria di massa

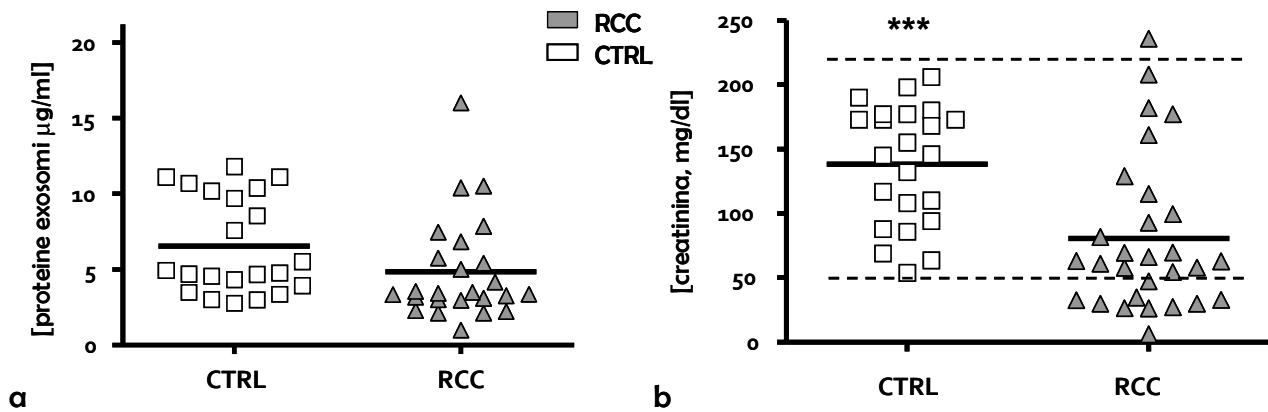


Figura 21. a) Scatter plot relativo alla distribuzione della concentrazione delle proteine negli exosomi urinari. La linea continua nera indica la media. b) Scatter plot relativo alla distribuzione del contenuto di creatinina negli exosomi. La linea continua nera indica la media, le linee nere tratteggiate indicano invece l'intervallo di riferimento per la creatinina nelle urine (50-220 mg/dl); \*\*\*  $p < 0.001$ .

L'utilizzo della creatinina urinaria come parametro di normalizzazione è condiviso in letteratura [HynKyung L *et al.*, 2012; Moon PG *et al.*, 2011] anche se sono stati proposti metodi alternativi quale la normalizzazione sull'escrezione di marker exosomal come ALIX o TSG 101 [Gonzales P *et al.*, 2008] o sulla quantità di *Tamm-Horsfall protein* [Fernandez-Llama P *et al.*, 2010], la più abbondante proteina negli exosomi. Questo secondo metodo, in particolare, non sembra convincente in quanto la quantità di *Tamm-Horsfall protein* risulta nei nostri campioni estremamente variabile tra i soggetti e non correlata con il livello delle altre proteine exosomal (dati non mostrati).

#### 4.1.2 Profili proteici degli exosomi urinari

Nel nostro studio, gli exosomi sono stati isolati, a partire dalle urine raccolte da pazienti ccRCC e da controlli, mediante il protocollo più frequentemente utilizzato in letteratura, cioè per ultracentrifugazione (UC). Abbiamo quindi inizialmente confrontato i profili proteici degli exosomi urinari con i pattern proteici totali delle urine di partenza e del surnatante ottenuto dopo la separazione degli exosomi stessi. Le proteine totali urinarie e quelle solubili sono state concentrate mediante ultrafiltrazione con dispositivi muniti di nanomembrane ultrafiltranti (VivaSpin®) e sono state poi risolte attraverso 1DE seguita da colorazione con Comassie Brilliant Blue (CBB). I profili osservati (Fig. 22) hanno evidenziato la presenza di notevoli differenze tra le bande proteiche delle urine *in toto* e quelle degli exosomi corrispondenti, suggerendone un diverso arricchimento; ad esempio, nelle urine la proteina più abbondante è l'albumina, mentre negli exosomi urinari, come ho detto precedentemente, la proteina maggiormente presente

risulta essere la THP (*Tamm Horshfall Protein*), o uromodulina, visualizzabile come una banda di maggiore e variabile intensità ad un peso molecolare di 80 KDa.

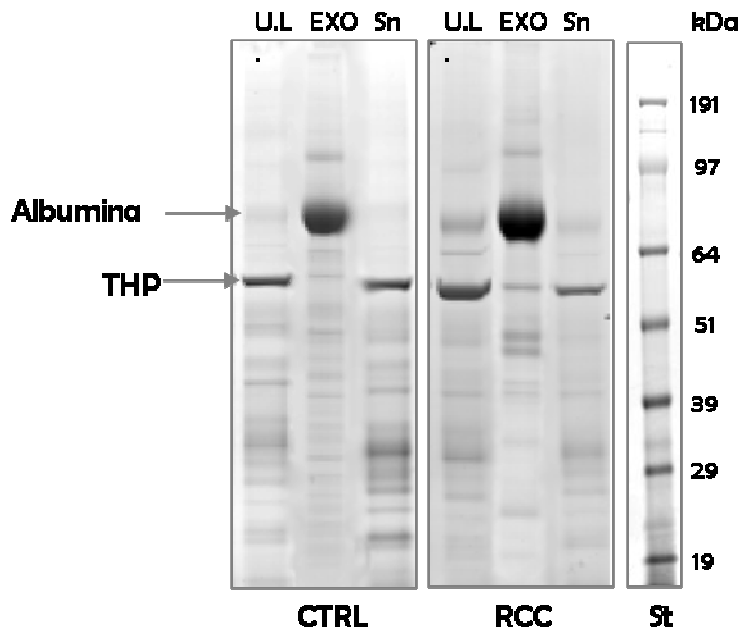


Figura 22. Confronto tra i profili proteici delle urine (UL), degli exosomi (EXO) e dei surnatanti degli exosomi (Sn) di un paziente e di un controllo. Colorazione CBB. Le frecce indicano le proteine più abbondanti presenti nelle urine totali (albumina) o negli exosomi urinari (THP).

La THP normalmente è secreta nelle urine come un polimero ad alto peso molecolare in forma di filamenti o maglie, che precipita centrifugando a velocità moderata (17000xg) insieme ai detriti cellulari e i nuclei, lasciando gli exosomi nel surnatante che verrà poi ultracentrifugato per isolare queste micro vescicole. In realtà da un lato i polimeri di THP intrappolano parte degli exosomi facendoli precipitare nella centrifugazione preliminare dall'altro gli abbondanti frammenti di uromodulina rimangono attaccati agli exosomi stessi contaminando il pellet ottenuto per UC [Fernandez-Llama P *et al.*, 2010]. Sono stati proposti diversi metodi per eliminare la THP basati principalmente sul trattamento, in diverse fasi del protocollo di isolamento degli exosomi, con ditionotritolo (DTT) che, riducendo i ponti disolfuro, causa la depolimerizzazione della THP. Nel nostro laboratorio abbiamo testato questi metodi di deplezione, senza però ottenere risultati soddisfacenti né aumentando il recupero di exosomi né eliminando in maniera significativa la THP (dati non mostrati).

La presenza della THP nei nostri campioni pone quindi dei problemi nel dosaggio delle proteine, essendo questi risultati influenzati più dalla variabile quantità di uromodulina che dall'effettiva

concentrazione delle altre proteine exosomal, e nelle analisi di spettrometria di massa, dove i segnali molto abbondanti della THP potrebbero coprire quelli di proteine più scarse e quindi eventuali differenze composizionali non sarebbero più rilevabili. Il primo problema è stato risolto, almeno per quanto riguarda il caricamento di gel per l'elettroforesi e WB, correggendo la quantità di campione da utilizzare in base all'intensità dei profili colorati con CBB ottenuti in un gel preliminare in modo che fossero confrontabili (Fig. 23) e normalizzando poi sull'intensità della colorazione con Rosso Ponceau della membrana di nitrocellulosa. Il secondo problema viene invece parzialmente superato grazie alla separazione elettroforetica dei campioni prima della spettrometria di massa, per cui i peptidi relativi alla THP si concentreranno solo nelle bande corrispondenti al suo peso molecolare, lasciando la possibilità di identificare numerose proteine anche poco abbondanti nelle altre bande ricavate dal gel. Recentemente è stato anche proposto in letteratura un metodo di esclusione dei picchi nello spettro di massa relativi all'uromodulina [Hiemstra TF *et al.*, 2011] che potrebbe aiutare nell'identificazione di proteine differenziale di massa analoga alla THP.

Dalla figura 22 si può anche rilevare che i profili delle proteine urinarie e dei surnatanti degli exosomi non hanno mostrato significative variazioni tra soggetti sani di controllo e pazienti affetti da RCC; ciò era di fatto atteso, in quanto i pazienti con RCC non manifestano nessuna importante alterazione della composizione urinaria riscontrabile con i comuni esami di laboratorio. Al contrario, i profili proteici degli exosomi urinari presentano alcune differenze tra soggetti controllo e pazienti RCC; abbiamo dimostrato inoltre che tali variazioni si mantengono indipendentemente dal giorno e dall'orario di raccolta delle urine (dati non mostrati).

La costanza e la riproducibilità di queste differenze è stata quindi confermata analizzando i profili proteici degli exosomi urinari ottenuti da numerosi pazienti ccRCC e controlli, pur rilevando una certa variabilità (Fig. 23).

Confrontando i profili proteici degli exosomi ottenuti dalle urine di controlli e pazienti, abbiamo notato che la composizione risulta riproducibile all'interno del gruppo considerato mentre mostra importanti differenze tra i due gruppi rafforzando ulteriormente l'ipotesi che negli exosomi stessi potessero essere rilevate, in maniera semplice e non invasiva, alterazioni a livello del proteoma tali da poter essere utilizzate a scopo diagnostico.

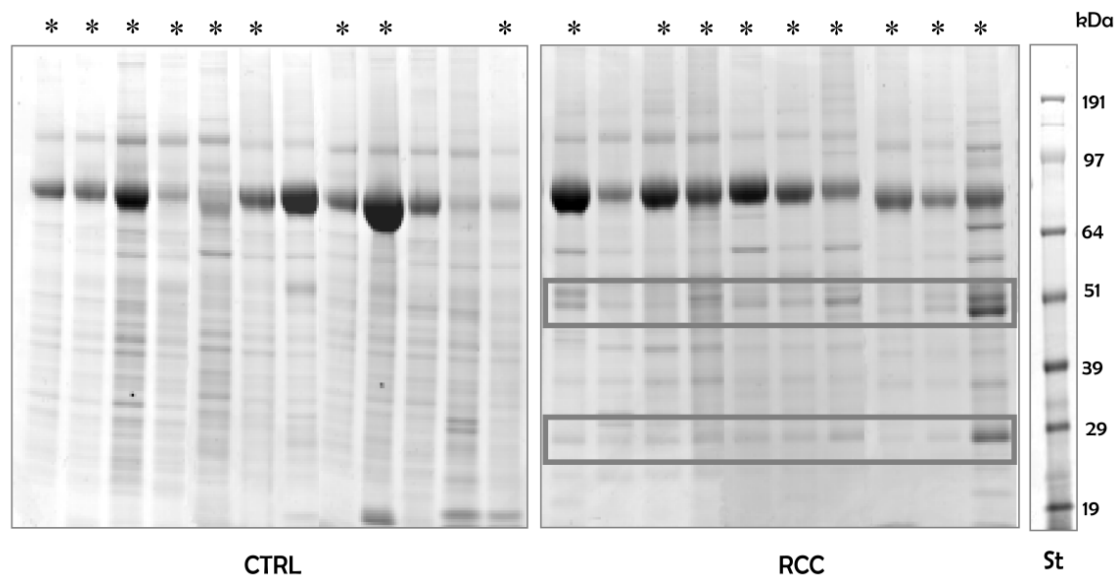


Figura 23. Profili proteici analizzati mediante 1DE, seguita da colorazione con CBB, di campioni di esosomi isolati da urine di 12 controlli sani e 10 pazienti ccRCC. I riquadri indicano alcune differenze evidenti tra i due gruppi. Gli asterischi identificano i campioni successivamente selezionati per il pool rappresentativo per le analisi di spettrometria di massa.

#### 4.1.3 Validazione del protocollo di isolamento degli esosomi

##### Caratterizzazione biochimica

A questo punto abbiamo voluto verificare l'effettiva che il preparato grezzo ottenuto mediante UC contenesse vescicole con le caratteristiche fisiche degli esosomi; quindi ne abbiamo inizialmente effettuato una caratterizzazione biochimica verificando nei nostri campioni, tramite EF/IB, la presenza di proteine accettate in letteratura come marcatori esosomiali, quali Alix, TSG 101 e CD9 [Zhou H *et al.*, 2006]. Alix (*Asparagine linked-glycosylation-2 interacting protein X*) è una proteina associata ai complessi ESCRTs coinvolta nel sorting delle proteine all'interno dei MVBs; TSG 101 (*tumor susceptibility gene 101*) è una componente del complesso ESCRT-I che riconosce la proteine ubiquitinate per la loro successiva inclusione nei MVBs. CD9 fa parte invece della superfamiglia delle tetraspanine ed è noto che gli esosomi contengono microdomini arricchiti in tetraspanine (TEM) [Bard MP *et al.*, 2004].

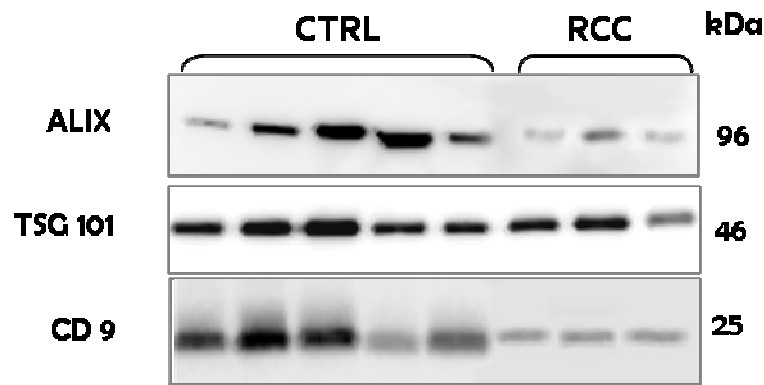


Figura 24. EF e IB con anticorpi anti-ALIX/CD9/TSG101 di campioni di exosomi ottenuti mediante UC da urine di pazienti ccRCC (RCC) e da controlli (CTRL).

I risultati mostrano la positività dei nostri campioni per questi marcatori (Fig. 24), confermando l'effettiva presenza degli exosomi urinari nei nostri preparati e quindi la correttezza e riproducibilità, a prescindere dalle differenze individuali, del protocollo standard di isolamento degli stessi da noi adottato. Inoltre i marcatori si arricchiscono negli exosomi in confronto alle urine di partenza concentrate mediante ultrafiltrazione, confermando ancora una volta l'efficacia del nostro protocollo di isolamento (Fig. 25).

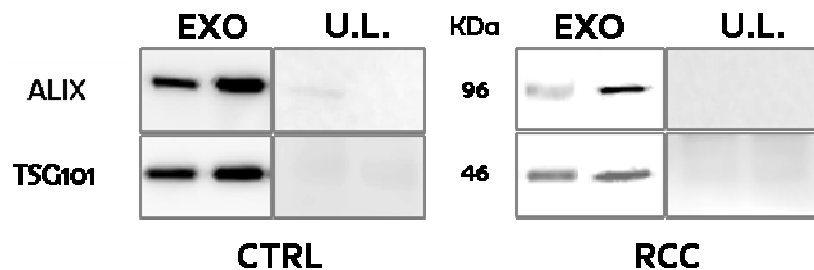


Figura 25. EF e IB con anticorpi anti-ALIX e TSG101 di campioni di exosomi ottenuti mediante UC da urine di pazienti ccRCC (RCC) e da controlli (CTRL) in confronto con le urine di partenza

L'assenza di contaminazione ad opera di altri tipi di microvescicole o membrane cellulari è stata anche verificata (dati non mostrati) tramite centrifugazione in gradiente discontinuo di densità di Optiprep, dato che la flottazione in un *range* di densità compreso tra 1.15 e 1.19 g/cm<sup>3</sup> è una ben definita caratteristica degli exosomi che li distingue dal reticolo endoplasmatico (1.18–1.25 g/cm<sup>3</sup>), cisterne dell'apparato di Golgi (1.05–1.12 g/cm<sup>3</sup>) e *apoptotic blebs* (1.24–1.28 g/cm<sup>3</sup>) [They C *et al.*, 2001].

### Caratterizzazione morfologica

In seguito abbiamo effettuato anche una caratterizzazione morfologica dei nostri preparati per UC contenenti esosomi osservandoli tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM) dopo colorazione di contrasto con uranile. Si sono quindi analizzati gli esosomi isolati a partire dalle urine di due pazienti affetti da ccRCC e di due controlli, paragonabili per fascia di età, al fine di identificarne eventuali differenze morfologico-dimensionali. Come evidenziato nella Fig. 26, la maggior parte degli esosomi mostra una forma tondeggiante; l'aspetto degli esosomi urinari ottenuti dalle urine di pazienti e controlli si presenta del tutto paragonabile ed assimilabile a quanto riportato in letteratura [Pisitkun T *et al.*, 2004]. E' possibile inoltre osservare, in alcuni campi, la presenza di filamenti attorno agli esosomi che ricordano la struttura reticolare della THP.

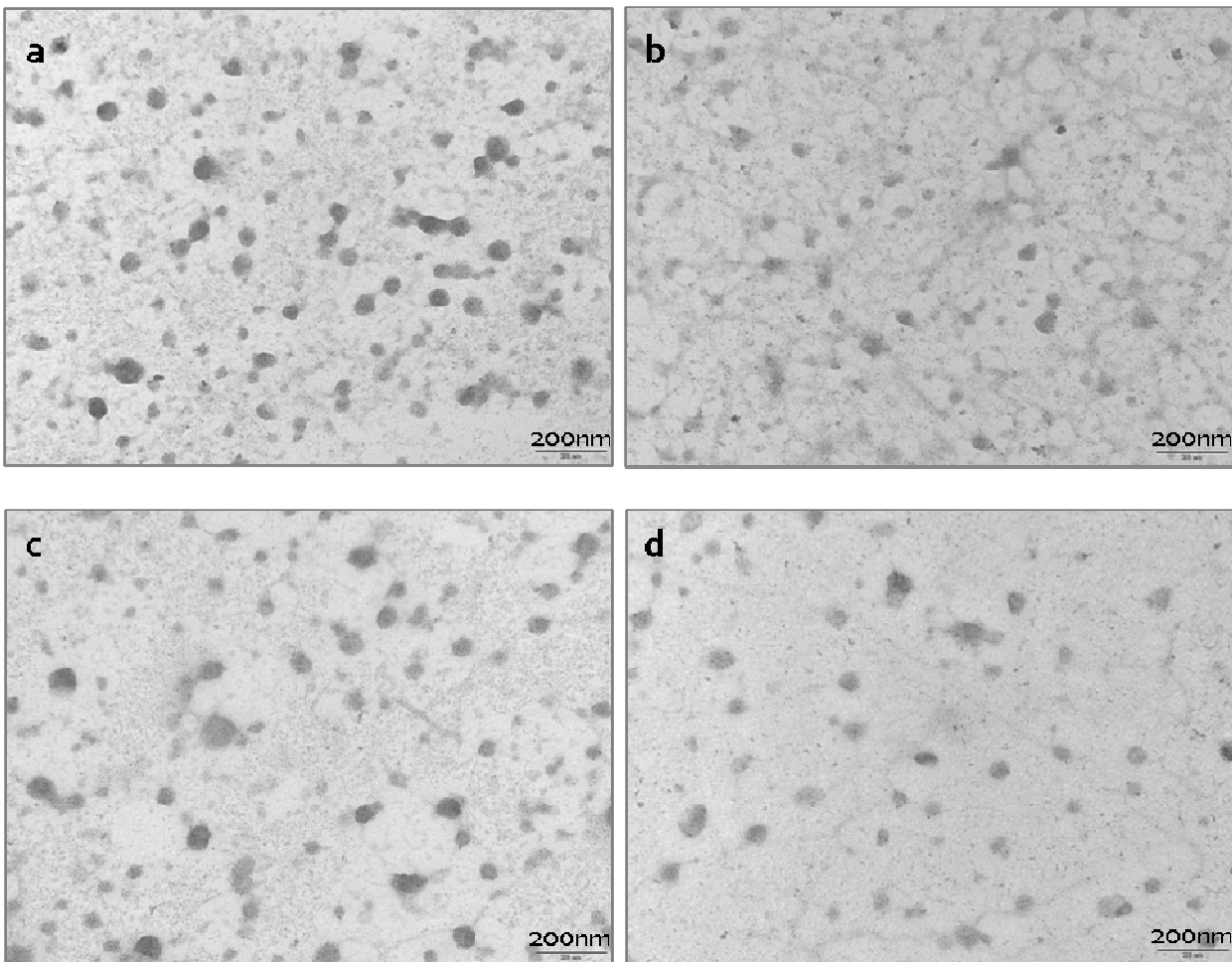


Figura 26. Fotografie al TEM di esosomi da urine di: a-b) soggetti controllo; c-d) pazienti affetti da ccRCC. Barra di riferimento: 200 nm.



A partire dalle immagini ottenute, abbiamo poi effettuato un'analisi morfometrica degli exosomi stessi osservati al TEM, al fine di contare le vescicole presenti nei vetrini allestiti e di valutarne le dimensioni misurandone il diametro.

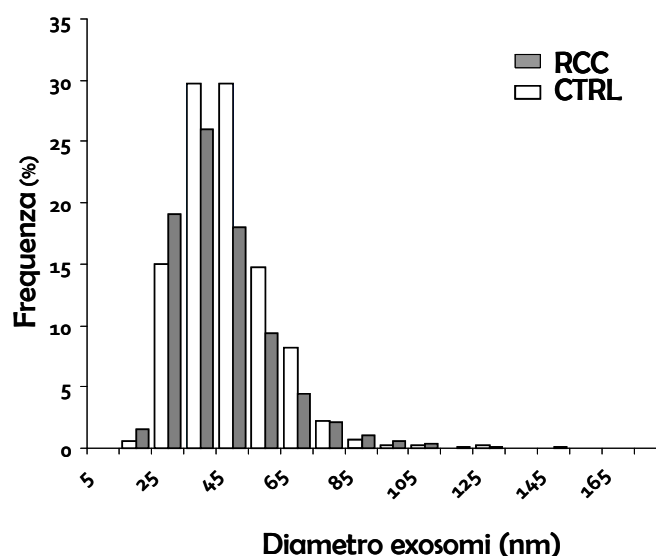


Figura 27. Distribuzione delle dimensioni degli exosomi urinari di controlli e pazienti ccRCC. Istogrammi relativi al diametro delle vescicole.

I risultati evidenziano che le dimensioni delle vescicole variano da un minimo di 16-18 nm ad un massimo di 140-170 nm (Fig. 27); tuttavia le dimensioni più frequentemente riscontrate sono comprese tra i 30 e 50 nm, sia nei controlli che nei pazienti, che quindi non presentano significative differenze nella morfologia, nelle dimensioni medie e nella distribuzione di frequenze delle dimensioni (Tab. 5).

Tabella 5. Analisi statistica dei valori ottenuti dall'analisi morfometrica degli exosomi urinari.

	CTRL	RCC
Total number of values	2270	1346
Number of binned values	2270	1346
Minimum	17,33	16,00
25% Percentile	33,33	34,67
Median	41,33	42,88
75% Percentile	50,67	54,40
Maximum	178,2	142,2
Mean	43,17	46,12
St. Dev.	14,00	17,12
St. Error	0,2938	0,4667
Lower 95% CI of mean	42,59	45,20
Upper 95% CI of mean	43,75	47,03

Il nostro laboratorio ha in programma di verificare anche la presenza dei marcatori exosomaliali Alix, TSG 101 e CD9 nelle microvescicole in esame tramite marcatura con anticorpi coniugati con oro colloidale e microscopia elettronica per confermare ulteriormente la natura di queste vescicole.

#### 4.1.4 Proteomica degli exosomi urinari

La concordanza con la letteratura sia per quel che riguarda la positività di noti marcatori proteici exosomaliali tramite IB, sia per quanto concerne i parametri morfologico-dimensionali, ci consente di concludere che stiamo lavorando con veri exosomi, ben caratterizzati dal punto di vista sia biochimico che morfologico e con un sufficiente grado di purezza, requisito essenziale per l'analisi proteomica.

Per l'identificazione delle proteine degli exosomi urinari attraverso spettrometria di massa (MS), sono stati allestiti pool rappresentativi ottenuti a partire dalle urine di 9 pazienti e 9 controlli, al fine di ottenere una sufficiente quantità di materiale per le analisi, minimizzando inoltre eventuali differenze intra-individuali.

Le proteine sono state separate tramite 1DE in un gel al 4-12% di poliacrilammide (Fig. 28); dopo colorazione CBB, le bande presenti nel gel sono state excise in modo contiguo al fine di includere, per quanto possibile, l'intera banda, sono state sottoposte a digestione con tripsina ed analizzate mediante LC-ESI-MS/MS.

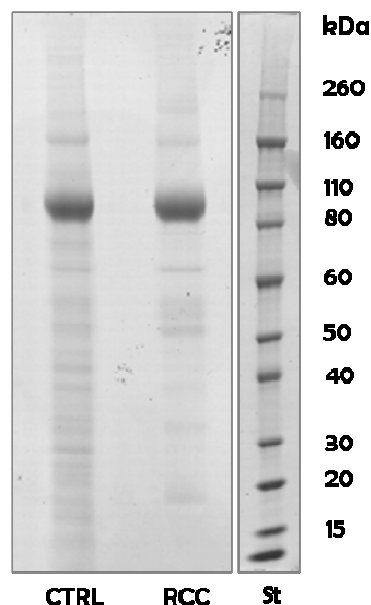


Figura 28. Profili SDS-PAGE di pools di exosomi derivati dalle urine di 9 pazienti (RCC) e 9 controlli (CTRL).

Le tabelle 6a e 6b elencano tutte le proteine identificate nei pools di exosomi controllo e di pazienti ccRCC. Per ogni proteina identificata viene riportato lo score in Mascot, che rappresenta una misura della probabilità assoluta (p) che l'identificazione della proteina sia frutto di un evento casuale (un falso positivo). Poiché:  $\text{score} = -10 \cdot \log_{10}(p)$ , una proteina identificata con uno score alto, avrà una bassa probabilità di essere un falso positivo. Nelle tabelle sono anche riportati; la copertura della sequenza proteica garantita dai peptidi identificati; la massa molecolare della proteina (in Dalton) ed il peso molecolare della banda corrispondente nel gel (in kDa); i peptidi identificati come possibilmente corrispondenti alla sequenza proteica associata (peptidi matched) e, tra questi, quelli propriamente identici alla sequenza stessa (peptidi identici); la localizzazione subcellulare e l'eventuale funzione nota, ricercate mediante il database UniProt Knowledgebase (UniProtKB) di ExPASy (Expert Protein Analysis System).

Come evidenziato nelle tabelle 6a e 6b e nel diagramma di Venn sotto riportato (Fig. 29), negli exosomi urinari controllo sono state identificate 261 proteine, di cui 140 (il 54%) non presenti invece nel pool di exosomi isolati dai pazienti RCC e 159 (il 61%) già descritte in qualità di proteine degli exosomi nella sezione relativa alle urine basata su studi su soggetti sani di Exocarta (1155 proteine al 25/01/12), un database in continuo aggiornamento che include tutte le proteine e tutti gli RNA exosomiali ad oggi identificati e validati [Matihvanan S. *et al.*, 2009]. Nel pool di exosomi urinari RCC sono state invece identificate 187 proteine, di cui 66 (il 35%) non individuate nel corrispettivo pool di controllo e 94 (il 50%) già presenti in Exocarta. Infine, le proteine comuni ad entrambi i pools sono 121, di cui 73 (il 60%) già presenti in Exocarta.

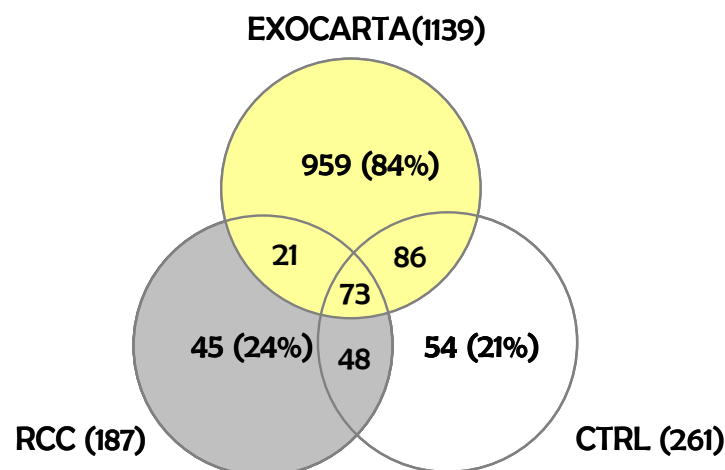


Figura 29. Diagramma di Venn che evidenzia le sovrapposizioni tra le proteine da noi identificate e quelle contenute in Exocarta.

L'abbondanza di proteine già descritte come componenti degli exosomi urinari ci conforta circa la correttezza delle nostre analisi; tuttavia, dato comunque molto interessante, una buona percentuale di proteine (il 30% del totale) da noi identificate non sono ancora riportate in Exocarta.

Questa differenza potrebbe essere dovuta alle tecniche di spettrometria di massa utilizzate (ad esempio il tipo di ionizzazione o di analizzatore) che potrebbero favorire l'identificazione di proteine con specifiche caratteristiche fisiche. . Studi fatti eseguiti da diversi gruppi con approcci sperimentali differenti potrebbero quindi risultare complementari. Per questi motivi sarebbe auspicabile l'integrazione dei dati per ottenere la descrizione completa del proteoma exosomiale.

Tabella 6a. Elenco delle proteine identificate mediante LC-ESI-MS/MS nel pool di exosomi urinari RCC.

