

L'APPROCCIO ALLA BIOPSIA RENALE E LE NUOVE POSSIBILITÀ DIAGNOSTICHE: COSA CAMBIA NELL'ERA POSTGENOMICA

D. Mattinzoli, L.A. Giardino, A. Corbelli, S. Armelloni, M. Li, S. Berra, M.P. Rastaldi

Laboratorio di Immunopatologia Renale, Fondazione D'Amico per la Ricerca sulle Malattie Renali, Milano

The renal biopsy in the post-genomic era

Histological and immunohistological examination of renal biopsy material is the method of choice for the diagnosis of glomerular and interstitial renal disease. However, our understanding of renal damage is still largely incomplete because of the limited knowledge of the etiology and pathogenesis of numerous kidney diseases. For this reason, we still provide unspecific treatment to kidney patients, which is generally aimed at counteracting inflammatory alterations and slowing progression towards renal failure, without intervening directly in the cause of the disease.

The recent development of the "omics" (genomics, proteomics, metabolomics) following the enormous progress of high-throughput technologies and information technology tools is profoundly transforming our knowledge in every biomedical field, including nephrology. It is expected that in a very short time a better understanding of both physiological and pathological events in the kidney will translate into different therapeutic strategies, possibly targeted to individual needs.

Nephrologists and renal pathologists must take these changes into account and realize that a new approach to renal biopsy is urgently required. Renal biopsy material has in fact an enormous importance in the generation of new knowledge and in the validation of experimental results from high-throughput technologies and animal models. Furthermore, it is conceivable that a new classification of renal diseases will be needed soon as a result of the improved knowledge. For these reasons, renal biopsy material should be adequately processed and preserved according to modern methods, and collaborative projects should be fostered to achieve standardized methods and avoid a waste of energy in singular efforts. (G Ital Nefrol 2007; 24: 415-24)

KEY WORDS:

Genomics,
Metabolomics,
Proteomics,
Renal biopsy

PAROLE CHIAVE:

Biopsia renale,
Genomica,
Metabolomica,
Proteomica

✉ Indirizzo degli Autori:

Dr.ssa Rastaldi Maria Pia
Laboratorio di Immunopatologia
Renale
Fondazione D'Amico per la Ricerca
sulle Malattie Renali
Ospedale San Carlo
Via Pio II, 3
20153 Milano
e-mail: mp.rastaldi@fastwebnet.it

INTRODUZIONE

La diagnostica delle nefropatie si fonda essenzialmente sull'interpretazione istologica ed immunostologica della biopsia renale.

Le tecniche di microscopia tradizionale impiegate in diagnostica prevedono un esame in microscopia ottica, che consente mediante diverse colorazioni di evidenziare le maggiori alterazioni istologiche glomerulari ed interstiziali, e deve essere sempre accompagnato dall'esame immunostologico per la determinazione della presenza nel glomerulo renale di immunoglobuline e componenti della cascata complementare.

Infine, l'esame in microscopia elettronica permette di chiarire alcuni aspetti morfologici non visibili in microscopia ottica, come l'ultrastruttura di alcuni tipi di depositi e le alterazioni più fini della membrana basale glomerulare.

L'interpretazione istologica ed immunostochimica della biopsia renale ha consentito di elaborare una classificazione delle malattie renali ormai largamente accettata dalla comunità scientifica e clinica internazionale. Sono tuttavia numerosi i quesiti lasciati irrisolti e nonostante i numerosi progressi della ricerca raggiunti negli anni più recenti, rimangono numerose le nefropatie la cui eziopatogenesi è tuttora ignota.

Questo fa sì che ancora oggi le nostre strategie terapeutiche siano estremamente generiche e si basino sull'utilizzo di steroidi e immunosoppressori e/o di farmaci ACE-inibitori o AT antagonisti.

