

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



Sede Amministrativa: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Scuola di Dottorato di Ricerca in: SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI

Indirizzo: SCIENZE NEFROLOGICHE

Ciclo: XXI

**COMPLESSO MACROMOLECOLARE RESPONSABILE  
DELL'ENDOCITOSI DELL'ALBUMINA: UN RUOLO A LIVELLO  
GLOMERULARE?**

**STUDIO DI ESPRESSIONE GENICA DI CLCN5 E MEGALINA IN  
BIOPSIE MICRODISSEZIONATE DI NEFROPATIE PROTEINURICHE**

**Direttore della Scuola:** CH.MO PROF. ANTONIO TIENGO

**Supervisore:** DR.SSA DORELLA DEL PRETE

**Dottorando:** EMILIA TIRALONGO



## **RIASSUNTO**

CLC-5 e Megalina sono due delle proteine che compongono il complesso macromolecolare coinvolto nel riassorbimento dell'albumina a livello del tubulo prossimale. Per comprendere meglio se ci fosse una relazione tra questo meccanismo e le patologie proteinuriche abbiamo effettuato uno studio di espressione per i geni CLCN5 e Megalina nei compartimenti glomerulare e tubulo interstiziale di pazienti con diabete di tipo II (NIDDM) e nefropatia a depositi di IgA (IgAN).

L'espressione di CLCN5 e Megalina è stata investigata mediante Real-Time PCR in biopsie microdissezionate manualmente grazie all'ausilio di uno stereomicroscopio. Queste sono state ottenute da pazienti con diabete di tipo II (n°9) e nefropatia a depositi di IgA (n°9). Come controllo è stato utilizzato tessuto corticale ottenuto da polo renale indenne in corso di nefrectomia per tumore. Entrambi i gruppi di pazienti analizzati presentavano livelli simili di proteinuria. Abbiamo inoltre analizzato cellule mesangiali umane (HMC), cellule endoteliali umane (HuVEC) cellule tubulari umane (HK-2) e podociti umani (HP) in condizioni basali. HMC e HK-2 sono state anche analizzate rispettivamente in presenza di alte concentrazioni di glucosio e a diverse concentrazioni di albumina.

Abbiamo trovato che: 1) CLCN5 e Megalina sono entrambi espressi in tutte le biopsie microdissezionate sia a livello glomerulare che a livello tubulo interstiziale e i loro livelli di espressione erano simili nei due compartimenti in entrambe le patologie; 2) i livelli di espressione sono risultati maggiori nelle nefropatie proteinuriche rispetto ai controlli

sia a livello tubulo interstiziale che a livello glomerulare. Per escludere un'eventuale contaminazione del compartimento glomerulare da parte del tubulo prossimale abbiamo chiesto la collaborazione del Dott. J.J.Baelde del Leiden University Medical Center che ha effettuato l'analisi di espressione di CLCN5 e Megalina su glomeruli microdissezionati mediante laser ottenuti da biopsie di pazienti NIDDM (n°28) e su glomeruli sani di controllo (n°14), confermando i nostri precedenti risultati. In queste biopsie microdissezionate è inoltre emersa una correlazione diretta tra CLCN5 e Megalina ( $r=0,5$ ,  $p=0,0039$ ); 3) la presenza di CLCN5 è stata evidenziata e quantificata in tutte le cellule analizzate, mentre per Megalina sono stati rilevati livelli molto bassi di espressione; 4) le cellule HK-2 stimulate con albumina hanno mostrato gli stessi livelli di espressione di CLCN5 delle cellule non trattate; 5) le cellule HMC stimulate con glucosio hanno mostrato gli stessi livelli di espressione di CLCN5 delle cellule non trattate.

Il nostro studio evidenzia per la prima volta la presenza di CLCN5 e Megalina a livello del compartimento glomerulare nell'uomo ed inoltre che tutti i tipi cellulari costituenti il glomerulo esprimono in vitro CLCN5. La sovrpressione di CLCN5 e Megalina nelle biopsie dei pazienti diabetici e con nefropatia da IgA suggerisce un loro ruolo nella fisiopatologia della proteinuria e la loro correlazione diretta, emersa tra l'espressione genica delle due proteine nel glomerulo, fa ipotizzare un loro meccanismo d'azione coordinato simile a quello presente nel tubulo prossimale. Gli esperimenti in vitro sulle HMC escludono un ruolo del glucosio nella modulazione dell'espressione di CLCN5 nella patologia diabetica. Un ruolo in questo processo

potrebbe essere ipotizzato per i podociti in quanto i risultati da noi ottenuti bene si affiancano ai dati in letteratura che mostrano che i podociti, nei pazienti proteinurici, sono in grado di endocitare proteine.

## **ABSTRACT**

CLC-5 and Megalin are part of the same macromolecular complex involved in the re-uptake of albumin in the proximal tubuli. To understand the relationship between this mechanism and proteinuric kidney diseases, we have performed gene expression study of CLCN5 and Megalin genes in glomerular (gl) and tubular interstitial (ti) compartments of patients with type 2 diabetes (NIDDM) and IgA nephropathy (IgAN).

Gene expression of CLCN5 and Megalin was investigated by Real-Time PCR in microdissected biopsies (mpb) (under a stereomicroscope) from patients with IgAN (n 10) and with NIDDM (n 9). Both groups had similar level of proteinuria. As controls, we used cortical tissues obtained from sites remote from tumor bearing renal tissue (n 9). Moreover, we analyzed human mesangial cells (HMC), endothelial cells (HuVEC), tubular cells (HK-2) and podocytes (HP) in basal conditions. HMC and HK-2 were also examined in high glucose and albumin conditions respectively.

We found that: 1) CLCN5 and Megalin were expressed in all mpb both at gl and ti levels, and their expression did not differ between gl and ti of NIDDM and IgAN; 2) CLCN5 and Megalin expression levels were significantly higher in proteinuric nephropathies than in controls both at gl and ti compartment. In order to exclude ti contamination in microdissected glomeruli, we performed gene expression analysis of CLCN5 and Megalin also on laser microdissected glomeruli from 28 NIDDM patients and 14 controls that confirmed our previous results. In these mpb a direct correlation between CLCN5 and Megalin was evidenced ( $r=0,50$   $p=0,0039$ ); 3) CLCN5 transcript was evidenced in

all cells analyzed, on the contrary, very low levels of Megalin were detected; 4) HK-2 treated with albumin showed the same level of CLCN5 expression as untreated cells; 5) HMC treated with high glucose for 24 and 48 hours showed the same level of CLCN5 expression as untreated cells.

Our study reveals, for the first time, that CLCN5 and Megalin genes are expressed in human glomeruli, and that all the cell types constituting the glomerulus express *in vitro* CLCN5. The overexpression of CLCN5 and Megalin in diabetic and IgA nephropathy biopsies suggests that proteinuria might regulate their expression. The *in vitro* experiments on HMC exclude the role of glucose in the up-regulation of CLC-5 expression in diabetic glomerulopathy. A role might be hypothesized for podocytes since podocyte endocytosis of proteins does occur in proteinuric patients.

## INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 L'OMEOSTASI DEL RENE	1
1.2 IL PROCESSO DI ULTRAFILTRAZIONE GLOMERULARE	1
1.2.1 FATTORI CHE INFLUENZANO LA PERMEABILITA' GLOMERULARE	5
1.2.2 FILTRAZIONE GLOMERULARE DELL'ALBUMINA	6
1.3 RIASSORBIMENTO E SECREZIONE TUBULARE	6
1.3.1 RIASSORBIMENTO DEL TUBULO PROSSIMALE	7
1.3.2 RIASSORBIMENTO TUBULARE DELL'ALBUMINA	8
1.4 LA FAMIGLIA DEI CANALI DEL CLORO VOLTAGGIO DIPENDENTI - CLCs	11
1.4.1 IL CANALE DEL CLORO CIC-5	14
1.5 MEGALINA	14
1.6 LE NEFROPATIE PROTEINURICHE	16
1.6.1 PROLIFERAZIONE MESANGIALE	16
1.6.2 GLOMERULONEFRITE A DEPOSITI MESANGIALI DA IgA	17
1.6.3 NEFROPATIA DIABETICA	18
1.7 MICROALBUMINURIA	19
2. SCOPO DELLA TESI	21
3. MATERIALI E METODI	23
3.1 PAZIENTI	23
3.2 COLTURE CELLULARI	23
3.3 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE	25
3.3.1 MICRODISSEZIONE MANUALE A DUE AGHI	25
3.3.2 MICRODISSEZIONE LASER	25
3.3.3 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE	26
3.3.3.1 Da biopsie microdissezionate manualmente	26
3.3.3.2 Da cellule e da biopsie microdissezionate al laser	27
3.3.4 CONTROLLO E QUANTIFICAZIONE DELL'RNA	28
3.3.5 RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA	28



3.3.6 RT PCR SEMIQUANTITATIVA	29
3.3.7 PURIFICAZIONE AMPLIFICATO PER CURVA STANDARD (REAL-TIME PCR)	30
3.3.8 REAL TIME PCR	32
3.4 ANALISI STATISTICA	33
4. RISULTATI	35
4.1 ESPRESSIONE DI CLCN5 IN BIOPSIE RENALI MICRODISSEZIONATE DI PAZIENTI DIABETICI	35
4.2 RUOLO DEL GLUCOSIO NELLA MODULAZIONE DELL' ESPRESSIONE DEL MESSAGGERO DI CLCN5 NELLA PATOLOGIA DIABETICA: Esperimento su cellule mesangiali umane	36
4.3 ESPRESSIONE DI MEGALINA IN BIOPSIE RENALI MICRODISSEZIONATE DI PAZIENTI DIABETICI	37
4.4 ESPRESSIONE DI CLCN5 IN BIOPSIE RENALI MICRODISSEZIONATE DI PAZIENTI CON NEFROPATIA DA DEPOSITI DI IgA	38
4.5 ESPRESSIONE DI MEGALINA IN BIOPSIE RENALI MICRODISSEZIONATE DI PAZIENTI CON NEFROPATIA DA DEPOSITI DI IgA	39
4.6 ESPRESSIONE DI CLCN5 E MAGALINA IN BIOPSIE LASER MICRODISSEZIONATE DI PAZIENTI DIABETICI	39
4.7 ESPRESSIONE DI CLCN5 IN CELLULE TUBULARI HK-2 STIMOLATE CON ALBUMINA	43
5. DISCUSSIONE	45
6. CONCLUSIONI	49
7. BIBLIOGRAFIA	51



## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1 L'OMEOSTASI DEL RENE**

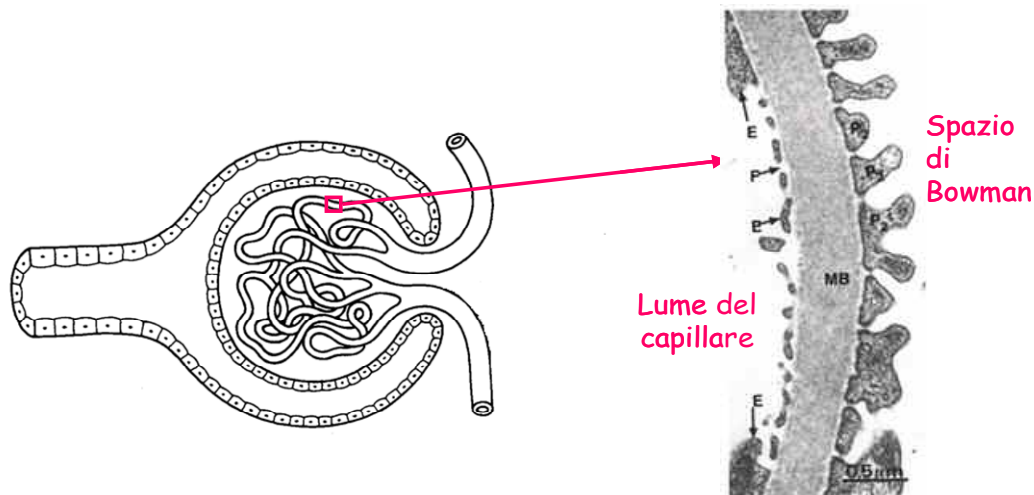
Il mantenimento del volume e della composizione dei fluidi corporei è un processo fondamentale che garantisce il normale svolgimento di numerose funzioni del corpo. Ricordiamo ad esempio la gittata cardiaca e la pressione sanguigna che sono dipendenti da un volume ottimale di plasma, il funzionamento di molti enzimi che lavorano bene solo entro certi range di pH e concentrazioni di ioni, ed ancora il potenziale e l'eccitabilità delle membrane basati rispettivamente sulle concentrazioni di ioni  $K^+$  e  $Ca^+$ .

Il mezzo con cui il rene è in grado di mantenere l'equilibrio idro elettrolitico è tramite la formazione dell'urina, che può essere grossolanamente divisa in due fasi:

- 1) Il processo di ultrafiltrazione glomerulare
- 2) Il processo di riassorbimento e secrezione a livello dei tubuli renali (1).

