

PROTEOMICA E RENE: UN APPROCCIO INNOVATIVO ALLO STUDIO DELLE MALATTIE RENALI

G.S. Netti^{1,2}, M.T. Rocchetti^{1,2}, M. Papale^{1,2}, M. Centra^{2,3}, D. Centonze^{2,4}, S. Di Paolo¹, E. Ranieri^{2,3}, L. Gesualdo^{1,2}

¹ Centro di Medicina Molecolare, Dipartimento Interaziendale di Nefrologia, Dialisi e Trapianto (DIAN), Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi, Foggia

² Centro di Ricerca Interdipartimentale "Bioagromed", Università degli Studi, Foggia

³ Centro di Medicina Molecolare, Dipartimento Scienze Biomediche, Cattedra di Patologia Clinica Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi, Foggia

⁴ Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Facoltà di Agraria, e Bioagromed, Università degli Studi, Foggia

Proteomics and the kidney: an innovative approach to the study of renal disease

In the post human genome era, several "omics" fields are emerging. Proteomics has experienced a rapid growth in the recent past and has great potential for the future. Proteomic technologies are used with increasing frequency also in nephrology. The aim of this review is to examine the recent application of emerging proteomic technologies to the study of renal physiology and pathophysiology. We highlight the use in renal research of a number of available techniques including 2-dimensional gel electrophoresis, liquid chromatography/mass spectrometry, surface-enhanced laser desorption/ionization, and capillary electrophoresis/mass spectrometry. We examine the role, efficacy and diagnostic potential of the different proteomic approaches, focusing on current difficulties and potential solutions. The integrating role of bioinformatics and the need for standardized procedures for sample preservation and analysis and reporting of results are also discussed. Although the field is still in an embryonic stage, the knowledge gained up to now is important not only for a better understanding of renal physiology and pathophysiology, but also for the identification of disease markers and the development and follow-up of new therapies. This review gives an overview of proteomics, providing background information, outlining the scopes, highlighting the applications in nephrology, and reporting advantages and limitations. (G Ital Nefrol 2008; 25: 169-82)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Two-dimensional electrophoresis, Biomarkers, Urine proteome Proteomics, Mass spectrometry

PAROLE CHIAVE:

Elettroforesi bidimensionale (2-DE), Marcatori biologici, Proteoma urinario, Proteomica, Spettrometria di massa (MS)

✉ Indirizzo degli Autori:

Prof. Loreto Gesualdo
Dipartimento Interaziendale di Nefrologia, Dialisi e Trapianto (DIAN)
Viale Pinto, 1
71100 Foggia
e-mail: l.gesualdo@unifg.it

INTRODUZIONE

Lo studio del proteoma costituisce la nuova frontiera della ricerca biomedica. Il termine proteoma deriva dalla fusione delle parole PROTEina e genOMA e può essere definito come l'insieme di tutte le proteine espresse dal genoma di una cellula, di un tessuto o di un organismo, comprendendo nella definizione anche tutte le modificazioni che intervengono durante e dopo la traduzione (1, 2).

L'analisi del proteoma offre indubbiamente dei vantaggi rispetto alle analisi genetiche ed alla valutazione

dell'espressione genica. Infatti, è noto che un singolo gene può codificare per diversi RNA messaggeri e che ogni sequenza polipeptidica tradotta può andare incontro a molteplici modificazioni post-traduzionali ("post-translational modifications" o PTMs). Tutti questi processi, inoltre, sono finemente regolati, in quanto variano da tessuto a tessuto, tra differenti tipi cellulari, in relazione allo stadio di sviluppo di un organismo ed in relazione allo stato di salute o di malattia.

Solo un'analisi delle proteine, quindi, può effettivamente fornire informazioni sullo stato funzionale della cellula o dell'organismo in esame, in quanto sono le

proteine gli effettori biologici dell'informazione codificata dal genoma (2). Ad esempio, il bruco e la farfalla, pur condividendo lo stesso genoma, presentano una morfologia molto diversa in quanto esprimono un set di proteine (proteoma) differente in dipendenza dallo stadio di sviluppo (3).

Appare evidente, pertanto, che l'interesse dei ricercatori negli ultimi anni si sia sempre di più spostato dall'identificazione di nuovi geni alla caratterizzazione della funzione dei prodotti genici e che gli studi di genetica e di espressione genica debbano ormai essere implementati con l'analisi dei prodotti proteici. A tale scopo è stato coniato un nuovo termine, proteomica, con il quale si indica la scienza che studia l'insieme delle proteine codificate dal genoma di un organismo e la loro funzione (4). La proteomica può, quindi, essere considerata un'estensione logica della genomica. Questa definizione è stata ulteriormente estesa a comprendere non soltanto l'identificazione e la quantificazione delle proteine, ma anche la determinazione della loro localizzazione, modificazione, interazione, attività e funzione (5).

IL NUOVO APPROCCIO METODOLOGICO DELLA PROTEOMICA ALLA RICERCA MEDICA

Il rapido progresso della proteomica negli ultimi anni è stato sostenuto innanzitutto dal completamento del Progetto Genoma, che ha portato alla quasi completa conoscenza del genoma umano e di altre specie, nonché dal rapido sviluppo di strumenti di spettrometria di massa in grado di analizzare le proteine.

L'elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilammide (2D-PAGE) è la prima tecnica di separazione ad alta risoluzione in grado di separare le proteine in base al punto isoelettrico ed al peso molecolare (6) e, partendo da campioni complessi, consente di visualizzare e discriminare contemporaneamente migliaia di proteine sotto forma di "spot". L'identificazione della maggior parte delle singole proteine separate su questi gel ha dovuto, però, attendere gli anni '90 con l'avvento di nuove tecniche di ionizzazione ESI ("Electro-Spray Ionization") (7) e MALDI ("Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization") (8), che hanno reso possibile l'analisi di massa di molecole biologiche termolabili polari ad alto peso molecolare mediante una ionizzazione "delicata" (*soft*), in grado di permettere il loro passaggio in fase gassosa evitandone la decomposizione.

La spettrometria di massa svolge un ruolo essenziale nell'analisi proteomica e potenzialmente è in grado di identificare qualsiasi modificazione covalente che alteri la massa di una proteina. Oltre che per l'identificazione delle proteine, la spettrometria di massa

è utilizzata per la caratterizzazione ed il controllo di qualità delle proteine ricombinanti e per l'individuazione e la caratterizzazione delle modificazioni post-traduzionali (PTMs). Attualmente gli sforzi dei ricercatori sono concentrati nel migliorare la sensibilità, l'accuratezza ed il potere di risoluzione degli spettrometri di massa e nella combinazione di questi con tecniche di separazione proteica più efficienti e sensibili rispetto ai gel bidimensionali, come ad esempio la cromatografia liquida bidimensionale ("Two-Dimensional Liquid Chromatography" o 2D-LC).

La separazione delle proteine su gel bidimensionali di poliacrilammide consente di avere una visione d'insieme del contenuto proteico di un campione biologico e di individuare le PTMs di una proteina, visualizzabili sul gel come treni di "spot" dovuti a piccole differenze di punto isoelettrico (pI) e peso molecolare (PM). D'altra parte, l'elettroforesi bidimensionale soffre di alcune limitazioni in quanto si tratta di una tecnica lunga, laboriosa e difficilmente riproducibile ed automatizzabile. Inoltre, i suoi limiti restano l'analisi di proteine idrofobiche e/o di membrana e la mancanza di una tecnica di quantificazione proteica sensibile, sebbene il ricorso a coloranti fluorescenti sensibili abbia considerevolmente migliorato anche questo aspetto (9).