Per fare un esempio, consideriamo la nefropatia mesangiale a depositi di IgA. Nonostante sia una patologia frequente, e nonostante sia stata largamente studiata, rimangono a tutt'oggi largamente indeterminati sia gli aspetti eziologici, che quelli prognostici e terapeutici.

Oggi stiamo assistendo ad una serie di eclatanti progressi nelle metodiche di biologia molecolare dove la tecnologia sta migliorando a ritmi vertiginosi le potenzialità di indagine molecolare. Possiamo dire a ragione che stiamo vivendo in un'epoca "omica": si parla correntemente di genomica e farmacogenomica, di proteomica e di metabolomica come campi di indagine e di studio delle scienze mediche e biologiche. L'impatto di tali tecnologie sulla diagnostica anatomo-patologica si sta già evidenziando in alcuni ambiti, ad esempio per quanto concerne la diagnostica oncologica ed ematologica, dove gli approcci molecolari stanno modificando rapidamente le classificazioni tradizionali e vengono sempre più utilizzati per la diagnosi, la definizione di sottogruppi di pazienti, la selezione di terapie specifiche, la predizione di tossicità terapeutiche e il monitoraggio della terapia.

La caratterizzazione dei pazienti con patologie renali è significativamente più difficile, innanzitutto per l'eccellente eterogeneità di composizione cellulare del tessuto renale e soprattutto per l'esiguità di materiale proveniente dalla biopsia renale. Tuttavia, nonostante le difficoltà, numerosi progressi sono già in atto e il nefrologo e l'anatomo-patologo renale devono essere pronti a cogliere questa sfida e ad aprirsi al cambiamento.

"OMICA" E MALATTIE RENALI

Le malattie renali hanno già largamente beneficiato dei progressi dell'ultimo decennio, derivanti soprattutto da acquisizioni nel campo della genetica e della biologia molecolare.

L'esempio paradigmatico è il rene policistico. In pochi anni la ricerca in questo campo ha consentito di determinare le mutazioni causali della malattia nella sua forma dominante (ADPKD), dove sono coinvolti i geni PKD1 e PKD2, e nella forma recessiva dovuta al gene PKHD1. Ma la scoperta più importante è stata fatta con il riconoscimento che le proteine codificate dai geni PKD1, PKD2 e PKHD1 sono espresse nel ciglio, struttura cellulare fino a pochi anni fa misconosciuta, che sporge dalla superficie cellulare ed ha molteplici funzioni, dal *patterning* di riconoscimento destro-sinistro dell'embrione, a funzioni meccanosen-

soriali, fotosensoriali e chemosensoriali, che si esprimono a seconda del tipo cellulare di appartenenza. Nel caso delle cellule epiteliali renali il ciglio ha verosimilmente un ruolo cruciale nella trasmissione di segnali meccanici causati dal flusso tubulare, ed il suo mancato funzionamento può spiegare numerose alterazioni che si verificano nel rene policistico e nelle malattie cistiche del rene (1, 2).

