



UNIVERSITÀ DI VERONA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA*

*Scuola di dottorato in Scienze della Vita e della Salute*

*Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali*  
XXXI Ciclo/2015

**Identificazione del primo biomarcatore diagnostico  
urinario per il rene a spugna midollare (MSK):  
risultato di studio di proteomica mediante  
spettrometria di massa**

S.S.D. MED/14

Coordinatore: Prof. Giovanni Targher

Firma

Tutor: Prof. Gianluigi Zaza

Firma

Dottorando: Dott.ssa Nadia Antonucci

Firma

## SOMMARIO

Il rene a spugna midollare (o medullary sponge kidney, MSK) è una malformazione renale, caratterizzata da modificazioni ectasiche e cistiche dei dotti collettori della porzione midollare delle piramidi renali, che assumono una forma simile a quella delle spugne dopo essere state strizzate e da cui deriva la sua denominazione.

Sebbene la sua prevalenza nella popolazione generale non sia nota con esattezza (~ 5 casi su 10,000-100,00 soggetti nella popolazione generale), MSK è stato diagnosticato nel 20% dei pazienti con calcoli renali ricorrenti. Infatti, la formazione di calcoli di fosfato di calcio e/o di ossalato di calcio è la prima manifestazione clinica in questi pazienti ed è causata dalla coesistenza dei seguenti fattori: ipercalciuria, elevato pH urinario, ipocitraturia, stasi urinaria nei dotti papillari ectasici.

La sua patogenesi non è del tutto chiara e vari fattori sembrano contribuire al suo sviluppo come: disturbi genetici, sviluppo anomalo congenito dei tubuli renali, condizioni acquisite di ostruzione dei dotti collettori da parte dei cristalli di calcio, o manifestazioni renali che potrebbero essere l'espressione di una condizione di iperparatiroidismo primario. Negli ultimi anni si è fatta strada l'idea che si tratti di una patologia ereditaria di tipo autosomico dominante a penetranza incompleta.

La diagnosi di MSK è radiografica e l'urografia con mezzo di contrasto è l'indagine di riferimento. Negli ultimi anni però si è diffusa una tendenza a ridurre l'impiego dell'urografia a seguito dell'introduzione di indagini che richiedono basse concentrazioni o assenza di mezzo di contrasto quali: ecografia, tomografia computerizzata (TAC spirale), risonanza magnetica. Questo si è tradotto in una riduzione del numero di casi di MSK diagnosticati. Infatti l'ecografia renale, a differenza dell'urografia, non consente di mettere in evidenza i reperti tipici e patognomonicici di questa condizione. Per quanto riguarda la TAC e l'uro-TAC, sebbene possano rivelare le più evidenti dilatazioni cistiche dei dotti collettori prepapillari, non possiedono la risoluzione spaziale necessaria per rivelare la forma più comune di MSK, caratterizzata da dotti dilatati e piccole cisti.

Il rischio che l'MSK possa essere sempre meno diagnosticata genera la necessità di introdurre specifici biomarker diagnostici e clinici. L'introduzione di biomarker potrebbe aiutare i clinici ad identificare più accuratamente i pazienti con questa patologia e ad iniziare terapie atte a ridurre le complicanze renali e sistemiche.

Pertanto nel nostro studio abbiamo utilizzato l'analisi proteomica, mediante spettrometria di massa, al fine di individuare nuovi elementi biologici coinvolti nella fisiopatologia dell'MSK e per identificare potenziali biomarker diagnostici da introdurre nella pratica clinica.

Sono stati arruolati, dopo firma del consenso informato, 22 pazienti affetti da MSK e 22 pazienti con nefrolitiasi calcica idiopatica (ICN) con simili caratteristiche demografiche (età, sesso e origine geografica) seguiti presso l'UOC di Nefrologia e Dialisi dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona. Due pazienti con ICN (ICN con cisti), sebbene non avessero segni clinici e radiologici di MSK, mostravano cisti su entrambi i reni.

Da tutti i pazienti inclusi nello studio, sono stati raccolti i campioni di urine della seconda minzione del mattino a cui sono stati immediatamente aggiunti gli inibitori delle proteasi.

Le urine di 10 pazienti con MSK e 11 pazienti con ICN (compresi i due pazienti con cisti), scelti in maniera random, sono state sottoposte a spettrometria di massa mediante lo spettrometro linear trap Quadrupole Orbitrap Velos Pro.

Dalle analisi di spettrometria di massa sono state identificate 1529 proteine. Di queste 884 (58%) erano in comune tra i due gruppi di pazienti mentre 249 (16%) e 396 (26%) erano associate rispettivamente a ICN e MSK. Tramite Volcano Plot e curva Receiver Operating Characteristic (ROC) è stato possibile restringere, rispettivamente, a 328 e 44 il numero di proteine specifiche per MSK. Inoltre, 119 proteine differenziavano i pazienti con cisti (tutti i pazienti con MSK e i due ICN con cisti renali) dai pazienti con nefrolitiasi che non presentavano cisti. In particolare, un totale di 22 proteine risultava up-regolato nel confronto tra pazienti MSK e ICN mentre 15

proteine risultavano sotto-espresse nel gruppo di pazienti con cisti rispetto al gruppo di pazienti senza cisti.

La sovrapposizione tra i 3 metodi statistici e l'applicazione dell'algoritmo Support Vector Machine ha portato all'identificazione di cinque proteine: glypican-1 (GPC-1), plexin domain-containing protein 1 (PLXDC-1), beta-hexosaminidase (HEXA), epididymis-specific alpha-mannosidase (MAN2B2) e laminin subunit alpha 2 (LAMA-2). Quest'ultima proteina, è risultata il miglior biomarcatore per MSK, poiché era statisticamente up-regolata in entrambe le analisi univariate, aveva un'elevata area sotto la curva, e mostrava il più basso ranking, ottenuto con algoritmo di support vector machine, dei 16 biomarcatori selezionati.

LAMA-2 (*laminin subunit alpha 2*) è una subunità della laminina, che consiste in una famiglia di almeno 15 proteine eterotrimeriche  $\alpha\beta\gamma$  della matrice extracellulare, che rappresenta la componente principale della membrana basale. Diversi autori hanno suggerito che la laminina potrebbe avere un ruolo fondamentale nella formazione e crescita delle cisti.

La validazione con metodica ELISA effettuata sulle urine di tutti i pazienti inclusi nello studio confermava i dati di proteomica.

In conclusione, LAMA-2 potrebbe rappresentare un ottimo candidato come biomarcatore per la diagnosi di MSK e potrebbe aiutare i clinici ad identificare precocemente i pazienti con questa patologia e ad iniziare terapie atte a ridurre le complicanze renali e sistemiche. Tuttavia, è necessario che la sua validità come biomarcatore sia valutata in una più grande coorte di pazienti (anche attraverso studi multicentrici) e misurata possibilmente a livello del tessuto renale.

Inoltre, le proteine identificate dall'analisi proteomica, potrebbero aiutarci a migliorare le nostre conoscenze sui meccanismi fisiopatologici alla base di questa malattia.

## ABSTRACT

Medullary sponge kidney (MSK) disease is a rare kidney malformation typically associated with nephrocalcinosis and nephrolithiasis, urinary acidification and concentration defects, and cystic anomalies in the precalyceal ducts.

Although rare in the general population (prevalence of ~5 cases per 10,000–100,000 in the general population) is relatively frequent in renal stone formers, reaching a high degree of association in some published medical records (20%). It has been also linked to developmental disorders (e.g., congenital hemihypertrophy and Beckwith-Wiedemann syndrome) and kidney developmental anomalies (e.g., horseshoe kidney, unilateral renal aplasia, contralateral congenital small kidney).

Although MSK was first described in 1938, its pathogenesis is elusive and ranges from abnormal developmental and genetic mechanisms to an acquired condition secondary to obstruction of the collecting ducts by calcium crystals. Moreover, MSK disease occurrence in childhood and its relationship with systemic congenital malformations support the hypothesis of an inherited condition.

Because of its high spatial resolution, i.v. urography represented the gold standard for diagnosing MSK disease, but unfortunately this test has been almost completely replaced by spiral computed tomography (CT) (with no i.v. contrast medium). This has led to fewer and fewer cases of MSK being diagnosed because spiral CT cannot disclose the typical MSK ‘cysts’ and, in cases of nephrocalcinosis, it is often unable to reveal its spotty distribution.

This reveals the necessity to identify MSK disease molecular biomarkers that could help clinicians to easily identify patients with this disease and to start preventive therapies to minimize renal and systemic complications.

Therefore, in our research project, a urinary proteomic highthroughput methodology was used for the first time to identify new biological elements involved in the pathophysiology of MSK disease and to select specific MSK disease-associated proteins that, in future, whether validated in a large cohort, could represent valuable new diagnostic disease biomarkers for use in daily

clinical practice. This will represent a significant step forward beyond current state of the art.

We have collected second morning urine from 22 patients with MSK and 22 patients affected by idiopathic calcium nephrolithiasis (ICN) as controls. Notably, two patients with ICN presented cysts.

In the discovery phase, the urine of 11 MSK and 10 ICN, were randomly selected, processed, and analyzed by mass spectrometry.

A total of 1529 proteins were identified by mass spectrometry analysis, and 884 (58%) overlapped the 2 study groups. Instead, 249 proteins (16%) and 396 (26%) were exclusive for ICN and MSK disease, respectively.

To better describe differences between the 2 cohorts of patients and to restrict the number of MSK disease-associated proteins, we used a volcano plot and receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis. The 2 methods revealed that 328 and 44 proteins, respectively, were specific for MSK disease. Interestingly, then, 119 proteins differentiated patients with cysts (a group including all MSK disease +2 ICN patients with renal cysts) from ICN patients without cysts. In particular, a total of 22 and 15 proteins were simultaneously up-regulated or down-regulated in the comparisons between MSK disease versus ICN and cysts versus no cysts. Sixteen proteins were common in the 3 methods.

To have another classification method to establish the priority and relevance of proteins and to further reduce the choice of the highlighted potential biomarkers identified by means of statistical analysis, we also used a Support Vector Machine. Five proteins have been consistently selected by all 4 methods: glypican-1 (GPC-1), plexin domain-containing protein 1 (PLXDC-1), beta-hexosaminidase (HEXA), epididymis-specific alpha-mannosidase (MAN2B2) e laminin subunit alpha 2 (LAMA-2).

This last protein was the most significant biomarker identified by the 4 methods reaching the higher rank by a Support Vector Machine, a binary classification/prediction scheme.

LAMA-2 is a well-described subunit of laminin, a family of at least 15  $\alpha\beta\gamma$  heterotrimeric proteins of extracellular matrix, that represents a major

component of the basement membrane. As reported in the literature, laminin may have a role in cyst formation and growth.

ELISA for LAMA-2 in the entire cohort of patients, validated proteomic results.

In conclusion, our results revealed for the first time that urinary proteome was able to clearly differentiate MSK from ICN and that laminin-2, a protein centrally involved in extracellular matrix reassembly, could be a candidate biomarker of the disease.

## INDICE

<b>SOMMARIO</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>10</b>
Il rene midollare a spugna.....	10
Patogenesi.....	11
Manifestazioni cliniche.....	14
Concomitanza con altre patologie.....	15
Terapie.....	17
Diagnosi.....	17
La proteomica urinaria.....	21
La spettrometria di massa.....	22
Gli ionizzatori.....	23
Gli analizzatori.....	24
Analizzatori quadrupolo.....	25
Analizzatori a trappola ionica (ION TRAP).....	25
Analizzatori a Tempo di Volo (TOF).....	26
Analizzatori a trasformata di Fourier.....	26
Spettrometri di massa tandem.....	30
Collision-induced dissociation (CID).....	30
Electron capture dissociation (ECD).....	30
Electron transfer dissociation (ETD).....	31
Quantificazione delle proteine.....	31
<b>SCOPI DELLA TESI</b> .....	<b>32</b>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>33</b>
Pazienti.....	33
Raccolta delle urine.....	34
Preparazione dei campioni di urine per spettrometria di massa.....	34
Settaggio dello spettrometro di massa.....	35
Analisi dei dati.....	36
Validazione dei dati con test ELISA.....	37

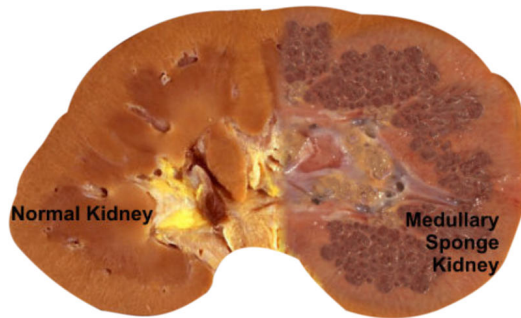


Analisi statistiche e bioinformatiche.....	37
<b>RISULTATI.....</b>	<b>40</b>
Lo Hierarchical clustering tramite multidimensional scaling e correlogramma di Spearman sono in grado di discriminare MSK da ICN sulla base del loro profilo proteomico urinario.....	40
Ruolo biologico delle proteine discriminanti rilevato tramite analisi funzionale.....	46
I test ELISA confermavano i risultati di spettrometria di massa.....	49
<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>52</b>
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>58</b>

## INTRODUZIONE

### Il rene midollare a spugna

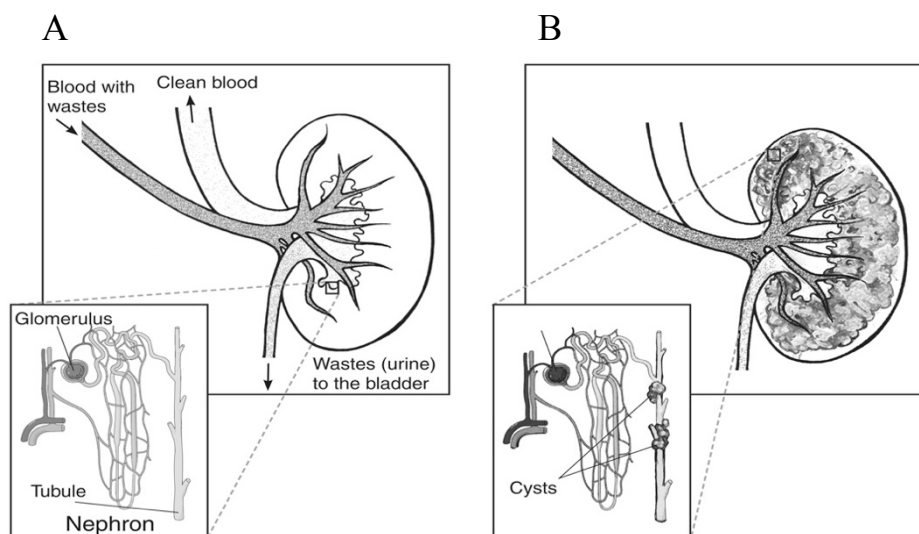
Il rene midollare a spugna (o *Medullary Sponge Kidney*, MSK) è una malformazione renale, caratterizzata da modificazioni ectasiche e cistiche dei dotti collettori della porzione midollare delle piramidi renali [1], che assumono una forma simile a quella delle spugne dopo essere state strizzate e da cui deriva la sua denominazione (**Figura 1**). La patologia è stata individuata e descritta per la prima volta in Italia da Leonarduzzi nel 1939 e successivamente approfondita da Cacchi e Ricci nel 1948 [2].



**FIGURA 1.** Differenza nella conformazione di un rene normale e rene midollare a spugna (kidneystones.uchicago.edu).

Queste alterazioni a livello anatomico inducono un elevato rischio clinico di sviluppare nefrocalcinosi, calcoli renali, alterazioni nell'acidificazione e concentrazione urinaria, anomalie cistiche dei dotti precaliceali, possibilità di predisposizione allo sviluppo di infezioni urinarie e un moderato rischio di deficit della funzione renale [3].

Dal punto di vista anatomico nel rene di un paziente affetto da MSK i vari dotti collettori sono nettamente dilatati e caratterizzati dalla presenza di cisti (**Figura 2**).



**FIGURA 2. Confronto tra un rene sano (A) e un rene con midollare a spugna (B).** Nel rene con MSK (B) la maggior parte del tessuto appare poroso, come una spugna. L'inserto mostra strutture tubulari con aree ectasiche e cistiche ben evidenti al microscopio ottico (<https://www.niddk.nih.gov>).

## Patogenesi

Sebbene la sua prevalenza nella popolazione generale non sia nota con esattezza (~ 5 casi su 10,000-100,00 soggetti nella popolazione generale), MSK è stato diagnosticato nel 20% dei pazienti con calcoli renali ricorrenti [3].