### **1.2 IL PROCESSO DI ULTRAFILTRAZIONE GLOMERULARE**

Durante l'ultrafiltrazione del plasma dai capillari glomerulari allo spazio di Bowman, il filtrato passa attraverso tre strati: l'*endotelio capillare*, la *membrana basale glomerulare* e lo *strato dei podociti*. Tutte e tre queste strutture compongono il filtro glomerulare e partecipano al processo di ultrafiltrazione (Fig. 1).



**Fig. 1: Fotografia al microscopio elettronico a trasmissione (x 30.000) del filtro glomerulare.** E: cellule endoteliali; MB: membrana basale glomerulare; F: fenestrazioni dell'endotelio; P2: processi secondari dei podociti.

## ENDOTELIO CAPILLARE

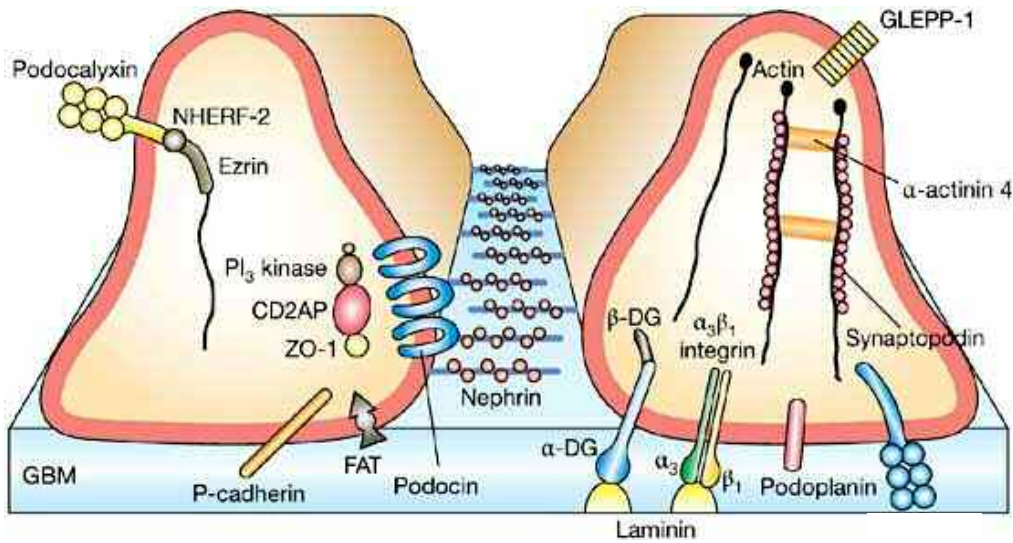
Le cellule endoteliali dei capillari glomerulari sono cellule altamente specializzate che contengono numerose fenestrazioni o pori del diametro di circa 60-80 nm, che occupano circa il 20% della superficie endoteliale. Grazie alla microscopia elettronica si è potuta verificare la presenza di un glicocalice spesso 200-400 nm che copre sia le fenestrazioni che i domini tra le fenestrazioni della superficie luminale delle cellule endoteliali. Il glicocalice costituisce uno strato dinamico di glicoproteine e proteoglicani in grado di assorbire le plasma proteine. Esso presenta una carica negativa dovuta alla presenza di proteoglicani costituiti da eparan solfato. I capillari dotati di fenestrazioni sono inoltre molto più permeabili all'acqua e ai piccoli soluti ma non alle proteine e costituiscono una barriera alle macromolecole, questa caratteristica può essere attribuita solo alla presenza del glicocalice.

## MEMBRANA BASALE GLOMERULARE

La membrana basale glomerulare è spessa 240-340 nm. Essa è costituita da collagene di tipo IV, da glicoproteine strutturali (fibronectina e laminina) e da proteoglicani ricchi in eparansolfato carichi negativamente; gli interstizi di questa struttura sono occupati d'acqua. Osservata al microscopio elettronico a trasmissione questa membrana è costituita da tre strati: una *lamina rara interna*, adiacente all'endotelio, una *lamina densa centrale* ed una *lamina rara esterna* in contatto con lo strato dei podociti. Entrambe le lamine rare presentano una carica negativa. Recenti studi hanno dimostrato che la carica negativa della membrana basale glomerulare contribuisce solo in piccola parte a costituire una barriera al passaggio delle proteine (2).

## STRATO DEI PODOCITI

I capillari glomerulari sono avvolti da cellule specializzate: i *podociti*. Essi hanno lunghe estensioni citoplasmatiche chiamate *processi primari*. I processi primari danno origine, a loro volta, a corti processi secondari conosciuti col nome di *pedicelli*. I pedicelli si interdigitano strettamente con i processi primari e sono direttamente applicati alla membrana basale glomerulare attraverso fini filamenti. Gli spazi tra le interdigitazioni, chiamati *fessure di filtrazione*, sono di larghezza uniforme (25-60 nm) e sono chiusi da un sottile diaframma (*slit diaphragm*) elettrondenso spesso 4 nm (Fig. 2).



**Fig. 2: Immagine schematica dello slit diaphragm.** Risulta evidente la complessità della struttura e le numerose proteine strutturali e funzionali coinvolte.

La superficie esterna dei podociti è rivestita da uno spesso glicocalice, struttura dotata di una forte carica negativa, che si estende anche sulle fessure di filtrazione. I geni meglio caratterizzati componenti lo slit diaphragm sono 4: ACTN4, Cd2ap, NPHS1 e NPHS2, codificanti rispettivamente la  $\alpha$ -actinina-4, la proteina CD2-associata (CD2AP) la nefrina e la podocina. Le proteine codificate da questi geni sono state ben localizzate. La  $\alpha$ -actinina-4 è una proteina di ancoraggio e risulta associata con l'actina del citoscheletro a livello dei pedicelli dei podociti. La CD2AP dà stabilità allo slit diaphragm ancorando al citoscheletro la porzione citoplasmatica della nefrina, una proteina trans membrana con un ampio dominio extracellulare facente parte dello slit diaphragm stesso. La podocina, come la nefrina, è presente nella membrana plasmatica dei podociti a livello dello slit diaphragm. Mutazioni in ognuno di questi 4 geni sono in grado di provocare proteinuria e danno renale, come avviene ad esempio

nella sindrome nefrosica di tipo Finnico (NPHS1) e nella sindrome nefrosica resistente agli steroidi (NPHS2) indicando che i podociti, e in particolare i loro processi secondari e la porzione dello slit diaphragm, rivestono un ruolo importante e critico nella barriera di filtrazione (2,3).

Si parla, dunque, di *ultrafiltrazione* perché la filtrazione avviene attraverso un setto a pori microscopici (ultrafiltro).

### 1.2.1 FATTORI CHE INFLUENZANO LA PERMEABILITA' GLOMERULARE

La permeabilità glomerulare è influenzata da tre fattori:

- 1) Dimensioni della sostanza che deve essere filtrata: la parete dei capillari è altamente permeabile ai piccoli soluti e all'acqua, meno alle molecole più grandi. Per molecole con un PM < 60 kDa si ha un progressivo aumento della filtrazione.
- 2) Carica elettrostatica: a causa delle cariche negative presenti a livello del filtro glomerulare l'albumina ed altre proteine cariche negativamente vengono filtrate in maniera limitata.
- 3) Azione ormoni vasoattivi quali Angiotensina II e Noradrenalina: l'infusione di questi ormoni conduce ad un modesto incremento della filtrazione delle proteine. Tali sostanze, causando una costrizione dell'arteriola efferente provocano un aumento della pressione idrostatica intraglomerulare con conseguente aumento della filtrazione glomerulare sia per aumento del diametro dei pori che per azione emodinamica diretta.

### 1.2.2 FILTRAZIONE GLOMERULARE DELL'ALBUMINA

L'albumina è una proteina di ~65 kD con carica elettrica negativa; la combinazione tra il fattore dimensione e la carica rendono difficile il suo passaggio nello spazio urinario. Recenti studi effettuati mediante la tecnica della micropuntura hanno suggerito una quantità di proteina filtrata pari a 22.9 µg/ml (corrispondente ad un coefficiente di filtrazione glomerulare di circa 0,0006) (4). Altri studi effettuati invece mediante la tecnica della microscopia elettronica a 2 fotoni hanno dato dei valori 50 volte maggiori (5). L'ammontare di albumina filtrata nei glomeruli è stata quindi stimata utilizzando diverse tecniche ed è stata calcolata con concentrazioni nell'ultrafiltrato tra 1 e 50 µg/ml. Questo, nell'uomo, corrisponde ad un carico di albumina filtrata tra 170 mg e 9 g/24h (6). L'albumina viene rapidamente riassorbita a livello tubulare e non è ancora chiaro se l'albuminuria rifletta un problema di overfiltrazione o di mancato riassorbimento e questo è tuttora argomento di ricerca e discussione (7). Verosimilmente disfunzioni in entrambi i meccanismi possono risultare in un'aumentata escrezione dell'albumina.

### **1.3 RIASSORBIMENTO E SECREZIONE TUBULARE**

Il filtrato glomerulare va incontro ad una serie di modificazioni prima di diventare urina. Questi cambiamenti consistono nell'assorbimento e nella secrezione di soluti e fluidi.



1) Assorbimento: si intende il movimento di soluti o acqua dal lume tubulare al sangue. Sono principalmente soggetti a questo fenomeno  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , glucosio, aminoacidi, proteine e altro.

2) Secrezione: si intende il movimento dei soluti dal sangue o dal compartimento intracellulare al lume tubulare. Sono principalmente coinvolti  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ , e un certo numero di acidi e basi organiche.

Questi processi avvengono in zone ben precise del nefrone. Il tubulo prossimale è, ad esempio, il maggior responsabile del riassorbimento della gran parte dei piccoli soluti filtrati; l'ansa di Henle è invece fondamentale per la diluizione dell'urina. La parte terminale del nefrone, che comprende il tubulo convoluto distale e i dotti collettori midollari e corticali, è invece il tratto in cui avvengono gli ultimi aggiustamenti in termini di composizione, tonicità e volume (1).

### 1.3.1 RIASSORBIMENTO DEL TUBULO PROSSIMALE

Nel nefrone, il tubulo prossimale è responsabile del riassorbimento dei soluti filtrati attraverso il glomerulo. In questo modo vengono ricatturati i metaboliti essenziali a basso peso molecolare che passano liberamente attraverso la membrana apicale delle cellule del tubulo e che altrimenti andrebbero persi con l'urina. Oltre all'acqua i principali componenti del sangue che vengono riassorbiti sono gli ioni, il glucosio, gli aminoacidi e le piccole proteine. Il riassorbimento tubulare di acqua, metaboliti ed

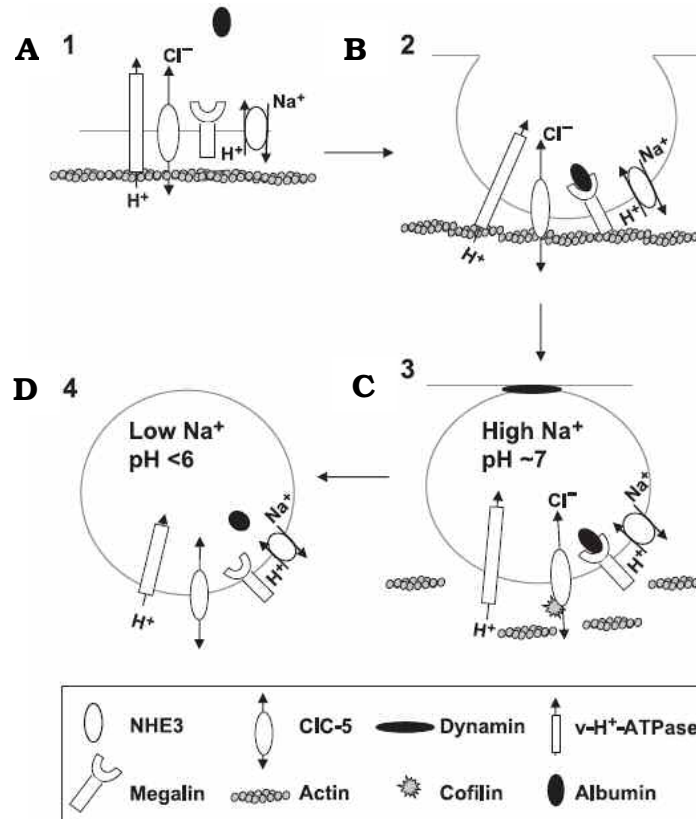
elettroliti svolge un ruolo centrale nella regolazione del volume e della composizione dei fluidi cellulari. Le proteine riassorbite invece, non vengono messe nuovamente in circolo, ma degradate nei lisosomi. Questo processo di riassorbimento avviene principalmente a livello delle cellule epiteliali del tubulo convoluto prossimale, infatti le membrane plasmatiche apicali (luminali) di tali cellule formano dei microvilli creando una superficie con orletto a spazzola. Questa struttura aumenta la superficie di membrana esposta e facilita l'endocitosi di macromolecole dal lume del tubulo attraverso vescicole rivestite di clatrina (8).