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	COV. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
3	14225	Q9H1C7	86	10966	13	11	2	2	ALTRO	ALTRO
14	<i>1,5-anhydro-D-fructose reductase</i>	Q96JD6	21	37136	38	2	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
11	<u>14-3-3 protein beta/alpha</u>	P31946	136	28179	28	19	9	3	CITOPLASMA	SIGNALLING
11	<u>14-3-3 protein z/delta</u>	P63104	74	27899	32	12	3	2	CITOPLASMA	SIGNALLING
10	<u>14-3-3 protein beta/alpha</u>	P31946	35	28179	30	20	5	2	CITOPLASMA	SIGNALLING
10	<u>15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase</u>	P15428	59	29187	30	9	2	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
9	<u>3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2</u>	Q9BUT1	51	27049	28	8	2	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
2	Acid ceramidase	Q13510	82	45087	10	11	6	2	LISOSOMI	METABOLISMO
16	Actin	P60709	415	42052	40	32	16	10	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
12	<i>Actin-related protein 2/3 complex subu 2</i>	O15144	37	34426	34	3	1	1	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
11	<u>ADP-ribosyl cyclase 2</u>	Q10588	44	36328	28	5	2	1	MEMBRANA	SIGNALLING
5	ADP-ribosylation factor 1	P84077	58	20741	18	11	2	1	GOLGI	TRAFFIKING
5	ADP-ribosylation factor 6	P62330	62	20183	18	12	2	2	GOLGI	TRAFFIKING
6	<i>ADP-ribosylation factor-like protein 3</i>	P36405	78	20614	19	6	1	1	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
14	Alcohol dehydrogenase	P14550	21	36892	38	10	3	1	ALTRO	METABOLISMO
18	<u>Aminoacylase-1</u>	Q03154	31	46084	45	3	2	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
37	<u>Aminopeptidase N</u>	P15144	998	109870	160	29	50	28	MEMBRANA	METABOLISMO
39	<u>Angiotensin-converting enzyme</u>	P12821	43	150418	200	2	4	2	MEMBRANA	METABOLISMO
36	Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1	Q9P2R3	69	129915	150	1	2	2	ENDOSOMI	ALTRO
44	<u>Annexin A1</u>	P04083	105	38918	>260	19	7	3	MEMBRANA	TRAFFIKING
22	<u>Annexin A11</u>	P50995	655	54697	54	35	22	15	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
14	<u>Annexin A2</u>	P07355	98	38808	38	20	6	3	MEMBRANA	TRAFFIKING
12	<u>Annexin A4</u>	P09525	340	36088	34	43	15	10	CITOPLASMA	SIGNALLING
12	<u>Annexin A5</u>	P08758	339	35971	34	35	18	9	CITOPLASMA	SIGNALLING

4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	COV. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
28	<u>Annexin A6</u>	P08133	97	76168	70	11	9	3	CITOPLASMA	ALTRO
19	<u>Annexin A7</u>	P20073	108	52991	48	14	8	4	SECRETA	TRAFFIKING
7	<u>Apolipoprotein D</u>	P05090	154	21547	22	30	8	5	SECRETA	TRASPORTO
12	<u>Aquaporin-2</u>	P41181	45	29047	34	7	3	2	MEMBRANA	TRASPORTO
10	<u>Azurocidin</u>	P20160	26	27325	30	6	2	1	CITOPLASMA	CHEMOTASSI
6	<u>Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein</u>	P98160	29	479221	19	0	3	2	SECRETA	ADESIONE
24	<i>Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone /FAD-AMP lyase</i>	Q3LXA3	38	59252	58	2	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
21	<u>Brain acid soluble protein 1</u>	P80723	116	22680	52	38	5	4	MEMBRANA	ALTRO
24	<u>Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2</u>	Q9UQB8	40	61115	58	10	6	1	CITOPLASMA	CITOSCHELETRO
16	<i>Brevican core protein</i>	Q96GW7	22	100539	38	0	1	1	SECRETA	ALTRO
18	BRO1 domain-containing protein BROX	Q5VW32	121	46960	45	18	8	5	MEMBRANA	ALTRO
11	<u>Calbindin</u>	P05937	46	30291	28	13	4	2	CITOPLASMA	SIGNALLING
14	<u>Calcium-binding protein 39</u>	Q9Y376	94	40015	38	18	7	4	CITOPLASMA	SIGNALLING
25	<u>Calpain-7</u>	Q9Y6W3	40	93335	60	2	2	1	ALTRO	METABOLISMO
11	Carbonic anhydrase 2	P00918	81	29285	32	15	5	3	CITOPLASMA	ALTRO
11	<u>Carbonyl reductase 1</u>	P16152	43	30641	32	12	3	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
10	<u>Carboxymethylenebutenolidase homolog</u>	Q96DG6	24	28372	30	3	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
8	<u>Cardiotrophin-like cytokine factor 1</u>	Q9UBD9	44	25388	25	3	1	1	SECRETA	SIGNALLING
30	<u>CD2-associated protein</u>	Q9Y5K6	43	71635	80	3	2	1	CITOSCHELETRO	MITOSI
5	<u>CD59 glycoprotein</u>	P13987	54	14795	18	15	2	1	MEMBRANA	SIGNALLING
5	<u>CD9 antigen</u>	P21926	83	25969	18	9	4	3	MEMBRANA	ADESIONE
6	<u>Cell division control protein 42</u>	P60953	33	21696	19	5	3	1	MEMBRANA	CITOSCHELETRO
33	<i>Centrosomal protein of 290 kDa</i>	O15078	27	290892	110	0	1	1	CITOPLASMA	ALTRO
10	<u>Charged multivesicular body protein 1b</u>	Q7LBR1	112	22152	30	13	7	2	ENDOSOMI	TRAFFIKING
11	<u>Charged multivesicular body protein 2a</u>	O43633	81	25088	32	22	9	4	ENDOSOMI	TRAFFIKING

## 4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	COV. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
11	<u>Charged multivesicular body protein 2b</u>	Q9UQN3	48	23948	32	14	3	2	ENDOSOMI	TRAFFIKING
12	<u>Charged multivesicular body protein 4b</u>	Q9H444	148	24935	34	20	5	2	ENDOSOMI	TRAFFIKING
11	<u>Charged multivesicular body protein 5</u>	Q9NZZ3	51	24612	32	7	1	1	ENDOSOMI	TRAFFIKING
11	<u>Chloride intracellular channel protein 1</u>	O00299	40	27248	32	8	2	2	MEMBRANA	TRASPORTO
11	<u>Chloride intracellular channel protein 4</u>	Q9Y696	31	28982	28	7	2	2	MEMBRANA	TRASPORTO
30	<u>Choline transporter-like protein 2</u>	Q8IWA5	40	81610	80	4	5	2	MEMBRANA	TRASPORTO
16	<u>Chromobox protein homolog 2</u>	Q14781	21	56388	40	2	1	1	ALTRO	ALTRO
15	<u>Clusterin</u>	P10909	24	53031	39	2	1	1	SECRETA	IMMUNITA
5	<u>Cofilin-1</u>	P23528	45	18719	18	6	1	1	CITOPLASMA	SIGNALLING
35	<u>Coiled-coil and C2 domain-containing</u>	Q6P1N0	45	104397	140	1	1	1	CITOPLASMA	ALTRO
35	<u>Collagen <math>\alpha</math>-1(VI) chain</u>	P12109	44	109602	140	4	3	2	SECRETA	ADESIONE
8	<u>Collagen <math>\alpha</math>-1(XV) chain</u>	P39059	25	142202	25	0	1	1	SECRETA	ADESIONE
23	<u>Copine-3</u>	O75131	68	60947	58	11	6	4	CITOPLASMA	TRAFFIKING
24	<u>Copine-8</u>	Q86YQ8	34	63638	58	8	5	1	ALTRO	TRAFFIKING
42	<u>Cubilin</u>	O60494	59	407262	>260	2	6	2	ENDOSOMI	TRASPORTO
36	<u>Cullin-associated NEDD8-dissociated</u>	Q86VP6	36	137999	150	1	1	1	ALTRO	ALTRO
3	<u>Cystatin-C</u>	P01034	70	16017	13	19	2	1	SECRETA	METABOLISMO
9	<u>Cytochrome b reductase 1</u>	Q53TN4	32	31735	28	3	1	1	MEMBRANA	TRASPORTO
21	<u>Cytosolic non-specific dipeptidase</u>	Q96KP4	31	53187	52	5	2	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
44	<u>Desmoplakin</u>	P15924	29	334021	>260	0	1	1	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
9	<u>Dihydropteridine reductase</u>	P09417	31	26001	28	4	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
22	<u>Dipeptidase 1</u>	P16444	189	46101	54	24	8	5	MEMBRANA	METABOLISMO
34	<u>Dipeptidyl peptidase 4</u>	P27487	463	88907	120	26	27	15	MEMBRANA	ADESIONE
36	<u>DNA excision repair protein ERCC-6</u>	Q03468	27	169452	150	0	1	1	ALTRO	ALTRO
24	<u>EH domain-containing protein 1</u>	Q9H4M9	84	60646	58	8	4	3	MEMBRANA	TRAFFIKING
25	<u>EH domain-containing protein 4</u>	Q9H223	107	61365	60	10	5	3	MEMBRANA	TRAFFIKING
35	<u>Electrogenic sodium bicarbonate transporter 1</u>	Q9Y6R1	25	122295	140	0	1	1	MEMBRANA	TRASPORTO
19	<u>Elongation factor 1-<math>\alpha</math> 1</u>	P68104	53	50451	48	6	3	3	CITOPLASMA	TRADUZIONE

4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	COV. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
11	<u>Erythrocyte band 7 integral membrane</u>	P27105	59	31882	32	19	5	3	MEMBRANA	ADESIONE
29	<u>Ezrin</u>	P15311	211	69484	75	23	18	8	MEMBRANA	ADESIONE
19	<u>Fidgetin-like protein 1</u>	Q6PIW4	24	74829	48	1	1	1	ALTRO	METABOLISMO
14	<u>Fructose-1,6-bisphosphatase 1</u>	P09467	31	37218	38	4	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
16	Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	41	39851	40	7	2	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
15	Fructose-bisphosphate aldolase B	P05062	63	39961	39	10	4	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
11	<u>Galectin-3</u>	P17931	27	26193	28	7	2	1	CITOPLASMA	ADESIONE
27	Galectin-3-binding protein	Q08380	188	66202	65	18	12	7	SECRETA	ADESIONE
23	<u>Glucose-6-phosphate isomerase</u>	P06744	36	63335	58	5	3	2	CITOPLASMA	METABOLISMO
37	Glutamyl aminopeptidase	Q07075	30	109689	160	3	3	1	MEMBRANA	SIGNALLING
9	<u>Glutathione S-transferase A1</u>	P08263	30	25672	23	19	5	2	CITOPLASMA	DETOX
8	<u>Glutathione S-transferase A2</u>	P09210	74	25648	25	22	7	3	CITOPLASMA	DETOX
8	<u>Glutathione S-transferase Mu 3</u>	P21266	92	26998	25	17	4	4	CITOPLASMA	DETOX
10	<u>Glutathione S-transferase omega-1</u>	P78417	33	27833	30	4	1	1	CITOPLASMA	DETOX
6	<u>Glutathione S-transferase P</u>	P09211	32	23569	19	4	1	1	ALTRO	DETOX
14	<u>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</u>	P04406	118	36201	38	22	7	3	CITOPLASMA	METABOLISMO
15	<u>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase</u>	P21695	27	38171	36	2	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
16	G-protein coupled receptor family C group 5 member B	Q9NZHo	140	45279	40	6	3	3	MEMBRANA	SIGNALLING
19	<u>G-protein coupled receptor family C group 5 member C</u>	Q9NQ84	103	48732	48	7	4	1	MEMBRANA	SIGNALLING
16	<u>Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-1</u>	P63096	73	40905	38	13	5	1	MEMBRANA	SIGNALLING
14	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2	P62879	69	38048	34	16	5	2	MEMBRANA	SIGNALLING
16	<u>Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha</u>	P50148	74	42400	38	3	1	1	MEMBRANA	SIGNALLING
16	<u>Guanine nucleotide-binding protein sub 13</u>	Q14344	48	44364	40	8	3	1	MEMBRANA	SIGNALLING
15	Guanine nucleotidebinding protein sub $\alpha 2$	P04899	86	40995	39	9	3	2	MEMBRANA	SIGNALLING



## 4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	COV. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
14	<i>Guanine nucleotide-binding protein sub <math>\beta_1</math></i>	P62873	29	38151	38	3	1	1	MEMBRANA	SIGNALLING
27	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	P08107	194	70294	65	13	10	3	CITOPLASMA	STRESS
26	<i>Heat shock 70 kDa protein 1-like</i>	P34931	44	70730	63	1	1	1	CITOPLASMA	STRESS
27	Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	292	71082	65	25	14	10	CITOPLASMA	ALTRO
9	Heat shock protein $\beta$ -1	P04792	61	22826	28	14	3	2	CITOPLASMA	STRESS
4	Hemoglobin subunit $\alpha$	P69905	41	15305	16	16	2	1	ALTRO	TRASPORTO
2	<i>Histone H2A type 1-A</i>	Q96QV6	26	14225	10	6	1	1	ALTRO	ALTRO
2	Histone H3.1t	Q16695	37	15613	10	10	2	1	ALTRO	ALTRO
1	<i>Histone H4</i>	P62805	111	11360	8	41	5	3	ALTRO	ALTRO
19	<i>Hsc70-interacting protein</i>	P50502	72	41477	48	6	2	2	CITOPLASMA	FOLDING
8	Ig kappa chain C	P01834	130	11773	25	51	5	3	SECRETA	IMMUNITA
9	<i>Ig kappa chain V-I region Lay</i>	P01605	23	11941	23	8	1	1	SECRETA	IMMUNITA
9	Ig kappa chain V-II region Cum	P01614	54	12782	28	11	2	1	SECRETA	IMMUNITA
9	<i>Ig lambda chain V-I region HA</i>	P01700	39	12003	28	11	1	1	SECRETA	IMMUNITA
10	Ig lambda-2 chain C	P0CG05	155	11458	30	41	7	3	SECRETA	IMMUNITA
29	Ig mu chain C region	P01871	39	49960	75	6	3	1	SECRETA	IMMUNITA
23	Ig $\alpha$ -1 chain C region	P01876	393	38486	58	38	11	10	SECRETA	IMMUNITA
24	Ig $\alpha$ -2 chain C region	P01877	213	37301	58	20	8	1	SECRETA	IMMUNITA
21	Ig $\gamma$ -1 chain C region	P01857	94	36596	52	18	5	3	SECRETA	IMMUNITA
21	Ig $\gamma$ -2 chain C region	P01859	112	36505	52	12	4	3	SECRETA	IMMUNITA
6	Immunoglobulin J chain	P01591	100	18543	19	26	4	3	SECRETA	IMMUNITA
12	<i>Insulin-like growth factor-binding protein</i>	Q16270	28	30138	34	5	1	1	SECRETA	ADESIONE
18	Isocitrate dehydrogenase cytoplasmic	O75874	37	46915	45	7	3	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
18	<i>IST1 homolog</i>	P53990	131	39897	45	20	8	4	VESICOLE	TRAFFIKING
28	<i>Kinesin-like protein KIF12</i>	Q96FN5	29	71813	70	4	3	1	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
23	Kininogen-1	P01042	270	72996	58	17	10	9	SECRETA	ALTRO
14	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	P00338	26	36950	34	3	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
12	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	P07195	260	36900	34	23	8	6	CITOPLASMA	METABOLISMO

4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	COV. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
42	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	P98164	67	540376	>260	1	9	2	MEMBRANA	TRAFFIKING
9	<i>L-xylulose reductase</i>	Q7Z4W1	35	26182	28	4	1	1	MEMBRANA	METABOLISMO
5	<i>Lysosomal protective protein</i>	P10619	59	54944	18	2	1	1	LISOSOMI	ALTRO
32	<i>Lysosome-associated membrane glycoprotein 1</i>	P11279	75	45367	95	4	2	2	LISOSOMI	TRAFFIKING
2	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>	P14174	50	12639	10	17	2	1	SECRETA	IMMUNITA
15	<i>Macrophage-capping protein</i>	P40121	32	38779	39	3	1	1	CITOPLASMA	CITOSCHELETRO
42	<i>Maltase-glucoamylase</i>	O43451	94	211031	>260	4	9	3	MEMBRANA	METABOLISMO
2	<i>Mannan-binding lectin serine protease 2</i>	O00187	116	77224	10	7	6	3	SECRETA	IMMUNITA
23	<i>Mannosyl-oligosaccharide<math>\alpha</math>1,2-mannosidase</i>	P33908	48	73150	58	7	4	1	GOLGI	ALTRO
10	<i>MIT domain-containing protein 1</i>	Q8WV92	67	29638	30	16	4	1	ENDOSOMI	TRASPORTO
28	<i>Moesin</i>	P26038	211	67892	70	13	12	7	MEMBRANA	CITOSCHELETRO
7	<i>Mps one binder kinase activator-like 1A</i>	Q7L9L4	30	25246	22	5	1	1	CITOPLASMA	SIGNALLING
7	<i>Mucin-1</i>	P15941	111	122200	22	1	5	3	MEMBRANA	SIGNALLING
38	<i>Multidrug resistance protein 1</i>	P08183	65	141788	180	4	6	3	MEMBRANA	TRASPORTO
12	<i>Multivesicular body subunit 12A</i>	Q96EY5	56	29107	34	5	1	1	ENDOSOMI	TRAFFIKING
23	<i>Myeloperoxidase</i>	P05164	61	84784	58	2	2	2	LISOSOMI	ALTRO
35	<i>Myosin-Ic</i>	O00159	156	122503	140	8	8	4	CITOPLASMA	CITOSCHELETRO
26	<i>Na/H exchange regulatory cofactor NHE-RF3</i>	Q5T2W1	21	57379	63	7	2	1	MEMBRANA	TRASPORTO
19	<i>N-acetyllactosaminide <math>\beta</math>-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase</i>	O43505	37	47545	48	2	1	1	LISOSOMI	ALTRO
13	<i>Napsin-A</i>	O96009	54	45700	32	4	2	2	SECRETA	ALTRO
35	<i>Nck-associated protein 1</i>	Q9Y2A7	48	130018	140	1	1	1	GOLGI	CITOSCHELETRO
32	<i>Nepriylsin</i>	P08473	151	86144	95	15	12	7	MEMBRANA	SIGNALLING
36	<i>Nesprin-1</i>	Q8NF91	18	101706	170	0	1	1	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
5	<i>Non-secretory ribonuclease</i>	P10153	37	18855	18	8	1	1	LISOSOMI	METABOLISMO
27	<i>Olfactomedin-4</i>	Q6UX06	177	57529	65	11	5	5	SECRETA	ADESIONE
22	<i>Pancreatic <math>\alpha</math>-amylase</i>	P04746	26	58354	54	2	2	1	SECRETA	METABOLISMO

4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	COV. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
3	<u>PDZK1-interacting protein 1</u>	Q13113	51	12333	13	9	1	1	MEMBRANA	ALTRO
12	<u>Peflin</u>	Q9UBV8	46	30646	30	9	5	2	CITOPLASMA	ALTRO
5	<u>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</u>	P62937	85	18229	18	35	9	4	CITOPLASMA	FOLDING
6	<u>Peroxiredoxin-1</u>	Q06830	35	22324	19	20	5	1	CITOPLASMA	DETOX
8	<u>Peroxiredoxin-6</u>	P30041	66	25133	25	17	4	3	CITOPLASMA	DETOX
6	<u>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</u>	P30086	108	21158	19	21	9	4	CITOPLASMA	ALTRO
33	<u>Plasma protease C1 inhibitor</u>	P05155	61	55347	110	9	4	3	SECRETA	IMMUNITA
19	<u>Plasma serine protease inhibitor</u>	P05154	90	45787	48	11	5	4	SECRETA	ALTRO
26	<u>Plastin-1</u>	Q14651	59	70608	63	1	1	1	CITOPLASMA	CITOSCHELETRO
37	<u>Podocalyxin</u>	O00592	175	59055	160	12	7	7	MEMBRANA	ADESIONE
31	<u>Polymeric immunoglobulin receptor</u>	P01833	167	84429	85	9	7	5	MEMBRANA	TRASPORTO
1	<u>Proactivator polypeptide</u>	P07602	97	59899	8	5	3	3	ORGANELLI (liso)	METABOLISMO
19	<u>Probable serine carboxypeptidase CPVL</u>	Q9H3G5	38	54414	48	1	1	1	ALTRO	ALTRO
31	<u>Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3</u>	Q9NQH7	25	57624	85	1	1	1	ORGANELLI (mito)	ALTRO
33	<u>Pro-epidermal growth factor</u>	P01133	154	137613	110	5	7	4	MEMBRANA	SIGNALLING
3	<u>Profilin-1</u>	P07737	30	15216	13	47	6	4	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
32	<u>Programmed cell death 6-interacting prote</u>	Q8WUM4	271	96590	95	22	14	10	CITOPLASMA	TRAFFIKING
9	<u>Programmed cell death protein 10</u>	Q9BUL8	34	24686	28	14	3	2	MEMBRANA	SIGNALLING
5	<u>Programmed cell death protein 6</u>	O75340	57	21912	18	16	6	3	MEMBRANA	SIGNALLING
4	<u>Prolactin-inducible protein</u>	P12273	33	16847	16	17	2	1	SECRETA	ALTRO
35	<u>Prominin-1</u>	O43490	224	98395	140	15	12	7	MEMBRANA	ALTRO
34	<u>Prominin-2</u>	Q8N271	54	93079	120	2	2	1	MEMBRANA	ALTRO
15	<u>Prostasin</u>	Q16651	71	37093	39	6	2	2	MEMBRANA	ALTRO
6	<u>Prostate stem cell antigen</u>	O43653	33	13474	19	8	1	1	MEMBRANA	SIGNALLING
16	<u>Prostatic acid phosphatase</u>	P15309	40	44880	38	4	1	1	SECRETA	METABOLISMO
12	<u>Protein AMBP</u>	P02760	181	39886	34	14	6	3	SECRETA	ADESIONE
11	<u>Protein MAL2</u>	Q969L2	51	19341	32	6	1	1	MEMBRANA	TRASPORTO
1	<u>Protein S100-A6</u>	P06703	33	10230	8	8	1	1	CITOPLASMA	SIGNALLING

## 4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	COV. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
1	Protein S100-A8	P05109	274	10885	8	52	14	5	CITOPLASMA	ALTRO
3	Protein S100-A9	P06702	82	13291	13	50	7	3	CITOPLASMA	ALTRO
29	Protein-glutamine $\gamma$ -glutamyltransferase 4	P49221	84	77951	75	5	3	3	ALTRO	ALTRO
30	Proton-coupled amino acid transporter 2	Q495M3	37	53809	80	3	3	1	MEMBRANA	TRASPORTO
23	Proto-oncogene tyrosine-kinase Src	P12931	33	60310	58	5	3	1	MEMBRANA	SIGNALLING
14	<i>Putative beta-actin-like protein 3</i>	Q9BYX7	42	42331	34	3	1	1	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
24	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	P14618	60	58470	58	12	6	3	CITOPLASMA	METABOLISMO
29	<u>Radixin</u>	P35241	100	68635	75	11	9	1	MEMBRANA	CITOSCHELETRO
6	<u>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2</u>	P15153	36	21814	19	5	1	1	CITOPLASMA	SIGNALLING
7	<u>Ras-related protein Rab-10</u>	P61026	92	22755	22	24	5	3	MEMBRANA	TRAFFIKING
7	Ras-related protein Rab-11A	P62491	71	24492	22	18	4	2	MEMBRANA	TRAFFIKING
8	<u>Ras-related protein Rab-11B</u>	Q15907	53	24588	25	24	5	2	MEMBRANA	TRAFFIKING
7	<u>Ras-related protein Rab-1A</u>	P62820	78	22891	19	18	4	2	GOLGI	TRASPORTO
6	<u>Ras-related protein Rab-2A</u>	P61019	36	23702	19	6	1	1	VESICOLE	TRAFFIKING
9	<u>Ras-related protein Rab-3A</u>	P20336	53	25196	28	10	2	2	MEMBRANA	TRAFFIKING
9	<u>Ras-related protein Rab-5B</u>	P61020	47	23920	28	11	2	1	MEMBRANA	TRAFFIKING
8	<u>Ras-related protein Rab-5C</u>	P51148	145	23696	25	28	5	4	MEMBRANA	TRAFFIKING
6	<u>Ras-related protein Rab-7a</u>	P51149	21	23760	19	18	5	1	MEMBRANA	TRAFFIKING
6	<u>Ras-related protein Rab-8B</u>	Q92930	45	23740	19	11	2	2	MEMBRANA	TRAFFIKING
8	<u>Ras-related protein Ral-A</u>	P11233	47	23723	25	16	3	2	MEMBRANA	SIGNALLING
9	Ras-related protein Ral-B	P11234	53	23508	28	19	5	3	MEMBRANA	SIGNALLING
6	<u>Ras-related protein Rap-1A</u>	P62834	63	21316	19	12	2	1	MEMBRANA	SIGNALLING
9	<u>Ras-related protein R-Ras2</u>	P62070	42	23613	23	5	1	1	MEMBRANA	SIGNALLING
4	Retinol-binding protein 5	P82980	39	16092	16	13	2	1	CITOPLASMA	TRASPORTO
5	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 10-like protein</i>	Q9HCE6	26	141873	16	0	1	1	CITOPLASMA	SIGNALLING
19	<u>Ribonuclease inhibitor</u>	P13489	28	51766	48	2	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
21	Selenium-binding protein 1	Q13228	43	52928	52	4	2	1	CITOPLASMA	TRASPORTO

4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	COV. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
8	<u>Semenogelin-1</u>	P04279	44	52157	25	4	2	1	SECRETA	ALTRO
5	Semenogelin-2	Q02383	27	65519	18	5	3	1	SECRETA	ALTRO
26	<u>Serum albumin</u>	P02768	630	66170	63	40	27	21	SECRETA	TRASPORTO
37	Solute carrier family 12 member 1	Q13621	122	122627	160	6	7	6	MEMBRANA	TRASPORTO
35	Solute carrier family 12 member 3	P55017	70	114193	140	3	3	3	MEMBRANA	TRASPORTO
30	<i>Solute carrier family 22 member 2</i>	O15244	30	63265	80	1	1	1	MEMBRANA	TRASPORTO
27	<i>Solute carrier family 23 member 1</i>	Q9UHL7	27	65644	65	1	1	1	MEMBRANA	TRASPORTO
15	Sorbitol dehydrogenase	Q00796	33	38927	39	4	2	1	MITOCONDRI	METABOLISMO
12	Syntenin-1	O00560	246	32595	34	27	12	5	CITOSCHELETRO	ADESIONE
12	<u>Tetraspanin-1</u>	O60635	68	26910	34	5	1	1	MEMBRANA	SIGNALLING
41	<u>THAP domain-containing protein 4</u>	Q8WY91	23	63535	260	1	2	1	ALTRO	ALTRO
2	Thioredoxin	P10599	83	12015	10	31	4	3	CITOPLASMA	ALTRO
12	<u>Thy-1 membrane glycoprotein</u>	P04216	117	18151	34	14	4	2	MEMBRANA	SIGNALLING
36	<u>Thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme</u>	Q9UKU6	24	117439	150	0	1	1	MEMBRANA	SIGNALLING
12	Toll-interacting protein	Q9H0E2	78	30490	34	9	3	2	CITOPLASMA	IMMUNITA
5	Transforming protein RhoA	P61586	26	22096	18	3	2	1	MEMBRANA	SIGNALLING
8	<i>Transmembrane protease serine 2</i>	O15393	39	55079	25	1	1	1	MEMBRANA	ALTRO
5	Transmembrane protein C19orf77	O75264	53	15012	18	26	2	2	MEMBRANA	ALTRO
9	<u>Triosephosphate isomerase</u>	P60174	111	26938	28	26	6	5	ALTRO	METABOLISMO
16	<u>Tripeptidyl-peptidase 1</u>	O14773	69	61723	38	4	2	2	LISOSOMI	METABOLISMO
2	<i>Tubulin polyglutamylase TTL7</i>	Q6ZT98	32	103846	11	1	1	1	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
19	<u>Tumor susceptibility gene 101 protein</u>	Q99816	59	44088	48	12	4	3	MEMBRANA	TRAFFIKING
22	<i>Tyrosine-protein kinase FRK</i>	P42685	30	58673	54	1	1	1	CITOPLASMA	ALTRO
20	<u>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3</u>	Q8IX04	29	52516	50	4	2	1	ALTRO	METABOLISMO
4	<i>UPFo467 protein C5orf32</i>	Q9H1C7	26	10966	16	10	1	1	ALTRO	ALTRO
31	<u>Uromodulin</u>	P07911	1753	72451	85	30	76	18	MEMBRANA	ALTRO
7	Uroplakin-1a	O00322	32	29429	22	17	4	1	MEMBRANA	ALTRO

## 4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	COV. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
2	<u>Uroplakin-2</u>	O00526	83	19540	10	24	7	3	MEMBRANA	ALTRO
7	<u>Vacuolar sorting-associated protein 28</u>	Q9UK41	65	25694	22	8	3	2	MEMBRANA	TRAFFIKING
11	<u>Vacuolar sorting-associated protein 37D</u>	Q86XT2	82	27941	32	14	3	3	ENDOSOMI	TRAFFIKING
21	<u>Vacuolar sorting-associated protein 4A</u>	Q9UN37	77	49152	52	17	8	4	ENDOSOMI	TRAFFIKING
21	<u>Vacuolar sorting-associated protein 4B</u>	O75351	218	49443	52	28	13	9	ENDOSOMI	TRAFFIKING
14	<u>Vacuolar sorting-associated protein VTA1 homolog</u>	Q9NP79	39	34143	38	9	3	2	ENDOSOMI	TRAFFIKING
2	<u>Vesicle-associated membrane protein 8</u>	Q9BV40	36	11488	10	19	2	1	MEMBRANA	TRAFFIKING
11	<u>Vesicular integral-membrane VIP36</u>	Q12907	27	40545	28	2	1	1	GOLGI	VESICOLE
25	<u>Vitamin K-dependent protein Z</u>	P22891	26	46026	60	4	2	1	SECRETA	ALTRO
27	<u>V-type proton ATPase catalytic subunit A</u>	P38606	30	68660	65	5	3	1	ORGANELLI	TRASPORTO
22	<u>V-type proton ATPase subunit B, brain</u>	P21281	24	56807	54	5	2	1	ORGANELLI	TRASPORTO
21	<u>V-type proton ATPase subunit B, kidney isoform</u>	P15313	26	57196	52	2	1	1	ORGANELLI	TRASPORTO
16	<u>V-type proton ATPase subunit C 1</u>	P21283	21	44085	40	2	1	1	ORGANELLI	TRASPORTO
35	<u>WASH complex subunit strumpellin</u>	Q12768	34	135113	140	0	1	1	ENDOSOMI	TRAFFIKING
23	<u>WD repeat-containing protein 1</u>	O75083	23	66836	58	1	1	1	CITOPLASMA	CITOSCHELETRO
30	<u>Xaa-Pro aminopeptidase 2</u>	O43895	32	76090	80	10	8	2	MEMBRANA	INFIAMMAZIONE
21	<u>Xaa-Pro dipeptidase</u>	P12955	25	55311	52	2	1	1	MEMBRANA	METABOLISMO
23	<u><math>\alpha</math>-1-antichymotrypsin</u>	P01011	33	47792	58	2	1	1	SECRETA	INFIAMMAZIONE
19	<u><math>\alpha</math>-enolase</u>	P06733	75	47481	48	21	9	5	MEMBRANA	METABOLISMO
29	<u><math>\alpha</math>-N-acetylglucosaminidase</u>	P54802	30	82571	75	1	1	1	LISOSOMI	METABOLISMO
23	<u><math>\beta</math>-galactosidase</u>	P16278	373	76483	58	21	13	9	CITOPLASMA	METABOLISMO
18	<u><math>\beta</math>-ine homocysteine S-methyltransferase 1</u>	Q93088	30	45426	45	1	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
16	<u><math>\gamma</math>-butyrobetaine dioxygenase</u>	O75936	32	45200	40	2	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
25	<u><math>\gamma</math>-glutamyltranspeptidase 1</u>	P19440	86	61714	60	6	4	3	MEMBRANA	METABOLISMO

Tabella 6b. Elenco delle proteine identificate mediante LC-ESI-MS/MS nel pool di exosomi urinari RCC.

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	CO V. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
10	<u>14-3-3 protein <math>\beta/\alpha</math></u>	P31946	25	28179	30	16	4	1	CITOPLASMA	SIGNALLING
22	<u>1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase <math>\alpha</math></u>	Q99943	32	32038	54	3	1	1	MEMBRANA	METABOLISMO
10	6-phosphogluconolactonase	O95336	123	27815	30	39	8	4	CITOPLASMA	METABOLISMO
7	<u>Abhydrolase domain-containing protein 14B</u>	Q961U4	47	22446	22	10	3	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
14	<u>Acid ceramidase</u>	Q13510	67	45087	38	4	2	2	LISOSOMI	METABOLISMO
16	<u>Actin</u>	P60709	309	42052	40	31	13	8	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
5	<u>Actin-related protein 2/3 complex subunit 4</u>	P59998	27	19768	18	11	2	1	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
5	<u>ADP-ribosylation factor 1</u>	P84077	41	20741	18	6	1	1	GOLGI	TRAFFIKING
6	<u>ADP-ribosylation factor-like protein 3</u>	P36405	50	20614	19	6	1	1	CITOSCHELETRO	CITOSCHELETRO
18	<u>Aminoacylase-1</u>	Q03154	69	46084	45	9	4	2	CITOPLASMA	METABOLISMO
37	<u>Aminopeptidase N</u>	P15144	790	109870	160	25	38	18	MEMBRANA	METABOLISMO
39	<u>Angiotensin-converting enzyme</u>	P12821	44	150418	200	1	2	2	MEMBRANA	METABOLISMO
24	<u>Angiotensinogen</u>	P01019	22	53406	58	3	1	1	SECRETA	SIGNALLING
14	<u>Annexin A2</u>	P07355	46	38808	38	8	3	3	MEMBRANA	TRAFFIKING
14	<u>Annexin A3</u>	P12429	35	36524	38	2	1	1	SECRETA	INFIAMMAZIONE
12	<u>Annexin A5</u>	P08758	44	35971	34	8	3	2	CITOPLASMA	SIGNALLING
22	<u>Antithrombin-III</u>	P01008	41	53025	54	2	1	1	SECRETA	ALTRO
8	<u>Apolipoprotein A-I</u>	P02647	71	30759	25	20	6	2	SECRETA	TRASPORTO
7	<u>Apolipoprotein D</u>	P05090	184	21547	22	34	10	6	SECRETA	TRASPORTO
17	<u>Aspartate aminotransferase</u>	P17174	23	46447	43	3	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
24	<u>Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase</u>	Q3LXA3	32	59252	58	2	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
34	<u>Bile salt-activated lipase</u>	P19835	29	79614	120	1	1	1	SECRETA	METABOLISMO
18	<u>BRO1 domain-containing protein BROX</u>	Q5VW32	41	46960	45	7	3	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
15	<u>Calcium-binding protein 39</u>	Q9Y376	19		39	1	1	1	CITOPLASMA	SIGNALLING

## 4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	CO V. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
11	Carbonic anhydrase 1	P00915	21	28909	32	11	3	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
11	Carbonic anhydrase 2	P00918	61	29285	32	15	4	3	CITOPLASMA	ALTRO
11	<u>Carbonyl reductase 1</u>	P16152	25	30641	32	9	3	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
28	Cardiotrophin-like cytokine factor 1	Q9UBD9	27	25388	70	3	1	1	SECRETA	SIGNALLING
18	Cathepsin	P07339	35	45037	45	11	5	1	LISOSOMI	ALTRO
4	<u>CD59 glycoprotein</u>	P13987	25	14795	16	15	2	1	MEMBRANA	SIGNALLING
5	<u>CD9 antigen</u>	P21926	87	25969	18	9	4	2	MEMBRANA	ADESIONE
6	<u>Cell division control protein 42</u>	P60953	24	21696	19	11	3	1	MEMBRANA	CITOSCHELETRO
37	Ceruloplasmin	P00450	274	122983	160	14	15	7	SECRETA	TRASPORTO
11	<i>Charged multivesicular body protein 2b</i>	Q9UQN3	32	23948	32	4	1	1	ENDOSOMI	TRAFFIKING
11	<u>Chloride intracellular channel protein 1</u>	O00299	37	27248	32	8	2	1	MEMBRANA	TRASPORTO
30	Choline transporter-like protein 2	Q8IWA5	24	81610	80	2	2	1	MEMBRANA	TRASPORTO
18	<u>Chondroitin sulfate proteoglycan 4</u>	Q6UVK1	95	251067	45	1	3	3	MEMBRANA	SIGNALLING
14	<u>Clusterin</u>	P10909	54	53031	38	11	5	2	SECRETA	IMMUNITA
37	Collagen $\alpha$ -1(VI) chain	P12109	314	109602	160	10	10	7	SECRETA	ADESIONE
10	Collagen $\alpha$ -1(XV) chain	P39059	41	142202	30	2	3	2	SECRETA	ADESIONE
7	Collagen $\alpha$ -3(VI) chain	P12111	44	345167	22	0	2	1	SECRETA	ADESIONE
35	Complement C3	P01024	231	188569	140	14	26	11	SECRETA	IMMUNITA
28	Complement C4-A	P0CoL4	52	194247	70	5	11	3	SECRETA	IMMUNITA
27	Complement component C9	P02748	32	64615	65	3	2	2	MEMBRANA	IMMUNITA
42	<u>Cubilin</u>	O60494	43	407262	>260	1	6	2	ENDOSOMI	TRASPORTO
3	Cystatin-C	P01034	38	16017	13	7	1	1	SECRETA	METABOLISMO
7	Cytochrome b561	P49447	24	27713	22	3	1	1	MEMBRANA	TRASPORTO
21	<u>Cytosolic non-specific dipeptidase</u>	Q96KP4	48	53187	52	6	2	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
9	Dapper homolog 1	Q9NYF0	31	91145	28	0	1	1	CITOPLASMA	SIGNALLING
14	Deoxyribonuclease-1	P24855	86	31642	38	11	3	3	SECRETA	ALTRO
23	<u>Dickkopf-related protein 4</u>	Q9UBT3	14	26057	58	5	1	1	SECRETA	SIGNALLING
21	<u>Dipeptidase 1</u>	P16444	69	46101	52	4	2	1	MEMBRANA	METABOLISMO