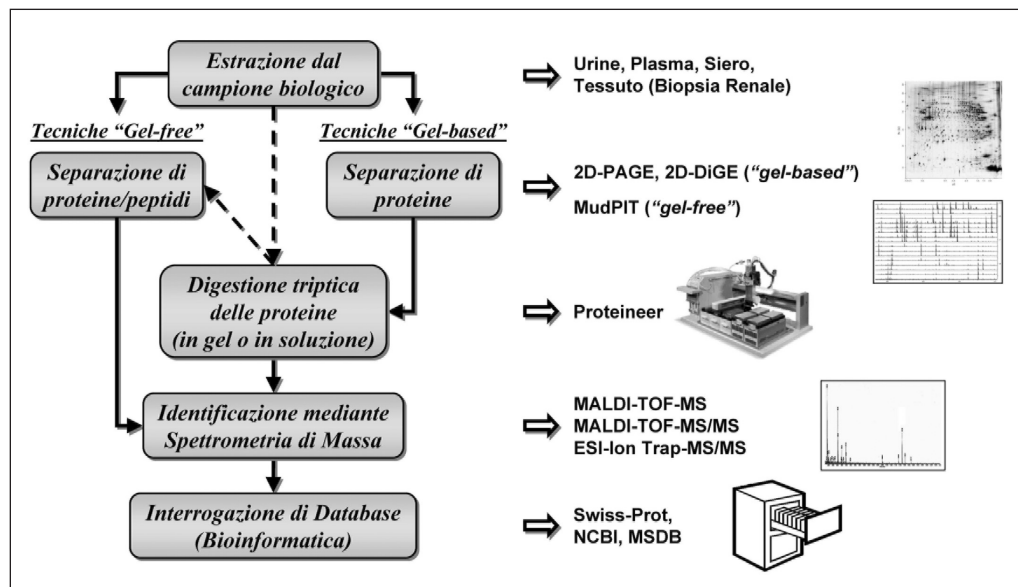
Di recente è stato messo a punto un nuovo approccio di separazione mediante gel elettroforesi, la 2D-DiGE ("Two-Dimensional Difference in Gel Electrophoresis"), che consente di ridurre la variabilità della tecnica 2D-PAGE. In questo caso, due campioni sono marcati separatamente con fluorocromi differenti appartenenti al gruppo delle cianine (Cy3 e Cy5) e successivamente sono mescolati e separati contemporaneamente sullo stesso gel bidimensionale. I due fluorocromi assorbono energia di fluorescenza a due diverse lunghezze d'onda. Pertanto la radiazione emessa cadrà nel visibile a due diverse lunghezze d'onda, conferendo ai due campioni due colorazioni diverse. Sarà visivamente possibile distinguere su uno stesso gel due campioni diversi, ed ottenere una valutazione quantitativa diretta del singolo *spot* tra i due campioni tramite un software specifico (10).

Un'altra strategia di separazione proteica si basa sull'uso della cromatografia liquida multidimensionale ("Multidimensional Protein Identification Technology" o MudPIT) che riduce la complessità del campione proteico e rende visibili le componenti meno abbondanti. Questo approccio è definito "gel free" in quanto prescinde dalla separazione delle proteine mediante elettroforesi su gel.

La sequenza tipica di un'analisi proteomica prevede cinque fasi principali:

- 1) l'estrazione delle proteine dal campione biologico;
- 2) la separazione della miscela di proteine;
- 3) la digestione triptica dei singoli *spots* proteici;

Fig. 1 - Sequenza dell'analisi proteomica.



- 4) l'identificazione dei peptidi mediante la spettrometria di massa;
- 5) la ricerca in banca dati.

Questa ultima fase prevede l'interrogazione di archivi informatici ("database") al fine di confrontare i dati sperimentali ottenuti (valori di massa/carica, ovvero m/z) dall'analisi in spettrometria di massa di peptidi triptici con i dati dei peptidi triptici presenti in letteratura, derivanti dalla digestione virtuale "in silico" di proteine note (Fig. 1).

Sicuramente una delle fasi cruciali dell'analisi proteomica è la preparazione del campione proteico, che deve garantire l'estrazione della maggiore quantità di proteine e la massima qualità delle molecole recuperate, evitandone la degradazione e la contaminazione. In questa fase è compreso anche il campionamento, in quanto la diversità tra i metodi di raccolta e conservazione del campione biologico da esaminare potrebbe influenzare notevolmente il contenuto proteico del campione stesso. Data la grande disponibilità dei metodi di estrazione proteica, per ogni campione biologico è necessario mettere a punto e standardizzare una metodica di estrazione che consenta di ottenere risultati riproducibili; in tal modo sarebbe possibile allo stesso tempo ridurre la variabilità intra-test ed inter-test e favorire un confronto tra i diversi gruppi di ricerca. Ad oggi, una metodica standard di raccolta ed estrazione proteica è disponibile solo per alcuni campioni biologici ed è liberamente accessibile "online" su siti internet specifici (ad esempio, www.expsy.org). La standardizzazione di una metodica di estrazione proteica da un campione biologico potrebbe anche non essere possibile per le caratteristiche intrinseche del campione in esame. Ad esempio, in

un recente studio (11), che ha esaminato 38 protocolli differenti di estrazione delle proteine dalle urine per l'analisi 2D-PAGE, è stato dimostrato che non esiste ad oggi un protocollo ideale per l'analisi dell'intero proteoma urinario e che tutti quelli utilizzati sinora sono tra loro complementari in termini di vantaggi e limiti.

Le proteine separate mediante 2D-PAGE, oppure mediante tecniche cromatografiche, possono essere successivamente identificate con i vari tipi di spettrometri di massa (MALDI-TOF-MS, Q-TOF-MS, ESI-ion trap-MS/MS, ecc.).

Tra le nuove tecniche di spettrometria di massa, l'analisi SELDI-TOF-MS ("Surface-Enhanced Laser Desorption-Ionization - Time Of Flight - Mass Spectrometry") sta acquistando un ruolo crescente negli studi clinici, soprattutto per la sua rapidità di analisi e la capacità di analizzare un grande numero di campioni in tempi relativamente brevi ("high-throughput"). Essa nasce dalla combinazione della tecnica MALDI-TOF-MS con la cromatografia di superficie ed offre il vantaggio di eseguire rapidamente l'analisi diretta del profilo proteico di campioni biologici in volumi molto piccoli. Nell'analisi SELDI-TOF-MS, i peptidi e le proteine presenti nel campione si legano in modo specifico ad un chip proteico in base alle proprie caratteristiche biochimiche, in quanto la superficie del chip è "funzionalizzata" con gruppi chimici opportuni. Questo approccio consente l'analisi di un gran numero di campioni ed è ideale per l'analisi delle proteine con peso molecolare inferiore a 20.000 Da.

Ciò che, però, ha incrementato il grado di automazione degli esperimenti di proteomica e che ha reso possibile l'impiego esteso delle tecniche di spettrometria di massa alle scienze biomediche è stato lo svi-

luppo di sofisticati algoritmi che permettono l'identificazione di proteine mediante la correlazione tra i dati sperimentali ottenuti analizzando i relativi digeriti triptici con la spettrometria di massa e quelli teorici riportati in un "database" dedicato. Tale approccio bioinformatico consente oggi di identificare direttamente qualsiasi proteina umana nota sulla base di informazioni elementari ottenute dalla spettrometria di massa semplicemente consultando banche dati accessibili "online" a tutti i ricercatori.

Come conseguenza del rapido progresso delle tecniche di proteomica, recentemente hanno avuto un rapido sviluppo i cosiddetti "Protein Arrays". Si tratta di sistemi di rilevazione multipla di determinate proteine e sono basati sull'uso di anticorpi coniugati a supporti solidi che riconoscono in modo specifico delle proteine individuate mediante l'analisi proteomica. Queste tecniche sono molto sensibili e di rapida esecuzione, ma non consentono l'analisi di un numero elevato di peptidi, né la rilevazione delle PTMs. Questo tipo di test è stato applicato con successo alla ricerca degli auto-anticorpi diretti in modo specifico verso strutture glomerulari nei pazienti affetti da LES (12).

Come detto, la proteomica studia tutte le proteine espresse dal genoma di un organismo o tessuto oggetto di studio. Negli ultimi anni, però, nell'ambito di questa disciplina sono emerse diverse branche che si occupano di studiarne aspetti specifici. In particolare, con il termine "proteomica di espressione o di profilo" si intende l'identificazione delle proteine presenti in un campione biologico o delle proteine differenzialmente espresse in due campioni diversi (ad esempio, il tessuto patologico versus il tessuto normale). La "proteomica funzionale", invece, studia la funzione delle proteine, valutando le interazioni proteina-ligando tramite la formazione di un complesso proteico *in vitro* tra una proteina nota fissata ad un supporto solido, detta "esca", ed i suoi *partners* proteici presenti nel campione biologico. La "proteomica strutturale" si occupa della determinazione della struttura terziaria delle proteine, o di complessi proteici, tramite la cristallografia a raggi-X e la biologia computazionale. Infine, il termine "proteomica clinica" è stato coniato di recente per indicare l'applicazione delle tecniche di proteomica alla ricerca clinica.

Da quanto detto appare chiaro come l'approccio metodologico di un'analisi proteomica sia completamente differente rispetto ai convenzionali metodi immunologici di analisi delle proteine. Le tecniche analitiche a disposizione, definite ad "high throughput" (alto rendimento), consentono, infatti, di non partire con un assunto a priori, come ad esempio la conferma della presenza di una proteina nota mediante l'uso di un anticorpo specifico, bensì di analizzare un campione "alla cieca" e di identificare simultaneamente numero-

se proteine, anche sconosciute, soltanto sulla base del rapporto massa/carica. Questo approccio può risultare molto utile per studi su larga scala e per lo *screening* di marcatori biologici associati a stati di malattia, oltre che per esaminare il profilo di espressione globale di cellule, tessuti ed organi.