### 1.3.2 RIASSORBIMENTO TUBULARE DELL'ALBUMINA

La microalbuminuria è da sempre associata ad un difetto primario a livello glomerulare, ci sono comunque evidenze che anche il tubulo renale rivesta un ruolo critico nel riassorbimento dell'albumina filtrata e nello sviluppo dell'albuminuria. La concentrazione di albumina stimata nel filtrato glomerulare è di circa 3,5 mg/L che corrisponde a 630 mg di albumina filtrati in un giorno da un rene umano. Solo 30 mg/24h sono normalmente escreti nelle urine e ciò indica che il 95% dell'albumina filtrata dal glomerulo viene quindi riassorbita.

Il meccanismo con cui viene riassorbita l'albumina coinvolge un "pathway" recettore mediato molto attivo che comprende il complesso Megalina/Cubilina responsabile del legame dell'albumina a livello tubulare. Gli altri elementi che costituiscono

il complesso macromolecolare coinvolto nell'uptake dell'albumina a livello tubulare sono riportati nella Fig.3.



**Fig. 3: Meccanismo di riassorbimento tubulare dell'albumina.** Hryciw DH, Lee EM, Pollock CA, Poronnik P. Molecular changes in proximal tubule function in diabetes mellitus. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004 May-Jun; 31(5-6): 372-9. Review.

Il complesso è presente a livello della membrana plasmatica nella fenditura dei microvilli ed è ancorato al citoscheletro mediante la porzione C-terminale di CIC-5, dello scambiatore Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE3) e della Megalina. (Fig. 3A). L'endocitosi ha inizio quando l'albumina si lega al complesso Megalina/Cubilina (Fig. 3B). L'endosoma nascente viene quindi staccato dalla membrana dalla Dinamina. La Cofilina, una proteina in grado di depolimerizzare l' actina si lega quindi alla porzione C-terminale del CIC-5 e questo comporta la

dissoluzione, a livello locale, dei filamenti di actina permettendo così all'endosoma di entrare nel citoplasma. A questo punto l'endosoma contiene fluido extracellulare con elevate concentrazioni di Na<sup>+</sup> e un pH neutro (Fig. 3C). NHE3 inizia quindi l'acidificazione endosomale scambiando Na<sup>+</sup> presenti all'interno dell'endosoma con H<sup>+</sup> citosolici. Quando il gradiente di Na<sup>+</sup> è stato dissipato la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolare (V-H<sup>+</sup>-ATPase) continua l'acidificazione e il ClC-5 provvede il necessario shunt anionico per il suo funzionamento, mentre l'albumina si dissocia dal complesso Megalina/Cubilina (Fig. 3D). L'albumina viene quindi condotta al comparto lisosomiale in cui verrà degradata nei suoi costituenti aminoacidici (9).

L'importanza funzionale di questo complesso proteico e soprattutto di ClC-5 nel mediare l'uptake di albumina è risultata evidente dagli studi genetici condotti su tubulopatie prossimali quali la malattia di Dent e sul suo modello sperimentale. Una delle manifestazioni caratteristiche della malattia di Dent, che è causata da mutazioni nel gene che codifica per ClC-5, è infatti la proteinuria a basso peso molecolare, dimostrata anche in topi knockout (KO) per ClC-5 e, in entrambi i casi, questa è data da un mancato riassorbimento a livello tubulare.

Numerosi studi hanno dimostrato che ClC-5 ha altri ruoli nell'endocitosi oltre alla formazione dello shunt anionico necessario per l'acidificazione dell'endosoma.

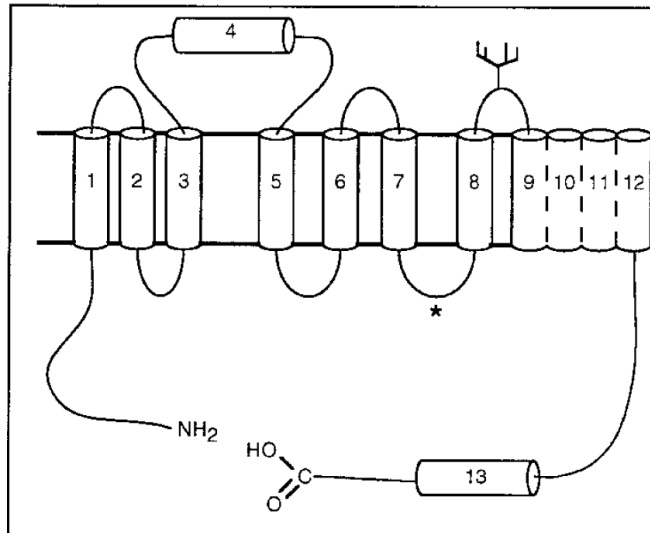
ClC-5 possiede infatti un'ampia porzione C-terminale intracitoplasmatica che può interagire con proteine strutturali o regolatorie presenti nel citoplasma. Altro aspetto fondamentale per

il processo di endocitosi è il rimodellamento del citoscheletro che permette l'internalizzazione dell'endosoma nascente all'interno del citoplasma e il "trafficking" delle proteine di membrana. CIC-5 è infatti in grado di legare una proteina, la Cofilina, che depolarizza l'actina, e permettere quindi il rimodellamento citoscheletrico. E' stato inoltre osservato che, in caso ci si trovi in presenza di un CIC-5 non funzionante si ha un "mis-trafficking" della V-H<sup>+</sup>-ATPase, e questo provoca una diminuzione dei livelli di Megalina/Cubilina a livello della membrana plasmatica con conseguente mancato riassorbimento di albumina (10).

#### **1.4 LA FAMIGLIA DEI CANALI DEL CLORO VOLTAGGIO DIPENDENTI - CLCS.**

I CLCs rappresentano la più recente scoperta di tre classi di canali del cloro voltaggio dipendenti. 1) I recettori/canali del cloro ligando dipendenti (ELC); 2) I canali del cloro regolatori della conduttanza trans membrana nella fibrosi cistica (CTFR); 3) I CLCs.

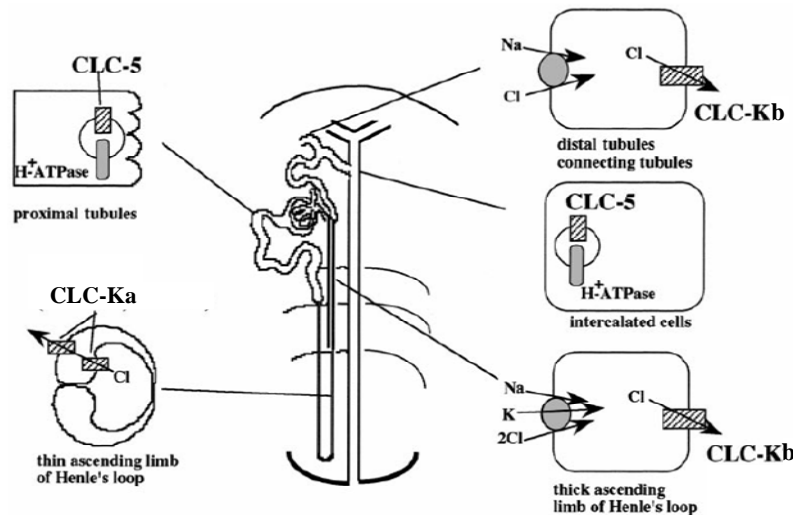
Questi ultimi sono caratterizzati da 12 domini trans-membrana i cui ruoli non sono stati ancora completamente chiariti. Sembra però che il dominio 4 contenga una sequenza conservata che è essenziale per la selettività anionica e molto probabilmente è coinvolto nella formazione del poro. Sono inoltre dotati di due domini citoplasmatici, uno amino- e uno carbossi-terminale lunghi rispettivamente 50-130 e 170-420 aminoacidi (Fig. 4).



**Fig. 4: Rappresentazione schematica dei CLCs.** Si notino i domini trans-membrana e i due domini citoplasmatici.

Il primo membro della famiglia, detto CLC-0, fu clonato nel 1990 dall'organo elettrico del Torpedo marmorata e nei mammiferi sono stati identificati altri 9 differenti CLCs (CLC-1 → CLC-7, CLC-Ka e CLC-Kb (rispettivamente codificati dai geni CLCN1 → CLCN7 CLCNKa e CLCNKb) (11). Ad eccezione del CLC-1, che è specifico per il muscolo scheletrico, tutti gli altri 8 canali sono espressi nel rene, sebbene per molti di essi non ne sia ancora stato chiarito il ruolo. I canali del cloro nel rene sono coinvolti in importanti funzioni fisiologiche come la regolazione del volume cellulare, l'acidificazione intracellulare delle vescicole e il trasporto trans-epiteliale. Tra gli 8 canali espressi a livello renale, tre (CLC-Ka, CLCKb e CLC-5) sono stati correlati a patologie nell'uomo. CLC-Ka, ad esempio, media il trasporto trans epiteliale nel tratto sottile ascendente dell'ansa di Henle ed è fondamentale per il meccanismo di concentrazione dell'urina, CLC-Kb è un canale presente in membrana basolaterale nel segmento distale del nefrone ed è

necessario per il riassorbimento del cloro, CLC-5 è un canale del cloro presente nelle vescicole del tubulo prossimale ed è coinvolto nell'endocitosi (Fig. 5) (12).



**Fig. 5: Localizzazione intrarenale e cellulare di CLC-5, CLC-Ka e CLC-Kb**

Sebbene il cloro rappresenti il più abbondante anione extracellulare negli organismi superiori, la ricerca degli ultimi 60 anni si è focalizzata soprattutto sui canali per i cationi monovalenti sodio e potassio e il catione divalente calcio. La ragione di ciò sembrerebbe risiedere nel fatto che rispetto ai canali cationici, ad esempio nei tessuti eccitabili, la funzione ed il significato fisiologico di quelli del cloro sembra essere meno evidente; dall'altro, sostanze farmacologiche in grado di bloccare selettivamente questi canali sono difficili da trovare e questo ha senz'altro rallentato la comprensione delle funzioni cellulari da esse esercitate (13).

#### 1.4.1 IL CANALE DEL CLORO ClC-5

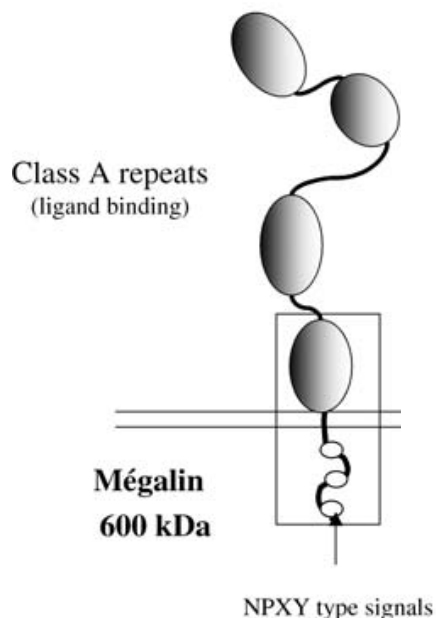
Il gene umano *CLCN5* mappa nella regione cromosomica pericentromerica Xp11.22, è costituito da una porzione codificante di 2238 bp divisa in 12 esoni e codificante per una proteina di 746 aa, ClC-5. Nel rene questo canale è altamente espresso nel tubulo prossimale e nelle cellule intercalate del dotto collettore. Nel tubulo prossimale si trova localizzato all'apice degli endosomi, insieme alla pompa protonica voltaggio dipendente V-H<sup>+</sup>-ATPasi, in cui ha un ruolo complementare nell'acidificazione degli endosomi. Mutazioni nel gene *CLCN5* associate con una nefropatia X-linked recessiva detta Malattia di Dent, hanno permesso di comprendere la rilevanza fisiologica di ClC-5 nella funzionalità renale. La malattia di Dent è una tubulopatia prossimale caratterizzata da proteinuria a basso peso molecolare, ipercalciuria, nefrocalcinosi, nefrolitiasi, aminoaciduria, fosfaturia, glicosuria, kaliuria, uricosuria ed eventualmente danno renale. Sebbene la malattia di Dent possa manifestarsi con diversi sintomi, ciò che rimane sempre costante è la proteinuria a basso peso molecolare, tale manifestazione risulta essere causata da una mancanza dell'endocitosi a livello del tubulo prossimale (14).

#### **1.5 MEGALINA**

Megalina è una delle più abbondanti glicoproteine di membrana espressa a livello dell'orletto a spazzola presente sulla superficie luminale del tubulo prossimale. Si tratta di una proteina



transmembrana di 4600aa, con un singolo dominio transmembrana, che appartiene alla famiglia dei recettori di lipoproteine a bassa densità (LDL) (15). L'ampio dominio extracellulare N-terminale è caratterizzato dalla ripetizione di recettori per LDL di classe A (in grado di legare il ligando specifico). La corta porzione citoplasmatica contiene invece tre motivi "NPXY" che mediano l'endocitosi e la funzione di trasmissione del segnale (Fig. 6).



**Fig. 6: Struttura schematica di megalina:** si notino i 4 elementi di Classe A ripetuti, il piccolo dominio transmembrana e i tre motivi "NPXY" nella porzione citoplasmatica.