## 4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	CO V. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
22	Dipeptidyl peptidase 2	Q9UHL4	19	54763	54	5	2	1	LISOSOMI	METABOLISMO
34	Dipeptidyl peptidase 4	P27487	132	88907	120	9	9	6	MEMBRANA	ADESIONE
15	<i>Endothelial protein C receptor</i>	Q9UNN8	66	26997	39	3	1	1	MEMBRANA	IMMUNITA
17	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	P27105	114	31882	28	13	3	3	MEMBRANA	ADESIONE
8	<i>Eukaryotic translation initiation factor 6</i>	P56537	35	27095	25	4	1	1	CITOPLASMA	ALTRO
29	Ezrin	P15311	70	69484	75	9	6	4	MEMBRANA	ADESIONE
14	<i>F-actin-capping protein subunit <math>\alpha</math>-1</i>	P52907	51	33073	38	3	1	1	CITOPLASMA	CITOSCHELETRO
22	Fibrinogen $\beta$ chain	P02675	36	56577	54	13	6	2	SECRETA	ALTRO
19	<i>Fibrinogen <math>\gamma</math> chain</i>	P02679	31	52106	48	1	1	1	SECRETA	ALTRO
16	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	P04075	44	39851	38	3	1	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
15	<i>Fructose-bisphosphate aldolase B</i>	P05062	87	39961	39	7	2	2	CITOPLASMA	METABOLISMO
27	Galectin-3-binding protein	Q08380	33	66202	65	4	2	1	SECRETA	ADESIONE
5	<i>Ganglioside GM2 activator</i>	P17900	51	21281	18	5	1	1	LISOSOMI	ALTRO
36	Glutamyl aminopeptidase	Q07075	36	109689	150	1	2	1	MEMBRANA	SIGNALLING
8	<i>Glutathione S-transferase A1</i>	P08263	23	25672	25	7	2	1	CITOPLASMA	DETOX
8	<i>Glutathione S-transferase Mu 3</i>	P21266	34	26998	25	8	2	1	CITOPLASMA	DETOX
15	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	46	36201	39	17	5	2	CITOPLASMA	METABOLISMO
16	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit $\alpha$ -1	P63096	80	40905	38	5	2	1	MEMBRANA	SIGNALLING
14	Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(t) subunit $\beta$ -1	P62873	79	38151	38	16	5	4	MEMBRANA	SIGNALLING
15	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit <math>\alpha</math></i>	P50148	59	42400	39	3	1	1	MEMBRANA	SIGNALLING
15	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit $\alpha$ isoforms XLas	Q5JWF2	79	43268	39	1	2	1	MEMBRANA	SIGNALLING
4	Haptoglobin	P00738	34	45861	16	6	2	1	SECRETA	ALTRO
27	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	P08107	61	70294	65	13	7	2	CITOPLASMA	STRESS
28	Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	87	71082	70	15	8	3	CITOPLASMA	ALTRO

4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	CO V. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
8	<i>Heat shock protein <math>\beta</math>-1</i>	P04792	32	22826	25	4	1	1	CITOPLASMA	FOLDING
27	Heat shock-related 70 kDa protein 2	P54652	56	70263	65	12	6	1	ALTRO	STRESS
4	Hemoglobin subunit $\alpha$	P69905	141	15305	16	61	8	2	ALTRO	TRASPORTO
4	Hemoglobin subunit $\beta$	P68871	72	16102	16	31	3	2	ALTRO	TRASPORTO
25	Hemopexin	P02790	24	52385	60	2	1	1	SECRETA	ALTRO
20	Ig gamma-3 chain C region	P01860	89	42287	48	10	4	4	SECRETA	IMMUNITA
21	Ig heavy chain V-III region TIL	P01765	85	12462	52	16	2	1	SECRETA	IMMUNITA
21	Ig heavy chain V-III region VH26	P01764	54	12745	50	18	2	1	SECRETA	IMMUNITA
8	Ig kappa chain C	P01834	389	11773	25	68	13	5	SECRETA	IMMUNITA
8	<i>Ig kappa chain V-I region Lay</i>	P01605	45	11941	25	8	1	1	SECRETA	IMMUNITA
9	<i>Ig kappa chain V-II region Cum</i>	P01614	87	12782	28	11	1	1	SECRETA	IMMUNITA
8	Ig kappa chain V-III region SIE	P01620	100	11882	25	24	3	2	SECRETA	IMMUNITA
8	<i>Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)</i>	P04433	38	12681	25	7	1	1	SECRETA	IMMUNITA
9	<i>Ig kappa chain V-IV region (Fragment)</i>	P06312	49	13486	28	7	1	1	SECRETA	IMMUNITA
8	Ig kappa chain V-IV region Len	P01625	39	12746	25	23	2	1	SECRETA	IMMUNITA
9	<i>Ig lambda chain V-I region HA</i>	P01700	51	12003	28	11	1	1	SECRETA	IMMUNITA
8	<i>Ig lambda chain V-III region LOI</i>	P80748	33	12042	25	14	1	1	SECRETA	IMMUNITA
9	Ig lambda-2 chain C regions	P0CG05	326	11458	28	63	13	3	SECRETA	IMMUNITA
29	Ig mu chain C region	P01871	67	49960	75	16	7	3	SECRETA	IMMUNITA
23	Ig $\alpha$ -1 chain C	P01876	533	38486	58	38	14	10	SECRETA	IMMUNITA
23	Ig $\alpha$ -2 chain C	P01877	361	37301	58	25	10	7	SECRETA	IMMUNITA
21	Ig $\gamma$ -1 chain C	P01857	472	36596	52	54	16	12	SECRETA	IMMUNITA
21	Ig $\gamma$ -2 chain C region	P01859	359	36505	52	38	13	9	SECRETA	IMMUNITA
6	Immunoglobulin J	P01591	108	18543	19	13	3	3	SECRETA	IMMUNITA
15	<i>Integrator complex subunit 4-like protein 1</i>	Q96LV5	24	49382	36	1	1	1	ALTRO	ALTRO
14	<i>Inter-<math>\alpha</math>-trypsin inhibitor heavy chain H4</i>	Q14624	132	103521	38	4	4	1	SECRETA	INFIAMMAZIONE
18	<i>Isocitrate dehydrogenase cytoplasmic</i>	O75874	33	46915	45	13	5	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
18	IST1 homolog	P53990	59	39897	45	13	5	3	VESICOLE	TRAFFIKING

4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	CO V. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
22	<u>Kininogen-1</u>	P01042	254	72996	54	12	8	8	SECRETA	ALTRO
19	<u>Leucine-rich <math>\alpha</math>-2-glycoprotein</u>	P02750	72	38382	48	10	4	3	SECRETA	ALTRO
14	<u>L-lactate dehydrogenase A</u>	P00338	30	36900	34	6	2	1	CITOPLASMA	METABOLISMO
12	<u>L-lactate dehydrogenase B chain</u>	P07195	166	36900	34	17	6	4	CITOPLASMA	METABOLISMO
44	<u>Low-density lipoprotein receptor-related protein 2</u>	P98164	79	540376	>260	1	7	4	MEMBRANA	TRAFFIKING
9	<u>L-xylulose reductase</u>	Q7Z4W1	30	26182	28	8	2	1	MEMBRANA	METABOLISMO
19	<u>Lysosomal acid phosphatase</u>	P11117	115	48713	48	12	6	4	LISOSOMI	METABOLISMO
2	<u>Macrophage migration inhibitory factor</u>	P14174	49	12639	10	17	2	1	SECRETA	IMMUNITA
5	<u>Mannan-binding lectin serine protease 2</u>	O00187	68	77224	18	8	9	5	SECRETA	IMMUNITA
23	Mannosyl-oligosaccharide 1,2- $\alpha$ -mannosidase IA	P33908	61	73150	58	4	2	1	GOGLI	ALTRO
28	Moesin	P26038	51	67892	70	6	5	2	MEMBRANA	CITOSCHELETRO
19	<u>Monocyte differentiation antigen CD14</u>	P08571	30	40678	48	7	3	1	MEMBRANA	IMMUNITA
7	<i>Mps one binder kinase activator-like 1A</i>	Q7L9L4	24	25246	22	5	1	1	CITOPLASMA	SIGNALLING
8	<u>Mucin-1</u>	P15941	97	122200	25	6	6	5	MEMBRANA	SIGNALLING
5	<u>Multimerin-2</u>	Q9H8L6	38	105028	18	0	1	1	SECRETA	ALTRO
15	<i>N-acetylgalactosamine-6-sulfatase</i>	P34059	26	58445	39	1	1	1	LISOSOMI	METABOLISMO
19	N-acetyllactosaminide acetylglucosaminyltransferase $\beta$ -1,3-N-	O43505	44	47545	48	3	2	2	LISOSOMI	ALTRO
14	<u>Napsin-A</u>	O96009	37	45700	38	4	2	1	SECRETA	ALTRO
2	<i>Nuclear transport factor 2</i>	P61970	34	14640	10	6	1	1	CITOPLASMA	TRASPORTO
27	<u>Olfactomedin-4</u>	Q6UX06	112	57529	65	13	8	3	SECRETA	ADESIONE
21	Pancreatic $\alpha$ -amylase	P04746	179	58354	52	21	10	5	SECRETA	METABOLISMO
16	<u>Pepsin A</u>	P00790	43	42350	40	4	2	1	SECRETA	METABOLISMO
9	<u>Peptidoglycan recognition protein 1</u>	O75594	73	22116	28	12	3	2	SECRETA	IMMUNITA
5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	50	18229	18	18	3	2	CITOPLASMA	FOLDING
6	<u>Peroxiredoxin-2</u>	Q06830	46	22049	19	9	2	1	CITOPLASMA	DETOX

4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	CO V. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
8	<u>Peroxiredoxin-6</u>	P30041	70	25133	25	8	2	2	CITOPLASMA	DETOX
18	<u>Phosphoglycerate kinase 1</u>	P00558	28	44985	45	11	6	3	CITOPLASMA	METABOLISMO
31	Plasma protease C1 inhibitor	P05155	85	55347	85	7	4	4	SECRETA	IMMUNITA
20	Plasma serine protease inhibitor	P05154	147	45787	50	16	7	4	SECRETA	ALTRO
27	<u>Plastin-1</u>	Q14651	23	70608	65	1	1	1	CITOPLASMA	CITOSCHELETRO
37	<u>Podocalyxin</u>	O00592	33	59055	160	8	4	2	MEMBRANA	ADESIONE
31	<u>Polymeric immunoglobulin receptor</u>	P01833	266	84429	85	16	10	9	MEMBRANA	TRASPORTO
11	<u>Probable serine carboxypeptidase CPVL</u>	Q9H3G5	27	54414	32	7	4	1	ALTRO	ALTRO
37	<u>Pro-epidermal growth factor</u>	P01133	750	137613	160	22	33	19	MEMBRANA	SIGNALLING
32	<u>Programmed cell death 6-interacting protein</u>	Q8WUM4	50	96590	95	3	3	2	CITOPLASMA	TRAFFIKING
6	<u>Programmed cell death protein 6</u>	O75340	42	21912	19	5	1	1	MEMBRANA	SIGNALLING
34	<u>Prominin-1</u>	O43490	17	98395	120	2	2	1	MEMBRANA	ALTRO
34	<u>Prominin-2</u>	Q8N271	50	93079	120	2	2	2	MEMBRANA	ALTRO
15	<u>Prostasin</u>	Q16651	33	37093	39	4	1	1	MEMBRANA	ALTRO
5	<u>Prostate stem cell antigen</u>	O43653	28	13474	18	8	1	1	MEMBRANA	SIGNALLING
6	<u>Prostate-specific antigen</u>	P07288	27	29293	19	4	1	1	SECRETA	METABOLISMO
21	Prostatic acid phosphatase	P15309	115	44880	52	15	5	4	LISOSOMI	ALTRO
12	<u>Protein AMBP</u>	P02760	88	39886	34	13	4	4	SECRETA	ADESIONE
35	<u>Protein archease</u>	Q8IWT0	35	19535	150	4	2	1	ALTRO	ALTRO
1	<u>Protein S100-A8</u>	P05109	135	10885	8	38	6	3	CITOPLASMA	ALTRO
26	Protein-glutamine $\gamma$ -glutamyltransferase 4	P49221	41	77951	75	7	4	2	ALTRO	ALTRO
6	<u>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</u>	P63000	25	21835	19	9	2	1	MEMBRANA	SIGNALLING
7	<u>Ras-related protein Rab-1A</u>	P62820	66	22891	22	5	2	1	GOLGI	TRASPORTO
9	<u>Ras-related protein Rab-5A</u>	P20339	23	23872	23	5	1	1	MEMBRANA	TRAFFIKING
8	<u>Ras-related protein Ral-A</u>	P11233	41	23723	25	3	1	1	MEMBRANA	SIGNALLING
23	<u>Receptor activity-modifying protein 2</u>	O60895	21	19880	56	4	1	1	MEMBRANA	TRASPORTO
10	<u>Retinoid-inducible serine carboxypeptidase</u>	Q9HB40	48	51083	30	2	1	1	SECRETA	ALTRO
9	<u>Retinoid-inducible serine carboxypeptidase</u>	Q9HB40	31	51083	23	2	1	1	SECRETA	ALTRO

4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	CO V. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
40	Serotransferrin	P02787	349	79280	80	30	19	11	SECRETA	TRASPORTO
18	Serpin B3	P29508	103	44594	43	12	5	4	CITOPLASMA	IMMUNITA
26	<u>Serum albumin</u>	P02768	592	71317	63	43	30	20	SECRETA	TRASPORTO
8	Serum amyloid P-component	P02743	37	25485	25	14	3	2	SECRETA	FOLDING
37	Solute carrier family 12 member 1	Q13621	62	122627	160	2	2	2	MEMBRANA	TRASPORTO
15	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>	Q00796	26	38927	39	2	1	1	MITOCONDRI	METABOLISMO
12	<u>Syntenin-1</u>	O00560	27	32595	34	15	6	1	MEMBRANA	ADESIONE
24	<i>Thy-1 membrane glycoprotein</i>	P04216	36	18151	32	6	1	1	MEMBRANA	SIGNALLING
30	<i>Thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme</i>	Q9UKU6	23	117439	160	0	1	1	MEMBRANA	SIGNALLING
29	<i>Thyroxine-binding globulin</i>	P05543	21	46637	58	3	1	1	SECRETA	TRASPORTO
9	<i>TIR domain-containing adapter molecule 1</i>	Q8IUC6	17	77343	63	1	1	1	MEMBRANA	IMMUNITA
20	Tissue alpha-L-fucosidase	P04066	25	53940	48	4	2	1	LISOSOMI	METABOLISMO
11	<i>Transmembrane protein 44</i>	Q2T9K0	21	53061	220	1	1	1	MEMBRANA	ALTRO
37	Transthyretin	P02766	48	15991	13	9	2	1	SECRETA	TRASPORTO
16	<i>Tripeptidyl-peptidase 1</i>	O14773	56	61723	38	2	1	1	LISOSOMI	METABOLISMO
20	<u>Tumor susceptibility gene 101 protein</u>	Q99816	52	44088	48	6	2	1	MEMBRANA	METABOLISMO
3	UPF0467 protein C5orf32	Q9H1C7	60	10966	13	11	2	1	ALTRO	ALTRO
3	Uromodulin	P07911	1661	72451	95	30	81	16	MEMBRANA	ALTRO
27	<u>Vacuolar protein sorting-associated 4B</u>	O75351	38	49443	52	4	1	1	ENDOSOMI	TRAFFIKING
32	<u>Vasorin</u>	Q6EMK4	72	72751	75	6	4	3	MEMBRANA	SIGNALLING
12	<u>Vesicular integral-membrane protein VIP36</u>	Q12907	33	40545	34	5	2	2	ENDOSOMI	TRAFFIKING
29	<u>V-type proton ATPase catalytic subunit A</u>	P38606	39	68660	65	1	1	1	ORGANELLI	TRASPORTO
23	$\alpha$ -1-antichymotrypsin	P01011	192	47792	58	13	6	4	SECRETA	ALTRO
22	$\alpha$ -1-antitrypsin	P01009	354	46878	54	33	17	11	SECRETA	INFIAMMAZIONE
39	$\alpha$ -2-macroglobulin	P01023	226	164613	200	9	12	7	SECRETA	ALTRO
19	<u><math>\alpha</math>-enolase</u>	P06733	95	47481	48	9	4	3	MEMBRANA	METABOLISMO
30	$\alpha$ -N-acetylglucosaminidase	P54802	31	82571	80	2	2	1	LISOSOMI	METABOLISMO

4. Risultati e Discussione

BANDA #	NOME	ACC. CODE	SCORE	MASSA (Da)	MASSA TEORICA (Da)	CO V. (%)	PEP. M.	PEP. I.	LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE	FUNZIONE
23	$\beta$ -galactosidase	P16278	122	76483	58	11	7	3	CITOPLASMA	METABOLISMO
18	<u><math>\beta</math>ine-homocysteine S-methyltransferase 1</u>	Q93088	57	45426	45	12	5	2	CITOPLASMA	METABOLISMO
25	<u><math>\gamma</math>-glutamyltranspeptidase 1</u>	P19440	22	61714	60	3	2	1	MEMBRANA	METABOLISMO

Legenda:

- Le proteine identificate sono elencate in ordine alfabetico.
- Le proteine evidenziate in grigio sono state identificate solo negli exosomi urinari CTRL (Tab. 6a) oppure solo negli exosomi RCC (Tab. 6b).
- Le proteine sottolineate sono già state identificate come proteine degli exosomi urinari (Exocarta).
- Le proteine in corsivo sono identificate secondo un criterio meno stringente (solo un peptide identico invece di minimo due).
- Cov (%): copertura di sequenza in percentuale
- PEP. M.: peptidi matched
- PEP. I.: peptidi identici

Successivamente all'identificazione, di ogni proteina sono state ricercate la localizzazione subcellulare e la funzione mediante il database UniProtKB di ExPASy.

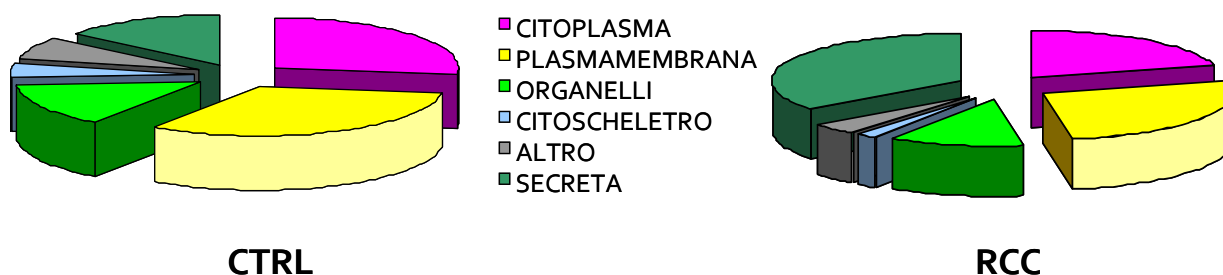


Figura 30. Localizzazione subcellulare delle proteine identificate negli exosomi urinari controllo (CTRL) e dei pazienti affetti da carcinoma renale (RCC) basata su UniProtKB.

La figura 30 evidenzia la presenza, sia nel pool di exosomi urinari dei soggetti controllo sia nel pool dei pazienti RCC, di un'elevata percentuale di proteine della membrana plasmatica e del citoplasma. L'abbondanza di queste due classi proteiche, non statisticamente differente fra soggetti controllo e pazienti RCC, è pienamente giustificata dalle caratteristiche strutturali di queste vescicole, che sono infatti delimitate da un doppio strato fosfolipidico. Nel pool di exosomi RCC si riscontra inoltre un'elevata percentuale di proteine normalmente secrete (35%), che risulta invece decisamente più ridotta nel pool di controllo (14%).

Le proteine identificate sono state anche analizzate dal punto di vista funzionale (Fig. 31) basandosi sempre sul database UniProtKB di ExPASy.

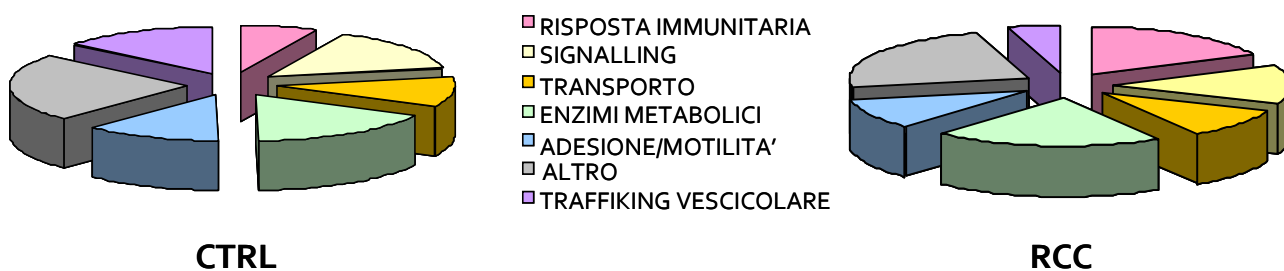


Figura 31. Suddivisione funzionale delle proteine identificate negli exosomi urinari controllo (CTRL) e dei pazienti affetti da carcinoma renale (RCC).

Sia nel pool controllo sia nel pool RCC sono state individuate numerose proteine tipiche degli exosomi, tra cui proteine che mediano il trafficking delle vescicole verso la plasma membrana,

quali le componenti dei complessi ESCRTs, le annexine e le tetraspanine come CD9. L'identificazione di queste specie proteiche era attesa, in quanto strettamente correlata al meccanismo di biogenesi degli exosomi [Hurley JH *et al.*, 2008; Simpson RJ *et al.*, 2009]. Sono state inoltre identificate molte altre classi funzionali tra le quali: enzimi metabolici, come la *triosofosfato isomerasi*, la *glucosio 6- fosfato isomerasi*, la *isocitrato deidrogenasi* e la *fosfoglicerato-chinasi di tipo 1*; proteine coinvolte nel signalling intracellulare, quali le *Ras-related proteins*; proteine del citoscheletro o coinvolte nell'adesione cellulare, come *Ezrin* e la *sintenina-1*; proteine di trasporto, ad esempio *chloride intracellular channel protein 1* (CLIC1). Una differenza consistente tra i due pools riguarda la percentuale di proteine implicate nella risposta immunitaria, che nel pool RCC costituiscono il 18% delle proteine identificate, mentre nel controllo solo il 7%. Questa diversità può dipendere dall'attivazione del sistema immunitario contro la neoplasia; infatti una delle ipotesi più condivise circa le principali funzioni degli exosomi riguarda la regolazione della risposta immunitaria, in particolar modo in presenza di una neoplasia [Chaput N *et al.*, 2010; Record M *et al.*, 2011]. Visto inoltre che tra proteine implicate nella risposta immunitaria maggiormente rappresentate, nel nostro pool di exosomi urinari, ci sono le catene delle immunoglobuline, rilasciate dalle cellule nell'ambiente extracellulare, questo potrebbe anche spiegare l'elevato contenuto di proteine secrete negli exosomi urinari RCC.

A partire da questi studi di proteomica comparativa degli exosomi urinari di pazienti RCC e corrispondenti controlli, che ci hanno permesso di identificarne il pattern proteico, è stato possibile effettuare un'attenta selezione di proteine renali differenzialmente espresse tra controlli e pazienti, e che sono note, sulla base degli studi in letteratura, essere coinvolte nella tumorigenesi, da studiare e validare poi come eventuali biomarcatori candidati del RCC.

#### **4.1.5 Valutazione del contenuto differenziale di alcune proteine negli exosomi urinari di pazienti RCC**

Dal momento che i profili proteici degli exosomi urinari dei pazienti affetti da ccRCC e dei corrispondenti controlli presentano significative differenze, dato poi confermato anche dalle nostre analisi MS, ci siamo proposti di indagare in maniera più approfondita tali variazioni ricercando, mediante WB ed immunodecorazione con anticorpi specifici, la presenza e l'eventuale contenuto differenziale di specifiche proteine di membrana che risultano correlate con l' RCC in quanto già riportate in letteratura come differenzialmente espresse nel tessuto tumorale o perché analizzate in esperimenti precedenti di proteomica del tessuto condotti dal laboratorio.



I livelli di espressione delle proteine aquaporina 1 (AQP1), EMMPRIN, l'anidrasi carbonica 9 (CA9) e la metallo proteasi della matrice 9 (MMP9) sono stati testati sugli exosomi isolati dalle urine di tutti i 29 pazienti e 28 controlli, mentre per le proteine ceruloplasmina (CP), podocalixina (PODXL), dickkopf-related protein (DKK4), nefrilisina (CD10) e sintenina (SYNT1) è stato svolto solo uno studio preliminare su 10 pazienti e 10 controlli.

Il contenuto differenziale di queste proteine è stato valutato tramite Western Blotting ed immunodecorazione con anticorpi specifici su campioni rappresentativi di exosomi urinari di pazienti RCC e controlli. Dai risultati, mostrati nella figura 32 possiamo concludere che MMP9, CA9, CP, PODXL e DKK4 risultano contenute a livelli più elevati nei campioni di exosomi urinari isolati da pazienti RCC. rispetto ai controlli.

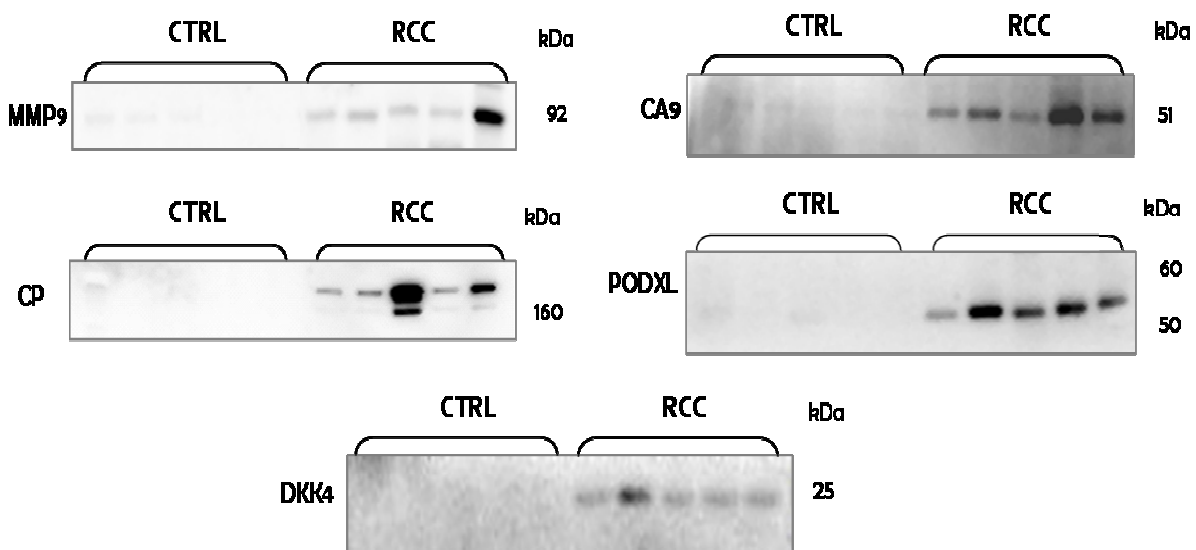


Figura 32. EF e WB con anticorpi specifici per le proteine indicate eseguiti sui campioni rappresentativi di exosomi ottenuti da urine di pazienti affetti da ccRCC (RCC) e da corrispondenti controlli sani (CTRL). Sono mostrati 5 casi rappresentativi.

In seguito è stata eseguita l'analisi densitometrica delle bande risultanti normalizzando la densità ottica rispetto al contenuto di creatinina urinaria, confermando così che le differenze osservate sono statisticamente significative (Fig. 33).

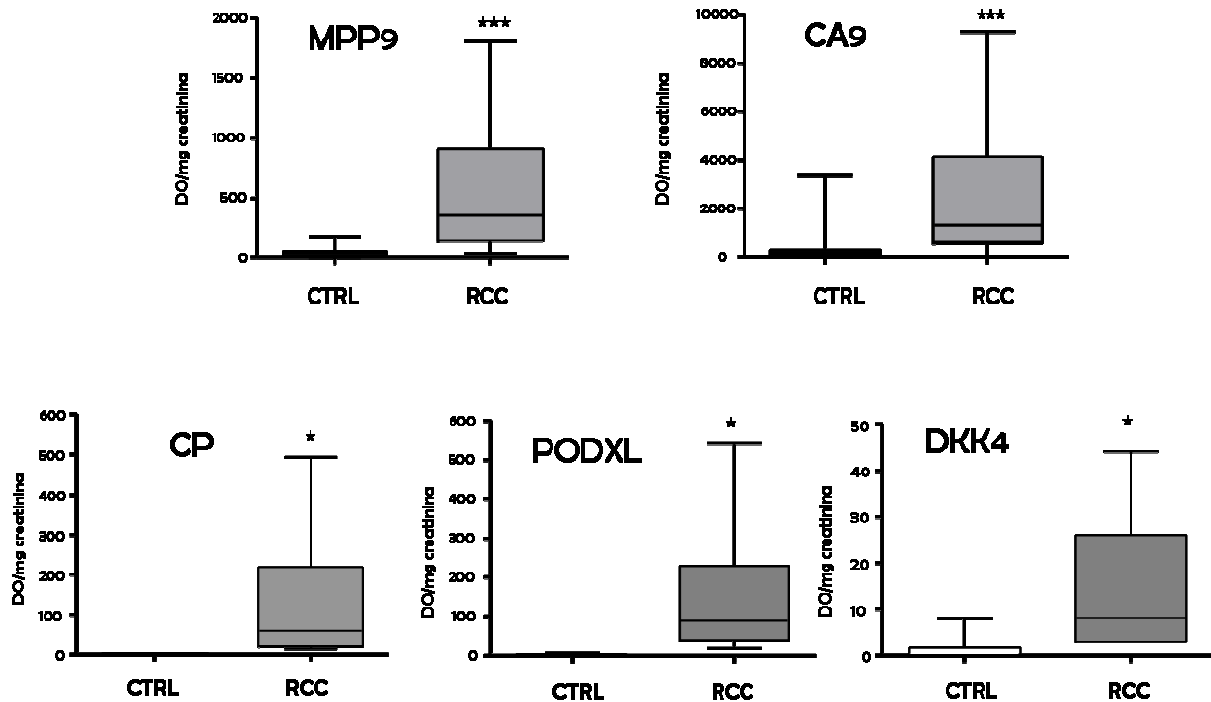


Figura 33. Quantificazione densitometrica delle bande normalizzate rispetto alla concentrazione di creatinina urinaria (\* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.0001$ ) (unità arbitrarie). Nel box plot, la linea nera continua rappresenta la mediana; la barra verticale delimita invece il minimo ed il massimo dei valori.

Le metalloproteasi della matrice extracellulare (MMPs), bersagli fisiologici di EMMPRIN, sono enzimi coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare, e possono di conseguenza essere cruciali per consentire lo sviluppo e la progressione tumorali. E' stato visto che l'aumentata espressione di MMP-9, ma anche di MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2, correla con variabili prognostiche sfavorevoli, tra cui la ridotta sopravvivenza dei pazienti RCC [Kallakury BV *et al.*, 2001]. Nel già citato lavoro del 2006, Jin JS *et al.* affermano che MMP-9 è localizzata ad alti livelli nei tessuti RCC tramite esperimenti di immunostochimica, mentre non è possibile identificarla in tessuto renale sano.

L'anidrasi carbonica IX (CAIX) è una proteina transmembrana la cui espressione è controllata dal fattore trascrizionale HIF-1. Studi immunostochimici effettuati su tessuto renale affetto da RCC e su corrispondente tessuto sano hanno rivelato che la CAIX risulta *up*-regolata nel tumore, suggerendo un suo possibile utilizzo in qualità di marcatore diagnostico. CAIX sembra essere uno

dei markers più significativi descritti per il RCC, ma presenta un comportamento originale come fattore prognostico; l'espressione di CAIX diminuisce all'aumentare dello sviluppo metastatico e quindi la riduzione di CAIX si associa ad una scarsa sopravvivenza in pazienti con RCC in stadio avanzato [Bui MH *et al.*, 2003; Sanlund J *et al.*, 2007]. Più recentemente, alcuni lavori hanno mostrato che i livelli sierici di CAIX correlano con le dimensioni della neoplasia e permettono di discriminare tra pazienti ccRCC e pazienti non ccRCC [Zhou GX *et al.*, 2009].

La ceruloplasmina (CP) è una glicoproteina con attività ferrossidasica rame-dipendente, deputata al trasporto del 70% del rame nel plasma. La CP è anche una proteina della fase acuta il cui gene possiede un elemento responsivo all'IL-6 e i cui livelli plasmatici aumentano in risposta ad infezioni ed infiammazioni [Conley L *et al.*, 2005]. Diversi lavori riportano un significativo aumento della CP tissutale in diverse tipologie di tumore, tra cui anche il carcinoma renale [Takahashi M *et al.*, 2001; Osunkoya AO *et al.*, 2009]. Recentemente, Moon PG *et al.* hanno identificato la CP negli exosomi urinari [Moon PG *et al.*, 2011]. Dalle nostre analisi MS, è emerso che la CP è identificata esclusivamente negli exosomi urinari RCC.