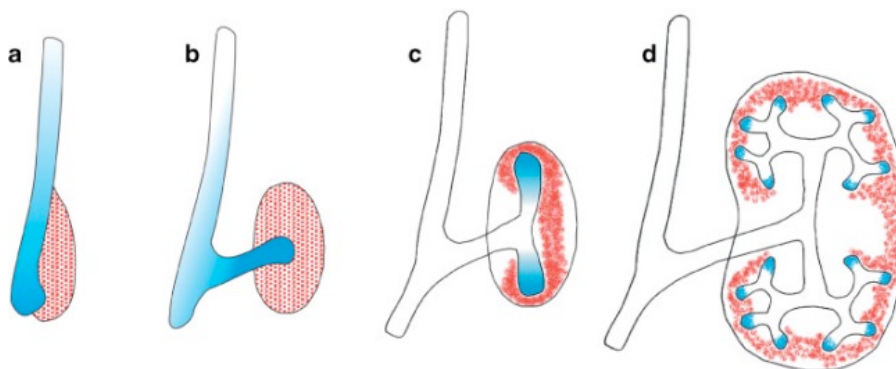
La sua patogenesi non è del tutto chiara e le ipotesi comprendono disturbi genetici, sviluppo anomalo congenito dei tubuli renali, condizioni acquisite di ostruzione dei dotti collettori da parte dei cristalli di calcio, o manifestazioni renali che potrebbero essere l'espressione di una condizione di iperparatiroidismo primario [4].

La maggior parte degli autori concorda con l'ipotesi che si tratti di una patologia congenita con espressione ritardata. Infatti, numerose osservazioni suggeriscono che alla base di MSK ci sia una componente genetica:

l'appartenenza di MSK al gruppo delle patologie malformative, la sua associazione con altre malattie ereditarie, la presenza in bambini di due anni di età [4], la presenza di casi familiari dove la malattia sembra essere trasmessa come carattere autosomico dominante [5].

In aggiunta nel 2000 la descrizione del caso clinico di una donna con neoplasie endocrine multiple, MSK e una mutazione nel protooncogene rearranged during transfection (RET) [6] ha indicato un possibile ruolo di questa mutazione nell'insorgenza di MSK.

RET e il suo ligando, glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), sono fondamentali nello sviluppo embrionale del rene. La sintesi del GDNF da parte del blastema metanefrico, infatti, stimola la formazione della gemma ureterica dal dotto mesonefrico di Wolff (**Figura 3**) [7].



**FIGURA 3. Espressione di RET (in blu) e GDNF (in rosso) durante il normale sviluppo del rene e dell'uretere.** (a) Ret è espresso nel dotto di Wolff e GDNF in un'ampia regione dell'adiacente mesenchima; (b) la gemma ureterica cresce ed entra nel blastema metanefrico; (c,d) la gemma ureterale inizia a formare le ramificazioni che daranno origine ai dotti collettori. L'espressione di RET è ristretta all'estremità distale della gemma ureterica e il GDNF è ristretto al mesenchima indifferenziato alla periferia del rene e circonda l'estremità della gemma ureterica [7].

Il legame tra i due è essenziale non solo per la corretta formazione dell'uretere e dei dotti collettori (entrambi derivanti dal dotto di Wolff) ma anche per la corretta formazione del tessuto renale.

In particolare la transizione delle cellule mesenchimali del metanefro, la corretta polarizzazione delle cellule tubulari renali e infine la specializzazione dei diversi segmenti tubulari del nefrone richiedono dei messaggi

differenziativi a partire dall'interfaccia "gemma ureterale/blastema metanefrico" [8].

L'importanza dell'interazione GDNF-RET è stata dimostrata con esperimenti *in vivo* su modelli animali. Gli animali knock-out per GDNF o RET presentavano agenesia o disgenesia dei reni e morivano poco dopo la nascita. I topi con un solo allele nullo in GDNF, invece, mostravano agenesia o disgenesia dei reni solo parziale, sopravvivevano ed erano fertili [9,10].

Sulla base dell'osservazione clinica di Diouf, in un recente lavoro del nostro gruppo di ricerca sono stati sequenziati tutti gli esoni e i confini esone-introne dei geni GDNF e RET in una coorte di 55 pazienti con MSK. I risultati non hanno mostrato mutazioni a carico del gene RET ma hanno identificato 2 varianti rare del gene GDNF in 8 pazienti, nella regione 5'UTR in eterozigosi, in un sito di legame per paired box gene 2 protein (PAX2), che ha un ruolo centrale nella nefrogenesi [11]. Un'alterata risposta di GDNF a PAX2 potrebbe influenzare l'interazione con RET, interrompendo la trasmissione dei messaggi che originano dall'interfaccia tra la gemma ureterale ed il blastema metanefrico con conseguente alterazione nella nefrogenesi e nella polarizzazione e funzionalità delle cellule tubulari. Inoltre gli autori hanno osservato che i pazienti con le varianti del GDNF mostravano un fenotipo clinico più severo rispetto ai pazienti che non avevano la variante del GDNF, caratterizzato da: acidificazione tubulare fortemente disregolata che comportava un pH urinario più alto, più basso livello sierico di potassio, citraturia subnormale, alta calciuria e osteopenia più severa.

E' interessante notare che una regolazione non corretta di GDNF è stata riscontrata anche in altre nefropatie cistiche quali la displasia multicistica renale [12].

Recentemente, Fabris e coll., [13] al fine di dimostrare l'ereditarietà di MSK hanno condotto un'approfondita analisi su 27 famiglie di pazienti con MSK dimostrando una familiarità della malattia nel 50% dei casi analizzati, a ridotta penetranza ed espressività variabile [13] poichè si registrava un progressivo attenuamento del quadro clinico della patologia dai probandi ai familiari con anomalie renali bilaterali, unilaterali fino ai non affetti.

Tutte queste osservazioni supportano l'esistenza di forme di MSK genetiche accanto a forme non genetiche o, forse, causate dall'influenza di uno o più geni recessivi.

### **Manifestazioni cliniche**

MSK colpisce entrambi i sessi e si manifesta negli adulti tra i 20 e i 40 anni [2]. Nei rari casi in cui si manifesta nei bambini, il quadro clinico è quello tipico della acidosi tubulare renale distale (dRTA): ritardi nella crescita, bassa statura e sintomi di rachitismo [14,15].

MSK è tipicamente diagnosticato in pazienti con calcoli renali ricorrenti. Infatti, la formazione di calcoli di fosfato di calcio e/o di ossalato di calcio è la prima manifestazione clinica in questi pazienti ed è causata dalla coesistenza dei seguenti fattori: ipercalciuria, elevato pH urinario, ipocitraturia, stasi urinaria nei dotti papillari ectasici [16].

Il peggioramento della nefrocalcinosi (fino a quadri di vera e propria nefrolitiasi) può causare anche pielonefriti. La pielonefrite è molto comune in pazienti con MSK, facilitata dal ristagno delle urine nei tubuli prepapillari dilatati e dagli stessi calcoli. Infatti, in alcuni pazienti può essere il primo segno clinico di MSK [17].

L'ipercalciuria sembra essere in parte dovuta al malassorbimento di calcio da parte dei tubuli renali danneggiati e in parte di origine ossea. Infatti molti pazienti mostrano una rilevante osteopenia che può essere contrastata con il trattamento con potassio citrato [18].

A questo si associa l'iperparatiroidismo, frequentemente associato ad MSK e possibile causa della malattia [19]. E' stato suggerito che l'ipercalciuria e la riduzione della densità minerale ossea causerebbero una omeostasi del calcio negativa favorendo la comparsa di iperparatiroidismo [20]. Tuttavia, in molti pazienti l'ipercalciuria, la nefrocalcinosi e la formazione di calcoli renali precedono di molti anni l'insorgenza dell'iperparatiroidismo [21,22].

In alcuni pazienti sono state riscontrate caratteristiche cliniche associate ad un'acidosi tubulare distale renale (dRTA) incompleta. La dRTA è una

malattia genetica caratterizzata clinicamente da un pH urinario >5.5, ipercalcuiuria, ipocitraturia, ipercaluria, ipercloremia, acidosi metabolica da gap anionico ipokaliemico e test di funzionalità renale nella norma.

Osther e coll., [23] hanno dimostrato che difetti nell'acidificazione renale distale svolgono un ruolo decisivo nello sviluppo di ipercalcuiuria in pazienti con MSK e che hanno un forte impatto sulla mineralizzazione dell'osso e sul rischio di formazione di calcoli a livello urinario [18,22].

In alcuni pazienti è stata riscontrata anche proteinuria a basso peso molecolare oltre ad un basso livello di fosfato nel plasma.

La microematuria e la macroematuria sono abbastanza frequenti ma generalmente associati al passaggio dei calcoli, sebbene siano stati registrati anche casi di ematuria persistente apparentemente non associata alla nefrolitiasi.

Seppur raramente, è stato rivelato in alcuni pazienti un decorso doloroso della patologia che non è necessariamente associato con il passaggio di calcoli o con la macro-ematuria. Pertanto, quando il dolore a livello lombare diviene lancinante ed intrattabile e non si irradia a livello inguinale, potrebbe ricordare la '*loin-pain hematuria syndrome*'. Fortunatamente si tratta di casi meno frequenti, che possono essere alleviati da trattamenti preventivi che favoriscono la riduzione del dolore.

L'insorgenza di insufficienza renale è molto rara e riscontrabile nei rari casi di ipoplasia renale [21] o di calcoli di struvite e/o pielonefriti [24,25].

### **Concomitanza con altre patologie**

MSK può verificarsi in associazione con anomalie dello sviluppo renale e tumori (tumore di Wilms), rene a ferro di cavallo, rene piccolo congenito controlaterale e, occasionalmente, con anomalie pelo-ureterali [21,26]. Le più importanti di queste patologie sono la sindrome di Beckwith-Wiedemann (una sindrome caratterizzata da macroglossia, onfalocele, anomalie ombelicali, anomalie della parete addominale alla nascita e che presenta il

rischio di sviluppare neoplasie quali carcinoma surrenalico, tumore di Wilms, epatoblastoma, rabdiomiosarcoma) [4,27-29] e l'emi-iperetrofia congenita. Quando MSK è associato al tumore di Wilms, in genere avviene nel contesto dell'emipertrofia/sindrome di Beckwith-Wiedemann. Circa uno su otto pazienti con sindrome di Beckwith-Wiedemann presentano emipertrofia. In una popolazione pediatrica con questa sindrome, nel 22% dei pazienti è stata riscontrata ipercalcemia e la maggior parte dei pazienti aveva nefrocalcolosi (e, probabilmente, MSK) [30]. Chesney e coll. hanno quindi suggerito che MSK ed emipertrofia rappresentano una sottile forma di sindrome di Beckwith-Wiedemann [29]. Ci sarebbe quindi una possibile associazione tra MSK, Wilm's tumor, e l'emipertrofia/sindrome di Beckwith-Wiedemann. Queste ultime sono associate a mutazioni nel cromosoma 11p15 [31], mentre il tumore di Wilms è associato ad alterazioni nel gene WT-1 nel cromosoma 11p13. Poiché i due loci sono molto vicini, è stato ipotizzato che le tre patologie possano dipendere da alterazioni che avvengono a livello del cromosoma 11p, determinando il cosiddetto fenotipo da "sindrome da geni contigui" [2].

Altre condizioni cliniche associate a MSK comprendono le dilatazioni congenite intraepatiche dei dotti biliari e la fibrosi epatica (malattia di Caroli), nonché il rene policistico nella sua forma autosomica dominante (ADPKD) [32,33].

RET e GDNF svolgono un ruolo anche nello sviluppo del sistema nervoso centrale, del cuore e dello scheletro craniofacciale [34]. Pertanto, pazienti affetti da MSK potrebbero manifestare anomalie anche in questi organi. Ria e coll., [35] hanno dimostrato una effettiva correlazione tra pazienti con MSK ed anomalie a livello del sistema nervoso centrale, del cuore e dello scheletro craniofacciale supportando l'ipotesi di un'alterazione genetica a livello dell'asse RET-GDNF. Pertanto, MSK sembra essere sempre più una patologia sistemica, e l'identificazione di difetti dello sviluppo potrebbe indurre facilmente il sospetto di MSK in coloro che formano calcoli renali [35].



## Terapie

Malgrado non ci sia ancora uno specifico trattamento per MSK e nonostante la difficoltà di ottenere una corretta diagnosi, riconoscere MSK nei casi di calcolosi recidivante è certamente utile per introdurre un trattamento che ne prevenga la formazione.

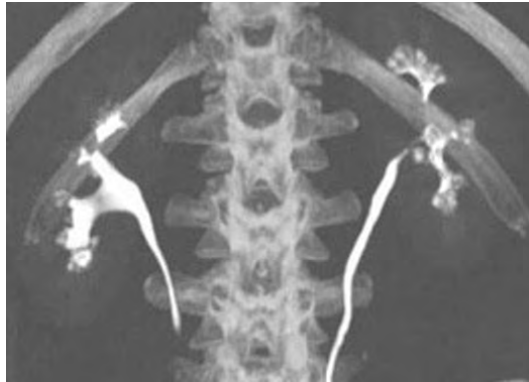
Data la frequente osservazione di ipercalciuria ed ipocitraturia nei casi di MSK, il trattamento con citrato di potassio è indicato per ridurre la calciuria e la litiasi, come pure per rallentare la perdita di massa minerale ossea dei pazienti [18].

Recenti linee guida raccomandano la somministrazione orale di citrato di potassio (2–4 g al giorno). Si inizia con 2 g al giorno e gradualmente si aumenta la dose nei pazienti che non riescono a raggiungere il livello di citraturia target di 450 mg/24 h, aggiungendo 1 g per volta [22]. Sono altresì raccomandate altre misure profilattiche, come ad esempio aumento del consumo di acqua, riduzione di sodio e proteine animali nella dieta, aumento del consumo di frutta e verdura. Inoltre, ai pazienti che continuano a formare calcoli o avere ipercalciuria, nonostante abbiano ricevuto una dose massimale di citrato alcalino, viene somministrato il diuretico tiazidico.

In alcuni pazienti con MSK e formazione ricorrente sintomatica di calcoli, si rende necessario un approccio chirurgico urologico (litotrissia, approccio endouroscopico e approccio percutaneo).

## Diagnosi

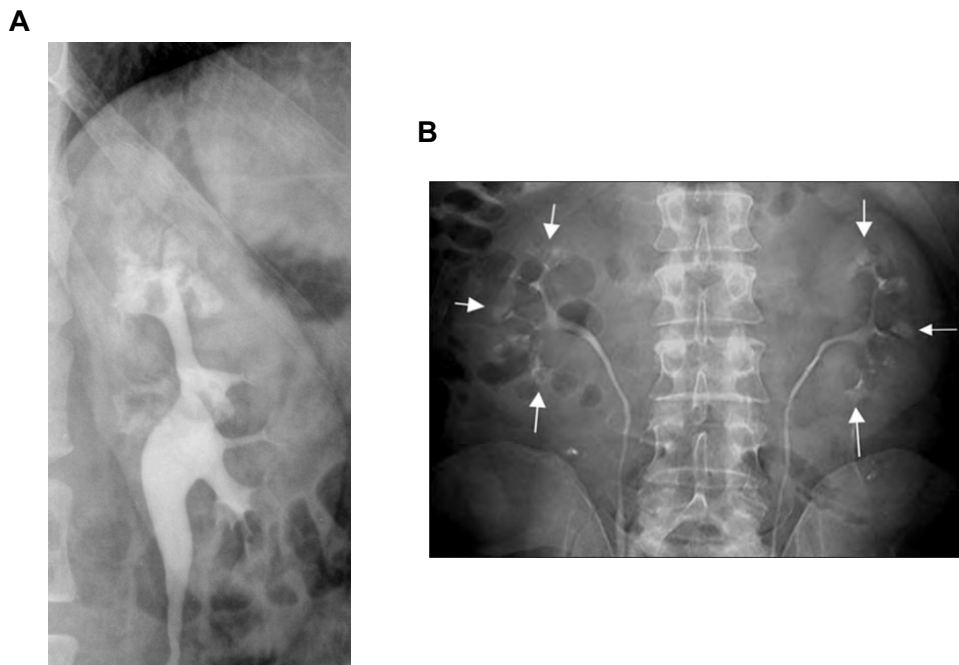
La diagnosi di MSK è radiografica e l'urografia con mezzo di contrasto è l'indagine di riferimento. I quadri tipici sono rappresentati da piccole raccolte di mezzo di contrasto che ristagna nei tubuli precaliceali ectasici (**Figura 4**), con aspetto di spruzzi (blush) nei casi più lievi, o di striature lineari o, quando le dilatazioni sono quasi vere e proprie cisti, con la classica manifestazione di un bouquet di fiori.