La proteina è stata inizialmente purificata dal ratto e chiamata gp-330, sulla base del peso molecolare stimato sulla mobilità elettroforetica in gel; una volta clonata si è potuto stabilire che il suo reale peso molecolare fosse di 600 kDa ed è stata chiamata Megalina. E' espressa nelle cellule epiteliali di molti tessuti (es.: rene, cellule della tiroide, cellule labirintiche dell'orecchio interno, epitelio ciliato dell'occhio). E' stata anche identificata nei tessuti embrionali, nei tubuli mesonefrici, e nel mesonefro, nella vescicola del nefrone e nella gemma ureterale. Durante la nefrogenesi

Megalina è anche espressa nel “corpo a forma di S” che darà origine ai glomeruli e ai tubuli prossimali e distali. In queste cellule essa non è espressa solo a livello apicale, ma anche lungo le membrane basolaterali, così come nelle cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso e nell’area perinucleare. Negli stadi più avanzati della nefrogenesi la sua espressione risulta invece limitata alle cellule epiteliali del glomerulo e alle cellule, ancora immature, del tubulo prossimale. Quando il rene è maturo Megalina si trova prevalentemente concentrata nelle vescicole rivestite di clatrina e questo accade nello stesso tempo in cui ha inizio la filtrazione glomerulare. L’abilità del tubulo prossimale di riassorbire le proteine coincide quindi con l’espressione di Megalina nelle vescicole rivestite (16).

## **1.6 LE NEFROPATIE PROTEINURICHE**

Numerose nefropatie che riconoscono eziologie di diversa natura si possono manifestare da un punto di vista clinico con la comparsa di proteinuria di varia entità fino ad arrivare alla sindrome nefrosica.

### **1.6.1 PROLIFERAZIONE MESANGIALE**

La proliferazione aberrante di cellule mesangiali è una caratteristica comune a numerose nefropatie che possono portare ad end-stage renal failure. La proliferazione incontrollata delle cellule mesangiali può essere causata da insulti di varia origine:

metabolica (nefropatia diabetica) o immunologica (nefropatia da depositi di IgA e nefrite lupica). Tale proliferazione a sua volta causa un incremento della deposizione di matrice extracellulare che porta a glomerulosclerosi con conseguente diminuzione nella filtrazione glomerulare dovuta a perdita di funzionalità dei nefroni (17).

#### 1.6.2 GLOMERULONEFRITE A DEPOSITI MESANGIALI DI IgA

Detta anche glomerulonefrite di Berger, è la forma più frequente di glomerulonefrite primitiva. In Italia si contano all'anno circa 8,4 casi per milione di popolazione. Questa malattia è stata descritta per la prima volta nel 1966 da Berger ed è inclusa nell'ampio gruppo istologico delle glomerulonefriti primitive proliferative mesangiali (18). Si manifesta spesso con anomalie urinarie come microematuria, macroematuria e proteinuria solitamente inferiore a 1 g/die. I casi che si manifestano con sindrome nefrosica (5-10%) sono quelli con prognosi peggiore ed elevato rischio di progressione verso l'insufficienza renale. Le alterazioni istologiche presenti sono localizzate prevalentemente nel mesangio. La microscopia ottica rivela solitamente una modesta ipercellularità mesangiale e un incremento della matrice a distribuzione segmentaria focale o diffusa. La diagnosi è possibile solo mediante i dati dell'immunofluorescenza, essa mostra depositi mesangiali di IgA e C3, più raramente IgG e IgM (19).

La deposizione di immunocomplessi circolanti o di microaggregati IgA 1, formati in situ a livello mesangiale, causa la lisi delle cellule

mesangiali, a cui seguono una proliferazione cellulare, accumulo di matrice mesangiale e sclerosi fibrosa indotta dal transforming growth factor (TGF)  $\beta$  che è prodotto dalle stesse cellule mesangiali. Probabilmente ai fenomeni di proliferazione mesangiale partecipa anche il complemento, rappresentato dai depositi di C3 insieme alle IgA (18).

### 1.6.3 NEFROPATIA DIABETICA

La Nefropatia diabetica è una sindrome clinica caratterizzata da albuminuria persistente tra 30 e 300 mg/die, lento e graduale declino della funzione renale, ipertensione arteriosa e alto rischio di morbilità e mortalità cardiovascolare. La forma iniziale o incipiente è diagnosticata sulla presenza della microalbuminuria persistente in assenza di infezioni delle vie urinarie, anomalie urinarie o scompenso cardiaco (18).

La principale alterazione glomerulare in corso di diabete è rappresentata da una sclerosi del glomerulo a carattere diffuso o nodulare. Le lesioni diffuse, che possono verificarsi con o senza lesioni nodulari, sono caratterizzate in microscopia ottica ed elettronica da un aumento uniforme della matrice mesangiale.

Questa malattia fu descritta per la prima volta nel 1936 da Kimmelstiel e Wilson (20) e successivamente meglio caratterizzata grazie all'avvento della biopsia renale. L'iperfiltrazione glomerulare è considerata classicamente il primo fattore responsabile della glomerulopatia diabetica.

Questa alterazione emodinamica è causata da una persistente iperglicemia. Il glucosio che passa attraverso il filtro glomerulare insieme all'acqua e al sodio, è riassorbito in eccesso con il sodio a livello del tubulo prossimale; pertanto l'urina che arriva alla macula densa, situata nel tubulo distale, è povera di sodio. Poiché esiste nel rene un bilancio glomerulotubulare, per poter compensare l'aumentato riassorbimento tubulare del sodio si instaura un incremento del flusso plasmatico renale e conseguentemente un'iperfiltrazione glomerulare.

Il secondo elemento patogenetico è rappresentato dalle alterazioni strutturali della membrana basale glomerulare, dovute ad una diminuita sintesi di proteoglicani, ciò comporta una riduzione delle cariche elettriche negative sulla superficie che sono necessarie per respingere le proteine (albumina) che hanno una carica negativa. Tale alterazione permette quindi il passaggio dell'albumina nelle urine (18).

### **1.7 MICROALBUMINURIA**

L'albumina è una proteina anionica, con un peso molecolare di ~65 kD, viene sintetizzata dal fegato e costituisce la più abbondante proteina plasmatica. Sono state descritte numerose funzioni per questa proteina: partecipa al mantenimento della pressione oncotica e del volume del sangue, agisce come tampone acido/base, ha funzione antiossidante, ed è trasportatore di diverse sostanze quali bilirubina, ioni ( $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ ), farmaci, ormoni, vitamine sia lipofile che idrofile come la vitamina A,

la riboflavina, vitamina B<sub>6</sub> acido ascorbico e folati. Viene utilizzata anche come marker prognostico nel danno renale se misurata sia a livello sierico che a livello urinario. L'ipoalbuminemia nel danno renale è associata con incremento della mortalità ed è correlata sia ad uno stato di malnutrizione che ad infiammazione, i livelli di albumina nelle urine sono invece associati direttamente con la progressione del danno renale (6).

Il termine "microalbuminuria" è stato coniato negli anni '80 da Viberti e Svendsen (21,22) che avevano identificato un valore superiore a 20 µg/min come fattore prognostico negativo per lo sviluppo di nefropatia diabetica, dapprima nel diabete di tipo 1 e successivamente nel diabete di tipo 2. Numerosi dati della letteratura documentano come l'escrezione di albumina sia associata con il rischio di danno cardiaco oltre che renale ed inoltre che tale rischio sembra essere presente anche per valori di albuminemia che ad oggi erano considerati "normali". Questo dato ha portato quindi alla ridefinizione del concetto di microalbuminuria. Esiste una relazione tra escrezione urinaria di albumina e rischio di mortalità totale e cardiovascolare anche nel range della normoalbuminuria. Il rischio associato all'aumentata albuminuria appare indipendente dagli altri fattori di rischio tradizionali (età, sesso, fumo, elevato indice di massa corporea, ipertensione), pertanto questo rafforza l'ipotesi che l'albuminuria rifletta un meccanismo autonomo di danno vascolare (23).

Questi nuovi risultati hanno accentuato l'attenzione sulla comprensione dei meccanismi che sono alla base dell'"handling" dell'albumina a livello renale correlandola al danno d'organo.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Normalmente solo una minima quantità di proteine viene escretata con le urine e questo grazie ad un complesso meccanismo che vede coinvolti sia il compartimento glomerulare che quello tubulare. Intervengono in questo processo numerosi fattori tra cui proteine sia funzionali che strutturali. Il ruolo rivestito da entrambi i compartimenti in questo meccanismo è tuttora materia di studio.

Con questo lavoro abbiamo voluto indagare se il complesso macromolecolare, che vede coinvolti il canale del cloro ClC-5 e la Megalina, notoriamente espresso a livello delle cellule del tubulo prossimale e responsabile dell'endocitosi dell'albumina, potesse avere un ruolo anche a livello glomerulare.

A questo scopo abbiamo quindi effettuato uno studio di espressione dei geni codificanti per ClC-5 e Megalina su biopsie renali microdissezionate di pazienti con due diverse nefropatie proteinuriche: coinvolgimento renale in corso di diabete di tipo II e nefropatia a depositi di IgA.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 PAZIENTI**

Per lo studio sono state raccolte biopsie renali provenienti da:

- N° 9 pazienti con diabete di tipo II
- N°10 pazienti affetti da nefropatia da IgA

Su tutte le biopsie è stata effettuata, mediante l'utilizzo di uno stereomicroscopio, una microdissezione a due aghi per separare i glomeruli dal compartimento tubulo interstiziale.

Tutti i pazienti arruolati avevano sospeso la terapia con ACE inibitori e antagonisti del recettore per Angiotensina II da almeno 15 gg e presentavano valori di proteinuria 24h compresa tra 0,4 g e 1 g per i pazienti diabetici e compresa tra 0,5 g e 1,5 g per i pazienti con nefropatia da IgA.

Come controlli sono state utilizzate biopsie non microdissezionate (tessuto corticale) :

- N° 9 polo indenne da nefrectomia per tumore.

#### **3.2 COLTURE CELLULARI**

In questo studio sono stati utilizzati diversi tipi cellulari. La tecnica di colture per le diverse cellule rimane la stessa, l'unica differenza è data dai terreni di coltura utilizzati che sono riportati nella tabella sottostante (Tab. 1).



<b>TIPO DI CELLULE</b>	<b>DESCRIZIONE</b>	<b>TERRENO UTILIZZATO</b>
<b>HK-2</b>	Linea stabilizzata di cellule tubulari umane	D-MEM/HAM F12
<b>HMC</b>	Cellule primarie mesangiali umane	D-MEM
<b>PODOCITI</b>	Linea stabilizzata di podociti umani	D-MEM
<b>HuVEC</b>	Cellule primarie endoteliali umane	M199

**Tab. 1: Terreni utilizzati per la coltura dei diversi tipi cellulari**

Le cellule sono state coltivate in condizioni sterili in fiasche di plastica aventi una superficie di 75 cm<sup>2</sup> in terreno liquido specifico, FBS 10% (v/v) (Celbio), pen/strep 1% (v/v) (Euroclone) pH 7.4, alla temperatura di 37°C e ad una concentrazione ambientale di CO<sub>2</sub> del 5%. Raggiunta la confluenza, le cellule sono state lavate con 2 ml/fiasca di PBS e quindi trattate con tripsina (Euroclone) e incubate per qualche minuto per consentirne il distacco dal pavimento della fiasca. Il distacco è stato controllato al microscopio ottico. Dopo il lavaggio delle pareti con circa 8 ml/fiasca di terreno liquido specifico le cellule sono state raccolte e centrifugate per 8 minuti a 289 giri. Il pellet è stato quindi risospeso nel terreno di crescita e le cellule ripiastrate alla densità desiderata.

### **3.3 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE**

#### **3.3.1 MICRODISSEZIONE MANUALE A DUE AGHI**

Immediatamente dopo la biopsia, il frammento destinato all'indagine di biologia molecolare, pari circa ad 1/10 dell'intero frustolo è stato posto in una capsula petri sterile adagiata in un'apposita "cella refrigerante" in lega metallica, in modo da mantenere il campione ad una temperatura tra 0-4°C per evitare la degradazione dell'RNA.

Successivamente il tessuto è stato bagnato con soluzione composta da fisiologica allo 0,9% e 100U di un inibitore delle RNAsi (RNAsi inhibitor - Applied Biosystem)

La microdissezione è stata eseguita sotto controllo ottico con l'utilizzo di uno stereomicroscopio (Zeiss), provvisto di illuminazione a luce fredda.

I glomeruli microdissezionati sono stati posti in una soluzione di EUROzol (EuroClone) e tenuti in ghiaccio.