La podocalixina (PODXL) è una proteina transmembrana, altamente sialilata ed O-glicosilata. La principale funzione della PODXL è di anti-adesione [Horvat R *et al.*, 1986]. In virtù della carica negativa di cui è dotata, la PODXL consente la separazione tra i pedicelli adiacenti dei podociti, mantenendo aperta la barriera di filtrazione glomerulare. [Economou CG *et al.*, 2004]. La PODXL è anche coinvolta nel mantenimento della morfologia cellulare in dipendenza dall'indiretta associazione della PODXL con l'actina del citoscheletro, attraverso la proteina Ezrina [Orlando RA *et al.*, 2001; Schmieder S *et al.*, 2004].

E'

stata dimostrata l'overespressione della PODXL in numerose neoplasie, tra cui il tumore al seno, alla prostata, al testicolo, al fegato, al pancreas, nella leucemia [Somasiri A *et al.*, 2004], ed anche nel RCC [Hsu YJ *et al.*, 2010], giustificata dal ruolo della PODXL nel mantenimento della morfologia cellulare e dell'adesione cellulare, due attività che sono molto importanti nello sviluppo tumorale. Nelle nostre analisi MS, la PODXL è stata identificata negli exosomi urinari sia del pool RCC sia del pool di controllo, ma con uno score significativamente maggiore nel primo. La PODXL risulta inoltre già riportata come proteina degli exosomi urinari in Exocarta.

La Dickkopf related protein 4 (DKK4) è una proteina secreta nell'ambiente extracellulare in grado di antagonizzare il pathway canonico di Wnt; nonostante ciò, è stato recentemente osservato che la DKK4 può contribuire all'oncogenesi attivando il pathway non canonico JNK (*c-Jun-NH2-Kinase*), promuovendo così la proliferazione cellulare, la migrazione delle cellule neoplastiche ed

inibendo l'apoptosi cellulare [Katlani TS *et al.*, 2007]. DKK4 risulta fortemente incrementata nelle cellule neoplastiche del cancro al colon [Matsvi A *et al.*, 2009; Pendas-Franco N *et al.*, 2008] e anche a livello del RCC [Hirata H *et al.*, 2010].

Mediante LC-ESI-MS/MS abbiamo identificato la DKK4, non ancora riportata in Exocarta come proteina degli exosomi urinari, unicamente nel pool RCC.

Nella figura 34 sono invece riassunti i risultati riguardanti i livelli negli exosomi urinari di pazienti e controlli delle proteine AQP1, EMMPRIN, CD10 e SYNT1 che appaiono contenute in quantità minore nei campioni isolati da pazienti RCC rispetto ai controlli.

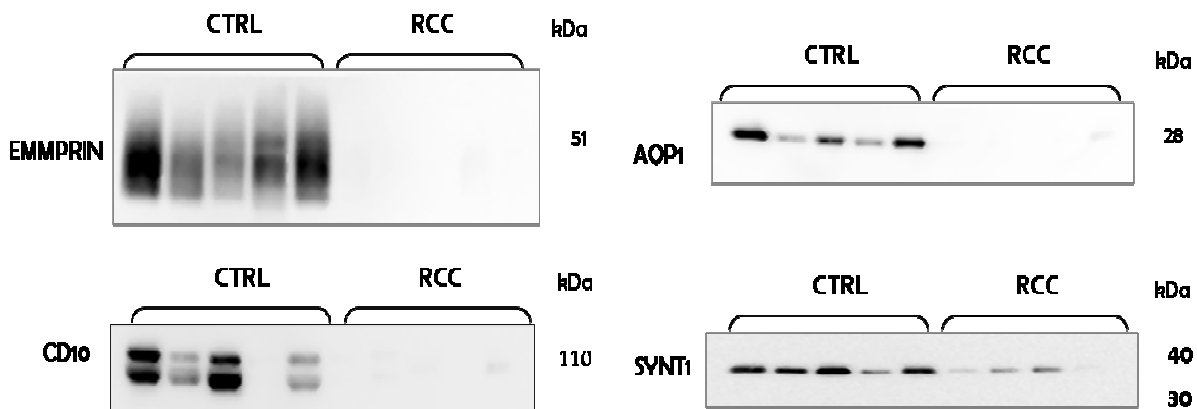


Figura 35. EF e WB con anticorpi specifici per le proteine indicate eseguiti sui campioni rappresentativi di exosomi ottenuti da urine di pazienti affetti da ccRCC (RCC) e da corrispondenti controlli sani (CTRL). Sono mostrati 5 casi rappresentativi.

In seguito è stata eseguita l'analisi densitometrica delle bande risultanti normalizzando la densità ottica rispetto al contenuto di creatinina urinaria, confermando così che le differenze viste con il WB sono statisticamente significative (Fig. 36).

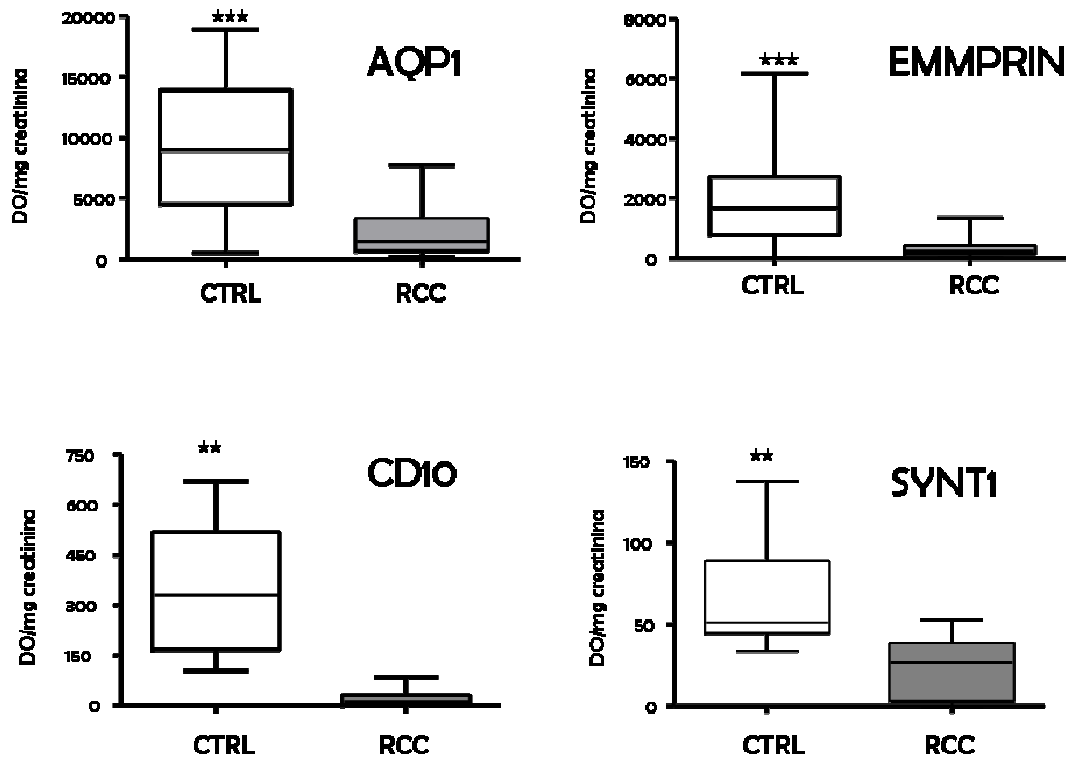


Figura 36. Quantificazione densitometrica delle bande normalizzate rispetto alla concentrazione di creatinina urinaria (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p$ -value  $< 0.0001$ ) (unità arbitrarie). Nel box plot, la linea nera continua rappresenta la mediana; la barra verticale delimita invece il minimo ed il massimo dei valori.

L'aquaporina-1 (AQP-1) è un canale di membrana dell'acqua specificamente espresso a livello del tubulo prossimale renale e dell'ansa di Henle; in esperimenti precedenti, condotti anche nel nostro laboratorio, si è dimostrato che l'AQP-1 risulta *down-regolata* in tessuti tumorali renali [Ticozzi-Valerio D *et al.*, 2008]. Molti lavori in letteratura ipotizzano inoltre un suo utilizzo in qualità di marcatore prognostico tissutale di tumori renali primari [Huang Y *et al.*, 2008].

EMMPRIN (*Extracellular Matrix MetalloPRotease INducer*), conosciuta anche come basigina o CD147, è un induttore delle metalloproteasi della matrice extracellulare di cui si è già dimostrata l'overespressione in tessuti RCC [Jin JS *et al.*, 2006]. I ricercatori considerano EMMPRIN un ideale candidato come marker, utile soprattutto nella diagnosi differenziale dei diversi sottotipi di RCC

[Jin JS *et al.*, 2006]. E' stato inoltre visto che l'espressione di EMMPRIN correla con alcuni parametri clinico-patologici del RCC, in particolar modo con il grado istologico tumorale e con la sopravvivenza dei pazienti [Tsai WC *et al.*, 2008].

La nefrilisina, conosciuta anche come CD10 o *common acute lymphoblastic lymphoma antigen* (CALLA), è una metalloproteasi di membrana zinco-dipendente [Pardossi PR *et al.*, 2004]. È utilizzata come marcatore per alcune forme di leucemia e di linfoma [Ohshmia K *et al.*, 2001], ma è normalmente espressa anche nei tessuti non ematopoietici, in particolar modo nel tessuto polmonare e nel rene [Chu P *et al.*, 2000] dove contribuisce ad inattivare peptidi quali la bradichinina, l'angiotensina, la sostanza P [Sahli S *et al.*, 2005]. Alcuni studi hanno rivelato l'overespressione tissutale della nefrilisina in diverse tipologie di tumori maligni, come il RCC, il melanoma e l'adenocarcinoma prostatico [Chu P *et al.*, 2000] [Velasquez EF *et al.*, 2007], mentre in altri tumori, ad esempio nel cancro al polmone, la nefrilisina è risultata *down*-regolata [Cohen AJ *et al.*, 1996].

La nefrilisina, non ancora riportata come proteina degli exosomi urinari in Exocarta, è stata identificata, nella nostra analisi proteomica, solamente nel pool di exosomi ottenuto dalle urine di soggetti controllo.

La sintenina-1 è una proteina di membrana [Koroll M *et al.*, 2001] espressa a livello del rene, del fegato, dei polmoni e del SNC. Dal punto di vista funzionale la sintenina-1 accoppia il sindecano-2, un proteoglicano di membrana coinvolto nella tumorigenesi al citoscheletro, e favorisce anche l'attivazione della proteina Rac1 [Cowan CA *et al.*, 2000]. Recentemente si è dimostrato che la sintenina-1 fa parte dei microdomini arricchiti in tetraspanine (TEM) ed in particolare interagisce direttamente con la tetraspanina CD63; questo giustifica la presenza della sintenina-1, insieme alla stessa CD63, negli exosomi (Exocarta). Inoltre, è stato visto che un aumento dell'espressione della sintenina-1 determina una corrispondente diminuzione dei livelli di CD63; questa riduzione sembra correlata ad un aumento del grado di aggressività ed invasività tumorale.[Latysheva N *et al.*, 2006]. E' stata infine dimostrata l'overespressione della sintenina-1 in linee cellulari di tumore al seno e di tumore allo stomaco con effetti nel potenziamento della migrazione cellulare e quindi nell'insorgenza di metastasi a distanza [Koo TH *et al.*, 2002]. La sintenina-1 è stata da noi identificata esclusivamente negli exosomi urinari controllo.

Inoltre, la figura 37 riporta i livelli medi di tutte le proteine analizzate negli exosomi di pazienti a confronto con quelli di controlli; questo ci ha consentito di riaffermare che gli exosomi urinari dei pazienti RCC hanno una composizione proteica significativamente diversa da quella dei controlli e che gli studi di proteomica comparativa degli exosomi urinari si propongono quindi come approcci molto promettenti al fine di identificare biomarcatori diagnostici e prognostici nei confronti del RCC, soprattutto tramite l'applicazione di una strategia multimarker.

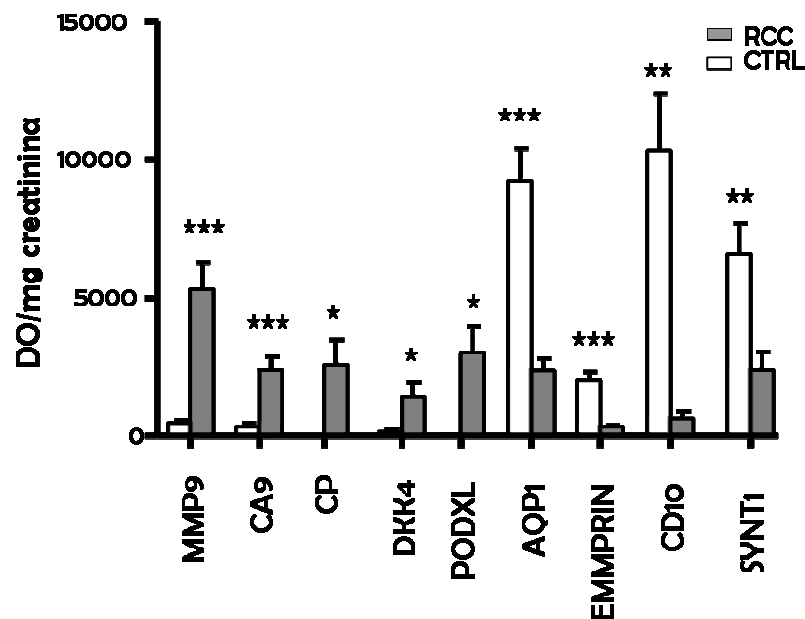
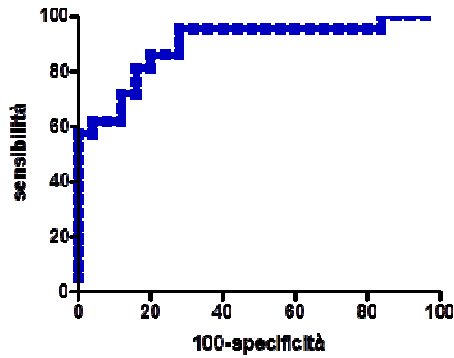


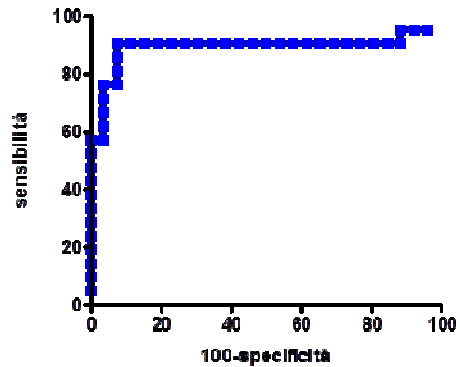
Figura 37. Livelli medi delle proteine analizzate negli exosomi dei pazienti e dei controlli. Intensità densitometrica delle bande, rivelate tramite IB con anticorpi specifici, più errore standard medio (\*: p-value < 0.05, \*\*: p-value < 0.001, \*\*\*: p-value < 0.0001).

Abbiamo per alcune delle proteine analizzate eseguito inoltre l'analisi della performance diagnostica tramite curve ROC (Fig. 34a): i risultati mostrano una buona discriminazione fra pazienti e controlli, dato che l'AUC (area sotto la curva) è, per ogni proteina, su valori attorno al 90%. La curva ROC multipla (Fig. 34b) sottolinea inoltre che il potere discriminante delle quattro proteine assieme, utilizzate quindi come marcatori multipli, è superiore rispetto al potere discriminante delle proteine valutate singolarmente, fatta eccezione per MMP9, che mostra un'AUC maggiore.

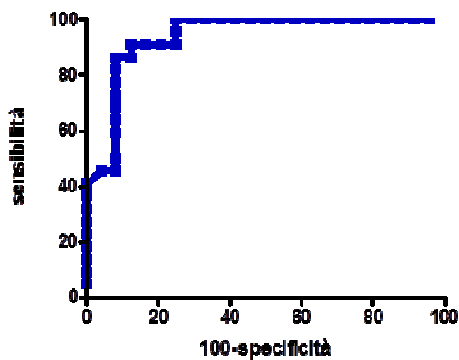
a) AQP1;  $AUC = 0.895 \pm 0.049$



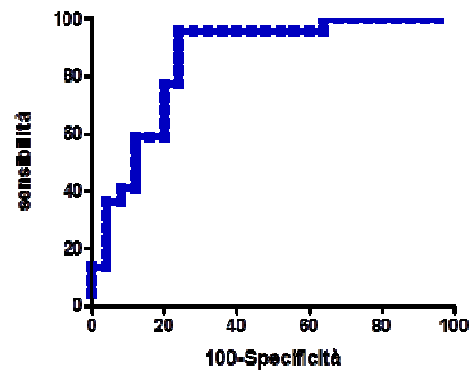
EMMPRIN;  $AUC = 0.893 \pm 0.061$



MMP9;  $AUC = 0.937 \pm 0.036$



CAIX;  $AUC = 0.856 \pm 0.057$



b)

ROC MULTIPLA;  $AUC = 0.918 \pm 0.032$

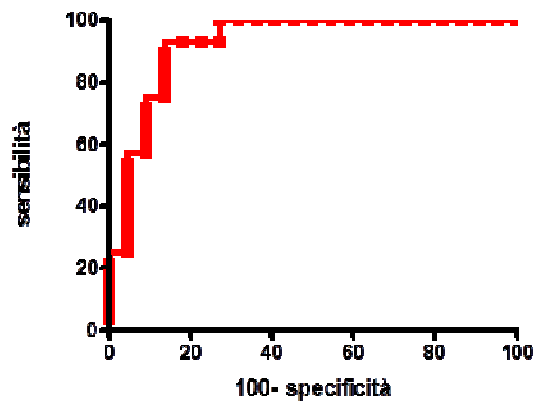


Figura 34. a) curve ROC ottenute utilizzando i valori di intensità delle bande relative a EMMPRIN, AQP1, MMP9 eCA9 (normalizzati per la creatinina urinaria) negli exosomi di 29 pazienti RCC e di 28 controlli b) curva ROC multipla.



Tutti questi dati contribuiscono a ribadire che lo studio della composizione proteica degli esosomi urinari, e soprattutto la possibilità di attuare una strategia di tipo multimarker, con l'analisi contemporanea del contenuto differenziale di più proteine, potrebbe realmente costituire un punto di partenza importante per lo sviluppo di biomarcatori del RCC.

### 3.1.6 Studio della composizione lipidica degli esosomi urinari

Gli esosomi urinari sono vescicole ricoperte di membrana la cui composizione lipidica, al pari di quella proteica, potrebbe essere alterata dalla condizione patologica. Abbiamo per questo deciso di confrontare anche il contenuto lipidico degli esosomi isolati da urine di pazienti RCC con quelli isolati da controlli sani. In letteratura non esistono informazioni riguarda la composizione lipidica degli esosomi urinari, mentre Laulagnier *et al.* hanno studiato la composizione lipidica degli esosomi derivati da cellule dendritiche e mastociti, e hanno riportato differenze nelle quantità di colesterolo e sfingomieline tra esosomi e cellule di origine [Laulagneir K *et al.* 2004], così come si evidenziano alterazioni nella composizione lipidica di esosomi isolati da reticolo citi durante la loro maturazione [Caranyon K *et al.*, 2011].

Per un primo esperimento preliminare abbiamo utilizzato due pools di urine, costituiti rispettivamente da circa 30-40 ml di urine di 7 pazienti RCC e 7 campioni provenienti da urine di controlli paragonabili per età. Inoltre avevamo a disposizione, ed abbiamo utilizzato per questo esperimento, anche un campione di circa 190 ml di urine di un paziente RCC ed un campione di circa 200 ml di urine di un controllo. Da questi 4 campioni (2 RCC e 2 CTRL) sono stati isolati gli esosomi, sottoposti ad estrazione dei lipidi, loro purificazione in classi (gangliosidi, fosfolipidi e colesterolo) ed analisi tramite TLC, con rivelazione mediante utilizzo di reattivi specifici e quantificazione dell'intensità delle bande così ottenute per densitometria. L'identificazione dei singoli lipidi e la misura della loro concentrazione è stata ottenuta tramite co-cromatografia e confronto con standards lipidici a contenuto noto.

#### Analisi dei Gangliosidi

La figura 37a mostra l'immagine della TLC ottenuta seminando le fasi acquose purificate dei 4 campioni. Il contenuto in gangliosidi di queste strutture risulta molto ridotto, e la composizione si rivela essere piuttosto semplificata (Tab. 7), come c'è da aspettarsi in membrane di origine extra nervosa.

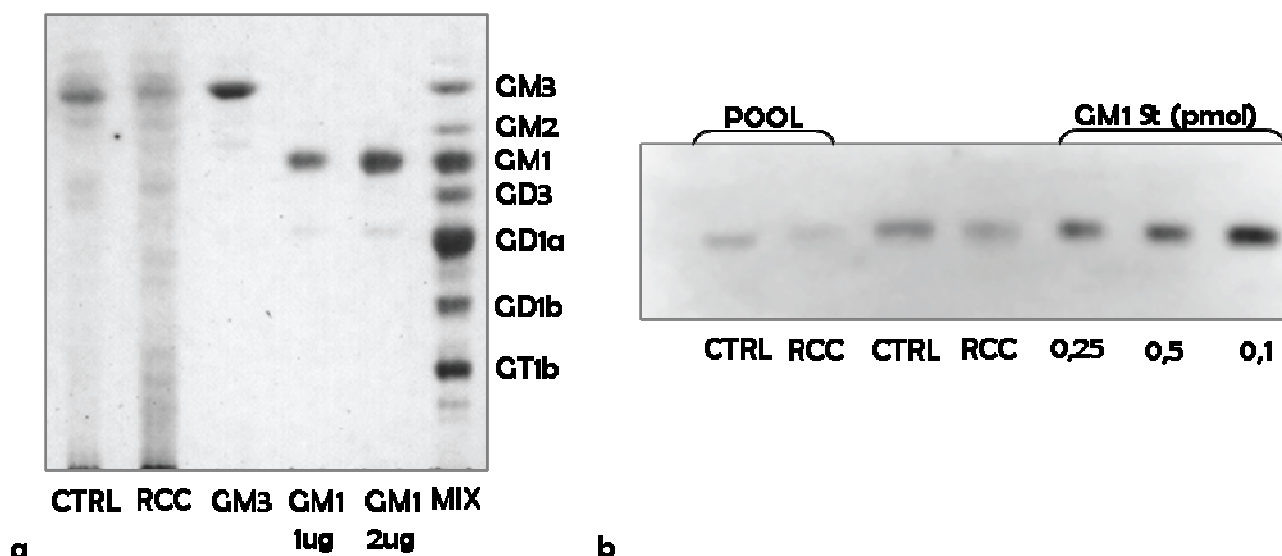


Figura 37. a) Analisi tramite TLC e rivelazione con reattivo di Earlich dei gangliosidi totali estratti da exosomi di pazienti (RCC) e di controlli (CTRL); sono stati seminati uno standard per GM<sub>3</sub>, uno standard per GM<sub>1</sub> a due concentrazioni e una miscela dei gangliosidi principali (Mix); b) Analisi tramite TLC e rivelazione con Tossina Colerica del GM<sub>1</sub> estratto da exosomi di pazienti (RCC) e di controlli (CTRL); è stato seminato uno standard a tre concentrazioni diverse per il GM<sub>1</sub>.

Dalla tabella 7 possiamo osservare che il ganglioside GM<sub>3</sub> è il più abbondante, mentre gli altri gangliosidi sono presenti in tracce. I risultati sembrano suggerire che gli exosomi urinari dei pazienti RCC contengano livelli inferiori di GM<sub>3</sub> rispetto ai controlli, ma questa differenza non è statisticamente significativa. Per quel che riguarda gli altri gangliosidi i valori sono troppo esigui e la casistica troppo limitata per poter rilevare delle differenze.

Tabella 7. Contenuto dei lipidi negli exosomi da urine di pazienti RCC e di controlli espresso come pmol/100 ml di urine.

	CTRL	RCC
GM <sub>3</sub>	482	24,6
GM <sub>1</sub>	0,63	0,4
Col.	20,8	14,3
PL	29,6	18,1

Viste le concentrazioni molto basse dei gangliosidi in queste membrane, abbiamo applicato una tecnica più sensibile per l'identificazione e la quantificazione del ganglioside GM<sub>1</sub>, che sfrutta l'affinità di questo per la Tossina Colerica; il dosaggio si avvale del coniugato con l'HRP per una visualizzazione tramite ECL sulla lastra di TLC (Fig. 37b). Il contenuto medio di GM<sub>1</sub> nei campioni

RCC è 0,4 pmol/100 ml di urine, mentre nei controlli è 0,63 pmol/100 ml di urine, suggerendo una tendenza alla diminuzione del contenuto di questo ganglioside nei campioni dei pazienti rispetto ai campioni di controllo.

#### Analisi del Colesterolo

Anche il contenuto di colesterolo negli exosomi isolati dai campioni RCC sembra essere leggermente inferiore a quello del campione di controllo, come mostrato nella figura 38.

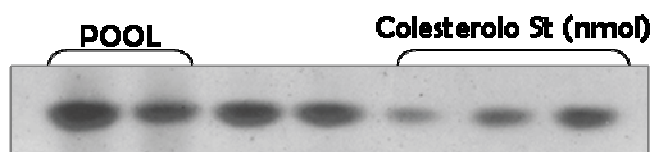


Figura 38. Analisi tramite TLC e rivelazione con colorante all'Anisaldeide del colesterolo estratto da exosomi di pazienti (RCC) e di controlli (CTRL); sono stati seminati tre standards di colesterolo a concentrazioni diverse.

Infatti, dalla quantificazione otteniamo un valore di colesterolo medio di 14,3 nmol/100 ml di urine negli exosomi dei pazienti RCC, contro un valore medio di 20,8 nmol/100 ml di urine negli exosomi dei controlli.

#### Analisi dei Fosfolipidi

Si è valutata la presenza nella fase organica dei fosfolipidi e, in particolare, della sfingomieline, un fosfolipide arricchito nei microdomini che contribuisce, insieme al colesterolo, a conferire una maggiore rigidità a questi domini lipidici [Bollinger CR *et al.*, 2005]. Per fare ciò si sono separati i fosfolipidi contenuti nella fase organica mediante TLC, successivamente colorata con Anisaldeide (Fig. 39).

I risultati suggeriscono che il contenuto dei fosfolipidi totali è ridotto negli exosomi urinari dei pazienti RCC rispetto ai controlli (Tab. 8), e questo dato concorda come tendenza con quelli ottenuti dall'analisi degli altri lipidi sebbene queste differenze non siano statisticamente significative e non ci siano cambiamenti composizionali evidenti a livello del tipo di fosfolipidi negli exosomi urinari isolati da pazienti RCC rispetto ai CTRL.

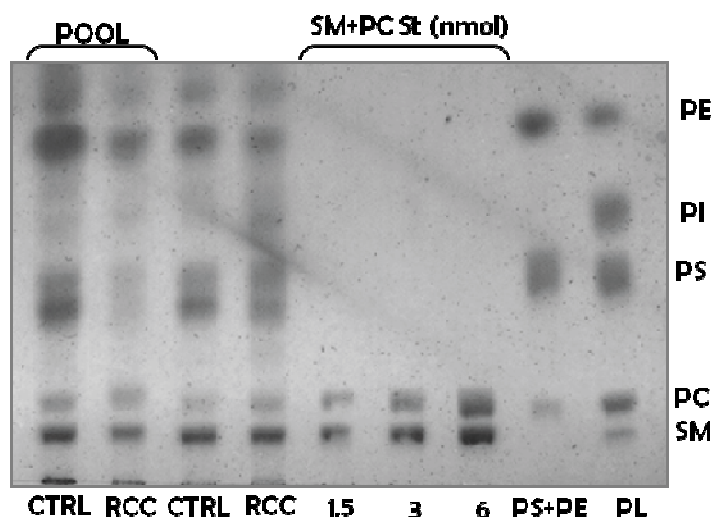


Figura 39. Analisi tramite TLC e rivelazione con colorante all'Anisaldeide dei fosfolipidi (PL) totali estratti da exosomi di pazienti (RCC) e di controlli (CTRL); sono stati seminate tre aliquote di sfingomieline (SM) e di fosfatidilcolina (PC) a concentrazioni note, un'aliquota di fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) e un'aliquota dei principali fosfolipidi di membrana (PL).

Tabella 8. Quantificazione dei fosfolipidi espressa come nmol/100 ml di urine.

	CTRL	RCC
SM	3,90	2,77
PC	1,50	1,93
PS	16,3	9,26
PE	7,91	4,15

Complessivamente quindi il contenuto di lipidi sia come qualità sia come quantità, non risulta significativamente alterato negli exosomi RCC rispetto ai controlli, almeno a un livello macroscopico. Questo però non esclude la presenza di più fini differenze al livello molecolare, quali lunghezza e insaturazioni delle code idrofobiche dei fosfolipidi, ipotesi che necessita di essere verificata tramite spettrometria di massa.

#### 4.1.7 Lipidomica degli exosomi urinari: risultati preliminari

I due pool (CTRL e RCC) di lipidi estratti da exosomi urinari e i lipidi estratti da exosomi urinari di un singolo caso RCC e un singolo controllo sono stati anche sottoposti a una valutazione lipidomica tramite spettrometria di massa. Le analisi preliminari hanno accertato che le quantità di lipidi estratti avviate all'analisi di spettrometria di massa e che la loro purezza erano adeguate.

Il metodo LC-MS sviluppato per l'analisi lipidomica è stato validato mediante prove di riproducibilità effettuate con l'utilizzo di un surrogato di matrice biologica (albumina umana 4%) fortificata con standard lipidici aventi concentrazioni differenti. Il metodo ha mostrato buona riproducibilità analitica in termini di recupero percentuale e risposta lineare (coefficiente di correlazione  $R_2 \geq 0.985$  per ogni analita,  $RSD\% \leq 15\%$ , accuratezza  $\leq 20\%$ ). Inoltre, l'uso della sorgente nanoLockSpray ha permesso di effettuare ri-calibrazioni di massa *on-line*, consentendo di ottenere un'accuratezza di massa con un errore al di sotto dei 10 ppm.

L'analisi LC-MS dei lipidi estratti ha fornito circa 1300 segnali m/z. La figura 40 mostra i profili LC-MS ottenuti dai lipidi idrofobici del pool degli exosomi urinari dei pazienti RCC (pannello a) e di quelli dei soggetti controllo (pannello b). La grande mole di dati che può essere ricavata da questo tipo di approccio necessita di un'elaborazione computazionale che viene effettuata mediante software dedicati. In questo caso, comunque, si può notare come ci siano numerose differenze macroscopiche nei due profili visibili anche senza l'ausilio di mezzi bioinformatici.

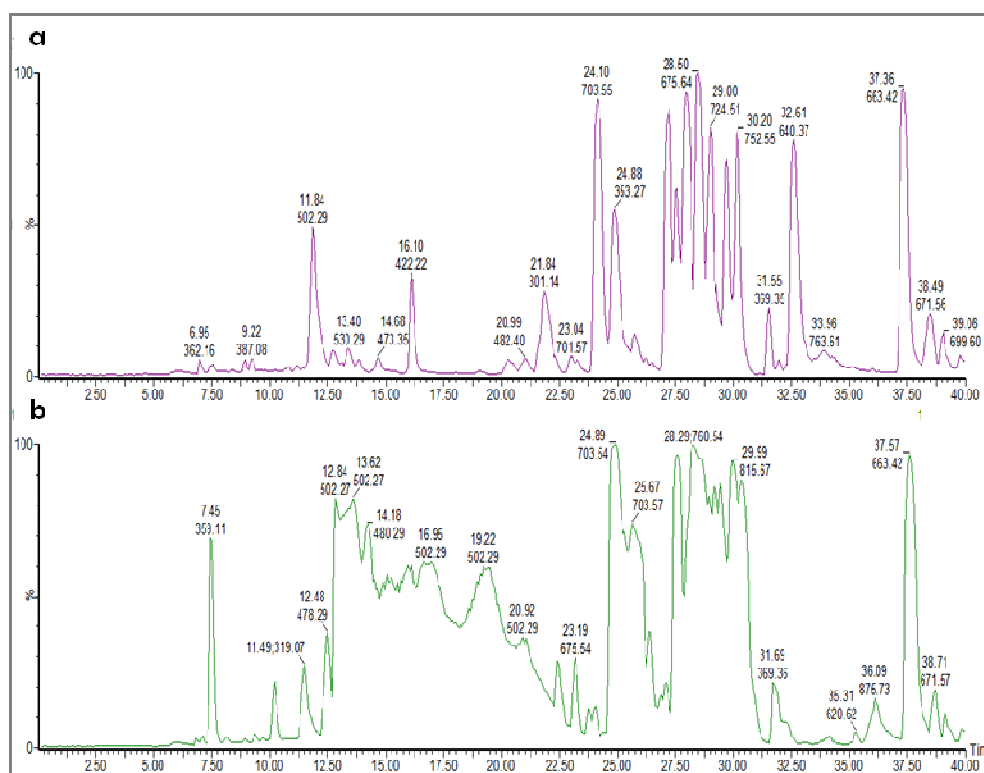


Figura 40. Profili LC-MS dei lipidi idrofobici dei pool di exosomi urinari provenienti da a) pazienti RCC e b) soggetti controllo.