**FIGURA 4.** TC ad alta risoluzione di MSK. L'immagine dei reni mostra nella parte sinistra tipici dotti pre-papillari dilatati con cisti in un normale calice superiore [3].

Il quadro radiologico è fondamentale per comprendere la severità della patologia (numero di coliche renali sintomatiche, numero di ammissioni ospedaliere e procedure richieste) [36].

MSK tipicamente coinvolge le papille renali bilateralmente, ma può presentarsi unilateralmente o interessare poche papille renali (**Figura 5**).



**FIGURA 5.** (A) Caso di MSK parziale relativo soltanto alle papille superiori del rene sinistro. (B) Immagine urografica di un tipico caso di MSK bilaterale. Blush e striature lineari sono presenti in tutte le papille.

Questi risultati radiografici in associazione con nefrolitiasi, nefrocalcinosi e cisti midollari consentono di diagnosticare MSK. Nonostante la combinazione di tali risultati sia già indice di patologia, altre cause eziologiche come cisti midollari, ematuria, calcoli e calcinosi devono essere ugualmente prese in considerazione.

Negli ultimi anni però si è diffusa una tendenza a ridurre l'impiego dell'urografia a seguito dell'introduzione di indagini che richiedono basse concentrazioni o assenza di mezzo di contrasto quali: ecografia, tomografia computerizzata (TAC spirale), risonanza magnetica.

Questo si è tradotto in una riduzione del numero di casi di MSK diagnosticati. Infatti l'ecografia renale, a differenza dell'urografia, non consente di mettere in evidenza i reperti tipici e patognomonicici di questa condizione [37]. L'ecografia evidenzia solo l'iperecogenicità midollare dovuta prevalentemente alla nefrocalcinosi, che non è sempre presente, per cui si tratta di un segno aspecifico [38].

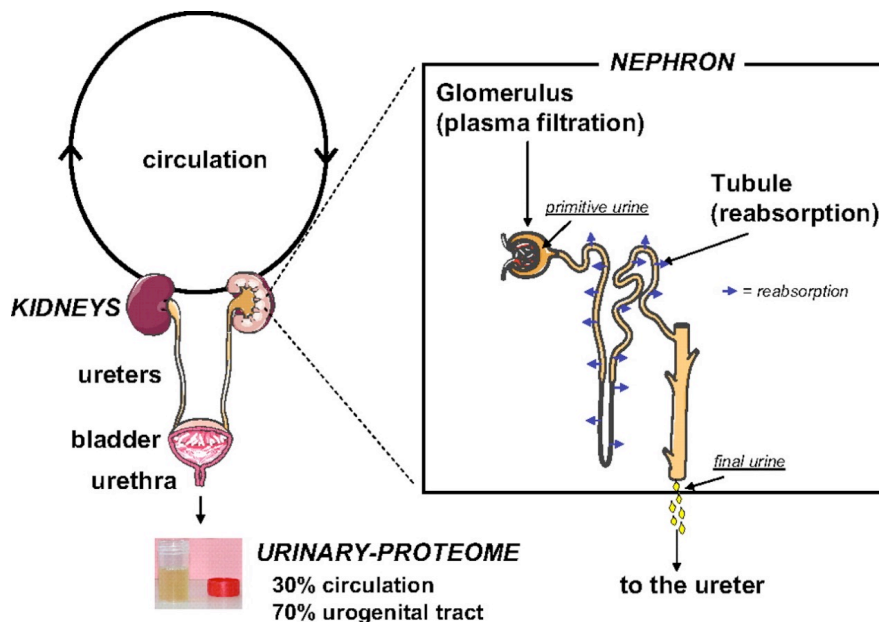
Per quanto riguarda la TAC, la sua sensibilità è discretamente inferiore a quella dell'urografia poiché anche nei casi più conclamati di questa patologia, può solo mostrare immagini che suggeriscono l'MSK. Infatti, sebbene la TAC possa rivelare le più evidenti dilatazioni cistiche dei dotti collettori prepapillari, sfortunatamente né la TAC basale né l'uro-TAC (differentemente dall'urografia) hanno un'alta risoluzione spaziale necessaria per rivelare la forma più comune di MSK, caratterizzata da dotti dilatati e piccole cisti. Nella migliore delle ipotesi, la TAC è unicamente in grado di indurre il sospetto di MSK rilevando la presenza di piccoli calcoli di calcio distribuiti nella porzione midollare del parenchima renale [3].

Pertanto il rischio che l'MSK possa essere sempre meno diagnosticata genera la necessità di introdurre specifici biomarker diagnostici e clinici. L'introduzione di nuovi biomarker potrebbe aiutare i medici ad identificare precocemente i pazienti con questa patologia e ad iniziare terapie atte a ridurre le complicanze renali e sistemiche.

## La proteomica urinaria

La proteomica urinaria è sicuramente tra i più importanti strumenti per la ricerca di biomarcatori. L'urina, infatti, rispetto ad altri fluidi biologici, può essere raccolta in grande quantità, mediante procedure non invasive e la sua composizione proteica risulta piuttosto stabile.

Un'altra caratteristica importante delle proteine urinarie è la sua composizione: circa il 30% deriva dal plasma e il 70% dai reni e dalle vie urinarie [39] (**Figura 6**). Pertanto le urine possono fornire informazioni non solo sul rene ma anche su organi distanti attraverso il plasma.



**FIGURA 6. Origine delle proteine presenti nelle urine.** Il 70% delle proteine e dei peptidi presenti nelle urine derivano dai reni e dalle vie urinarie mentre il restante 30% derivano dal circolo. Circa 900 litri di plasma attraversano i reni ogni giorno. 150–180 litri di questo plasma sono filtrati dai glomeruli (urina primitiva). Più del 90% di questa urina primitiva viene riassorbito a livello tubulare. L'urina finale attraverso l'uretere va in vescica [39].

Le proteine plasmatiche sono soggette a un processo selettivo di ultrafiltrazione in base alla loro dimensione, carica ionica e configurazione [40,41]. Alcuni studi effettuati agli inizi degli anni '80, hanno dimostrato che le proteine con massa molecolare fino a 67 kDa vengono facilmente filtrate a livello glomerulare. Tuttavia, in alcuni casi, la loro carica anionica ne limita

il passaggio, a causa della repulsione svolta da parte della membrana basale glomerulare. Tale fenomeno, è definito *selettività renale* e consente alle proteine di dimensioni <45 kDa di essere facilmente filtrate ed escrete, mentre per quanto riguarda le molecole più grandi, la carica cationica rende il passaggio più agevole rispetto alla carica anionica [42].

La spettrometria di massa è diventata il principale metodo per l'analisi della produzione e funzione delle proteine in sistemi biologici e per la ricerca di biomarcatori [43].

## LA SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che consente di determinare la composizione qualitativa e quantitativa di una miscela di analiti sulla base del loro diverso rapporto massa/carica ( $m/z$ ) [44]. Gli analiti vengono ionizzati e separati con l'impiego di un campo elettrico o magnetico all'interno dello strumento. Perché sia efficace la separazione deve avvenire sotto vuoto per evitare che vi sia collisione tra le particelle ioniche sottoposte ad accelerazione e le molecole di aria [45].

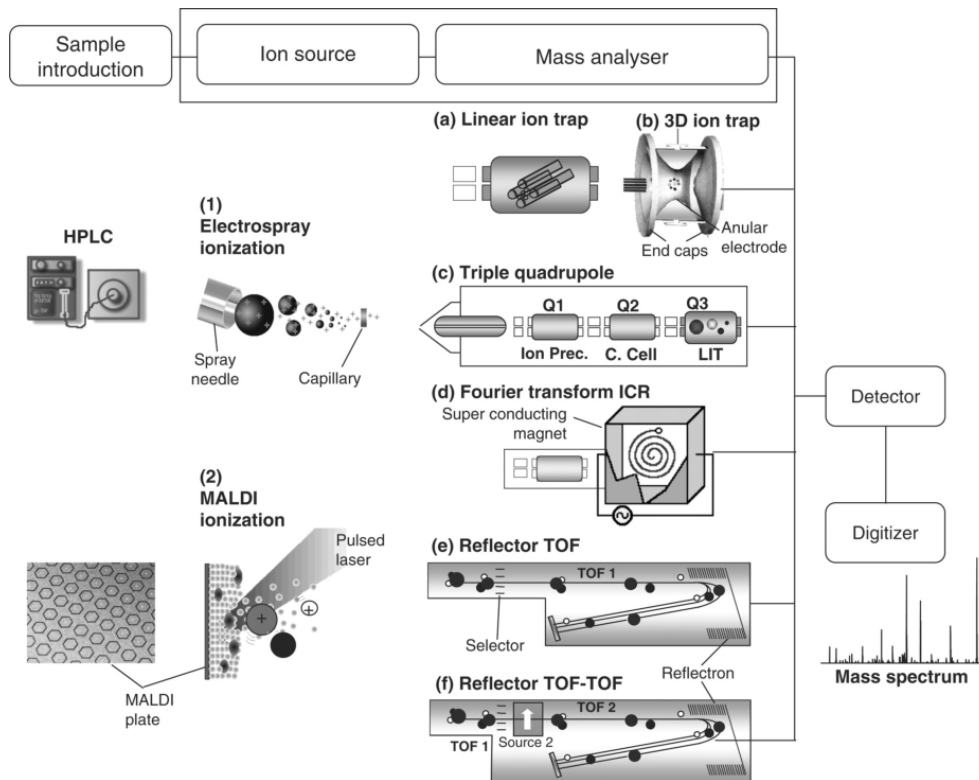
Tutti gli spettrometri di massa comprendono 3 componenti (**Figura7**):

- una camera di ionizzazione o sorgente ionica;
- un analizzatore di massa,
- un rivelatore.

Nella camera di ionizzazione gli analiti sono sottoposti a ionizzazione. Gli ioni così prodotti vengono poi separati in base al loro rapporto massa/carica nell'analizzatore raggiungendo poi il rivelatore, il quale mediante l'emissione secondaria di elettroni genera un segnale elettrico che viene amplificato e registrato per produrre uno spettro di massa. Uno spettro di massa è quindi un plot dell'abbondanza relativa di ioni rispetto al loro  $m/z$  [46].

Il computer genera poi una lista dei peptidi generati dalla frammentazione che viene confrontata con le banche dati disponibili in rete. In particolare il confronto viene fatto tra la massa di frammenti ottenuti in vitro e la massa di

frammenti peptidici ottenuti dalla digestione in silico di tutte le proteine presenti in banca dati [43].



**FIGURA 7. Principali componenti di uno spettrometro di massa:** sistema di introduzione del campione, sorgente di ioni, analizzatore di massa e detector. Le sorgenti di ionizzazione più comunemente utilizzate per la proteomica sono: electrospray (ESI, 1) e matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI, 2). Gli analizzatori più diffusi sono: a) trappola ionica (a) lineare e (b) tridimensionale; (c) triplo quadrupolo; (d) a trasformata di Fourier a risonanza ciclotronica; (e) e (f) time-of-flight (TOF). Gli analizzatori a trappola ionica e quadrupolo sono generalmente accoppiati alla sorgente di ioni electrospray mentre gli analizzatori TOF sono accoppiati con le sorgenti MALDI, sebbene siano disponibili anche sistemi ibridi (per es. ESI-TOF e MALDI-QqTOF) [45].

## Gli ionizzatori

La ionizzazione può essere ottenuta mediante espulsione di elettroni, protonazione, cationizzazione o deprotonazione. Le tecniche per ottenerla sono:

- Ionizzazione per interazione elettronica (*Electron Impact ionization*, EI)
- Ionizzazione per desorbimento con laser assistita da matrice (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI)
- Ionizzazione elettrospray (*ElectroSpray Ionization*, ESI).
- Ionizzazione chimica (*Chemical Ionization*, CI)
- Ionizzazione chimica a pressione atmosferica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI)

La Ionizzazione per interazione elettronica è stata la prima sorgente di ionizzazione sviluppata prima del 1980 ed è limitata a piccole molecole molto al di sotto del range di peso molecolare dei comuni composti organici. Questo ha spinto gli scienziati a sviluppare nuovi metodi tra cui la fast atom/ion bombardment (FAB), MALDI, ed ESI. MALDI ed ESI sono attualmente i metodi più utilizzati nella spettrometria di massa biomolecolare poiché offrono un ampio range di massa molecolare e alta sensibilità [43,47,48].

### MALDI

La tecnologia MALDI si basa sull'utilizzo di una matrice in grado di assorbire i raggi UV. La matrice e il campione sono mescolati in un appropriato solvente. Il solvente viene fatto evaporare e questo permette di ottenere molecole di analiti co-cristallizzate nella matrice. Il campione così ottenuto viene posto nella macchina sotto vuoto spinto colpito dai raggi UV la matrice in parte evapora trascinando le molecole di analita in fase gassosa [49].

## ESI

Nell'ESI energia ad alta tensione è applicata a un liquido che scorre attraverso un capillare sottile, si genera uno "spray elettrico" composto di piccole goccioline cariche (< 10 micron di diametro).

Queste goccioline evaporano molto rapidamente fino a che il numero di cariche sulla loro superficie diventa molto alto ed esplodono diventano micro goccioline ancora più piccole. Questo processo viene ripetuto più volte fino a che gli analiti ionizzabili presenti in soluzione fuoriescono dalle goccioline, passano attraverso un capillare riscaldato e raggiungono l'analizzatore [45].

La tecnica ESI ionizza gli analiti in soluzione ed è quindi accoppiata ad una tecnica di separazione in fase liquida (quale ad esempio cromatografica o elettroforetica) [43].

## Gli analizzatori

Esistono quattro tipologie di analizzatori correntemente utilizzati, anche combinati tra loro in tandem: quadrupolo, trappola ionica (*Ion Trap*), tempo-di-volo (*Time Of Flight*, TOF), ed analizzatori che lavorano mediante trasformata di Fourier di segnali complessi in radiofrequenza (*Fourier Transform–Mass Spectrometry*, FT-MS). Gli strumenti composti da due o più analizzatori accoppiati sono definiti come spettrometri di massa tandem (MS/MS).

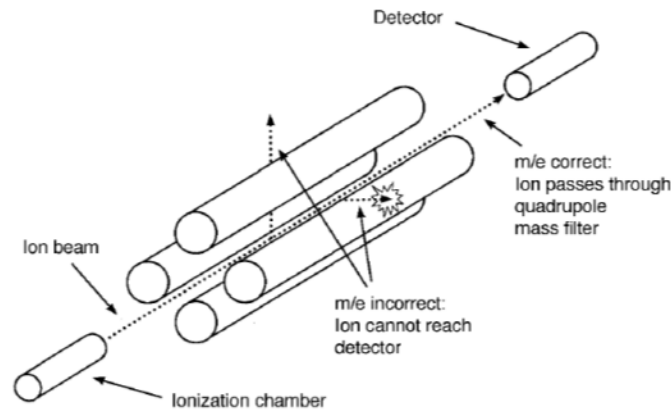
### ANALIZZATORI QUADRUPOLO

Gli analizzatori di massa a quadrupolo sono spesso impiegati negli spettrometri di massa da banco per il loro basso costo, design compatto, lunga durata e affidabilità [46].

Questo analizzatore è costituito da 4 barre cilindriche in parallelo a cui vengono applicati tensione a corrente continua (DC) e tensione alternata a radiofrequenza (RF). L'alternanza di questi potenziali fa sì che gli ioni oscillino attraversando tutto il quadrupolo (**Figura 8**) [50]. A seconda dei potenziali applicati, solo gli ioni con un certo  $m/z$  avranno traiettoria stabile



e raggiungeranno il detector, mentre quelli con traiettoria instabile si scontreranno con le barre metalliche e saranno filtrati [51].



**FIGURA 8. Analizzatore a quadrupolo [50].**

#### ANALIZZATORI A TRAPPOLA IONICA (ION TRAP)

L'analizzatore a trappola ionica riprende l'analizzatore quadrupolare [46] e può essere in 2D (sviluppato più di recente) o in 3D. La trappola ionica 3D è sostanzialmente un quadrupolo in tre dimensioni: ha un elettrodo circolare e due elettrodi ellittici alle sue estremità. Applicando una radiofrequenza oscillante e un campo elettrico a corrente continua, gli ioni sono intrappolati tra gli elettrodi. Gli ioni di diverso  $m/z$  sono poi selettivamente espulsi dalla trappola per raggiungere il detector cambiando il potenziale di radiofrequenza [46]. Le trappole in 2D, o trappole ioniche lineari, sono l'equivalente dei quadrupoli ma il potenziale è applicato a ogni estremità del quadrupolo al fine di intrappolare gli ioni al suo interno. Gli ioni vengono così intrappolati in un volume cilindrico considerevolmente più grande dei 2D, aumentando così la sensibilità, risoluzione e accuratezza. Successivamente gli ioni possono essere espulsi selettivamente [43,46].