#### **3.3.2 MICRODISSEZIONE LASER**

Immediatamente dopo la biopsia, il frammento destinato alla microdissezione laser è stato congelato in azoto liquido. Da questo sono state ottenute al criostato fettine dello spessore di 4 µm che sono state poste su vetrini coperti con uno strato di polietilene. Dopo aver selezionato i glomeruli mediante l'aiuto di un microscopio (circa 20 ± 5 per ogni biopsia) questi sono stati

dissezionati con un raggio laser (PALM Laser-MicroBeam System, Wolfratshausen, Germany) e catapultati direttamente all'interno di un tubino contenente buffer RLT (RNeasy Micro Extraction kit, Qiagen) e posti in ghiaccio

### 3.3.3 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

#### 3.3.3.1 *Da biopsie microdissezionate manualmente*

Dai glomeruli e dal corrispondente compartimento tubulo-interstiziale, come anche dalle cellule utilizzate nei diversi esperimenti, si è quindi proceduto all'estrazione dell'RNA totale utilizzando il metodo dell'estrazione in fenolo acido/cloroformio con EUROzol.

Si tratta di una sostanza che promuove la formazione di complessi di RNA con guanidinio e molecole d'acqua e abolisce le interazioni idrofiliche del DNA e delle proteine, per cui nella fase acquosa rimane sospeso l'RNA e nella fase fenolica troviamo DNA e proteine. Tutto il procedimento viene svolto in ghiaccio. Questo metodo è composto da 4 fasi.

1. Omogenizzazione: i glomeruli ed il tubulo interstizio vengono omogenati ciascuno in 200 µl di EUROzol, facendo passare il lisato attraverso un puntale di piccolo calibro (Gilson da 200 µl).
2. Estrazione dell'RNA: si ottiene aggiungendo una quantità di cloroformio freddo pari ad 1/10 del volume totale dell'omogenato, si agita mediante l'ausilio di un vortex, si lascia in ghiaccio per 5 minuti e successivamente si

centrifuga a 14000 giri a 4°C per 20 minuti. In questa fase l'RNA si separa dal DNA e dalle proteine.

3. Precipitazione dell'RNA: la fase acquosa che si è separata viene trasferita in tubini sterili (Eppendorf® Safe-Lock® microtubes, PCR clean capacity 0.5 mL), a questa si aggiunge un ugual volume di isopropanolo freddo e si lascia a -20°C per una notte. Successivamente si centrifuga a 14000 giri a 4°C per 20 minuti.
4. Lavaggio dell'RNA: il sopranatante viene rimosso ed il pellet di RNA viene lavato con una soluzione fredda di etanolo al 70%. Per ottenere un RNA maggiormente puro è stata anche eseguita un'ulteriore precipitazione in overnight a -20°C con etanolo al 100%. Il pellet di RNA è stato poi risospeso in 10µl di una soluzione acquosa di Dietilpirocarbonato (acqua DEPC).

#### *3.3.3.2 Da cellule e dai glomeruli microdissezionati al laser*

Per l'estrazione dell'RNA dalle colture cellulari si è utilizzato il kit della Qiagen "RNeasy Micro Kit". Partendo da 500000 cellule, seguendo il protocollo fornito dalla ditta fornitrice si sono ottenuti 14 µl di sospensione di RNA. Lo stesso Kit è stato utilizzato anche per estrarre l'RNA dai glomeruli microdissezionati mediante laser.

### 3.3.4 CONTROLLO E QUANTIFICAZIONE DELL'RNA

Un  $\mu\text{l}$  di soluzione di RNA è stato utilizzato per la quantificazione mediante spettrofotometro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer) ed un altro microlitro per il controllo dell'integrità mediante elettroforesi capillare in Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology).

### 3.3.5 RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA

Dopo essere stato controllato e quantificato l'RNA deve essere retrotrascritto in cDNA.

Per la retrotrascrizione si utilizzano quantità di RNA totale pari a 30ng per quello estratto dalle biopsie e 100 ng per quello estratto dalle cellule.

Per ogni singolo campione si utilizzano 11  $\mu\text{l}$  di una miscela costituita da 4  $\mu\text{l}$  di MgCl 25 mM (Sigma), 2  $\mu\text{l}$  Buffer 10x (Sigma), 2  $\mu\text{l}$  dNTPS 10  $\mu\text{M}$  (Roche), 1  $\mu\text{l}$  Random examers 50  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{l}$  RNAsi inhibitor 20 U/ $\mu\text{l}$  (Applied Biosystem), 1  $\mu\text{l}$  Mulv Reverse Transcriptase 50 U/ $\mu\text{l}$  (Applied Biosystem). A questa si aggiungono i  $\mu\text{l}$  contenenti la quantità di RNA desiderato e H<sub>2</sub>O q.b. ad arrivare a 20  $\mu\text{l}$  totali.

I campioni vengono quindi lasciati a temperatura ambiente per 10 min per permettere ai Random examers di legarsi alle loro sequenze specifiche, vengono quindi incubati prima per 30 minuti a 42°C, 5 minuti a 99°C. Il cDNA così ottenuto viene infine

denaturato a 95°C per 5 minuti prima di essere utilizzato nelle reazioni di PCR e Real Time PCR.

### 3.2.6 RT-PCR SEMIQUANTITATIVA

Per la reazione a catena della polimerasi (PCR) ad 1 µl del cDNA ottenuto sono stati aggiunti 2.4 µl di Buffer 10x, 0.4 µl dNTPS 10 µM (Roche), 0.5 µl di primer Forward 20 mM, 0.5 µl di primer Reverse 20 mM, 0.4 µl JumpStart Taq DNA Polymerase 2.5 U/µl (Sigma), 1.3 µl MgCl 25 mM (Sigma), 18.5 µl di acqua milliQ per arrivare ad un volume di reazione di 25 µl.

La miscela di reazione è stata preincubata per 5 minuti a 95°C (denaturazione iniziale) e poi sottoposta a  $n$  cicli di amplificazione secondo lo schema:

- |                  |                          |     |             |
|------------------|--------------------------|-----|-------------|
| ▪ denaturazione: | 94°C                     | 45" | } x n cicli |
| ▪ ibridazione:   | temperatura di annealing | 45" |             |
| ▪ estensione:    | 72°C                     | 1'  |             |

La fase finale viene condotta a 72°C per 7 min.

Per ogni coppia di primer (Sigma) la sequenza, il numero di cicli di amplificazione e la temperatura di annealing (A.T.) sono riportati in Tab. 2. Le condizioni sono state scelte in modo che nessun gene analizzato raggiungesse il plateau alla fine del processo di amplificazione. La glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) è stata utilizzata come housekeeping gene.

PRIMER	SEQUENZA	A.T.	N° CICLI
CLCN5 2-3F	TAGGCACCGAGAGATTACCAAT	60° C	35
CLCN5 6R	GATGTTCCCACAGCAGCAAGC		
G3PDH 0,45F	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	60° C	30
G3PDH 0,45R	ACCACAGTCCATGCCATCAC		

**Tab. 2: Sequenza dei primer utilizzati per l'analisi semiquantitativa in RT/PCR dell'mRNA di CLCN5. G3PDH è stata utilizzata come housekeeping gene.**

Alla fine del processo 1  $\mu$ l di ogni campione è stato controllato e quantificato mediante elettroforesi capillare in Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology).

### 3.3.7 PURIFICAZIONE AMPLIFICATO PER CURVA STANDARD (REAL TIME PCR)

Per effettuare l'analisi quantitativa in Real Time PCR è stato necessario ottenere degli amplificati purificati da utilizzare per preparare le curve standard di riferimento. Le porzioni dei vari geni umani di nostro interesse sono state amplificate usando i seguenti oligonucleotidi sintetici disegnati mediante l'utilizzo del software Beacon Designer (Bio-Rad) e indicati in Tab. 3.

PRIMER	SEQUENZA	A.T. [MgCl]	DITTA
CLCN5 Fw	CAGAGTGGGAATAGTTGGTC	54° C	Eurogentec
CLCN5 Rw	AGAGATACGGCAAGGAAG	2 mM	
G3PDH Fw	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	60° C	MWG
G3PDH Rw	TGGCAACAATATCCACTTTACCA	3 mM	
Megalin Fw	GCTGATAAAACGAGACGCACAGTA	58° C	Sigma
Megalin Rw	AGGACGGAACCAATCAGTGAAG	3 mM	

**Tab. 3: Sequenza dei primer utilizzati per l'analisi semiquantitativa in Real-Time PCR dell'mRNA di CLCN5 e Megalina.** G3PDH è stata utilizzata come housekeeping gene. Sono inoltre stati indicati la temperatura di annealing e la concentrazione di MgCl della miscela di amplificazione.

Allo scopo di verificare l'avvenuta amplificazione ed escludere la presenza di prodotti aspecifici, 1  $\mu$ l di ogni amplificato ottenuto è stato quindi caricato in Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology). Il campione è quindi stato purificato dai componenti utilizzati per la reazione di PCR mediante l'utilizzo di MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen) che permette, seguendo il protocollo della ditta fornitrice, di eliminare allo stesso tempo eventuali prodotti aspecifici di dimensioni inferiori a 70 bp.

Gli amplificati purificati, diluiti 1:23, sono stati letti allo spettrofotometro ottenendo il valore di assorbanza a 260 nm (OD260). Tale valore è stato utilizzato per calcolare la concentrazione del campione espressa in "numero di copie/ $\mu$ l" mediante la seguente formula:



$$\frac{6,023e23 \cdot 5e-5 \cdot OD260 \cdot 1e-3 \cdot 23}{}$$

$$\text{bp amplificato} \cdot 6,58e2$$

La curva standard è stata preparata mediante diluizioni seriali 1:10 a partire da un campione con la concentrazione di  $10e8$  copie/ $\mu\text{l}$ .

### 3.2.8 REAL TIME PCR

L'analisi quantitativa in Real Time PCR è stata eseguita usando un ICycler (BioRad).

La miscela di reazione era costituita da  $0,5 \mu\text{l}$  di cDNA o  $1 \mu\text{l}$  di standard (ottenuti come descritto nella sezione "Materiali e metodi"),  $0,375 \mu\text{l}$  di primer senso e  $0,375 \mu\text{l}$  di primer antisenso alla concentrazione di  $20 \mu\text{M}$ ,  $0,1 \mu\text{l}$  SYBR®Green (Sigma),  $0,4 \mu\text{l}$  JumpStart Taq DNA Polymerase  $2.5 \text{ U}/\mu\text{l}$  (Sigma),  $0,5 \mu\text{l}$  dNTPS  $10 \mu\text{M}$  (Roche),  $2,5 \mu\text{l}$  Buffer  $10x$ ,  $3 \mu\text{l}$  di MgCl  $25 \text{ mM}$  (Sigma) per i primers che necessitano di una concentrazione finale di MgCl di  $3 \text{ mM}$  e  $2 \mu\text{l}$  di MgCl  $25 \text{ mM}$  (Sigma) per quelli che invece necessitano di una concentrazione finale di  $2 \text{ mM}$ . Acqua RNAsi free (Qiagen) per arrivare ad un volume di reazione di  $25 \mu\text{l}$ . I campioni sono stati aliquotati, in duplicato, in piastre da 96 pozzetti (PCR plates 96 wells - BioRad). Per ciascuna piastra sono stati utilizzati dei controlli negativi per escludere eventuali contaminazioni dei componenti di reazione. I templati sono stati amplificati utilizzando il seguente programma:

- pre-incubazione per 5 minuti a 95°C (denaturazione iniziale) e poi sottoposta a  $n$  cicli di amplificazione secondo lo schema:
- denaturazione: 94°C 30" } x  $n$  cicli
- ibridazione: temperatura di annealing 30" }

Il numero dei cicli è stato scelto in base all'espressione basale del gene d'interesse. Successivamente, per verificare la specificità dei prodotti è stata eseguita per ogni campione una curva di Melting.

La quantificazione del prodotto di amplificazione è stata calcolata mediante il rapporto tra l'espressione del gene d'interesse e quella del gene housekeeping.

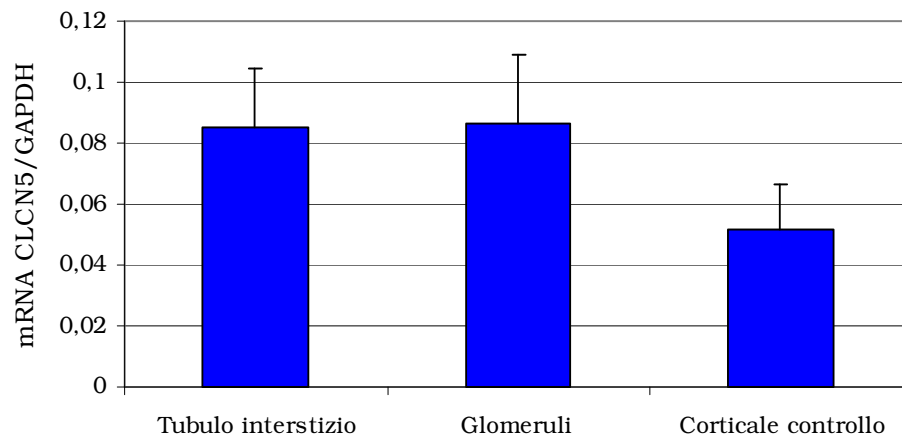
### **3.4 ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il Test T di Student e la Regressione Lineare, considerando una  $p \leq 0,05$  statisticamente significativa.