TEST DI VERIFICA

1) Il proteoma è definito come:

- L'insieme completo degli RNA messaggeri espressi dal genoma di una cellula
- L'insieme completo dei peptidi espressi dal genoma di una cellula o di un organismo prima che subiscano delle modificazioni post-traduzionali
- L'insieme completo delle proteine citoplasmatiche espresse dal genoma di una cellula
- L'insieme completo delle proteine espresse dal genoma di una cellula o di un organismo
- L'insieme completo delle proteine espresse dal genoma di una cellula in mitosi.

2) Perché è più vantaggioso studiare il proteoma rispetto al genoma? (indicare la risposta errata)

- Perché, a differenza del genoma, il proteoma varia da tessuto a tessuto, tra differenti tipi di cellule nello stesso tessuto, in relazione allo stadio di sviluppo dell'organismo ed in relazione alle condizioni di salute o di malattia
- Perché lo studio del genoma e dei trascritti genici consente di definire precisamente i livelli di espressione dei prodotti proteici, ma non il loro stato funzionale
- Perché non esiste una stretta correlazione tra i livelli di RNA messaggero ed i livelli di espressione della corrispondente proteina
- Perché ogni singolo trascritto può dare origine a diverse isoforme della stessa proteina a seguito delle modificazioni post-traduzionali
- Perché l'espressione del RNA messaggero non necessariamente indica la presenza di una proteina attiva a livello cellulare.

3) Indicare la corretta sequenza dei passaggi che portano alla caratterizzazione proteomica di una cellula o di un organismo con un approccio "gel-based":

- Separazione delle proteine → digestione proteolitica degli spot proteici → analisi in spettrometria di massa → estrazione del campione biologico → ricerca in banca-dati

- b. Digestione proteolitica degli spot proteici → separazione delle proteine → estrazione del campione biologico → analisi in spettrometria di massa → ricerca in banca-dati
- c. Estrazione del campione biologico → separazione delle proteine → digestione proteolitica degli spot proteici → analisi in spettrometria di massa → ricerca in banca-dati
- d. Estrazione del campione biologico → separazione delle proteine → analisi in spettrometria di massa → ricerca in banca-dati → digestione proteolitica degli spot proteici
- e. Separazione delle proteine → digestione proteolitica degli spot proteici → estrazione del campione biologico → analisi in spettrometria di massa → ricerca in banca-dati.

4) Quale delle seguenti tecniche basate sull'analisi in spettrometria di massa può prescindere dalla separazione proteica basata sull'elettroforesi-in-gel?

- a. MALDI-TOF-MS
- b. Nano-LC-ESI-MS/MS
- c. TOF/TOF
- d. Q-TOF-MS
- e. SELDI-TOF-MS.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

PROTEOMICA E FISIOPATOLOGIA RENALE

L'approccio metodologico dell'analisi proteomica applicato allo studio della Nefrologia è molto promettente, in quanto può offrire un utile contributo in diversi campi. In particolare, la proteomica può migliorare la comprensione della fisiologia renale, la definizione dei meccanismi patologici delle malattie renali e l'identificazione di *biomarkers* per la diagnosi precoce ed il monitoraggio terapeutico delle malattie renali (13).

Sicuramente gli studi più promettenti di proteomica in Nefrologia riguardano l'individuazione di proteine urinarie che, mutando significativamente in termini di quantità o di distribuzione durante dei processi fisiopatologici, possono costituire degli utili bio-marcatori (*biomarkers*). Dopo un'opportuna validazione, queste proteine potrebbero diventare, infatti, bersagli ideali della terapia farmacologica o nuovi marcatori utili per

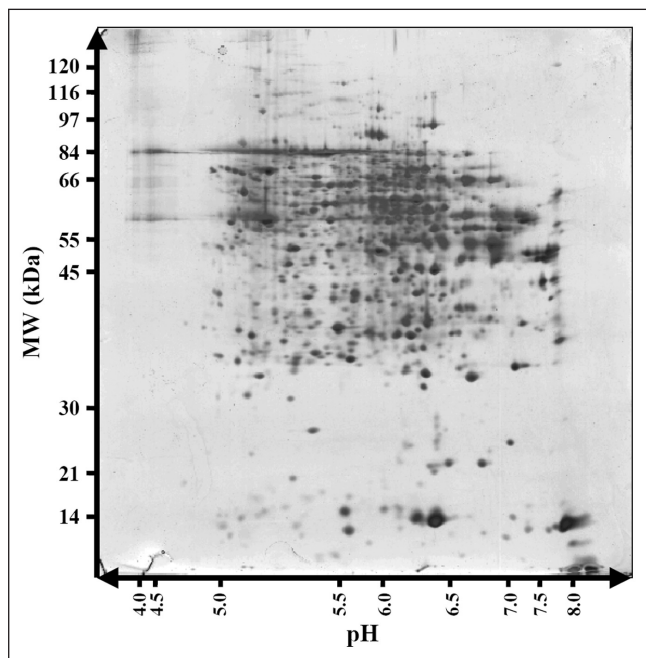


Fig. 2 - Gel bidimensionale (2-DE) dell'estratto proteico del tessuto renale normale.

Il tessuto renale sano, congelato in azoto liquido subito dopo la biopsia, è stato polverizzato con un mortaio in presenza di un appropriato buffer di lisi. Sessanta μg di proteine totali sono stati separati nella prima dimensione in base al loro punto isoelettrico (IEF, 40.000 VhT) su gel-strip di 13 cm, a pH 3-10 lineare, e nella seconda dimensione in base al loro peso molecolare su gel verticale di poliacrilammide. Gli spot proteici sono stati evidenziati tramite colorazione argentea.

la diagnosi o per la prognosi di una determinata nefropatia. Più difficoltosa è, invece, l'analisi del tessuto renale, sano o patologico, in quanto questa presuppone comunque un approccio invasivo. Inoltre, il rene è costituito da diversi tipi cellulari specializzati, ognuno dei quali esprime un proteoma specifico. Pertanto la maggior parte degli studi sul tessuto renale sono stati condotti su modelli animali.

Il profilo di espressione proteica del tessuto renale umano normale (Fig. 2), ottenuto mediante la 2D-PAGE e la spettrometria di massa, permette l'analisi d'insieme delle proteine renali e rappresenta un'interessante piattaforma per poter svolgere ulteriori studi di fisiologia e fisiopatologia del rene. Su un gel bidimensionale possono essere visualizzate più di 2000 proteine del rene umano e, di queste, ad oggi ne sono state caratterizzate circa 100 (14). Lo studio del rene con tecniche di indagine proteomica sta progredendo rapidamente e sta coinvolgendo tutti i compartimenti intra-renali, dalla cui analisi ci si aspetta di osservare una differente espressione proteica qualitativa e quantitativa in relazione alla notevole complessità strutturale e funzionale dell'organo. Recentemente, Magni et al. (15), hanno migliorato la mappa proteica

della corticale renale umana, aggiungendo 89 proteine a quelle già identificate da Arthur et al. (16). In questo studio, tra l'altro, erano state individuate 16 proteine differenzialmente espresse tra la porzione corticale e quella midollare del rene. Yoshida et al. (17), hanno descritto il proteoma caratteristico del glomerulo umano, Ransom et al. (18), il proteoma del podocita murino, mentre è ancora in fase di definizione la mappa proteica delle cellule mesangiali e delle cellule dell'epitelio tubulare (19).

Gli studi condotti su modelli animali di diverse nefropatie hanno dimostrato che l'analisi proteomica è in grado di evidenziare delle differenze nel proteoma del tessuto renale correlate ad una specifica patologia, consentendo di formulare nuove ipotesi fisiopatologiche. Questi dati necessitano comunque di essere rapidamente confermati mediante approcci più convenzionali di biologia molecolare.

Thongboonkerd e Klein (20), ad esempio, hanno evidenziato un ruolo significativo del sistema callicreina-callistatina nel danno renale indotto dall'ipossia, paragonando i gel bidimensionali dei proteomi renali di ratti esposti ad ipossia episodica (ipertesi) rispetto a quelli esposti ad ipossia continua ed ai controlli (entrambi normotesi). La callistatina, potente vasodilatatore, era meno espressa nel tessuto renale di entrambi i gruppi di ratti esposti ad ipossia rispetto ai controlli.