### ANALIZZATORI A TEMPO DI VOLO (*TIME-OF-FLIGHT*, TOF)

L'analizzatore a tempo di volo (TOF) usa un campo elettrico per accelerare fasce di ioni in fase gassosa verso il detector. Esso è costituito da un tubo di volo. Gli ioni, accelerati con uguale energia, voleranno attraverso il tubo di volo con diverse velocità che sono inversamente proporzionale alla loro massa [52].

Il  $m/z$  di uno ione determinerà quanto tempo impiegherà per viaggiare dalla sorgente al detector. In particolare, gli ioni con basso  $m/z$  viaggeranno più velocemente rispetto agli ioni con alto  $m/z$ . Gli analizzatori TOF moderni comprendono anche un reflectron (riflettore elettrostatico) che respinge gli ioni prima che arrivino al detector [53]. Gli ioni che giungono con maggiore energia cinetica entrano più in profondità nel riflettore. Questo consente di correggere le differenze di energia cinetica iniziale degli ioni che possono verificarsi durante l'accelerazione, in modo tale che ioni con uguale massa ma energia diversa arrivino al detector nello stesso momento [54].

### ANALIZZATORI A TRASFORMATA DI FOURIER

Gli analizzatori a trasformata di Fourier possono essere a risonanza ionica ciclotronica (FT-ICR) o Orbitrap.

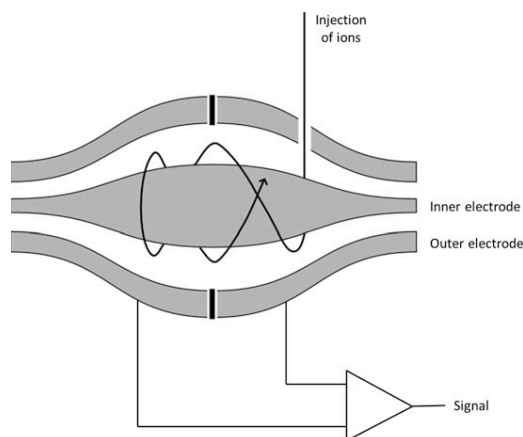
FT-ICR determinano il rapporto  $m/z$  misurando la frequenza di risonanza ciclotronica di ioni in un campo magnetico statico [55]. Gli ioni vengono prima introdotti in una trappola di Penning, uno strumento simile alla trappola ionica 3D che usa però un campo magnetico anziché un campo elettrico per intrappolare gli ioni. Questi una volta introdotti, oscillano con una frequenza (frequenza ciclotronica) inversamente proporzionale al rapporto  $m/z$  e direttamente proporzionale all'intensità del campo magnetico. Successivamente viene inviato un impulso radiofrequenza sufficientemente ampio da coprire l'intervallo delle diverse frequenze ciclotroniche dei diversi ioni che si muovono su orbite più larghe che li permettono di essere detectate [56]. Il detector misura la frequenza ciclotronica di tutti gli ioni nella trappola

e utilizza la trasformata di Fourier per convertire queste frequenze in valori  $m/z$ .

I vantaggi di questi analizzatori risiedono in un'elevata sensibilità, accuratezza e risoluzione, mentre il principale svantaggio consiste nell'essere strumenti che richiedono molto spazio e costosi [46].

L'analizzatore orbitrap è molto simile al FT-ICR poiché utilizza la trasformata di Fourier per convertire un segnale, prodotto da ioni oscillanti in un  $m/z$ . Diversamente dal FT-ICR l'orbitrap utilizza un campo elettrico e non magnetico per indurre queste oscillazioni ioniche [57-59].

Esso è composto da tre parti: un elettrodo interno a forma di fuso ricoperto da due elettrodi esterni concavi separati da un anello sottile di materiale dielettrico (**Figura 9**).



**FIGURA 9.** Vista schematica dell'analizzatore Orbitrap ed esempio di traiettoria ionica stabile [46].

Gli ioni vengono introdotti nell'orbitrap tra gli elettrodi esterni e interno attraverso un buco nell'elettrodo esterno. A causa del campo elettrico gli ioni ruotano attorno all'elettrodo centrale con oscillazioni armoniche lungo il suo asse. La frequenza assiale delle oscillazioni degli ioni in questa traiettoria è proporzionale alla radice quadrata del rapporto  $m/z$ .

Uno dei maggiori vantaggi dell'analizzatore Orbitrap è il suo alto potere risolutivo e l'utilizzo di strumentazioni piccole e che richiedono poca manutenzione [46].

## **Spettrometri di massa tandem**

Gli spettrometri di massa tandem sono composti da due o più analizzatori accoppiati (MS/MS). Quelli più comunemente utilizzati sono composti da tre quadrupoli in tandem (TQ) [60] e quelli in cui il terzo quadrupolo è sostituito da un altro analizzatore come per es. TOF (QqTOF) [61] o una trappola ionica lineare (QqLIT) (figura Mc) [62]. In generale la metodologia consiste nell'isolamento iniziale di ioni settando adeguatamente il voltaggio nel primo quadrupolo, seguito dalla loro frammentazione nel secondo e lo scanning dei frammenti nel terzo quadrupolo.

Un passaggio fondamentale degli spettrometri di massa tandem è la frammentazione degli ioni. Una molecola o un composto di più molecole è ionizzato con sufficiente energia interna per rompersi in diversi frammenti che vengono poi singolarmente identificati e riassemblati per determinare la struttura degli ioni di origine.

### **Collision-induced dissociation (CID)**

In spettrometria di massa la CID costituisce la cella di collisione più utilizzata, consiste in un meccanismo di frammentazione degli ioni in fase gassosa [63,64]. Gli ioni generati in sorgente e accelerati nel vuoto dal potenziale elettrico crescente entrano nella cella di frammentazione dove collidono con molecole neutre gassose (solitamente elio, azoto o argon). Durante questa collisione, una parte dell'energia cinetica verrà convertita in energia interna determinando la rottura di uno o più legami con la frammentazione dello ione [65]. I frammenti vengono poi trasferiti verso l'analizzatore per l'analisi MS/MS.

### **Electron capture dissociation (ECD)**

La dissociazione per cattura di elettroni è un metodo di frammentazione di ioni che si verifica in fase gassosa, basato sulla ricombinazione dissociativa

di molecole polipeptidiche protonate attraverso l'utilizzo di elettroni con bassa energia [66,67].

### **Electron transfer dissociation (ETD)**

Un altro metodo di frammentazione degli ioni si basa sulla dissociazione per trasferimento elettronico [68,69]. Le molecole polipeptidiche protonate vengono messe a contatto con un reagente anionico (utilizzato come donatore di elettroni). Questo cede un elettrone alla molecola proteica con conseguente rottura dei legami N-C $\alpha$  e frammentazione. Questa tecnica può essere applicata quando è necessario caratterizzare le proteine con modifiche post-traduzionali quali fosforilazione, glicosilazione, ecc... poiché questi gruppi chimici non vengono intaccati dalla frammentazione [70].

## **QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE**

L'ultimo step in un esperimento di spettrometria di massa applicato per analisi proteomica è la quantificazione delle proteine identificate.

Le metodiche più utilizzate sono il cosiddetto approccio "Label-free" e la quantificazione proteica relative basata sull'intensità del segnale.

Nell'ambito dell'approccio label-free esistono due diverse strategie:

1. Spectral counting: il conteggio e la comparazione del numero degli spettri dei frammenti corrispondenti ad una data proteina;
2. Peptide chromatographic peak intensity measurements: misurazione e comparazione dei picchi cromatografici degli ioni del peptide precursore che appartengono ad una specifica proteina.

Diversi studi hanno dimostrato che i dati ottenuti con entrambe le strategie correlano con l'abbondanza della proteina in esame nel campione biologico [71,72].

## **SCOPI DELLA TESI**

La patogenesi del Rene Midollare a Spugna (MSK) non è stata ancora totalmente chiarita e, al momento, non vi sono affidabili e standardizzati biomarcatori diagnostici di malattia.

Inoltre la tecnica diagnostica urografica utilizzata storicamente per individuare questa patologia è stata recentemente abbandonata a favore di tecniche meno nefrotossiche basate sull'utilizzo di ridotte concentrazioni o assenza di mezzo di contrasto (come l'ecografia, la TAC spirale e la risonanza magnetica). Queste tecniche però, spesso, non hanno una risoluzione spaziale sufficiente da individuare i reperti tipici e patognomonici di questa condizione clinica.

Pertanto gli scopi di questo studio attraverso una tecnica high-throughput con spettrometria di massa sono stati:

1. Riconoscere un profilo proteomico in grado di discriminare i pazienti con MSK dai pazienti con nefrolitiasi;
2. Individuare nuovi potenziali biomarcatori diagnostici specifici per MSK che possano aiutare i clinici ad identificare precocemente i pazienti affetti da questa patologia evitando la comparsa di complicanze renali e sistemiche;
3. Comprendere meglio, attraverso l'analisi delle proteine identificate, le basi fisiopatologiche di questa patologia rara.

## MATERIALI E METODI

### Pazienti

Sono stati arruolati, dopo firma del consenso informato, 22 pazienti affetti da MSK e 22 pazienti da nefrolitiasi calcica idiopatica (ICN) con simili caratteristiche demografiche (età, sesso e origine geografica) seguiti presso l'UOC di Nefrologia e Dialisi dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona.

I criteri di inclusione per i pazienti MSK erano: interessamento bilaterale della patologia con nefrocalcinosi tipica e/o caratteristiche cisti su almeno due papille per ogni rene. Per la diagnosi di MSK, è stato obbligatorio dimostrare l'ectasia precaliceale papillare tramite le lastre, effettuate almeno 10 minuti dopo l'iniezione del mezzo di contrasto, senza compressione manuale o segni di ostruzione.

Invece, i criteri di inclusione per pazienti arruolati nel gruppo di controllo (ICN) erano: presenza di calcoli di calcio, assenza di disordini endocrini o di altre patologie sistemiche/dismetaboliche; concentrazioni normali di creatinina nel siero e di elettroliti e nessuna evidenza di cisti renali, di nefrocalcinosi, o di nefropatia ostruttiva. Il pH urinario misurato nei campioni di urina della mattina, dopo tutta la notte, doveva essere di 5.5 per escludere un'eventuale acidosi tubulare. Inoltre doveva essere esclusa la patologia MSK [11].

Due pazienti con ICN (ICN con cisti), sebbene non avessero segni clinici e radiologici di MSK, mostravano cisti su entrambi i reni.

Per tutti i pazienti arruolati i dati clinici e di laboratorio sono stati registrati in database elettronici secondo i protocolli clinici dell'UOC di Nefrologia e Dialisi dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona. Lo studio è stato condotto in accordo con la Dichiarazione di Helsinki e approvato dal comitato etico della nostra Azienda Ospedaliera.

### **Raccolta delle urine**

Da tutti i pazienti inclusi nello studio, sono stati raccolti i campioni di urine della seconda minzione del mattino a cui sono stati immediatamente aggiunti gli inibitori delle proteasi. Le urine sono state centrifugate a 1000 g a 4°C per 10 minuti per eliminare i frammenti cellulari ed eventuali detriti in accordo con protocolli standard internazionali (EuroKUP-European Kidney and urine proteomics <http://www.eurokup.org>).

In seguito le urine sono state centrifugate a 17000 g nel rotore JA-20 (Beckman Avanti™ J-25) per 30 minuti a 16°C per rimuovere i sedimenti urinari microscopici. Dopo dosaggio proteico con Bradford, un'aliquota del surnatante (100 µg) è stata dializzata tre volte in una soluzione di 25 mM fosfato di sodio pH 7.4 in membrane di cellulosa 3500 MWCO Spectra/Por® a 4°C al fine di concentrare la frazione proteica, rimuovere i metaboliti, i sali, i detergenti ed altre piccole molecole [73].

Dopo la liofilizzazione le urine sono state conservate a -80°C fino al loro utilizzo.

### **Preparazione dei campioni di urina per spettrometria di massa**

Le urine di 10 MSK e 11 ICN (compresi i due pazienti con cisti), selezionate in maniera random, sono state sottoposte a spettrometria di massa (MS) mediante lo spettrometro di massa linear trap Quadrupole Orbitrap Velos Pro (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

I campioni di urina sono stati solubilizzati in 0.1 ml di 4% SDS, 50mM DTT, e 0.1M Tris/HCl, pH 7.6, a 90°C per 5 minuti, sonicati e processati con la procedura Filter Aided Sample (FASP) utilizzando le colonnine di filtrazione Vivacom da 30k. Questo metodo, attraverso la selezione del giusto filtro, consente di trattenere sostanze ad alto peso molecolare (proteine e DNA) e di permettere il passaggio di molecole a basso peso molecolare (peptidi) [74].

Aliquote da 50 µl sono state miscelate con 0.2 ml di urea 8M in 0.1M Tris/HCl, pH 8.5 (UA solution), caricate sulle apposite colonnine di



filtrazione e centrifugate a 14000g per 15 min. I campioni concentrati sono stati poi diluiti nelle colonnine con soluzione UA e centrifugati di nuovo. Dopo la centrifugazione, i campioni sono stati miscelati con 0.1 ml di 50mM di iodoacetamide nella soluzione UA e incubati al buio a temperatura ambiente per 30 minuti e poi centrifugati per 15 minuti. In seguito, i concentrati sono stati diluiti con 0.2 ml di urea 8M in 0.1M Tris/HCl, pH 8.5 (UB solution), e concentrati di nuovo. Questo step è stato ripetuto per due volte. I campioni sono stati poi diluiti in 120  $\mu$ l di 40 mM NaHCO<sub>3</sub> contenente 1  $\mu$ g di tripsina. Dopo una digestione overnight, i peptidi sono stati raccolti tramite centrifugazione per 20 min e i filtri sono stati lavati con 50 ml 0.5M NaCl e centrifugati in modo da eliminare eventuali interazioni idrofobiche.

#### **Settaggio dello spettrometro di massa**

Lo spettrometro di massa linear trap Quadrupole Orbitrap Velos Pro è stato utilizzato nella modalità di ionizzazione positiva. Singoli scan sono stati effettuati nell'Orbitrap, registrando una finestra di massa compresa tra 350 e 1650 m/z e un tempo di iniezione ionica massimale di 250 ms. La risoluzione è stata settata a 60.000. E' stata utilizzata una calibrazione interna con polidimetilciclosilossano (protonato [Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O]); m/z 445.120025).

Gli esperimenti sono stati effettuati alternando esperimenti di MS e MS/MS. Il segnale minimo di MS per innescare la MS/MS è stato settato a 500 ioni, con un picco del segnale ionico selezionato per MS/MS utilizzando una finestra di isolamento ionico di 2 Da. I valori m/z dei segnali già selezionati per MS/MS sono stati disposti su una exclusion list per 60 secondi utilizzando una finestra di esclusione di  $\pm 10$  ppm. In tutti i casi, è stato registrato 1 microscan. Il processo di *collision-induced dissociation* (CID) è stato attivato con un valore target di 5.000 ioni nella trappola ionica lineare, con un tempo di iniezione ionica massimale di 150 ms, l'energia di collisione normalizzata

al 35%, con un Q value di 0.25, ed un tempo di attivazione di 10 ms. Un massimo di 20 esperimenti MS/MS sono stati indotti per uno scan di MS.

### **Analisi dei dati**

I file grezzi ottenuti dalla spettrometria di massa sono stati processati con il software Thermo Scientific Proteome Discoverer versione 1.3 (Thermo Scientific, Waltham, MA). I picchi ottenuti dalla spettrometria di massa sono stati confrontati con proteoma umano di riferimento ottenuto da Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) con l'ausilio di programmi quali MASCOT e SEQUEST.