Un'altra patologia che si è largamente giovata delle nuove acquisizioni di genetica molecolare è la sindrome nefrosica. Lo studio di forme familiari di sindrome nefrosica ha consentito, infatti, di individuare la presenza di mutazioni nei geni codificanti per una serie di proteine, per la maggior parte localizzate nel podocita, quali *nefrina*, *podocina*, *WT1*, *CD2AP*, *alfa-actinina-4*, e *TRPC6*, o localizzate nella membrana basale glomerulare, come *Laminin beta2* (3, 4). Il riconoscimento del coinvolgimento di queste proteine nella sindrome nefrosica ha sicuramente modificato la diagnostica della glomerulonefrite a lesioni minime e della glomerulosclerosi focale idiopatica, oggi meglio identificate come podocitopatie (5), ma soprattutto ha stimolato un'enorme quantità di studi sul filtro glomerulare, e in particolare ha prodotto una serie di conoscenze che riguardano la struttura e la funzionalità del podocita (6). Il podocita è una cellula altamente differenziata dalla struttura complessa, che avvolge con le sue ramificazioni il capillare glomerulare. Le ramificazioni del podocita si embricano tra loro e prendono tra loro contatto mediante una struttura a cerniera, il cosiddetto *slit-diaphragm*, che è composto da molecole di adesione della famiglia delle molecole *Ig-like*, come *nefrina* e da *caderine*. Lo studio del podocita, per anni limitato dalla difficoltà tecnica di mantenere questa cellula in coltura, può essere oggi affrontato sia *in vitro*, grazie alla possibilità di utilizzare linee cellulari immortalizzate condizionali, che *in vivo*, grazie alla creazione di modelli animali di *knockout* condizionali (7). Tuttavia, nonostante le recenti acquisizioni genetiche e molecolari, la strada da percorrere è ancora lunga. La diagnosi di glomerulosclerosi focale rimane ancora oggi una delle più complesse, da un lato per la specificità della lesione istologica che la identifica, dall'altro perché le cause genetiche spiegano solo il 18% circa dei casi. La maggior parte rimane quindi sotto l'etichetta di glomerulosclerosi focale primitiva o idiopatica, a sottolineare la nostra ignoranza riguardo l'eziologia di queste forme.

L'applicazione dei *microarray* di espressione al tessuto renale è una tecnica che si sta diffondendo molto rapidamente poiché consente la rapida generazione di numerosissimi dati di espressione genica e l'immediato confronto tra il tessuto normale e patologico. Studi recenti hanno dimostrato come il danno renale

possa essere classificato con un approccio molecolare e come ad esempio i pazienti possano essere raggruppati dal punto di vista molecolare in controlli, soggetti con danno fibrotico e soggetti con danno infiammatorio (8). Per quanto concerne la glomerulosclerosi focale, un lavoro recente ha identificato *fingerprints* molecolari che discriminano tra la presenza di sindrome nefrosica e di insufficienza renale (9). Un dato importante che emerge per lo meno da alcuni di questi studi è l'eterogeneità molecolare di categorie istologiche ritenute omogenee. Quello che manca è invece una accurata revisione istologica effettuata alla luce dei nuovi raggruppamenti molecolari e che potrebbe condurre ad una nuova classificazione delle patologie renali più precisamente guidata da considerazioni di tipo patogenetico.

Numerosi ricercatori sono oggi impegnati nello studio del proteoma e del metaboloma urinario. L'urina è un liquido biologico di facile acquisizione, potenzialmente è specchio immediato delle alterazioni renali, tuttavia costituisce un difficile campo di studio e di analisi per le numerose variabili legate anche solo alla procedura di raccolta e di conservazione. Nonostante le difficoltà, cominciano ad essere presenti in letteratura pubblicazioni sul proteoma urinario che documentano l'identificazione e la definizione di *pattern* proteomici urinari normali e patologici (10). A questo proposito va segnalato un lavoro di recentissima pubblicazione, nel quale gli Autori individuano una serie di *pattern* proteomici urinari potenzialmente diagnostici (11), che sembrano discriminare con buona sensibilità e specificità tra patologie quali la glomerulosclerosi focale, la glomerulonefrite membranosa, la nefrite lupica e la nefropatia diabetica.

Allo stesso modo, la determinazione di amine organiche e dei prodotti secondari dell'infiammazione quali nitrati, nitriti, istamina, cominciano ad evidenziare la possibilità di uno studio delle variazioni del metaboloma urinario nelle malattie renali e nel trapianto (12).

Per quanto riguarda l'esperienza diretta del nostro gruppo, abbiamo avuto la possibilità di partecipare ad uno studio Europeo grazie al quale è stata creata una banca di cDNA di 1750 biopsie renali. Il materiale biotico è stato microdissettato nelle componenti glomerulare ed interstiziale, ed è stato studiato con la tecnologia dei *microarrays*.

