



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
della Facoltà di Medicina e Chirurgia

DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: DIABETOLOGIA

XX CICLO

TITOLO TESI

PROTEOMICA DI FIBROBLASTI CUTANEI COLTIVATI IN VITRO, OTTENUTI DA
BIOPSIE DI SOGGETTI NORMALI E DI PAZIENTI DIABETICI DI TIPO 1,
CARATTERIZZATI DALLA PRESENZA O ASSENZA DI COMPLICANZE
MICROVASCOLARI RENALI

Coordinatore: Ch.mo Prof. Silvano Todesco

Supervisore: Ch.mo Prof. Paolo Tessari

Dottorando: Millions Renato

DATA CONSEGNA TESI

Dedico questo lavoro a Manuela e Aurora

Indice

ABBREVIAZIONI	6
RIASSUNTO DEL LAVORO SVOLTO	7
INTRODUZIONE	9
LA NEFROPATIA NEL DIABETE DI TIPO 1	9
I FIBROBLASTI	10
LA PROTEOMICA.....	11
L'ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE	12
METODI	14
SELEZIONE DEI PAZIENTI	14
COLTURE CELLULARI	15
PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	15
SEPARAZIONE DELLE PROTEINE.....	16
I ^a dimensione: IEF.....	16
II ^a dimensione: SDS-PAGE:.....	17
VISUALIZZAZIONE ED ACQUISIZIONE DEI DATI	19
ANALISI DEI GEL 2-DE	19
IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE	21
ANALI WESTERN BLOT	22
ATTIVITÀ DELLA PIRUVATO CHINASI.....	22
ANALISI STATISTICA.....	23
RISULTATI E DISCUSSIONE	24
PROTEINE DEL CITOSCHELETRO O CORRELATE AL CITOSCHELETRO	32
PROTEINE COINVOLTE NEL METABOLISMO PROTEICO.....	37
PROTEINE COINVOLTE NEL METABOLISMO ENERGETICO	43
EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON ALTO GLUCOSIO.....	46
CONCLUSIONI	51
PUBBLICAZIONI:	52
BIBLIOGRAFIA	53

ABBREVIAZIONI

ACE	Enzima di conversione dell'angiotensina	MALDI TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Time of Fly Mass Spectrometer
AGE	Prodotti avanzati di glicazione	MBP	Pressione sanguigna media
ANOVA	Analisi della varianza	mRNA	RNA messaggero
AER	Albumin Escretion Rate	Mr	Massa Relativa
APS	Persolfato d'ammonio	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
ADP	Adenosinbifosfato	NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
ATP	Adenosintrifosfato	NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide ridotto
BMI	Indice di massa corporea	PEP	Fosfoenolpiruvato
CE	Classificazione enzimatica	pI	Punto Isoelettrico
CHAPS	3-[3-cholamidopropyl-dimethylammonio]-1-propane sulfonate	PBS	Tampone fosfato salino
DN	Nefropatia diabetica	PTM	Modifiche post translazionali
DNA	Acido deossi ribonucleico	RE	Reticolo Endoplasmatico
DTT	Ditiotreitolo	RNA	Acido ribonucleico
DS	Deviazione Standard	RBP	RNA binding protein
EDTA	Etilen Diammino Tetra Acetato	SEM	Errore Standard della Media
FBS	Siero bovino fetale	SDS	Sodio Dodecil Sofato
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	SDS-PAGE	Elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di SDS
HbA_{1c}	Emoglobina glicata	T1DM	Diabete Mellito di Tipo 1
HSP	Heat shock protein	TEMED	N,N,N',N'- Tetra Metilen Diammina
IEF	Isoelettrofocalizzazione	Tris	Tris idrossimetilaminometano
IGF	Insulin growth factor	2-DE	Elettroforesi Bidimensionale
IPG	Immobilized pH Gradient	C%	Quantità di cross-linker come percentuale del monomero totale
IR	Insulino resistenza	T%	Percentuale in peso del monomero totale (acrilamide+cross-linker)

Riassunto del lavoro svolto

Lo scopo del progetto di ricerca è stato individuare marker proteici di nefropatia diabetica DN, complicanza microvascolare che si manifesta in circa il 30% dei soggetti con diabete di tipo 1 e che spesso è associata a una maggior probabilità di sviluppo di malattie cardiovascolari e morte prematura rispetto ai soggetti diabetici non nefropatici.

Numerosi studi indicano che l'iperglicemia è la condizione necessaria ma non sufficiente nel determinare il danno renale associato al diabete. Infatti, l'incidenza della ND cresce progressivamente nei primi 15-20 anni di malattia per poi ridursi con il prosieguo di malattia. Tale andamento suggerisce l'esistenza di una suscettibilità individuale (genetica) al danno renale, indotta da fattori diversi dall'iperglicemia, e spinge all'identificazione precoce dei soggetti diabetici di tipo 1 a rischio di nefropatia e allo studio dei meccanismi patogenetici.

I fibroblasti umani rappresentano un modello cellulare sperimentale ideale, anche in quanto facilmente accessibile, per un'ampia ricerca sulle predisposizioni genetiche alla malattia diabetica e per lo studio dei meccanismi del danno cellulare e metabolico che portano allo sviluppo delle complicanze.

Abbiamo quindi messo a punto un protocollo sperimentale per l'estrazione delle proteine da fibroblasti in coltura e definito le condizioni sperimentali ottimali per ottenere gel 2-D riproducibili. Abbiamo quindi confrontato i profili proteici di fibroblasti in coltura, derivati da biopsie cutanee di pazienti affetti da diabete di tipo 1 di lunga durata (>15 anni) di malattia, con o senza ND.

Questa ricerca ha quindi permesso, in primo luogo, di ottenere maggiori e più approfondite conoscenze sul proteoma di fibroblasti derivati da soggetti umani e coltivati in vitro, dati utili come riferimento per successive indagini applicate a varie patologie anche non diabetiche.

In secondo luogo, il confronto fra gruppi delle mappe proteiche ha evidenziato variazioni significative nel livello quantitativo di varie proteine strutturali e di proteine di regolazione del metabolismo energetico e del turnover proteico. Parte dei risultati sono stati validati ed approfonditi con ulteriori analisi come western blot e test di attività enzimatica.

Tali dati, del tutto originali a livello internazionale, rappresentano un punto di partenza per successive indagini per l'identificazione precoce di soggetti con predisposizione genetica alla nefropatia e hanno messo in luce nuovi indizi per una migliore comprensione dei meccanismi fisiopatologici che portano allo sviluppo di tale patologia.

Infine è stato svolto il confronto dei livelli quantitativi di tutte le proteine identificate dopo l'esposizione a livelli elevati di glucosio, sia all'interno di ciascun gruppo che tra i tre gruppi ottenendo informazioni circa le proteine coinvolte nella risposta cellulare all'iperglicemia.

Summary

The target of this research project was to identify protein markers of diabetic nephropathy (DN), a microvascular complication which develops in about 30% of subject with type 1 diabetes and which is often associated with an increase risk of developing cardiovascular diseases and premature death in comparison with non nephropatic subjects.

Many studies indicate that hyperglycemia is a necessary although not sufficient condition to determine the diabetes associated renal damage. Indeed, the incidence of nephropathy reaches a maximum after 15-20 years of disease and thereafter it decreases. Such a behaviour is compatible with the existence of an individual susceptibility (genetic) to renal damage, induced by factors other than hyperglycaemia, thus highlighting the need for an early detection of the type 1 diabetic subjects with high risk of developing DN, and to clarify the pathophysiological mechanisms

Human fibroblasts represent an ideal experimental model, also because easily accessible, for an ample investigation on the genetic predisposition to diabetic disease, as well as to study of the mechanisms leading to cellular and metabolic damages occurring in diabetic complications.

We have established an experimental protocol for the extraction of proteins from cultured cells and we have defined the optimal experimental conditions to obtain reproducible 2-D gels.

So we compared protein profiles of cultured fibroblasts, harvested from skin biopsies of type 1 diabetic patients with long disease duration and with or without DN, and normal healthy subjects. This research has allowed, firstly, a more and deeper knowledge about human fibroblast proteome, useful data as a reference for subsequent investigations applied to the study of various diseases including non-diabetic.

Secondly, the comparison among groups showed significant changes in the amounts of some proteins including cytoskeletal proteins and proteins involved in energy metabolism and protein turnover. Some of these results have been validated with more depth analysis as western blot and enzymatic activity test.

These data, entirely original at the international level, represent a starting point for further investigations for the early identification of subjects with a genetic predisposition to DN and revealed new clues to understand physiopathological mechanisms that lead to the development of this pathology.

Finally we made the comparison of protein levels after exposure to high levels of glucose, within each group and among the three groups, obtaining information about proteins involved in cellular response to hyperglycemia.

INTRODUZIONE

La nefropatia nel diabete di tipo 1

La nefropatia diabetica (ND) è una complicanza microvascolare frequente sia nel diabete di tipo 1 sia in quello di tipo 2. Nel primo caso la prevalenza di nefropatia aumenta con la durata della malattia fino a superare il 30% dopo 20 anni [Batlle et al., 1995, Borch-Johnsen et al., 1992].

Questa complicanza è una delle principali cause di insufficienza renale terminale con ricorso a dialisi e a trapianto di rene [Viberti et al., 1992] ed è associata ad un aumentato rischio di malattia cardiovascolare e di morte prematura. Nelle prime fasi del suo sviluppo, la DN non si associa ad alcun sintomo clinico ma si rivela solo per la presenza di una quantità moderatamente elevata di albumina nelle urine (microalbuminuria). In condizioni normali, la quantità di albumina eliminata giornalmente con le urine non supera i 30mg/l. Si definisce microalbuminuria una quantità di albumina compresa fra 30 e 300mg/l. Oltre alla comparsa della microalbuminuria, altre caratteristiche della DN sono l'aumentata produzione di urine (iperfiltrazione), l'ipertrofia renale e glomerulare, l'espansione della matrice mesangiale e interstiziale e l'ispessimento della membrana basale glomerulare [Mason et al., 2003]. Negli stadi successivi, quando la DN progredisce, i pazienti sviluppano proteinuria e il tasso di filtrazione glomerulare (GFR) si riduce. L'escrezione di una quantità superiore ai 300mg viene definita invece macroalbuminuria ed è indicativa di una nefropatia conclamata. Quando la quantità di albumina secreta è superiore ai 300mg, il danno renale è di tale entità da consentire anche il passaggio di proteine diverse dall'albumina. Per questo il termine macroalbuminuria è interscambiabile con quello di proteinuria. Nel tempo la quantità di proteine disperse con le urine può crescere progressivamente fino a raggiungere valori superiori ai 3g nelle 24 ore. Ne deriva una riduzione della concentrazione di albumina nel sangue con conseguente comparsa di edema alle caviglie e successiva estensione ad altri distretti.

Anche se la valutazione della velocità di escrezione urinaria di albumina (AER) è attualmente, tra tutti i metodi non invasivi disponibili, il migliore per il riconoscimento precoce della malattia renale in pazienti diabetici, nella letteratura corrente esiste un'importante controversia sulla sua sensibilità e specificità (Caramori et al., 2000; Parving et al., 2002; Perkins et al., 2003; Ritz et al., 2003).

Studi osservazionali suggeriscono che l'insorgenza di nefropatia sia più frequente in pazienti diabetici con inadeguato controllo glicometabolico. Gli effetti dell'iperglicemia sono mediati da diversi meccanismi patogenetici, tra i quali: aumento della pressione intraglomerulare e della glicosilazione di proteine plasmatiche e tissutali con formazione di AGEs [Brownlee et al., 1988; Singh et al., 2001] attivazione della via dei polioli [Yabe-Nishimura 1998], e del sistema della proteina fosfochinasi C [Inoguchi et al., 1992; Koya et al., 1998].

L'efficacia delle terapie di controllo glicemico e pressorio sono determinanti per rallentare l'evoluzione della nefropatia diabetica verso l'insufficienza renale cronica. Tuttavia è chiaro che la glicemia di per sé, non è in grado di spiegare la variabilità del rischio di DN. Numerosi studi [Nasr et al., 1999; Worrall 1994] indicano che l'iperglicemia è la condizione necessaria ma non sufficiente nel determinare il danno renale associato al diabete. Infatti, l'incidenza della ND cresce progressivamente nei primi 15-20 anni di malattia per poi ridursi con il prosieguo di malattia. Tale andamento suggerisce quindi l'esistenza di una suscettibilità individuale (genetica) al danno renale, indotta da fattori diversi dall'iperglicemia.

Queste osservazioni hanno spinto alla ricerca di possibili marker genetici allo scopo di identificare precocemente i soggetti diabetici di tipo 1 a rischio di nefropatia e di chiarire i meccanismi patogenetici che portano a tale complicanza. Tuttavia, le ricerche di possibili alterazioni geniche sono finora risultate nel complesso deludenti. Se è stata trovata un'associazione tra complicanze renali e isoforme della PC-1 (plasma cell membrane glycoprotein 1) [De Cosmo et al., 2000], non sono al contrario risultate significative associazioni con altri geni candidati quali ACE (angiotensin converting enzyme) [Fujisawa et al., 1998; Staessen et al., 1997], PAI-1 (plasminogen activator inhibitor), decorina ed elicasi [De Cosmo et al., 1999].

L'identificazione precoce dei soggetti a rischio avrebbe un grande impatto sulla prevenzione dello sviluppo di complicanze, poiché indurrebbe ad un'intensificazione delle terapie abituali (controllo della glicemia, dell'ipertensione, delle infezioni, della dieta, ecc), e costituirebbe la base di partenza per lo sviluppo di una terapia più adeguata e mirata al fine di prevenire la progressione del declino della funzionalità renale. Il rallentamento dello sviluppo dell'insufficienza renale cronica potrebbe così posticipare il momento in cui tali pazienti debbono ricorrere alle terapie dialitiche, con rilevanti vantaggi anche dal punto di vista socio-sanitario.

I fibroblasti

Le colture cellulari primarie derivate da biopsie *in vivo* rappresentano un ottimo modello per allontanare le condizioni ambientali e rilevare le alterazioni geneticamente determinate [Trevisan et al., 1999; Lurbe et al., 1996].

I fibroblasti cutanei sono ampiamente utilizzati come un modello *in vitro* per studiare le modifiche costitutivamente espresse anche in altre cellule del corpo e, quindi, sono utilizzabili per lo studio dei fenotipi geneticamente associati alla patogenesi di una malattia, come ad esempio le complicanze croniche del diabete. Le colture di fibroblasti umani ottenute da pazienti con DN presentano maggiore sintesi del DNA, aumentata attività dell'antiporto Na^+/H^+ [Lurbe et al., 1996; Trevisan et al., 1992], della PKC [Iori et al., 2003] e riduzione dell'attività di pompe Ca^{2+} [Potestà et al., 2001].

Tutti questi fattori possono potenzialmente accelerare la crescita cellulare [Trevisan et al., 1992]. Alterazioni analoghe del controtrasporto Na^+/H^+ sono state evidenziate anche in Diabetici di Tipo 2 con microalbuminuria [Trevisan et al., 1996].

Queste differenze persistono anche dopo diversi passaggi delle cellule in coltura in normali concentrazioni di glucosio, suggerendo che esse siano intrinsecamente legate a una predisposizione genetica piuttosto che al *milieu* diabetico. Oltre a portare possibili fenotipi associati alla DN, i fibroblasti stessi svolgono un ruolo fondamentale nella patogenesi della sclerosi renale [Rossing et al., 1995; Valmadrid et al., 2000; Schena et al., 2005; Breyer 1992; Schleicher 1996], sono facili da reperire e adatti per l'applicazioni di studi di proteomica [Lehr et al., 2002].

La proteomica

L'identificazione dei geni costituisce la base di partenza delle indagini sulla predisposizione ereditaria alle malattie ma essa non evidenzia come le informazioni contenute nel DNA siano poi effettivamente trascritte, e come esse possano essere associate alle malattie. L'identificazione e la quantificazione in cellule o tessuti di tutte le proteine effettivamente espresse (proteomica), e non soltanto degli mRNA trascritti, è fondamentale, anche in quanto è stata riscontrata una disparità tra l'espressione degli mRNA e quella delle corrispondenti proteine [Griffin et al., 2002; Gygi et al., 1999].

La proteomica è una scienza più complessa della genomica per una lunga serie di motivi.

Il primo è correlato alla molteplicità delle molecole proteiche che possono derivare dall'espressione di un singolo gene. Infatti, tra la trascrizione genica ed il prodotto proteico finito possono aver luogo una serie di processi, quali uno splicing differenziato dell'RNA messaggero e tutta una serie di modifiche post-sintetiche, che caratterizzano il prodotto maturo e che incrementano la variabilità di una singola specie proteica. Isoforme, varianti o prodotti di modificazione post-sintetica non sono rilevabili con la sola informazione genomica. Parte della ricerca proteomica è volta a fornire la fotografia di uno stato cellulare, cioè la rappresentazione spaziale e temporale del contenuto proteico, comprendente anche tutte le varianti molecolari che dai singoli geni hanno origine.

Un'altra tra le principali caratteristiche del proteoma è il dinamismo e dipende dal fatto che l'eterogeneo contenuto proteico di una cellula cambia a seconda delle condizioni in cui essa si trova (ciclo cellulare, stress, trattamento farmacologico e/o patologico).

Caratteristica della proteomica è anche il modo in cui viene improntata la ricerca rispetto alle classiche scienze biologiche. Con le tecniche classiche, un ricercatore deve avanzare un'ipotesi a priori e poi pensare e realizzare un esperimento ad hoc che confermi o smentisca tale ipotesi. Al contrario con la proteomica l'approccio più utilizzato è quello di scegliere il sistema che ci interessa

ed analizzarlo in toto. Il confronto fra un tessuto sano ed uno malato può infatti mostrare un gran numero di proteine alterate. Ma è solamente l'identificazione di tutte queste proteine e della loro funzione che può permetterci a posteriori di comprendere il complesso meccanismo di insorgenza e progressione di una malattia. Quello proteomico è quindi un approccio, che ci aiuta a comprendere la realtà senza trascurare la complessità, che è parte di tutti i fenomeni biologici che caratterizzano la vita.

L'elettroforesi bidimensionale

La proteomica oggi rappresenta il filone di ricerca più avanzato in tutte le scienze biomediche e biologiche. La metodica principe è ancora la mappatura del contenuto di campioni biologici tramite elettroforesi bidimensionale (2-DE) e rappresenta un valido approccio per lo studio dei meccanismi pato-fisiologici del diabete e delle sue complicanze. Tale tecnica è attualmente l'unica che consente di separare migliaia di proteine, sia prodotti genici primari che polipeptidi modificati post-traduzionalmente, contemporaneamente su di un unico gel con una risoluzione ed una riproducibilità adeguata. Esistono, attualmente, tecniche di separazione alternative come ad esempio combinazioni di focalizzazioni isoelettriche capillari o cromatografie associate a spettrometria di massa, o l'uso di anticorpi immobilizzati su microchip [Celis et al., 1999; Borrebaeck et al., 2000; Legrain et al., 2000; Walter et al., 2000] ma nessuna di queste ha la capacità risolutiva dell'elettroforesi bidimensionale, soprattutto nei riguardi delle modificazioni post-traduzionali.

La 2-DE fu introdotta da O' Farrell nel 1975 [O' Farrell, 1975] e permette di separare i singoli componenti di una miscela di proteine tramite due processi elettroforetici successivi e abbinati ortogonalmente. In prima dimensione la separazione avviene in base alla carica delle proteine tramite isoelettrofocalizzazione (IEF) utilizzando specifiche strip di poliacrilammide (IPG strip): la migrazione avviene attraverso un gradiente di pH fino a che la somma delle cariche positive e negative si sarà annullata e la proteina non sarà più in grado di muoversi, indipendentemente dalla forza del campo elettrico applicato. La seconda dimensione invece si realizza tramite elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e garantisce che le proteine siano risolte in base alla massa relativa (Mr).

Ogni proteina, dopo opportuna colorazione del gel, è visualizzabile sul gel stesso come una macchia la cui intensità è proporzionale alla quantità della proteina. Con l'utilizzo di sistemi d'acquisizione specifici, i dati sono digitalizzati ed elaborati tramite software dedicati. La successiva identificazione delle proteine "anomale" offre informazioni utili per la comprensione delle basi delle patologie e per la scoperta di nuovi target terapeutici.

A tutt'oggi non esiste un'altra tecnica che possa fornire informazioni ricche e dettagliate sulle proteine in esame in termini di quantità relativa, pI, Mr e presenza di PTMs. Inoltre gli apparati elettroforetici impiegati per svolgere la 2-DE sono studiati per alloggiare più campioni simultaneamente, consentendo analisi highthroughput.

Nonostante l'alta efficienza di separazione, anche la 2-DE ha i suoi limiti.

In molti casi le proteine diverse ma con Mr e pI simili sono talmente vicine fra loro da essere visualizzate nel gel come degli strisci (smear) e non più come macchie distinte mentre le proteine poco abbondanti o "rare", che però, in molti casi, rivestono ruoli essenziali a livello fisiologico, risultano spesso mascherate da quelle presenti in quantità superiori.

Per ridurre questo effetto mascheramento/oscurante da parte delle proteine più espresse, e per aumentare la risoluzione delle mappe proteiche, si rende spesso necessaria una fase di arricchimento del campione iniziale in alcune proteine d'interesse. Fra le metodiche utilizzate per il conseguimento di tale scopo vi sono, ad esempio, la centrifugazione differenziale o la solubilizzazione selettiva delle proteine cellulari, finalizzate al frazionamento delle strutture subcellulari (mitocondrio, reticolo endoplasmatico, nucleo, etc.) di cui si vuole analizzare il proteoma specifico. Anche diverse tecniche cromatografiche vengono spesso utilizzate per selezionare una o alcune particolari "classi" proteiche.