Gli stessi Autori hanno studiato i meccanismi cellulari sottesi al danno renale indotto dal diabete mellito su topi transgenici OVE26, che sviluppano un quadro clinico assai simile al diabete mellito di tipo 1 all'esordio. Applicando l'analisi proteomica a campioni di tessuto renale, sono state evidenziate 30 proteine differenzialmente espresse dai topi transgenici rispetto ai controlli sani. Tra queste spiccava l'aumento dell'espressione proteica degli inibitori dell'elastasi e la riduzione dell'elastasi. Questi dati hanno portato alla conclusione che l'elastina, la proteina degradata dall'elastasi, si accumula nel rene diabetico e può, quindi, giocare un ruolo determinante nel danno tubulare e nella fibrosi interstiziale della nefropatia diabetica (21, 22).

L'analisi proteomica del tessuto renale è stata applicata anche allo studio di modelli di nefropatia su base tossica; in particolare sono stati studiati ratti esposti ad elevati livelli di piombo (23), Ciclosporina-A (24), Gentamicina (25) e Puromicina Aminonucleoside (PAN) (26), allo scopo di determinare un'associazione tra il cambiamento di espressione proteica renale e l'agente nefrotossico.

Lo studio dei meccanismi patogenetici della proteinuria nelle malattie glomerulari si è avvalso dell'analisi proteomica per studiare il siero di pazienti con glomerulosclerosi focale segmentale nel tentativo di individuare dei "fattori di permeabilità" circolanti che dan-

neggerebbero la barriera di filtrazione glomerulare (27). L'analisi proteomica è stata utilizzata, inoltre, per lo studio dei monociti di pazienti affetti da Sindrome Nefrosica Idiopatica, il cui profilo di espressione proteica differiva da quello dei monociti di donatori sani e da quello dei monociti di pazienti affetti da Nefropatia ad IgA (28). Altri Autori hanno studiato il tessuto glomerulare ottenuto da ratti nei quali era stata indotta una glomerulonefrite con un anticorpo anti-Thy-1, evidenziando che una delle 28 proteine differenzialmente espresse nel tessuto patologico rispetto a quello normale era la tropomiosina 5, la quale risultava iperespressa nel glomerulo del ratto con glomerulonefrite da anticorpi anti-Thy-1 (29).

Anche il carcinoma renale è stato oggetto di numerosi studi di proteomica tissutale al fine di individuare *markers* precoci di malattia. Infatti, questa patologia è un esempio rilevante di come la sintomatologia clinica possa presentarsi anche a distanza di anni dall'esordio biologico della patologia. Utilizzando un approccio combinato di elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE) e spettrometria di massa (MALDI-TOF-MS), sono state identificate 8 proteine differenzialmente espresse nel tessuto renale neoplastico rispetto al tessuto renale sano (30). A questo sono seguiti altri studi (31) che hanno, però, evidenziato i limiti dell'indagine sul tessuto. Infatti, per quanto la ricerca di *biomarkers* tissutali della neoplasia possa risultare fruttuosa, essa non può prescindere dall'utilizzo di metodiche altamente invasive per la raccolta dei campioni biologici, il che limita la disponibilità del paziente, ma anche la ripetitività ed il *timing* di tale approccio. D'altra parte, la caratterizzazione proteomica di colture cellulari primarie di carcinoma renale in grado di mantenere lo stesso fenotipo del tessuto originale può risultare assai vantaggiosa per lo studio dei cambiamenti biochimici e molecolari associati alla neoplasia (32).

Infine, meritano di essere citati due studi indirizzati alla individuazione, "storicamente" elusiva, delle cosiddette tossine uremiche. In uno studio sono stati esaminati i proteomi dell'ultrafiltrato di pazienti uremici rispetto ai controlli, mediante l'impiego dei gel bidimensionali e del MALDI-TOF-MS. Questo approccio ha permesso di individuare 6 proteine tra le probabili tossine uremiche: la β 2-microglobulina, l' α ₁-antitripsina, l'albumina complessata con l'acido miristico e l'acido triiodobenzoico, il fattore D del complemento, la cistatina C e la *retinol-binding protein* (33). Nel secondo studio sono stati paragonati il profilo peptidico del fluido dializzato rimosso dalla dialisi ad alto flusso rispetto a quello rimosso a basso flusso. In questo caso l'analisi delle proteine è stata eseguita mediante elettroforesi capillare combinata alla spettrometria di massa (CE-ESI-TOF MS), consentendo l'individuazione di un profilo di espressione proteica caratteristico di

ciascuno dei due gruppi (34).

In conclusione, la definizione dei proteomi caratteristici di ciascuna struttura del rene rappresenta una premessa importante per la definizione più adeguata e completa a livello molecolare della fisiologia dell'organo. Inoltre, l'analisi comparata delle variazioni dei profili di espressione proteica in condizioni di patologia sperimentale e clinica potrà risultare molto utile per definire i meccanismi patogenetici sottesi allo stato di malattia, nonché la loro sequenza temporale, le modificazioni strutturali qualitative e quantitative che accompagnano la storia naturale della malattia e la loro eventuale modulazione a seguito degli interventi terapeutici. Infine, l'approccio proteomico rappresenta, almeno potenzialmente, un'eccezionale opportunità per l'identificazione di *markers* biologici precoci di malattia.

TEST DI VERIFICA

5) Gli studi di proteomica in Nefrologia possono migliorare:

- La comprensione della fisiologia renale
- La definizione dei meccanismi patologici delle malattie renali
- L'identificazione di *biomarkers* per la diagnosi precoce ed il monitoraggio terapeutico delle malattie renali
- Tutte le precedenti risposte sono corrette
- Nessuna delle precedenti risposte è corretta.

6) L'analisi di un rene umano su un gel bidimensionale:

- Non consente di discriminare la porzione corticale dalla midollare
- Non permette di studiare le modificazioni post-traduzionali
- Consente di visualizzare più di 2000 proteine, ma nessuna di esse è stata ad oggi caratterizzata
- Consente di visualizzare più di 2000 proteine, di cui ad oggi sono state caratterizzate circa 100
- Non consente di visualizzare le proteine delle cellule endoteliali.

7) Gli studi di proteomica su modelli animali di nefropatie hanno evidenziato un ruolo per:

- Il sistema callicreina-callistatina
- Il sistema elastasi-inibitori dell'elastasi
- La Fetuina A esosomale
- Tutte le precedenti risposte sono corrette
- Nessuna delle precedenti risposte è corretta.

MARCATORI BIOLOGICI DI DANNO RENALE: APPLICAZIONI DELLE TECNICHE DI PROTEOMICA ALLO STUDIO DELLE URINE

Le urine rappresentano teoricamente un ottimo substrato per condurre un'analisi proteomica al fine di poter individuare nuovi *biomarkers* di diagnosi precoce di nefropatia, monitorare la progressione del danno renale o identificare nuovi e più efficaci bersagli terapeutici. Convenzionalmente, la diagnosi "precoce" di patologia renale è basata sull'individuazione di anomalie urinarie o sul riscontro di un aumento della creatinina sierica o dei valori di pressione arteriosa. D'altro canto, è ben noto che la creatininemia sia un indice di danno renale assai poco sensibile e specifico, benché utilizzato estesamente nella pratica clinica, e che la sua concentrazione può essere influenzata dalle variazioni della massa muscolare e dalla secrezione tubulare. A conferma di ciò, è a tutti noto che alcune nefropatie croniche, quali le glomerulonefriti, possono presentare un minimo o addirittura nessun incremento della creatinina sierica non solo nelle fasi iniziali di danno renale, ma anche per anni dopo l'esordio biologico della patologia. Inoltre, nella maggior parte dei casi è necessario ricorrere ad un esame invasivo, quale è la biopsia renale, per poter porre una diagnosi precisa di nefropatia e per poter esprimere un giudizio sulla prognosi *quoad functionem*.

Nella Tabella I (35) sono elencati i classici *biomarkers* urinari di danno renale, considerati indicatori "non invasivi" e precoci rispetto alla creatinina. La variazione di escrezione urinaria di questi *biomarkers* riflette il danno renale in parti specifiche del rene. Infatti, l'aumento di escrezione urinaria di albumina, immunoglobuline G e altre proteine ad alto peso molecolare è indice di danno glomerulare (barriera di filtrazione), in particolare a livello dei podociti, mentre la presenza nelle urine di proteine a basso peso molecolare (β_2 -microglobulina, α_1 -microglobulina) e di enzimi a prevalente localizzazione tubulare (N-acetil-glucosaminidasi, alanina amminopeptidasi, fosfatasi alcalina, γ -glutamyltransferasi) può essere considerata marcatore precoce (rispetto alla creatinina) di danno acuto o cronico dell'epitelio tubulare (36).