Questa tecnologia da un lato ha consentito di raggiungere il primo obiettivo dello studio, cioè l'identificazione di *pathways* comuni di progressione del danno renale (13), ma dall'altro la quantità e la qualità dei dati prodotti, hanno generato una altrettanto numerosa serie di progetti paralleli, centrati su aspetti specifici, *hypothesis-driven*, e portati avanti individualmente dai vari gruppi partecipanti allo studio. Ad

esempio, nel nostro laboratorio (14) il dato genomico insieme ad uno studio proteomico hanno permesso di individuare una nuova modalità di comunicazione simil-neuronale, in particolare la presenza di un sistema di *signaling* glutamatergico tra le cellule del glomerulo renale. Tale meccanismo è stato quindi studiato nel glomerulo umano normale e ne sono state osservate variazioni in numerose nefropatie.

Dato l'impatto e la sempre maggiore applicazione delle nuove tecnologie allo studio delle malattie renali, è importante conoscerne le tappe principali e fare il punto sulle potenzialità che esse attualmente offrono sia nella ricerca che nella pratica clinica.

TEST DI VERIFICA

1) La struttura della membrana basale glomerulare è meglio apprezzabile utilizzando:

- La microscopia ottica
- La microscopia a fluorescenza
- La microscopia elettronica
- Tecniche di immunofluorescenza
- Tecniche di immunoperossidasi.

2) Alla luce delle attuali conoscenze, la glomerulosclerosi focale ha un'origine genetica nel:

- 100% dei casi
- 50% dei casi
- 18% dei casi
- 30% dei casi
- 60% dei casi.

3) Nel rene policistico e nelle malattie cistiche del rene sono coinvolte:

- Proteine del ciglio cellulare
- Enzimi
- Fattori di trascrizione
- Proteine lisosomiali
- Cofattori.

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

GENOMICA

La genomica è lo studio delle sequenze di DNA e RNA, che ha come scopo la comprensione della struttura, della funzione e dell'espressione dei geni, nonché la comprensione del loro ruolo nell'organismo.

Se consideriamo le date delle tappe principali dello sviluppo delle conoscenze nel campo della

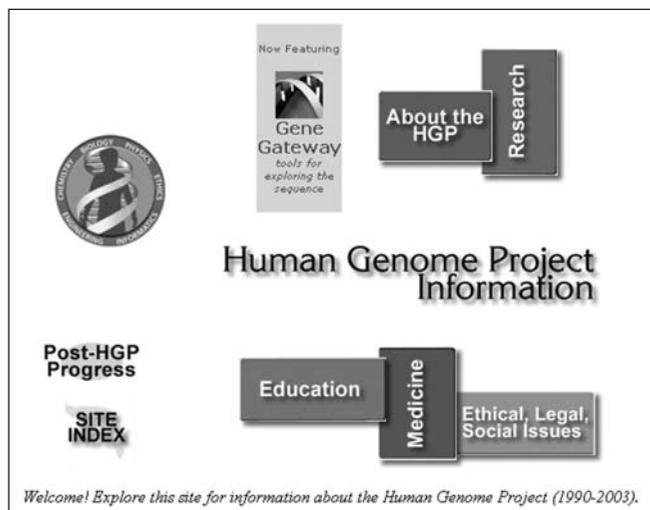


Fig. 1 - La home page del sito web del progetto genoma umano.

genomica, ci accorgiamo che in questi anni stiamo assistendo, così come accade per tutte le branche della scienza e della tecnologia, ad una accelerazione esponenziale.

È vero, infatti, che gli studi di Mendel risalgono alla fine dell'800, ma la descrizione della doppia elica del DNA appartiene già agli anni '50 (15), dunque ad un periodo molto recente della nostra storia. Altre due tappe importanti, come la tecnologia del DNA ricombinante e le metodiche di sequenziamento, si situano negli anni '70, il *database GenBank* viene istituito nel 1982 e la PCR è stata inventata nel 1985 (16).