Un'altra difficoltà è costituita dalla minor solubilità delle proteine idrofobiche, rispetto a quelle idrofiliche, nei tamponi che si usano per l'IEF e dal minor rilevamento di proteine con Mr troppo piccolo (<8 kDa) o troppo grande (>200 kDa).

METODI

Selezione dei pazienti

Sono stati reclutati tre gruppi di soggetti paragonabili per sesso, età, MBP e BMI. Il primo gruppo comprendeva soggetti di controllo, sani e senza familiarità per ipertensione e diabete. Gli altri due gruppi erano costituiti da pazienti con diabete tipo 1 con e senza nefropatia, in base all'escrezione urinaria di albumina (AER). L'AER è stata determinata in tre campioni d'urina durante la notte tramite saggi radioimmunologici (Immunotech, Beckman Coulter Co, Praga, Repubblica Ceca).

I pazienti diabetici presentavano un controllo metabolico sovrapponibile (emoglobina glicata, HbA_{1c}) e una durata di malattia superiore ai 15 anni. La lunga durata di malattia garantisce che i soggetti diabetici che non hanno ancora sviluppato complicanze micro-vascolari con molta probabilità non le svilupperanno più nel resto della vita.

Tutti i pazienti diabetici con DN, e due di quelli senza DN, erano trattati per l'ipertensione con farmaci ipotensivi (ACE inibitori, calcio antagonisti, vasodilatatori, diuretici), da soli o in combinazione. Tutti i farmaci sono stati sospesi il giorno prima dello studio. Due dei pazienti con DN presentavano una insufficienza renale di grado moderato-grave (concentrazione della creatinina plasmatica di 588 e 860 μmol/L rispettivamente), mentre un terzo paziente aveva solo un lieve aumento rispetto ai valori normali (119 μmol/L). Negli altri soggetti, la funzionalità renale era normale. Gli obiettivi dello studio sono stati spiegati in dettaglio ed ogni soggetto ha firmato il consenso alla partecipazione dello studio. Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico della Facoltà di Medicina presso l'Università di Padova, in Italia, ed è stato eseguito secondo la dichiarazione di Helsinki (revisione del 1983).

	Normal control subjects	T1DM patients without nephropathy	T1DM patients with nephropathy
N°. (maschi/femmine)	2/3	2/3	2/3
Età (anni)	37 ± 4.6	39.4 ± 5	35.6 ± 3.8
BMI (kg/m ²)	22.9 ± 1.2	24.1 ± 0.4	22.2 ± 1.2
MBP (mmHg)	93.3 ± 10	95.2 ± 2.7	99.1 ± 6.8
Creatinina sierica (μmol/l) (range)	86 ± 8.5 (79-94)	85 ± 5.9 (69.8-91.9)	347.3 ± 160 (73-860)
Durata di diabete (anni)	-	22.8 ± 3.2	21.8 ± 4.5
HbA _{1c} (%)	-	9.3 ± 0.8	10.5 ± 1.3
AER (μg/min) (range)	-	9.9 (0-11.3)	662.5 (625-922)

Tabella 1: I parametri clinici dei pazienti con T1DM con e senza DN e dei normali soggetti di controllo. I valori sono riportati come medie ± SEM, tranne che per tasso di escrezione di albumina che è riportata come mediana e intervallo.

Colture cellulari

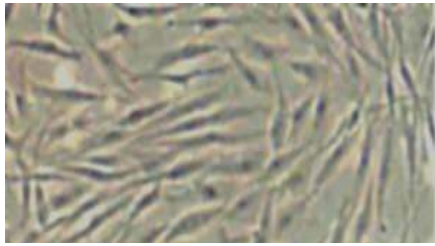


Figura 1: immagine di fibroblasti umani in coltura

L'espianto cutaneo, eseguito mediante anestesia locale sulla superficie volare dell'avambraccio, delle dimensioni di circa 2x3 mm, viene suddiviso con un bisturi in piccoli pezzetti distribuiti poi in fiasche da 25 cm². Dopo l'aggiunta del terreno HAM'S F-10 Nutrient Mixture (Eurobio, Les Ulis Cedex B, France) addizionato con il 20% di siero bovino fetale (FBS, Eurobio), 1 mM di glutamina (Eurobio), 100 U/ml di penicillina (Eurobio) e 100 µg/ml di streptomycin (Eurobio), le fiasche sono mantenute a 37°C. Il terreno viene cambiato ogni 3-4 giorni. Solitamente, i fibroblasti sono visibili dopo 4-5 giorni d'incubazione e arrivano alla confluenza dopo circa 4 settimane (Figura 1). Quando le cellule sono a confluenza, il terreno viene aspirato e il monostrato viene lavato 3 volte con una soluzione fosfato-salina (PBS). I fibroblasti vengono staccati con aggiunta di 0.05% di tripsina-0.02% EDTA (Eurobio), trasferiti in fiasche da 75 cm² e coltivati con il terreno di crescita al 10% di FBS. Dopo il terzo passaggio, le cellule vengono congelate e conservate in azoto liquido. Per ogni esperimento le cellule sono state utilizzate sempre all'ottavo passaggio e coltivate nel medium in presenza di normali concentrazioni di glucosio (6 mM) o di alto glucosio (21 mM) per 72 ore.

Preparazione del campione.

La fase di preparazione del campione è molto importante, l'obiettivo finale è quello di raggiungere il maggior grado possibile di solubilizzazione, disaggregazione, denaturazione e riduzione delle proteine contenute nel campione.

Prima d'ogni esperimento i fibroblasti sono incubati per 24 ore con terreno quiescente privo di siero. Le cellule vengono lavate 3 volte con PBS. Ad ogni fiasca vengono aggiunti 250µl di tampone di lisi composto da urea 8M, CHAPS 4% p/v, IPG buffer 2%, al quale, al momento dell'uso, si aggiunge un cocktail di inibitori delle proteasi. Il lisato viene quindi raccolto, trasferito in provette e sottoposto a 3 cicli di congelamento-scongelo in N₂ liquido e sonicazione in ghiaccio. Dopo la lisi cellulare, il materiale insolubile è eliminato mediante centrifugazione a 14000 g a 4°C per 15 minuti. Successivamente il campione proteico viene concentrato utilizzando apposite provette (Microcon-Amicon, Millipore Corporation, Bedford, MA 01730 USA) provviste di un filtrino con un cut-off di 3000 dalton. Questo passaggio di concentrazione permette anche una parziale rimozione dei sali dal campione. Il contenuto proteico è stato determinato mediante il metodo di Lowry modificato [Lowry et al., 1951].

Separazione delle proteine

Le proteine sono separate utilizzando due steps di elettroforesi: il primo in gradiente di pH (prima dimensione), il secondo mediante SDS-PAGE (seconda dimensione).

I^a dimensione: IEF

L'IEF è un metodo elettroforetico ad alta risoluzione che separa le proteine in base al loro punto isoelettrico. Le proteine sono molecole anfotere che possono avere carica netta negativa, positiva o uguale a zero a seconda del pH dell'ambiente circostante. Il prerequisito per una separazione altamente riproducibile è la presenza di un gradiente di pH stabile e continuo con una conducibilità regolare e costante. Infatti, intali condizioni e sotto l'effetto di un campo elettrico, una proteina si muoverà verso il punto nel quale la sua carica netta è nulla. Di fondamentale importanza, per la diffusione dell'elettroforesi bidimensionale, è stata l'introduzione dei gradienti di pH immobilizzati in sostituzione di quelli generati con anfotiti trasportatori. La tecnica dei gradienti di pH immobilizzati, proposta nel 1982 (Bjellqvist et al., 1982), è basata sull'incorporazione covalente di tamponi di immobiline, determinanti il pH, nella matrice di poliacrilamide. Un'immobilina è un acido o una base debole definita dal suo valore di pK, contenente catene laterali cariche con capacità tamponanti. Il pH in ogni punto del gel è determinato dalla misura di immobiline che si trovano in quel punto ed è stabile.

Nel nostro caso sono state usate strisce di gel preformati di acrilamide/bisacrilamide (T=4%, C=3%) copolimerizzati su un supporto di plastica con la miscela di immobiline (IPG strip), che sono disponibili in commercio in forma disidratata e congelata. E' possibile scegliere strip di diversa lunghezza e con diverso gradiente di pH. Nel nostro caso abbiamo usato strip di 24 cm e intervalli di pH tra 3-10 e 4-7. Le IPG strip sono state conservate disidratate alla temperatura di -20°C e, al momento dell'uso, sono state lasciate 10 minuti a temperatura ambiente, per evitare rotture dello strato di gel quando si toglie la sottile pellicola di protezione che le ricopre.

I campioni sono stati solubilizzati in 450µl di una soluzione di reidratazione: 8 M urea, 2% CHAPS, 0.5 % IPG buffer, 1% DTT, tracce di blu di bromofenolo). L'aggiunta di olio minerale fino a coprire completamente la strip permette di minimizzare il contatto con l'aria, responsabile dell'evaporazione che può facilitare la cristallizzazione dell'urea durante la reidratazione. L'IEF è stata condotta sull'apparecchio IPGphor Isoelectric Focusing (Amersham Biosciences), alla temperatura costante di 20°C. L'IEF viene condotta a voltaggi molto alti (fino ad un massimo di 8000V) e a correnti molto basse (fino ad un valore massimo di 50µA per IPG strip). Un tipico protocollo isoelettroforetico è caratterizzato da una serie di steps in cui il voltaggio viene aumentato gradualmente fino al valore finale desiderato per il focusing. Il voltaggio iniziale è, solitamente,

basso per minimizzare l'aggregazione del campione e per favorire l'entrata del campione nel gel di poliacrilamide, in particolare delle proteine ad elevato peso molecolare.

Nel nostro caso, per la IEF con strip da 24 cm e gradienti di pH 4-7 e 3-10, abbiamo seguito il protocollo riportato in Tabella 2:

Step	Vtaggio (V)	$\mu\text{A}/\text{strip}$	Tempo
Reidratazione	50	50	12h
1 (Step and hold)	200	50	1h
2 (Step and hold)	500	50	1h
3 (Step and hold)	1000	50	1h
4 (gradient)	1000-8000	50	4h
5 (Step and hold)	8000	50	4h

Tabella 2: Protocollo di isoelettrofocalizzazione

Prima di separare le proteine in seconda dimensione è necessario equilibrare le IPG strip in una soluzione fortemente denaturante per risolubilizzare le proteine e favorirne il trasferimento dalla prima alla seconda dimensione. L'equilibratura avviene in due steps: nel primo le strip vengono trattate con una soluzione SDS e DTT, per denaturare e ridurre le proteine; nel secondo si usa la stessa soluzione in cui il DTT è sostituito dalla iodoacetamide, per l'alchilazione dei gruppi sulfidrilici e per inibirne una eventuale riossidazione.

II^a dimensione: SDS-PAGE:

La seconda dimensione della 2-DE è un'elettroforesi su gel di poliacrilamide condotta in presenza di SDS (SDS-PAGE). L'SDS è un detergente anionico in grado di legarsi alle proteine in modo indipendente dalla composizione aminoacidica provocandone la denaturazione, la distruzione dei legami a idrogeno, la rottura dei ponti di solfuro, la perdita della struttura secondaria e terziaria. In presenza di un eccesso di SDS, per ogni grammo di proteina si legano circa 1.4 g di detergente, fornendo alla proteina una quantità di carica negativa costante per unità di massa e permettendo la separazione proteica esclusivamente in base alla massa molecolare relativa (Mr). I complessi proteina-SDS, si muoveranno verso il polo positivo del campo elettrico e, per le proprietà di setaccio molecolare del gel, la mobilità risulta essere inversamente proporzionale al \log_{10} della Mr.

Le proteine, già separate in base al loro pI, migrano dalla prima alla seconda matrice di separazione grazie all'azione di un campo elettrico esterno. I gel vengono polimerizzati contemporaneamente (fino ad un massimo di 6) nella camera di polimerizzazione (Ettan Dalt VI gel caster, Amersham

Biosciences). Le singole camere di polimerizzazione consistono di due vetri (27 x 21 cm) uniti a libro da una striscia di silicone; sui due lati sono posizionati due spaziatori aventi uno spessore di 1.0 mm. Se si polimerizzano meno di 6 gel, lo spazio che rimane inutilizzato viene occupato da spaziatori specifici. Per la separazione in seconda dimensione abbiamo utilizzato gel con una concentrazione d'acrilamide pari al 12%, che offre una buona risoluzione delle proteine comprese tra 14 e 120 KDa. La composizione dei gels è: 12% di soluzione stock di acrilamide/bisacrilamide (40%T, 2.5%C), TRIS-HCl 1.87 M pH 8.8, APS 0.5%, TEMED 0.03%.

Appena il gel polimerizza, viene versato delicatamente del tampone elettroforetico sui bordi a contatto con l'aria al fine di mantenere la superficie superiore del gel completamente piatta ed omogenea. Il gel viene lasciato polimerizzare per circa 2 ore a temperatura ambiente. La superficie superiore di ciascun gel, regione in cui sarà caricata la strip, viene sciacquata con acqua bidistillata per eliminare gli eventuali residui di acrilamide e poi asciugata con piccoli ritagli di carta assorbente. La strip viene inserita tra i due vetri e successivamente si aggiunge una soluzione bollente di agarosio allo 0.5% sciolto nel tampone di corsa elettroforetica. Una volta raffreddatosi, l'agarosio fornisce una soluzione di continuità per il passaggio di proteine tra la prima e la seconda matrice d'acrilamide. La composizione del tampone di corsa è TRIS 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%. La SDS-PAGE viene fermata quando il tracciante ha raggiunto il bordo inferiore del gel e viene condotta a temperatura costante (20°C) ed a voltaggio costante (75V).

Per maggior chiarezza, riportiamo una immagine esemplificativa della 2-DE in Figura 2.

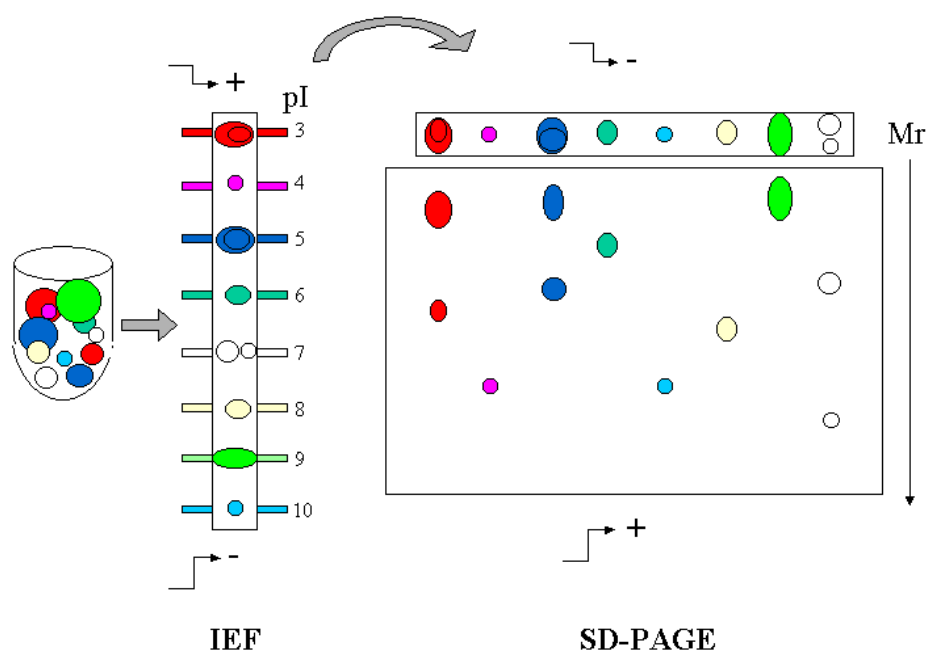


Figura 2: immagine esemplificativa della 2-DE

Visualizzazione ed acquisizione dei dati

Per la messa a punto del protocollo usato in questo progetto, è stato utilizzato il colorante Coomassie Colloidale Brilliant Blue. I vantaggi di questo colorante sono i seguenti: è compatibile con la successiva analisi in spettrometria di massa degli spot proteici; è lineare e quindi utilizzabile per valutazioni comparative; è più sensibile rispetto al Coomassie Blue “classico”; è economico e riciclabile. I gel sono stati colorati per tre ore e decolorati overnight con una soluzione acquosa d’acido acetico (7%) e metanolo (10%).

Dopo la fase di colorazione/decolorazione, l’immagine è stata acquisita con uno scanner a trasmittanza (Epson Expression 1680 Pro, 16 bit, risoluzione 300 DPI) che converte i valori di scala di grigio in densità ottica.

Analisi dei gel 2-DE

Le mappe proteiche sono state analizzate con un software dedicato (Proteomweaver, BioRad, CA) per ottenere il maggior numero d’informazioni possibili e cogliere le differenze esistenti tra gel provenienti da gruppi di pazienti diversi. Le operazioni principali che il programma permette di compiere per ciascun gel prevedono:

- 1) Sottrazione del background: tutte le immagini dei gels contengono in varia misura un certo background che deriva dalla colorazione e dall’acquisizione dell’immagine. Per un’accurata misurazione occorre rimuoverlo prima di procedere al matching, operando con diverse modalità, sia manuali che automatiche, che possono essere impostate di volta in volta.
- 2) Valutazione degli spots: dal menù principale è possibile impostare i parametri che il programma deve utilizzare per “vedere” gli spots sul gel, che possono essere applicati solo al gel in esame o mantenuti costanti per processare una serie di più gel che appartengono allo stesso esperimento. I parametri sono:

-intensità: è calcolata come il volume di uno spot rispetto al rumore di fondo;

-contrasto: altezza di uno spot rispetto al rumore di fondo;

-raggio: larghezza di uno spot.

Il programma è dotato di una funzione che rende possibile l’intervento manuale per rifinire la forma e le dimensioni di certi spots non correttamente interpretati dalla funzione automatica, per aggiungerne o eliminarne e per separare tra loro due spots che, essendo vicini, non vengono visti distintamente e considerati come un tutt’uno.

3) Misurazione degli spots: la misura d'ogni spot rappresenta la sua abbondanza nell gel e genera le informazioni che servono poi per il confronto quantitativo. Viene effettuata in automatico dal software in contemporanea alla visualizzazione (Figura 3).

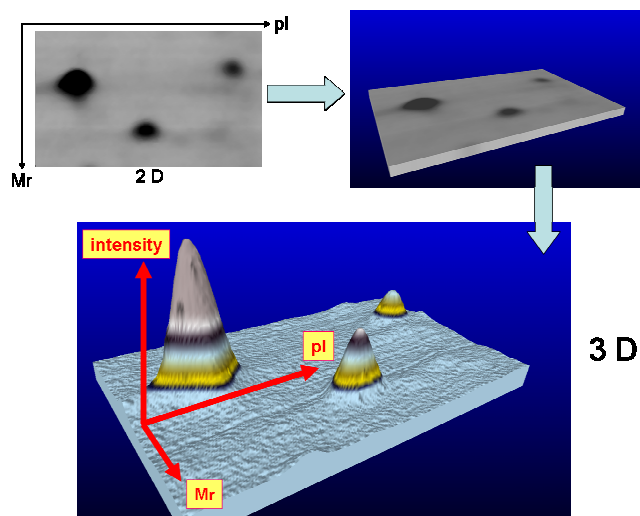


Figura 3: Misurazione dell'intensità degli spot in un gel 2-DE

Dopo la fase d'acquisizione degli spot, ad ogni spot acquisito viene assegnato un numero di identificazione che permetterà in seguito una tabulazione ordinata dei dati accumulati.

4) Spot matching: il matching effettua un abbinamento degli spot che su gel diversi occupano le stesse posizioni (Figura 4). Calcolando i rapporti fra le distanze tra spot, il programma è in grado di deformare (warping process) le immagini per migliorare la sovrapposibilità delle diverse mappe. Spots visualizzati su due gels che non coincidono per posizione e/o per intensità vengono evidenziati dal software con un codice a colori che permette di cogliere facilmente le variazioni.

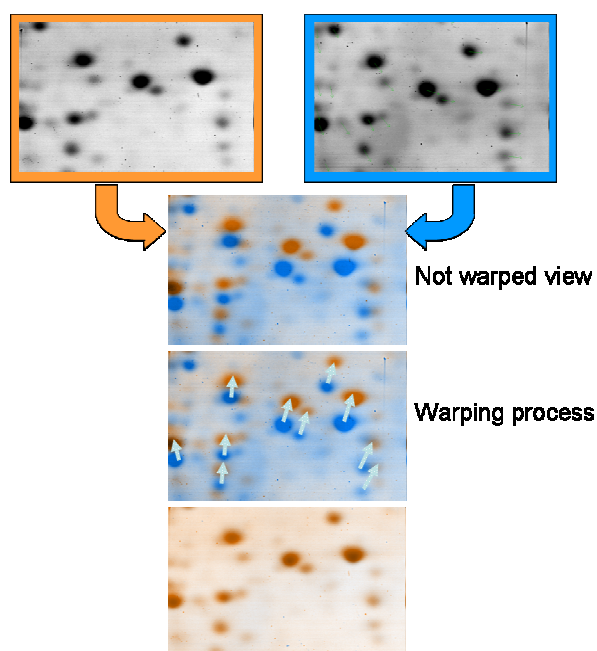


Figura 4: Elaborazione che porta alla sovrapposizione degli spot di mappe 2-DE diverse

5) Normalizzazione:

Esistono “variabili strumentali/operative”, come errori di caricamento e/o di quantificazione del campione e differente durata del processo di colorazione/decolorazione dei gel, che possono alterare la riproducibilità dei risultati e creare falsi positivi. Grazie a complessi calcoli matematici, il processo di normalizzazione serve a ridurre la variabilità sperimentale. La normalizzazione è svolta automaticamente dal software e solo dopo questo passaggio è possibile confrontare quantitativamente le intensità degli spots in gel diversi.