Sebbene l'aumento dell'enzimuria possa segnalare la presenza di danno tubulare assai prima dell'aumento dell'urea o della creatinina sierica, l'utilità clinica di tale *marker* è oscurata dalla bassa concentrazione urinaria di tali proteine, difficilmente valutabili, soprattutto nelle fasi precoci del danno d'organo. È attualmente in fase di valutazione una nuova classe di *markers* urinari di danno tubulare acuto illustrata nella Tabella II (35). Tra questi si distingue la KIM-1 (*kidney injury molecule-1*), una proteina

TABELLA I - BIO-MARCATORI URINARI "CLASSICI" DI DANNO RENALE

Marcatore Biologico	Principale tipo di danno	Bibliografia
Proteine ad alto peso molecolare		
Albumina	Glomerulare	Jungers P, et al. Nephrol Dial Trasplant 1995 Bazzi C, et al. Kidney Int 2000
Transferrina	Glomerulare	Mackinnon B, et al. Clin Nephrol 2003
Immunoglobuline	Glomerulare	Corso A, et al. Ann Hematol 2003
Proteine a basso peso molecolare		
β_2 -microglobulina	Tubulo Proximale	Tolkoff-Rubin NE, et al. Clin Lab Med 1988
Retinol binding protein	Tubulo Proximale	Tolkoff-Rubin NE, et al. Clin Lab Med 1988
α_1 -microglobulina	Tubulo Proximale	Bazzi C, et al. Am J Kidney Dis 2001
Antigeni del "brush border"		
Adenosine deaminase binding protein	Tubulo Proximale	Tolkoff-Rubin NE, et al. Clin Lab Med 1988
Anidrasi carbonica	Tubulo Proximale	Taniguchi N, et al. Environ Res 1979
Enzimi urinari		
Endopeptidasi neutra	Tubulo Proximale	Nortier J, et al. Occup Environ Med 1997
Alanina amminopeptidasi		Tolkoff-Rubin NE, et al. Clin Lab Med 1988; Gibey R, et al. Clin Chim Acta 1981; Stonard MD, et al. Fundam Appl Toxicol 1987
γ -glutamyltransferasi (GGT) 1998	Tubulo Proximale	Kohli MM, et al. Experientia 1996; Donaldio C, et al. Ren Fail
Fosfatasi Alcalina	Tubulo Proximale > Tubulo Distale	Stonard MD, et al. Fundam Appl Toxicol 1987; Nowen EJ, et al. Kidney Int 1994
N-acetil-glucosamminidasi (NAG)	Tubulo Proximale > Tubulo Distale	Tolkoff-Rubin NE, et al. Clin Lab Med 1988; Gibey R, et al. Clin Chim Acta 1981; Stonard MD, et al. Fundam Appl Toxicol 1987
α -GST	Tubulo Proximale	Usuda K, et al. Arch Toxicol 1998; Branten AJ, et al. Nephron 2000
π -GST	Tubulo Distale	Usuda K, et al. Arch Toxicol 1998; Branten AJ, et al. Nephron 2000
Lattato deidrogenasi	Tubulo Proximale > Tubulo Distale	Stonard MD, et al. Fundam Appl Toxicol 1987; Olbricht CJ, et al. Nephrol Dial Trasplant 1994
Callicreina	Tubulo Distale	O'Connor DT, et al. Am J Med 1982; Girolami JP, et al. Toxicology 1989; Bompert G, et al. Toxicol Lett 1990
Glicoproteina Tamm-Horsfall	Tubulo Distale	Torffvit O, et al. Nephron 1998

di transmembrana che risulta iperespressa nelle cellule tubulari prossimali subito dopo il danno ischemico e la cui forma solubile è stata misurata nelle urine mediante l'uso di un anticorpo monoclonale, 12 ore dopo l'inizio dell'insulto ischemico (37, 38). L'utilità della KIM-1 umana urinaria come *marker* precoce di danno renale è attualmente in fase di studio e ciò che la rende particolarmente attraente è la sua completa assenza nel tessuto renale normale.

La ricerca di *biomarkers* precoci di malattia renale nelle urine è sollecitata dalla facile reperibilità del campione biologico, dalla non invasività del metodo di raccolta dei campioni e dalla elevata disponibilità, almeno potenziale, di proteine di origine renale in tale fluido biologico.

Il danno renale acuto o cronico è una complessa entità dovuta a cause multiple ed è quindi molto probabi-

le che un singolo marcatore non sia sufficientemente sensibile e specifico. È più probabile, invece, che sia richiesto un *set* di marcatori per soddisfare le caratteristiche di specificità e sensibilità richieste ad un *bio-marker* diagnostico. A questo proposito l'applicazione delle metodologie di analisi proteomica al campione urinario rappresenta un importante strumento di *screening* per generare un *set* di *biomarkers* candidati che possano successivamente essere ricercati e valutati su larga scala con l'utilizzo di metodiche di indagine tradizionali, adottabili nei laboratori di patologia clinica di routine (ELISA, immuno-nefelometria, immunoistochimica, immunoblot, ecc.).

Lo studio del proteoma urinario umano presenta comunque delle problematiche tecniche rilevanti, dovute alla complessa natura delle urine ed alla conseguente difficoltà di standardizzare i risultati ottenuti.

TABELLA II - NUOVI MARCATORI BIOLOGICI URINARI DI DANNO RENALE ACUTO

Marcatore Biologico	Tipo di danno	Bibliografia
KIM-1 (<i>kidney-injury-molecule 1</i>)	Necrosi tubulare acuta ischemica e tossica	Han WK, et al. <i>Kidney Int</i> 2002; Han WK, et al. <i>J Am Soc Nephrol</i> 2005; Ichimura T, et al. <i>Am J Renal Physiol</i> 2004
NGAL (<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>)	Necrosi tubulare acuta ischemica e tossica	Mishra J, et al. <i>Am J Nephrol</i> 2004
NHE3	Necrosi tubulare acuta ischemica	Du Cheyron D, et al. <i>Am J Kidney Dis</i> 2003
Cyr61	Necrosi tubulare acuta ischemica	Muramatsu Y, et al. <i>Kidney Int</i> 2002
Actina	Necrosi tubulare acuta ischemica e ritardata ripresa funzionale del trapianto renale	Kwon O, et al. <i>Am J Kidney Dis</i> 2003
Citochine (IL-6, IL-8, IL-18)	IRA e ritardata ripresa funzionale del trapianto renale	Kwon O, et al. <i>Am J Kidney Dis</i> 2003; Parikh CR, et al. <i>Am J Kidney Dis</i> 2004
Cistatina C	Danno del tubulo prossimale	Herget-Rosenthal S, et al. <i>Clin Chem</i> 2004
α -GST	Danno del tubulo prossimale e tossicità da ciclosporina A	Usuda K, et al. <i>Arch Toxicol</i> 1998; Branten AJ, et al. <i>Nephron</i> 2000
π -GST	Danno del tubulo distale, rigetto acuto	Usuda K, et al. <i>Arch Toxicol</i> 1998; Branten AJ, et al. <i>Nephron</i> 2000
Fetulina A	Danno renale acuto	Zhou H, et al. <i>Kidney Int</i> 2006

L'elevata diluizione delle proteine e, di conseguenza, la necessità di congelare e conservare grandi volumi di campioni urinari, l'elevata concentrazione salina, che interferisce con le tecniche di separazione elettroforetica delle proteine, l'alta variabilità inter-individuale (sesso, età, razza, dieta, terapia), che rende difficile ottenere campioni proteici omogenei, rappresentano i principali problemi dell'analisi proteomica delle urine. A questi si aggiunge l'aumento delle proteine ad alto peso molecolare, come l'albumina e le immunoglobuline, che vanno rimosse dai campioni urinari di pazienti proteinurici per permettere la visualizzazione sul gel bidimensionale delle proteine co-migranti (stesso punto isoelettrico e stesso peso molecolare dell'albumina e delle IgG) e delle proteine poco abbondanti. Una delle sfide più importanti in campo proteomico è il miglioramento della visualizzazione delle proteine poco abbondanti, perché a questa classe pare appartenere la maggior parte dei potenziali marcatori biologici di malattia. Per la deplezione dell'albumina e delle immunoglobuline dai fluidi biologici (siero e urine) vengono comunemente usati dei *kit* commerciali, veloci e facili da utilizzare, basati su resine sulle quali sono immobilizzati degli anticorpi specifici. Nonostante l'alta specificità e l'efficacia dei *kit* commerciali, non è escluso che anche altre proteine possano essere rimosse insieme all'albumina e alle immunoglobuline. Un metodo più efficace, ma più comples-

so per arricchire il campione biologico di proteine meno abbondanti, è quello cromatografico che, attraverso il passaggio del campione su colonne specifiche, permette il frazionamento delle proteine in base al loro peso molecolare (*Size Exclusion Chromatography* o SEC) (39).