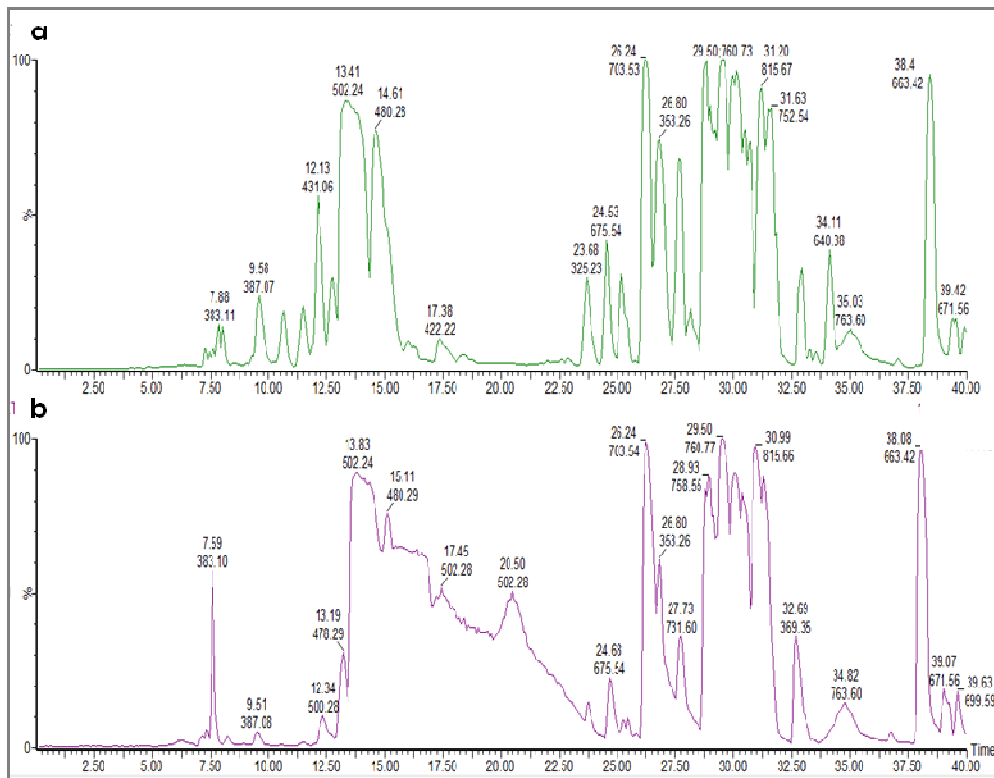


Figura 4.1. Profili LC-MS dei lipidi idrofobici di exosomi urinari provenienti da a) un paziente RCC e b) da un soggetto controllo.

Come indagine preliminare, quindi, il confronto è stato effettuato tra due pool di campioni, senza l'ausilio di un'analisi statistica adeguata dei dati ottenuti. Nonostante ciò, questi profili sono stati confermati analizzando la stessa frazione lipidica ottenuta dagli exosomi urinari di un paziente RCC e di un controllo, per i quali avevamo a disposizione grande quantità di materiale (Fig. 4.1).

Sono stati estratti i cromatogrammi specifici di alcuni segnali che risultavano interessanti già ad un'analisi grossolana. Questi segnali potrebbero rappresentare 3 potenziali biomarcatori: il segnale a  $m/z = 502.29$  Th è più abbondante negli exosomi dei controlli, mentre i segnali a  $m/z = 422.23$  Th e  $640.39$  Th sono presenti quasi esclusivamente in quelli dei pazienti RCC.

I cromatogrammi dei singoli segnali sono stati estratti dal profilo totale e grazie alla presenza dello standard interno, la sfingomielina deuterata, è stato possibile avere una stima delle quantità relative. La figura 4.2 mostra l'estratto cromatografico del segnale con  $m/z = 502.29$  Th, con l'abbondanza relativa tra il pool dei controlli e degli RCC.

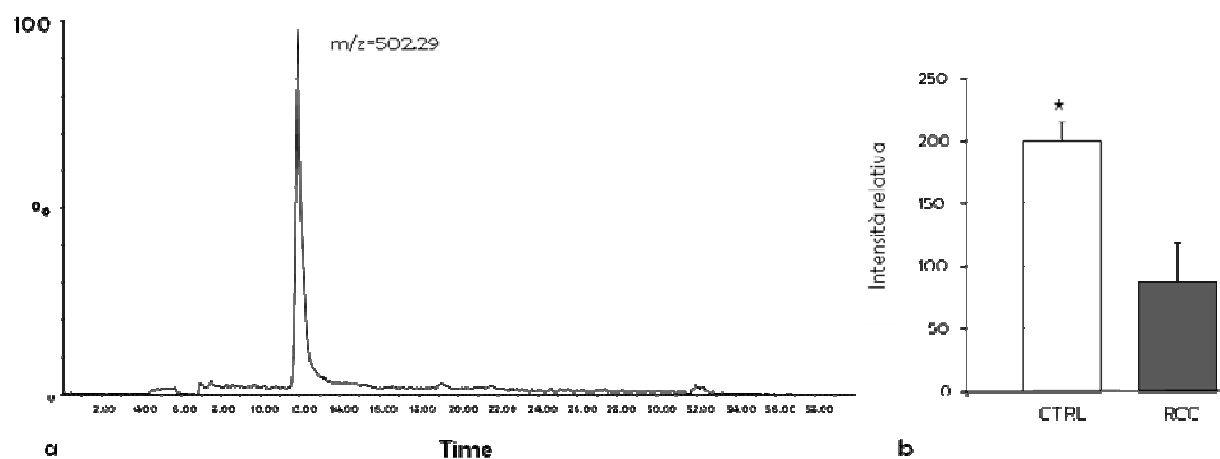


Figura 42. a) Cromatogramma estratto del segnale con  $m/z = 502.29$  Th, estratto dal cromatogramma relativo al profilo lipidico del pool degli exosomi RCC; b) L'istogramma rappresenta la differenza tra l'intensità relativa del segnale ottenuto nel pool Controllo (CTRL) e nel pool RCC. Analisi strumentale ripetuta in triplo.

Un'altra aliquota dei campioni è stata sottoposta ad analisi MS/MS per la caratterizzazione del segnale selezionato (Fig. 43). I dati di frammentazione, uniti alla ricerca in banca dati Human Metabolome Database (HMDB) usando la massa accurata ha permesso di identificare la lysofosfatidiletanolamina (LysoPE).

Come mostrato nello spettro MS/MS, i frammenti principali della molecola sono in accordo con la struttura molecolare della LysoPE (20:4). Inoltre il  $\Delta M = 141$  indicato sullo spettro, corrisponde alla perdita della testa polare del lipide: secondo le masse dei principali frammenti ottenuti, la LysoPE potrebbe essere stata frammentata.

Lo stesso è stato fatto per i segnali a  $m/z = 422.23$  Th e  $640.39$  Th: entrambi sono over-espresi negli exosomi RCC (164,65 volte più intensi) ed hanno un pattern di frammentazione simile. Anche in questo caso la ricerca in HMDB ha dato come risultato la probabile identificazione di una Lyso PE (24:1).

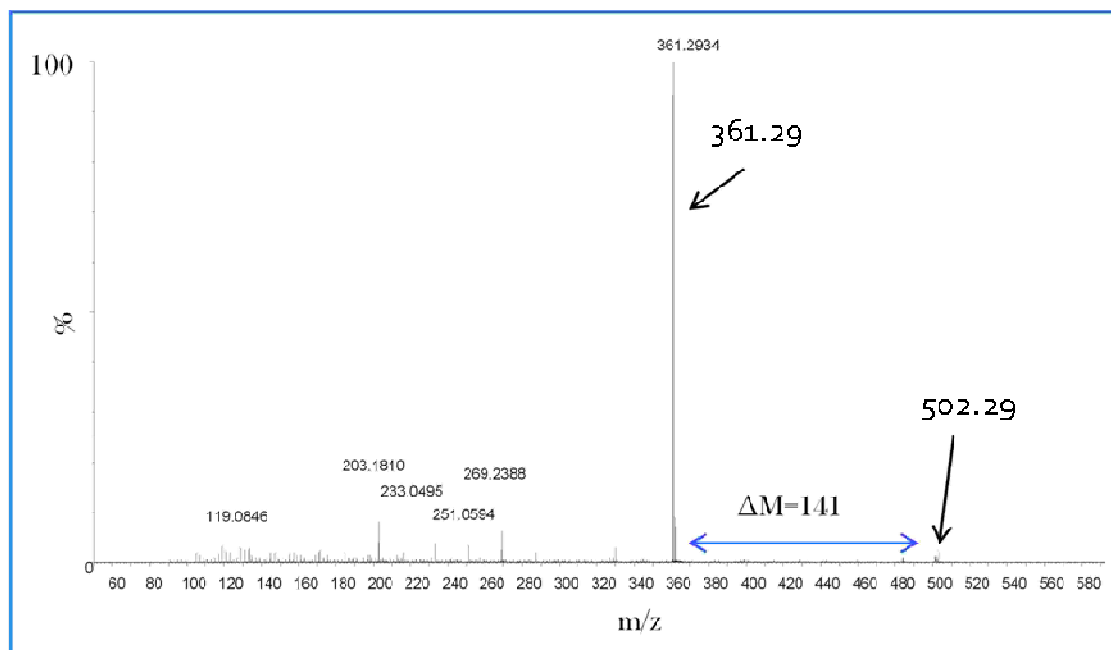
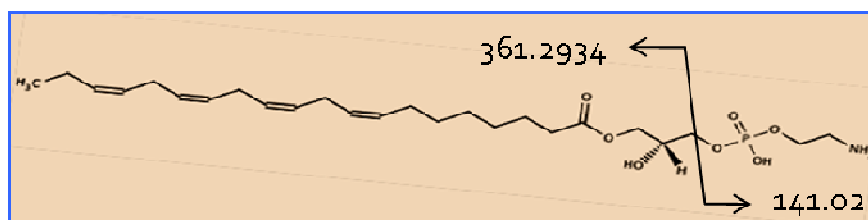
**a****b**

Figura43. a) Spettro di frammentazione (MS/MS) del segnale con  $m/z = 502.29$  Th; b) Struttura della LysoPE, e possibili frammenti che si formano durante analisi MS/MS.

Quindi anche se il pattern lipidico, analizzato tramite TLC, degli exosomi urinari da pazienti RCC era grossolanamente simile a quello dei controlli, come composizione in colesterolo, fosfolipidi (PL) e glicolipidi, i risultati attuali mostrano la presenza di differenze più fini a livello di specie molecolari, come la lunghezza e le insaturazioni delle code idrofobiche dei PL. Tali differenze potrebbero costituire la base per la modulazione di un diverso microambiente di membrana favorevole all'inserimento delle proteine specifiche di cui sopra accennato. Questa ipotesi richiede ulteriori esperimenti per essere convalidata.



## 4.2 MICRODOMINI NEL CARCINOMA RENALE

### 4.2.1 Casistica

I campioni di tumore renale primario (RCC) e di tessuto normale adiacente al tumore (*Adjacent Normal Kidney*, ANK) sono stati raccolti chirurgicamente in seguito a nefrectomia da pazienti con caratteristiche cliniche molto simili. Nessuno dei pazienti aveva precedentemente subito trattamenti di chemioterapia, erano tutti nella fase precoce della malattia e non presentavano metastasi o linfonodi intaccati al momento della diagnosi. I campioni tumorali sono stati classificati seguendo le raccomandazioni dell'Organizzazione mondiale per la sanità e solo i campioni diagnosticati come carcinoma renale a cellule chiare sono stati inclusi nello studio [Raimondo F *et al.*, 2011]. Lo *staging* e il *grading* dei tumori sono stati stabiliti da un patologo (Tab.9). In particolare il termine "RCC" viene usato per riferirsi a un pezzo di tessuto tumorale selezionato in un'area piuttosto omogenea, evitando zone eccessivamente fibrose o necrotiche; "ANK" invece identifica una porzione di corticale sana dello stesso rene contigua alla massa tumorale.

Tabella 9. Lista dei campioni analizzati in questo studio con i corrispondenti dati clinici.

CODICE PAZIENTE	GENERE	DIAMETRO DEL TUMORE (cm)	TUMOR STAGE (pT)	NUCLEAR GRADE (G)	PER POOL	PER WB
27CG	M	8.0	3a	2		X
41SG	M	6.5	1b	2		X
45DM	F	4.5	1b	2	X	
48GA	M	5.9	1b	2	X	X
49CA	M	4.8	3b	3	X	X
51MI	F	4.2	1b	2	X	
52CA	F	7.3	2	2	X	
60CC	M	11.5	3a	3	X	
61FG	M	5.0	A1b	2	X	
75CPL	M	4.1	1b	2		X
80MLA	F	6.2	3b	3		X
91BE	M	9.5	3b	1		X
117VLF	M	7.5	2	2		X

Nota: con una X sono contrassegnati i pazienti che sono stati successivamente selezionati per l'allestimento del pool rappresentativo di microdomini da sottoporre alle analisi di spettrometria di massa oppure per la validazione con Western blotting.

### 4.2.2 Purificazione della frazione arricchita in microdomini (MD)

I campioni di tessuto renale normale e tumorale sono stati sottoposti a frazionamento subcellulare tramite omogeneizzazione manuale con un potter di vetro e centrifugazioni differenziali per ottenere una frazione post-nucleare arricchita in plasma membrane. Questa frazione è stata poi sottoposta a trattamento con detergenti (TritonX-100) e ultracentrifugazione

in gradiente di densità per isolare i microdomini di membrana. Prima di tutto abbiamo verificato l'efficienza del nostro protocollo di purificazione analizzando la distribuzione di marker positivi o negativi dei micro domini lungo le frazioni del gradiente di saccarosio.

I risultati (Fig. 44) mostrano come proteine caratteristiche dei microdomini analizzate tramite EF seguita da WB, come la caveolina e la flotillina, risultino arricchite nella frazione 5 corrispondente alla densità caratteristica dei MD, mentre il recettore della transferrina si concentra nelle ultime frazioni del gradiente, essendo una proteina della plasmamembrana, ma non associata ai MD. La qualità del frazionamento subcellulare così dimostrata viene confermata anche dall'andamento dei marcatori lipidici dei MD, quali colesterolo e ganglioside GM1, che visualizzati tramite colorazione con anisaldeide in seguito a cromatografia su strato sottile e dot blot con tossina colerica rispettivamente, risultano arricchiti nella frazione dei MD.

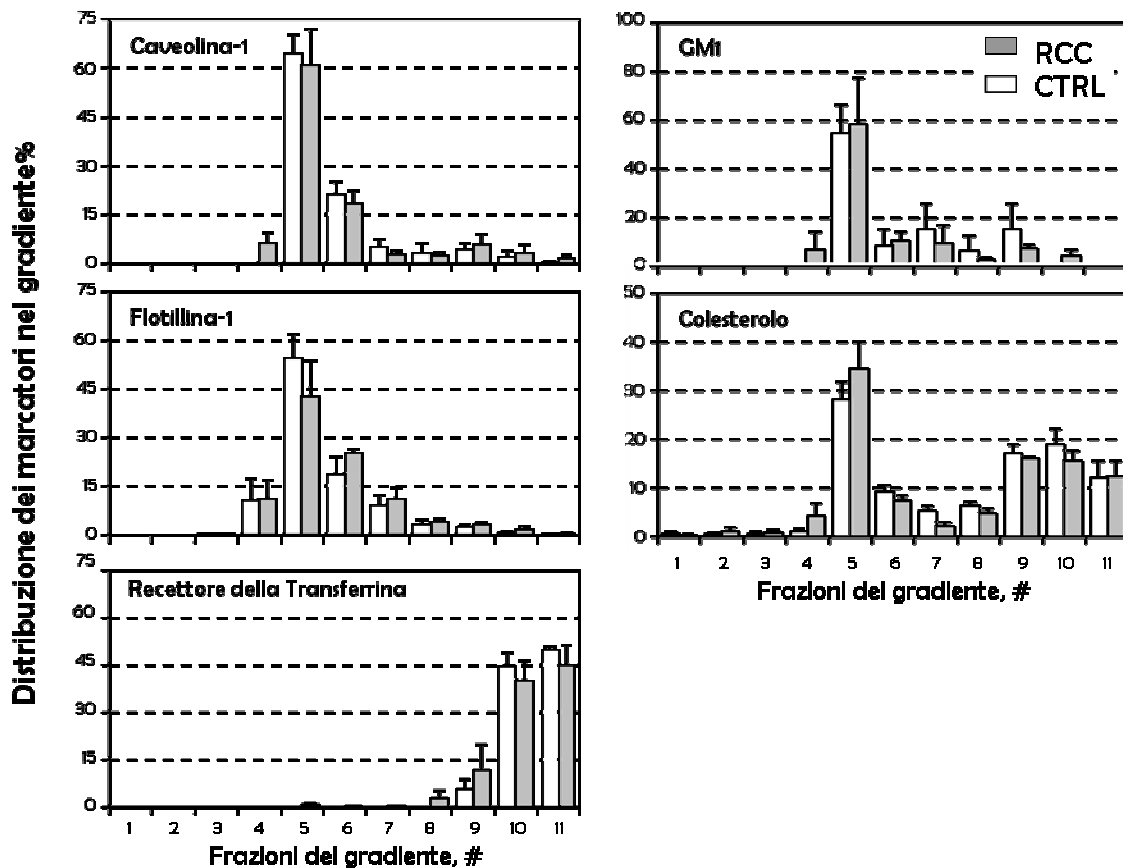


Figura 44. Analisi densitometrica della distribuzione di noti marcatori dei microdomini lungo le frazioni del gradiente di densità.

Possiamo quindi concludere che la frazione 5 è realmente arricchita in microdomini di membrana, senza differenze significative tra RCC e ANK e che la contaminazione da altri tipi di membrana è molto bassa.

### 4.2.3 Proteomica dei microdomini di membrana

Dopo aver concentrato per ultracentrifugazione i MD, le proteine di 7 campioni accoppiati RCC e ANK sono state analizzate tramite SDS-PAGE seguita da colorazione CBB.

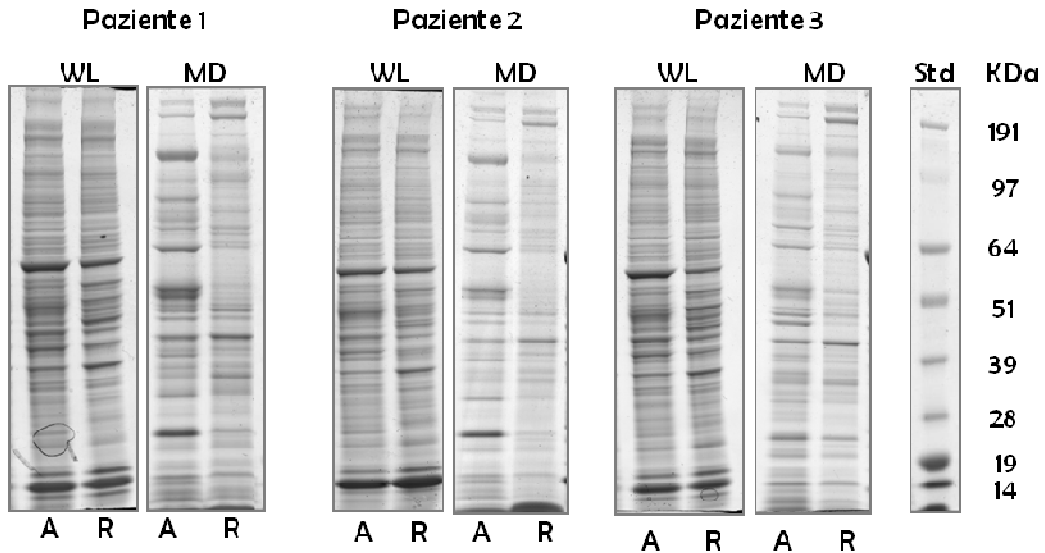


Figura 45. Profili proteici di omogenati tissutali (*Whole Lysates*, WL) e di frazioni arricchite in microdomini (MD) preparati da tessuto renale di 3 pazienti diversi, rappresentativi dei 7 per allestire il pool; A, ANK R, RCC

I risultati (Fig. 45) mostrano che il pattern proteico dei microdomini risulta semplificato rispetto all'omogenato tissutale, che ci sono differenze evidenti tra MD di RCC e di ANK e che questo è riproducibile.

Abbiamo quindi deciso di riunire i campioni in due pool per analizzarli tramite la spettrometria di massa al fine di ottenere una sufficiente quantità di materiale per le analisi, minimizzando inoltre l'effetto di eventuali differenze intra-individuali.

Le proteine sono state separate tramite 1DE in un gel al 4-12% e in un gel al 12% di poliaccrilammide (Fig. 46) al fine di ottenere una risoluzione ottimale sia per le proteine ad alto sia basso peso molecolare; dopo colorazione CBB, le bande presenti nel gel sono state excise in modo contiguo al fine di includere, per quanto possibile, l'intera banda, sono state sottoposte a digestione con tripsina ed analizzate mediante LC-ESI-MS/MS.

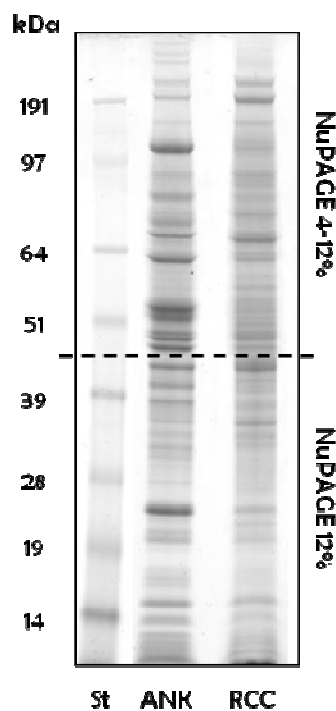


Figura 46. Profili SDS-PAGE di pools di microdomini derivati dal tessuto tumorale (RCC) e normale (ANK) di 7 pazienti.

L'analisi ha portato all'identificazione di 98 e 93 proteine nei microdomini di ANK e RCC rispettivamente (Tab. 10).

Tra le proteine identificate 42 sono in comune tra ANK e RCC, mentre 56 proteine sono state identificate unicamente nei microdomini del tessuto sano e 51 in quelli del tessuto tumorale, lasciando aperta la possibilità che alcune di queste proteine siano presenti a livelli differenziali tra sano e tumore (Fig. 47).

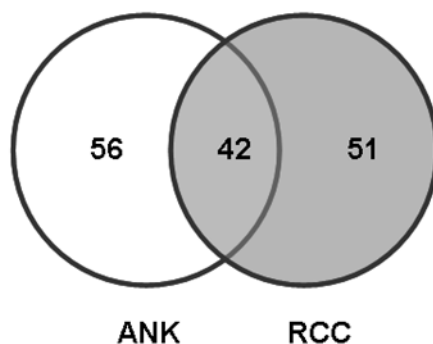


Figura 47. Diagramma di Venn rappresentate le sovrapposizioni delle proteine identificate nei microdomini RCC e ANK.

Tabella 10. Elenco delle proteine identificate mediante LC-ESI-MS/MS nei pool di MD ANK e RCC.

BANDA #	NOME	MASSA (Da)	ACC. CODE	IDENTIFICATA IN		LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE
				RCC	ANK	
1	Cytochrome c oxidase polypeptide 7A2	9390	P14406	X	X	MD/MITO
1	Guanine nucleotide-binding protein subunit $\gamma$ -12	8115	O9UBI6		X	MD/PM
1	Neutrophil defensin 1	10536	P59665	X		ALTRO(SECRETA)
2	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	9900	O14949		X	ALTRO(MITO)
2	Cytochrome c oxidase polypeptide 7A1	9169	P24310		X	MD/MITO
2	Cytochrome c oxidase polypeptide Vic	8776	P09669	X	X	MEMBRANA MITO
2	NADH dehydrogenase 1 $\alpha$ subcomplex subunit 4	9421	O00483		X	MD/MITO
2	Sodium/potassium-transporting ATPase $\gamma$ chain	7336	P54710		X	MEMBRANA
3	Cytochrome c oxidase subunit 7A-related protein	12664	O14548		X	MD/MITO
3	Cytochrome c oxidase subunit VIb isoform 1	10414	P14854	X	X	MEMBRANA MITO
3	Protein S100-A8	10885	P05109	X		MEMBRANA
4	Cytochrome c oxidase subunit 5A	16923	P20674	X		MD/MITO
4	Cytochrome c oxidase subunit 5B	13915	P10606	X	X	MD/MITO
5	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	13522	P14927		X	MD/MITO
5	NADH dehydrogenase 1 $\alpha$ subcomplex subunit 5	13507	Q16718	X	X	MD/MITO
5	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 5	12737	O43920		X	MD/MITO
6	NADH dehydrogenase 1 $\alpha$ subcomplex subunit 6	15127	P56556		X	MD/MITO
6	NADH dehydrogenase 1 $\alpha$ subcomplex subunit 7	12601	O95182		X	MD/MITO
6	NADH dehydrogenase 1 $\beta$ subcomplex subunit 4	15256	O95168		X	MD/MITO
6	V-type proton ATPase subunit G 1	13863	O75348		X	MD/PM
7	CD59 glycoprotein	14795	P13987	X		MD/PM
8	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1	19621	P13073	X	X	MD/MITO
8	Hemoglobin subunit $\beta$	16102	P68871	X		ALTRO(CITOPLASMA)
8	Microsomal glutathione S-transferase 3	16734	O14880	X	X	MEMBRANA
8	NADH dehydrogenase 1 $\alpha$ subcomplex subunit 13	16688	Q9PoJo	X	X	MD/MITO
9	Protein MAL2	19341	Q969L2	X		MD/PM
10	NADH dehydrogenase 1 $\alpha$ subcomplex subunit 12	17104	Q9UI09		X	MD/MITO
10	RasGAP-activating-like protein 1	90855	O95294		X	MEMBRANA
11	Transcription initiation factor TFIID subunit 4B	91832	Q92750	X	X	ALTRO(CITOPLASMA)
12	NADH dehydrogenase 1 $\beta$ subcomplex subunit 8	21865	O95169		X	MEMBRANA MITO
16	Cytochrome c oxidase subunit 2	25719	P00403	X	X	MEMBRANA MITO
17	A-crystallin B chain	20146	P02511	X	X	ALTRO(CITOPLASMA)
17	NADH dehydrogenase 1 $\beta$ subcomplex subunit 10	21048	O96000		X	MEMBRANA MITO
17	Ras-related protein Rab-1B	22171	Q9HoU4	X		MD/PM
17	Caveolin-1	20630	Q03135	X	X	MD/PM
19	Aquaporin-1	28736	P29972	X	X	MD/PM
19	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske	29934	P47985	X	X	MD/MITO
19	NADH dehydrogenase flavoprotein 2	27659	P19404	X	X	MD/MITO
20	Actin, cytoplasmic 1	42052	P63267	X	X	ALTRO(CITOPLASMA)
21	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 3	30337	O75489	X	X	MD/MITO
22	Coiled-coil-helix domain-containing protein 3	26421	Q9NX63	X	X	ALTRO(CITOPLASMA)
24	Prohibitin	29843	P35232	X		MD/MITO
24	Thy-1 membrane glycoprotein	18151	P04216	X	X	MD/PM
24	V-type proton ATPase subunit D	28245	Q9Y5K8		X	MD/PM
24	V-type proton ATPase subunit E 1	26186	P36543		X	MD/PM
25	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	31882	P27105		X	MD/PM
25	Putative uncharacterized protein LOC439951	22292	Q8NDZ9	X		ALTRO

BANDA #	NOME	MASSA (Da)	ACC. CODE	IDENTIFICATA IN		LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE
				RCC	ANK	
25	Tricarboxylate transport protein	34333	P53007		X	MEMBRANA MITO
25	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	30981	Q9Y277	X	X	MD/MITO
26	Prohibitin-2	33276	Q99623	X	X	MD/MITO
26	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	30868	P21796	X	X	MD/MITO
28	60S acidic ribosomal protein Po-like	34364	Q8NHW5	X		ALTRO(CITOPLASMA)
28	Guanine nucleotide-binding protein subunit $\beta$ -1	38151	P62873	X	X	MD/PM
28	Guanine nucleotide-binding protein subunit $\beta$ -2	38048	P62879	X		MD/PM
28	NADH dehydrogenase 1 $\alpha$ subcomplex subunit 9	42654	Q16795		X	MD/MITO
28	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	32060	P45880	X	X	MD/MITO
29	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36201	P04406	X		MD/PM
29	NADH dehydrogenase 1 $\alpha$ subcomplex subunit 10	41067	O95299		X	ALTRO(MITO)
29	V-type proton ATPase subunit d 1	40759	P61421	X	X	MEMBRANA
30	Guanine nucleotide-binding protein $\alpha$ -2 subunit	40995	P04899	X	X	MD/PM
30	Hydroxyacid oxidase 2	39384	Q9NYQ3		X	ALTRO(PEROXISOME)
30	Stomatin-like protein 2	38534	Q9UJZ1		X	MD/PM
31	Erlin-1	39072	O75477		X	MD/PM
31	Erlin-2	38044	O94905	X		MD/PM
31	V-type proton ATPase subunit C 1	44085	P21283		X	MD/PM
32	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	48584	P22695	X	X	MD/MITO
32	Isocitrate dehydrogenase	51333	P48735		X	ALTRO(MITO)
32	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 2	52911	O75306	X	X	MD/MITO
33	Flotillin-2	41830	Q14254	X	X	MD/PM
33	Trifunctional enzyme subunit $\beta$	51547	P55084		X	ALTRO(MITO)
34	ATP synthase subunit $\beta$	56525	P06576		X	MD/MITO
34	Cytochrome b-c1 complex subunit 1	53297	P31930	X	X	MD/MITO
34	Dipeptidase 1	46101	P16444		X	MD/PM
34	Elongation factor 1- $\alpha$ 1	50451	P68104		X	ALTRO(CITOPLASMA)
34	Flotillin-1	47554	O75955	X	X	MD/PM
34	NADH dehydrogenase flavoprotein 1	51469	P49821	X	X	MD/MITO
34	Solute carrier family 2 member 1	54083	P11166	X		MEMBRANA
34	Tubulin $\alpha$ -1A chain	50788	Q71U36	X		CITOSCHELETRO
35	Basigin	42573	P35613	X	X	MD/PM
35	Cell cycle control protein 5 oA	41057	Q9NV96	X		MEMBRANA
35	Dihydrolipoyl dehydrogenase	54713	P09622	X	X	ALTRO(MITO)
35	Ig $\gamma$ -1 chain C region	36596	P01857	X		ALTRO(SECRETA)
35	Monocyte differentiation	40678	P08571	X		MEMBRANA
35	Sorting and assembly machinery component 50	52342	Q9Y512	X		MEMBRANA MITO
35	Tubulin $\beta$ -2C chain	50255	P68371	X		CITOSCHELETRO
35	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A	49152	Q9UN37		X	MEMBRANA
35	V-type proton ATPase subunit H	56417	Q9UI12		X	MD/PM
36	14-3-3 protein $\gamma$	28456	P61981	X		ALTRO(CITOPLASMA)
36	ATP synthase subunit $\alpha$	59828	P25705	X	X	MD/MITO
36	HLA class II histocompatibility antigen	30331	Q5Y7A7	X		MEMBRANA
36	Metaxin-2	30086	O75431	X		MEMBRANA MITO
36	Protein ERGIC-53	57798	P49257	X		MEMBRANA
36	Tyrosine-protein kinase Lyn	58993	P07948	X		MEMBRANA
36	UDP-glucuronosyltransferase 2B7	61168	P16662		X	MEMBRANA
36	Vimentin	53676	P08670	X		CITOSCHELETRO

BANDA #	NOME	MASSA (Da)	ACC. CODE	IDENTIFICATA IN		LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE
				RCC	ANK	
36	V-type proton ATPase subunit B, kidney isoform	57196	P15313	X	X	MD/PM
37	Myeloperoxidase	84784	P05164	X		ALTRO(LISOSOMI)
37	V-type proton ATPase subunit B	56807	P21281		X	MD/PM
38	Pyruvate kinase isozymes R/L	62191	P30613	X		ALTRO(CITOPLASMA)
38	Radixin	68635	P35241	X		MD/PM
39	Dynein heavy chain 7	461142	Q8WXXo		X	CITOSCHELETRO
39	Ezrin	69484	P15311	X		MD/PM
39	Sodium/glucose cotransporter 2	73932	P31639		X	MEMBRANA
40	ATP-binding cassette sub-family D member 3	75941	Q99758		X	MEMBRANA
40	Iodotyrosine dehalogenase 1	33510	Q6PHWo		X	MEMBRANA
40	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	70745	P49748		X	ALTRO(MITO)
41	Serum albumin	71317	P02768	X		ALTRO(SECRETA)
41	V-type proton ATPase catalytic subunit A	68660	P38606	X	X	MD/PM
42	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	75114	Q75746	X		ALTRO(MITO)
42	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	74528	Q9UJSO	X	X	ALTRO(MITO)
42	Sodium-coupled monocarboxylate transporter 2	68629	Q1EHB4		X	MEMBRANA
43	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	57611	P05186		X	MD/PM
44	Moesin	67892	P26038	X		MD/PM
44	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	80443	P28331	X	X	MD/MITO
44	Platelet glycoprotein 4	53589	P16671	X		MD/PM
45	Band 3 anion transport protein	102013	P02730	X		MD/PM
45	Mitochondrial inner membrane protein	84026	Q16891	X	X	ALTRO(MITO)
45	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	97148	Q93050		X	MD/PM
45	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 4	97207	Q9HBG4	X		MD/PM
45	Xaa-Pro aminopeptidase 2	76090	Q43895		X	MEMBRANA
46	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit $\alpha$ -1	114135	P05023	X	X	MD/PM
46	Uromodulin	72451	P07911		X	MD/PM
47	Catenin $\alpha$ -1	100693	P35221	X		MEMBRANA
47	Desmoplakin	334021	P15924		X	CITOSCHELETRO
47	Potassium-transporting ATPase $\alpha$ chain 1	115756	P20648		X	MEMBRANA
48	Angiotensin-converting enzyme	92860	Q9BYF1		X	MEMBRANA
48	Dipeptidyl peptidase 4	88907	P27487	X	X	MD/PM
48	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	114564	Q13423		X	OTHER(MITO)
49	GTP-binding protein 2	66468	Q9BX10		X	MD/PM
50	Aminopeptidase N	109870	P15144	X	X	MD/PM
50	Ceruloplasmin	122983	P00450	X		ALTRO(SECRETA)
50	Ectonucleotide pyrophosphatase family member 3	101998	Q14638	X	X	MEMBRANA
50	Multidrug resistance protein 1	141772	P08183	X		MD/PM
50	Netrin-G1	72702	Q9HCJ2	X		MEMBRANA
50	Voltage-dependent calcium channel subunit $\alpha$ -2/ $\delta$ -1	124246	P54289	X		MD/PM
51	Myosin-VI	150965	Q9UM54		X	ALTRO(GOLGI)
54	Myosin-10	229827	P35580	X		ALTRO(CITOPLASMA)
54	Myosin-11	228054	P35749	X		ALTRO(CITOPLASMA)
54	Myosin-14	228889	Q7Z406	X		ALTRO(CITOPLASMA)
54	Myosin-9	227646	P35579	X	X	CITOSCHELETRO
55	Filamin-A	283301	P21333	X		CITOSCHELETRO

BANDA #	NOME	MASSA (Da)	ACC. CODE	IDENTIFICATA IN		LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE
				RCC	ANK	
55	Spectrin $\alpha$ chain	285163	Q13813	X		CITOSCHELETRO
56	Maltase-glucoamylase	211031	O43451		X	MD/PM
56	Plectin-1	533462	Q15149	X		CITOSCHELETRO
57	Cubilin	407195	O60494		X	MD/PM

La localizzazione subcellulare delle proteine identificate, assegnata in base al database UniProtKB di ExPASy, mostra come la maggioranza delle proteine (77% e 72% in ANK e RCC rispettivamente)

sia associata alla membrana (Fig. 48). Tra le proteine di membrana sono presenti specie sia integrali di membrana sia periferiche associate tramite interazioni con lipidi o ancora GPI e molte sono già state descritte come associate ai microdomini, come ad esempio le *Ras related protein*, la Dipeptidil dipeptidase 4, la proteina MAL2 e CD59 [Erne B *et al.*, 2002; Pechlivanis M & Kuhlmann J, 2006; Riquier AD *et al.*, 2009, Parkin ET *et al.*, 2001].