Identificazione delle proteine

L'identificazione delle proteine è stata eseguita mediante spettrometria di massa. Queste analisi sono state svolte grazie alla collaborazione con il laboratorio ProteinTechnology Walleberglab, di Lund, Sweden. Gli spot sono stati prelevati manualmente dal gel (Figura 5), decolorati e trattati con tripsina in modo da ottenere la digestione delle proteine.



Figura 5: Prelievo manuale degli spot da gel 2-DE

Dopo desalificazione mediante colonne C18 ZipTip (Millipore, Billerica, MA), i campioni sono stati analizzati utilizzando uno strumento MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation-Time of Fly Mass Spectrometer, della Micromass) usando come matrice l'acido alfa-ciano-4-idrossicinnamico (Sigma). Gli spettri ottenuti sono stati confrontati con quelli presenti in database, accessibili on-line, di proteine umane, utilizzando i motori di ricerca MASCOT (Matrix Science, UK) e PIUMS (www.hh.se/staff/bioinf). I campioni non identificabili mediante confronto delle masse dei peptidi, sono stati ulteriormente processati con lo strumento AP-MALDI-Ion Trap (MassTech/ThermoFinnigan) e gli spettri MS/MS sono stati analizzati con il motore di ricerca Mascot ed esaminati manualmente per ulteriore conferma.

Anali western blot

E' stata eseguita la quantificazione di moesina, caldesmon e beta tubulina in tutti i campioni analizzati tramite western blot. Il fibroblasti sono stati lavati tre volte con PBS e lisati in TRIS-HCl pH 7.2 62.5 mM, glicerolo 10%, SDS 10% e 2-mercaptoetanololo 2%.

Il contenuto proteico è stato misurato in base al metodo di Lowry [Lowry et al., 1951]. Gli estratti di proteine (50µg) sono stati separati in SDS-PAGE al 10% e poi trasferiti in un filtro di nitrocellulosa (Hybond ECL Amersham Life Science). Le membrane sono state bloccate con latte in polvere al 5% sciolto in PBS contenente 0,01% di Tween 20 (PBST) per 6 ore a temperatura ambiente e incubate con anticorpi contro moesina (mouse monoclonal anti-moesin 1:500, Santa Cruz Biotechnology), caldesmon (goat polyclonal anti-caldesmon 1:500, Santa Cruz Biotechnology), e beta tubulina (mouse monoclonal anti-β-tubulin 1:1000, Santa Cruz Biotechnology) a 4°C durante la notte. In seguito, le membrane sono state lavate tre volte per 10 min con soluzione PBST e incubate con IgG anti-mouse coniugata con perossidasi per moesina e β-tubulina, diluito 1:10000 con PBST, e con IgG anti-goat coniugata con perossidasi per H-caldesmon, diluito 1:10000 con PBST. Tale incubazione è avvenuta per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio con PBST, l'espressione delle proteine è stata rilevata in chemiluminescenza (Super Signal West Pico Chemiluminescent, PIERCE Rockford, IL, USA), seguendo le istruzioni del produttore. L'intensità del segnale è stata quantificata tramite l'apparato VersaDoc Imaging System (Bio-Rad). I valori sono stati normalizzati verso la proteina housekeeping GAPDH.

Attività della piruvato chinasi

Alla confluenza, ad ogni coltura di fibroblasti è stato aggiunto il terreno quiescente (privo di siero) per 24 ore. Il mezzo è stato quindi rimosso e le cellule sono state lavate con PBS. Le cellule sono state raccolte in 250µl di soluzione contenente trietanolamina 100mM, EDTA/Na⁺ 0.5mM (pH 7.6), inibitori di proteasi e lisate tramite sonicazione. Dopo centrifugazione a 14000 x g per 15 minuti (4 °C), il supernatante è stato utilizzato per la determinazione delle proteine [Lowry et al., 1951] e per il dosaggio enzimatico. L'attività della piruvato chinasi (PK, EC.2.7.1.40) è stata stimata con il metodo sviluppato da Gutmann e Bernt [Gutmann et al., 1974]. Brevemente, questo test si basa sulla variazione d'assorbanza del NADH a 340 nm (25°C) che avviene a causa della conversione del piruvato a lattato, reazione catalizzata dalla lattato deidrogenasi (EC.1.1.1.27; LDH). La soluzione conteneva trietanolamina 97.5mM pH 7.5, MgSO₄ 13mM, KCl 74mM, NADH 185 µM, fosfoenolpiruvato (PEP) 1mM, LDH 2.5U/ml, ADP 3mM. I test enzimatici sono stati ripetuti tre volte per ogni soggetto e la media dei valori ottenuti è stata usata per l'analisi statistica.

Analisi statistica

Per quanto riguarda gli esperimenti svolti a normale concentrazione di glucosio, le elaborazioni statistiche dei risultati sono state eseguite applicando l'ANOVA (Statistica, StatSoft Italia srl).

Per quanto riguarda il confronto con i dati ottenuti ad alto glucosio abbiamo utilizzato il test T di Student a dati appaiati per l'analisi intra-gruppo e l'ANOVA a misure ripetute per l'analisi tra gruppi. Una volta eseguiti i test ANOVA ed evidenziata la presenza di disuguaglianze, abbiamo applicato il test post hoc di Bonferroni per il confronto fra gruppi. Valori di p inferiore a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativa. I dati sono presentati come medie \pm SEM.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi proteomica mira al reale profilo proteico che è la chiave degli eventi regolatori dei processi cellulari e fornisce un approccio che, rispetto alle tecniche di studio dell'mRNA, è potenzialmente più comprensivo nel chiarire i meccanismi fisiopatologici che sono alla base dell'insorgenza delle malattie.

I protocolli di studio basati sulla 2-DE richiedono un lavoro accurato per stabilire i parametri ottimali di esecuzione. Una volta ottimizzato l'intero processo, questa tecnologia presenta potenzialità uniche, di grande utilità per lo studio delle proteine e delle loro implicazioni fisiopatologiche.

La riproducibilità delle mappe bidimensionali è un prerequisito essenziale per un'accurata analisi proteomica. Secondo quanto riportato da Nisihara [Nisihara 2002], partendo da campioni proteici complessi, come ad esempio lisati cellulari totali, circa il 6-20% degli spots non risultano accoppiabili. Tenendo quindi conto della variabilità biologica di soggetti differenti, è innanzi tutto necessario avere un numero sufficiente di campioni biologici di partenza su cui svolgere un numero di repliche che consenta di effettuare successivamente un'analisi statistica dei risultati. A tal fine ogni esperimento è stato svolto in duplicato.

Poiché anche tutte le variazioni sperimentali possono influenzare il risultato finale (variabilità tecnica), ogni attività è stata svolta nelle stesse condizioni e usando gli stessi materiali al fine di avere tutti i prerequisiti per una massima affidabilità. Quindi, per garantire tali prerequisiti, le cellule sono state coltivate usando lo stesso incubatore, lo stesso terreno di coltura e gli stessi prodotti chimici necessari (vedi "Metodi") e per ogni esperimento le cellule sono state utilizzate sempre tra il 7° e l'8° passaggio. I cicli di congelamento-scongelo e di sonicazione in ghiaccio hanno garantito una lisi completa delle cellule che è stata svolta in presenza di un cocktail di inibitori di proteasi per ridurre il rischio di degradazione. I campioni proteici sono stati conservati a -20°C.

Una volta ottenute le mappe proteiche bidimensionali, per avere una comparazione accurata degli spots è stato usato il software Proteomweaver che permette l'acquisizione, misurazione e confronto (matching) degli spots proteici nei diversi gel. Anche se il programma sarebbe in grado di svolgere tutte queste operazioni in modo automatico, ogni passaggio è stato controllato manualmente.

Per stimare la riproducibilità dei risultati ottenuti, sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- efficienza di matching: indica la percentuale di "matched spot" rispetto al numero totale di spot acquisiti e rappresenta una valutazione qualitativa;
- variazione d'intensità di "matched spots": rappresenta una valutazione quantitativa.

Entrambe queste informazioni sono ottenibili tramite la creazione di uno “scatter plot” per ogni coppia di gel confrontata. Lo scatter plot è un diagramma di dispersione: sugli assi cartesiani sono inseriti le intensità degli spots dei gel confrontati mentre i punti all'interno del grafico rappresentano gli appaiamenti tra spots. Il numero d'appaiamenti (e quindi di punti all'interno del grafico), rispetto al numero totale di spots rilevati nei gel, rappresenta l'efficienza di matching. Matched spots con la stessa intensità si trovano sulla diagonale (bisettrice) del grafico. La distanza dalla diagonale è una misura della differenza dell'intensità della proteina nei due gel.

Grazie alla visualizzazione dei dati, è risultato evidente che oltre novanta per cento degli spots visibili nell'intervallo di pH 3-10 era compreso nella zona tra 4 e 7.

Inoltre con le IPG strip 3-10, anche se la maggior parte delle proteine apparivano ben separate (una tipica mappa di questi esperimenti è mostrata in Figura 6A), la analisi in MS ha mostrato più di una proteina, in alcuni spot che erano apparentemente unici. A titolo d'esempio, nello spot #19 l'analisi in MS ha rivelato la presenza di tropomyosin 4 e tropomyosin 4-ALK fusion oncoprotein di tipo 2, mentre nello spot #68 sono stati identificati insieme la HSP cognate 71 kDa e la vimentina. Poiché la quantificazione attraverso la 2-DE si basa sull'assunzione che in ciascuno spot sia presente una sola proteina, i fenomeni di co-migrazione possono compromettere questa analisi [Campostrini et al., 2005]. In questi casi una buona strategia per risolvere, almeno in parte, questo problema è l'aumento fisico dello spazio di risoluzione in prima dimensione con l'utilizzo di gradienti di pH ristretti. Pertanto, tutti i campioni sono processati utilizzando IPG strip con pH 4-7 (Figura 6B). Questo intervallo di pH anche ci ha permesso non solo di migliorare le risoluzioni ma anche di rilevare le proteine meno abbondanti, in quanto da IPG strip con intervalli di pH stretti è possibile aumentare la quantità di proteine caricabili.

In Figura 6 riportiamo un'immagine dove sono confrontate due mappe proteiche bidimensionali rappresentative. Nella prima mappa (gel A) sono state usate strip con un intervallo di pH ampio (3-10) mentre nella seconda mappa (gel B) sono state usate strip con un intervallo di pH più stretto (4 a 7).

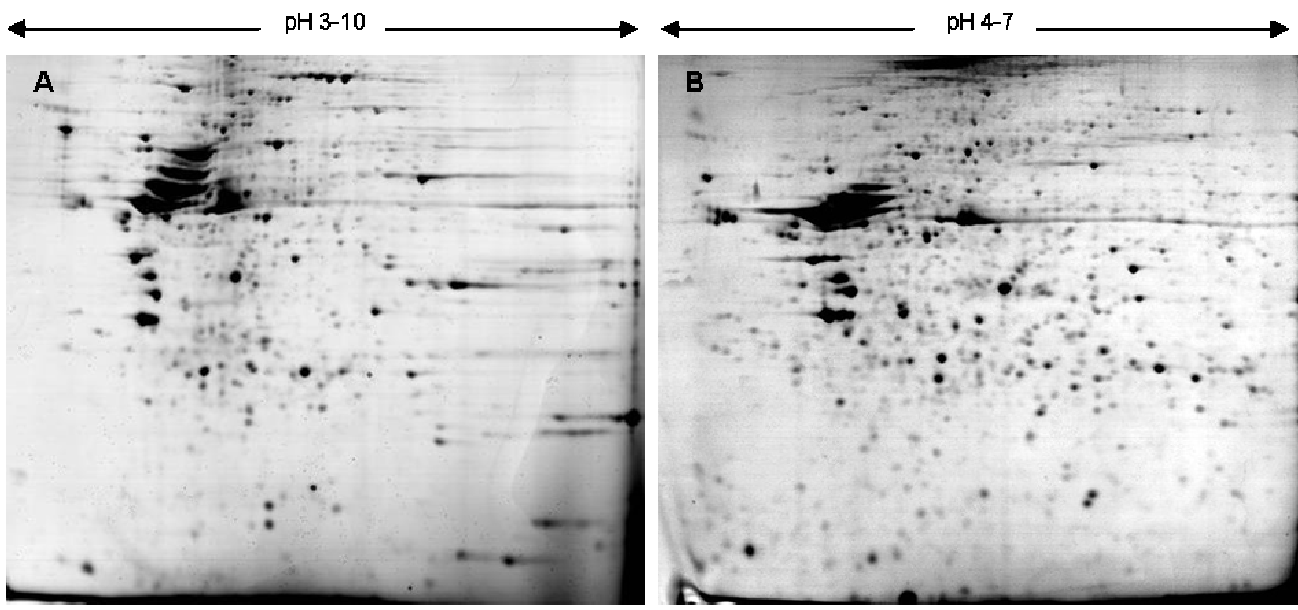


Figura 6: Immagini rappresentative delle mappe bidimensionali ottenute da fibroblasti umani in coltura usando IPG strip con intervallo di pH 3-10 (A) e 4-7 (B).

Il primo risultato, usando le IPG strip con l'intervallo di pH 4-7, è stato un significativo aumento ($p < 0.05$) del numero di spots rilevabili, caratterizzati inoltre da una miglior risoluzione, evidente anche visivamente (Figura 6B).

L'impressione visiva è stata confermata confrontando i dati d'efficienza di matching e d'intensità degli spots ottenuti usando i due diversi intervalli di pH. Riportiamo, in Figura 7, gli scatter plot rappresentativi dei risultati ottenuti usando le strip con diverso intervallo di pH.

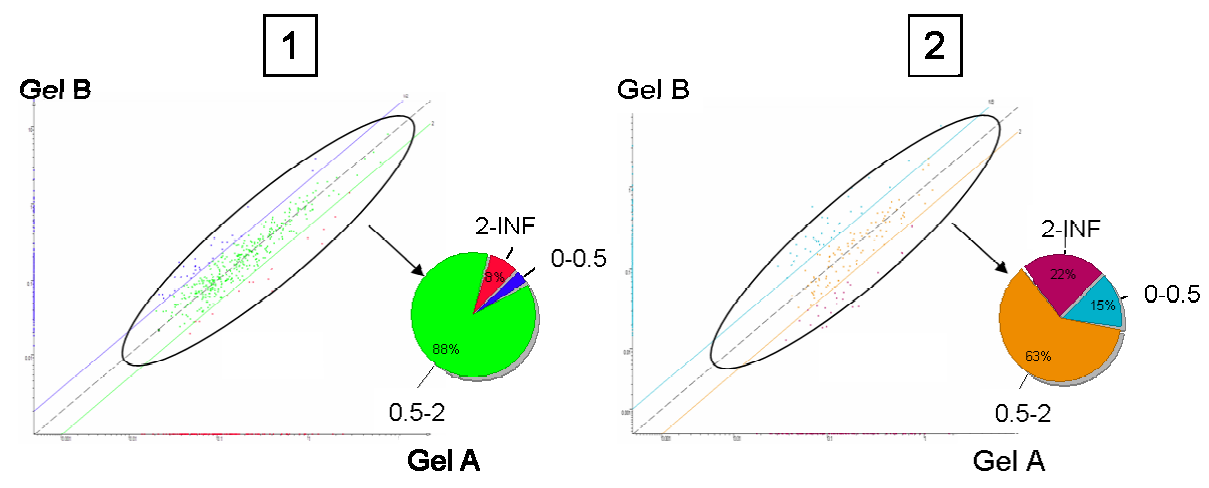


Figura 7: Scatter plot rappresentativi del confronto tra mappe bidimensionali ottenute utilizzando l'intervallo di pH 4-7 (1) e 3-10 (2). Nei grafici a settori circolari sono rappresentate le percentuali di matched spots con una variazione dell'intensità compresa tra 0-0.5, 0.5-2 e maggiore di 2.

Abbiamo osservato che i gels ottenuti con l'intervallo 4-7, rispetto ai 3-10, hanno un significativo ($p < 0,05$) incremento dell'efficienza di matching, passando dal 60 all'80% ed un aumento del numero di spot appaiati che hanno variazione nell'intensità minore di un fattore due, passando dal 62 all'88% (Tabella 3).

Intervallo di pH utilizzato	N° di spots rilevati (\pm DS)	Efficienza di matching (%)	Matched spots con variazione d'intensità inferiore di un fattore 2
3-10	321 \pm 68	60 \pm 6	62 \pm 12
4-7	592 \pm 92	80 \pm 7	88 \pm 9

Tabella 3: Caratteristiche dei gel analizzati dopo elaborazione ed analisi della riproducibilità.

Nel complesso, i pattern degli spot ottenuti usando l'intervallo di pH più stretto presentano un'alta riproducibilità in accordo con studi riportati in letteratura sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo [Lerh et al., 2002]. In Figura 8 è riportata un'immagine con due gel 4-7 affiancati come esempio visivo a dimostrazione della buona riproducibilità delle mappe bidimensionali ottenute.

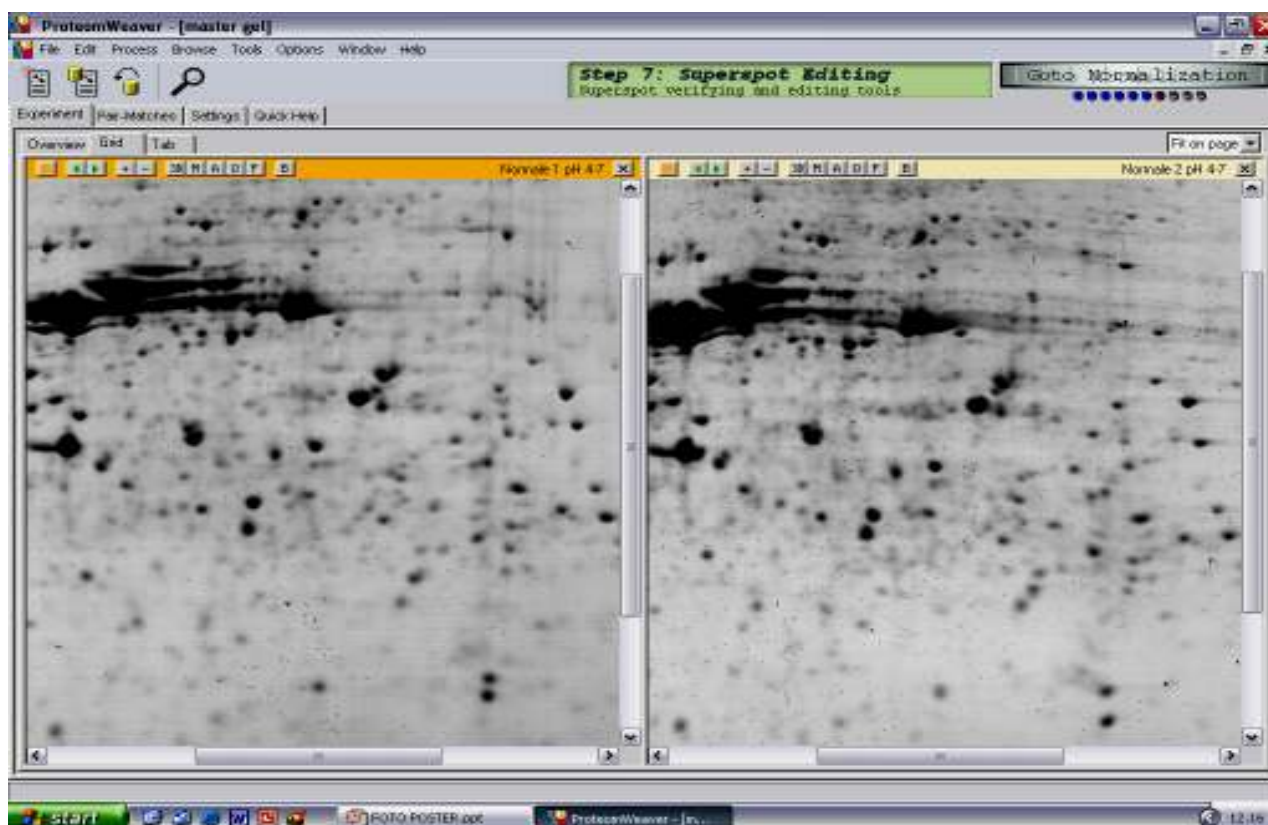


Figura 8: Riproducibilità di due tipici 2-DE gel derivati da fibroblasti umani usando IPG strip con pH 4-7.

Anche se la maggioranza degli spots accoppiati mostrava un'alta riproducibilità, abbiamo comunque notato, pure nelle mappe ottenute con IPG strip 4-7, che alcuni matched spot variano molto nelle loro intensità. Ciò è osservato soprattutto per gli spot con intensità debole. Gli spot accoppiati che, pur derivando dallo stesso campione o da campioni appartenenti allo stesso gruppo, presentano una variazione d'intensità superiore di un fattore 2, sono stati esclusi dal successivo confronto fra gruppi.

Oltre all'uso di IPG strip con un intervallo di pH stretto, quando si parte da campioni cellulari, un'altra valida strategia per aumentare la risoluzione delle mappe bidimensionali, è quella di prefazionare le proteine in base alla loro localizzazione intracellulare. Esistono protocolli che consentono di separare le proteine presenti nel nucleo, mitocondri, reticolo endoplasmatico, citosol e membrana plasmatica. Ogni frazione purificata può successivamente essere separata mediante 2-DE. Questi protocolli hanno però lo svantaggio di richiedere grandi quantità di materiale, non sempre disponibile, e tempi molto lunghi.

I fibroblasti cutanei umani, ottenuti da biopsia sotto anestesia locale della superficie anteriore dell'avambraccio, sono stati coltivati in vitro. Nella Tabella 4 riportiamo la lista di tutte le proteine identificate, classificate in base alle loro funzioni biologiche utilizzando una banca dati di riferimento (<http://www.hpdr.org>). Per maggior chiarezza, riportiamo anche un grafico a settori circolari della distribuzione percentuale delle proteine identificate, sulla base delle loro funzioni biologiche (Figura 9).