## 4. RISULTATI.

### 4.1 ESPRESSIONE DI CLCN5 IN BIOPSIE RENALI MICRODISSEZIONATE DI PAZIENTI DIABETICI

Lo studio di espressione del gene codificante per il canale del cloro CLC-5, eseguita nelle biopsie microdissezionate ottenute dai pazienti diabetici, ha messo in evidenza la sua presenza sia nel compartimento glomerulare che tubulo interstiziale con un'espressione aumentata nei due compartimenti rispetto al tessuto corticale di controllo (Fig. 7).

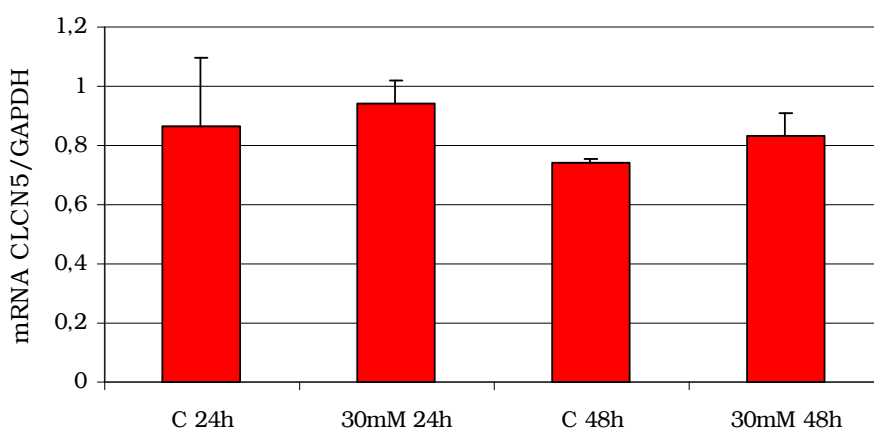


**Fig. 7: Quantificazione dell'mRNA del CLCN5 in biopsie renali microdissezionate di pazienti diabetici.**

Tale aumento è risultato statisticamente significativo secondo il test T di Student: Glom vs Ctr  $p < 0.008$ ; TI vs Ctr  $p < 0,001$ .

#### 4.2 RUOLO DEL GLUCOSIO NELLA MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL MESSAGGERO DI CLCN5 NELLA PATOLOGIA DIABETICA: ESPERIMENTO SU CELLULE MESANGIALI UMANE

Il riscontro dell'espressione di CLCN5 a livello del compartimento glomerulare nelle biopsie dei pazienti diabetici ci ha portato ad indagare un possibile ruolo modulatore del glucosio sulle cellule mesangiali in coltura visto che anche i nostri risultati confermano la presenza di CLC-5 in queste cellule. Caratteristica principale del diabete è una costante iperglicemia. Le quantità di glucosio che vengono filtrate dal glomerulo sono quindi molto maggiori rispetto a quelle filtrate in condizioni fisiologiche. Per poter testare l'effetto del glucosio su cellule del glomerulo è stato condotto un esperimento in vitro su cellule mesangiali. Le cellule mesangiali sono state trattate con concentrazioni di glucosio fisiologiche (5 mM, controlli) e con elevate concentrazioni di glucosio (30 mM) per 24h e 48h. I risultati sono riportati in figura 8.

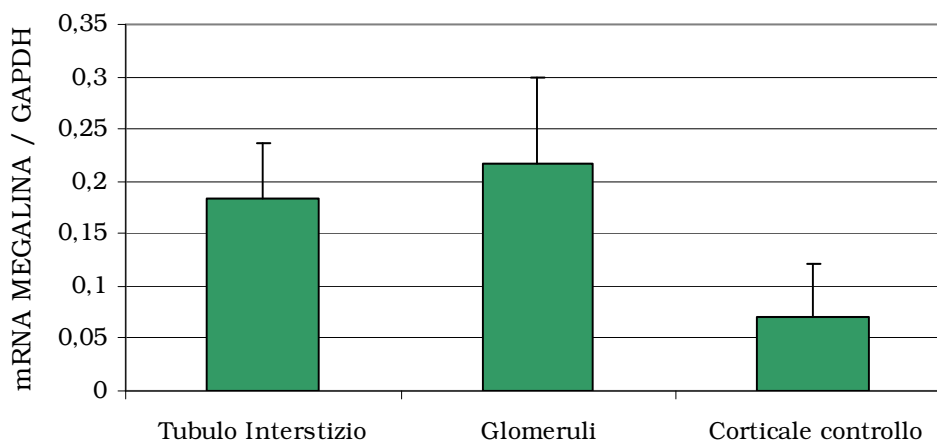


**Fig. 8: Quantificazione dell'mRNA del CLCN5 in cellule mesangiali in coltura stimulate con glucosio.** Non vi sono differenze statisticamente significative nei livelli di espressione di CLCN5 (test T di Student).

Dal grafico risulta evidente come non vi siano variazioni nei livelli di espressione di CLCN5 rispetto ai controlli, sia a 24h che a 48h. Questo ci permette di escludere un ruolo del glucosio nella modulazione dell'espressione del gene in questione nella patologia diabetica a livello di cellule mesangiali glomerulari.

#### **4.3 ESPRESSIONE DI MEGALINA IN BIOPSIE RENALI MICRODISSEZIONATE DI PAZIENTI DIABETICI**

Abbiamo inoltre valutato l'espressione del gene per il secondo componente del complesso macromolecolare preso in esame: Megalina. Anche in questo caso, come visibile in figura 9 il gene in analisi è risultato espresso sia nel compartimento glomerulare che tubulo interstiziale.



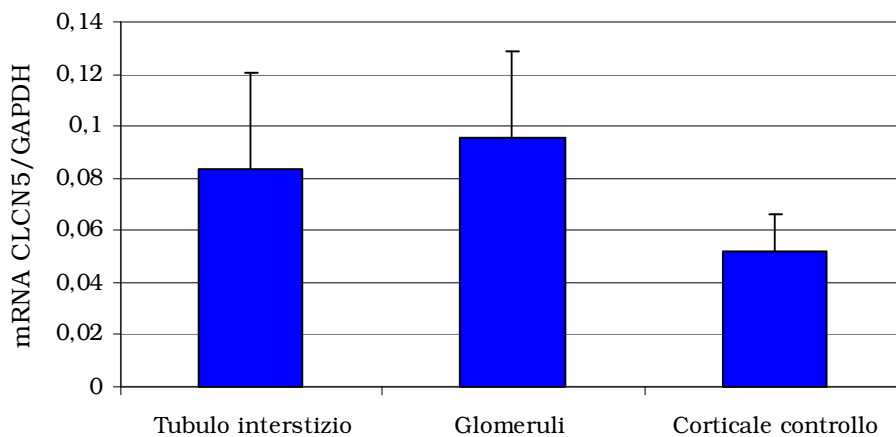
**Fig. 9: Quantificazione dell'mRNA di Megalina in biopsie renali microdissezionate di pazienti diabetici.**

L'espressione di Megalina è risultata aumentata in entrambi i compartimenti rispetto al tessuto corticale di controllo in maniera

statisticamente significativa secondo il test T di Student: Glom vs Ctr  $p < 0,003$ ; TI vs Ctr  $p < 0,0004$ .

#### 4.4 ESPRESSIONE DI CLCN5 IN BIOPSIE RENALI MICRODISSEZIONATE DI PAZIENTI CON NEFROPATIA A DEPOSITI DI IgA

Alla luce dei precedenti risultati siamo andati a valutare l'espressione di CLCN5 anche in un'altra patologia proteinurica, la nefropatia a depositi di IgA. I risultati sono riportati in figura 10.



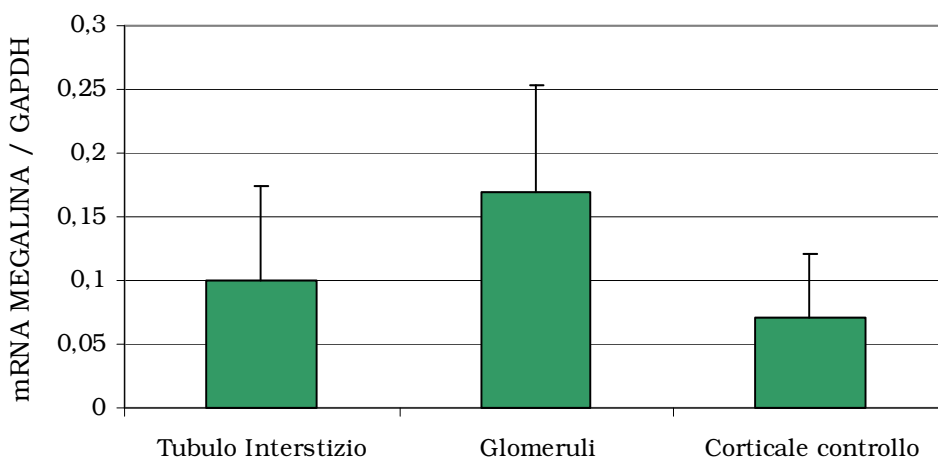
**Fig. 10: Quantificazione dell'mRNA del CLCN5 in biopsie renali microdissezionate da pazienti con nefropatia da IgA.**

Solo l'aumento dell'espressione del messaggero nel compartimento glomerulare rispetto al controllo risulta significativo (T test di Student).

Come si può vedere, anche nel caso di questa patologia, si ha un aumento dell'espressione del messaggero di ClC-5 rispetto al controllo, in entrambi i compartimenti. Solo l'aumento a livello glomerulare risulta però statisticamente significativo (Glom vs Ctrl  $p < 0,006$ ).

#### 4.5 ESPRESSIONE DI MEGALINA IN BIOPSIE RENALI MICRODISSEZIONATE DI PAZIENTI CON NEFROPATIA A DEPOSITI DI IgA

Lo stesso tipo di risultato è stato ottenuto analizzando l'espressione di Megalina nella nefropatia a depositi di IgA (Fig. 11).



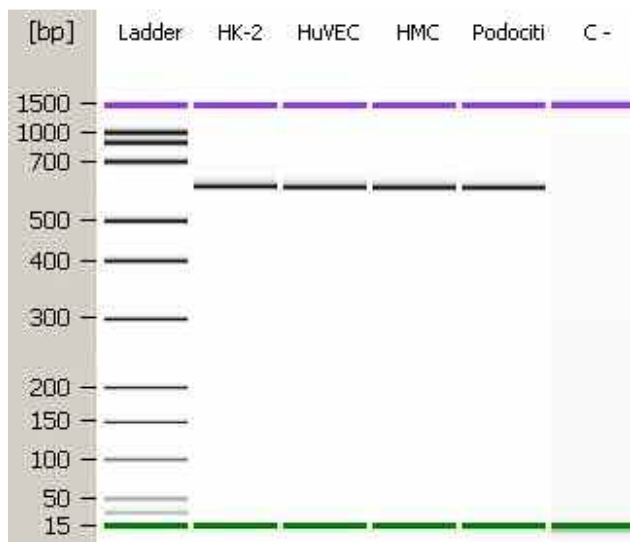
**Fig. 11: Quantificazione dell'mRNA della Megalina in biopsie renali microdissezionate da pazienti con nefropatia da IgA.**

Anche in questo caso la significatività statistica la si raggiunge nel compartimento glomerulare vs controllo ( $p < 0,01$ ).

#### 4.6 ESPRESSIONE DI CLCN5 E MEGALINA IN BIOPSIE LASER MICRODISSEZIONATE DI PAZIENTI DIABETICI

Uno dei limiti della microdissezione manuale è quello di non poter escludere con certezza la contaminazione da parte di tubulo prossimale, del compartimento glomerulare. La sede principale dell'espressione delle proteine da noi analizzate è proprio il tubulo prossimale. Per quanto riguarda il canale del cloro una prova che i

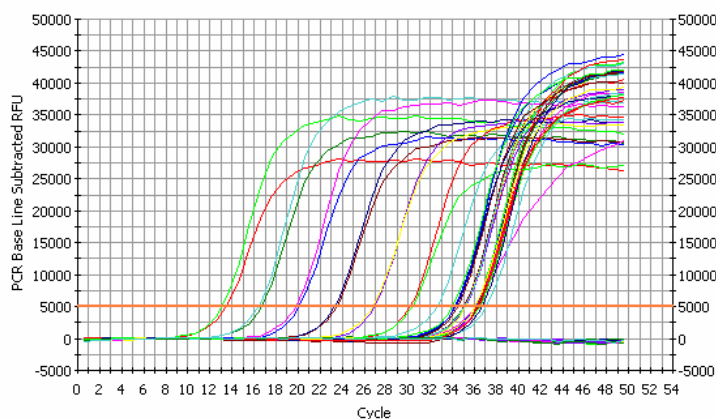
risultati fossero attendibili era stata ottenuta nel momento in cui, cellule componenti il glomerulo, messe in coltura, esprimevano la nostra proteina (Fig 12).



**Fig. 12: Grafico Agilent DNA 1000:** si evidenzia la presenza di CLCN5 (banda a 612 bp) in tutti i tipi cellulari analizzati.

HK-2: cellule tubulari,  
HuVEC: cellule endoteliali,  
HMC: cellule mesangiali.