Le liste di peptidi ottenute dalle analisi sono state sottoposte ad un controllo dei falsi positivi tramite False Discovery Rate (FDR) utilizzando l'algoritmo 'Percolator', la deviazione dalla massa dei peptidi è stata settata a 10 ppm e ad un minimo di 6 amminoacidi per ogni peptide identificato. I parametri per la ricerca erano la tolleranza di massa per lo ione precursore di 20 ppm, la tolleranza di massa della dissociazione indotta/attivata da collisione era pari a 0.8 Da con una modificazione dinamica di deamidazione, ossidazione e modificazione statica di alchilazione con iodoacetamide. Per tutte le ricerche è stata selezionata l'opzione tripsina con due missed cleavage. Le proteine sono state raggruppate tramite il maximum parsimony rule. L'opzione dell'algoritmo "match between runs" è stata attivata con un match window time di 0.5 minuti e un alignment time window di 20 minuti. La quantificazione *label-free* delle proteine è stata effettuata utilizzando il MaxQuant software.

### **Validazione dati con test ELISA**

La validazione dei risultati di MS dell'intera coorte di pazienti è avvenuta tramite l'impiego del kit ELISA per LAMA-2 (Cloud-Clone Corp., Houston, TX), disponibile in commercio, seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

## Analisi statistiche e bioinformatiche

Per le analisi di spettrometria di massa, l'identità proteica e i dati quantitativi sono stati esportati per successive analisi statistiche e bioinformatiche.

I dati proteici quantitativi label-free sono stati normalizzati in base al volume urinario e per identificare eventuali outlier e differenze tra i campioni sono state applicate analisi di unsupervised hierarchical clustering quali MDS (Multidimensional scaling) e il test di correlazione di Spearman.

Proteine differenzialmente espresse tra MSK e ICN e tra il gruppo di pazienti con cisti e quello senza cisti sono state rilevate utilizzando un test non parametrico U-Mann Whitney. I p value sono stati corretti per test multipli utilizzando il Benjamini Hochberg false discovery rate. Le proteine sono state considerate come differenzialmente espresse tra i due gruppi con un p value  $\leq 0.05$  e un fold change  $\leq -2$  o  $\geq 2$ . Il volcano plot è stato utilizzato per visualizzare rapidamente le differenze statistiche, e le linee di cutoff sono state stabilite tramite la funzione  $y = c / (x - x_0)$  [75]. In caso di confronto tra più gruppi, il Volcano-Plot è l'espressione grafica maggiormente utilizzata che consente una rapida visualizzazione dei risultati, basandosi su test statistici univariati. In queste rappresentazioni grafiche, il log<sub>2</sub> del fold change per ogni proteina/peptide è tracciato rispetto al  $-\log_{10}$  del suo P-value.

In aggiunta, per distinguere accuratamente le due coorti di pazienti è stata costruita una curva ROC per ogni proteina statisticamente significativa presente in almeno il 70% di campioni MSK e ICN. Proteine con area sotto la curva  $\leq 0.5$  sono state escluse.

La *curva ROC (Receiving Operating Characteristic)* offre una visione grafica circa la specificità e sensibilità di un test e ne fornisce una stima della capacità discriminante. Tale tecnica statistica tenta di dimostrare come al variare del *cut-off*, valore di soglia che permette di discriminare i risultati in positivi e negativi, corrisponda una variazione in termini di sensibilità e specificità. La *curva ROC* fornisce anche un'indicazione dell'accuratezza del test. Pertanto, attraverso la costruzione della *curva ROC* e del calcolo dell'area sottesa alla

curva stessa (AUC, Area under the ROC curve), è possibile stimare la probabilità di assegnare una unità statistica al suo reale gruppo di appartenenza.

Successivamente, l'uso di software dedicati permette la semplificazione dei risultati delle analisi [42].

Ancora, per un'ulteriore distinzione tra i due gruppi di pazienti è stata effettuata una Support Vector Machine non lineare per creare così una lista di proteine. Per valutare l'accuratezza di questa lista di proteine è stato applicato un approccio di cross-validazione.

Per l'analisi delle pathway è stato usato il software Cytoscape. La lista di proteine identificate è stata caricata su software per effettuare l'analisi di enrichment dei processi biologici in cui rientrano le proteine individuate in accordo con le annotazioni in Gene Ontology. I processi biologici dei due gruppi di pazienti con almeno il 20% di geni associati e un pvalue <0.05 dopo FDR sono state considerate statisticamente significative.

Analisi statistiche sono state effettuate utilizzando R-software. Il software *Cytoscape* è stato utilizzato per analisi di pathway. Le proteine urinarie significativamente iperspresse nel gruppo di pazienti MSK sono state utilizzate per le successive analisi di validazione in una popolazione indipendente di pazienti.

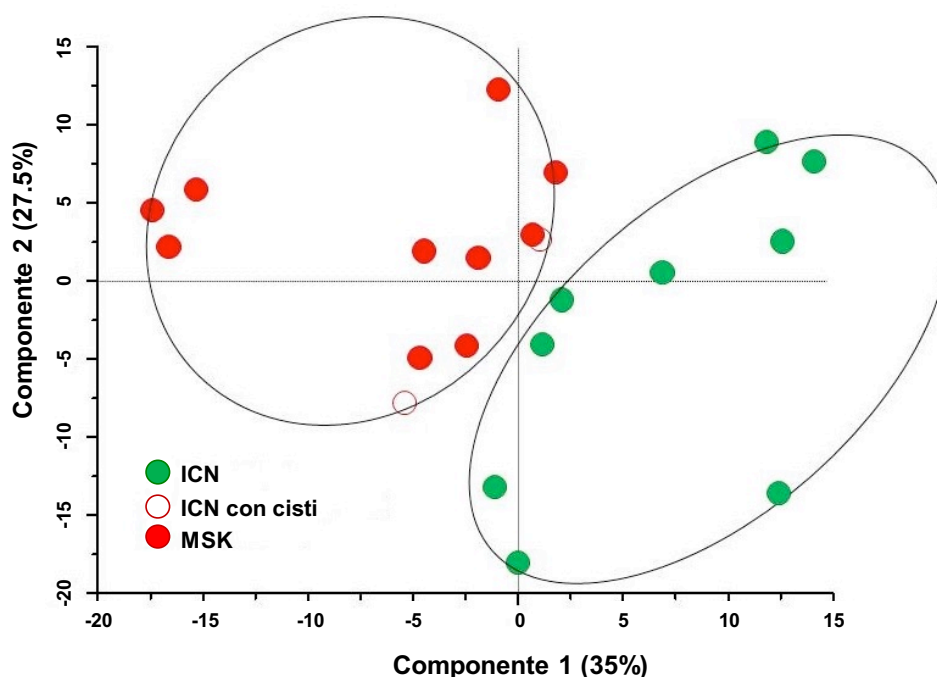
I risultati dell'analisi di GO sono stati mostrati tramite MDS e Volcano Plot per visualizzare rapidamente l'abilità di ogni processo biologico di distinguere i pazienti con MSK dal gruppo controllo ICN. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate usando l'ultima versione disponibile di R (R Foundation of Statistical Computing, Vienna, Austria) al momento degli esperimenti.

Per l'analisi dei dati dell'ELISA è stato utilizzato il test U di Mann-Whitney. I risultati sono stati espressi come mediana e range interquartile. Il valore di p value < 0.05 è stato considerato statisticamente significativo. L'efficienza diagnostica del saggio è stata valutata costruendo la curva ROC.

## RISULTATI

Lo Hierarchical clustering tramite multidimensional scaling e correlogramma di Spearman sono in grado di discriminare i pazienti con rene midollare a spugna (MSK) da quelli con nefrolitiasi (ICN) sulla base del loro profilo proteomico urinario.

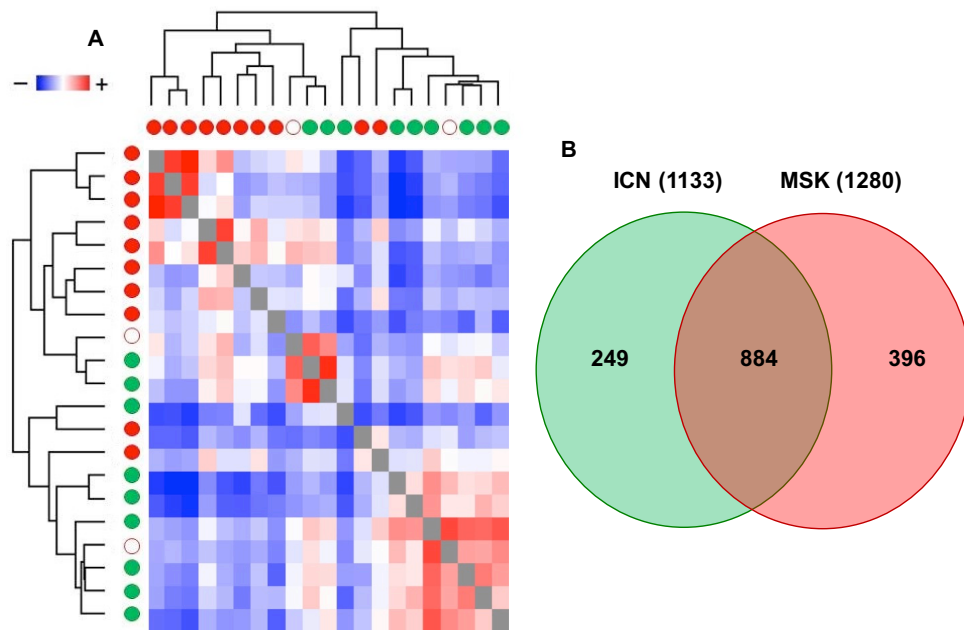
Il multidimensional scaling (MDS) effettuato sull'intero profilo proteomico urinario ottenuto dalle analisi dello spettrometro di massa, era in grado di discriminare i pazienti MSK da quelli ICN (**Figura 10**). I pazienti ICN con cisti renali sono localizzati sulla linea di separazione tra i due gruppi rivelando un fenotipo intermedio.



**FIGURA 10. Multidimensional scaling (MDS) dei dati proteomici dei pazienti affetti da MSK e confrontati con pazienti ICN.** Lo scatterplot bidimensionale di analisi MDS di pazienti con MSK (cerchi rossi) e pazienti con ICN (cerchi verdi) mostra due gruppi separati corrispondenti alle due coorti di pazienti. I pazienti ICN con cisti renali sono localizzati sulla linea di separazione tra i due gruppi rivelando un fenotipo intermedio.

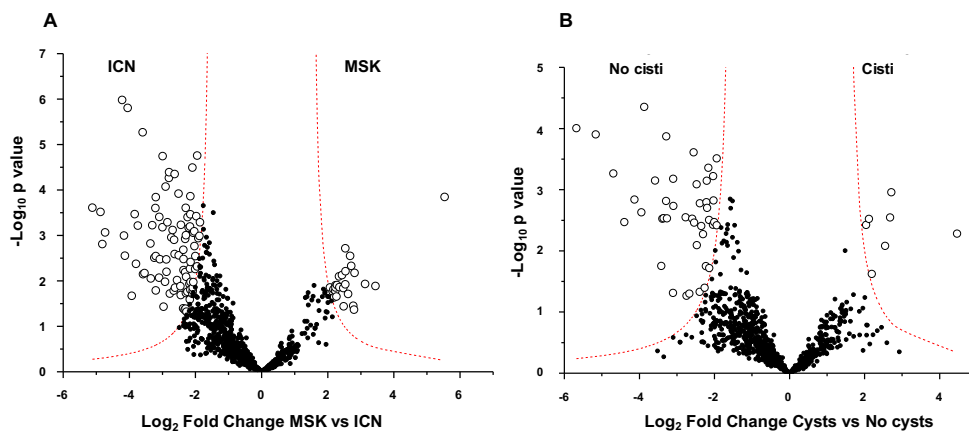
In accordo con MDS, il correlogramma (**Figura 11a**) di Spearman differenziava i due gruppi di studio. Il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman ( $R^2$ ) era più alto nei due gruppi di studio ( $0.45 \pm 0.85$ ).

Dalle analisi di spettrometria di massa sono state identificate 1529 proteine. Di queste 884 (58%) erano in comune tra i due gruppi di pazienti mentre 249 (16%) e 396 (26%) erano associate rispettivamente a ICN e MSK (**Figure 11b**).



**FIGURA 11. Correlogramma di Spearman associato con analisi di unsupervised hierarchical clustering dei pazienti con malattia del rene midollare a spugna (MSK) e diagramma di Venn. (a)** Nel correlogramma di Spearman, i valori del coefficiente sono raffigurati tramite una scala cromatica estesa da 0.45 (in blu) a 0.85 (in rosso). In più, il dendrogramma mostra i risultati di un'analisi di unsupervised hierarchical clustering che sono posti similmente ai valori del coefficiente di Spearman l'uno accanto all'altro. Entrambi i grafici mostrano due gruppi tra pazienti affetti da MSK e con nefrolitiasi (ICN). **(b)** Il diagramma di Venn rappresenta le proteine totali di pazienti con malattia di MSK ed ICN identificate attraverso spettrometria di massa. Il diagramma di Venn mostra proteine comuni e non comuni. I numeri rappresentano le proteine distintive nelle rispettive aree di overlapping e non overlapping.

Tramite Volcano Plot (**Figura 12a**) e curva ROC è stato possibile restringere, rispettivamente, a 328 e 44 il numero di proteine specifiche per MSK. Inoltre, 119 proteine differenziavano i pazienti con cisti (tutti i pazienti con MSK e i due ICN con cisti renali) dai pazienti con nefrolitiasi che non presentavano cisti (**Figura 12b**). In particolare, un totale di 22 proteine risultava up-regolato nel confronto tra pazienti MSK e ICN mentre 15 proteine risultavano sotto-esprese nel gruppo di pazienti con cisti rispetto al gruppo di pazienti senza cisti.



**FIGURA 12. Volcano plot dei risultati dell'analisi statistica univariata.** Il Volcano plot è basato sul fold change ( $\text{Log}_2$ ) e il p value ( $-\text{Log}_{10}$ ) di tutte le proteine identificate in MSK ed ICN (**a**) e nei pazienti con cisti renali e senza cisti (**b**). In entrambi i grafici, i cerchi bianchi indicano le proteine che hanno mostrato cambiamenti di espressione statisticamente significativi.

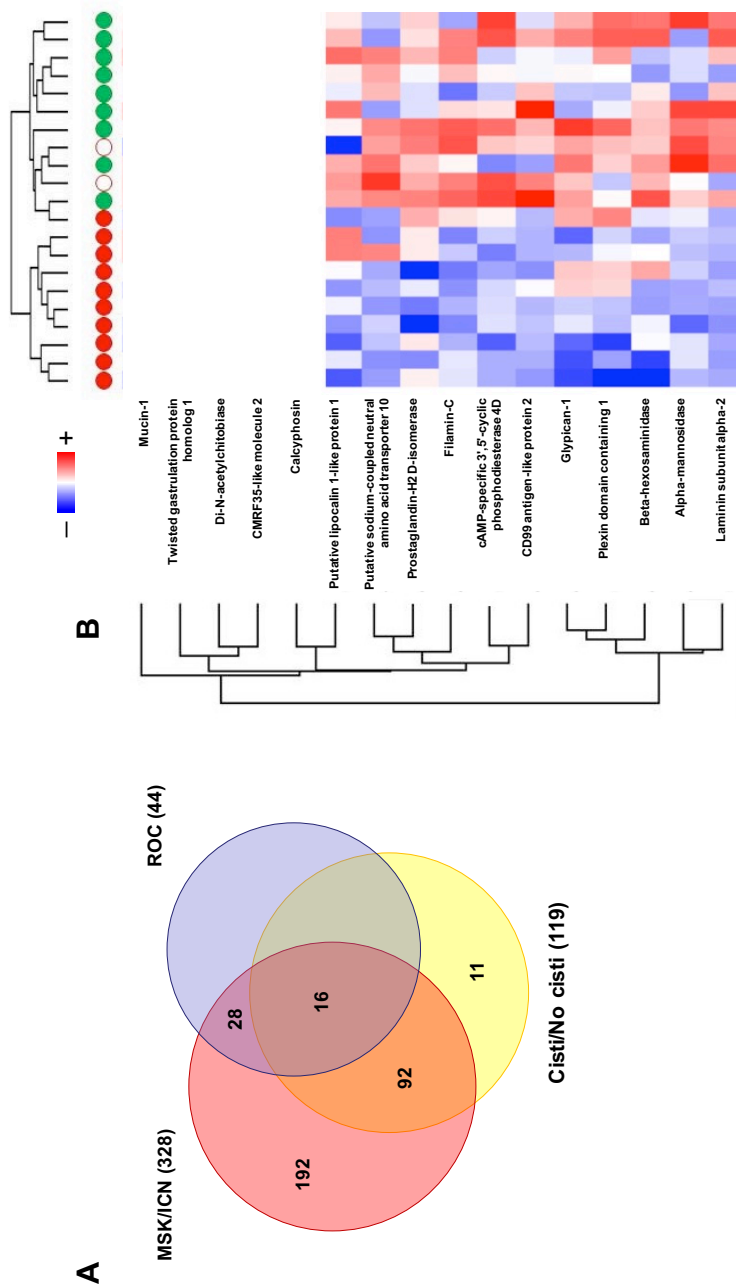
Come mostra il diagramma di Venn (**Figura 13a**), 16 proteine risultavano in comune ai tre metodi statistici, elencate in tabella 1.