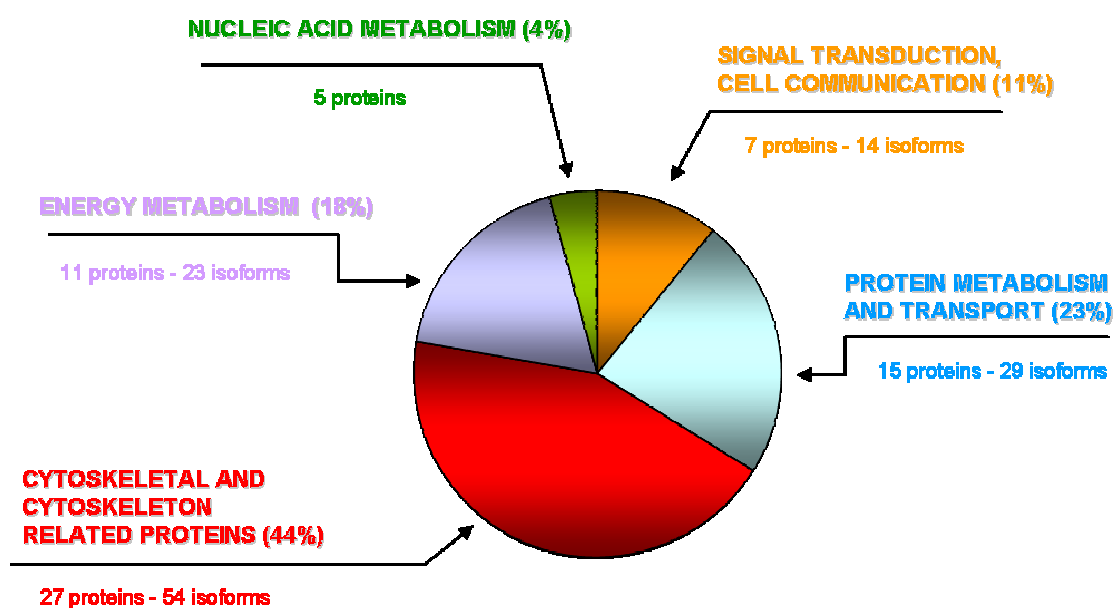


Figura 9: Distribuzione percentuale delle proteine identificate, sulla base delle loro funzioni biologiche.

N° of spot	SIGNAL TRANSDUCTION, CELL COMMUNICATION	Accession number	Accession number	pI theoret.	pI experim.	Mr theoret.	Mr experim.
10	Annexin A1	IPI00218918	P04083	6.64	5.16	38583.05	35019.81
41	Annexin A1	IPI00218918	P04083	6.64	5.06	38583.05	34862.67
A48	Annexin A1	IPI00218918	P04083	6.64	5.29	38583.05	35401.43
5	Annexin A2 (§) (*)	IPI00455315	P07355	7.56	6.68	38472.85	38211.22
70	Annexin A2 (§) (*)	IPI00455315	P07355	7.56	5.46	38472.85	30635.21
A9	Annexin A2 (§) (*)	IPI00455315	P07355	7.56	5.45	38472.85	33650.46
A41	Annexin A2 (§) (*)	IPI00455315	P07355	7.56	5.32	38472.85	22920.18
A74	Annexin A2 (§) (*)	IPI00455315	P07355	7.56	5.75	38472.85	31742.36
A84	Annexin A2 (§) (*)	IPI00455315	P07355	7.56	5.69	38472.85	37287.08
80	Calmodulin (*)	IPI00075248	P62158	4.09	4.10	16706.39	18612.30
48	Reticulocalbin 1 (§) (*)	IPI00015842	Q15293	4.86	4.52	38890.00	48632.21
49	Reticulocalbin 3 (§) (*)	IPI00101037	Q96D15	4.74	4.49	37492.98	47960.92
A45	Tumor Protein, Translationally-Controlled 1 (§) (*)	IPI00009943	Q5W0H4	5.34	4.77	21525.66	31181.15
11	Beta-galactoside-binding lectin L-14-I	IPI00219219	P09382	5.34	5.03	14584.51	13267.42
PROTEIN METABOLISM AND TRANSPORT							
72	Alpha crystallin B chain (*)	IPI00021369	P02511	6.76	7.25	20158.91	24305.90
A55	Calreticulin precursor	IPI00020599	P27797	4.29	4.35	48141.56	51227.47
A56	Calreticulin precursor	IPI00020599	P27797	4.29	4.36	48141.56	51227.47
40	Cathepsin B Precursor	IPI00295741	P07858	5.88	5.21	37821.58	37982.98
42	Cathepsin B Precursor	IPI00295741	P07858	5.88	5.14	37821.58	33268.84
A91	Cathepsin D [Precursor] (*)	IPI00011229	P07339	6.10	5.64	44552.22	37152.40
1	Cyclophilin A Complex	IPI00419585	P62937	7.82	7.86	17881.30	11487.43
2	Cyclophilin A Complex	IPI00419585	P62937	7.82	7.44	17881.30	12126.76
79	Endoplasmic Precursor	IPI00027230	P14625	4.76	4.67	92468.87	52013.16
53	Glucose regulated protein 75 Kda	IPI00007765	P38646	5.87	5.59	73680.50	61706.40
56	Heat Shock 20 Kda Like-Protein P20 (§) (*)	IPI00022433	O14558	5.95	6.07	17135.60	24267.08
A31	Heat shock 70 kDa protein 1	IPI00033946	P08107	5.48	4.96	70052.23	46625.57
58	Heat Shock Cognate 71 Kda Protein	IPI00003865	P11142	5.37	6.71	70898.09	33352.34
6	Heat Shock Protein 27kda	IPI00025512	P04792	5.98	5.98	22782.52	31658.13
14	Heat Shock Protein 27kda	IPI00025512	P04792	5.98	5.59	22782.52	32457.29
A71	Heat Shock Protein 27kda	IPI00025512	P04792	5.98	5.66	22782.52	32528.05
A4	Heat Shock Protein 60 Kda, Mitochondrial	IPI00472102	P10809	5.70	5.26	61054.64	53472.29
55	Heat Shock Protein 60 Kda, Mitochondrial	IPI00472102	P10809	5.70	5.36	61054.64	57646.69
A27	Mannose-6-phosphate receptor binding protein 1 (§) (*)	IPI00303882	O60664	5.30	4.86	47046.91	36568.74
A32	Protein disulfide-isomerase [Precursor]	IPI00010796	P07237	4.76	5.00	57116.37	46894.95
A37	Protein disulfide-isomerase [Precursor]	IPI00010796	P07237	4.76	5.10	57116.37	45682.74
77	Protein disulfide-isomerase [Precursor]	IPI00010796	P07237	4.76	4.72	57116.37	53068.22
A15	Protein disulfide-isomerase A3 [Precursor]	IPI00025252	P30101	5.98	5.63	56782.39	38925.81
A83	Protein disulfide-isomerase A3 [Precursor]	IPI00025252	P30101	5.98	5.73	56782.39	40564.53
A7	Protein disulfide-isomerase A3 [Precursor]	IPI00025252	P30101	5.98	5.95	56782.39	36344.25
A17	Protein disulfide-isomerase A3 [Precursor]	IPI00025252	P30101	5.98	5.75	56782.39	39352.32
34	Protein disulfide-isomerase A3 [Precursor]	IPI00025252	P30101	5.98	5.73	56782.39	52349.88
39	Protein disulfide-isomerase A3 [Precursor]	IPI00025252	P30101	5.98	5.30	56782.39	38521.74
59	Protein disulfide-isomerase A3 [Precursor]	IPI00025252	P30101	5.98	6.72	56782.39	34982.62

CITOSKELETAL AND CYTOSKELETON RELATED PROTEINS		Accession number	Accession number	pI theoret.	pI experim.	Mr theoret.	Mr experim.
A1	Alpha-actinin 1 (*)	IPI00013508	P12814	5.25	4.99	103057.55	54123.29
A2	Alpha-actinin 4 (*)	IPI00013808	Q96BG6	5.16	5.02	73619.58	53517.19
A3	Alpha-actinin 4 (*)	IPI00013808	Q96BG6	5.16	5.06	73619.58	53135.57
A39	Beta-actin	IPI00021439	P60709	5.29	5.15	41736.73	47613.29
A40	Beta-actin	IPI00021439	P60709	5.29	5.45	41736.73	41013.50
A61	Beta-actin	IPI00021439	P60709	5.29	5.10	41736.73	46064.36
A102	Beta-actin	IPI00021439	P60709	5.29	4.99	41736.73	45524.60
44	Caldesmon	IPI00014516	Q05682	5.63	6.13	93250.13	57221.16
45	Caldesmon	IPI00014516	Q05682	5.63	6.25	93250.13	57288.50
50	Caldesmon	IPI00014516	Q05682	5.63	5.79	93250.13	61067.08
51	Caldesmon	IPI00014516	Q05682	5.63	5.75	93250.13	61067.08
A52	Caldesmon	IPI00014516	Q05682	5.63	5.72	93250.13	56076.29
A87	Caldesmon 1 protein [Fragment]	IPI00333771	Q6PJM5	5.36	5.07	36692.16	46423.53
84	Calponin 2, Isoform A (§) (*)	IPI00015262	Q99439	6.92	6.98	33565.86	41311.93
3	Cofilin-1	IPI00012011	P23528	8.26	8.14	18371.30	15515.18
30	F-actin capping prot. alpha 1 sub.	IPI00005969	P52907	5.45	5.42	32922.77	42315.50
A43	F-actin capping protein beta subunit	IPI00218782	P47756	5.36	4.90	31219.30	28083.29
A54	FLJ00279 protein [Fragment] (§) (*)	IPI00019502	Q6ZNL4	8.97	5.33	65769.93	58814.98
A21	Lamin A/C	IPI00181888	P02545	6.57	5.90	74139.49	40474.74
85	LIM and SH3 Domain Protein 1 (LASP-1)	IPI00000861	Q14847	6.61	6.80	29717.16	43134.01
A63	LIM and SH3 Domain Protein 1 (LASP-1)	IPI00000861	Q14847	6.61	5.00	29717.16	34862.67
71	Macrophage Capping Protein	IPI00027341	P40121	5.88	5.79	38517.59	34952.46
A94	Macrophage Capping Protein	IPI00027341	P40121	5.88	5.56	38517.59	34436.15
A95	Macrophage Capping Protein	IPI00027341	P40121	5.88	5.57	38517.59	34471.00
47	MOESIN	IPI00219365	P26038	6.09	5.64	67688.85	46648.02
A103	Myosin heavy chain, nonmuscle type A	IPI00442359	P35579	5.50	5.37	226532.24	46603.12
43	Myosin Light Polypeptide 6	IPI00101961	P60660	4.56	4.42	16798.86	17824.42
86	Pdz and Lim Domain 1	IPI00010414	O00151	6.55	6.81	35940.52	44156.93
87	Pdz and Lim Domain 1	IPI00010414	O00151	6.55	6.62	35940.52	44444.63
8	Stathmin (§) (*)	IPI00479997	P16949	5.77	5.71	17171.32	22044.70
74	Transgelin	IPI00216138	Q01995	8.88	8.25	22479.71	26863.19
75	Transgelin	IPI00216138	Q01995	8.88	8.75	22479.71	26831.23
76	Transgelin	IPI00216138	Q01995	8.88	8.86	22479.71	26831.23
73	Transgelin-2 (§) (*)	IPI00024057	P37802	8.45	7.63	22260.25	25009.15
A79	Tropomodulin-3 (§) (*)	IPI00005087	Q9NYL9	5.08	5.13	39594.77	46288.84
22	Tropomyosin 1 alpha chain (§) (*)	IPI00014581	P09493	4.69	4.77	32708.57	42113.47
20	Tropomyosin 3 (§) (*)	IPI00218319	P06753	4.68	4.81	32818.79	38993.15
19	Tropomyosin 4	IPI00010779	P07226	4.67	4.73	28390.62	38611.53
23	Tropomyosin beta chain splice isof. 1	IPI00013991	P07951	4.66	4.66	32850.73	43819.53
A100	Tropomyosin beta chain splice isof. 2	IPI00220709	P07951-2	4.66	4.63	32850.73	41731.84
21	Tropomyosin Isoform	IPI00018853	Q15657	4.89	4.81	28420.13	40923.70
29	Tubulin alpha-3 chain (*)	IPI00180675	Q71U36	4.94	5.45	50155.63	43011.40
A66	Tubulin beta-2 chain	IPI00011654	P07437	4.78	4.79	49670.82	37376.87
A75	Tubulin beta-2 chain	IPI00011654	P07437	4.78	4.60	49670.82	32977.01
A80	Tubulin beta-2 chain	IPI00011654	P07437	4.78	4.60	49670.82	34054.53
A93	Tubulin beta-2 chain	IPI00011654	P07437	4.78	5.00	49670.82	39823.74
28	Tubulin beta-4 chain (§) (*)	IPI00023598	P04350	4.81	5.73	49630.87	44335.84
9	Tubulin beta-4 chain (§) (*)	IPI00023598	P04350	4.81	5.39	49630.87	41193.08
A25	Tubulin beta-6 chain (§) (*)	IPI00034283	Q9BUF5	4.77	4.88	49857.11	37578.91
A64	Tubulin beta-6 chain (§) (*)	IPI00034283	Q9BUF5	4.77	5.52	49857.11	41574.70
46	Vimentin	IPI00418471	P08670	5.06	6.14	53520.49	51029.67
69	Vimentin	IPI00418471	P08670	5.06	4.75	53520.49	48645.91
A85	Vimentin	IPI00418471	P08670	5.06	5.47	53520.49	48443.88
A51	Vinculin Splice Isoform 1	IPI00291175	P18206	5.51	5.79	123668.11	57961.95

	ENERGY METABOLISM	Accession number	Accession number	pI theoret.	pI experim.	Mr theoret.	Mr experim.
A14	Alpha enolase	IPI00465248	P06733	6.99	5.66	47037.77	40452.29
A22	Alpha enolase	IPI00465248	P06733	6.99	5.85	47037.77	40452.29
A88	Alpha enolase	IPI00465248	P06733	6.99	5.79	47037.77	39284.98
13	Alpha enolase	IPI00465248	P06733	6.99	7.10	47037.77	52308.33
27	Alpha enolase	IPI00465248	P06733	6.99	5.81	47037.77	44897.05
A42	ATP synthase D chain, mitochondrial	IPI00220487	O75947	5.22	5.18	18360.02	29722.01
7	Cu,Zn Superoxide dismutase	IPI00218733	P00441	5.70	5.73	15804.55	22852.84
83	Fructose-bisphosphate aldolase A	IPI00180818	P04075	8.39	8.34	39288.83	47001.93
15	Glutathione S-Transferase (*)	IPI00219757	Q5TZY3	5.43	5.53	23355.83	30215.88
4	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	IPI00219018	Q5D0F4	8.57	7.39	36053.21	41056.21
16	Peroxiredoxin 2 Isoform B (§) (*)	IPI00027350	P32119	5.67	5.58	21760.73	26383.70
81	Peroxiredoxin 6 (§) (*)	IPI00220301	P30041	6.02	6.28	24903.79	33919.84
A89	Phosphoglycerate kinase 1	IPI00169383	P00558	8.30	5.75	44483.49	33268.84
A98	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	IPI00220644	P14618-2	7.59	6.25	57930.87	43999.12
26	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	IPI00220644	P14618-2	7.95	5.88	57805.70	43033.84
35	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	IPI00220644	P14618-2	7.95	5.88	57805.70	34727.98
60	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	IPI00220644	P14618-2	7.59	6.60	57930.87	45243.79
61	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	IPI00220644	P14618-2	7.59	6.38	57930.87	45691.31
66	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	IPI00220644	P14618-2	7.59	5.80	57930.87	43357.78
A82	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	IPI00220644	P14618-2	7.59	5.75	57930.87	30462.81
67	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	IPI00022774	P55072	5.14	5.64	89190.61	41120.14
36	Triosephosphate Isomerase	IPI00451401	P60174	6.51	6.12	26538.30	33246.39
57	Triosephosphate Isomerase	IPI00451401	P60174	6.51	7.00	26538.30	31466.34
NUCLEIC ACID METABOLISM							
82	Heterogeneous Nuclear Ribonucleo Protein	IPI00396378	P22626-2	8.97	8.85	37429.70	41088.18
38	Protein DJ-1	IPI00298547	O14805	6.33	6.14	19891.05	30575.05
A53	Splice isoform 2 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (§) (*)	IPI00216746	P61978-2	5.19	5.43	51028.23	53674.33
78	UV Excision Repair Protein RAD23 Homolog B (§) (*)	IPI00008223	P54727	4.79	4.73	43171.18	51900.91
62	Similar To Elongation Factor 2b [Fragment] (§) (*)	IPI00186290	Q8TA90	6.51	6.35	57500.35	47513.39

Tabella 4: Proteine identificate tramite MS da colture cellulari di fibroblasti cutanei ottenuti da soggetti normali e pazienti diabetici. Le 27 proteine mai precedentemente riportate in mappe 2-DE di fibroblasti (etichettate come *), come pure 20 proteine mai precedentemente riportati in letteratura in assoluto per i fibroblasti (etichettate come §) sono state indicate. I codici identificativi riportati derivano dai database IPI (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html>) e SwissProt/TrEMBL (<http://www.expasy.org/>).

Tutte queste proteine sono state identificate in ogni soggetto analizzato. Il numero totale di proteine identificate è stato 72, molte delle quali sono state trovate in punti diversi del gel, come isoforme della stessa molecola modificata da PTMs.

Abbiamo confrontato i nostri dati sulle proteine dei fibroblasti con quelli pubblicati e presenti online in banche dati (Swiss-PAGE 2D e Siena-2D PAGE). Abbiamo riscontrato che 27 proteine non erano mai state segnalate in precedenza in mappe di 2-DE di fibroblasti umani, tra cui 20 mai segnalate in assoluto (Tabella 4). Questa ricerca ha quindi permesso, in primo luogo, di ottenere maggiori e più approfondite conoscenze sul proteoma di fibroblasti derivati da soggetti umani e

coltivati in vitro, dati utili come riferimento per successive indagini applicate a varie patologie anche non diabetiche.

Lo scopo dello studio è stato confrontare le proteine espresse in colture di fibroblasti umani ottenuti mediante biopsia cutanea da pazienti affetti da diabete di tipo 1 con o senza nefropatia (albuminuria >200 µg/min) e con lunga durata di malattia (15-20 anni), e da soggetti normali di controllo.

L'identificazione delle "anomalie" dei profili proteici rilevati da tale confronto ha fornito dati utili sia per una migliore comprensione dei meccanismi fisiopatologici della nefropatia diabetica, che per l'identificazione di possibili candidati, ancora da validare, di markers precoci di predisposizione allo sviluppo di tale complicanza.

I nostri risultati indicano che, almeno nelle nostre condizioni sperimentali, né il diabete né la DN sono associati alla presenza e/o assenza di specifiche proteine. Tuttavia, abbiamo osservato variazioni significative e riproducibili nei livelli quantitativi di varie proteine.

Per motivi di chiarezza, i risultati e la discussione delle proteine trovate alterate sono stati suddivisi in gruppi sulla base delle funzioni biologiche delle proteine stesse.

In una sezione a parte, sono riportati i dati ottenuti dal trattamento con alto glucosio.

Proteine del citoscheletro o correlate al citoscheletro

Le proteine appartenenti a questo gruppo rappresentano circa il 40% del totale delle proteine identificate nelle nostre condizioni sperimentali (Tabella 4 e Figura 9) e svolgono un ruolo importante nello sviluppo della DN [Clarkson et al., 2002; Conway et al., 2004].

La morfologia e l'elasticità cellulare sono mantenute e regolate dalla complessa struttura del citoscheletro, che include actine, tubuline e filamenti intermedi [Cooper 1991; Theriot et al., 1991]. Utilizzando tecniche diverse dalla proteomica, sono già stati riportati cambiamenti del citoscheletro associati alla neuropatia diabetica umana [Scott 1992] e alla nefropatia diabetica sperimentale nei ratti [Sanai 2000].

La maggior parte dei cambiamenti strutturali osservati in presenza di DN, come la proliferazione delle cellule mesangiali, il danno alle cellule tubulari e la fibrosi interstiziale, sono stati associati con espressione di una vasta gamma di proteine del citoscheletro, tra cui actina e vimentina [El Nahas et al., 1996].

Il presente studio ha aggiunto nuovi risultati, sottolineando l'importanza dei cambiamenti del citoscheletro come alterazioni chiave nella fisiopatologia della DN. Di notevole importanza è il non aver trovato differenze sostanziali in proteine del citoscheletro tra soggetti normali e pazienti T1DM

senza DN, ma solo tra i diabetici con DN e gli altri due gruppi di studio, suggerendo che proprio la nefropatia, e non il diabete di per sé, sia responsabile dei cambiamenti osservati.

La presenza di DN è stata associata con una diminuzione di beta actina (#A61), di tre isoforme di tubulina beta-2 (#A66, #A75 e #A80), mentre è stato osservato un aumento della tubulina beta-4, isoforma #9 e isoforma #28 (Figura 10).

L'analisi western blot della tubulina beta (Figura 11) ha dimostrato che l'espressione globale di questa proteina non è differente tra i diversi gruppi, suggerendo così che le alterazioni osservate della analisi 2-DE siano dovute a modifiche post-traduzionali, piuttosto che a una diversa regolazione genetica.

Actina e tubulina sono i principali costituenti del citoscheletro. Un disassemblamento dei filamenti d'actina e una marcata riduzione della beta tubulina, componente principale di microtubuli, rappresentano importanti caratteristiche di nefropatia diabetica [Clarkson et al., 2002; Sanai et al., 2000; Shimoni et al., 2001]. In questi studi tuttavia, non sono state esaminate le possibili isoforme di tali proteine. I nostri dati suggeriscono che la DN si associ a cambiamenti di isoforme di actina e beta tubulina. Dal nostro studio tuttavia, il tipo di modifiche non può essere stabilito.