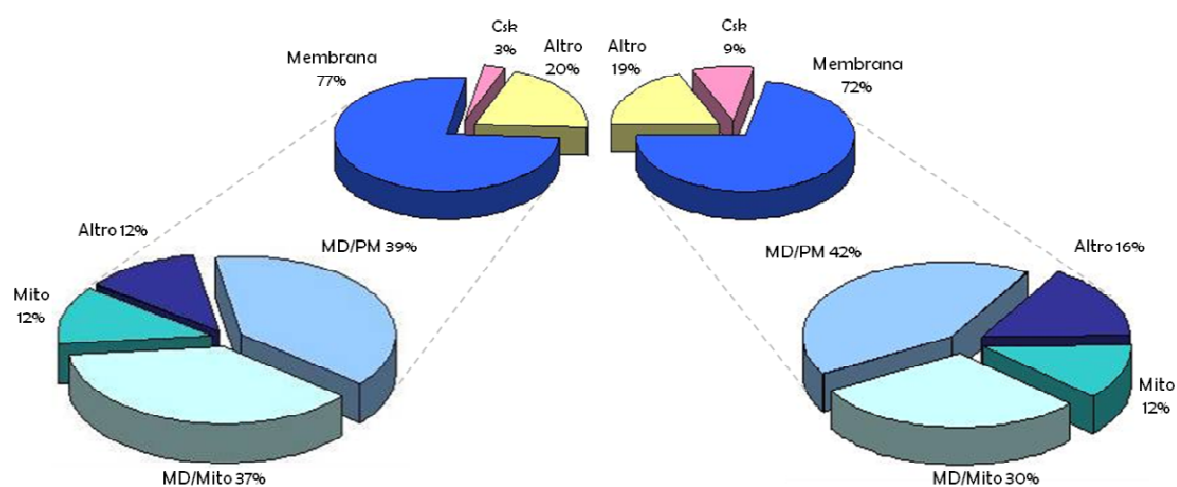


Figura 48. Grafico a torta che rappresenta la localizzazione subcellulare delle proteine identificate basata su ExPASy e sulla letteratura; Csk: citoscheletro, Mito: mitocondri, PM: plasma membrana.



La stessa indicazione viene dall'analisi del grafico di idropaticità (Fig.49) il quale mostra che circa il 70% delle proteine risulta idrofobica in base all'assegnazione dello score GRAVY [Kyte j & Doolittle RF, 1982]. Questi risultati validano ulteriormente la qualità del nostro protocollo di sub frazionamento.

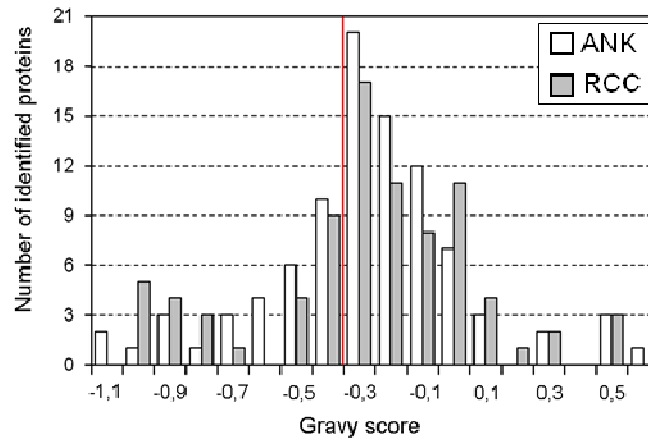
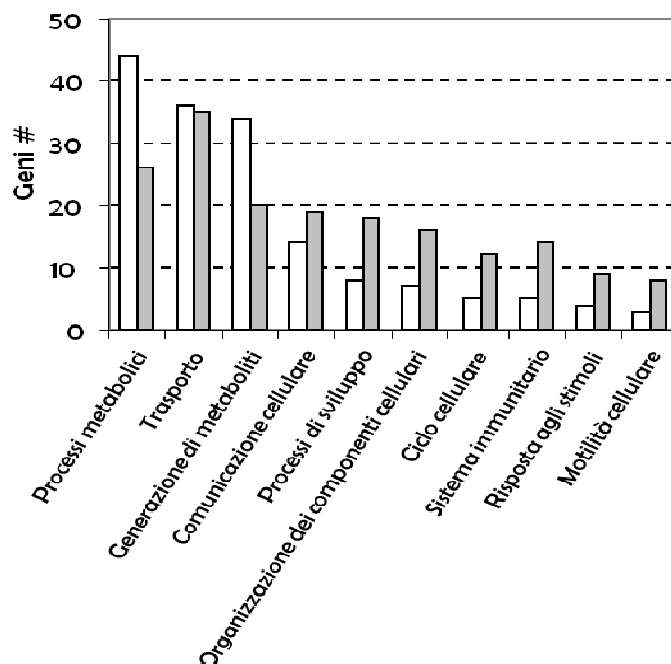


Figura 49. Distribuzione dello score di idropaticità (GRAVY) delle proteine identificate. La linea rossa rappresenta il cut-off per l'idrofobicità.

Dalla localizzazione subcellulare risulta evidente la presenza di molte proteine mitocondriali nella frazione dei microdomini, problema condiviso e molto dibattuto in letteratura. Infatti molti lavori riportano queste identificazioni [Kim BW *et al.*, 2010; Browman DT *et al.*, 2007; Herrera JL *et al.*, 2011; Panfoli I *et al.*, 2011] con interpretazioni differenti; alcuni autori imputano la presenza di queste proteine a una contaminazione, mentre altri sostengono la correttezza di questa origine subcellulare [Banfi C *et al.*, 2006; Ziolkowski W *et al.*, 2010]. Infatti è stata dimostrata sia la presenza di microdomini nelle membrane mitocondriali sia la presenza e la funzionalità nei microdomini della membrana plasmatica di proteine mitocondriali come i componenti del sistema della fosforilazione ossidativa e VDAC [Kim BW *et al.*, 2010].

I nostri dati suggeriscono che svariate proteine mitocondriali siano veramente presenti sulla superficie cellulare, probabilmente come seconda localizzazione preferenziale, anche se non possiamo escludere la presenza di una piccola quota di contaminazione.

Da un punto di vista funzionale, abbiamo identificato proteine coinvolte nella trasduzione del segnale (Ras related protein), canali (aquaporina 1), trasportatori (glicoproteina P) e componenti strutturali del citoscheletro (spettrina). Analizzando le nostre liste di proteine con PantherDB, uno



strumento online per la classificazione dei geni in base alle classi di GeneOntology, abbiamo ottenuto il grafico mostrato nella figura 50.

Figura 50. Numero di geni coinvolti nei processi biologici indicati secondo la classificazione operata dal software online PantherDB

Oltre ai processi metabolici in cui molte proteine risultano coinvolte a causa dell'alto numero di enzimi identificati, le proteine sono state attribuite a funzioni caratteristiche della membrana quali il trasporto e la comunicazione cellulare. Inoltre il numero di geni coinvolti nei diversi processi biologici è in qualche modo diverso tra ANK e RCC, rimarcando le differenze del profilo proteico.

#### 4.2.4 Valutazione del contenuto differenziale di alcune proteine nei microdomini di membrana isolati da tessuto tumorale

Dal momento che i profili proteici dei microdomini isolati da tessuto sano e presentano significative differenze, dato poi confermato anche dalle nostre analisi MS, ci siamo proposti di indagare in maniera più approfondita tali variazioni ricercando, mediante WB ed immunodecorazione con anticorpi specifici, la presenza e l'eventuale contenuto differenziale di specifiche proteine di membrana selezionate come particolarmente interessanti in quanto già

note come proteine dei microdomini, o perché espresse a livello renale e/o perché già riportate in alcuni studi in letteratura come proteine coinvolte nella tumorigenesi (non solo nel RCC).

Il canale anionico voltaggio dipendente (VDAC) forma un canale attraverso la membrana mitocondriale esterna e anche la membrana plasmatica che permette la diffusione di piccole molecole idrofiliche. Nella membrana plasmatica è coinvolta anche nella regolazione del volume cellulare e dell'apoptosi. Potrebbe partecipare alla formazione del complesso del poro transitoria di permeabilità (*permeability transition pore complex*, PTPC) responsabile del rilascio di prodotti mitocondriali che guidano l'apoptosi. Proprio il suo ruolo centrale nell'apoptosi può essere il motivo dell'overespressione di questa proteina in molti tipi di tumore [Nawarak J *et al.*, 2009].

La glicoproteina di membrana THY 1 è una proteina periferica di membrana dotata di ancora GPI espressa in molti tipi cellulari inclusi linfociti T, timociti, neuroni, cellule endoteliali e fibroblasti. L'attivazione di THY1 può indurre l'attivazione dei linfociti T, ma questa proteina ha anche svariati ruoli non immunologici quali l'adesione cellulare, la crescita tumorale, la migrazione e la morte cellulare [Reg, TA & Hagood JS, 2006]. La sua localizzazione a livello dei lipid rafts è nota e dipende dall'ancora GPI. È stato recentemente riportato che i suoi livelli aumentano significativamente nel cancro alla prostata [True LD *et al.*, 2010].

La dipeptidasi renale 1 (DPEP) è una metallopeptidasi zinco-dipendente di membrana coinvolta nell'idrolisi di una grande varietà di dipeptidi ed implicata nel metabolismo renale del glutatione e dei suoi coniugati [Toiyama Y *et al.*, 2011]. Questo enzima risulta fortemente overespresso a livello del tessuto tumorale nel cancro colonrettale rispetto al tessuto sano di controllo e la sua espressione è negativamente correlata con fattori che riflettono la progressione della malattia [Toiyama Y *et al.*, 2011]. La DPEP, essendo una metallodipeptidasi di membrana con ancora GPI, potrebbe giocare un ruolo nella degradazione delle componenti della matrice extracellulare, favorendo l'invasività tumorale e la formazione di metastasi a distanza anche nel caso del RCC [McEver CM *et al.*, 2004].

La P-glicoprotein (PgP) è un trasportatore di membrana appartenente alla superfamiglia dei trasportatori ABC. Sebbene il ruolo fisiologico di PgP non sia ancora chiaro, pare che sia implicata nella detossificazione da prodotti batterici e nella secrezione di ormoni e cataboliti. Inoltre sembrerebbe responsabile del fenomeno della resistenza multi farmaco (MDR o multidrug resistance) in molti tumori umani a causa dell'aumentata estrusione dei farmaci dalla cellula. C'è inoltre una evidenza sostanziale che l'espressione tissutale di PgP sia di significato prognostico in molti tipi di neoplasie [Soto-Vega E *et al.*, 2008].

Sono inoltre state scelte l'aquaporina 1 (AQP<sub>1</sub>) e EMMPRIN di cui abbiamo già discusso parlando degli exosomi urinari e i marcatori dei microdomini caveolina (CAV<sub>1</sub>) e flotillina (FLOT<sub>1</sub>), in quanto era già nota una loro presenza differenziale nei tessuti RCC [Liang YX *et al.*, 2009; Magni F *et al.*, 2008].

Abbiamo prima di tutto confermato tramite EF e immunodecorazione con anticorpi specifici, la localizzazione preferenziale nei microdomini di queste proteine: VDAC, AQP<sub>1</sub>, DPEP, CAV<sub>1</sub>, FLOT<sub>1</sub>, THY<sub>1</sub> e PgP [Ticozzi-Valerio D *et al.*, 2007; Rege TA & Hagood JS, 2006; Ramirez CM *et al.*, 2009; Garner AE *et al.*, 2007; Klappe K *et al.*, 2009].

Inoltre abbiamo dimostrato per la prima volta la localizzazione nei microdomini di EMMPRIN. Abbiamo anche verificato tramite EF e immunodecorazione con anticorpi specifici, se il contenuto di queste proteine fosse differenziale nei microdomini RCC rispetto ad ANK, concludendo che VDAC, THY<sub>1</sub>, EMMPRIN, CAV<sub>1</sub> e FLOT<sub>1</sub> risultano presenti a livelli significativamente più alti nei MD isolati dal tessuto tumorale rispetto al tessuto sano, mentre AQP<sub>1</sub> e DPEP, proteine caratteristiche del rene sano, sono downregolate negli MD RCC in modo statisticamente rilevante, probabilmente a causa della perdita di differenziazione caratteristica delle cellule tumorali (Fig. 51).

Per quanto riguarda PgP la situazione è più complessa in quanto è presente a livelli minori nell'omogenato tissutale tumorale rispetto al sano, come riportato in letteratura [Zilkowski W *et al.*, 2010], ma il suo livello cresce nella frazione arricchita in microdomini RCC raggiungendo livelli comparabili ad ANK o addirittura superiori anche se non in modo statisticamente significativo.

Lo stesso discorso vale anche per VDAC e EMMPRIN, il cui livello non è differenziale tra RCC e ANK nell'omogenato tissutale, ma risulta aumentato nei microdomini RCC. Quindi la composizione dei microdomini tumorali è specificatamente alterata, anche per proteine la cui espressione differenziale non è apprezzabile nell'omogenato tissutale (Fig. 51).

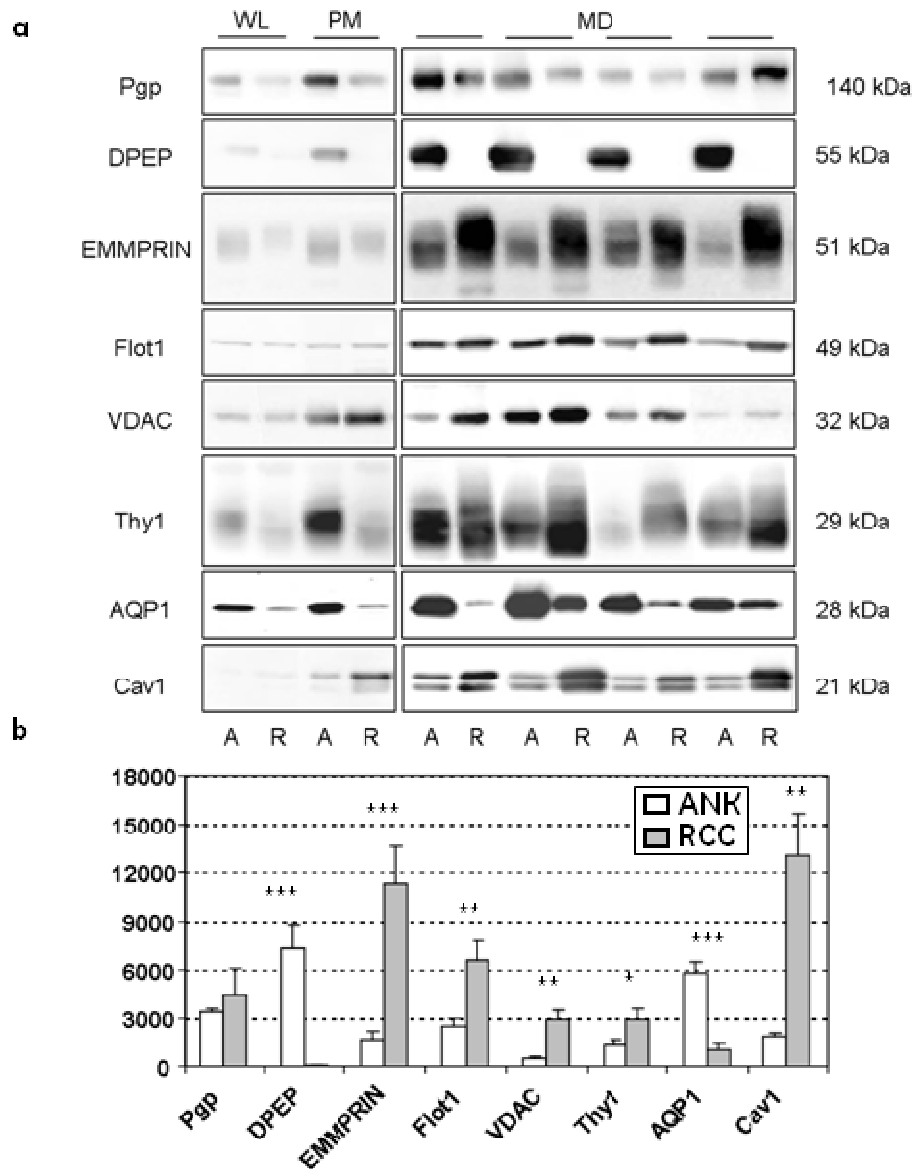


Figura 51. Contenuto differenziale di un pannello di proteine identificate in MD ANK e RCC; a) l'abbondanza di alcune proteine identificate è stata verificata tramite EF/IB in MD ANK (A) e RCC (R), rispetto all'omogenato tissutale (*Whole lysate*, WL) e alla frazione arricchita in plasma membrane (PM); b) Analisi densitometrica delle bande in seguito a normalizzazione sulla colorazione con rosso Ponceau (\*=p-value < 0.05, \*\*=p-value < 0.01, \*\*\*=p-value < 0.005).

È interessante anche notare come AQP1 risulti presente a livelli più bassi sia nei microdomini sia negli esosomi tumorali in confronto ai controlli sani, mentre EMMPRIN appare aumentato nei microdomini RCC, ma diminuito negli esosomi RCC rispetto ai controlli. Questo potrebbe significare che la trasformazione neoplastica non cambia la produzione globale della proteina

EMMPRIN, ma porta a dei riarrangiamenti e a delle modificazione della sua distribuzione nei diversi compartimenti subcellulare con un arricchimento nei microdomini di membrana a scapito per esempio degli exosomi. Questa diversa organizzazione della membrana e composizione proteica potrebbe riflettere, o essere persino dovuta, a una diversa composizione a livello dei lipidi da cui dipendono le caratteristiche chimico-fisiche dei MD che influenzano l'indirizzamento delle proteine a questi compartimenti.

In conclusione la composizione globale dei microdomini isolati da tessuto renale è profondamente e riproducibilmente diversa da quella dei microdomini isolati da tessuto sano e lo studio di queste differenza potrebbe supportare l'identificazioni di nuovi biomarcatori per questa patologia.

## 4.3 NEFROPATIA DIABETICA

### 4.3.1 Casistica

Il diabete di tipo I è stato indotto in 10 ratti Sprague Dawley tramite iniezione di streptozotocina, mentre i ratti controllo (CTRL) hanno subito solo iniezione di soluzione tampone. Tra i 10 ratti diabetici (D), 4 vengono trattati cronicamente con insulina (DI). Dopo tre mesi dall'iniezione, per permettere lo sviluppo del diabete e della nefropatia diabetica, sono state raccolte per due volte le urine durante le 24 ore e sono stati isolati gli exosomi tramite UC. Per monitorare l'effettiva insorgenza del diabete e l'efficacia del trattamento con insulina sono stati misurati la glicemia il peso e la proteinuria di tutti i ratti (Tab.11).

Tabella 11. Glicemia, peso, proteinuria e proteine totali negli exosomi dei ratti modello di diabete di tipo I, nei diabetici trattati con insulina dei corrispondenti controlli sani.

CODICE RATTO	GLICEMIA (mg/dl)	PESO (g)	PROTEINURIA (mg/24h)	PROTEINE TOTALI (µg/ml) 1° raccolta	PROTEINE TOTALI (µg/ml) 2° raccolta
C 08.92	115	654	224,02	4,20	7,00
C 08.93	110	590	212,85	2,97	8,88
C 08.94	95	480	191,81	2,10	4,31
C 08.95	107	528	65,5	2,50	5,74
D 08.72	405	425	381,66	0,15	0,78
D 08.73	262	440	544,03	2,20	1,46
D 08.74	340	467	298,03	0,87	0,71
D 08.75	404	415	397,45	0,89	0,34
D 08.76	292	438	101,53	1,65	10,58
D 08.77	325	389	412,3	0,48	1,44
DI 08.85	254	594	128,28	1,72	8,60
DI 08.86	283	586	55,31	2,27	3,86
DI 08.88	53	495	98,25	3,63	0,67
DI 08.91	68	453	39,03	1,74	4,94

Come atteso la glicemia e la proteinuria sono più alte in modo statisticamente significativo nei ratti diabetici sia rispetto ai controlli sia rispetto ai diabetici trattati con insulina, mentre non ci sono differenze tra questi ultimi due gruppi. Inoltre i ratti diabetici mostrano una significativa perdita di peso, che è uno dei più comuni sintomi del diabete di tipo I non trattato (Fig. 52). Si può quindi concludere che il modello è valido sia per quanto riguarda i ratti diabetici che i diabetici in

terapia con insulina, che rispondono bene al trattamento raggiungendo una condizione più simile ai controlli che ai diabetici per tutti i parametri in analisi.

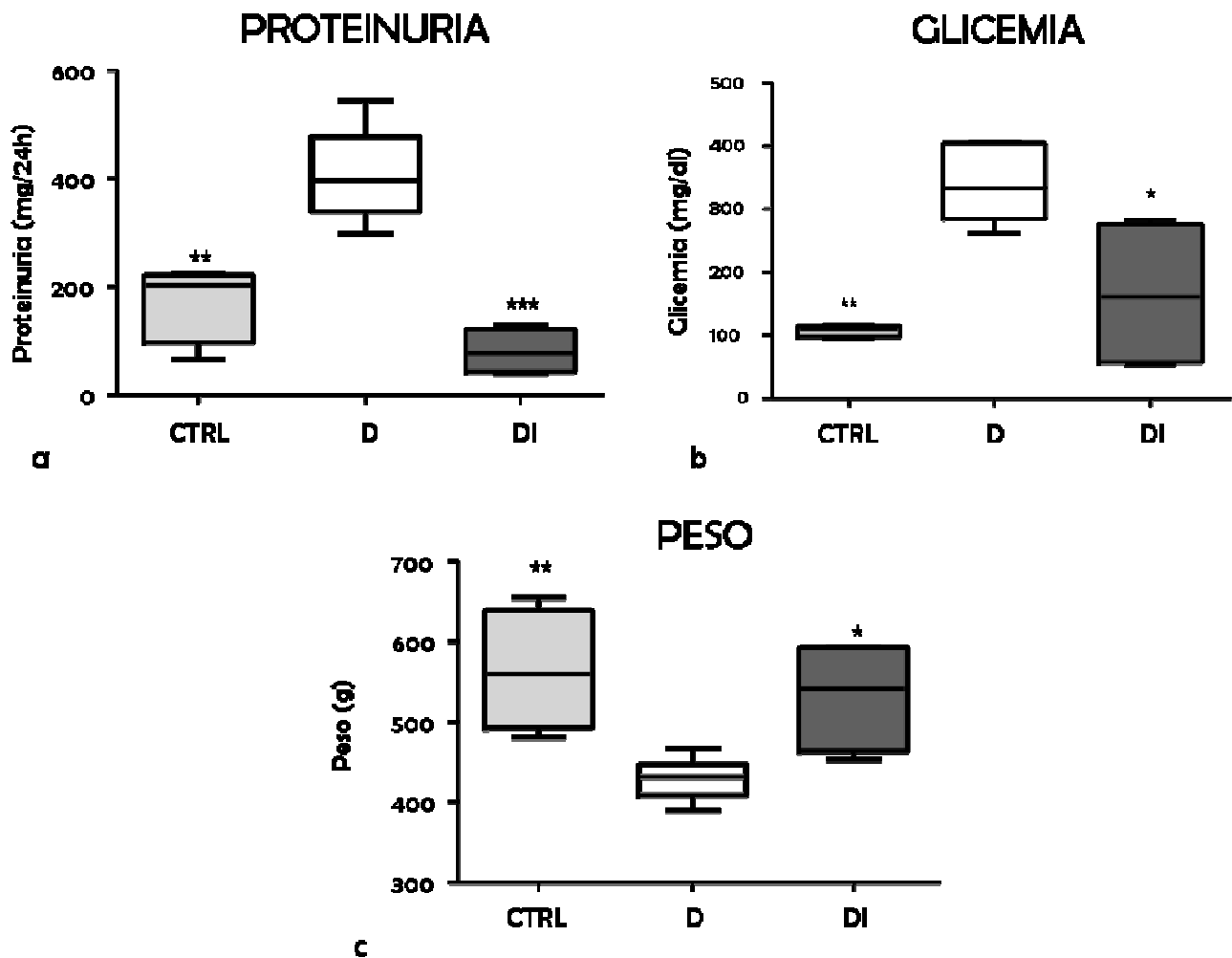


Figura 52. a) Box plot rappresentante i dati relativi alla proteinuria dei ratti diabetici, controllo e diabetici trattati con insulina (\*\*p-value < 0.01 CTRL vs D; \*\*\*p-value < 0.005 DIvsD) b) Box plot che raffigura la glicemia dei ratti diabetici, controllo e diabetici trattati con insulina (\*p-value < 0.05 DI vs D; \*\*p-value < 0.01 CTRLvsD) c) Box plot relativo al peso dei ratti in esame (\*p-value < 0.05 DI vs D; \*\*p-value < 0.01 CTRL vs D).



Abbiamo poi misurato la quantità di proteine negli exosomi ottenuti per millilitro di urine di partenza. La figura 53 mostra che la quantità di proteine ottenuta dagli exosomi isolati da un millilitro di urine è significativamente maggiore nei controlli e nei diabetici trattati con insulina rispetto ai diabetici, dato che si può facilmente spiegare tenendo presente che i diabetici sono poliurici e quindi la quota exosomi prodotta (verosimilmente confrontabile tra CTRL, DI e D) sarà rilasciata in un volume di urine molto maggiore, risultando quindi diluita. La quantità di proteine exosomal non è influenzata quindi dalla elevata proteinuria dei diabetici e quindi il contenuto proteico di queste vescicole non rispecchia le differenze a livello di escrezione glomerulare tra diabetici e non, ma le eventuali diversità potrebbero riflettere alterazioni a livello del tessuto renale dalle cui cellule derivano gli exosomi urinari ed esser quindi più interessanti per capire i meccanismi molecolari della nefropatia diabetica.

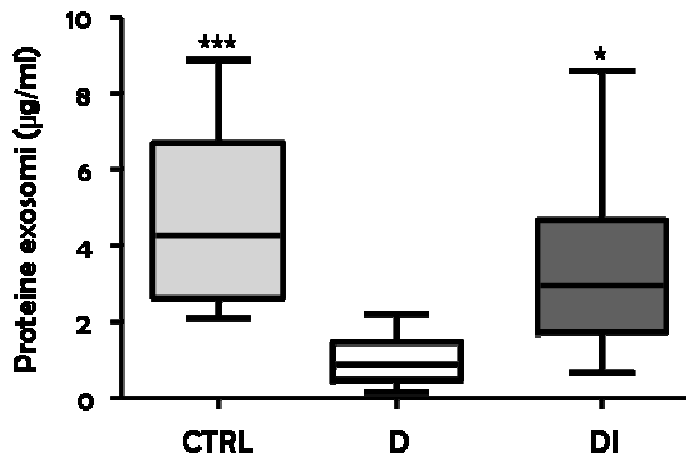


Figura 53. Box plot rappresentate la quantità di proteine degli exosomi ottenuta da un millilitro di urine di partenza (\*p-value < 0.05 DI vs D; \*\*\*p-value < 0.005 CTRL vs D)

#### 4.3.2 Profili proteici degli exosomi urinari

I profili proteici degli exosomi urinari isolati tramite UC dalle urine di ratti modello di diabete di tipo I sono stati analizzati tramite elettroforesi monodimensionale e colorazione CBB. I risultati (Fig. 54) evidenziano la presenza, soprattutto tra le proteine a basso peso molecolare, di alcune differenze macroscopiche nel pattern proteico degli exosomi isolati da ratti D rispetto ai controlli o ai DI e che queste differenze sono riproducibili.

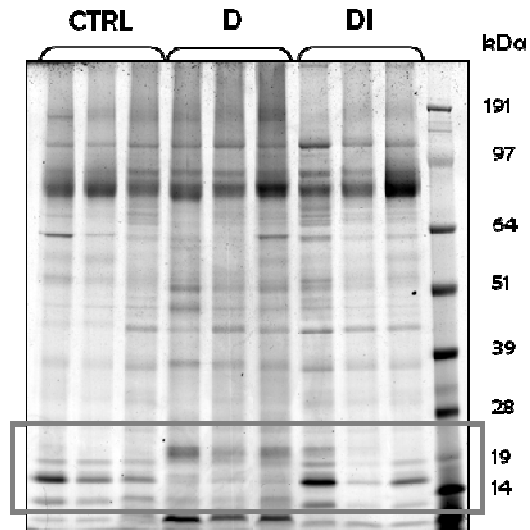


Figura 54. Profili proteici analizzati mediante 1DE, seguita da colorazione con CBB, di campioni di exosomi isolati da urine di ratti D, DI e CTRL. I riquadri indicano alcune differenze evidenti tra i gruppi.

Questo risultato è stato confermato tramite elettroforesi bidimensionale 16-BAC/SDS-PAGE, che separa le proteine in base al loro peso molecolare in entrambe le dimensioni, ma utilizzando due detergenti con caratteristiche sufficientemente diverse a far sì che alcuni spot si distinguano dalla diagonale permettendo un aumento della risoluzione. La figura 55 mostra come, sempre a basso peso molecolare, siano evidenti degli spot differenziali nei i profili degli exosomi isolati da urine di ratti D rispetto a quelli isolati da ratti CTRL o DI, particolarmente evidente è l'assenza di due spot a circa 20 kDa nel gel D.

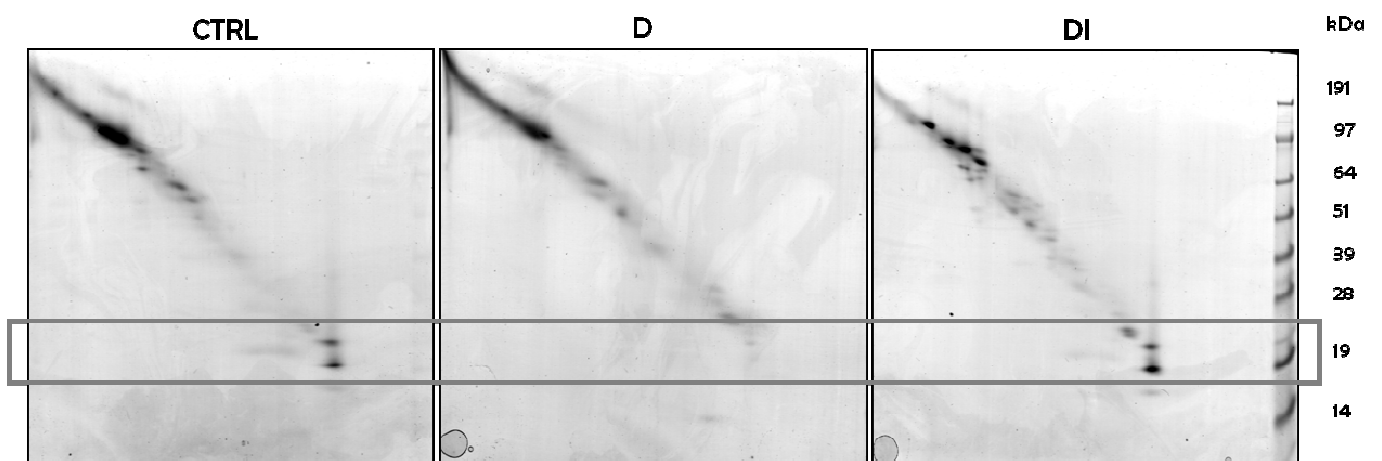


Figura 55. Profili proteici analizzati mediante 2DE 16-BAC/SDS-PAGE, seguita da colorazione con SyproRuby, di campioni di exosomi isolati da urine di ratti D, DI e CTRL. I riquadri indicano alcune differenze evidenti tra i gruppi.

Le bande e gli spot differenziali rispettivamente dell'elettroforesi mono e bidimensionale sono stati excisi dai gel, digeriti con tripsina e analizzati tramite LC-ESI-MS/MS.