Ma la tappa cruciale che costituisce il fondamento delle nostre conoscenze, cioè il Progetto Genoma Umano (http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml) (Fig. 1) è avvenuta in questi ultimi 15 anni, grazie ad uno sforzo Internazionale che ha generato un'immensa serie di dati disponibili pubblicamente grazie ad Internet. Formalmente iniziato nel 1990, il Progetto Genoma Umano è stato uno sforzo durato 13 anni, coordinato dal *U.S. Department of Energy* e dal *National Institute of Health*. Gli scopi fondamentali del progetto erano: l'identificazione dei 20000-25000 geni che sono presenti nel DNA umano e la determinazione della sequenza dei 3 miliardi di basi che compongono il DNA dell'uomo. L'immensa serie di dati generati dal Progetto Genoma Umano è stata immagazzinata in *database* pubblici. Contestualmente, durante il progetto, si è ottenuta la produzione di numerosi modelli sperimentali *knockout* e *knockdown*, e sono stati creati numerosi *database* che integrano le sequenze con una serie di informazioni aggiuntive ed il collegamento ad altri *database*. I dati ottenuti sono stati pubblicati su *Nature* (17) e *Science* (18), rispettivamente nel 2001

e nel 2003, data ufficiale di conclusione del Progetto.

Va detto che il Progetto Genoma Umano è stato a sua volta immensamente aiutato da una serie di concomitanti svolte tecnologiche che hanno accelerato il sequenziamento e la genotipizzazione di polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs). Durante il Progetto, questi metodi sono stati progressivamente incrementati e resi più efficienti da avanzamenti che possiamo definire evolutivi, come l'automazione e la miniaturizzazione, cioè dalle cosiddette *high throughput technologies* o tecnologie ad alta produttività.

L'esempio più eclatante è stata l'introduzione dei *microarrays* (19), che consentono l'esame di decine di migliaia di geni in un singolo esperimento. Se un esperimento di *microarray* fondamentalmente si basa su una reazione di ibridazione tra sequenza campione e sequenza di riferimento, la novità sta nella densità della sequenza di riferimento, perché, grazie a tecniche di fotolitografia e miniaturizzazione, è oggi possibile avere su un solo chip decine di migliaia di geni.

Esistono diverse varianti di *microarray*. Una di queste, ad esempio, sfruttando un sistema di amplificazione particolarmente accurato della sequenza campione e la deposizione delle sequenze di riferimento su microsferi, sembrerebbe offrire una metodica fattibile per l'esame di profili di espressione genica da campioni di tessuto dove l'RNA è parzialmente degradato. Se pensiamo all'enormità del numero di campioni in paraffina presenti nelle anatomie patologiche e al loro potenziale impiego, ci rendiamo conto di cosa questo possa significare.

Tramite i *microarray* si possono studiare sia sequenze di DNA che di mRNA (cDNA, o DNA complementare).

I *DNA-microarray*, insieme ad altre tecnologie di sequenziamento su larga scala, hanno consentito lo sviluppo di un progetto come l'*International Hapmap Project* (<http://www.hapmap.org/>), uno sforzo multicentrico Internazionale che ha prodotto un *database* pubblico delle variazioni genetiche comuni.

Le differenze genetiche più comuni sono quelle di singole basi, note anche come polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs). Comunemente, circa 10 milioni di SNPs sono presenti nel genoma umano, e la loro identificazione e catalogazione costituisce la base su cui poter studiare la diversità genetica nelle popolazioni. Infatti, gli SNPs possono essere considerati come *markers* per localizzare i geni all'interno di sequenze di DNA. Paragonando ad esempio gli SNP di soggetti normali con gli SNPs di soggetti affetti da diabete mellito di tipo II, potrebbero essere trovati alcuni SNPs più comuni nella popolazione affetta da malattia e tali SNPs potrebbero essere utilizzati come punto di partenza per identificare i geni coinvolti nella malattia.