Una funzione d'actina e tubulina è legare diverse proteine che svolgono un ruolo nella dinamica organizzazione del citoscheletro in strutture tridimensionali. Queste proteine leganti modulano la capacità d'actina e tubulina a polimerizzare o depolimerizzare [Cooper 1991; Stossel 1993; Bamburg et al., 1987], o sono coinvolte nell'attacco di microfilamenti o microtubuli alla membrana plasmatica. Tra queste ci sono ADF/cofilin [Sum 1995], caldesmon [Helfman et al., 1999], vinculina [Weller et al., 1990], alfa actinina [Sanai et al., 2000], moesin [Bretscher et al., 2002], LASP-1 [Schreiber et al., 1998]. Dalla nostra analisi è emerso che alcune di queste proteine leganti actina sono alterate nei fibroblasti da pazienti T1DM con DN.

L'alfa-4 actinina (#A3), ad esempio, è stata trovata aumentata in fibroblasti provenienti dai soggetti con DN rispetto ai soggetti normali (Figura 10). L'actinina è una proteina legante actina e svolge molteplici ruoli in diversi tipi di cellule. Nelle cellule non muscolari, le isoforme alfa 1 e alfa 4 sono coinvolte nel legame dei filamenti d'actina alla membrana plasmatica. Mutazioni puntiformi del gene per l'alfa-4 actinina sono state associate alla glomerulosclerosi focale e segmentale, un tipo di lesione renale comune, non specifica, che non è solo secondaria ad altri disturbi, tra cui l'infezione da HIV, l'obesità, l'ipertensione e il diabete, ma può anche essere presente come condizione idiopatica [Kaplan et al., 2000]. E' inoltre interessante la recente pubblicazione in cui è stato dimostrato come l'alfa actinina sia essenziale per l'adesione dei podociti, cellule con funzioni chiave per il mantenimento della permeabilità glomerulare [Dandapani et al., 2007]

I principali effetti delle mutazioni del gene per l'actinina alfa-4 sono la l'aumento di espressione della proteina e la perdita della normale funzionalità [Kaplan et al., 2000]. Queste osservazioni

suggeriscono che un'alterata conformazione e/o espressione di questa proteina può essere associata allo sviluppo di diversi tipi di malattie renali.

Caldesmon è una proteina legante actina e miosina. La forma ad alto peso molecolare (H-caldesmon) è prevalentemente espressa nella muscolatura liscia, mentre la forma a basso peso molecolare (L-caldesmon) è ampiamente diffusa anche nei tessuti non muscolari. Caldesmon inibisce la contrattilità cellulare [Helfman et al., 1999], può promuovere sia l'assemblamento [Yamashiro et al., 2001] che il disassemblamento [Helfman et al., 1999] dei filamenti di actina, regolare l'esocitosi e la deposizione di matrice [Matsumura et al., 1993]. La fosforilazione di caldesmon è necessaria per la formazione degli anelli contrattili durante la mitosi e quindi potrebbe anche essere coinvolta nella regolazione della proliferazione cellulare [Yamashiro et al., 2001]. Conway e colleghi [Conway et al., 2004] hanno dimostrato che un singolo polimorfismo nucleotidico nella regione promotrice del gene di caldesmon è associato alla nefropatia del diabete di tipo 1 nella popolazione dell'Irlanda del Nord e che una simile tendenza è stata osservata in un campione di popolazione indipendente dalla Repubblica d'Irlanda. Nei soggetti T1DM con DN abbiamo trovato una diminuzione isoforma #A87 di caldesmon, mentre le isoforme #44 e #45 sono risultate aumentate (per l'isoforma #45 il cambiamento è stato significativo solo rispetto a soggetti di controllo, probabilmente a causa di una alta varianza delle misure) (Figura 10). Studi più approfonditi potranno chiarire la natura di questi cambiamenti. L'analisi western blot ha mostrato una diminuita espressione di H-caldesmon in fibroblasti da T1DM con DN (Figura 11). Questo risultato suggerisce l'esistenza di associazione tra l'alterata espressione di questa proteina e la presenza di DN, a sostegno dei risultati precedentemente riportati [Conway et al., 2004].

Anche i dati riguardanti moesin (membrane-organizing extension spike protein) sono molto interessanti. I risultati ottenuti sia tramite 2-DE che western blot (Figure 9 e 10), mostrano per la prima volta che moesin aumenta in fibroblasti ottenuti da pazienti diabetici rispetto ai controlli ed in particolare nei soggetti con DN. Moesin appartiene alla famiglia ezrin/radixin/moesin (ERM). Le proteine di tale famiglia sono strutturalmente molto simili e presentano due domini funzionali, corrispondenti alle regioni N e C-terminali, che possono interagire con le proteine di membrana e l'actina [Bretscher et al., 2002]. In tal modo partecipano ai processi che regolano forma, la motilità e l'adesione delle cellule [Tsukita et al., 1999]. Moesin è stata anche di recente riportata come proteina correlata all'invecchiamento in cellule endoteliali in cultura [Lee et al., 2006]. Recenti studi hanno identificato le ERMs come siti di legame per i prodotti avanzati di glicazione (AGEs) e suggerito che l'interazione tra ERMs e AGEs può essere importante nello sviluppo delle complicanze diabetiche [McRobert et al., 2003]. I nostri risultati suggeriscono quindi il possibile ruolo, geneticamente determinato, di moesin nella patogenesi delle complicanze renali.

Anche le proteine FLJ100279 (#A54), vinculina (#A51), tropomodulina-3 (#A79), tropomiosina (#21), LASP-1 (#63), CapG (#A94) sono stati trovate alterate (Figura 10) in associazione alla presenza di DN e rappresentano dati nuovi, su cui non esistono altri riferimenti in letteratura.

FLJ100279 è stata trovata aumentata nei soggetti con DN, rispetto ai controlli. Secondo quanto riportato nei database di NCBI e PROT/TrEMBL, la sequenza di questa proteina era stata identificata solo grazie ad analisi di mRNA. La sequenza di FLJ100279 presenta un'alta corrispondenza con quella di un frammento della catena pesante della miosina non muscolare. Il significato di queste alterazioni in relazione ai soggetti T1DM con DN richiede ulteriori indagini.

La vinculina ha mostrato livelli più elevati associati alla DN. Vinculina è una proteina del citoscheletro coinvolta nelle giunzioni intercellulari e nell'ancoraggio dei filamenti d'actina alla membrana [Weller et al., 1990].

Una diminuzione di tropomodulina-3 (#A79) e un aumento di un'isoforma di tropomiosina (#21) sono stati osservati in presenza di DN. La tropomodulina è associata con la punta dei filamenti d'actina [Fowler et al., 1993], e Sung e colleghi [Sung et al., 1996] riportano che questa proteina, legandosi alla tropomiosina, è in grado di bloccare l'allungamento e la depolarizzazione dei filamenti di actina.

LASP-1 (LIM and SH3 domain protein) è una proteina legante actina e coinvolta nell'organizzazione del citoscheletro [Schreiber et al., 1999]. La nostra indagine ha evidenziato una diminuzione di questa proteina nei soggetti con DN rispetto ai sani.

CapG (macrophage capping protein) appartiene alla famiglia di proteine gelsolin/villin e si lega alla actina in modo calcio-dipendente. A differenza degli altri membri della famiglia gelsolin, questa proteina incappuccia le estremità dei filamenti d'actina ma non le taglia [Southwick et al., 1986]. Abbiamo osservato un aumento di CapG (#A94) nei soggetti con DN.

Le alterazioni del citoscheletro in un certo numero di malattie, come la DN e la glomerulosclerosi focale e segmentale, sono associate con marcati cambiamenti nella barriera di filtrazione glomerulare e nel metabolismo della matrice. Yip e colleghi [Yip et al., 1993], hanno riportato che i pazienti T1DM con DN sono più insulino-resistenti (IR) di quelli senza DN, pur a parità di età e durata del diabete. Poiché l'insulina stessa svolge un ruolo di regolazione e controllo della rete dei filamenti di actina [Khayat et al., 2000], e di tubulina [Caron, 1989], è anche possibile che le alterazioni del citoscheletro che abbiamo trovato associate alla DN siano dovute alla IR.

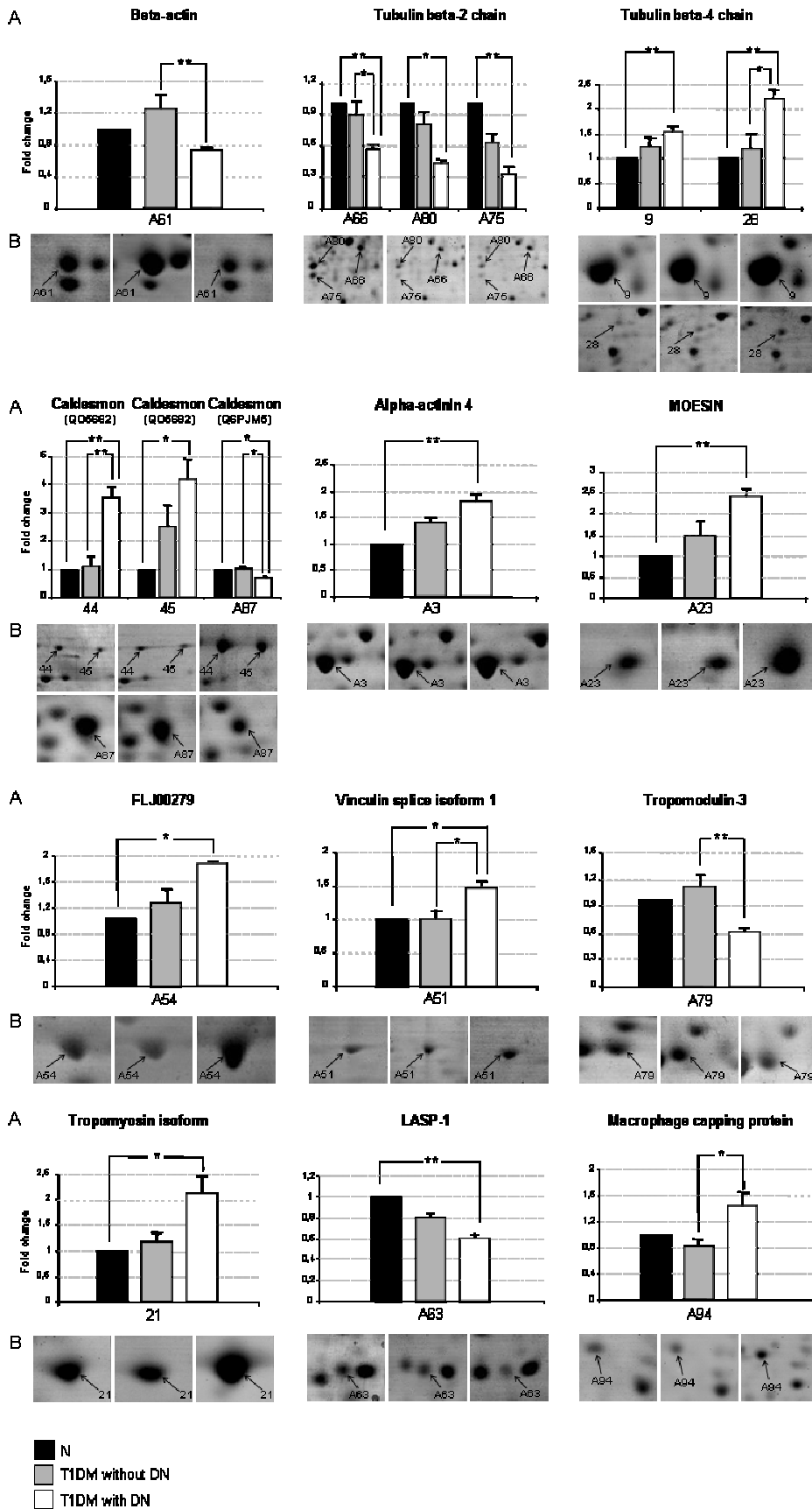


Figura 10: A) Istogrammi dei livelli quantitativi delle proteine trovate alterate nel confronto fra gruppi. I dati (media \pm SEM), sono espressi come fold change vs controllo. I confronti significativi sono indicati con: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$
 B) immagini selezionate degli spot.

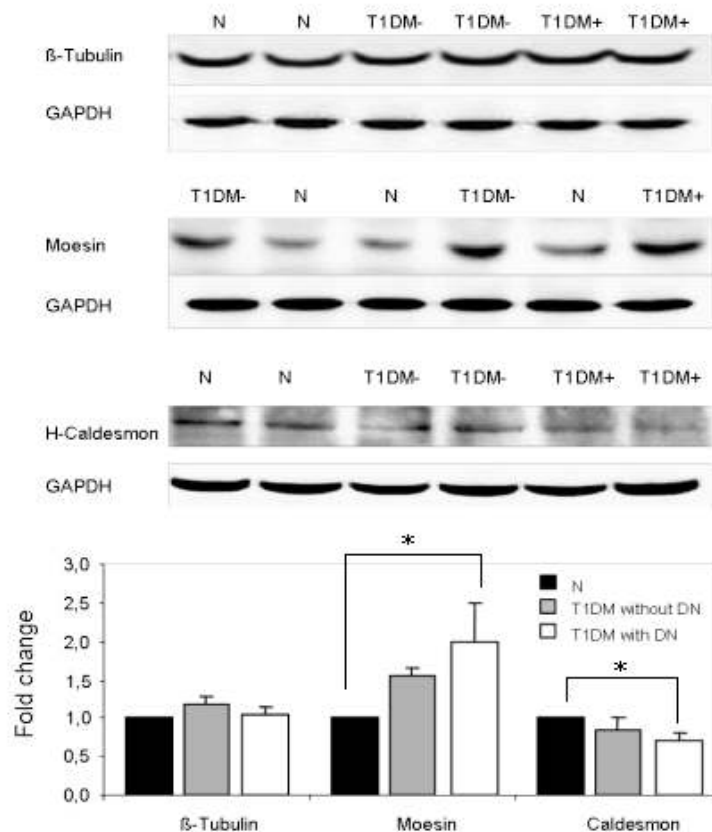


Figura 11: Risultati dell'analisi western blot (media \pm SEM). I valori sono stati normalizzati verso la proteina housekeeping GAPDH ed espressi come fold change vs controllo. I confronti significativi sono indicati con: (*) $p < 0,05$.

Proteine coinvolte nel metabolismo proteico

Sono stati identificate 15 proteine appartenenti a questo gruppo e, tenendo conto della presenza di isoforme, un totale di 29 spot (Tabella 4).

Questo studio evidenzia alterazioni quantitative delle proteine responsabili del turnover/folding/trasporto proteico nei fibroblasti dei pazienti T1DM con DN. Questi cambiamenti sono suggestivi di una base genetica, mantenuta nelle cellule in coltura.

Gli chaperon molecolari regolano l'assemblamento ed il turnover delle proteine [Welch et al., 1992; Voges et al., 1999] e sono raggruppati in famiglie altamente conservate. Includono HSPs, enzimi proteolitici, PDI e altre proteine che regolano la sintesi proteica. Il loro compito principale è proteggere la cellula da condizioni nocive, come ad esempio lo stress ossidativo, estreme variazioni

di temperatura, sostanze tossiche [Hartl, 1996], irradiazione ultravioletta, esposizione a sostanze chimiche (ad esempio etanolo), infezioni virali [Welch et al., 1992]. Gli chaperon assistono le proteine nelle fasi di folding e nei passaggi attraverso le membrane intracellulari; al tempo stesso impediscono la formazione d'aggregati tra proteine malformate, potenzialmente dannosi per la cellula, e sono in grado di correggere le proteine con difetti conformazionali [Hartl, 1996]. Infine gli chaperon controllano la degradazione delle proteine, indirizzandole al proteosoma [Voges, D.; 1999]. Sono costitutivamente espressi (\approx 5-10% del totale delle proteine, in normali condizioni di crescita) ma la loro espressione può variare molto in seguito a condizioni di stress.

Nei fibroblasti provenienti da pazienti con DN, abbiamo osservato un incremento di cognate HSP 71kDa (#A30), HSP 60 kDa (#A4) e HSP27 kDa (#6), (Figura 12) che possono indicare una risposta a stimoli quali stress ossidativo, variazioni di calore e di energia disponibile per la cellula [Welch 1992; Kiang et al.,1998; Callahan et al., 2002 ; Theriault et al., 2004; Rogalla et al., 1999; Arrigo 2001].

Il gruppo delle HSP70, a cui la cognate HSP 71kDa (#A30) appartiene, ha funzioni sia intracellulari [Callahan 2002] che extracellulari [Asea et al., 2002]. Nel diabete di tipo 1, le HSP70 delle beta cellule pancreatiche sono up-regolate e questo migliora la resistenza alla tossicità per l'ossido nitrico. [Burkart et al., 2000] Al contrario, HSP70 extracellulari stimolano risposte infiammatorie [Asea et al., 2002 ; Asea et al., 2000] mettendo quindi in evidenza una duplice e, apparentemente contraddittoria, funzione di questa proteina.

Grp94 e HSP70 sono state recentemente identificate e purificate nel plasma di soggetti diabetici di tipo 1 [Pagetta et al., 2003]. Queste proteine possono essere responsabili per l'aumento globale delle proteasi, evento riscontrato nel diabete e potenzialmente associabile con lo sviluppo e la progressione delle complicanze vascolari indipendentemente dal controllo glicemico [Finotti et al., 1992; Raghothama et al., 1996; Carmassi et al., 1992; Roberts et al., 1986; Finotti et al., 2004]. Questi dati sono quindi d'accordo con l'aumento della HSP 71KDa rilevato nei fibroblasti da pazienti affetti da diabete di tipo 1 con DN.

La HSP 27kDa e la via di segnalazione delle MAPK sono strettamente correlate. Un aumento della fosforilazione-attivazione di MAPK è coinvolto nelle lesioni tubulointerstitiali della DN [Sakai et al., 2005] e la fosforilazione-attivazione di MAPK-p38 porta alla fosforilazione della HSP 27kDa e ad un aumento della secrezione di TNF α e IL-6 [Haddad 2002]. Inoltre, nel ratto, la fosforilazione di HSP25, omologo della HSP27 umana, aumenta per effetto dello stress indotto da radicali liberi attraverso l'attivazione della MAPK-p38 e questo porta ad una riduzione della contrattilità di cellule mesangiali in coltura [Dunlop 2000]. Viceversa, l'osservata diminuzione dei livelli di altre due isoforme di HSP 27kDa (#A90 e #A71) indica un cambiamento di isoforme il cui significato nella patogenesi della DN richiede analisi più approfondite per essere chiarito.

Abbiamo anche osservato un aumento di HSP 60kDa (#A4) nei fibroblasti dei pazienti T1DM con DN. Una reattività ai membri della famiglia HSP60 è stata trovata in malattie autoimmuni, tra cui il diabete [Roep 1996; Chen et al., 2005]. HSP60 può anche aumentare il numero dei recettori dell'IGF-1 [Chen et al., 2005]. Una maggiore espressione di HSP60 è stata osservata nel rene di ratti resi diabetici e un aumento di IGF-1 è stato correlato allo sviluppo della DN [Lupia et al., 1999]. Quindi l'aumento di HSP 60kDa (#A4) nei fibroblasti dei pazienti T1DM con DN potrebbe essere implicato nello sviluppo della DN.

Un'isoforma (#34) con alto peso molecolare di PDI A3 è stata trovata notevolmente aumentata nei fibroblasti di soggetti diabetici con DN, mentre altre due isoforme della stessa proteina ma con peso inferiore (#A7 e #39) erano diminuite (Figura 12). Molte altre isoforme PDI sono invece rimaste invariate. L'interpretazione di questi risultati è difficile, anche perché non esistono pubblicazioni su queste proteine riguardo al diabete. Possiamo supporre che il cambiamento osservato nelle varie isoforme indichi un loro alterato turnover che, nei soggetti con DN, favorisce l'isoforma a più alto peso. PDI è una proteina multifunzionale del RE, coinvolta nella formazione dei ponti di solfuro delle proteine [Jessop et al., 2004]. Assistendo le proteine a trovare la corretta conformazione tridimensionale, PDI è essenziale per la funzione delle proteine. È stata segnalato un aumento di proteine mal avvolte nel RE in animali diabetici, con conseguente aumento dell'espressione di chaperon [Schröder et al., 2005]. È stato inoltre segnalato che l'aumento d'espressione di proteine della matrice extracellulare in cellule umane mesangiali coltivate in alte concentrazioni di glucosio può dipendere da un'attività di PDI superiore alla norma [Weston et al., 2001]. Viceversa, l'inibizione di PDI riduce l'eccessiva deposizione di matrice, caratteristica invece della DN [Weston et al., 2001]. Così, anche se l'azione specifica della isoforma #34 ci è sconosciuta, il suo aumento solo in fibroblasti di soggetti diabetici con DN può essere correlato con l'accumulo anormale di proteine di matrice, come di fatto avviene nei casi di DN.

La maggiore abbondanza della proteina DJ-1 (#38) (nota anche come RNA binding protein regulatory subunit) in pazienti T1DM con DN (Figura 12), è probabilmente associabile con il processo di stabilizzazione di specifici mRNA, regolazione che controlla i livelli di espressione delle proteine [Hollams et al., 2002]. La stabilizzazione degli mRNA di specifiche citochine proinfiammatorie (TNF-alfa, interleuchina 3, cicloossigenasi 2, PAI-2) aumenta la loro sintesi contribuendo in tal modo allo sviluppo di infiammazione grave [Carballo et al., 1998; Phillips et al., 2004]. Viceversa, la destabilizzazione degli mRNA è un meccanismo per ridurre l'infiammazione [Carballo et al., 1998]. È stata riportata un'associazione tra proteine leganti l'mRNA e l'IR e, di conseguenza, con un aumento del rischio di sviluppo di diabete di tipo 2 [Xia et al., 1999]. Anche la stabilizzazione del gene renina da parte di una specifica RBP può aumentare la produzione di renina [Adams et al., 2003]. Pertanto, possiamo ipotizzare che la maggiore espressione della RBP DJ-1

(#38), in pazienti T1DM con DN può essere associata alle complicanze diabetiche renali [Gallina et al., 2006; Deinum et al., 2002; Nelson et al., 2005; Mezzano et al., 2003].