#### 4.3.3 Proteomica degli exosomi urinari

Come precedentemente detto, le bande e gli spot differenziali tra D, CTRL e DI sono stati excisi dai gel mono e bidimensionali, digeriti con tripsina e analizzati tramite LC-ESI-MS/MS portando all'identificazione delle proteine riportate nella tabella 12a e b rispettivamente.

Tabella 12a. Proteine identificate nelle bande differenziali dei profili proteici monodimensionali degli exosomi isolati da ratti CTRL (sfondo grigio chiaro), D (sfondo bianco) e DI (sfondo grigio scuro).

BANDA #	NOME	ACC. CODE	MASSA TEORICA (kDa)	MASSA (Da)	SCORE	COP. (%)	PEP. M.	PEP. I.
1	Urinary protein 1	P81827	10	11523	110	28	4	1
1	Ribonuclease UK114	P52759	10	14352	48	31	3	1
2	Major urinary protein	P02761	14	21009	346	63	35	9
3	Urinary protein 2	P81828	17	11630	44	13	1	1
4	Probasin	P15399	20	20995	177	35	18	4
5	Actin, cytoplasmic 1	P60711	45	42052	174	26	17	7
6	Uromodulin	P27590	49	73752	45	4	3	1
2	Major urinary protein	P02761	14	21009	345	53	35	10
4	Cd36 antigen-like	P27615	20	53559	47	2	3	1
4	Membrane-associated guanylate kinase 3	Q9JK71	20	161490	36	2	6	1
5	Actin, cytoplasmic 1	P60711	45	42052	104	30	14	5

Tabella 12b. Proteine identificate negli spot differenziali dei profili proteici bidimensionali degli exosomi isolati da ratti CTRL (sfondo grigio chiaro), D (sfondo bianco) e DI (sfondo grigio scuro).

SPOT	NOME	ACC. CODE	MASSA TEORICA (Da)	MASSA (Da)	SCORE	COP. (%)	PEP. M.	PEP. I.
92-3	Major urinary protein	P02761	17	21009	182	49	24	6
92-20	Urinary protein 1	P81827	10	11523	113	28	4	1
92-1	Major urinary protein	P02761	14	21009	204	48	29	7
77-22	Glutathione transferase alpha-1	S- <b>P00502</b>	25	25705	54	23	10	2
77-22	Membrane-associated guanylate kinase 3	Q9JK71	25	161490	36	3	9	1
77-29	Serum amyloid component	P- P23680	28	26273	221	44	13	5
85-1	Major urinary protein	P02761	14	21009	363	58	85	7
85-3	Major urinary protein	P02761	17	21009	178	48	28	6
85-3	Urinary protein 1	P81827	17	11523	35	28	6	1
85-3	Membrane-associated guanylate kinase 3	Q9JK71	17	161490	35	4	8	1
85-2	Major urinary protein	P02761	14	21009	133	56	24	4

#### Legenda:

- Cov (%): copertura di sequenza in percentuale
- PEP. M.: peptidi matched
- PEP. I.: peptidi identici

Molte delle proteine identificate nel gel sia mono sia bidimensionale appartengono alla famiglia delle lipocaline (es. Urinary protein 1 e 2, Probamina), piccole proteine extracellulari in grado di legare diverse piccole molecole idrofobiche e specifici recettori della superficie cellulare, oltre che di formare complessi con macromolecole solubili [Beynon RJ & Hurst JL, 2004]. La probamina risulta identificata in una banda evidente solo nel pattern proteico degli exosomi diabetici, ma essendo una proteina prodotta prevalentemente dall'epitelio prostatico difficilmente una sua alterazione potrebbe dipendere dalle alterazioni a livello del tessuto renale indotti dalla nefropatia diabetica ed è quindi di scarso interesse per il nostro studio. Potrebbe invece essere interessante l'antigene CD36 che è una glicoproteina di membrana coinvolta anche nell'assorbimento di acidi grassi e lipoproteine. In un primo momento però abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione su un'altra proteina la Major Urinary Protein 1 (MUP1) in quanto è

stata identificata, con elevato score e basandosi su numerosi peptidi identici, nelle bande e negli spot presenti solo nel pattern proteico degli exosomi dei ratti controllo dei diabetici trattati con insulina, mentre è completamente assente negli exosomi di ratti diabetici.

#### **4.3.4 Valutazione del contenuto differenziale della Major urinary protein 1 negli exosomi urinari di ratti modello di diabete**

Dal momento che i profili proteici degli exosomi isolati dai ratti CTRL, D e DI presentano significative differenze, dato poi confermato anche dalle nostre analisi MS, ci siamo proposti di indagare in maniera più approfondita tali variazioni ricercando, mediante WB ed immunodecorazione con anticorpo specifico. Tra le proteine identificate, come detto, abbiamo deciso di approfondire lo studio della Major urinary protein 1 (MUP<sub>1</sub>). La MUP<sub>1</sub> appartiene alla famiglia delle lipocaline, proteine secrete coinvolte nel legame e nel trasporto di ferormoni o altre molecole idrofobiche a basso peso molecolare [Beynon RJ & Hurst JL, 2004]. Inoltre MUP<sub>1</sub> regola il metabolismo lipidico e glucidico suggerendo un suo coinvolgimento nell'iperglicemia, l'insulino-resistenza e/o l'intolleranza al glucosio nel diabete. Infatti è stato recentemente dimostrato che i livelli MUP<sub>1</sub> diminuiscono marcatamente nel fegato e nel sangue di topi diabetici e che la riespressione di MUP<sub>1</sub> in questi topi migliora l'iperglicemia e l'intolleranza al glucosio indipendente dall'insulina, e infine che la sua overespressione inibisce i geni della gluconeogenesi e lipogenesi [Zhou Y *et al.*, 2009]. È stato inoltre dimostrato anche che la MUP<sub>1</sub> è correlata con la sensibilità all'insulina e che riportata la MUP<sub>1</sub> a livelli normali in topi modello di diabete di tipo II viene ridotta la concentrazione di insulina nel sangue, il contenuto lipidico dei muscoli scheletrici mentre viene aumentata la biogenesi dei mitocondri [Hui X *et al.*, 2009]. Il meccanismo con cui MUP<sub>1</sub> regola il metabolismo glucidico e lipidico non è ancora chiaro, ma parte dei suoi effetti potrebbero essere dovuti a una sua influenza a livello nervoso come ferormone.

Il contenuto differenziale di questa proteina è stato valutato tramite Western Blotting ed immunodecorazione con l'anticorpo specifico su campioni rappresentativi di exosomi urinari di ratti diabetici, diabetici trattati con insulina e controlli.

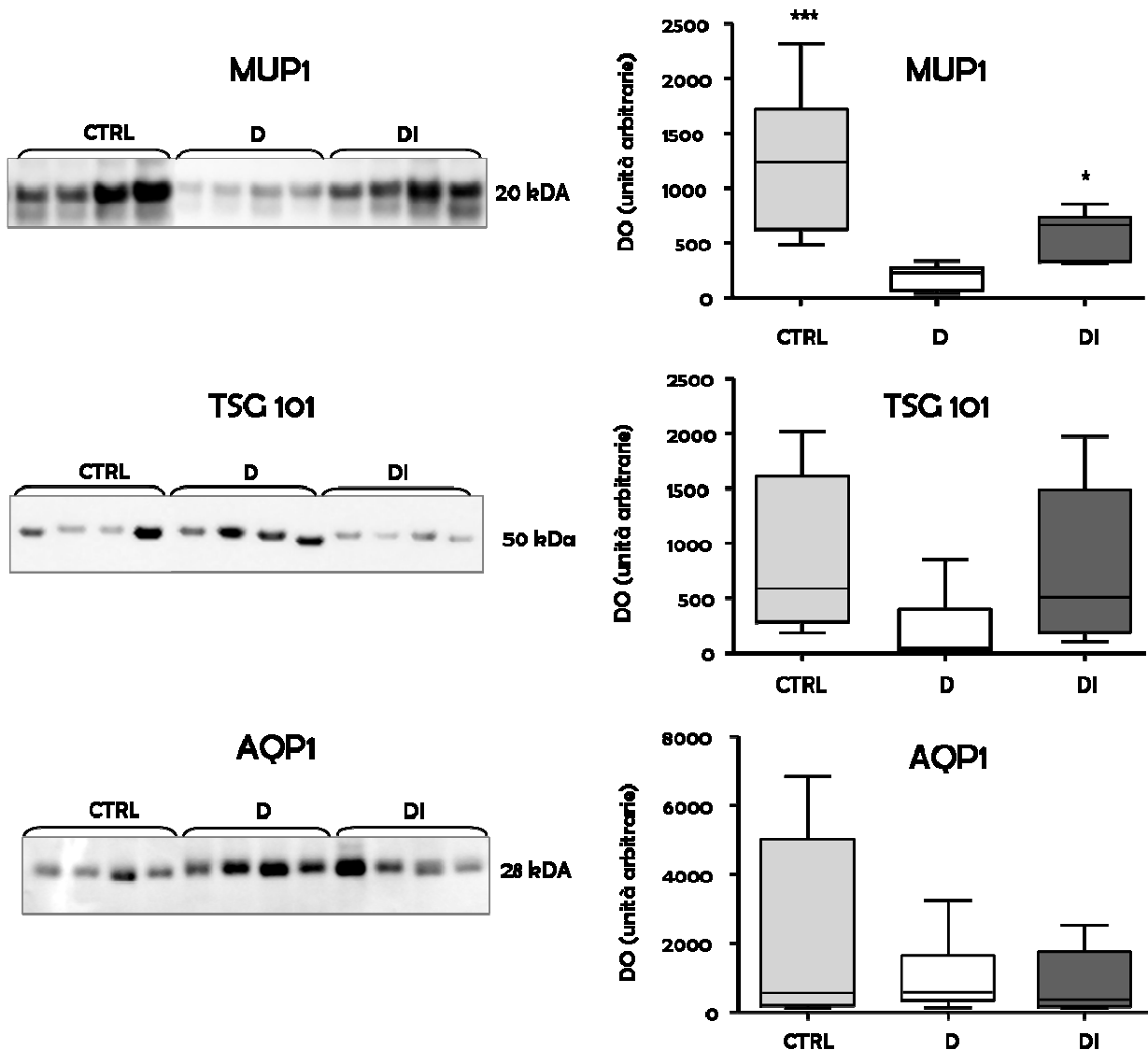


Figura 56. Contenuto della proteine MUP1, TSG 101 e AQP1 in exosomi CTRL, D e DI verificata tramite EF/IB e analisi densitometrica delle bande in seguito a normalizzazione sulla colorazione con rosso Ponceau (\*p-value<0.05 CTRL vs DI; \*\*\*p-value<0.005 CTRL vs D).

Dai risultati, mostrati nella figura 56 possiamo concludere MUP1 risulta contenuta a livelli significativamente più bassi nei campioni di exosomi urinari isolati da ratti D rispetto ai controlli. Il livello di MUP1 negli exosomi isolati da ratti diabetici trattati con insulina risulta intermedio: significativamente più basso rispetto ai CTRL e più alto, ma non in modo statisticamente valido rispetto ai D probabilmente ciò è dovuto al fatto che l'insulina agisce regolando la glicemia, ma non influenza i meccanismi che portano alla down regolazione di MUP1 nel diabete. La diminuzione dei livelli di questa proteina negli exosomi urinari è quindi coerente con quanto visto nel fegato e nel sangue di topi diabetici [Zhou Y *et al.*, 2009; Hui X *et al.*, 2009].

È stata contemporaneamente valutata anche l'espressione di TSG101, noto marcatore exosomale, per verificare che le vescicole presenti nel preparato grezzo ottenuto mediante UC siano effettivamente exosomi. Si può notare sempre dalla figura 56 come TSG101 sia espressa negli exosomi isolati da ratti CTRL, D e DI senza variazioni significative tra i diversi gruppi. Anche i livelli di AQP1 rimangono costanti confrontando gli exosomi di ratti D, DI e CTRL per cui abbiamo deciso di usare anche questa proteina come controllo di caricamento e marcatore degli exosomi urinari di ratto analogamente a quanto proposto in letteratura per aquaporina 2 [Conde-Vancelles *Jet al.*, 2011].

Il contenuto differenziale di MUP1 potrebbe quindi essere proposto come biomarcatore della DN nonché essere coinvolte nel suo meccanismo patogenetico. Nell'uomo non è ancora stata dimostrata l'esistenza di questa proteina anche se esiste un gene omologo per cui è possibile ipotizzare un'analogia funzione nella regolazione del metabolismo e quindi un coinvolgimento nella nefropatia diabetica.

## 5. CONCLUSIONI



## 5. CONCLUSIONI

Il carcinoma renale (RCC; Renal Cell Carcinoma) è l'ottava forma di tumore maligno in ordine di incidenza, colpisce gli adulti e conta tra il 3% e il 4% di nuovi casi l'anno [Jemal A *et al.*, 2007]. Questo tumore è asintomatico e per questo la diagnosi è spesso tardiva, è inoltre resistente a radio e chemioterapia rendendo la nefrectomia, ad oggi, l'unico trattamento veramente efficace. La nefropatia diabetica (DN) è una delle più gravi complicazioni del diabete ed è la causa principale di End Stage Renal Disease (ESDR). Questa patologia insorge in circa il 25-40% degli affetti da diabete di tipo I e di tipo II e viene tradizionalmente identificata in seguito alla comparsa microalbuminuria che può poi progredire a macroalbuminuria e successivamente a danno renale (glomerulo sclerosi e fibrosi tubulo interstiziale). Il meccanismo patogenetico della nefropatia diabetica non è ancora completamente chiarito, ma sembra essere dovuta a una combinazione di fattori metabolici e emodinamici.

Al fine di ricercare possibili nuovi biomarcatori diagnostici e/o prognostici per il carcinoma renale a cellule chiare e per nefropatia diabetica abbiamo utilizzato un approccio proteomico basato sul pre-frazionamento del proteoma allo scopo di ridurre la complessità e analizzare, dopo isolamento e/o purificazione, profili sub-proteomici semplificati e particolarmente coinvolti o alterati dalla patogenesi di queste malattie nei quali ricercare significative differenze composizionali tra campioni ottenuti da controlli, da pazienti e da modelli animali.

Dalle urine, fluido biologico di elezione nella ricerca di biomarcatori per le patologie renali, abbiamo ottenuto gli exosomi, piccole vescicole di membrana, di dimensioni comprese fra i 30 e i 100 nm, rilasciate dalle cellule epiteliali nello spazio urinario a seguito della fusione dei corpi multivescicolari (MVBs) con la membrana plasmatica cellulare [Pisitkun T *et al.*, 2004; Zhou H *et al.*, 2006] e capaci di riflettere lo stato fisiopatologico delle cellule d'origine oltre ad essere coinvolti nella comunicazione cellula-cellula [Zhang HG *et al.* 2011],.

Dalla membrana cellulare invece, sono stati isolati i microdomini di membrana, che svolgono un ruolo fondamentale in svariati processi biologici quali l'endocitosi, la comunicazione e l'adesione cellulare e loro alterazioni sono spesso coinvolte nella biologia del cancro, nella farmaco resistenza, nella metastatizzazione e nella progressione tumorale [Jahn KA *et al.*, 2010]. Inoltre i MD, facilmente isolabili grazie alla loro caratteristica densità, affacciandosi sul lume extracellulare sono un'ottima fonte di possibili biomarcatori.

Per l'indagine dell'RCC sono stati isolati gli exosomi da urine raccolte da pazienti affetti da questo tumore e da controlli sani. La purezza dei campioni ottenuti nonché la riproducibilità del

protocollo di purificazione adottato, è stata confermata valutando l'arricchimento di noti marcatori exosomaliali quali ALIX, TSG101 e CD9, proteine essenziali per la struttura degli exosomi e il loro *trafficking* verso la membrana plasmatica [Zhou H *et al.*, 2006]. Possiamo inoltre concludere che le dimensioni e la forma degli exosomi da noi preparati sono coerenti con quanto riportato in letteratura [Gonzales PA *et al.*, 2009]. Anche i microdomini di membrana (MD), isolati tramite centrifugazione in gradiente di densità da tessuto tumorale (RCC) e da tessuto renale normale (ANK) adiacente alla massa cancerosa sono risultati caratterizzati da adeguata purezza dopo valutazione dei marcatori positivi (flotillina 1, caveolina, GM1 e colesterolo) negativi (recettore della transferrina) degli MD, confermando l'efficacia del protocollo

L'indagine proteomica degli exosomi isolati da urine di pazienti RCC e di controlli ha portato all'identificazione di 261 proteine negli exosomi controllo e 187 negli exosomi RCC molte delle quali non erano ancora state identificate in queste microvescicole, determinando un significativo ampliamento delle conoscenze circa la composizione degli exosomi urinari. Dallo studio dei microdomini abbiamo poi ottenuto l'identificazione di 98 proteine in ANK e 93 in RCC. È quindi stato selezionato un pannello di proteine di cui validare il contenuto differenziale negli exosomi di pazienti RCC rispetto a controlli e nei microdomini ottenuti da tessuto sano e tumorale tramite IB. L'overespressione, negli exosomi RCC, di proteine coinvolte nella degradazione della matrice extracellulare, quali MMP9 e DKK4, potrebbe essere correlata con l'aggressività tumorale e con l'elevato grado di metastatizzazione del RCC [Kallakury BV *et al.*, 2001; Hirata H *et al.*, 2010]. La PODXL, proteina con funzioni anti-adesive, potrebbe essere eliminata dalle cellule neoplastiche attraverso gli exosomi, favorendo così la perdita dell'adesione cellulare da parte delle cellule tumorali stesse e quindi l'espansione della neoplasia e la formazione di metastasi; questo spiegherebbe l'aumento della sua espressione negli exosomi RCC [Hsu YJ *et al.*, 2010]. L'aumento invece dell'espressione di CA9 potrebbe essere facilmente spiegato se consideriamo che la proteina CA9 è regolata dal fattore HIF1 la cui upregolazione dovuta alla mutazione del gene VHL è causa di alcuni tipi di carcinoma renale a cellule chiare [Zhou GX *et al.*, 2009].

Invece la down-regolazione negli exosomi RCC di CD10, metalloproteasi di membrana zinco dipendente normalmente espressa a livello delle cellule epiteliali renali, della sintenina-1, coinvolta nell'interazione matrice-citoscheletro, e per l'AQP1, canale di membrana dell'acqua fisiologicamente presente ed attivo a livello del tubulo prossimale e dell'ansa di Henle, potrebbe essere una conseguenza del processo di "de-differenziamento" delle cellule tumorali che perderebbero così la propria specializzazione [Ticozzi-Valerio D *et al.*, 2008; Chu P *et al.*, 2000;

Koroll M *et al.*, 2001]. Risulta più difficile interpretare invece l'overespressione della CP negli exosomi urinari RCC; si potrebbe pensare che questo aumento possa essere conseguente all'attivazione della risposta infiammatoria in presenza di tumore, ma questo comporterebbe semplicemente un aumento della forma di CP secreta dalle cellule epatiche, che non dovrebbe essere riscontrata invece negli exosomi urinari [Takahashi M *et al.*, 2001]. Sarebbe interessante verificare, attraverso l'analisi dei peptidi identificati mediante MS, la presenza, negli exosomi urinari, dell'isoforma con ancora GPI.

Negli exosomi risulta down regolata anche la proteina EMMPRIN, un induttore delle metalloproteasi della matrice che invece è presente a livelli più alti nei microdomini RCC [Raimondo F *et al.*, 2011]. Questa discordanza potrebbe essere spiegata con una diversa distribuzione della proteina nei compartimenti subcellulari con un arricchimento nei microdomini di membrana a scapito per esempio degli exosomi indotta dalla trasformazione neoplastica. Nei microdomini AQP<sub>1</sub> invece si comporta coerentemente con quanto visto negli exosomi, in quanto il suo livello diminuisce nei MD RCC probabilmente a seguito della perdita di differenziamento del tessuto neoplastico, così come accade anche per la dipeptidasi 1 che è una proteina caratteristica del rene sano. L'overespressione nei microdomini RCC di VDAC rispecchia quanto accade in altri tumori a conferma del ruolo centrale di questo canale di membrana nella regolazione dell'apoptosi [Nawarak J *et al.*, 2009].

È stata anche valutata la composizione lipidica degli exosomi isolati da urine di pazienti RCC e di controlli sani, evidenziando una sostanziale somiglianza nella quantità e nel tipo di lipidi che li compongono, ma portando all'identificazione tramite spettrometrie di massa di fini differenze a livello di particolari specie molecolari quali la lyso-fosfatidiletanolamina che si arricchisce negli exosomi RCC.

In futuro ci proponiamo di approfondire l'idea di una strategia multi-marker per la diagnosi del carcinoma renale mettendo a punto un *Protein Microarray* in fase inversa che potrebbe fornire un mezzo sensibile, veloce e ad ampio spettro per validare le proteine di interesse.

Lo studio effettuato sul modello animale di nefropatia diabetica ha fornito dati interessanti riguardo alla proteina MUP<sub>1</sub>, il cui contenuto differenziale negli exosomi è stato validato tramite IB. La MUP risulta espressa a livelli più bassi nei controlli rispetto ai diabetici e a livelli intermedi nei diabetici trattati con insulina in linea con quanto accade nel fegato e nel sangue di topi diabetici e con il suo ruolo nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico [Zhou Y *et al.*, 2009]. Nell'uomo esiste un gene omologo (accession number: XM\_001723632) a quello della

MUP, e anche se non è ancora stata accertata l'esistenza della corrispondente proteina, è possibile ipotizzare per questa un analogo funzione.

Il contenuto differenziale di MUP<sub>1</sub> potrebbe quindi essere proposto come biomarcatore della DN nonché essere coinvolta nel suo meccanismo patogenetico. Stiamo lavorando a questa ipotesi analizzando il contenuto di MUP in exosomi e anche microdomini isolati da ratti modello di diabete di tipo II e in exosomi ottenuti da pazienti umani affetti da DN, con risultati preliminari promettenti.

In conclusione possiamo dire che la composizione di exosomi e microdomini risulta alterata in modo riproducibile in condizioni patologiche. L'analisi di questi due compartimenti risulta interessante inoltre perché permette di correlare le modificazioni a livello tissutale con quelle che si riscontrano nei fluidi biologici. Le differenze evidenziate possono essere un ottimo punto di partenza per la scoperta di biomarcatori diagnostici e/o prognostici, ma anche per il chiarimento di alcuni dei meccanismi patogenetici di queste malattie.

## 6. BIBLIOGRAFIA

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Abid Hussein, M.N. et al., 2007. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thrombosis and Haemostasis*, 98(5), pagg.1096-1107.
- Admyre, C. et al., 2003. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 22(4), pagg.578-583.
- Ahlquist, D.A. et al., 2000. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology*, 119(5), pagg.1219-1227.
- Ahmed, S.N., Brown, D.A. & London, E., 1997. On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry*, 36(36), pagg.10944-10953.
- Alzaid, A.A., Sobki, S. & De Silva, V., 1994. Prevalence of microalbuminuria in Saudi Arabians with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a clinic-based study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 26(2), pagg.115-120.
- Amann, B., Tinzmann, R. & Angelkort, B., 2003. ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1. *Diabetes Care*, 26(8), pagg.2421-2425.
- Amato, R.J., 2005. Renal cell carcinoma: review of novel single-agent therapeutics and combination regimens. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 16(1), pagg.7-15.
- Amelink, A. et al., 2003. Single-scattering spectroscopy for the endoscopic analysis of particle size in superficial layers of turbid media. *Applied Optics*, 42(19), pagg.4095-4101.
- Anderson, R.G., 1998. The caveolae membrane system. *Annual Review of Biochemistry*, 67, pagg.199-225.
- André, F. et al., 2002. Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine*, 20 Suppl 4, pagg.A28-31.
- Andreola, G. et al., 2002. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(10), pagg.1303-1316.
- Aupeix, K. et al., 1997. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(7), pagg.1546-1554.
- Babst, Markus, 2005. A protein's final ESCRT. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(1), pagg.2-9.
- Bachmann, S. et al., 2005. Renal effects of Tamm-Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 288(3), pagg.F559-567.
- Baillat, G. et al., 2008. Early adhesion induces interaction of FAK and Fyn in lipid domains and activates raft-dependent Akt signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1783(12), pagg.2323-2331.
- van Balkom, B.W.M. et al., 2011. Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. *Kidney International*, 80(11), pagg.1138-1145.
- Ballermann, B.J., Skorecki, K.L. & Brenner, B.M., 1984. Reduced glomerular angiotensin II receptor density in early untreated diabetes mellitus in the rat. *The American Journal of Physiology*, 247(1 Pt 2), pagg.F110-116.
- Banfi, C. et al., 2006. Proteomic analysis of membrane microdomains derived from both failing and non-failing human hearts. *Proteomics*, 6(6), pagg.1976-1988.
- Bard, M.P. et al., 2004. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 31(1), pagg.114-121.
- Barry, O.P. et al., 1998. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(1), pagg.136-144.
- Beck, S.D.W. et al., 2004. Effect of papillary and chromophobe cell type on disease-free survival after nephrectomy for renal cell carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 11(1), pagg.71-77.
- Benigni, A. et al., 2004. Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. *Kidney International*, 65(6), pagg.2193-2200.
- Beynon, R.J. & Hurst, J.L., 2004. Urinary proteins and the modulation of chemical scents in mice and rats. *Peptides*, 25(9), pagg.1553-1563.
- Bhatnagar, S. et al., 2007. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*, 110(9), pagg.3234-3244.
- Bjornsson, J. et al., 1996. Tuberos sclerososis-associated renal cell carcinoma. Clinical, pathological, and genetic features. *The American Journal of Pathology*, 149(4), pagg.1201-1208.
- Blanchard, N. & Hivroz, C., 2002. The immunological synapse: the more you look the less you know.. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 94(6), pagg.345-354.
- Bloembergen, W.E. et al., 1995. A comparison of mortality between patients treated with hemodialysis and peritoneal dialysis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 6(2), pagg.177-183.
- Blonder, J. et al., 2004. Proteomic analysis of detergent-resistant membrane rafts. *Electrophoresis*, 25(9), pagg.1307-1318.

- Blonder, J. et al., 2006. Combined chemical and enzymatic stable isotope labeling for quantitative profiling of detergent-insoluble membrane proteins isolated using Triton X-100 and Brij-96. *Journal of Proteome Research*, 5(2), pagg.349-360.
- Bonifacino, J.S. & Traub, L.M., 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 72, pagg.395-447.
- Braun, R.J. et al., 2007. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(4), pagg.1033-1045.
- Briand, N., Dugail, I. & Le Lay, S., 2011. Cavin proteins: New players in the caveolae field. *Biochimie*, 93(1), pagg.71-77.
- Browman, D.T., Hoegg, M.B. & Robbins, S.M., 2007a. The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends in Cell Biology*, 17(8), pagg.394-402.
- Browman, D.T., Hoegg, M.B. & Robbins, S.M., 2007b. The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends in Cell Biology*, 17(8), pagg.394-402.
- Brown, D.A. & London, E., 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14, pagg.111-136.
- Brown, D.A. & Rose, J.K., 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68(3), pagg.533-544.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), pagg.813-820.
- Van Buren, P.N. & Toto, R., 2011. Hypertension in diabetic nephropathy: epidemiology, mechanisms, and management. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 18(1), pagg.28-41.
- Caby, M.-P. et al., 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International Immunology*, 17(7), pagg.879-887.
- Campbell, S.M., Crowe, S.M. & Mak, J., 2001. Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 22(3), pagg.217-227.
- Canani, L H et al., 2005. The presence of allele D of angiotensin-converting enzyme polymorphism is associated with diabetic nephropathy in patients with less than 10 years duration of Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 22(9), pagg.1167-1172.
- Canani, Luis H et al., 2002. Polymorphism in ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 gene (ENPP1/PC-1) and early development of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes*, 51(4), pagg.1188-1193.
- Caramori, M.L. et al., 2003. The human peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPARgamma2) Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52(12), pagg.3010-3013.
- Carpena, M.P. et al., 2010. Genetics of diabetic nephropathy. *Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia*, 54(3), pagg.253-261.
- Chang, C.-H. et al., 2002. Tissue polypeptide specific antigen (TPS) as a tumor marker in renal cell carcinoma. *Anticancer Research*, 22(5), pagg.2949-2950.
- Chaput, Nathalie & Théry, Clotilde, 2011. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in Immunopathology*, 33(5), pagg.419-440.
- Chavez-Muñoz, C., Kilani, R.T. & Ghahary, A., 2009. Profile of exosomes related proteins released by differentiated and undifferentiated human keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 221(1), pagg.221-231.
- Chen, C. et al., 2010. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab on a Chip*, 10(4), pagg.505-511.
- Chen, S, Wolf, G & Ziyadeh, F N, 2001. The renin-angiotensin system in diabetic nephropathy. *Contributions to Nephrology*, (135), pagg.212-221.
- Chern, C.J. & Beutler, E., 1976. Biochemical and electrophoretic studies of erythrocyte pyridoxine kinase in white and black Americans. *American Journal of Human Genetics*, 28(1), pagg.9-17.
- Chow, W.H. et al., 1999. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 281(17), pagg.1628-1631.
- Chu, P. & Arber, D.A., 2000. Paraffin-section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and endometrial stromal sarcoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 113(3), pagg.374-382.
- Chu, Z., Witte, D.P. & Qi, X., 2005. Saposin C-LBPA interaction in late-endosomes/lysosomes. *Experimental Cell Research*, 303(2), pagg.300-307.
- Chudek, J. et al., 1997. Detailed microsatellite analysis of chromosome 3p region in non-papillary renal cell carcinomas. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 73(2), pagg.225-229.
- Clayton, A et al., 2001. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 247(1-2), pagg.163-174.
- Clayton, Aled et al., 2007. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Research*, 67(15), pagg.7458-7466.

- Clifford, S.C. et al., 1998. Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumorigenesis. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 22(3), pagg.200-209.
- Cohen, A.J. et al., 1996. Inactivation of neutral endopeptidase in lung cancer. *Chest*, 109(3 Suppl), pag.12S-13S.
- Cohen, A.W., Hnasko, R., Schubert, W. & Lisanti, Michael P, 2004a. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiological Reviews*, 84(4), pagg.1341-1379.
- Cohen, A.W., Hnasko, R., Schubert, W. & Lisanti, Michael P, 2004b. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiological Reviews*, 84(4), pagg.1341-1379.
- Cohen, H.T. & McGovern, F.J., 2005. Renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 353(23), pagg.2477-2490.
- Colantonio, D.A. & Chan, D.W., 2005. The clinical application of proteomics. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 357(2), pagg.151-158.
- Conde-Vancells, J. et al., 2008. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *Journal of Proteome Research*, 7(12), pagg.5157-5166.
- Conde-Vancells, J. et al., 2010. Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples. *Proteomics. Clinical Applications*, 4(4), pagg.416-425.
- Conley, B.A. & Taube, S.E., 2004. Prognostic and predictive markers in cancer. *Disease Markers*, 20(2), pagg.35-43.
- Conley, L., Geurs, T.L. & Levin, L.A., 2005. Transcriptional regulation of ceruloplasmin by an IL-6 response element pathway. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 139(2), pagg.235-241.
- Conrad, P.A. et al., 1995. Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. *The Journal of Cell Biology*, 131(6 Pt 1), pagg.1421-1433.
- Contreras, F.-X. et al., 2011. Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21536707> [Consultato Dicembre 20, 2011].
- Couet, J., Sargiacomo, M & Lisanti, M P, 1997. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(48), pagg.30429-30438.
- Deedwania, P.C., 2000. Hypertension and diabetes: new therapeutic options. *Archives of Internal Medicine*, 160(11), pagg.1585-1594.
- Denzer, K. et al., 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science*, 113 Pt 19, pagg.3365-3374.
- Diehl, H.C. et al., 2007. A catalogue of proteins released by colorectal cancer cells in vitro as an alternative source for biomarker discovery. *Proteomics. Clinical Applications*, 1(1), pagg.47-61.
- Dietrich, C. et al., 2001. Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pagg.10642-10647.
- Economou, C.G. et al., 2004. Enhanced podocalyxin expression alters the structure of podocyte basal surface. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 15), pagg.3281-3294.
- Ehehalt, R. et al., 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of Cell Biology*, 160(1), pagg.113-123.
- Engelman, J.A. et al., 1998. Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer disease, and muscular dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 63(6), pagg.1578-1587.
- Erne, B. et al., 2002. Rafts in adult peripheral nerve myelin contain major structural myelin proteins and myelin and lymphocyte protein (MAL) and CD59 as specific markers. *Journal of Neurochemistry*, 82(3), pagg.550-562.
- Feng, D. et al., 2010. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(5), pagg.675-687.
- Février, B. & Raposo, Graça, 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(4), pagg.415-421.
- Février, B. et al., 2005. [Exosomes: carriers of prions?]. *Médecine Sciences: M/S*, 21(2), pagg.132-133.
- Ficarra, V. et al., 2010. Prognostic and therapeutic impact of the histopathologic definition of parenchymal epithelial renal tumors. *European Urology*, 58(5), pagg.655-668.
- Ficarra, V. et al., 2005. Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system: a multivariate analysis of 388 patients with conventional renal cell carcinoma. *Cancer*, 103(1), pagg.68-75.
- Fine, L.G., Bandyopadhyay, D. & Norman, J.T., 2000. Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia. *Kidney International. Supplement*, 75, pagg.S22-26.
- Fioretto, P. et al., 1996. Patterns of renal injury in NIDDM patients with microalbuminuria. *Diabetologia*, 39(12), pagg.1569-1576.
- Fischer, J. et al., 1998. Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene*, 17(6), pagg.733-739.