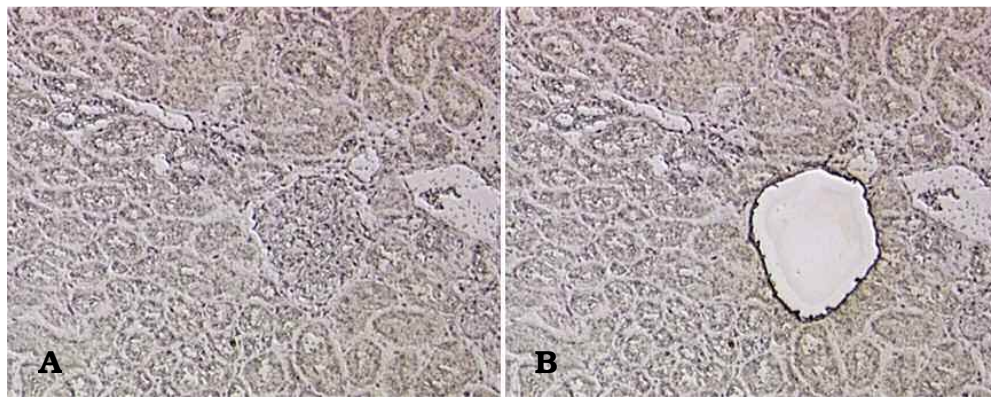
Risultati diversi ha dato invece l'analisi dell'espressione di Megalina condotta sia su cellule componenti il glomerulo che su cellule del tubulo prossimale, sede naturale di espressione della Megalina stessa. Come si può vedere in figura 13 il livello di espressione della Megalina era talmente basso da non poter essere quantificato, avendo una concentrazione inferiore alle 10 copie/ $\mu$ l.



**Fig. 13: Grafico Real Time PCR per l'analisi di megalina in cellule tubulari HK-2 stimulate con albumina.** E' possibile vedere le curve relative ai vari punti dello standard equidistanti tra loro a partire da una concentrazione di  $10^7$  copie/ $\mu$ l. Tutti i campioni analizzati sono distribuiti in un unico gruppo sulla destra del grafico e presentano una concentrazione inferiore alle 10 copie/ $\mu$ l.



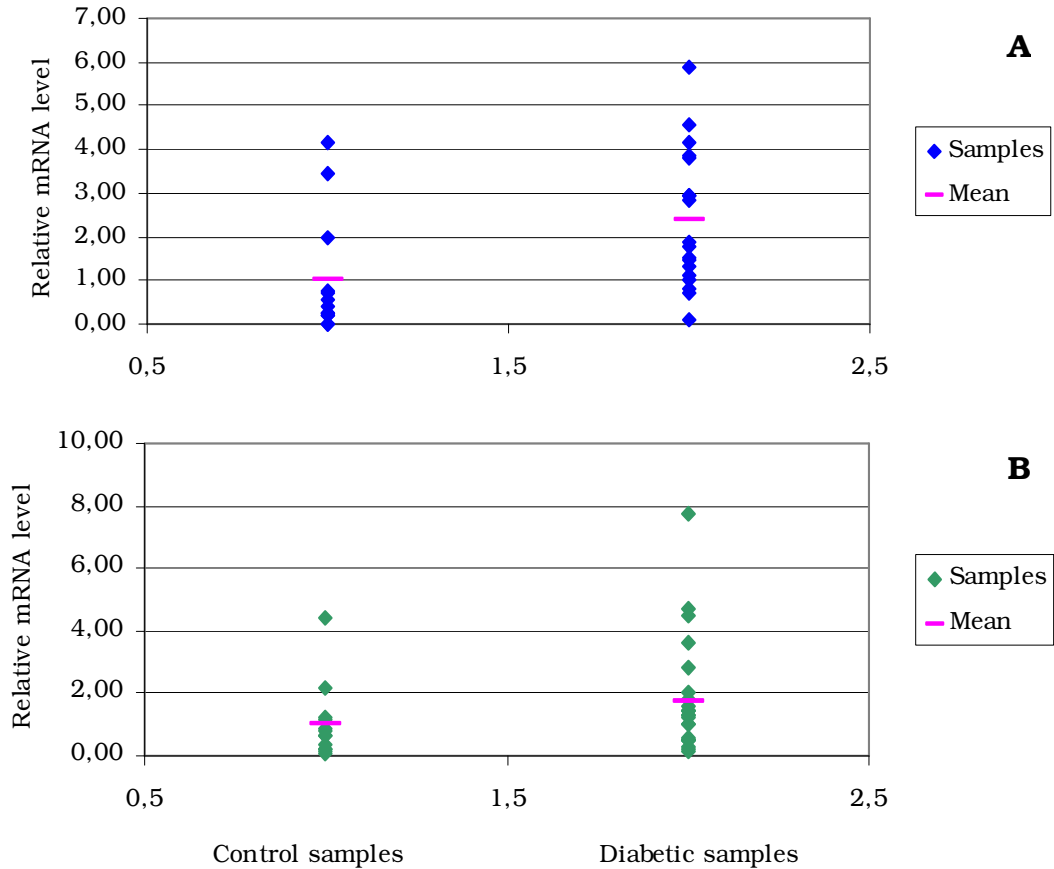
Per poter quindi verificare che i nostri risultati non fossero frutto di un errore di contaminazione tra compartimenti abbiamo chiesto la collaborazione del Dott. J.J. Baelde, del Leiden University Medical Center che si occupa proprio di studi di espressione su biopsie renali microdissezionate al laser. Il vantaggio di questa tecnica consiste nel fatto che, essendo effettuata grazie all'aiuto di un microscopio ad elevati ingrandimenti e di un laser ad alta precisione, è possibile prelevare dal tessuto i glomeruli privi addirittura della capsula del Bowman stessa (Fig. 14).



**Fig. 14: Immagine del tessuto renale da cui è stato prelevato mediante il glomerulo pre (A) e post (B) taglio con laser.**

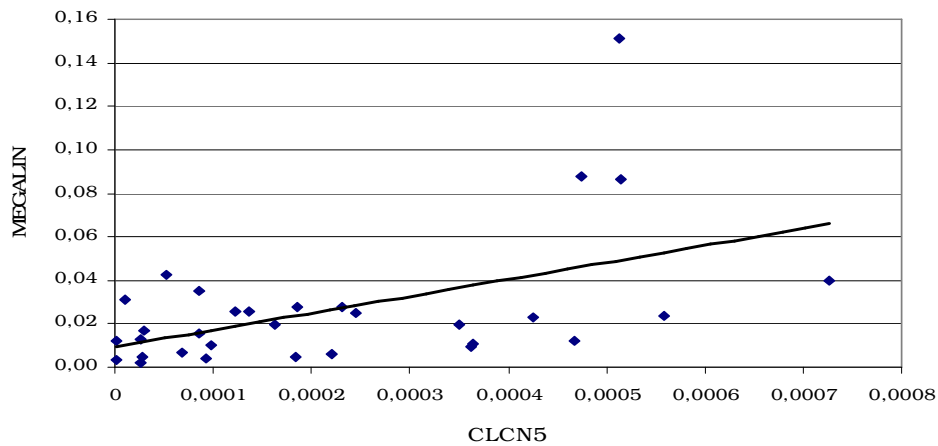
E' stata quindi effettuata l'analisi di espressione di CLCN5 e Megalina, sempre mediante Real-Time PCR, nei glomeruli (n° 28) di pazienti con patologia diabetica. Il controllo in questo caso era rappresentato da glomeruli normali (n° 14) e non da tessuto corticale come nel caso dei nostri esperimenti. Gli esperimenti condotti hanno confermato i nostri risultati non solo appurando la presenza di Megalina e di CLC-5 a livello glomerulare, cosa che fin'ora non era mai stata messa in evidenza, ma che nella patologia diabetica i glomeruli presentano un'espressione maggiore sia di CLCN5 che di Megalina rispetto ai controlli (Fig. 15).

## Risultati



**Fig. 15: Risultati degli esperimenti condotti dal Dr. Baelde condotti su glomeruli laser microdissezionati da biopsie di pazienti diabetici. Espressione di CLCN5 (A) e di Megalina (B).**

E' emersa inoltre una correlazione diretta tra l'espressione dei due geni ( $r=0,5$ ,  $p<0,004$ ) come riportato in figura 16.

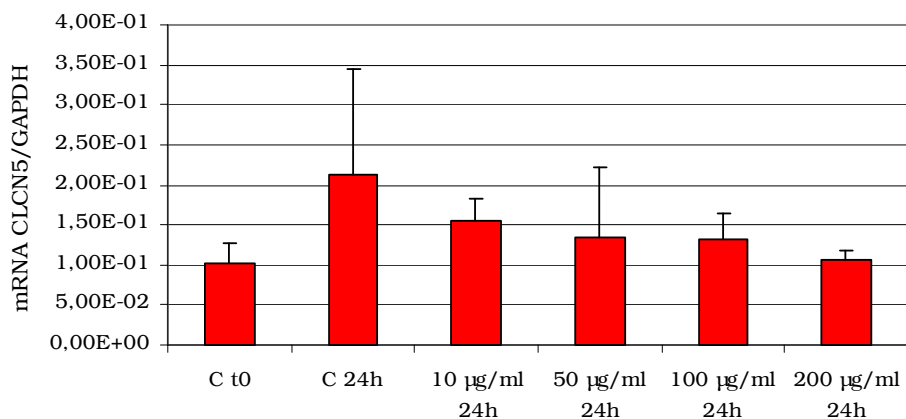


**Fig. 16: Correlazione lineare tra l'espressione di CLCN5 e Megalina .**

#### 4.7 ESPRESSIONE DI CLCN5 IN CELLULE TUBULARI HK-2 STIMOLATE CON ALBUMINA

Per poter valutare se fosse proprio l'aumentata escrezione di albumina a modulare l'espressione del canale a livello tubulo interstiziale abbiamo condotto un esperimento sulle cellule tubulari HK-2 poste in coltura. Le cellule sono state stimolate per 24h con diverse concentrazioni di albumina da 10 µg/ml a 200 µg/ml.

Come si può vedere dalla figura 17 non è emersa nessuna differenza significativa tra i campioni stimolati con le diverse concentrazioni di albumina, né questi sono risultati diversi dal controllo preso al tempo zero.



**Fig. 17: Quantificazione dell'mRNA del CLCN5 in cellule tubulari HK-2 in coltura stimolate con albumina.** Analisi condotta mediante RT-PCR semiquantitativa.

## **5. DISCUSSIONE**

I risultati ottenuti evidenziano per la prima volta la presenza del canale del cloro ClC-5 e della Megalina in glomeruli microdissezionati da biopsie renali umane.

Mentre la presenza del ClC-5 non è stata mai dimostrata nel compartimento glomerulare, né nell'uomo né in modelli sperimentali, Megalina è stata evidenziata nel glomerulo di ratto in un modello sperimentale di glomerulonefrite membranosa, la nefrite di Heyman. Nella nefrite di Heyman anticorpi circolanti contro Megalina passano attraverso la membrana basale glomerulare, reagiscono con la Megalina a livello delle vescicole rivestite di clatrina presenti nei podociti, e formano immunocomplessi che si depositano a livello subepiteliale (24). Nell'uomo, a livello glomerulare, la presenza di Megalina non è mai stata dimostrata. Gli esperimenti in vitro sulle cellule componenti il glomerulo non ci hanno permesso di evidenziare quali fossero i tipi cellulari responsabili a questo livello della sua espressione visti i bassi livelli rinvenuti non solo nelle cellule del glomerulo, ma anche nelle cellule tubulari. E' risaputo il ruolo di Megalina nel processo di endocitosi dell'albumina a livello tubulare.

Ma cosa si conosce sul processo di endocitosi a livello glomerulare? Esistono evidenze che podociti umani messi in coltura sono in grado di endocitare l'albumina. Infatti si è osservata, in microscopia elettronica, la presenza di numerosi vacuoli a livello dei podociti in biopsie di pazienti proteinurici (25). In maniera indiretta anche i nostri risultati hanno messo in evidenza la

possibilità di attività endocitotica nei podociti vista la presenza di CIC-5 in questo tipo cellulare.

La presenza di due proteine del complesso macromolecolare responsabile dell'endocitosi dell'albumina a livello del glomerulo umano adulto non è poi così inaspettata visto che, come riportato da Christensen EI e Verroust PJ (16), Megalina risulta sempre presente nel glomerulo durante le fasi di sviluppo embrionale del rene.

I dati riportati in letteratura, riguardanti la localizzazione di CIC-5 e Megalina nel rene, utilizzano per la ricerca delle due proteine tecniche di Western blot, immunoistochimica o immunofluorescenza. Il fatto di aver utilizzato una metodica più sensibile (Real-Time PCR) rispetto a quelle utilizzate in letteratura, probabilmente ci ha permesso di mettere in evidenza questi due geni, codificanti per proteine appartenenti al complesso macromolecolare deputato all'endocitosi, anche a livello glomerulare.