Inoltre gli SNPs possono essere raggruppati in bloc-



Fig. 2 - La home page del sito web dell'organizzazione per lo studio del proteoma umano.

chi, detti aplotipi, alcuni molto comuni nei soggetti di una popolazione e altri più rari. In una data popolazione, ad esempio, il 55% dei soggetti può avere un determinato aplotipo, il 30% un'altro e l'8% un'altro ancora. Variabili meno comuni sono quindi distribuite nel rimanente 7% della popolazione.

L'*International HapMap Project* ha identificato questi aplotipi comuni in 4 popolazioni di diverse aree del mondo e i cosiddetti "tag SNPs" che individuano gli aplotipi stessi. (ripetizione dello stesso verbo). Il *database* creato è pubblico, utilizzabile e scaricabile da Internet, completo di una guida all'utente che istruisce sulle modalità di utilizzo dei dati stessi. Trattandosi appunto di una catalogazione delle varianti genetiche comuni presenti nell'uomo, che ne descrive caratteristiche e distribuzione nelle popolazioni, *HapMap* costituisce una raccolta di informazioni che possono e potranno essere utilizzate per stabilire connessioni tra varianti genetiche specifiche e rischio di malattia (20).

Se i DNA *microarrays* sono diventati un ausilio cruciale negli studi genetici, la tecnologia dei cDNA-*microarrays*, che permettono lo studio dell'espressione di mRNA, è ormai largamente diffusa a tutte le discipline della ricerca biomedica. Le maggiori applicazioni, già oggi di tipo diagnostico e prognostico, sono sicuramente da attribuire al campo dell'oncologia, ma a livello sperimentale non esiste oggi un campo di indagine dove essi non siano stati applicati.

Il passo successivo, che in alcune aree mediche già trova un'importante applicazione, è l'accoppiamento delle due tecniche di *microarrays* per associare il dato genetico al dato di espressione (21).

PROTEOMICA

La proteomica è la branca che si occupa della determinazione dei livelli di espressione proteica, della loro distribuzione e delle modificazioni post-trascrizionali. Anche in questo ambito, rispetto alle metodiche tradizionali, le nuove tecnologie ad alta produttività stanno consentendo lo sviluppo di strategie di analisi del proteoma cellulare, cioè dell'intero set di proteine codificate dal genoma in ogni particolare tipo cellulare.

È importante tenere presente che rispetto alla genomica, lo studio del proteoma è decisamente più complesso poiché è infinitamente maggiore la complessità delle proteine e delle interazioni specifiche che intercorrono tra proteine diverse nell'ambito di un determinato tipo cellulare, inserito in un determinato tessuto, che a sua volta interagisce con l'ambiente dell'organismo e con l'ambiente esterno nelle diverse fasi del ciclo cellulare, dello sviluppo e della vita. Vi sono pertanto numerosissimi proteomi nell'organismo, tanto che si stima che i dati che emergeranno dallo studio del proteoma umano saranno almeno tre volte maggiori di quelli derivati dallo studio del genoma (22).

Nonostante queste evidenti difficoltà, la proteomica sta conoscendo una grande espansione. Un dato importante che deriva dallo studio del Genoma Umano è che vi sono molti meno geni che codificano per sequenze proteiche di quante sono in realtà le proteine presenti nell'organismo (approssimativamente il rapporto è di circa 1:40, con approssimativamente 25000 geni vs circa un milione di proteine). Si pensa che tale sproporzione sia dovuta al fenomeno di

splicing alternativo e alle modificazioni post-trascrizionali e proprio da tale discrepanza deriva la necessità della proteomica per ottenere una precisa e completa caratterizzazione cellulare.

Come nel caso del progetto Genoma Umano, anche per il proteoma è stata istituita, ufficialmente il 9 febbraio 2001, una organizzazione Internazionale, denominata "HUPO", cioè *Human Proteome Organization* (www.hupo.org) (Fig. 2), che ha lo scopo di promuovere iniziative proteomiche Internazionali per una migliore comprensione sia dei processi biologici fondamentali che delle patologie umane.