TPT1 (Translationally-Controlled Tumor Protein 1, nota anche come fattore di rilascio di istamina, o p23, o fortilin) si lega ai microtubuli [Langdon et al., 2004] ed è impegnata nella regolazione del ciclo cellulare, della sintesi proteica [Langdon et al., 2004] e nella stabilità delle proteine [Liu et al., 2005]. In contrasto, TPT1 è stata trovata aumentata in una linea di cellule tumorali umane, dopo trattamento con fattori di crescita [Vercoutter-Edouart et al., 2001]. L'aumento di TPT1 in pazienti T1DM con DN (Figura 12) può essere associato all'alterata crescita delle cellule già osservata nella DN [Trevisan et al., 1992; Lurbe et al., 1996].

Le annessine mediano le risposte cellulari tramite cambiamenti nella concentrazione intracellulare di Ca^{2+} [Gerke et al., 2005]. L'annessina 2 è stata proposta come il principale recettore del plasminogeno sulla superficie delle cellule renali ed endoteliali, promuovendo così la fibrinolisi. [Gugliucci et al., 2002]. È stato riportato che l'inibizione della sintesi della annessina 2 porta ad una diminuita proliferazione cellulare e all'apoptosi [Tanaka et al., 2004]. Sia l'elevato glucosio che il diabete promuovono l'associazione di HSP 90KDa con l'annessina 2 e ciò comporta aumento di espressione e glicazione dell'annessina-2 sulla superficie delle cellule endoteliali aortiche [Lei et al., 2004]. La glicazione dell'annessina-2 sulla superficie delle cellule endoteliali ostacola la formazione del complesso tra l'attivatore del plasminogeno tissutale, il plasminogeno e l'annessina-2, compromettendo un meccanismo chiave di regolazione della fibrinolisi. Così, la riduzione della annessina-2 (#A9), in pazienti T1DM con DN (Figura 12), può essere collegata sia ad un aumento della proliferazione cellulare che alla riduzione della fibrinolisi, eventi entrambi associati alla DN [Trevisan et al., 1992; Lurbe et al., 1996].

Anche la riduzione di CIMPR (cation-independent mannose-6-phosphate receptor binding protein) (#A27) è interessante (Figura 12). CIMPR svolge un ruolo essenziale nella regolazione del traffico degli enzimi lisosomiali e nell'omeostasi cellulare [DellAngelica et al., 2001]. Inoltre questa proteina, essendo molto simile alle proteine leganti l'IGF (IGFBP), può inibire o potenziare le azioni di IGF [Jones et al., 1995]. L'attivazione del sistema IGF in cellule mesangiali promuove la cicatrizzazione glomerulare [Karl et al., 2005], e può contribuire all'ipertrofia renale. [Flyvbjerg et al., 1995]. È stato riportato che un'aumentata degradazione di IGFBP-3 nelle urine di pazienti con T1DM e DN a causa dell'attività proteolitica di una serina proteasi [Shinada et al., 2000] con conseguente aumento della concentrazione di IGF libero. La riduzione di CIMPR, quindi, può portare ad un aumento della disponibilità locale di IGF e quindi potrebbe contribuire ai cambiamenti strutturali osservati nella DN.

Una ridotta degradazione della membrana basale, associata alla riduzione dell'attività della catepsina, può contribuire all'ispessimento della membrana basale e allo sviluppo di

microangiopatia [Belfiore et al., 1985]. Viceversa, il trattamento con proteasi può contrastare l'aumentata espressione di TGF-beta1 indotta dagli AGE [Paczek et al., 2001]. La soppressione dell'attività di catepsina, probabilmente mediata dalla alcalinizzazione dei lisosomi, è coinvolta nella degradazione delle proteine [Sebekova et al., 1997]. Di rilievo quindi la dimostrazione dell'aumento del pH nei fibroblasti in coltura ottenuti da pazienti T1DM con DN e in rapida proliferazione [Trevisan et al., 1992; Lurbe et al., 1996]. La riduzione della catepsina beta 2 (#40) nei pazienti T1DM con DN (Figura 12) è compatibile con una diminuita attività proteolitica con conseguente ipertrofia cellulare e ispessimento della membrana basale. Questi dati sembrano, tuttavia, in contrasto con il sopra riportato aumento della attività proteolitica nel plasma nel diabete di tipo 1 [Pagetta et al., 2003]. È quindi possibile che siano coinvolti diversi tipi d'attività proteolitica. Solo ulteriori indagini potranno chiarire questi difficili e complesse questioni.

Nessuna differenza quantitativa di proteine coinvolte nella regolazione intracellulare del folding e turnover proteico è stata rilevata confrontando i dati ottenuti da pazienti T1DM senza DN e i soggetti sani. Pertanto, le differenze presentate in questo lavoro sono state ottenute solo confrontando pazienti diabetici con complicanze renali rispetto a soggetti senza complicanze renali, sia che essi fossero o meno diabetici.

Questi cambiamenti sembrano essere costitutivi, probabilmente geneticamente determinati e legati alla patogenesi delle lesioni dei tessuti caratteristiche della nefropatia diabetica.

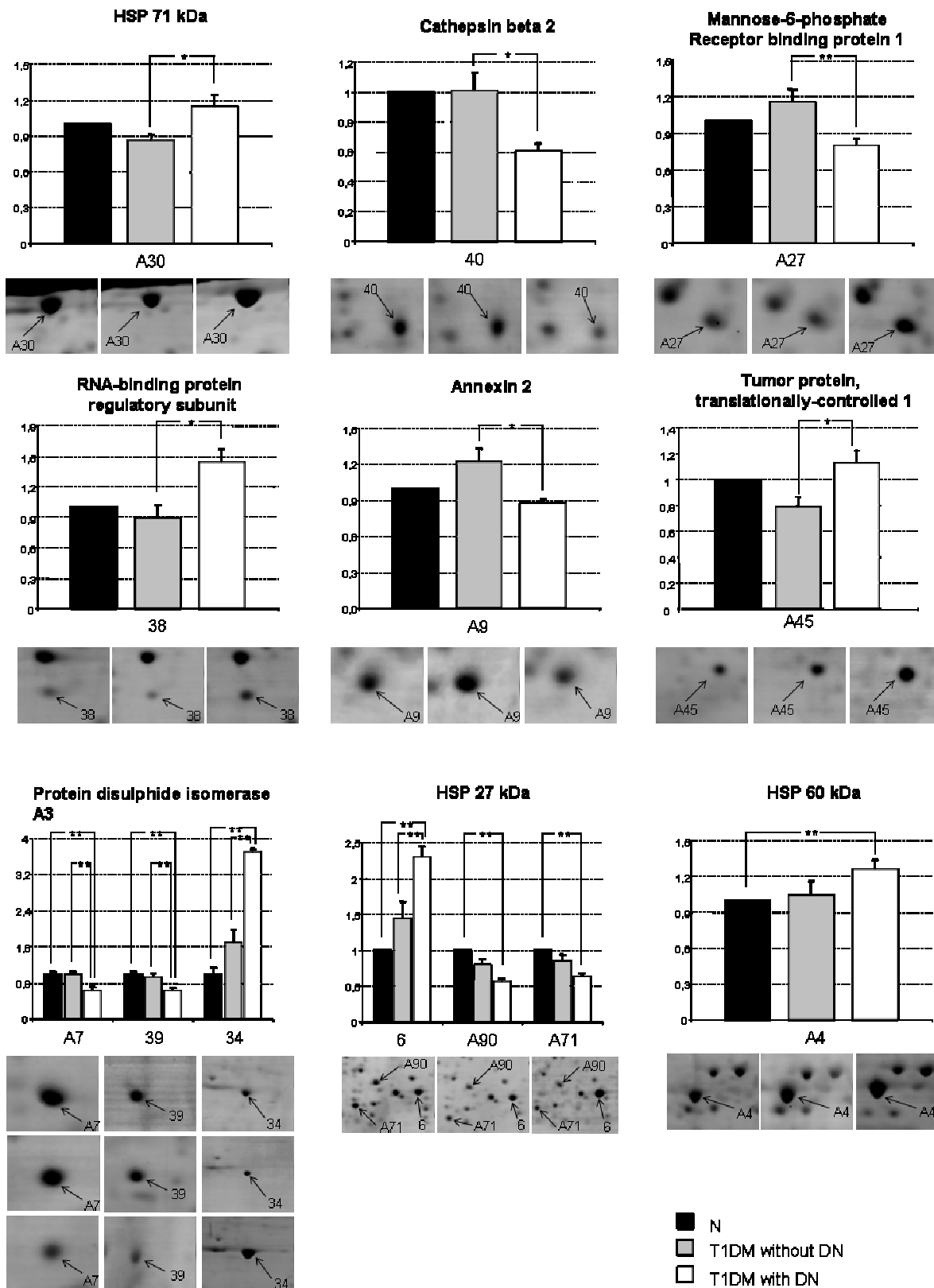


Figura 12: A) Istogrammi dei livelli quantitativi delle proteine trovate alterate nel confronto fra gruppi. I dati (media ± SEM), sono espressi come fold change vs controllo. I confronti significativi sono indicati con: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$
 B) immagini selezionate degli spo

Proteine coinvolte nel metabolismo energetico

Abbiamo identificato un totale di 23 spot appartenenti alle proteine coinvolte nel metabolismo energetico (Tabella 4). Questo gruppo rappresenta il 18% di tutte le proteine isolate nelle colture di fibroblasti sia di soggetti normali che diabetici. Come probabile conseguenza di splicing alternativo dei trascritti primari e/o di modifiche post-traduzionali, alcuni di questi spot hanno dato uguale identificazione. Pertanto, sono state identificate 11 uniche proteine.

L'analisi software, combinata con quella statistica, ha rivelato differenze significative, tra i tre gruppi di soggetti, in 7 spot, corrispondenti a 3 uniche proteine, come mostrato in Figura 13.

Un alterato metabolismo del glucosio intracellulare è stato già collegato alla patogenesi della nefropatia diabetica in altri studi [Meyer et al., 2005].

Questo studio ha rivelato isoforme alterate e differenze di attività della PK. In particolare abbiamo riscontrato una diminuita espressione dell'attività di questo enzima nei fibroblasti dei pazienti T1DM con DN (Figura 14). La PK è un enzima altamente regolato che converte il PEP in piruvato, ultima reazione della glicolisi. In questa reazione fortemente esoergonica, il fosfato ad alta energia del PEP è conservato come ATP. I dati riportati in letteratura sull'attività della PK e il diabete sono contrastanti. L'attività e l'mRNA della PK sono stati trovati diminuiti sia nel tessuto adiposo [Belfiore et al., 1975] che in colture di isole pancreatiche [Lupi et al., 2004] di pazienti affetti da diabete di tipo 1, così come nei modelli animali di diabete insulino-dipendente [Kondoh et al., 1992; Shih et al., 2001].

E' noto che l'insulina attiva la PK [Parks et al., 1982]. Nei fibroblasti dei due gruppi di diabetici abbiamo osservato un aumento della isoforma #A98 rispetto ai controlli, mentre la isoforma #35 era diminuita nei fibroblasti da T1DM pazienti con DN rispetto ad altri due gruppi. Infine l'isoforma #26 è stata trovata ridotta nei fibroblasti dei sani rispetto ad entrambi i gruppi di diabetici. L'attività di PK è risultata ridotta solo nei pazienti con DN (Figura 13).

Poiché dai risultati della attività enzimatica non è possibile discriminare le attività di ogni singola isoforma, dai nostri dati non possiamo concludere che la diminuita espressione della isoforma #35, (nei pazienti con DN) sia responsabile per la diminuzione globale dell'attività della PK. Ulteriori studi riguardo alle possibili modifiche post-traduzionali potrebbero chiarire questi punti.

L'insulina stimola l'espressione del gene della PK negli adipociti, attraverso vie di segnale che coinvolgono sia PI3K che MAPK chinasi [Asai et al., 2003]. È ormai riconosciuto che, in condizioni di IR, l'azione dell'insulina sul segnale intracellulare mediato da PI3K è ridotta [Pessin et al., 2000; Cusi et al., 2000], mentre, attraverso la via di segnale extracellulare regolata dalle MAP chinasi, rimane normale [Cusi et al., 2000]. Pertanto, dai nostri dati è possibile dedurre che l'attività della PK sia prevalentemente attivata attraverso la via di PI3K.

E' stato dimostrato che l'IR è associata alla DN [Yip et al., 1993]. Pertanto, la ridotta attività della PK nei fibroblasti dei pazienti con nefropatia sarebbe d'accordo con questa ipotesi.

Oltre alla PK, abbiamo riscontrato alterazioni significative di altri enzimi glicolitici quali la trioso fosfato isomerasi (TPI, #36) e l'alfa enolasi (#A22, #A14, #27) (Figura 13).

L'enzima TPI è risultato aumentato nei fibroblasti di T1DM senza DN rispetto agli altri gruppi. TPI (CE 5.3.1.1) catalizza l'interconversione di di-idrossiacetonefosfato in D-gliceraldeide-3-fosfato (GAP). GAP è poi ulteriormente ossidato a 1,3 difosfoglicerato tramite l'enzima GAP-deidrogenasi (GAPDH). Du e colleghi [Du et al., 2003] hanno riportato che l'attività della GAPDH è ridotta nel diabete di tipo 1, sia negli esseri umani che animali, così come in cellule esposte a elevato glucosio. Secondo Brownlee [Brownlee et al., 2005], una diminuita attività della GAPDH porta ad un aumento degli intermedi glicolitici che sono a monte, a alla attivazione di altre vie metaboliche, che sono alterati in diabete, vale a dire la via degli AGEs e della PKC. Con i dati disposizione non siamo in grado di spiegare come mai questo enzima sia alterato solo nei diabetici senza nefropatia e non in quelli con. Avremmo voluto determinare e confrontare l'attività di TPI fra i gruppi ma, purtroppo, non siamo riusciti a trovare i reagenti necessari.

L'alfa enolasi (CE 4.2.1.11), isoenzima della enolasi, catalizza la conversione di 2-fosfoglicerato a PEP. Essa è presente nel citoplasma in complessi multi-enzimatici, spesso in associazione con altri enzimi glicolitici, come ad esempio la PK, la fosfoglicerato mutasi, l'aldolase [Merkulova et al., 1997; Foucault et al., 1999]. Sono stati identificati tre forme di enolasi. La forma alfa è presente nella maggior parte dei tessuti e negli embrioni, la beta è espressa nei tessuti muscolari e la gamma è presente solo nei tessuti neuronali [Pancholi et al., 2001].

L'alfa-enolasi è stata identificata non solo nel citoplasma, ma anche sulla superficie della membrana plasmatica. Sebbene l'orientamento di tale proteina sulla membrana non sia ancora chiaro, è noto che l'amminoacido C-terminale è esposto sulla superficie cellulare e coinvolto nel legame del plasminogeno e nella sua attivazione [Pancholi et al., 2001].

In tessuti cardiaci di scimmie, l'espressione di alfa enolasi e di altre proteine coinvolte nel metabolismo energetico sono state trovate ridotte in relazione all'età dei soggetti analizzati [Yan et al., 2004]. Inoltre, diversi studi [Akisawa et al., 1997; Orth et al., 1998] hanno dimostrato che, nelle malattie autoimmuni sistemiche, autoanticorpi specifici per alfa enolasi sono riscontrati più frequentemente nei pazienti con insufficienza renale. Questi anticorpi riconoscono la forma associata alla membrana e interferiscono con la funzione recettore di questo enzima, inibendo quindi il legame del plasminogeno. È noto che il sistema di attivazione del plasminogeno, in risposta a lesioni vascolari convertendo il plasminogeno a plasmina. La plasmina, a sua volta, degrada la fibrina e diverse proteine della matrice extracellulare.

La deposizione di fibrina è un fattore importante nello sviluppo di disturbi vascolari come l'aterosclerosi, e l'accumulo di proteine della matrice extracellulare è una caratteristica della fibrosi renale. La fibrosi e la conseguente lesione vascolare nel rene può essere critica nei capillari glomerulari causando la perdita di proteine e conseguente albuminuria. Così, l'inibizione del plasminogeno, forse a causa di una modifica del legame alla alfa enolasi (che potrebbe dipendere da una alterata espressione o da modifiche post traslazionali) potrebbe portare a un accumulo di proteine della matrice extracellulare, come comunemente si osserva nella DN. Purtroppo, non abbiamo potuto determinare attività dell'alfa enolasi a causa dell'irreperibilità dei reagenti necesari. I nostri dati sono i primi a segnalare la possibile associazione tra alfa enolasi e la DN. In letteratura non sono presenti studi sulla ricerca di autoanticorpi contro l'alfa enolasi in soggetti con diabete di tipo 1, che è considerata una malattia autoimmune. Ulteriori analisi potrebbero essere svolte per chiarire questo importante punto.

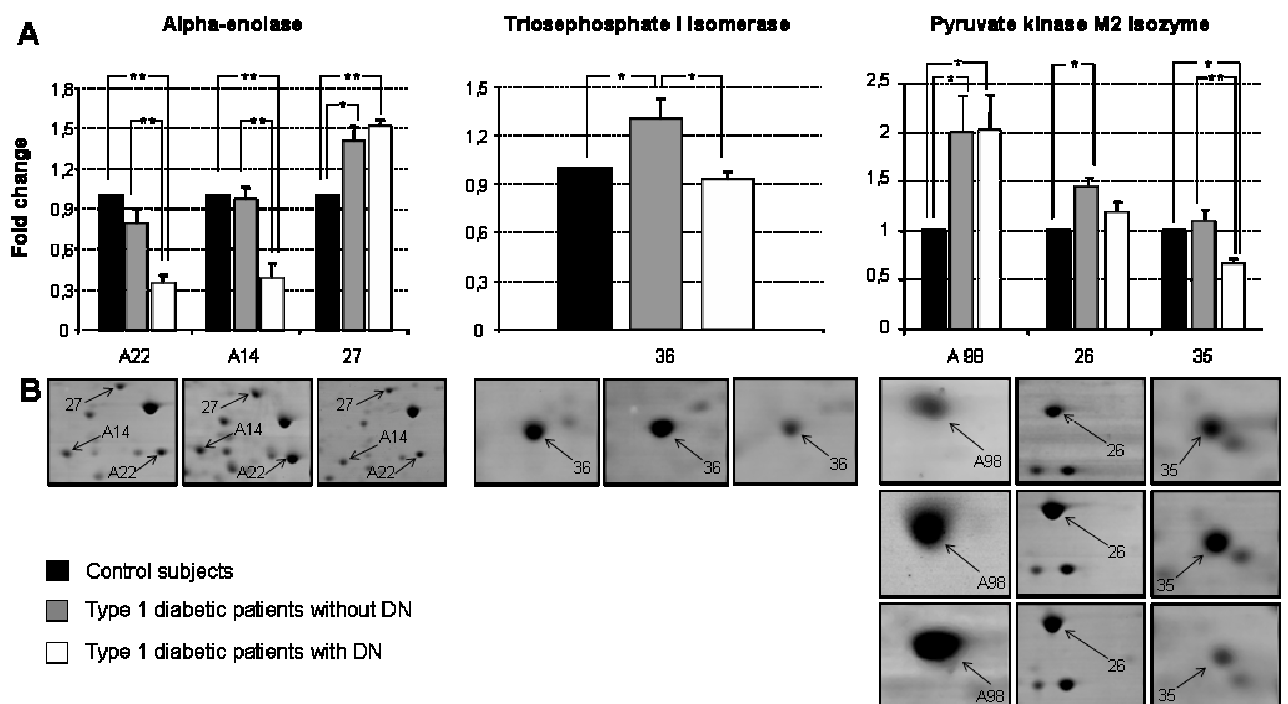


Figura 13: A) Istogrammi dei livelli quantitativi delle proteine trovate alterate nel confronto fra gruppi. I dati (media \pm SEM), sono espressi come fold change vs controllo. I confronti significativi sono indicati con: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$
 B) immagini selezionate degli spot.

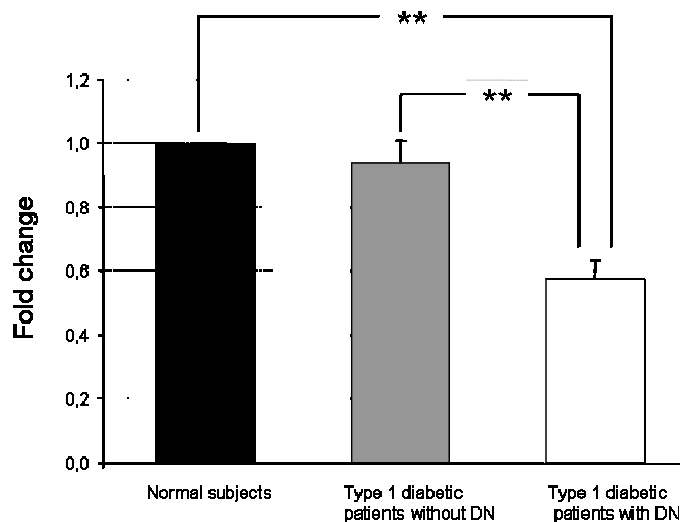


Figura 14: Attività della piruvato chinasi in fibroblasti da pazienti T1DM con e senza DN e soggetti normali di controllo. I dati (media \pm SEM), sono espressi come fold change vs controlli (** = $p < 0,01$).