Al contrario del tessuto renale (14), la raccolta e il processamento dei campioni urinari non è ancora stata standardizzata, e nella banca dati *online* dei gel bidimensionali (SWISS 2D-PAGE; www.expasy.org/ch2d/) non è ancora pubblicata la mappa del proteoma urinario umano. In Figura 3 è mostrato il gel bidimensionale del proteoma urinario umano ottenuto presso il nostro laboratorio mediante l'adattamento del protocollo di estrazione proteica di Thongboonkerd (40), e la cui riproducibilità è stata più volte confermata.

Nel momento in cui, però, dall'analisi qualitativa si intende avviare un'analisi quantitativa o semi-quantitativa, l'ostacolo più rilevante finora incontrato è certamente la standardizzazione dei dati ottenuti, in quanto i livelli di espressione proteica urinaria andrebbero normalizzati ad uno standard di riferimento; i due parametri più utilizzati in letteratura che più si adattano a svolgere questa funzione sono la creatininuria della 24 ore ed il rapporto proteine escrete/creatininuria.

L'interesse verso lo studio del proteoma urinario nelle diverse nefropatie è dimostrato dal numero crescente di lavori presenti in letteratura; tuttavia l'eterogeneità

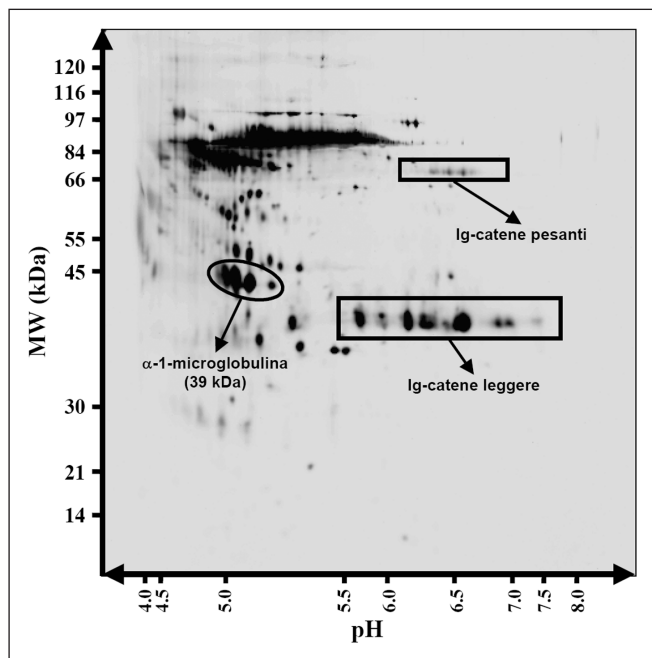


Fig. 3 - Gel bidimensionale (2-DE) delle proteine urinarie umane. Le proteine urinarie sono state isolate dalle urine di un soggetto normale subito dopo la minzione, applicando un protocollo già descritto in letteratura (40). Separazione delle proteine e colorazione come descritto in Figura 2.

dei risultati conferma la complessità dell'analisi proteomica delle urine umane. I primi lavori in questo ambito hanno cercato di definire il proteoma urinario normale per poter evidenziare successivamente le differenze con le urine dei pazienti affetti da diverse nefropatie. L'approccio più utilizzato è stato quello dell'elettroforesi bidimensionale ad alta risoluzione, la quale ha però richiesto notevoli sforzi a partire dai primi anni '80 per lo sviluppo della metodologia e per la mappatura delle proteine urinarie (41). Successivamente sono stati adottati anche metodi di indagine basati sulla separazione cromatografica. Spahr et al. (9), ad esempio, hanno tentato di definire il proteoma urinario adottando una combinazione di cromatografia liquida e spettrometria di massa, ed hanno analizzato campioni urinari dopo digestione triptica individuando ben 124 proteine (42). In un altro studio, Thongboonkerd et al. utilizzando la 2D-PAGE, hanno analizzato le urine di donatori sani precipitate in acetone ed hanno definito la prima mappa del proteoma urinario costituita da 67 proteine e dalle loro isoforme (42). Successivamente Oh et al. (43), hanno implementato il lavoro precedente, estendendo la mappa a ben 113 proteine. Studi successivi hanno ulteriormente allargato la conoscenza del proteoma urinario normale, consentendo ad oggi di identificare circa 800 proteine e di porre le basi per la scoperta di biomarkers nel proteoma urinario (39, 44, 45).

Attualmente, comunque, lo studio più completo sulla caratterizzazione del proteoma urinario individua circa 1500 proteine (o frammenti) nelle urine di soggetti sani (46). Un gran numero di proteine riportate in questo studio sono costituite da proteine di membrana e ciò può essere dovuto alla presenza degli esosomi, piccole vescicole rilasciate dai complessi endosomali cellulari (47). Recentemente, proprio una proteina esosomale, la Fetuina A, è stata proposta come marker di danno renale acuto nel ratto, dato confermato mediante *immunoblotting* nelle urine di tre pazienti affetti da insufficienza renale acuta (48). Benché questi dati siano molto interessanti e promettenti, tuttavia necessitano di essere confermati con ulteriori studi.

In letteratura sono presenti numerosi lavori in cui è stato studiato il proteoma urinario di pazienti affetti da diverse nefropatie al fine di individuare potenziali biomarkers utili alla diagnosi.

Thongboonkerd et al., utilizzando la 2D-PAGE ed il MALDI-TOF-MS, hanno paragonato i proteomi urinari di pazienti con nefropatia diabetica, glomerulosclerosi renale segmentaria, e nefrite lupica classe V, tra di loro e con dei controlli sani, individuando 25 proteine espresse diversamente tra i gruppi (49). In particolare l'albumina, la transferrina e l' α_1 -antitripsina erano significativamente più espresse nelle tre classi di pazienti rispetto ai controlli.

Mischak e Fliser, invece, hanno utilizzato una raffinata combinazione di elettroforesi capillare e spettrometria di massa (CE-MS/MALDI-TOF) per individuare un "pattern peptidico normale" nelle urine di soggetti sani e un "pattern peptidico diabetico" caratteristico dei pazienti con nefropatia diabetica (Diabete Mellito di tipo 2) (50). I frammenti peptidici da loro individuati appartengono a proteine coinvolte nella malattia renale come l'*insulin-like peptide 3*, l'*uromodulina* e la proteina di Tamm-Horsfall. Le proteine "genitrici" dei frammenti peptidici trovati, essendo più grandi, possono essere individuate nelle urine solo a danno renale conclamato, mentre questi frammenti peptidici più piccoli, passando più facilmente attraverso il filtro glomerulare, possono essere utilizzati come markers precoci di danno renale in corso di diabete mellito. Una spiegazione alternativa all'aumento (o diminuzione) di questi frammenti peptidici nelle urine potrebbe essere attribuiti al cambiamento dell'attività proteolitica dovuto allo stato patologico. A tal proposito, Sharma et al., analizzando le urine di tre pazienti affetti da nefropatia diabetica, hanno descritto un incremento dell'espressione di α_1 -antitripsina, dato che è stato poi confermato mediante *immunoblotting* (51).

Diversi studi sono stati condotti anche sulle urine di pazienti affetti da nefropatia a depositi mesangiali di IgA (IgAN). Ad esempio, in un lavoro Park et al. hanno confrontato mediante 2D-PAGE le urine di 13 pazienti

con IgAN con quelle di 12 donatori sani ed hanno descritto un insieme di proteine differentemente espresse, tentando in tal modo di porre le basi per la descrizione del proteoma urinario caratteristico dell'IgAN (52). Un altro gruppo, invece, ha utilizzato una combinazione di elettroforesi capillare e spettrometria di massa (CE-MS), individuando un profilo urinario peptidico IgAN-specifico (53).

Il nostro gruppo, invece, ha analizzato il proteoma urinario di 18 pazienti affetti da IgAN, individuando, mediante un approccio "gel-based" (2D-PAGE seguita da nanoHPLC-ESI-MS/MS), tre proteine differentemente espresse tra soggetti che avevano risposto al trattamento con ACE-inibitori e pazienti che non avevano risposto, ovvero il kininogeno, l'*inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4* (ITIH-4, frammento di 35 kDa) e la Transtiretina (54). In particolare ridotti livelli urinari di kininogeno, confermati mediante *immunoblotting*, si associavano ad una inadeguata o assente risposta alla terapia con ACE-inibitori dopo 6 mesi di *follow-up* (54).