Il profilo proteomico (**Figura 13b**) riporta il nome delle 16 proteine identificate.

**Tabella I. Elenco delle 16 proteine identificate**

<b>Protein IDs</b>	<b>Proteina</b>	<b>Gene</b>	<b>Regolazione MSK/ICN</b>
P24043	Laminin subunit alpha-2	LAMA2	Up
P35052	Glypican-1	GPC1	Up
C9JWQ3	Plexin domain-containing protein 1	PLXDC1	Up
H0YA68	Alpha-mannosidase	MAN2B2	Up
H3BS10	Beta-hexosaminidase	HEXA	Down
P15941-7	Mucin-1	MUC1	Down
J3QS03	Twisted gastrulation protein homolog 1	TWSG1	Down
Q01459	Di-N-acetylchitobiase	CTBS	Down
Q496F6	CMRF35-like molecule 2	CD300E	Down
K7ES72	Calcyphosin	CAPS	Down
Q9HBR0	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 10	SLC38A10	Down
Q5VSP4	Putative lipocalin 1-like protein 1	LCN1P1	Down
P41222	Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS	Down
Q14315-2	Filamin-C	FLNC	Down
Q08499-7	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D	PDE4D	Down
H0Y4H3	CD99 antigen-like protein 2	CD99L2	Down





**FIGURA 13. Diagramma di Venn dei risultati dell' analisi statistica univariata tra i pazienti MSK e ICN. (A)** Il diagramma di Venn mostra graficamente i risultati dei test di Mann-Whitney U e della curva ROC. I numeri rappresentano le proteine nelle rispettive aree di overlapping e di non overlapping. **(B)** Heat map di unsupervised hierarchical clustering del profilo proteomico di 16 proteine comuni nelle tre analisi. Nella heat map, ogni fila rappresenta una proteina e ogni colonna corrisponde ad un campione. L' abbondanza delle proteine normalizzate con Z score è rappresentata da una scala colorata, in cui il rosso esprime l' espressione positiva, il bianco una espressione uguale, ed il blu una espressione negativa comparata con i valori di ogni proteina; Sia il dendrogramma che la heat map dimostrano l' abilità di queste proteine di distinguere tra pazienti con MSK e con nefrolitiasi.

Successivamente per stabilire la priorità e la rilevanza delle proteine e per ridurre il campo di scelta di un potenziale biomarker è stata effettuata l'analisi Support Vector Machine.

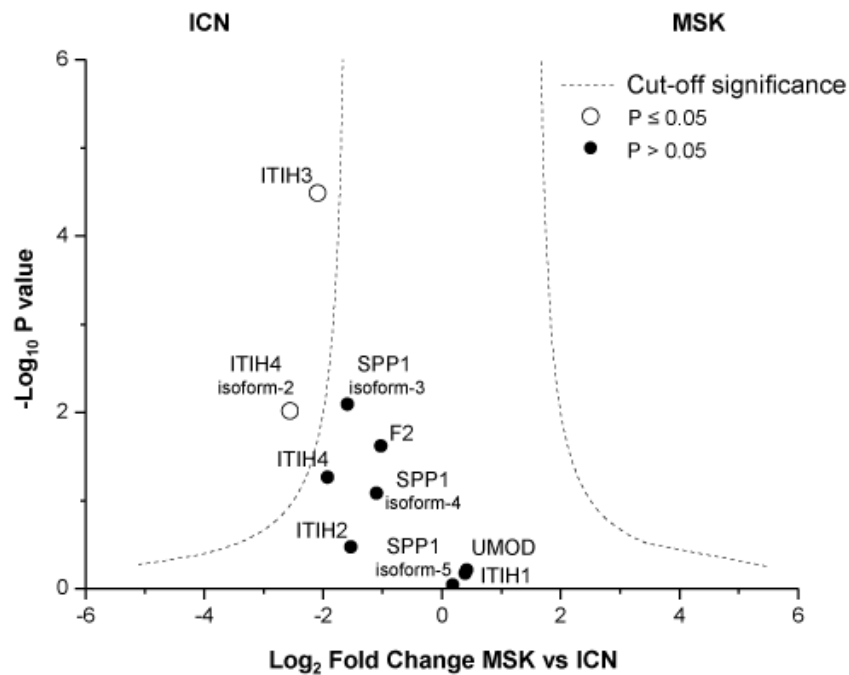
Il Support Vector Machine è un metodo non probabilistico “machine-learning” di classificazione/predizione binaria proposta da Vapnik [76]. Questo metodo costruisce un iperpiano oppure una serie di iperpiani in un alto o infinito spazio dimensionale attraverso diverse funzioni di kernel per raggiungere un'elevata accuratezza di classificazione. In questo studio è stata utilizzata una funzione kernel non lineare per stabilire una classificazione delle proteine.

Con l'utilizzo del Support Vector Machine la maggior parte delle 44 proteine ottenute dalla curva ROC e tutte le 16 proteine ottenute dalla combinazione dei 3 metodi statistici erano al di sotto della centesima posizione della classificazione delle proteine confermando l'abilità di queste proteine di discriminare tra MSK e ICN.

Dalla combinazione dei quattro metodi statistici sono state selezionate cinque proteine: glypican-1, plexin domain-containing protein 1, beta-hexosaminidase, epididymis-specific alpha-mannosidase, e laminin subunit alpha 2 (LAMA-2). Quest'ultima proteina è risultata il miglior biomarcatore per MSK, poiché statisticamente iper-espressa in entrambe le analisi univariate, con un'elevata area sotto la curva, e con il più basso ranking dei 16 biomarcatori selezionati.

In particolare, i maggiori inibitori di calcoli renali, sebbene non presenti tra le principali proteine che discriminavano i pazienti con MSK dai pazienti con ICN, sono comunque presenti nelle urine dei pazienti arruolati nello studio. In particolare, l'inibitore inter-alpha-trypsin heavy chain 3 e l'inibitore inter-alpha-trypsin heavy chain 4 isoforma-2 risultavano significativamente sotto-espressi in pazienti con MSK rispetto ai pazienti con ICN (**Figura 14**).

Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4, secreted phosphoprotein 1, e coagulation factor II thrombin mostravano un buon trend verso la down-regolazione in MSK (sebbene non statisticamente significativo).



**FIGURA 14.** Volcano plot basato sul fold change (Log<sub>2</sub>) e p value (-Log<sub>10</sub>) degli inibitori della formazione dei calcoli renali identificate in MSK e ICN. I cerchi bianchi indicano le proteine con un livello di espressione significativamente differente tra i due gruppi di pazienti.

### Ruolo biologico delle proteine identificate

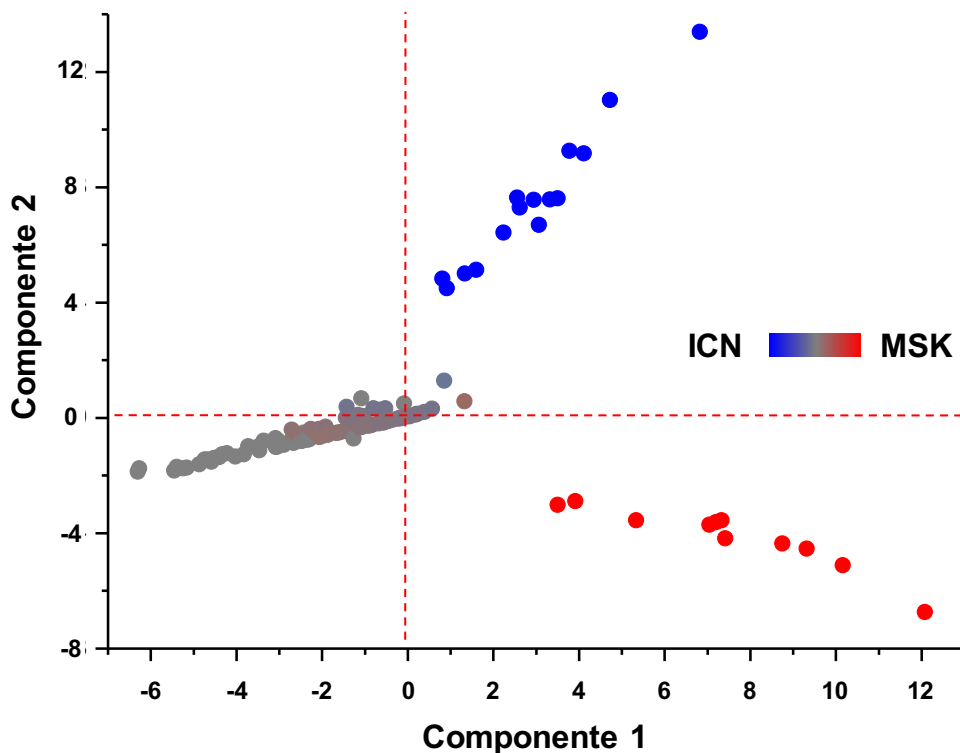
Per meglio chiarire il ruolo biologico delle proteine in grado di discriminare MSK versus ICN è stata effettuata un'analisi funzionale mediante Gene Ontology (GO) basata sui processi biologici utilizzando il software Cytoscape.

L'analisi ha permesso di identificare 166 "gene signature" più significativi. Per gene signature si intende un singolo o un gruppo di geni con caratteristiche uniche di espressione genica che risultano in un processo biologico alterato o in determinate condizioni patologiche [77].

Per consentire una rapida visualizzazione dei principali meccanismi biologici in grado di differenziare i pazienti con MSK dai pazienti con ICN, i risultati

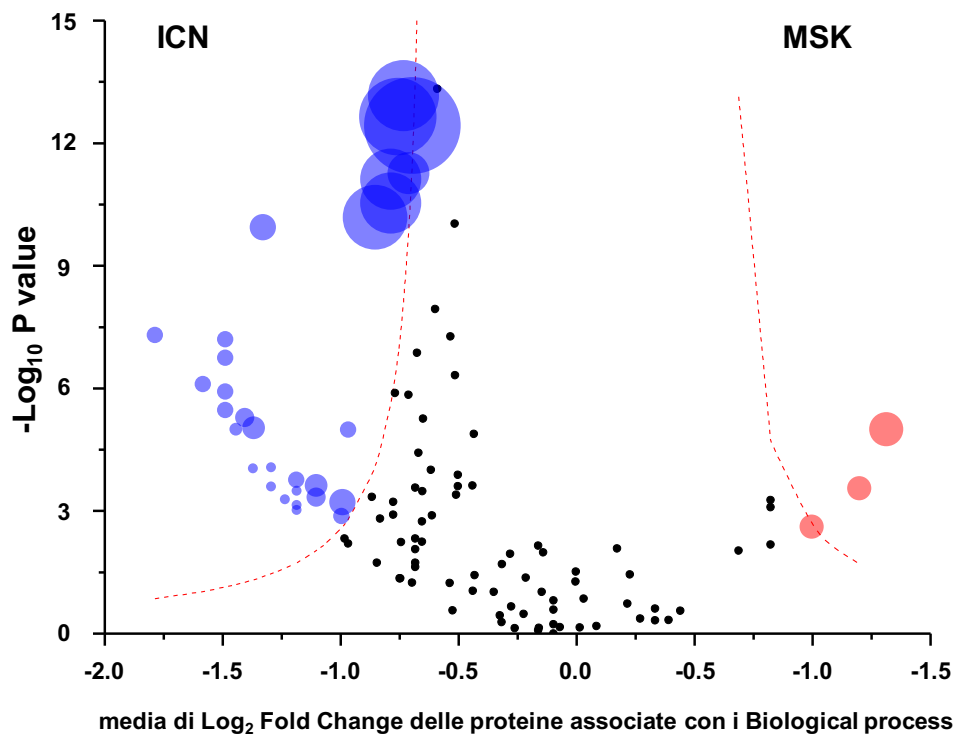
delle analisi di enrichment di GO sono stati mostrati tramite MDS e volcano plot.

Uno scatterplot di MDS mostra tre differenti gruppi caratterizzati dalla condivisione di un processo biologico esclusivo e comune sia ai pazienti con rene midollare a spugna che ai pazienti con nefrolitiasi (**Figure 15**).



**FIGURA 15. Analisi dei processi biologici tramite annotazione *Gene Ontology*.** Lo scatterplot bidimensionale dell'analisi di multidimensional scaling mostra tre gruppi distinti caratterizzati da un comune (cerchi in grigio) ed esclusivo processo biologico presente in pazienti affetti da MSK (cerchi in rosso) e ICN (cerchi in blu).

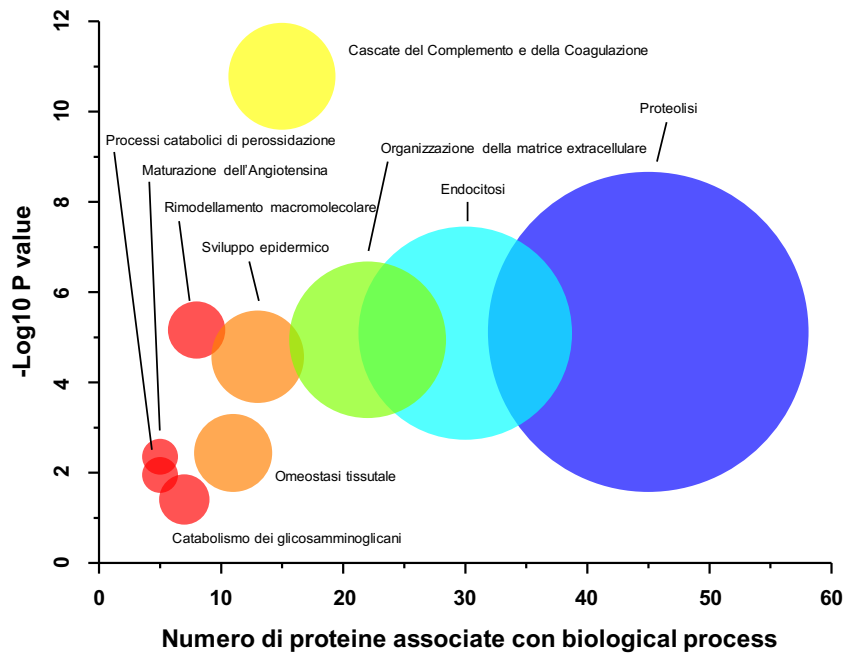
Per definire se il coinvolgimento in specifiche pathway biochimiche per MSK e ICN fosse associato ad una differenza di abbondanza proteica, abbiamo misurato l'enrichment funzionale tramite volcano plot. In questo grafico, le medie dei fold change delle proteine associate con ciascun processo biologico sono state rappresentate rispetto alla loro stessa probabilità di essere attivamente espresse nei pazienti con MSK e nel gruppo dei pazienti con ICN (**Figura 16**).



**FIGURA 16. Volcano plot dei processi biologici.** Il Volcano plot si basa sull'associazione del fold change di ogni proteina (Log2) con ciascun processo biologico e con il suo stesso P value (Log10). Le dimensioni dei cerchi sono proporzionali al numero di proteine associate con ogni processo biologico statisticamente significativo.

I risultati ottenuti da entrambe le analisi sono stati riassunti nel diagramma a bolle dei *gene signature* più significativi (**Figure 17**).

Le proteine selezionate risultavano principalmente coinvolte nei processi di proteolisi, endocitosi, organizzazione della matrice extracellulare, cascata di coagulazione e del complemento, sviluppo epidermico, omeostasi tissutale, e processo catabolico dei glicosamminoglicani.