Effetti del trattamento con alto glucosio

Abbiamo valutato gli effetti dell'alto glucosio sull'espressione del proteoma di colture di fibroblasti ottenuti da pazienti affetti da diabete di tipo 1, con o senza nefropatia, nonché da controlli sani. Lo scopo era verificare se i fibroblasti dei soggetti con predisposizione genetica alla nefropatia rispondevano diversamente all'esposizione ad alto glucosio rispetto ai fibroblasti provenienti dai soggetti non nefropatici. Infatti, la predisposizione genetica alla nefropatia, indipendentemente dal controllo metabolico e dall'esposizione ad altri fattori ambientali, potrebbe condizionare la risposta delle cellule alle alte concentrazioni di glucosio extracellulare e contribuire così alle alterazioni tessutali che portano allo sviluppo di questa complicanza. Una fase successiva di esperimenti potrebbe essere finalizzata a manipolare geneticamente le cellule umane in coltura per correggere le alterazioni indotte dall'esposizione all'alto glucosio. Tramite trasferimento genico mediato da adenovirus o inibizione dell'espressione delle proteine in studio con oligonucleotidi antisenso, potrebbe essere possibile modulare i livelli d'espressione dei geni d'interesse in queste cellule, e ottenere nuove informazioni sulla possibilità di correggere i danni indotti dall'iperglicemia nelle cellule renali.

Abbiamo esaminato le variazioni quantitative delle proteine prima e dopo l'esposizione a livelli elevati di glucosio, sia all'interno di ciascun gruppo, che tra gruppi.

Come precedentemente riportato, moesin (#A23) è una proteina associata al citoscheletro ed è inoltre in grado di agire come recettore degli AGE [McRobert et al 2003].

Poichè gli AGEs si accumulano nei tessuti con cattivo controllo glicemico, il loro legame ad un recettore cellulare può favorire il loro metabolismo da parte della cellula e in tal modo fornire un meccanismo per limitare i danni. In normali condizioni di glucosio, l'espressione di moesin è più alta nei fibroblasti dei pazienti T1DM con DN. Abbiamo interpretato tale aumento come un meccanismo di protezione contro l'accumulo di AGEs. Tuttavia, dopo l'esposti ad elevato glucosio per 72 ore, è stata osservata un'inattesa diminuzione di moesin proprio nei pazienti con DN rispetto ai controlli, mentre nessuna modifica è stata rilevata diabetici senza DN (Figura 15). Questo dato può essere interpretato ipotizzando che l'assenza di un ulteriore aumento di moesin nei fibroblasti dei pazienti con complicanze sia conseguenza di una già massima espressione di questa proteina. Questa osservazione può fornire un possibile ed ulteriore collegamento tra il controllo metabolico e la patogenesi delle complicanze diabetiche, suggerendo che il fallimento di questo meccanismo di difesa antiossidante nelle cellule di pazienti T1DM con DN porti ad un accumulo di AGEs in condizioni di iperglicemia.

Un'altra proteina che varia dopo il trattamento con alto glucosio è la beta actina. Beltramo e colleghi [Beltramo et al., 2006] hanno dimostrato che l'alto glucosio può alterare l'actina nei periciti della retina. Nei fibroblasti da pazienti T1DM senza DN, sia l'analisi intra che inter gruppo mostra una significativa riduzione della beta actina (#A61) dopo stimolazione con glucosio. Tale riduzione è interpretabile come un sintomo di stress, come se le cellule dei soggetti diabetici fossero più sensibili o privi di meccanismi di difesa rispetto alle cellule dei soggetti normali. Tuttavia, i fibroblasti dei pazienti con DN hanno presentato lo stesso livello di beta actina e la stessa risposta dei soggetti normali. Interpretare questi risultati è difficile.

Dopo l'esposizione ad elevato glucosio per 72 ore, l'analisi intra gruppo ha mostrato una diminuzione significativa di vimentina (#A85), tuttavia, solo nei fibroblasti di soggetti normali.

La vimentina è responsabile dell'integrità strutturale di cellule e tessuti: le proprietà viscoelastiche uniche di tale proteina conferiscono resistenza a fattori esterni di stress fisico [Chou et al., 2000]. Le alterazioni di vimentina potrebbero quindi essere correlate sia ad un effetto osmotico del trattamento che a quello metabolico. Dato il suo ruolo importante nella stabilizzazione e rafforzamento delle cellule esposte ad alta concentrazione salina e stress osmotico, supponiamo che la riduzione di vimentina nei controlli rifletta una risposta verso il trattamento dell'alto glucosio. Nei soggetti diabetici tale diminuzione non è stata significativa, il che potrebbe indicare un adattamento e/o una incapacità di risposta al trattamento con il glucosio, probabilmente dovuto alla precedente e prolungata esposizione delle cellule dei diabetici all'iperglicemia. In questo modello, la predisposizione genetica alla DN non avrebbe un ruolo importante.

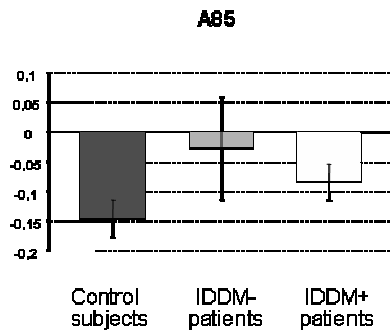
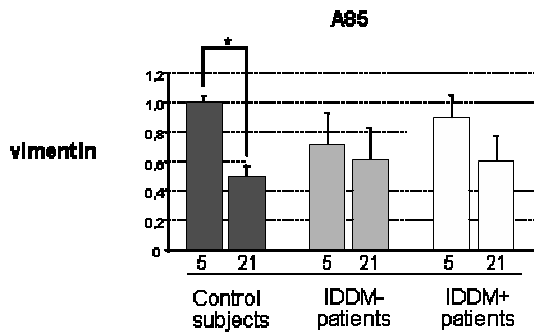
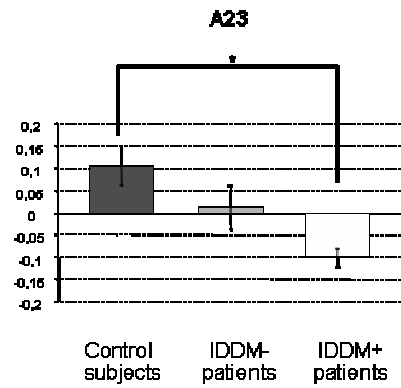
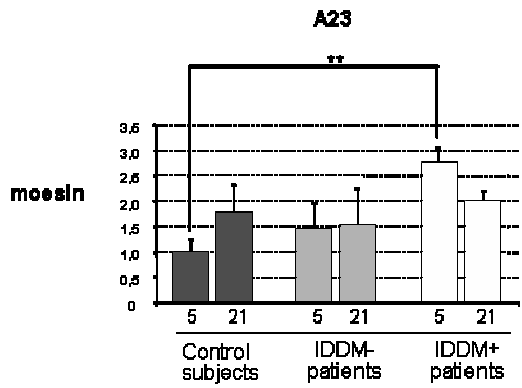
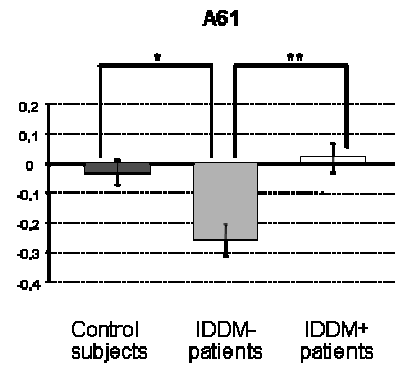
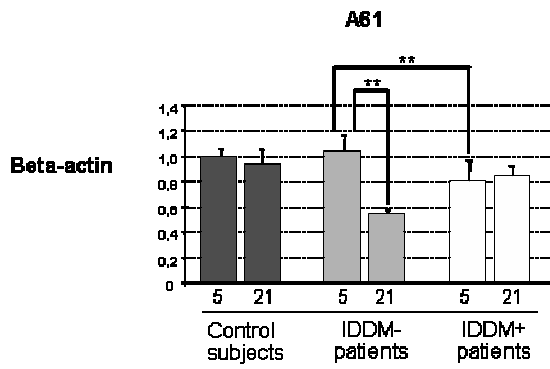
Nei fibroblasti coltati a normali livelli di glucosio non abbiamo osservato alcuna differenza nell'espressione degli enzimi della regolazione redox cellulare, come ad esempio Cu-Zn

superossido dismutasi (#7), perossiredoxina-2 (#16), perossiredoxina-6 (#81), HSPs (#A31, #58, #A30, #6, #14, #A71, #55, #A4, #56, #53) confrontando i dati ottenuti dai pazienti T1DM senza DN rispetto ai controlli. Al contrario, i fibroblasti dai pazienti T1DM con DN hanno mostrato differenze quantitative nelle proteine coinvolte nella risposta di stress rispetto sia ai soggetti di controllo e ai pazienti diabetici senza DN. Abbiamo interpretato queste differenze come indici di una diversa capacità delle cellule provenienti da pazienti con DN di rispondere a vari stress, come ad esempio lo stress ossidativo, ipotesi sostenuta anche da altri autori [Ceriello, 2000].

I fibroblasti dei pazienti T1DM con DN, dopo trattamento con alto glucosio, hanno mostrato una diminuzione di HSP 71kDa (#A30) e un aumento di HSP 27kDa (#A90) e PDI (#39) rispetto ai controlli (Figura 15). Da un'osservazione generale abbiamo inoltre notato che i fibroblasti da pazienti T1DM con DN presentano i più bassi livelli di espressione di chaperon molecolari come HSP 27KDa, PDI, e catepsina B, in condizioni di glucosio sia normali che elevate (Figura 15). Presi insieme, questi dati suggeriscono la presenza, in fibroblasti da pazienti T1DM con DN, di alcune modifiche e/o alterazioni dei processi che assistono ripiegamento e metabolismo delle proteine, sia in condizioni di normale che di alto glucosio. Infatti è noto che chaperones molecolari, come PDI e HSP 27, hanno funzione protettiva contro diverse condizioni di stress. PDI è un chaperon molecolare, che assiste il corretto avvolgimento dei polipeptidi e la sua diminuzione in condizioni di alto glucosio nei fibroblasti normali può portare all'inibizione della degradazione delle proteine malformate, processo essenziale per prevenire l'accumulo e l'aggregazione di proteine difettose. Pertanto, la diminuzione di PDI osservata in condizione di alto glucosio, può causare l'aggregazione delle proteine e stress a livello del RE [Sitia et al., 2004].

La riduzione di catepsina B nei fibroblasti dei pazienti T1DM con DN in condizioni di normale glucosio è compatibile con una diminuita attività proteolitica che porta ad ipertrofia cellulare e ispessimento della membrana. Il fatto che catepsina B non si riduca ulteriormente in risposta agli elevati livelli di glucosio nei soggetti con DN, può indicare che, già a normale glucosio, questa proteina è presente al livello di espressione più basso possibile.

Di fatto, i nostri risultati sono in accordo con quanto riportato in un altro studio, riguardante gli effetti dell'alto glucosio sulle cellule della retina umana dove simili alterazione di PDI e cathepsin B sono stati segnalati [Yokoyama et al., 2006].



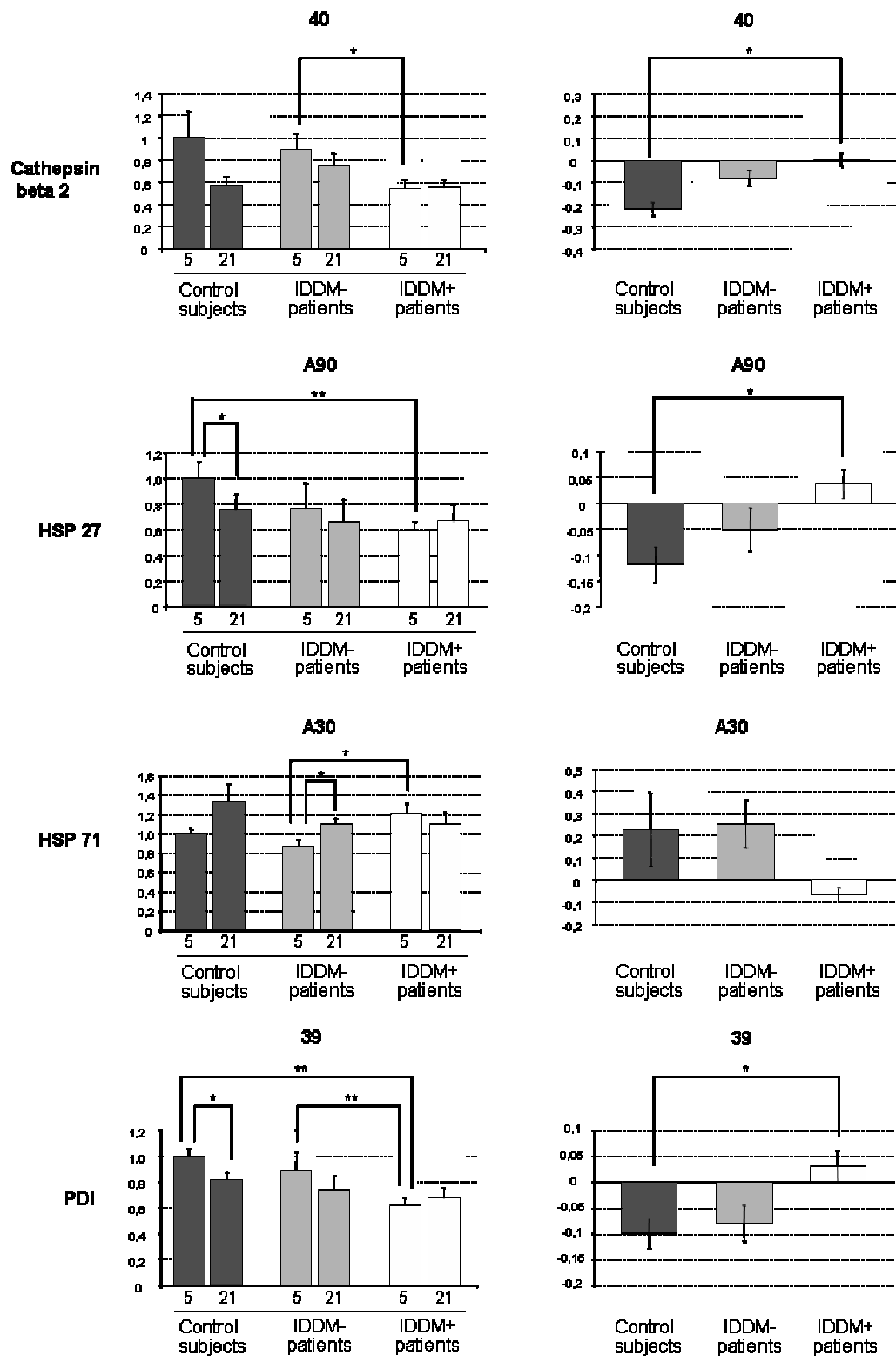


Figura 15: Istogrammi dei livelli quantitativi delle proteine trovate alterate nell'analisi intra gruppo (a sinistra) e fra gruppi (a destra) dopo trattamento con alto glucosio. I dati (media \pm SEM), sono espressi come fold change vs controllo. I confronti significativi sono indicati con: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Conclusioni

Il nostro gruppo di ricerca, dopo aver raccolto le biopsie cutanee e coltivate le cellule, ha messo a punto un protocollo sperimentale per la caratterizzazione riproducibile delle proteine di fibroblasti tramite 2-DE.

Questo lavoro ha permesso, in primo luogo, di ottenere maggiori e più approfondite conoscenze sul proteoma di fibroblasti umani coltivati in vitro, dati utili come riferimento per successive indagini applicate a varie patologie anche non diabetiche.

Abbiamo confrontato le proteine espresse dai fibroblasti umani di pazienti affetti da diabete di tipo 1 con lunga durata di malattia (15-20 anni) e caratterizzata dalla presenza o assenza di nefropatia (albuminuria >200 $\mu\text{g}/\text{min}$), e di soggetti normali di controllo.

Poichè le colture cellulari primarie derivate da biopsie in vivo sono state allontanate dalle condizioni ambientali, i cambiamenti osservati sembrano essere costitutivi, probabilmente geneticamente determinati e legati alla patogenesi delle lesioni dei tessuti caratteristiche della nefropatia diabetica.

L'aver dimostrato che i fibroblasti di pazienti con nefropatia presentano pattern di spot proteici molto differenti rispetto a quelli ottenuti dai fibroblasti di diabetici non nefropatici e di soggetti sani, è già di per sè un dato originale ed importante: esso conferma l'esistenza, in pazienti con DN, di un forte background genetico che si manifesta con fenotipi specifici. Abbiamo anche dimostrato che i fibroblasti dei diabetici con nefropatia rispondono diversamente all'esposizione ad alto glucosio rispetto ai fibroblasti provenienti dai soggetti non neuropatici.

L'identificazione delle proteine risultate quantitativamente diverse nell'analisi fra gruppi ha quindi fornito informazioni utili sia per una migliore comprensione dei meccanismi fisiopatologici della nefropatia diabetica, che per l'identificazione di possibili markers precoci di predisposizione allo sviluppo di tale complicanza. Tuttavia solo studi longitudinali di follow-up potranno confermare la validità di tali proteine come markers precoci di nefropatia in diabetici ancora normoalbuminurici.

Publicazioni:

- Millioni R., Iori E., Puricelli L., Arrigoni G., Vedovato M., Trevisan R., James P., Tiengo A., Tessari P. Abnormal cytoskeletal protein expression in cultured skin fibroblasts from type 1 diabetes mellitus patients with nephropathy: a proteomic approach. *Proteomics*. 2007 [under press] **IF(2006):5.735**

- Tessari P, Puricelli L, Iori E, Arrigoni G, Vedovato M, James P, Coracina A, Millioni R. Altered chaperone and protein turnover regulators expression in cultured skin fibroblasts from type 1 diabetes mellitus with nephropathy. *J Proteome Res*. 2007 Mar;6(3):976-86. **IF(2006):5.151**

- Puricelli L, Iori E, Millioni R., Arrigoni G, James P, Vedovato M, Tessari P. Proteome analysis of cultured fibroblasts from type 1 diabetic patients and normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Sep;91(9):3507-14. **IF(2006):5.799**

- Iori E, Millioni R., Puricelli L, Arrigoni G, Trevisan R, James P, Pinna L, Tessari P. Glycolytic enzymes in cultured fibroblasts from type 1 diabetic patients without and with nephropathy: reduced pyruvate kinase activity. ...*Under submission*

Bibliografia

- Adams DJ, Beveridge DJ, van der Weyden L, Mangs H, Leedman PJ, Morris BJ (2003). HADHB, HuR, and CP1 bind to the distal 3'-untranslated region of human renin mRNA and differentially modulate renin expression. *J Biol Chem*; 278: 44894-44903
- Akisawa N, Maeda T, Iwasaki S, Onishi S (1997). Identification of an autoantibody against alpha-enolase in primary biliary cirrhosis. *J Hepatology*; 26: 845-851
- Arrigo AP (2001). Hsp27: novel regulator of intracellular redox state. *IUBMB Life*; 52: 303-307
- Asai Y, Yamada K, Watanabe T, Keng VW, Noguchi T (2003). Insulin stimulates expression of the pyruvate kinase M gene in 3T3-L1 adipocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*; 67: 1272-1277
- Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*; 6: 435-442
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4. *J Biol Chem*. 277: 15028-15034
- Bamburg JR, Bray D (1987). Distribution and cellular localization of actin depolymerization factor. *J Cell Biol*; 105: 2817-2825
- Battle D, Lurbe A, LaPointe M, Agrawal R (1995). The Na⁺/H⁺ antiporter, type I diabetes, and hypertension. *Kidney Curr Surv World Lit*; 4: 1-3
- Belfiore F, Rabuazzo AM, Iannello S, Campione R, Vasta D (1985). Cathepsin D and other hydrolases in the kidney of streptozotocin-diabetic mice. Possible relevance to microangiopathy. *Horm Metab Res*; 17: 435-437
- Beltramo E, Berrone E, Giunti S, Gruden G, Perin PC, Porta M (2006). Effects of mechanical stress and high glucose on pericyte proliferation, apoptosis and contractile phenotype. *Exp Eye Res*; 83: 989-94.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology, and some applications. *J Bioch Biophys Methods*; 6: 317-339
- Borch-Johnsen K, Norgaard K, Hommel E, Mathiesen ER, Jensen JS, Deckert T, Parving HH (1992). Is diabetic nephropathy an inherited complication? *Kidney Int*; 41: 719-722
- Borrebaeck CAK (2000). Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. *Immunol Today*; 21: 379-382
- Bretscher A, Edwards K, Fehon RG (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 3: 586-599

- Breyer JA (1996). Diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *Am J Kidney Dis*; 20: 533-547
- Brownlee M (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*; 54: 1615-1625
- Brownlee M, Cerami A, Vlassara H (1988). Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*; 3188: 1315-1321
- Burkart V, Liu H, Bellmann K, Wissing D, Jaattela M, Cavallo MG, Pozzilli P, Briviba K, Kolb H (2000). Natural resistance of human beta cells toward nitric oxide is mediated by heat shock protein 70. *J Biol Chem*; 275: 19521-19528
- Callahan MK, Chaillot D, Jacquin C, Clark PR, Menoret A (2002). Differential acquisition of antigenic peptides by Hsp70 and Hsc70 under oxidative conditions. *J Biol Chem*; 277: 33604-33609
- Campostrini N, Areces LB, Rappsilber J, Pietrogrande MC, Dondi F, Pastorino F, Ponzoni M, Righetti PG (2005). Spot overlapping in two-dimensional maps: a serious problem ignored for much too long. *Proteomics*; 5(9): 2385-95
- Caramori ML, Fioretto P, Mauer M (2000). The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes*; 49(9): 1399-408
- Carballo E, Lai WS, Blackshear PJ (1998). Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science*; 281: 1001-1005
- Carmassi F, Morale M, Puccetti R, De Negri F, Monzani F, Navalesi R, Mariani G (1992). Coagulation and fibrinolytic system impairment in insulin dependent diabetes mellitus. *Thromb Res*; 67: 643-654
- Caron JM (1989). Alteration of microtubule physiology in hepatocytes by insulin. *J Cell Physiol*; 138: 603-610
- Celis JE, Gromov P (1999). 2D protein electrophoresis: can it be perfected? *Curr Opin Biotech*; 10: 16-21
- Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F, Quagliario L, Moro M, Damante G, Viberti GC (2000). Detective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes*; 49: 2170-2177
- Chen HS, Shan YX, Yang TL, Lin HD, Chen JW, Lin SJ, Wang PH (2005). Insulin deficiency downregulated heat shock protein 60 and IGF-1 receptor signaling in diabetic myocardium. *Diabetes*; 54: 175-181
- Chou YH, Goldman RD (2000). Intermediate filament on the move. *J Cell Biol*; 150: F101-105
- Clarkson MR, Murphy M, Gupta S, Lambe T, Mackenzie HS, Godson C, Martin F, Brady HR (2002). High glucose-altered gene expression in mesangial cells. Actin-regulatory protein gene expression is triggered by oxidative stress and cytoskeletal disassembly. *J Biol Chem*; 277: 9707-9712