Lo stesso approccio è stato utilizzato per studiare le urine di pazienti portatori di rene trapiantato ed affetti da rigetto acuto. In particolare Wittke et al. (55), hanno descritto un profilo peptidico urinario caratteristico del rigetto acuto tubulointerstiziale, differente rispetto a quello di pazienti affetti da infezione del tratto urinario e di pazienti trapiantati di controllo. Sempre nel *setting* del trapianto renale, Schaub et al. (56), hanno utilizzato l'analisi SELDI-TOF-MS per differenziare il profilo peptidico urinario di pazienti trapiantati con rigetto acuto da quello di soggetti normali e di pazienti trapiantati con funzione renale stabile, dimostrando in tal modo che il pattern proteomico può essere utilizzato come *marker* diagnostico e/o prognostico di danno renale. Purtroppo, i limiti dell'analisi SELDI non hanno permesso l'identificazione dei *biomarkers* candidati specifici: a tal scopo sono necessari ulteriori metodi di identificazione affinché si possano poi sviluppare dei test diagnostici applicabili al letto del paziente.

Altri studi sono stati condotti nelle urine di pazienti affetti da glomerulosclerosi focale e segmentaria, glomerulopatia a lesioni minime e glomerulonefrite membranosa (50, 53, 57) portando all'identificazione di pattern proteici specifici. Tutti questi dati, però, necessitano di essere confermati con studi su casistiche più estese e con metodiche quantitative tradizionali prima di poter essere adottati nella pratica clinica.

Infine l'analisi del proteoma urinario è stata condotta anche per ottenere informazioni sulla prognosi di determinate patologie e sulla risposta alla terapia farmacologica. In uno studio recente, Decramer et al. (58), hanno descritto profili proteici specifici di differenti gradi di stenosi del giunto pielo-ureterale, dimostrando che questi profili correlavano con l'*outcome*

clinico della patologia dopo 9 mesi di *follow-up*. In un altro studio, Rossing et al. (59), hanno osservato che il trattamento con Candesartan in pazienti diabetici microalbuminurici induceva variazioni significative nell'espressione di 15 su 113 proteine caratteristiche del danno renale in corso di nefropatia diabetica. In questo modo essi hanno dimostrato che le tecniche di proteomica possono essere un metodo rapido e non invasivo per il monitoraggio clinico della progressione di una nefropatia o della risposta alla terapia farmacologica.

TEST DI VERIFICA

8) È più utile ricercare marcatori biologici di danno renale nelle urine piuttosto che nel tessuto per:

- L'alta concentrazione salina che stabilizza le proteine
- L'assenza di proteine ad alto peso molecolare (albumina, immunoglobuline)
- La non invasività del metodo di raccolta del campione biologico e la più alta probabilità di identificare proteine di origine renale
- La maggiore probabilità di trovare fattori trascrizionali e proteine intracellulari
- L'assenza di proteine secrete e di isoforme recettoriali solubili.

9) L'analisi proteomica delle urine presenta delle difficoltà metodologiche per le seguenti ragioni (indicare la risposta errata):

- Difficoltà nella corretta raccolta e conservazione del campione
- Elevata diluizione delle proteine presenti
- Elevata concentrazione salina
- Notevole variabilità inter-individuale
- Aumento delle proteine ad alto peso molecolare, come l'albumina e le immunoglobuline, mascherano la visualizzazione sul gel bidimensionale delle proteine co-migranti e delle proteine poco abbondanti.

10) Quali delle seguenti nefropatie non sono state studiate con l'analisi proteomica:

- Nefropatia diabetica
- Nefropatia a depositi mesangiali di IgA
- Rigetto acuto del rene trapiantato
- Nefropatia cronica del trapianto
- Glomerulosclerosi focale e segmentaria.

PROSPETTIVE E CONCLUSIONI

Il proteoma urinario rappresenta un promettente e potente strumento di indagine nella ricerca nefrologica. Molti degli studi effettuati evidenziano le potenzialità delle tecniche di indagine proteomica per meglio comprendere la fisiologia renale e la fisiopatologia delle malattie renali, e per identificare nuovi *biomarkers* diagnostici, prognostici e di monitoraggio terapeutico. Sicuramente il ricorso a protocolli di raccolta e processamento dei campioni urinari validati e uniformemente condivisi potrebbe contribuire a rendere omogenei i campioni biologici da analizzare e, di conseguenza, ad ottenere risultati riproducibili e confrontabili tra i vari gruppi di ricerca. Il primo passo in questa direzione è certamente la definizione di Linee Guida condivise per la proteomica clinica (60), nonché l'avvio di un più esteso programma di studio del proteoma renale e urinario umano ("*Human Kidney and Urine Proteome Project*" o HKUPP; <http://hkupp.kir.jp>).

Inoltre, la "proteomica funzionale" aiuterà a definire la funzione delle proteine isolate con gli studi di proteomica di espressione, nella prospettiva di rendere questi dati applicabili alla clinica. Attualmente molti gruppi di ricerca "pensano in termini di proteomica" e molti di questi stanno compiendo grandi sforzi per trasferire i risultati dell'analisi proteomica alla pratica clinica. La grande sfida per i ricercatori risiede sicuramente nell'individuazione delle proteine meno abbondanti, che spesso costituiscono utili *biomarkers*. I metodi attualmente a disposizione per l'eliminazione delle proteine più abbondanti non sono molto specifici e spesso comportano la perdita di altre informazioni. La messa a punto di un metodo di rilevazione simile alla PCR per il DNA potrebbe contribuire a risolvere molti problemi. Lo sforzo dei ricercatori è attualmente rivolto, da un lato al potenziamento delle tecniche di spettrometria di massa, utili alla maggiore affidabilità dell'identificazione proteica ed all'individuazione delle modificazioni post traduzionali delle proteine, e dall'altro alla "proteomica clinica", termine coniato per indicare l'applicazione delle tecniche di proteomica e dell'informatica alla ricerca clinica. In tale contesto il Nefrologo clinico si può porre come "cerniera" preziosa tra il paziente ed il ricercatore, in quanto può intervenire in due momenti cruciali dell'indagine. In primo luogo deve assicurare un'accurata selezione dei pazienti, che è premessa indispensabile per ottenere la migliore omogeneità dei campioni biologici e permet-

tere un significativo confronto tra i profili proteomici di potenziale rilevanza biologica. Successivamente il Nefrologo ha il compito di trasferire alla clinica i risultati della analisi proteomica al fine di validarne il significato nella diagnostica precoce e nel monitoraggio della progressione del danno renale.

RIASSUNTO

In epoca post-genomica, stanno progressivamente emergendo diverse discipline "omiche". In particolare la "Proteomica" ha conosciuto un rapido sviluppo nel recente passato e mostra grandi potenzialità di crescita nel prossimo futuro. Nella comunità scientifica nefrologica, le tecniche di indagine proteomica trovano sempre maggiori applicazioni, consentendo di estendere enormemente le possibilità di studio della fisiologia e della fisiopatologia renale. In questa rassegna è stato evidenziato il ruolo dell'elettroforesi bidimensionale su gel, il cui limite di sensibilità è stato enormemente ampliato dall'introduzione di nuovi e sofisticati software per l'analisi di immagine e dallo sviluppo della bioinformatica, nonché dall'affermarsi di metodologie innovative di analisi in spettrometria di massa che utilizzano nuove tecniche di ionizzazione degli analiti (nanoLC-ESI-MS, MALDI-TOF-MS, SELDI-TOF-MS, CE-ESI-MS) e di "protein-array" su supporti solidi. Inoltre, sono stati discussi il ruolo, l'efficacia e le potenzialità diagnostiche di differenti approcci proteomici, evidenziandone le difficoltà attuali e le potenziali soluzioni. Infine, è stato evidenziato il ruolo integrante della bioinformatica e la necessità di standardizzare le procedure di raccolta, processamento e conservazione del campione e di analisi dei risultati ottenuti.