- Flanigan, R.C. et al., 2003. Metastatic renal cell carcinoma. *Current Treatment Options in Oncology*, 4(5), pagg.385-390.
- Fleming, S. & Lewi, H.J., 1986. Collecting duct carcinoma of the kidney. *Histopathology*, 10(11), pagg.1131-1141.
- Forbes, J M et al., 2001. Renoprotective effects of a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetologia*, 44(1), pagg.108-114.
- Fowlkes, J.L. et al., 1995. Matrix metalloproteinases as insulin-like growth factor binding protein-degrading proteinases. *Progress in Growth Factor Research*, 6(2-4), pagg.255-263.
- Galbiati, F., Razani, B. & Lisanti, M P, 2001. Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends in Molecular Medicine*, 7(10), pagg.435-441.
- Garin, J. et al., 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *The Journal of Cell Biology*, 152(1), pagg.165-180.
- de Gassart, A. et al., 2003. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*, 102(13), pagg.4336-4344.
- de Gassart, A. et al., 2004. Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 5(11), pagg.896-903.
- Gastpar, R. et al., 2005. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Research*, 65(12), pagg.5238-5247.
- Glenney, J.R., Jr, 1992. The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Letters*, 314(1), pagg.45-48.
- Gnarra, J.R. et al., 1994. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nature Genetics*, 7(1), pagg.85-90.
- Godley, P.A. & Taylor, M., 2001. Renal cell carcinoma. *Current Opinion in Oncology*, 13(3), pagg.199-203.
- Gonzales, P.A. et al., 2009. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20(2), pagg.363-379.
- Gooch, J.L. et al., 2001. Insulin-like growth factor-I induces renal cell hypertrophy via a calcineurin-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(45), pagg.42492-42500.
- Görg, A., Weiss, W. & Dunn, M.J., 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), pagg.3665-3685.
- Gouva, C. et al., 2004. Treating anemia early in renal failure patients slows the decline of renal function: a randomized controlled trial. *Kidney International*, 66(2), pagg.753-760.
- Graner, M.W. et al., 2009. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(5), pagg.1541-1557.
- Graves, L.E. et al., 2004. Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Research*, 64(19), pagg.7045-7049.
- Grizzle, W.E., 2011. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(5), pagg.959-964.
- Gupta, K. et al., 2008. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer Treatment Reviews*, 34(3), pagg.193-205.
- Ha, H. & Kim, K.H., 1999. Future of interventions in diabetic nephropathy: antioxidants. *Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, 19 Suppl 2, pagg.S228-233.
- Hakomori, S., 2003. Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Current Opinion in Hematology*, 10(1), pagg.16-24.
- Han, S.Y. et al., 2006. An imbalance between matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 contributes to the development of early diabetic nephropathy. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 21(9), pagg.2406-2416.
- Harder, T. et al., 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *The Journal of Cell Biology*, 141(4), pagg.929-942.
- Hegmans, J.P.J.J. et al., 2004. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *The American Journal of Pathology*, 164(5), pagg.1807-1815.
- Heijnen, H.F. et al., 1999. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, 94(11), pagg.3791-3799.
- Held, P.J. et al., 1991. The United States Renal Data System's 1991 annual data report: an introduction. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 18(5 Suppl 2), pagg.1-16.
- Herrera, J.L. et al., 2011. Voltage-dependent anion channel as a resident protein of lipid rafts: post-transductional regulation by estrogens and involvement in neuronal preservation against Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 116(5), pagg.820-827.
- Hill, C. et al., 2001. Transforming growth factor-beta2 antibody attenuates fibrosis in the experimental diabetic rat kidney. *The Journal of Endocrinology*, 170(3), pagg.647-651.
- Hills, C.E. & Squires, P.E., 2010. TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention in diabetic nephropathy. *American Journal of Nephrology*, 31(1), pagg.68-74.

- Hirata, H. et al., 2011. DICKKOPF-4 activates the noncanonical c-Jun-NH<sub>2</sub> kinase signaling pathway while inhibiting the Wnt-canonical pathway in human renal cell carcinoma. *Cancer*, 117(8), pagg.1649-1660.
- Hong, C.Y. & Chia, K.S., 1998. Markers of diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 12(1), pagg.43-60.
- Hooper, N.M., 1999. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Molecular Membrane Biology*, 16(2), pagg.145-156.
- Horvat, R. et al., 1986. Endothelial cell membranes contain podocalyxin--the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 102(2), pagg.484-491.
- Hostetter, T.H. & Ibrahim, H.N., 2003. Aldosterone in chronic kidney and cardiac disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 14(9), pagg.2395-2401.
- van der Hout, A.H. et al., 1988. Direct molecular analysis of a deletion of 3p in tumors from patients with sporadic renal cell carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 32(2), pagg.281-285.
- Hovind, P. et al., 2001. Progression of diabetic nephropathy. *Kidney International*, 59(2), pagg.702-709.
- Hricik, D.E. et al., 1998. Benefits of pre-emptive dose reduction for Sandimmune to Neoral conversion in stable renal transplant recipients. *Clinical Transplantation*, 12(6), pagg.575-578.
- Huber, Veronica et al., 2005. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*, 128(7), pagg.1796-1804.
- Hui, X. et al., 2009. Major urinary protein-1 increases energy expenditure and improves glucose intolerance through enhancing mitochondrial function in skeletal muscle of diabetic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(21), pagg.14050-14057.
- Hurley, J.H., 2008a. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(1), pagg.4-11.
- Hurley, J.H., 2008b. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(1), pagg.4-11.
- Iero, M et al., 2008. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death and Differentiation*, 15(1), pagg.80-88.
- Igarashi, T. et al., 2004. Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood*, 104(1), pagg.170-177.
- Iliopoulos, O et al., 1995. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nature Medicine*, 1(8), pagg.822-826.
- Janowska-Wieczorek, A. et al., 2001. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*, 98(10), pagg.3143-3149.
- Jeffers, M. et al., 1997. Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), pagg.11445-11450.
- Jefferson, J.A., Shankland, S.J. & Pichler, R.H., 2008. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney International*, 74(1), pagg.22-36.
- Jemal, A. et al., 2005. Cancer statistics, 2005. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(1), pagg.10-30.
- Jemal, A. et al., 2007. Cancer statistics, 2007. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 57(1), pagg.43-66.
- Jensen, T., 1997. Pathogenesis of diabetic vascular disease: evidence for the role of reduced heparan sulfate proteoglycan. *Diabetes*, 46 Suppl 2, pagg.S98-100.
- Jeong, H.S. et al., 2004. Effect of antisense TGF-beta1 oligodeoxynucleotides in streptozotocin- induced diabetic rat kidney. *Journal of Korean Medical Science*, 19(3), pagg.374-383.
- Ji, H. et al., 2008. Difference gel electrophoresis analysis of Ras-transformed fibroblast cell-derived exosomes. *Electrophoresis*, 29(12), pagg.2660-2671.
- Jocham, D. et al., 2004. Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet*, 363(9409), pagg.594-599.
- Kallakury, B.V. et al., 2001. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(10), pagg.3113-3119.
- Kanwar, Y.S. et al., 2008. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 233(1), pagg.4-11.
- Kashyap, M.K. et al., 2005. Biochemical and molecular markers in renal cell carcinoma: an update and future prospects. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 10(4), pagg.258-294.
- Katzmann, D J, Babst, M & Emr, S D, 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 106(2), pagg.145-155.
- Katzmann, David J, Odorizzi, G. & Emr, Scott D, 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(12), pagg.893-905.

- Khatlani, T.S. et al., 2007. c-Jun N-terminal kinase is activated in non-small-cell lung cancer and promotes neoplastic transformation in human bronchial epithelial cells. *Oncogene*, 26(18), pagg.2658-2666.
- Kim, B.-W. et al., 2010. Lipid raft proteome reveals that oxidative phosphorylation system is associated with the plasma membrane. *Expert Review of Proteomics*, 7(6), pagg.849-866.
- Kim, W.Y. & Kaelin, William G, 2004. Role of VHL gene mutation in human cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(24), pagg.4991-5004.
- Klappe, K. et al., 2009. Lipid dependence of ABC transporter localization and function. *Chemistry and Physics of Lipids*, 161(2), pagg.57-64.
- Koleske, A.J., Baltimore, D. & Lisanti, M P, 1995. Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), pagg.1381-1385.
- Koo, T.H. et al., 2002. Syntenin is overexpressed and promotes cell migration in metastatic human breast and gastric cancer cell lines. *Oncogene*, 21(26), pagg.4080-4088.
- Koroll, M., Rathjen, F.G. & Volkmer, H., 2001. The neural cell recognition molecule neurofascin interacts with syntenin-1 but not with syntenin-2, both of which reveal self-associating activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(14), pagg.10646-10654.
- Kotajima, N. et al., 1998. [The significance of determination of urinary type IV collagen concentrations from a random urine collection in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus]. *Rinsho Byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 46(3), pagg.277-282.
- Kovacs, G. et al., 1997. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *The Journal of Pathology*, 183(2), pagg.131-133.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), pagg.105-132.
- Lam, J.S. et al., 2005. Role of molecular markers in the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma. *Urology*, 66(5 Suppl), pagg.1-9.
- Lamparski, H.G. et al., 2002. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *Journal of Immunological Methods*, 270(2), pagg.211-226.
- Latif, F. et al., 1993. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5112), pagg.1317-1320.
- Latysheva, N. et al., 2006. Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63. *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), pagg.7707-7718.
- Laulagnier, K. et al., 2004. PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS Letters*, 572(1-3), pagg.11-14.
- Lebovitz, H.E. et al., 1994. Renal protective effects of enalapril in hypertensive NIDDM: role of baseline albuminuria. *Kidney International. Supplement*, 45, pagg.5150-155.
- Levental, I. et al., 2010. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(51), pagg.22050-22054.
- Li, N. et al., 2003. Monocyte lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and phagosome formation. *Proteomics*, 3(4), pagg.536-548.
- Liang, Y.-X. et al., 2009. CD147 and VEGF expression in advanced renal cell carcinoma and their prognostic value. *Cancer Investigation*, 27(7), pagg.788-793.
- Lisanti, M P et al., 1994. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends in Cell Biology*, 4(7), pagg.231-235.
- Liu, C. et al., 2006. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(3), pagg.1375-1385.
- Liu, P. et al., 1996. Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(17), pagg.10299-10303.
- Looze, C. et al., 2009. Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPARgamma as an exosome-associated protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378(3), pagg.433-438.
- Lopez-Beltran, A. et al., 2006. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *European Urology*, 49(5), pagg.798-805.
- Di Lorenzo, G., Autorino, R. & Sternberg, C.N., 2009. Metastatic renal cell carcinoma: recent advances in the targeted therapy era. *European Urology*, 56(6), pagg.959-971.
- Lubensky, I.A. et al., 1999. Hereditary and sporadic papillary renal carcinomas with c-met mutations share a distinct morphological phenotype. *The American Journal of Pathology*, 155(2), pagg.517-526.
- Luciani, L.G., Cestari, R. & Tallarigo, C., 2000. Incidental renal cell carcinoma-age and stage characterization and clinical implications: study of 1092 patients (1982-1997). *Urology*, 56(1), pagg.58-62.
- Luo, S.-S. et al., 2009. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biology of Reproduction*, 81(4), pagg.717-729.

- Magni, Fulvio et al., 2008. AQP1 expression analysis in human diseases: implications for proteomic characterization. *Expert Review of Proteomics*, 5(1), pagg.29-43.
- Majno, G. & Joris, I., 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, 146(1), pagg.3-15.
- Mancia, G. & Grassi, G., 2009. Protection of patients with diabetes, with or without hypertension: implications of ADVANCE for clinical practice. *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*, 27(1), pagg.S19-23.
- Mancini, V. et al., 2008. Current insights in renal cell cancer pathology. *Urologic Oncology*, 26(3), pagg.225-238.
- Mason, R.M. & Wahab, N.A., 2003. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 14(5), pagg.1358-1373.
- Masuda, A. et al., 2009. Is Stat3 and/or p53 mRNA expression a prognostic marker for renal cell carcinoma? *Biomedical Research (Tokyo, Japan)*, 30(3), pagg.171-176.
- Masyuk, A.I. et al., 2010. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(4), pagg.G990-999.
- Mathew, A. et al., 2002. Global increases in kidney cancer incidence, 1973-1992. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 11(2), pagg.171-178.
- Mathivanan, S. & Simpson, R.J., 2009. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*, 9(21), pagg.4997-5000.
- Mathivanan, S. et al., 2010. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 9(2), pagg.197-208.
- Matveev, S. et al., 2001. The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49(3), pagg.237-250.
- Mauer, S.M. et al., 1984. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 74(4), pagg.1143-1155.
- McIver, C.M. et al., 2004. Dipeptidase 1: a candidate tumor-specific molecular marker in colorectal carcinoma. *Cancer Letters*, 209(1), pagg.67-74.
- Mears, R. et al., 2004. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 4(12), pagg.4019-4031.
- Mitchell, P.J., Welton, J., Staffurth, J., Court, Jacquelyn, Mason, Malcolm D, Tabi, Z. & Clayton, Aled, 2009a. Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *Journal of Translational Medicine*, 7, pag.4.
- Mitchell, P.J., Welton, J., Staffurth, J., Court, Jacquelyn, Mason, Malcolm D, Tabi, Z. & Clayton, Aled, 2009b. Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *Journal of Translational Medicine*, 7, pag.4.
- Mizuno, S. & Nakamura, Toshikazu, 2004. Suppressions of chronic glomerular injuries and TGF-beta 1 production by HGF in attenuation of murine diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 286(1), pagg.F134-143.
- Mizutani, Y. et al., 2003. The significance of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor activity in renal cell carcinoma. *Cancer*, 98(4), pagg.730-736.
- Möbius, W. et al., 2003. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 4(4), pagg.222-231.
- Moch, Holger et al., 2009. Reassessing the current UICC/AJCC TNM staging for renal cell carcinoma. *European Urology*, 56(4), pagg.636-643.
- Mogensen, C.E., 1984. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 310(6), pagg.356-360.
- Mogensen, C.E. & Christensen, C.K., 1984. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *The New England Journal of Medicine*, 311(2), pagg.89-93.
- Mogensen, C.E., Christensen, C.K. & Vittinghus, E., 1983. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*, 32 Suppl 2, pagg.64-78.
- Mogensen, C.E. et al., 1990. Renal and glyceic determinants of glomerular hyperfiltration in normoalbuminuric diabetics. *The Journal of Diabetic Complications*, 4(4), pagg.159-165.
- Moon, P.-G. et al., 2011. Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy. *Proteomics*, 11(12), pagg.2459-2475.
- Motzer, R J et al., 2000. Phase III trial of interferon alfa-2a with or without 13-cis-retinoic acid for patients with advanced renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(16), pagg.2972-2980.

- Motzer, Robert J et al., 2002. Treatment outcome and survival associated with metastatic renal cell carcinoma of non-clear-cell histology. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(9), pagg.2376-2381.
- Murakami, Y. et al., 1999. MN/CA9 gene expression as a potential biomarker in renal cell carcinoma. *BJU International*, 83(7), pagg.743-747.
- Murata, M. et al., 1995. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22), pagg.10339-10343.
- Nagashima, Y. et al., 2004. Pathological and molecular biological aspects of the renal epithelial neoplasms, up-to-date. *Pathology International*, 54(6), pagg.377-386.
- Narita, T. et al., 2006. Increased urinary excretions of immunoglobulin g, ceruloplasmin, and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 29(1), pagg.142-144.
- Nawarak, J. et al., 2009. Proteomics analysis of A375 human malignant melanoma cells in response to arbutin treatment. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1794(2), pagg.159-167.
- Négrier, S. & Raymond, E., 2011. Antiangiogenic treatments and mechanisms of action in renal cell carcinoma. *Investigational New Drugs*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21573959>.
- Neumann-Giesen, C. et al., 2007. Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 3), pagg.395-406.
- Ng, D.P.K. et al., 2002. Minor effect of GLUT1 polymorphisms on susceptibility to diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes*, 51(7), pagg.2264-2269.
- Nguyen, D.G. et al., 2003. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(52), pagg.52347-52354.
- Nichols, B.J. et al., 2001. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *The Journal of Cell Biology*, 153(3), pagg.529-541.
- van Niel, G et al., 2001. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*, 121(2), pagg.337-349.
- van Niel, Guillaume et al., 2006. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *Journal of Biochemistry*, 140(1), pagg.13-21.
- Nielsen, S. et al., 1997. The clinical course of renal function in NIDDM patients with normo- and microalbuminuria. *Journal of Internal Medicine*, 241(2), pagg.133-141.
- Noronha, I.L., Fujihara, C.K. & Zatz, R., 2002. The inflammatory component in progressive renal disease--are interventions possible? *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 17(3), pagg.363-368.
- Novick, A.C. et al., 2002. Conservative surgery for renal cell carcinoma: a single-center experience with 100 patients. 1989. *The Journal of Urology*, 167(2 Pt 2), pagg.878-882; discussion 883.
- Ohshima, K. et al., 2001. CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD10 is a marker of improved prognosis. *Histopathology*, 39(2), pagg.156-162.
- Okamoto, T. et al., 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing «preassembled signaling complexes» at the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), pagg.5419-5422.
- Oliferenko, S. et al., 1999. Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*, 146(4), pagg.843-854.
- Orlando, R A et al., 2001. The glomerular epithelial cell anti-adhesin podocalyxin associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 12(8), pagg.1589-1598.
- Osunkoya, A.O. et al., 2009. Diagnostic biomarkers for renal cell carcinoma: selection using novel bioinformatics systems for microarray data analysis. *Human Pathology*, 40(12), pagg.1671-1678.
- Pan, B.T. & Johnstone, R.M., 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), pagg.967-978.
- Panfoli, I. et al., 2011. Proteomics unravels the exportability of mitochondrial respiratory chains. *Expert Review of Proteomics*, 8(2), pagg.231-239.
- Pani, B. & Singh, B.B., 2009b. Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium*, 45(6), pagg.625-633.
- Parkin, D.M., Pisani, P. & Ferlay, J., 1999. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 49(1), pagg.33-64, 1.
- Parkin, E.T., Turner, A.J. & Hooper, N.M., 2001. Differential effects of glycosphingolipids on the detergent-insolubility of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane dipeptidase. *The Biochemical Journal*, 358(Pt 1), pagg.209-216.
- Parolini, I. et al., 2009. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pagg.34211-34222.
- Patra, S.K. et al., 2008. Molecular targets of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG): specificity and interaction with membrane lipid rafts. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 59 Suppl 9, pagg.217-235.
- Pechlivanis, M. & Kuhlmann, J., 2006. Hydrophobic modifications of Ras proteins by isoprenoid groups and fatty acids--More than just membrane anchoring. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1764(12), pagg.1914-1931.

- Pelchen-Matthews, A., Kramer, B. & Marsh, M., 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *The Journal of Cell Biology*, 162(3), pagg.443-455.
- Pelchen-Matthews, A., Raposo, Graça & Marsh, M., 2004. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends in Microbiology*, 12(7), pagg.310-316.
- Pendás-Franco, N. et al., 2008. DICKKOPF-4 is induced by TCF/beta-catenin and upregulated in human colon cancer, promotes tumour cell invasion and angiogenesis and is repressed by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Oncogene*, 27(32), pagg.4467-4477.
- Pisitkun, Trairak, Johnstone, R. & Knepper, Mark A, 2006. Discovery of urinary biomarkers. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 5(10), pagg.1760-1771.
- Pisitkun, Trairak, Shen, Rong-Fong & Knepper, Mark A, 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), pagg.13368-13373.
- Pizzocaro, G. et al., 1987. Adjuvant medroxyprogesterone acetate to radical nephrectomy in renal cancer: 5-year results of a prospective randomized study. *The Journal of Urology*, 138(6), pagg.1379-1381.
- Pontremoli, R. et al., 1997. Microalbuminuria: a marker of cardiovascular risk and organ damage in essential hypertension. *Kidney International. Supplement*, 63, pagg.S163-165.
- Quest, A.F.G., Leyton, L. & Párraga, M., 2004. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 82(1), pagg.129-144.
- Raiborg, C., Rusten, T.E. & Stenmark, H., 2003. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(4), pagg.446-455.
- Raimondo, F et al., 2011. Protein profiling of microdomains purified from renal cell carcinoma and normal kidney tissue samples. *Molecular bioSystems*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159573> [Consultato Dicembre 20, 2011].
- Ramírez, C.M. et al., 2009. VDAC and ERalpha interaction in caveolae from human cortex is altered in Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 42(3), pagg.172-183.
- Raposo, G et al., 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), pagg.1161-1172.
- Raposo, Graça et al., 2002. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 3(10), pagg.718-729.
- Re, R.N. & Cook, J.L., 2009. Senescence, apoptosis, and stem cell biology: the rationale for an expanded view of intracrine action. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 297(3), pagg.H893-901.
- Record, M. et al., 2011. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochemical Pharmacology*, 81(10), pagg.1171-1182.
- Rege, T.A. & Hagood, J.S., 2006. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(8), pagg.1045-1054.
- Riquier, A.D.M., Lee, D.H. & McDonough, A.A., 2009. Renal NHE<sub>3</sub> and NaPi<sub>2</sub> partition into distinct membrane domains. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 296(4), pagg.C900-910.
- Ristorcelli, E. et al., 2009. Essential role of Notch signaling in apoptosis of human pancreatic tumoral cells mediated by exosomal nanoparticles. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 125(5), pagg.1016-1026.
- Rodby, R.A., Firth, L.M. & Lewis, E.J., 1996. An economic analysis of captopril in the treatment of diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *Diabetes Care*, 19(10), pagg.1051-1061.
- Rossing, Peter, 2006. Diabetic nephropathy: worldwide epidemic and effects of current treatment on natural history. *Current Diabetes Reports*, 6(6), pagg.479-483.
- Rothberg, K.G. et al., 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68(4), pagg.673-682.
- Saal, S. & Harvey, S.J., 2009. MicroRNAs and the kidney: coming of age. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 18(4), pagg.317-323.
- Sabharanjak, S. et al., 2002. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Developmental Cell*, 2(4), pagg.411-423.
- Safaei, R. et al., 2005. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(10), pagg.1595-1604.
- Sahli, S. et al., 2004. Structure-based design, synthesis, and in vitro evaluation of nonpeptidic neprilysin inhibitors. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 5(7), pagg.996-1000.
- Santos, K.G. et al., 2005. Relationship of p22phox C242T polymorphism with nephropathy in type 2 diabetic patients. *Journal of Nephrology*, 18(6), pagg.733-738.
- Savina, A. et al., 2003. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(22), pagg.20083-20090.
- Schägger, H. & von Jagow, G., 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, 199(2), pagg.223-231.

- Scheiffele, P. et al., 1999. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(4), pagg.2038-2044.
- Scherer, P.E. et al., 1994. Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *The Journal of Cell Biology*, 127(5), pagg.1233-1243.
- Scherer, P.E. et al., 1996. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), pagg.131-135.
- Schmidt, L. et al., 1997. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature Genetics*, 16(1), pagg.68-73.
- Schmieder, Sandra et al., 2004. Podocalyxin activates RhoA and induces actin reorganization through NHERF1 and Ezrin in MDCK cells. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 15(9), pagg.2289-2298.
- Schmitz, A., Vaeth, M. & Mogensen, C.E., 1994. Systolic blood pressure relates to the rate of progression of albuminuria in NIDDM. *Diabetologia*, 37(12), pagg.1251-1258.
- Schnitzer, J.E., 2001. Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49(3), pagg.265-280.
- Schnitzer, J.E. et al., 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *The Journal of Cell Biology*, 127(5), pagg.1217-1232.
- Schroeder, R., London, E. & Brown, D., 1994. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), pagg.12130-12134.
- Segura, E. et al., 2007. CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(3), pagg.1489-1496.
- Shinada, M. et al., 2000. Proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 is increased in urine from patients with diabetic nephropathy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(3), pagg.1163-1169.
- Simons, K & Toomre, D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), pagg.31-39.
- Simons, Kai & Ehehalt, R., 2002a. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(5), pagg.597-603.
- Simons, Kai & Ehehalt, R., 2002b. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(5), pagg.597-603.
- Simons, Kai & Sampaio, J.L., 2011. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), pag.004697.
- Simpson, R.J., Jensen, S.S. & Lim, J.W.E., 2008. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*, 8(19), pagg.4083-4099.
- Simpson, R.J. et al., 2009. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Review of Proteomics*, 6(3), pagg.267-283.
- Singh, R. et al., 1999. Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation. *Diabetes*, 48(10), pagg.2066-2073.
- Siragy, H.M., 2008. Evidence for benefits of angiotensin receptor blockade beyond blood pressure control. *Current Hypertension Reports*, 10(4), pagg.261-267.
- Skog, J. et al., 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12), pagg.1470-1476.
- Skubitz, K.M. & Skubitz, A.P.N., 2002. Differential gene expression in renal-cell cancer. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 140(1), pagg.52-64.
- Smalley, D.M. et al., 2008. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *Journal of Proteome Research*, 7(5), pagg.2088-2096.
- Smart, E.J. et al., 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11), pagg.7289-7304.
- Somasiri, A. et al., 2004. Overexpression of the anti-adhesin podocalyxin is an independent predictor of breast cancer progression. *Cancer Research*, 64(15), pagg.5068-5073.
- Sonoda, H. et al., 2009. Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 297(4), pagg.F1006-1016.
- Soto-Vega, E. et al., 2009. P-glycoprotein activity in renal clear cell carcinoma. *Urologic Oncology*, 27(4), pagg.363-366.
- Speicher, M.R. et al., 1994. Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *The American Journal of Pathology*, 145(2), pagg.356-364.
- Staubach, S. & Hanisch, F.-G., 2011. Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert Review of Proteomics*, 8(2), pagg.263-277.
- Steffes, M.W. et al., 2001. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney International*, 59(6), pagg.2104-2113.

- Stipp, C.S., 2010. Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12, pag.e3.
- Stuermer, C.A.O., 2011. Microdomain-forming proteins and the role of the reggies/flotillins during axon regeneration in zebrafish. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1812(3), pagg.415-422.
- Sturgeon, C.M. et al., 2008. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in clinical practice: quality requirements. *Clinical Chemistry*, 54(8), pag.e1-e10.
- Subra, C. et al., 2010. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of Lipid Research*, 51(8), pagg.2105-2120.
- Takahashi, M., 1995. Increased urinary fibronectin excretion in type II diabetic patients with microalbuminuria. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*, 37(6), pagg.336-342.
- Takahashi, M. et al., 2001. Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), pagg.9754-9759.
- Takashi, M. et al., 1989. Elevated concentrations of brain-type glycogen phosphorylase in renal cell carcinoma. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 80(10), pagg.975-980.
- Takebayashi, K. et al., 2006. Aldosterone blockade attenuates urinary monocyte chemoattractant protein-1 and oxidative stress in patients with type 2 diabetes complicated by diabetic nephropathy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(6), pagg.2214-2217.
- Tang, Z.L., Scherer, P.E. & Lisanti, M.P., 1994. The primary sequence of murine caveolin reveals a conserved consensus site for phosphorylation by protein kinase C. *Gene*, 147(2), pagg.299-300.
- Taylor, D.D. & Gerçel-Taylor, C., 2005. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *British Journal of Cancer*, 92(2), pagg.305-311.
- Taylor, Douglas D & Gerçel-Taylor, C., 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 110(1), pagg.13-21.
- Théry, C et al., 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(12), pagg.7309-7318.
- Théry, Clotilde, Ostrowski, M. & Segura, E., 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews. Immunology*, 9(8), pagg.581-593.
- Théry, Clotilde, Zitvogel, Laurence & Amigorena, Sebastian, 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews. Immunology*, 2(8), pagg.569-579.
- Thiele, C et al., 2000. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nature Cell Biology*, 2(1), pagg.42-49.
- Thoenes, W., Störkel, S. & Rumpelt, H.J., 1986. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathology, Research and Practice*, 181(2), pagg.125-143.
- Thongboonkerd, V. et al., 2006. Proteomic identification of alterations in metabolic enzymes and signaling proteins in hypokalemic nephropathy. *Proteomics*, 6(7), pagg.2273-2285.
- Ticozzi-Valerio, D. et al., 2007. Differential expression of AQP1 in microdomain-enriched membranes of renal cell carcinoma. *Proteomics. Clinical Applications*, 1(6), pagg.588-597.
- Toeller, M. et al., 1997. Protein intake and urinary albumin excretion rates in the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia*, 40(10), pagg.1219-1226.
- Toiyama, Y. et al., 2011. DPEP1, expressed in the early stages of colon carcinogenesis, affects cancer cell invasiveness. *Journal of Gastroenterology*, 46(2), pagg.153-163.
- Trajkovic, K. et al., 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), pagg.1244-1247.
- True, L.D. et al., 2010. CD90/THY1 is overexpressed in prostate cancer-associated fibroblasts and could serve as a cancer biomarker. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23(10), pagg.1346-1356.
- Tsuchida, K. et al., 1999. Suppression of transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy in rats by a novel advanced glycation end product inhibitor, OPB-9195. *Diabetologia*, 42(5), pagg.579-588.
- Tuttle, K.R. & Anderson, P.W., 2003. A novel potential therapy for diabetic nephropathy and vascular complications: protein kinase C beta inhibition. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 42(3), pagg.456-465.
- Twigg, S.M. et al., 2002. Renal connective tissue growth factor induction in experimental diabetes is prevented by aminoguanidine. *Endocrinology*, 143(12), pagg.4907-4915.
- Uchida, M. et al., 1995. Percutaneous cryosurgery for renal tumours. *British Journal of Urology*, 75(2), pagg.132-136; discussion 136-137.



- Ushigome, F. et al., 2000. Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein. *European Journal of Pharmacology*, 408(1), pagg.1-10.
- Valadi, H. et al., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), pagg.654-659.
- Valenti, Roberta et al., 2006. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Research*, 66(18), pagg.9290-9298.
- Vega, V.L. et al., 2008. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(6), pagg.4299-4307.
- Velazquez, E.F. et al., 2007. Clinical relevance of neutral endopeptidase (NEP/CD10) in melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 5, pag.2.
- Weikert, S. & Ljungberg, Börje, 2010. Contemporary epidemiology of renal cell carcinoma: perspectives of primary prevention. *World Journal of Urology*, 28(3), pagg.247-252.
- Welton, J.L. et al., 2010. Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 9(6), pagg.1324-1338.
- Weternan, M.A., Wilbrink, M. & Geurts van Kessel, A., 1996. Fusion of the transcription factor TFE<sub>3</sub> gene to a novel gene, PRCC, in t(X;1)(p11;q21)-positive papillary renal cell carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), pagg.15294-15298.
- White, K.E. et al., 2002. Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes*, 51(10), pagg.3083-3089.
- Wieckowski, E.U. et al., 2009. Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(6), pagg.3720-3730.
- Williams, T.M. & Lisanti, Michael P, 2004. The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Annals of Medicine*, 36(8), pagg.584-595.
- Wolf, G, 2004. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *European Journal of Clinical Investigation*, 34(12), pagg.785-796.
- Wolf, G et al., 2007. Association of diabetic retinopathy and renal function in patients with types 1 and 2 diabetes mellitus. *Clinical Nephrology*, 68(2), pagg.81-86.
- Wolf, G et al., 1997. High glucose stimulates expression of p27Kip1 in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy. *The American Journal of Physiology*, 273(3 Pt 2), pagg.F348-356.
- Wolf, Gunter, 2003. Growth factors and the development of diabetic nephropathy. *Current Diabetes Reports*, 3(6), pagg.485-490.
- Wu, M.S. et al., 1997. Poor pre-dialysis glycaemic control is a predictor of mortality in type II diabetic patients on maintenance haemodialysis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 12(10), pagg.2105-2110.
- Xiang, X. et al., 2009. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 124(11), pagg.2621-2633.
- Yamamoto, M. et al., 1999. Downregulation of caveolin expression by cAMP signal. *Life Sciences*, 64(15), pagg.1349-1357.
- Yao, Masahiro et al., 2002. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(20), pagg.1569-1575.
- Zambrano, N.R. et al., 1999. Histopathology and molecular genetics of renal tumors toward unification of a classification system. *The Journal of Urology*, 162(4), pagg.1246-1258.
- Zbar, B. et al., 1995. Hereditary papillary renal cell carcinoma: clinical studies in 10 families. *The Journal of Urology*, 153(3 Pt 2), pagg.907-912.
- Zhang, Y. et al., 2010. Exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response in vitro: a novel vaccine for renal cell carcinoma. *International Journal of Oncology*, 36(1), pagg.133-140.
- Zhou, G.X. et al., 2010. Quantification of carbonic anhydrase IX expression in serum and tissue of renal cell carcinoma patients using enzyme-linked immunosorbent assay: prognostic and diagnostic potentials. *Urology*, 75(2), pagg.257-261.
- Zhou, H et al., 2006. Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney International*, 70(10), pagg.1847-1857.
- Zhou, Hua et al., 2008. Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. *Kidney International*, 74(5), pagg.613-621.
- Zhou, Y., Jiang, L. & Rui, L., 2009. Identification of MUP1 as a regulator for glucose and lipid metabolism in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(17), pagg.11152-11159.

- Zhuang, S. et al., 2008. Extracellular signal-regulated kinase activation mediates mitochondrial dysfunction and necrosis induced by hydrogen peroxide in renal proximal tubular cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(3), pagg.732-740.
- Zimmer, M. et al., 2004. Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL-/- tumors. *Molecular Cancer Research: MCR*, 2(2), pagg.89-95.
- Ziolkowski, W. et al., 2010. Methyl-beta-cyclodextrin induces mitochondrial cholesterol depletion and alters the mitochondrial structure and bioenergetics. *FEBS Letters*, 584(22), pagg.4606-4610.
- Ziyadeh, Fuad N & Wolf, Gunter, 2008. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Current Diabetes Reviews*, 4(1), pagg.39-45.
- Zlotta, A.R. et al., 1997. Radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) is a possible new modality for treatment of renal cancer: ex vivo and in vivo experience. *Journal of Endourology / Endourological Society*, 11(4), pagg.251-258.
- Zundel, W., Swiersz, L.M. & Giaccia, A., 2000. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Molecular and Cellular Biology*, 20(5), pagg.1507-1514.