- Conway BR, Maxwell AP, Savage DA, Patterson CC, Doran PP, Murphy M, Brady HR, Fogarty DG (2004). Association between variation in the actin-binding gene caldesmon and diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes*; 53: 1162-1165
- Cooper JA (1991). The role of actin polymerization in cell mobility. *Annu Rev Physiol*; 53: 585-605
- Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawat T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signalling in human muscle. *J Clin Invest*; 105: 311-320
- Dandapani SV, Sugimoto H, Matthews BD, Kolb RJ, Sinha S, Gerszten RE, Zhou J, Ingber DE, Kalluri R, Pollak MR (2007). Alpha-actinin-4 is required for normal podocyte adhesion. *J Biol Chem*; 282: 467-77
- De Cosmo S, Argiolas A, Miscio G, Thomas S, Piras GP, Trevisan R, Perin PC, Bacci S, Zucaro L, Margaglione M, Frittitta L, Pizzuti A, Tassi V, Viberti GC, Trischitta V. (2000). A PC-1 amino acid variant (K121Q) is associated with faster progression of renal disease in patients with type 1 diabetes and albuminuria. *Diabetes*; 49(3): 521-4
- De Cosmo S, Margaglione M, Tassi V, Garrubba M, Thomas S, Olivetti C, Piras GP, Trevisan R, Vedovato M, Cavallo-Perin P, Bacci S, Coalizzo D, Costernino C, Zucaro L, Di Minno G, Trischitta V, Viberti GC (1999). ACE, PAI-1, decorin and Werner helicase genes are not associated with the development of renal disease in European patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*; 15: 247-53
- Deinum J, Chaturvedi N (2002). The Renin-Angiotensin system and vascular disease in diabetes. *Semin Vasc Med*; 2: 149-156
- DellAngelica EC, Payne GS (2001). Intracellular cycling of lysosomal enzyme receptors: cytoplasmic tails' tales. *Cell*; 106: 395-398
- Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, Brownlee M (2003). Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest*; 112: 1049-1057
- Dunlop ME, Muggli EE (2000). Small heat shock protein alteration provides a mechanism to reduce mesangial cell contractility in diabetes and oxidative stress. *Kidney Int*; 57: 464-475
- El Nahas AM, Muchaneta-Kubara EC, Zhang G, Adam A, Goumenos D (1996). Phenotypic modulation of renal cells during experimental and clinical renal scarring. *Kidney Int*; 54: S23-27
- Finotti P, Pagetta A (2004). A heat shock protein70 fusion protein with alpha1-antitrypsin in plasma of type 1 diabetic subjects. *Biochem Biophys Res Commun*; 315: 297-305
- Finotti P, Piccoli A, Carraro P (1992). Alteration of plasma proteinase-antiproteinase system in type 1 diabetic patients. Influence of sex and relationship with metabolic control. *Diabetes Res Clin Pract*; 18: 35-42
- Flyvbjerg A, Landau D, Domene H, Hernandez L, Gronbaek H, LeRoith D (1995). The role of growth hormone, insulin-like growth factors (IGFs), and IGF-binding proteins in experimental diabetic kidney disease. *Metabolism*; 44 (10 Suppl 4): 67-71

- Foucault G, Vacher M, Merkulova T, Keller A, Ario-Dupont M (1999). Presence of enolase in the M-band of skeletal muscle and possible indirect interaction with the cytosolic muscle isoform of creatine kinase. *Biochem J*; 338: 115–121
- Fowler VM, Sussmann MA, Miller PG, Flucher BE., Daniels MP (1993). Tropomodulin is associated with the free (pointed) ends of the thin filaments in rat skeletal muscle. *J Cell Biol*; 120: 411-420
- Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, Hamada Y, Ueda H, Shintani M, Fukuda M, Ogihara T (1998). Meta-analysis of association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme genewith diabetic nephropathy and retinopathy. *Diabetologia*; 41: 47-52
- Galkina E, Ley K (2006). Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*; 17: 368-377
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 6: 449-461
- Griffin TJ, Gygi SP, Ideker T, Rist B, Eng J, Hood L, Aebersold R (2002). Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*; 4: 323-333
- Gugliucci A, Ghitescu L (2002). Is diabetic hypercoagulability an acquired annexinopathy? Glycation of annexin II as a putative mechanism for impaired fibrinolysis in diabetic patients. *Med Hypotheses*; 59: 247-251
- Gutmann I, Bernt E (1974). Pyruvate Kinase. In Bergmeyer HU (eds) *Methods of Enzymatic Analysis*; vol. 2; Verlag Chemie Weinheim, Academic Press, Inc. New York and London; 774-777
- Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*; 19: 1720-1730
- Haddad JJ (2002). The involvement of L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione/GSH) in the mechanism of redox signaling mediating MAPKp38-dependent regulation of pro-inflammatory cytokine production. *Biochem Pharmacol*; 63: 305-320
- Hartl FU (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*; 381: 571-579
- Helfman DM, Levy ET, Berthier C, Shtutman M, Riveline D, Grosheva I, Lachish-Zalait A, Elbaum M, Bershadsky AD (1999). Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. *Mol Biol Cell*; 10: 3097-3112
- Hollams EM, Giles KM, Thomson AM, Leedman PJ (2002). *Neurochem Res*; 27, 957-980
- Huang C, Kim Y, Caramori ML, Fish AJ, Rich SS, Miller ME, Russell GB, Mauer M. (2002). Cellular basis of diabetic nephropathy: II. The transforming growth factor-beta system and diabetic nephropathy lesions in type 1 diabetes. *Diabetes*; 51(12): 3577-81
- Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL (1992). Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89: 11059-11063

- Iori E, Marescotti MC, Vedovato M, Ceolotto G, Avogaro A, Tiengo A, Del Prato S, Trevisan R (2003). In situ protein kinase C activity is increased in cultured fibroblasts from type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetologia*; 46: 524-530
- Jessop CE, Chakravarthi S, Watkins RH, Bulleid NJ (2004). Oxidative protein folding in the mammalian endoplasmic reticulum. *Biochem Soc Trans*; 32: 655-658
- Jones JJ, Clemmons DR (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*; 16: 3-34
- Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Rodríguez-Pérez JC, Allen PG, Beggs AH, Pollak MR (2000). Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*; 24: 251-256
- Karl M, Potier M, Schulman IH, Rivera A, Werner H, Fornoni A, Elliot SJ (2005). Autocrine activation of the local insulin-like growth factor I system is up-regulated by estrogen receptor (ER)-independent estrogen actions and accounts for decreased ER expression in type 2 diabetic mesangial cells. *Endocrinology*; 146: 889-900
- Khayat ZA, Tong P, Yaworsky K, Bloch RJ, Klip A (2000). Insulin-induced actin filament remodeling colocalizes actin with phosphatidylinositol 3-kinase and GLUT4 in L6 myotubes. *J Cell Sci*; 113: 279-290
- Kiang JG, Tsokos GC (1998). Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther*; 80: 183-201
- Kondoh Y, Kawase M, Kawakami Y, Ohmori S (1992). Concentrations of D-lactate and its related metabolic intermediates in liver, blood, and muscle of diabetic and starved rats. *Res Exp Med (Berl)*; 192: 407-414
- Koya D, King GL (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications *Diabetes*; 47: 859-866
- Langdon JM, Vonakis BM, MacDonald SM (2004). Identification of the interaction between the human recombinant histamine releasing factor/translationally controlled tumor protein and elongation factor-1 delta (also known as eElongation factor-1B beta). *Biochim Biophys Acta*; 1688: 232-236
- Lee JH, Chung KY, Bang D, Lee KH (2006). Searching for aging-related proteins in human dermal microvascular endothelial cells treated with anti-aging agents. *Proteomics*; 6: 1351-61
- Legrain P, Jestin JL, Schächter V (2000). From the analysis of protein complexes to proteomewide linkage maps. *Curr Opin Biotech*; 11: 402-407
- Lei H, Romeo G, Kazlauskas A (2004). Heat shock protein 90 alpha-dependent translocation of annexin II to the surface of endothelial cells modulates plasmin activity in the diabetic rat aorta. *Circ Res*; 94: 902-909
- Lerh S, Kotzka J, Knebel B, Schiller M, Krone W, Muller-Wieland D (2002). Primary skin fibroblasts as human model system for proteome analysis. *Proteomics*; 2: 280-287
- Liu H, Peng HW, Cheng YS, Yuan HS, Yang-Yen HF (2005). Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol Cell Biol*; 25: 3117-3126

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193:265-275
- Lupi R, Marselli L, Dionisi S, Del Guerra S, Boggi U, Del Chiaro M, Lencioni C, Bugliani M, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Dotta F, Marchetti P (2004). Improved insulin secretory function and reduced chemotactic properties after tissue culture of islets from type 1 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev*; 20: 246-251
- Lupia E, Elliot SJ, Lenz O, Zheng F, Hattori M, Striker GE, Striker LJ (1999). IGF-1 decreases collagen degradation in diabetic NOD mesangial cells: implications for diabetic nephropathy. *Diabetes*; 48: 1638-1644
- Lurbe A, Fioretto P, Mauer M, LaPointe MS, Batlle D (1996). Growth phenotype of cultured skin fibroblasts from IDDM patients with and without nephropathy and overactivity of the Na⁺/H⁺ antiporter. *Kidney Int*; 50: 1684-1693
- Mason RM, Wahab NA (2003). Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*; 14: 1358-1373
- Matsumura F, Yamashiro S (1993). Caldesmon. *Curr Opin Cell Biol*; 5: 70-76
- McRobert EA, Gallicchio M, Jerums G, Cooper ME, Bach LA (2003). The amino-terminal domains of the ezrin, radixin, and moesin (ERM) proteins bind advanced glycation end products, an interaction that may play a role in the development of diabetic complications. *J Biol Chem*; 278: 25783-25789
- Merkulova T, Lucas M, Jabet C, Lamandé N, Rouzeau JD, Gros F, Lazar M, Keller A (1997). Biochemical characterization of the muscle-specific enolase: developmental changes in electrophoretic variants and selective binding to other proteins. *Biochem J*; 323:791–800
- Meyer C, Tolia A, Platanisiotis D, Stumvoll M, Vlachos L, Mitrakou A (2005). Increased renal glucose metabolism in Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med*; 22: 453-459
- Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flores CA, Aros CA, Caorsi I, Vio CP, Ruiz-Ortega M, Egido J (2003). Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. *Kidney Int*; 86: S64-S70
- Nasr CE, Hoogwerf BJ, Faiman C, Reddy SS (1999). United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS). Effects of glucose and blood pressure control on complications of type 2 diabetes mellitus. *Cleve Clin J Med*; 66(4):247-53.
- Nelson CL, Karschimkus CS, Dragicevic G, Packham DK, Wilson AM, O'Neal D, Becker GJ, Best JD, Jenkins AJ (2005). Systemic and vascular inflammation is elevated in early IgA and type 1 diabetic nephropathies and relates to vascular disease risk factors and renal function. *Nephrol Dial Transplant*; 20: 2420-2426
- Nisihara JC, Champion KM (2002). Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain. *Electrophoresis*; 23: 2203-2215
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins (1975) *J Biol Chem*; 250(10): 4007-21

- Orth T, Kellner R, Diekmann O, Faus J, Meyer zum Büschenfelde KH, Mayet WJ (1998). Identification and characterization of autoantibodies against catalase and alphaenolase in patients with primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Immunol*; 112: 507–515
- Paczek L, Gaciong Z, Bartłomiejczyk I, Sebekova K, Birkenmeier G, Heidland A (2001). Protease administration decreases enhanced transforming growth factor-beta 1 content in isolated glomeruli of diabetic rats. *Drugs Exp Clin Res*; 27: 141-149
- Pagetta A, Folda A, Brunati AM, Finotti P (2003). Identification and purification from the plasma of Type 1 diabetic subjects of a proteolytically active Grp94. Evidence that Grp94 is entirely responsible for plasma proteolytic activity. *Diabetologia*; 46: 996-1006
- Pancholi V (2001). Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci*; 58: 902–920
- Parks WC, Drake RL (1982). Insulin mediates the stimulation of pyruvate kinase by a dual mechanism. *Biochem J*; 208: 333-337
- Parving HH, Chaturvedi N, Viberti G, Mogensen CE (2002). Does microalbuminuria predict diabetic nephropathy? *Diabetes Care*; 25(2): 406-7
- Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS (2003). Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med*; 348: 2285-93
- Pessin JE, Saltiel AR (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*; 106: 165-169
- Phillips K, Kedersha N, Shen L, Blackshear PJ, Anderson P (2004). Arthritis suppressor genes TIA-1 and TTP dampen the expression of tumor necrosis factor, cyclooxygenase 2, and inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 2011-2016
- Podestà F, Meregalli G, Ghelardi R, Del Giudice R, Asnaghi V, Maestroni A, Zerbini G (2001). Low Ca²⁺ pump activity in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis*; 38: 465-472
- Raghothama C, Rao P (1996). Degradation of glycated hemoglobin by erythrocytic proteolytic enzymes. *Clin Chim Acta*; 245: 201–208
- Ritz E (2003). Renal dysfunction: a novel indicator and potential promoter of cardiovascular risk. *Clin Med*; 3: 357-60
- Roberts RC, Hall PK, Nikolai TF, McKenzie AK (1986). Reduced trypsin binding capacity of alfa 2-macroglobulin in diabetes. *Clin Chim Acta*; 154: 85–101
- Roep BO (1996). T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the Holy Grail. *Diabetes*; 45: 1147-1156
- Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M (1999). Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem*; 274: 18947–18956
- Rossing P, Rossing K, Jacobsen P, Parving HH (1995). Unchanged incidence of diabetic nephropathy in IDDM patients. *Diabetes*; 44: 739-743

- Sakai N, Wada T, Furuichi K, Iwata Y, Yoshimoto K, Kitagawa K, Kokubo S, Kobayashi M, Hara A, Yamahana J, Okumura T, Takasawa K, Takeda S, Yoshimura M, Kida H, Yokoyama H (2005). Involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis*; 45: 54-65
- Sanai T, Sobka T, Johnson T, el-Essawy M, Muchaneta-Kubara EC, Ben Gharbia O, el Oldroyd S, Nahas AM (2000). Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*; 43: 91-100
- Schena FP, Gesualdo F (2005). Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*; Suppl 1: 30-33
- Schleicher E, Kolm V, Ceol M, Nerlich A (1996). Structural and functional changes in diabetic glomerulopathy. *Kidney Blood Press Res*; 19: 305-315
- Schreiber V, Masson R, Linares JL, Mattei MG (1998). Chromosomal assignment and expression pattern of the murine Lasp-1 gene. *Gene*; 207: 171-175
- Schröder M, Kaufman RJ (2005). ER stress and unfolded protein response. *Mutat Res*; 569: 29-63
- Scott JN, Clark AW, Zochodne DW (1999). Neurofilament and tubulin gene expression in progressive experimental diabetes: failure of synthesis and export by sensory neurons. *Brain*; 122: 2109-2118
- Sebekova K, Paczek L, Dammrich J, Ling H, Spustova V, Gaciong Z, Heidland A (1997). Effetti della terapia della proteasi nel resto del rene modello di progressiva insufficienza renale. *Miner Electrolyte Metab*; 23: 291-295
- Shih DQ, Screenan S, Munoz KN, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, Polonsky KS, Stoffel M (2001). Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes*; 50: 2472-2480
- Shimoni Y, Rattner JB (2001). Type 1 diabetes leads to cytoskeleton changes that are reflected in insulin action on rat cardiac K⁺ currents. *Am J Physiol*. 281: 575-585
- Shinada M, Akdeniz A, Panagiotopoulos S, Jerums G, Bach LA (2000). Proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 is increased in urine from patients with diabetic nephropathy. *J Clin Endocrinol Metab*; 85: 1163-1169
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*; 44: 129-146
- Sitia R, Molteni SN (2004). Stress, protein (mis)folding, and signaling: the redox connection. *Sci STKE*; 22(239): pe27
- Southwick FS, DiNubile MJ (1986). Rabbit alveolar macrophages contain a Ca²⁺-sensitive, 41000-dalton protein which reversibly blocks the "barbed" ends of actin filaments but does not sever them. *J Biol Chem*; 261: 14191-14195
- Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Soubrier F, Vlietinck R, Fagard R (1997). The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens*; 15: 1579-85

- Stossel TP (1993). On the crawling of animal cells. *Science*; 260: 1086-1094
- Sun HO, Kwiatkowska K, Yin HL (1995). Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol*; 7: 102-110
- Sung LA, Fan Y, Lin CC (1996). Gene assignment, expression, and homology of human tropomodulin. *Genomics*; 34: 92-96
- Tanaka T, Akatsuka S, Ozeki M, Shirase T, Hiai H, Toyokuni S (2004). Redox regulation of annexin 2 and its implications for oxidative stress-induced renal carcinogenesis and metastasis. *Oncogene*; 23: 3980-3989
- Theriault JR, Lambert H, Chavez-Zobel AT, Charest G, Lavigne P, Landry J (2004). Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *J Biol Chem*; 279: 23463-23471
- Theriot JA, Mitchison TJ (1991). Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature*; 352: 126-131
- Trevisan R, Fioretto P, Barbosa J, Mauer M (1999). Insulin-independent diabetic sibling pairs are concordant for sodium/hydrogen antiport activity. *Kidney Int*; 55: 2383-2389
- Trevisan R, Li LK, Messent J, Tariq T, Earle K, Walker JD, Viberti G (1992). Na⁺/H⁺ antiport activity and cell growth in cultured skin fibroblasts of IDDM patients with nephropathy. *Diabetes*; 41: 1239-1246
- Trevisan R., Cipollina MR., Duner E, Trevisan M, Nosadini R (1996). Abnormal Na⁺/H⁺ antiport activity in cultured fibroblasts from NIDDM patients with hypertension and microalbuminuria. *Diabetologia*; 39: 717-24
- Tsukita S, Yonemura S (1999). Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem*; 274: 34507-3451
- Valmadrid CT, Klein R, Moss SE, Klein BE (2000). The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus. *Arch Intern Med*; 160:1093-1100
- Vercoutter-Edouart AS, Czeszak X, Crepin M, Lemoine J, Boilly B, Le Bourhis X, Peyrat JP, Hondermarck H (2001). Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by fibroblast growth factor-2 in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp Cell Res*; 262: 59-68
- Viberti GC, Yip Messent J, Morocutti A (1992). Diabetic nephropathy. *Future avenue. Diabetes Care*; 15: 1216-25
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999). The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*; 68: 1015-1068
- Walter G, Büssow K, Cahill D, Lueking A, Lehrach H (2000). Protein arrays for gene expression and molecular interaction screening. *Curr Opin Biotech*; 3: 298-302
- Welch WJ (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev*; 72: 1063-1081

- Weller PA, Ogryzko EP, Corben EB, Zhidkova NI, Patel B, Price GJ, Spurr NK, Koteliansky VE, Critchley DR (1990). Complete sequence of human vinculin and assignment of the gene to chromosome 10. *Proc Nat Acad Sci*; 87, 5667-5671
- Weston BS, Wahab NA, Roberts T, Mason RM (2001). Bacitracin inhibits fibronectin matrix assembly by mesangial cells in high glucose. *Kidney Int*; 60: 1756-1764
- Worrall G. (1994). Results of the DCCT trial. Implications for managing our patients with diabetes. *Can Fam Physician*; 40: 1955-60, 1963-5
- Xia J, Bogardus C, Prochazka M (1999). A type 2 diabetes-associated polymorphic ARE motif affecting expression of PPP1R3 is involved in RNA-protein interactions. *Mol Genet Metab*; 68: 48-55
- Yabe-Nishimura C (1998). Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol Rev*; 50: 21-33
- Yamashiro S, Chern H, Yamakita Y, Matsumura F (2001). Mutant caldesmon lacking cdc2 phospho-rylation sites delays M-phase entry and inhibits cytokinesis. *Mol Biol Cell*; 12: 239-250
- Yan L, Ge H, Li H, Lieber SC, Natividad F, Resuello RR, Kim SJ, Akeju S, Sun A, Loo K, Peppas AP, Rossi F, Lewandowski ED, Thomas AP, Vatner SF, Vatner DE (2004). Gender-specific proteomic alterations in glycolytic and mitochondrial pathways in aging monkey hearts. *J Mol Cell Cardiol*; 37: 921-929
- Yip J, Mattock MB, Morocutti A, Sethi M, Trevisan R, Viberti G (1993). Insulin resistance in insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Lancet*; 342: 883-887
- Yokoyama T, Yamane K, Minamoto A, Tsukamoto H, Yamashita H, Izumi S, Hoppe G, Sears JE, Mishima HK (2006). High glucose concentration induces elevated expression of anti-oxidant and proteolytic enzymes in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*; 83(3): 602-609