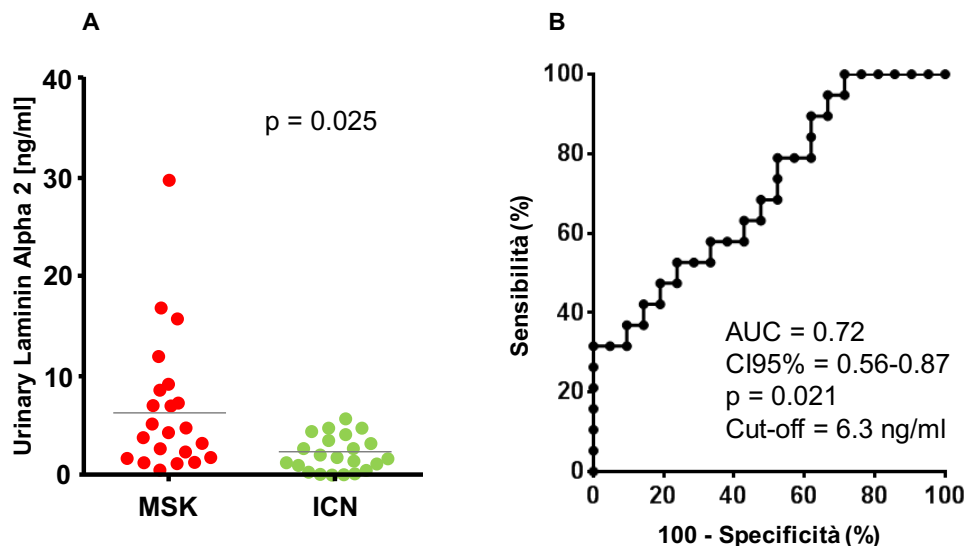
**FIGURA 17. Bubble plot bidimensionale delle analisi di annotazione gene ontology.** Il grafico mostra i principali processi biologici (cerchi) tracciati rispetto al valore di  $\text{Log}_{10}$  in seguito alla correzione tramite false discovery rate per proteine identificate in pazienti che presentano la patologia del rene midollare a spugna e nefrolitiasi. Le dimensioni dei cerchi sono proporzionali al numero di proteine associate con ogni processo biologico statisticamente significativo. I colori sono stati impostati unicamente per scopo estetico.

### **I test ELISA confermavano i risultati di spettrometria di massa**

Al fine di selezionare un potenziale biomarcatore, abbiamo effettuato, sull'intera coorte di pazienti inclusi nello studio, test ELISA per le proteine che risultavano maggiormente discriminanti dall'analisi proteomica: LAMA-2, GPC-1, e PLXDC1.

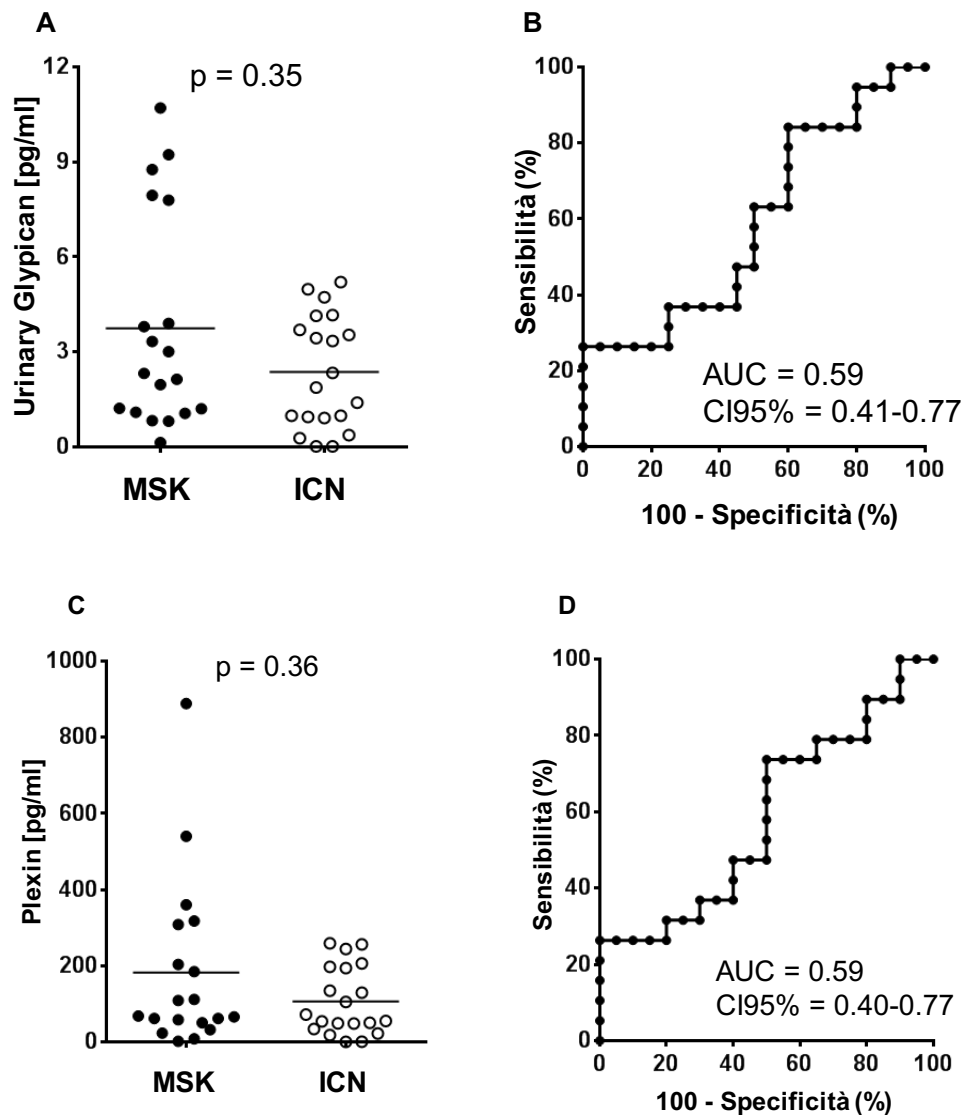
Come mostrato in **Figura 18**, LAMA-2 risultava iper-espressa in MSK rispetto ai pazienti con ICN (mediana/range interquartile, 3.67/1.63–8.52 vs. 1.70/0.31–3.70).

Tuttavia, sebbene in grado di discriminare tra MSK e ICN (curva ROC Figura 8b), la differenza tra i due gruppi di studio era meno marcata rispetto alle analisi ottenute dalla spettrometria di massa. Questo potrebbe essere dovuto alla diversa performance delle due tecniche. Infatti la sensibilità di MS è molto elevata, ed ha anche una significativa abilità nel distinguere accuratamente le diverse isoforme o eventuali forme alterate delle proteine [78]. Si può evidenziare che i pazienti con nefrolitiasi, che presentavano cisti, hanno mostrato livelli intermedi di LAMA-2 (mediana/range interquartile, 2.31/2.01–2.60).



**Figura 18. Test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), validazione risultati della proteomica. (a)** Dot plot mostra la distribuzione e il valore della mediana della concentrazione urinaria della subunità alpha 2 della laminina (LAMA-2) (ng/ml) sull'intera coorte di pazienti. Il contenuto di LAMA-2 è più alto nei pazienti che presentano rene midollare a spugna (MSK) rispetto ai pazienti con nefrolitiasi (ICN). **(b)** Analisi di curva ROC (Receiver-operating characteristic curve) per LAMA-2 urinaria. I valori riportati consentono ai pazienti affetti da MSK di differenziarsi dai pazienti che presentano ICN. AUC, area under the curve; CI, intervallo di confidenza.

In aggiunta i livelli di GPC1 e PLXDC1 misurati con metodica ELISA, sebbene non statisticamente significativi, risultavano più alti nei pazienti MSK rispetto ai pazienti ICN (**Figura 19**).



**FIGURA 19.** (A) Il Dot plot mostra la distribuzione e la mediana dei livelli di concentrazione urinaria di Glypican (ng/ml) nell'intera coorte di pazienti. Il livello di Glypican risultava più alto in MSK rispetto a ICN. (B) Analisi della curva ROC per Glypican urinario. I valori riportati permettono di discriminare MSK da ICN. (C) Il Dot plot mostra la distribuzione e la mediana dei livelli di concentrazione urinaria di Plexin (ng/ml) nell'intera coorte di pazienti. Il livello di Plexin risultava più alto in MSK rispetto a ICN. (D) Analisi della curva ROC per Plexin. I valori riportati permettono di discriminare MSK da ICN.



## DISCUSSIONE

Al momento, la patologia del rene midollare a spugna continua ad essere diagnosticata attraverso esami strumentali e clinici complessi, costosi, e che richiedono lunghi tempi di esecuzione. In particolare, come descritto precedentemente, l'urografia rimane l'esame gold standard attualmente disponibile per la diagnosi di MSK [36].

Sfortunatamente, questa metodica è stata in gran parte abbandonata, rendendo così la diagnosi di MSK sempre più complicata. Pertanto, è indiscutibile che l'identificazione di nuovi biomarcatori molecolari rappresenti un importante obiettivo in ambito nefrologico, evitando il rischio di una sotto diagnosi dell'MSK e permettendo una diagnosi sempre più rapida, accurata e meno dispendiosa di questa condizione patologica.

Per il raggiungimento di questo obiettivo, abbiamo utilizzato una metodica di tipo high-throughput per identificare un profilo proteomico urinario altamente specifico per MSK ed in grado di discriminare questi pazienti da altre coorti di pazienti con malattie differenti. Dopo analisi bioinformatica abbiamo individuato 16 proteine altamente associate con MSK. Successive analisi statistiche hanno portato all'identificazione di LAMA-2 come l'elemento biologico maggiormente discriminativo tra i pazienti affetti da MSK rispetto a quelli con ICN.

LAMA-2 (laminin subunit alpha 2) è una subunità della laminina, che consiste in una famiglia di almeno 15 proteine eterotrimeriche  $\alpha\beta\gamma$  della matrice extracellulare, che rappresenta la componente principale della membrana basale [79].

La principale funzione di LAMA-2 è quella di mediare l'adesione, la migrazione e l'organizzazione cellulare nei tessuti durante lo sviluppo embrionale tramite l'interazione con le altre componenti della matrice extracellulare. Il deposito e la formazione della laminina all'interno della matrice è regolata dai recettori presenti sulla superficie cellulare, incluso le integrine, i destruglicani, e i sindecani [80,81].

Diversi autori hanno suggerito che la laminina potrebbe avere un ruolo fondamentale nella formazione delle cisti. Infatti, O'Brien e coll. [81], tramite l'impiego della linea cellulare epiteliale Madin-Darby canine kidney, hanno dimostrato il coinvolgimento di questa proteina nell'orientamento del polo apicale durante il processo di formazione delle cisti. In particolare, gli autori hanno osservato il coinvolgimento di Rac 1 (una GTPasi appartenente alla superfamiglia del sistema renina-angiotensina delle small GTP-binding proteins) nel regolare l'assemblaggio della laminina extracellulare, la quale induce l'orientamento del polo apicale. Al contrario, l'assenza di laminina causa un'inversione del polo apicale.

Analogamente la laminina sembra avere un ruolo chiave nello sviluppo delle cisti nella malattia del rene policistico (PKD), una patologia ereditaria molto frequente che comporta la formazione di cisti a livello renale, le quali causano nel tempo una sempre più marcata insufficienza renale. Questa condizione è dovuta a mutazioni genetiche presenti nella linea germinale e somatica dei geni PKD1 e PKD2.

In questi pazienti, le cisti hanno origine dai nefroni e dai dotti collettori. In effetti, dalle analisi di microdissezione è possibile evidenziare come le cisti comunichino direttamente con i nefroni e con i dotti collettori. Regioni di tessuto renale parenchimale normale si intervallano a zone con cisti.

Le cellule epiteliali delle differenti aree del nefrone sono caratterizzate da un'incrementata proliferazione, una polarità cellulare anomala, una secrezione di fluidi oltre che dalla produzione in eccesso della matrice extracellulare [82]. Nel rene policistico, la membrana basale delle cisti risulta considerevolmente ispessita a causa di un inconsueto accumulo di laminina 332 che contribuisce ad un'aberrante proliferazione delle cellule epiteliali e della crescita delle cisti [83-85].

Inoltre, è stato dimostrato che la laminina presente nelle cellule che formano le cisti in PKD risulta up-regolata rispetto alle cellule di un rene sano [86] poiché è coinvolta nel sistema di regolazione della proliferazione cellulare e nella crescita delle cisti [84].

In particolare, la laminina-5 è particolarmente espressa nei pazienti affetti da rene policistico autosomico dominante, ma al contrario, non è presente nei tubuli di adulti che non manifestano la malattia [87].

Inoltre, la laminina-5 forma un substrato di adesione preferenziale per le cellule epiteliali interessate alla formazione delle cisti (CC), in particolare attraverso l'interazione con l'integrina  $\alpha_6\beta_4$ . Le interazioni tra la laminina-5 e l'integrina  $\alpha_6\beta_4$  mediano sia l'adesione che la migrazione delle cellule derivanti dalle cisti [86].

Un simile meccanismo potrebbe essere presente nel rene midollare a spugna. Infatti, l'over espressione di LAMA-2 potrebbe avere un ruolo centrale nello sviluppo e nella crescita delle cisti renali.

Pertanto questa proteina potrebbe rivelarsi un ottimo biomarcatore per la diagnosi di MSK. Tuttavia, è necessario ampliare questo studio, ad una coorte ancora più grande e multicentrica di pazienti, con lo scopo di validarne i risultati e fare in modo che LAMA-2 diventi un biomarcatore diagnostico da utilizzare attivamente nella pratica clinica.

Il ruolo di LAMA-2 nella polarizzazione cellulare può essere interessante da un punto di vista funzionale. Si è ipotizzato che la maggior parte delle disfunzioni tubulari osservate nei pazienti con MSK potrebbero essere l'espressione di un'anomala polarizzazione delle cellule tubulari e di un'alterata funzionalità di trasporto da parte dei trasportatori di membrana [2]. E' interessante notare che la nostra analisi proteomica ha portato all'identificazione di altre proteine over-esprese nei pazienti con MSK: epididymis-specific alpha-mannosidase (MAN2B2), plexin domain-containing protein 1 (PLXDC1), beta-hexosaminidase (HEXA) and glypican-1 (GPC1). Tuttavia, nessuna di queste proteine è stata precedentemente associata a MSK o ad altre patologie che formano cisti. GPC1, un membro della famiglia dei proteoglicani di eparan solfato che sono ancorate alla membrana tramite un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI) [88], interagisce e regola l'attività del fibroblast growth factor-2, (FGF-2), vascular endothelial growth factor (VEGF) e di altri fattori di crescita che modulano alcune attività biologiche. Pertanto, i glicipani svolgono un importante ruolo

regolatorio nel controllo della crescita cellulare, differenziazione e morfogenesi [89]. Allo stesso modo una sua iperespressione in MSK potrebbe riflettere un possibile incremento nel rapporto di turnover/proliferazione cellulare e promuovere i processi cellulari che portano alla formazione di cisti. Tuttavia, sono ancora necessari studi funzionali per confermare questa ipotesi.

Inoltre, i livelli di GPC1 e PLXDC1 determinati tramite test ELISA, sebbene non statisticamente significativi, sono risultati più elevati nei pazienti con MSK rispetto ai pazienti controllo con ICN. Ulteriori studi, su una popolazione più ampia, potrebbero essere utili per comprendere meglio le proteine che sono state selezionate.

Dalle analisi effettuate mediante il software Cytoscape sono state riscontrate altre proteine associate ad MSK che intervengono in importanti processi biologici quali la proteolisi, l'endocitosi, l'organizzazione della matrice extracellulare, la cascata del complemento e della coagulazione, lo sviluppo epidermico, l'omeostasi tissutale e il processo catabolico dei glicosamminoglicani.

Tali collegamenti polifunzionali denotano un'eccezionale attivazione cellulare che include il rimodellamento della matrice e l'attivazione del sistema immunitario evidenziando i possibili cambiamenti tissutali ed istologici che rendono il rene maggiormente suscettibile ai cambiamenti morfologici, generando la formazione di cisti e la vulnerabilità dell'organo stesso. Inoltre, una completa analisi delle proteine identificate in questo studio potrebbe in futuro consentire una migliore comprensione delle possibili complicanze sistemiche, associate con tale condizione patologica (e.g., patologie ossee ed alterazioni vascolari) [22,90].

Questo studio fornisce anche degli spunti di riflessione in merito alla patogenesi di formazione dei calcoli renali in pazienti affetti da MSK. Infatti, è comunemente accertato come la litogenesi nel rene midollare a spugna si verifichi a causa di condizioni di ipercalciuria ed ipocitraturia e probabilmente anche a causa di stasi urinaria nel dotto cistico [18]. Non si hanno informazioni in merito a possibili inibitori della formazione di calcoli

renali, eccetto per il citrato, e nello specifico in merito ad inibitori macromolecolari della litogenesi del calcio in pazienti che presentano MSK. In questo studio è stato visto che alcuni di questi inibitori, come inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chains 3 and 4 (isoforma-2), risultano significativamente ridotti nelle urine, suggerendo una riduzione del meccanismo che contrasta la formazione di calcoli in pazienti affetti da MSK. Ulteriori studi sono necessari per meglio comprendere questo fenomeno.

## CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati di questo studio grazie alla spettrometria di massa e a complesse analisi statistiche e bioinformatiche, hanno mostrato, per la prima volta, che il proteoma urinario è in grado di differenziare chiaramente i pazienti affetti da MSK dai pazienti che presentano nefrolitiasi.

In particolare è emerso che la laminina-2, una proteina coinvolta nell'assemblaggio della matrice extracellulare, potrebbe rappresentare un ottimo candidato come biomarcatore per la diagnosi di MSK. L'utilizzo di LAMA-2 come test diagnostico preliminare potrebbe aiutare i clinici ad identificare precocemente i pazienti con questa patologia e ad iniziare terapie atte a ridurre le complicanze renali e sistemiche. Tuttavia, è necessario che la sua validità come biomarcatore sia valutata in una più grande coorte di pazienti (anche attraverso studi multicentrici) e misurata possibilmente a livello del tessuto renale.

Inoltre, tutte le proteine identificate se sottoposte ad ulteriori studi nell'ambito di questa patologia rara, potrebbero aiutarci a meglio comprendere la patofisiologia del MSK.

## BIBLIOGRAFIA

1. Harrison's Principles of Internal Medicine-15th Edition-McGraw-Hill.
2. Gambaro G, Feltrin GP, Lupo A, Bonfante L, D'Angelo A, Antonello A. Medullary sponge kidney (Lenarduzzi-Cacchi-Ricci disease): a Padua Medical School discovery in the 1930s. *Kidney Int.* 2006;69(4):663-70.
3. Fabris A, Anglani F, Lupo A, Gambaro G. Medullary sponge kidney: state of the art. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(5):1111-9.
4. Patriquin HB, O'Regan S. Medullary sponge kidney in childhood. *AJR Am J Roentgenol.* 1985;145(2):315-9
5. Thompson IM, Rodriguez FR, Spence CR. Medullary sponge kidney and congenital hemihypertrophy. *South Med J.* 1987;80(11):1455-6.
6. Diouf B, Ka EH, Calender A, Giraud S, Diop TM. Association of medullary sponge kidney disease and multiple endocrine neoplasia type IIA due to RET gene mutation: is there a causal relationship? *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(12):2062-3.
7. Costantini F, Shakya R. GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays.* 2006;28(2):117-27.
8. Salomon R, Attié T, Pelet A, Bidaud C, Eng C, Amiel J, Sarnacki S, Goulet O, Ricour C, Nihoul-Fékété C, Munnich A, Lyonnet S. Germline mutations of the RET ligand GDNF are not sufficient to cause Hirschsprung disease. *Nat Genet.* 1996;14(3):345-7.
9. Sánchez MP, Silos-Santiago I, Frisén J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382: 70–73.

10. Manie S, Santoro M, Fusco A et al. The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet* 2001; 17: 580–589.
11. Torregrossa R, Anglani F, Fabris A, Gozzini A, Tanini A, Del Prete D, Cristofaro R, Artifoni L, Abaterusso C, Marchionna N, Lupo A, D'Angelo A, Gambaro G. Identification of GDNF gene sequence variations in patients with medullary sponge kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(7):1205-10.
12. El-Ghoneimi A, Berrebi D, Levacher B, Nepote V, Infante M, Paris R, Simonneau M, Aigrain Y, Peuchmaur M. Glial cell line derived neurotrophic factor is expressed by epithelia of human renal dysplasia. *J Urol*. 2002;168(6):2624-8.
13. Fabris A, Lupo A, Ferraro PM, Anglani F, Pei Y, Danza FM, Gambaro G. Familial clustering of medullary sponge kidney is autosomal dominant with reduced penetrance and variable expressivity. *Kidney Int*. 2013;83(2):272-7.
14. Sluysmans T, Vanoverschelde JP, Malvaux P. Growth failure associated with medullary sponge kidney, due to incomplete renal tubular acidosis type 1. *Eur J Pediatr*. 1987;146(1):78-80.
15. Cameron S. Medullary sponge kidney. In: Davison AM, Cameron JS, Grunfeld J-P, Ponticelli C, Ritz E, Winearls CG, van Ypersele C (eds). *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*, 3rd edn, Oxford University Press, Oxford, UK, 2004, pp. 2495–2501.
16. Yagisawa T, Kobayashi C, Hayashi T, Yoshida A, Toma H. Contributory metabolic factors in the development of nephrolithiasis in patients with medullary sponge kidney. *Am J Kidney Dis*. 2001;37(6):1140-3.
17. Chu HY, Yan MT, Lin SH. Recurrent pyelonephritis as a sign of 'sponge kidney'. *Cleve Clin J Med*. 2009;76(8):479-80.
18. Fabris A, Lupo A, Bernich P, Abaterusso C, Marchionna N, Nouvenne A, Gambaro G. Long-term treatment with potassium citrate and renal stones in medullary sponge kidney. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(9):1663-8.



19. Maschio G, Tessitore N, D'Angelo A, Fabris A, Corgnati A, Oldrizzi L, Loschiavo C, Lupo A, Valvo E, Gammaro L, Rugiu C. Medullary sponge kidney and hyperparathyroidism--a puzzling association. *Am J Nephrol.* 1982;2(2):77-84.
20. Dlabal PW, Jordan RM, Dorfman SG. Medullary sponge kidney and renal-leak hypercalciuria. A link to the development of parathyroid adenoma? *JAMA.* 1979;241(14):1490-1.
21. Gambaro G, Fabris A, Citron L, Tosetto E, Anglani F, Bellan F, Conte M, Bonfante L, Lupo A, D'Angelo A. An unusual association of contralateral congenital small kidney reduced renal function and hyperparathyroidism in sponge kidney patients: on the track of the molecular basis. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(6):1042-7.
22. Fabris A, Bernich P, Abaterusso C, Marchionna N, Canciani C, Nouvenne A, Zamboni M, Lupo A, Gambaro G. Bone disease in medullary sponge kidney and effect of potassium citrate treatment. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(12):1974-9.
23. Osther PJ, Mathiasen H, Hansen AB, Nissen HM. Urinary acidification and urinary excretion of calcium and citrate in women with bilateral medullary sponge kidney. *Urol Int.* 1994;52(3):126-30.
24. Pesce C, Colombo B, Nicolini E, Spata F, Cappellari F. [Medullary sponge kidney with severe renal function impairment: a case report]. *Pediatr Med Chir.* 1995;17(1):65-7.
25. Gambaro G, Favaro S, D'Angelo A. Risk for renal failure in nephrolithiasis. *Am J Kidney Dis.* 2001;37(2):233-43.
26. Lambrianides AL, John DR. Medullary sponge disease in horseshoe kidney. *Urology.* 1987;29(4):426-7.
27. Indridason OS, Thomas L, Berkoben M. Medullary sponge kidney associated with congenital hemihypertrophy. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(8):1123-30.

28. Choyke PL, Siegel MJ, Oz O, Sotelo-Avila C, DeBaun MR. Nonmalignant renal disease in pediatric patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *AJR Am J Roentgenol.* 1998;171(3):733-7.
29. Chesney RW, Kaufman R, Stapleton FB, Rivas ML. Association of medullary sponge kidney and medullary dysplasia in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Pediatr.* 1989;115(5 Pt 1):761-4.
30. Goldman M, Shuman C, Weksberg R, Rosenblum ND. Hypercalciuria in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Pediatr* 2003; 142: 206–208.
31. West PM, Love DR, Stapleton PM, Winship IM. Paternal uniparental disomy in monozygotic twins discordant for hemihypertrophy. *J Med Genet.* 2003;40(3):223-6.
32. Kerr DN, Warrick CK, Hart-Mercer J. A lesion resembling medullary sponge kidney in patients with congenital hepatic fibrosis. *Clin Radiol.* 1962; 13:85-91.
33. Torres VE, Erickson SB, Smith LH, Wilson DM, Hattery RR, Segura JW. The association of nephrolithiasis and autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 1988;11(4):318-25.
34. Hiltunen JO, Laurikainen A, Airaksinen MS, Saarma M. GDNF family receptors in the embryonic and postnatal rat heart and reduced cholinergic innervation in mice hearts lacking ret or GFRalpha2. *Dev Dyn.* 2000;219(1):28-39.
35. Ria P, Fabris A, Dalla Gassa A, Zaza G, Lupo A, Gambaro G. New non-renal congenital disorders associated with medullary sponge kidney (MSK) support the pathogenic role of GDNF and point to the diagnosis of MSK in recurrent stone formers. *Urolithiasis.* 2017;45(4):359-362.
36. Forster JA, Taylor J, Browning AJ, Biyani CS. A review of the natural progression of medullary sponge kidney and a novel grading system based on intravenous urography findings. *Urol Int.* 2007;78(3):264-9.

37. Patriquin HB, O'Regan S. Medullary sponge kidney in childhood. *AJR Am J Roentgenol.* 1985;145(2):315-9.
38. Toyoda K, Miyamoto Y, Ida M, Tada S, Utsunomiya M. Hyperechoic medulla of the kidneys. *Radiology.* 1989;173(2):431-4.
39. Decramer S, Gonzalez de Peredo A, Breuil B, Mischak H, Monsarrat B, Bascands JL, Schanstra JP. Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7(10):1850-62.
40. Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. Molecular basis of proteinuria of glomerular origin. *N Engl J Med.* 1978;298(15):826-33.
41. Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. Glomerular permselectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge. *Am J Physiol.* 1978;234(6):F455-60.
42. Santucci L, Bruschi M, Candiano G, Lugani F, Petretto A, Bonanni A, Ghiggeri GM. Urine Proteome Biomarkers in Kidney Diseases. I. Limits, Perspectives, and First Focus on Normal Urine. *Biomark Insights.* 2016;11:41-8.
43. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003;422(6928):198-207.
44. Jennings KR, Dolnikowski GG. Mass analyzers. *Method Enzymol* 1990;193:37–61.
45. Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2006;4(4):295-320.
46. Haag AM. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 919:157-169.

47. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246:64–71.
48. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10000 daltons. *Anal Chem*. 1988;60:2299–2301.
49. Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem*. 1991 Dec 15;63(24):1193A-1203A.
50. Honour JW. Benchtop mass spectrometry in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem*. 2003;40(Pt 6):628-38.
51. March RE. An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 1997;32:351–69.
52. Weickhardt C, Moritz F, Grotemeyer J. Time-of-flight mass spectrometry: state-of-the-art in chemical analysis and molecular science. *Mass Spectrom Rev* 1996;15:139–62.
53. Cotter RJ. The new time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 1999;71:445A–451A.
54. Strathmann FG, Hoofnagle AN. Current and future applications of mass spectrometry to the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol*. 2011;136(4):609-16.
55. Comisarow MB, Marshall AG. Fourier transform mass Ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chem Phys Lett* 1974;25:282–283.
56. Comisarow MB, Marshall AG. Frequencysweep Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chem Phys Lett* 1974;26:489–490.
57. Scigelova M, Hornshaw M, Giannakopoulos A, Makarov A. Fourier transform mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Jul;10(7):M111.009431.

58. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Cooks RG (2005) The orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 40:430–443.
59. Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem.* 2000; 72:1156–1162.
60. Hunt DF, Buko AM, Ballard JM, et al. Sequence analysis of polypeptides by collision activated dissociation on a triple quadrupole mass spectrometer. *BiomedMassSpectrom* 1982; 8:397–408.
61. Morris HR, Paxton T, Dell A, et al. High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996;10:889–96.
62. Le Blanc JC, Hager JW, Ilisiu AM, et al. Unique scanning capabilities of a new hybrid linear ion trap mass spectrometer (Q TRAP) used for high sensitivity proteomics applications. *Proteomics* 2003; 3:859–69.
63. Sleno L, Volmer DA. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2004; 39(10): 1091-112.
64. Wells JM, McLuckey SA. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Methods Enzymol.* 2005;402:148-85.
65. Harrison AG. To b or not to b: the ongoing saga of peptide b ions. *Mass Spectrom Rev.* 2009;28(4):640-54.
66. McLafferty FW, Horn DM, Breukler K., Ge Y, Lewis MA, Cerda B, Zubarev RA, Carpenter BK. Electron capture dissociation of gaseous multiply charged ions by Fourier-transform ion cyclotron resonance. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2001;12(3):245-9.
67. Zubarev RA, Horn DM, Fridriksson EK, Kelleher NL, Kruger NA, Lewis MA, Carpenter BK, McLafferty FW. Electron capture dissociation for structural

characterization of multiply charged protein cations. *Anal Chem.* 2000;72(3):563-73.

68. Mikesch LM, Ueberheide B, Chi A, Coon JJ, Syka JE, Shabanowitz J, Hunt DF. The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1764(12):1811-22.

69. Syka JE, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc. Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(26):9528-33.

70. Riley NM, Coon JJ. The Role of Electron Transfer Dissociation in Modern Proteomics. *Anal Chem.* 2018;90(1):40-64.

71. Griffin TJ, Lock CM, Li XJ, Patel A, Chervetsova I, Lee H, Wright ME, Ranish JA, Chen SS, Aebersold R. Abundance ratio-dependent proteomic analysis by mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003;75(4):867-74.

72. Wang M, You J, Bemis KG, Tegeler TJ, Brown DP. Label-free mass spectrometry-based protein quantification technologies in proteomic analysis. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2008;7(5):329-39.

73. Afkarian M, Bhasin M, Dillon ST, Guerrero MC, Nelson RG, Knowler WC, Thadhani R, Libermann TA, Optimizing a proteomics platform for urine biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics.* 2010; 9:2195–204.

74. Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem.* 2003; 75:663–70.

75. Keilhauer EC, Hein MY, Mann M. Accurate protein complex retrieval by affinity enrichment mass spectrometry (AE-MS) rather than affinity purification mass spectrometry (AP-MS). *Mol Cell Proteomics.* 2015; 14:120–35.

76. Vapnik VN. An overview of statistical learning theory. *IEEE Trans Neural Netw.* 1999; 10:988–99.
77. Van de Vijver M.J.A. Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2002; 347:1999-2009.
78. Hale JE. Advantageous uses of mass spectrometry for the quantification of proteins. *Int J Proteomics.* 2013;2013: 219452.
79. Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 2000;218:213–234.
80. Hamill K1, Kligys K, Hopkinson SB, Jones JC. Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. *J Cell Sci.* 2009;122: 4409–4417.
81. O'Brien LE, Jou TS, Pollack AL, Zhang Q, Hansen SH, Yurchenco P, Mostov KE. Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nat Cell Biol.* 2001;3: 831–38.
82. Wilson PD. Polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2004;350:151–64.
83. Shannon MB, Patton BL, Harvey SJ, Miner JH. A hypomorphic mutation in the mouse laminin alpha5 gene causes polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17:1913–22.
84. Joly D, Berissi S, Bertrand A, Strehl L, Patey N, Knebelmann B. Laminin 5 regulates polycystic kidney cell proliferation and cyst formation. *J Biol Chem.* 2006;281:29181–9.
85. Vijayakumar S, Dang S, Marinkovich MP, Lazarova Z, Yoder B, Torres VE, Wallace DP. Aberrant expression of laminin-332 promotes cell proliferation and cyst growth in ARPKD. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014; 306:640–54.
86. Joly D, Morel V, Hummel A, Ruello A, Nusbaum P, Patey N, Noël LH, Rousselle P, Knebelmann B. Beta4 integrin and laminin 5 are aberrantly expressed

in polycystic kidney disease: role in increased cell adhesion and migration. *Am J Pathol.* 2003;163:1791–800.

87. Mizushima H, Miyagi Y, Kikkawa Y, Yamanaka N, Yasumitsu H, Misugi K, Miyazaki K. Differential expression of laminin-5/ladsin subunits in human tissues and cancer cell lines and their induction by tumor promoter and growth factors. *J Biochem.* 1996;120:1196–202.

88. David G. Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *FASEB J.* 1993;7:1023–30.

89. Weksberg R, Squire JA, Templeton DM. Glypicans: a growing trend. *Nat Genet.* 1996;12:225–7.

90. Fabris A, Ferraro PM, Comellato G, Caletti C, Fantin F, Zaza G, Zamboni M, Lupo A, Gambaro G. The relationship between calcium kidney stones, arterial stiffness and bone density: unraveling the stone-bone-vessel liaison. *J Nephrol.* 2015; 28:549–55.