I nostri risultati dimostrano inoltre che i glomeruli di pazienti con patologie proteinuriche hanno livelli di espressione di Megalina e CIC-5 maggiori rispetto ai controlli. Questo ci permette di ipotizzare un loro ruolo nella fisiopatologia della proteinuria, quasi un tentativo da parte del glomerulo di ridurre la quantità di proteine filtrate, una sorta di meccanismo compensatorio "antiproteinurico" che si aggiunge a quelli strutturali ben noti. La correlazione diretta emersa tra l'espressione genica delle due proteine fa ipotizzare un loro meccanismo d'azione coordinato simile a quello presente nel tubulo prossimale.

Per quanto riguarda la patologia diabetica sono presenti in letteratura esperimenti in vitro su cellule porcine di tubulo prossimale che, sottoposte per 24h a stimolo con elevate concentrazioni di glucosio, non mostrano alcuna modulazione nell'espressione di CLCN5 (26). Abbiamo pensato di ripetere l'esperimento su cellule mesangiali umane e anche in questo caso la stimolazione con glucosio non ha provocato variazioni nei livelli di espressione di CLCN5. Questo ci ha permesso di escludere un ruolo del glucosio nella modulazione del messaggero di CIC-5 a livello glomerulare nella patologia diabetica. Questo dato è stato inoltre avvalorato dai risultati ottenuti nelle biopsie dei pazienti con nefropatia a depositi di IgA permettendoci di associare un ruolo di Megalina e CIC-5 più alla proteinuria che all'"ambiente" caratteristico della singola patologia.

Per quanto riguarda il compartimento tubulo interstiziale la presenza di CIC-5 e di Megalina era attesa. E' infatti ben noto il meccanismo con cui le cellule tubulari sono in grado di riassorbire l'albumina filtrata dal glomerulo mediante il complesso macromolecolare, sito in membrana apicale, che vede coinvolte proprio le proteine da noi prese in esame (9).

Non è mai stato dimostrato invece che nelle nefropatie proteinuriche ci sia una up-regolazione di Megalina e CIC-5. La nostra ipotesi è che l'aumentata espressione dei due geni in esame venga indotta dalla maggiore quantità di albumina che filtra attraverso il glomerulo. Abbiamo provato a dimostrare questa teoria stimolando in vitro le cellule tubulari HK-2 con albumina, ma non abbiamo ottenuto i risultati attesi. Effettivamente Hryciw

et al (27) hanno condotto degli esperimenti in vitro su cellule tubulari di opossum in cui hanno riscontrato che concentrazioni da loro definite fisiologiche (da 10 µg/ml a 100 µg/ml) di albumina causano un aumento di ClC-5 sulla superficie cellulare, senza però variazioni nella quantità di proteina totale. Questi dati sono in accordo con un modello in cui il ClC-5 è reclutato in membrana plasmatica da vescicole presenti a livello subcellulare in risposta alla presenza di albumina. Si presuppone quindi che non venga attivato un processo che porta alla produzione di nuova proteina e questi dati sono in accordo con i nostri risultati in cui, per concentrazioni di albumina fino a 200 µg/ml, non si hanno modificazioni nell'espressione di CLCN5.

La maggior parte dei dati riportati in letteratura considerano la microalbuminuria e la macroproteinuria dovute ad un danno a livello glomerulare più che tubulare anche se studi più recenti hanno ipotizzato che la proteinuria possa essere dovuta più ad un difetto di riassorbimento a livello tubulare che ad un problema a livello glomerulare. Il dibattito in questione crea un'elevata difficoltà nel calcolo teorico dell'albumina che realmente si trova a contatto con il tubulo sia nei processi fisiologici che patologici (28). Di conseguenza anche la scelta delle concentrazioni di albumina da utilizzare negli esperimenti in vitro, per mimare le situazioni che accadono in vivo, diventa difficoltosa.

Il risultato del nostro esperimento non ci permette quindi di stabilire se l'ipotesi da noi avanzata sul meccanismo di regolazione dell'espressione di ClC-5 e Megalina sia corretta o meno.

## 6. CONCLUSIONI

Riassumendo:

1. Abbiamo dimostrato per la prima volta nell'uomo la presenza del canale del cloro ClC-5 e della Megalina a livello del compartimento glomerulare.
2. L'espressione di ClC-5 e Megalina è stata rilevata in tutte le biopsie analizzate sia a livello tubulo-interstiziale (ti) che a livello glomerulare (gl) senza nessuna differenza significativa tra i due compartimenti.
3. Livelli di espressione di ClC-5 e Megalina sono risultati significativamente maggiori nei due compartimenti analizzati rispetto alle bp di controllo in entrambe le nefropatie (gl IgA vs bp controllo  $p < 0,006$ ; gl diabetici vs bp controllo  $p < 0,008$ ; ti diabetici vs bp controllo  $p > 0,001$ ).
4. Il trattamento in alto glucosio a 24 e 48 ore delle HMC non ha evidenziato nessuna modificazione significativa nell'espressione di ClC-5 escludendo così un ruolo determinante del glucosio nella sua up regolazione in corso di glomerulopatia diabetica.
5. L'esperimento condotto in vitro sulle cellule tubulari stimulate con albumina non ha mostrato un suo effetto nella modulazione dell'espressione di ClC-5 alle concentrazioni utilizzate.

In conclusione, questo studio, mettendo in evidenza per la prima volta a livello glomerulare la presenza di ClC-5 e Megalina, componenti del complesso macromolecolare



responsabile dell'endocitosi dell'albumina, apre una nuova prospettiva nella comprensione del meccanismo fisiopatologico alla base della proteinuria.

I nostri dati rafforzano il ruolo del glomerulo in questo meccanismo, che si aggiunge a quello ben noto del tubulo interstizio.

Un ruolo fondamentale potrebbero avere i podociti visto che i dati riportati in letteratura sulla loro capacità endocitotica, bene si affiancano alla presenza di CIC-5 e Megalina nel glomerulo da noi rinvenuta.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Greenberg A, Cheung AK, Coffmann TM, Falk RJ, Jennette JC. Primer on kidney disease. *National Kidney Foundation*; Second Edition, 1998.
2. Satchell SC, Tooke JE. What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia*. 2008 May;51(5):714-25. Review.
3. Miner JH. Focusing on the glomerular slit diaphragm: podocin enters the picture. *Am J Pathol*. 2002 Jan;160(1):3-5. Review.
4. Tojo A, Endou H. Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *Am J Physiol*. 1992 Oct;263(4 Pt 2):F601-6.
5. Russo LM, Sandoval RM, McKee M, Osicka TM, Collins AB, Brown D, Molitoris BA, Comper WD. The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney Int*. 2007 Mar;71(6):504-13.
6. Birn H, Christensen EI. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int*. 2006 Feb;69(3):440-9. Review.

7. Danziger J. Importance of low-grade albuminuria. *Mayo Clin Proc.* 2008 Jul;83(7):806-12. Review.
8. Leheste JR, Rolinski B, Vorum H, Hilpert J, Nykjaer A, Jacobsen C, Aucouturier P, Moskaug JO, Otto A, Christensen EI, Willnow TE. Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am J Pathol.* 1999 Oct;155(4):1361-70.
9. Hryciw DH, Lee EM, Pollock CA, Poronnik P. Molecular changes in proximal tubule function in diabetes mellitus. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004 May-Jun;31(5-6):372-9. Review.
10. Hryciw DH, Wang Y, Devuyst O, Pollock CA, Poronnik P, Guggino WB. Cofilin interacts with CLC-5 and regulates albumin uptake in proximal tubule cell lines. *J Biol Chem.* 2003 Oct 10;278(41):40169-76.
11. Thakker RV. Pathogenesis of Dent's disease and related syndromes of X-linked nephrolithiasis. *Kidney Int.* 2000 Mar;57(3):787-93. Review
12. Uchida S. In vivo role of CLC chloride channels in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Nov;279(5):F802-8. Review.
13. Mindell JA, Maduke M. CLC chloride channels. *Genome Biol.* 2001;2(2) Review.

14. Souza-Menezes J, Morales MM, Tukaye DN, Guggino SE, Guggino WB. Absence of ClC5 in knockout mice leads to glycosuria, impaired renal glucose handling and low proximal tubule GLUT2 protein expression. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(5):455-64.
15. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Apr;3(4):256-66. Review.
16. Christensen EI, Verroust PJ. Megalin and cubilin, role in proximal tubule function and during development. *Pediatr Nephrol.* 2002 Dec;17(12):993-9. Review.
17. Cove-Smith A, Hendry BM. The regulation of mesangial cell proliferation. *Nephron Exp Nephrol.* 2008;108(4):e74-9. Review.
18. Schena FP, Selvaggi FP. Malattie dei reni e delle vie urinarie. *Mc Graw Hill.* Terza edizione, 2003.
19. Rose BD. Fisiopatologia delle malattie renali. *Mc Graw Hill.* Seconda edizione, 1989.
20. P. H. Kimmelstiel, C. Wilson: Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *American Journal of Pathology,* Philadelphia, 1936, 12: 82-97.

21. Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 1982 Jun 26;1(8287):1430-2
22. Svendsen PA, Oxenbøll B, Christiansen JS. Microalbuminuria in diabetic patients: a longitudinal study. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*. 1981;242:53-4.
23. Solomon SD, Lin J, Solomon CG, Jablonski KA, Rice MM, Steffes M, Domanski M, Hsia J, Gersh BJ, Arnold JM, Rouleau J, Braunwald E, Pfeffer MA; Prevention of Events With ACE Inhibition (PEACE) Investigators. Influence of albuminuria on cardiovascular risk in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*. 2007 Dec 4;116(23):2687-93.
24. Yamazaki H, Saito A, Ooi H, Kobayashi N, Mundel P, Gejyo F. Differentiation-induced cultured podocytes express endocytically active megalin, a heyman nephritis antigen. *Nephron Exp Nephrol*. 2004;96(2):e52-8.
25. Eyre J, Ioannou K, Grubb BD, Saleem MA, Mathieson PW, Brunskill NJ, Christensen EI, Topham PS. Statin-sensitive endocytosis of albumin by glomerular podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Feb;292(2):F674-81.

26. Ishibashi F. Chronic high glucose inhibits albumin reabsorption by lysosomal alkalization in cultured porcine proximal tubular epithelial cells (LLC-PK1). *Diabetes Res Clin Pract.* 2006 Jun;72(3):223-30.
27. Hryciw DH, Ekberg J, Lee A, Lensink IL, Kumar S, Guggino WB, Cook DI, Pollock CA, Poronnik P. Nedd4-2 functionally interacts with ClC-5: involvement in constitutive albumin endocytosis in proximal tubule cells. *J Biol Chem.* 2004 Dec 31;279(53):54996-5007.
28. Hryciw DH, Ekberg J, Pollock CA, Poronnik P. ClC-5: a chloride channel with multiple roles in renal tubular albumin uptake. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(7):1036-42. Review.

**IL CONTENUTO DI QUESTA TESI E' STATO PRESENTATO A  
CONGRESSI NAZIONALI E INTERNAZIONALI DI INTERESSE  
NEFROLOGICO**

1. Possibile ruolo del canale del cloro ClC-5 e delle sue isoforme nelle malattie renali proteinuriche: studio di espressione in biopsie microdissezionate di pazienti con diabete di tipo II.

Del Prete D, Tosetto E, Ceol M, **Tiralongo E**, Antonucci F, Ghiggeri GM, D'Angelo A, Anglani F.

“47° Congresso Nazionale SIN” - Roma, 24-27 Maggio 2006.

2. Possible role of ClC-5 chloride channel in proteinuric kidney disease: expression study in microdissected biopsies of patients with type II diabetes.

Del Prete D, Tosetto E, Ceol M, **Tiralongo E**, Antonucci F, Ghiggeri GM, D'Angelo A, Gambaro G, Anglani F.

“XLIII Congress of the European Renal Association, European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA)”.  
15-18 Luglio 2006 - Glasgow, United Kingdom.

3. Studio dell'espressione del canale del cloro ClC-5 in biopsie renali microdissezionate di nefropatie proteinuriche e in cellule renali in coltura.

**Tiralongo E**, Ceol M, Tosetto E., Mezzabotta F, Antonucci F, Anglani F, D'Angelo A, Del Prete D.

“48° Congresso SIN”, 7-10 Ottobre 2007 – Fiera del Levante – Bari. Premio per “miglior poster della sessione Immunologia Crescita Cellulare”.

4. Expression study of CLCN5 gene in microdissected human kidney biopsies of proteinuric nephropathies.

**Tiralongo E**, Ceol M, Tosetto E, Mezzabotta F, Anglani F, Antonucci F, D’Angelo A, Del Prete D.

“XLV Congress of the European Renal Association, European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA)”. May 10-13, 2008 - Stockholm, Sweden.

5. Expression study of CLCN5 gene in microdissected human kidney biopsies of proteinuric nephropathies.

**Tiralongo E**, Ceol M, Tosetto E, Mezzabotta F, Anglani F, Antonucci F, D’Angelo A, Del Prete D.

“41st Annual Meeting & Scientific Exposition” ASN Renal Week - 6-9 Nov,2008, Pennsylvania Convention Center - Philadelphia, Pennsylvania, USA.