Nonostante questo campo di indagine sia ancora al suo stadio embrionale, le conoscenze acquisite a tutt'oggi costituiscono una premessa importante non solo per meglio comprendere la fisiologia e la fisiopatologia renale, ma anche eventualmente per identificare nuovi marcatori di malattia e sviluppare nuove terapie. Questa rassegna intende offrire una panoramica sulle "scienze proteomiche", descrivendone i presupposti scientifici, definendone i campi di applicazione, evidenziandone la potenziale applicabilità in ambito nefrologico e riportandone vantaggi e limiti.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

BIBLIOGRAFIA

1. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207.
2. O'Riordan E, Gross SS, Goligorsky MS. Technology Insight: renal proteomics—at the crossroads between promise and problems. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2: 445-58.
3. Klein JB, Thongboonkerd V. Thongboonkerd V, Klein JB (eds): Overview of proteomics. *Contrib Nephrol Basel, Karger* 2004; 141: 1-10.
4. Wilkins MR, Sanchez JS, Gooley AA, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996; 13: 19-50.
5. Fields S. Proteomics in Genomeland. *Science* 2001; 291: 1221-4.
6. O'Farrell PH. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *J Biol Chem* 1975; 250: 4007-21.
7. Fenn JB, Mann M, Meng CK, et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246: 64-71.
8. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988; 60: 2299-301.
9. Spahr CS, Davis MT, McGinley MD, et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Profiling an unfractionated tryptic digest. *Proteomics* 2001; 1: 93-107.
10. Wu TL. Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Methods Mol Biol* 2006; 328: 71-95.
11. Thongboonkerd V, Chutipongtanate S, Kaulaya R. Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality, and variability. *J Proteome Res* 2006; 5: 183-91.
12. Li QZ, Xie C, Wu T, et al. Identification of autoantibody clusters that best predict lupus disease activity using glomerular proteome arrays. *J Clin Invest* 2005; 115: 3428-39.
13. Thongboonkerd V. Proteomics in Nephrology: Current Status and Future Directions. *Am J Nephrol* 2004; 24: 360-78.
14. Sarto C, Marocchi A, Sanchez J, et al. Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression. *Electrophoresis* 1997; 18: 599-604.
15. Magni F, Sarto C, Valsecchi C, et al. Expanding the proteome two-dimensional gel electrophoresis reference map of human renal cortex by peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 2005; 5: 816-25.
16. Arthur JM, Thongboonkerd V, Scherzer JA, et al. Differential expression of proteins in renal cortex and medulla: A proteomic approach. *Kidney Int* 2002; 62: 1314-21.
17. Yoshida Y, Miyazaki K, Kamiie J, et al. Two-dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney glomerulus proteome and construction of an extensible markup language (XML)-based database. *Proteomics* 2005; 5: 1083-96.
18. Ransom RF, Vega-Warner V, Smoyer WE, Klein J. Differential proteomic analysis of proteins induced by glucocorticoids in cultured murine podocytes. *Kidney Int* 2005; 67: 1275-85.
19. Cutillas PR, Biber J, Marks J, et al. Proteomic analysis of plasma membrane vesicles isolated from the rat renal cortex. *Proteomics* 2005; 5: 101-12.
20. Thongboonkerd V, Klein JB. Thongboonkerd V, Klein JB (eds): Proteomics and hypertension. *Contrib Nephrol Basel, Karger* 2004; 141: 245-56.
21. Thongboonkerd V, Barati MT, McLeish KR, et al. Alterations in the renal elastin-elastase system in type 1 diabetic nephropathy identified by proteomics analysis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 650-62.
22. Thongboonkerd V, Barati MT, McLeish KR, et al. Thongboonkerd V, Klein JB (eds): Proteomics in Nephrology. *Contrib Nephrol Basel, Karger* 2004; 141: 142-54.
23. Witzmann FA, Fultz CD, Grant RA, et al. Regional protein alterations in rat kidneys induced by lead exposure. *Electrophoresis* 1999; 20: 943-51.
24. Aicher L, Wahl D, Arce A, et al. New insights into cyclosporine A nephrotoxicity by proteome analysis. *Electrophoresis* 1998; 19: 1998-2003.
25. Charwood J, Skehel JM, King N, et al. Proteomics analysis of rat kidneys cortex following treatment with gentamicin. *J Proteome Res* 2002; 1: 73-82.
26. Cutler P, Bell DJ, Birrell HC, et al. An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity. *Electrophoresis* 1999; 20: 3647-58.
27. Musante L, Candiano G, Bruschi M, et al. Characterization of plasma factors that alter the permeability to albumin within isolated glomeruli. *Proteomics* 2002; 2: 197-205.
28. Gonzalez E, Neuhaus T, Kemper M, et al. Mononuclear cell proteins involved in idiopathic nephrotic syndrome of childhood: a proteomic approach. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 583A.
29. Nazeer K, Arthur JM, Barber K, et al. Detection and characterization of glomerulonephritis associated proteins using a proteomics approach. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 408A.
30. Hwa JS, Park HJ, Jung JH, et al. Identification of proteins differentially expressed in the conventional renal cell carcinoma by proteomic analysis. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 450-5.
31. Shi T, Dong F, Liou LS, et al. Differential protein profiling in renal-cell carcinoma. *Mol Carcinog* 2004; 40: 47-61.
32. Perego RA, Bianchi C, Corizzato M, et al. Primary cell cultures arising from normal kidney and renal cell carcinoma retain the proteomic profile of corresponding tissues. *J Prot Research* 2005; 4: 1503-10.
33. Ward RA, Brinkley KA. A proteomics analysis of proteins removed by ultrafiltration during extracorporeal renal replacement therapy. Thongboonkerd V, Klein JB (eds): *Proteomics in Nephrology. Contrib Nephrol Basel, Karger* 2004; 141: 280-91.
34. Kaiser T, Hermann A, Kielstein JT, et al. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry to establish polypeptide patterns in dialysis fluids. *J Chromatogr A* 2003; 1013: 157-71.
35. Han WK, Bonventre JV. Biologic markers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care* 2004; 10: 476-82.
36. D'Amico G, Bazzi C. Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12: 639-43.
37. Han WK, Bailly V, Abichandani R, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002; 62: 237-44.
38. Han WK, Alinani A, Wu CL, et al. Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1126-34.
39. Pieper R, Gatlin CL, McGrath AM, et al. Characterization of the human urinary proteome: A method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics* 2004; 4: 1159-74.
40. Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM, Klein JB. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int* 2002; 62: 1461-9.

41. Marshall T, Williams KM. High resolution two-dimensional electrophoresis of human urinary proteins. *Anal Chim Acta* 1998; 371: 147-60.
42. Davis MT, Spahr CS, McGinley MD, et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. II. Limitations of complex mixture analyses. *Proteomics* 2001; 1: 108-17.
43. Oh J, Pyo JH, Jo EH, et al. Establishment of a near-standard two-dimensional human urine proteomic map. *Proteomics* 2004; 4: 3485-97.
44. Sun W, Li F, Wu S, et al. Human urine proteome analysis by three separation approaches. *Proteomics* 2005; 5: 4994-5001.
45. Castagna A, Cecconi D, Sennels L, et al. Exploring the hidden human urinary proteome via ligand library beads. *J Proteome Res* 2005; 4: 1917-30.
46. Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol* 2006; 7: R80.
47. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13368-73.
48. Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, et al. Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: A novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int* 2006; 70: 1847-57.
49. Thongboonkerd V, Klein JB, Jevans AW, McLeish KR. Urinary proteomics and biomarker discovery for glomerular diseases. Thongboonkerd V, Klein JB (eds): *Proteomics in Nephrology*. Contrib Nephrol Basel, Karger 2004; 141: 292-307.
50. Mischak H, Kaiser T, Walden M, et al. Proteomic analysis for the assessment of diabetic renal damage in humans. *Clin Science* 2004; 107: 485-95.
51. Sharma K, Lee S, Han S, et al. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis analysis of the urine proteome in human diabetic nephropathy. *Proteomics* 2005; 5: 2648-55.
52. Park MR, Wang EH, Jin DC, et al. Establishment of a 2-D human urinary proteomic map in IgA nephropathy. *Proteomics* 2006; 6: 1066-76.
53. Haubitz M, Wittke S, Weissinger EM, et al. Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67: 2313-20.
54. Rocchetti MT, Centra M, Papale M, et al. Urine protein profile of IgA nephropathy patients may predict the response to ACE-inhibitor therapy. *Proteomics* 2008; 8: 206-16.
55. Wittke S, Haubitz M, Walden M, et al. Detection of Acute Tubulointerstitial rejection by Proteomic Analysis of Urinary Samples in Renal Transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 2479-88.
56. Schaub S, Rush D, Wilkins J, et al. Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 219-27.
57. Weissinger EM, Wittke S, Kaiser T, et al. Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes. *Kidney Int* 2004; 65: 2426-34.
58. Decramer S, Wittke S, Mischak H, et al. Predicting the clinical outcome of congenital unilateral ureteropelvic junction obstruction in newborn by urinary proteome analysis. *Nat Med* 2006; 12: 398-400.
59. Rossing K, Mischak H, Parving HH, et al. Impact of diabetic nephropathy and angiotensin II receptor blockade on urinary polypeptide patterns. *Kidney Int* 2005; 68: 193-205.
60. Mischak H, Apweiler R, Banks RE, et al. Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. *Proteomics Clin Appl* 2007; 1: 148-56.