Al momento vi sono sette iniziative scientifiche promosse da HUPO, che comprendono: a) lo studio del proteoma epatico; b) lo studio del proteoma del cervello; c) lo studio del proteoma plasmatico; d) un progetto di standardizzazione della rappresentazione dei dati in proteomica; e) la cosiddetta "*human antibody initiative*" che comprende la generazione di un catalogo di anticorpi ed di un atlante proteico di localizzazione delle proteine umane nei tessuti normali e patologici; f) l'iniziativa glicomica/proteomica in patologia umana, che ha per scopo l'identificazione di variazioni di glicosilazione proteica nei processi patologici; g) il progetto modelli animali di patologia umana, che sulla base dei risultati degli altri progetti, avrebbe il compito di validarne i risultati attraverso lo sviluppo di modelli animali.

Come nel caso della genomica, anche gli studi di proteomica si stanno sviluppando con grande rapidità grazie ai progressi delle tecnologie analitiche, delle tecnologie ad alta produttività e dei supporti informatici.

Eseguita l'estrazione delle proteine dal campione in oggetto, il secondo *step* nell'analisi del contenuto proteico è la separazione delle diverse proteine. A tutt'oggi la tecnica più utilizzata è la separazione elettroforetica bidimensionale, che consente la separazione delle proteine secondo il punto isoelettrico (pI) ed il peso molecolare (23).

Dopo la separazione, le proteine possono essere studiate in diversi modi, ma attualmente la "parte del leone" è fatta dalla spettrometria di massa, che negli ultimi anni è diventata uno strumento essenziale per gli studi di proteomica (24).

Tecniche di deadsorbimento e ionizzazione come il MALDI-MS (23) e significativi miglioramenti degli spettrometri di massa "*time of flight*" (SELDI-TOF-MS) (25) hanno migliorato le capacità analitiche della strumentazione, e l'identificazione delle proteine è notevolmente aumentata grazie alla rapida espansione dei *database* proteici. Si aggiungono oggi possibilità estremamente interessanti quali, quella di applicare la spettrometria di massa direttamente ad una sezione di tessuto, che consente di accoppiare il risultato della spettrometria alla localizzazione tissutale microscopica (26).

Come nella genomica, anche nella proteomica si stanno poi ampiamente affermando, pur con diverse difficoltà dovute alla complessità della struttura proteica, gli *array* proteici e gli *array* di tessuto.

Gli *array* proteici sono il corrispettivo degli *array* di DNA e di mRNA sul fronte proteico. Essi possono essere classificati in due categorie principali: *array* analitici e *array* funzionali. Il primo gruppo è ulteriormente suddiviso in due sottogruppi indipendentemente da quando il campione viene applicato al supporto. Infatti, al supporto possono essere legate sequenze cosiddette "di cattura" alle quali si aggiunge il campione in esame, oppure il campione in esame viene aggiunto direttamente al supporto e funziona esso stesso come matrice di cattura per una certa proteina o miscela *target* nota. Gli *array* funzionali sono disegnati per analizzare specifiche funzioni proteiche, ad esempio le interazioni tra proteine, tra enzima e substrato, proteina-DNA, proteina-oligosaccaride, proteina-farmaco (27).

In sostanza, anche gli *array* proteici, pur con le presenti limitazioni tecniche, permettono già di ottenere un grand numero di informazioni sull'assetto proteico di un dato campione e di confrontarlo ad esempio con un campione di controllo.

Gli *array* di tessuto sono invece costituiti da supporti che contengono numerosi campioni di tessuto, che possono essere simultaneamente analizzati con metodiche istologiche e immunoistochimiche. L'utilità della metodica consiste ad esempio nell'ottenere rapide informazioni sull'espressione di una proteina nei diversi tessuti dell'organismo oppure sulle variazioni di espressione di una proteina in un determinato tessuto in condizioni normali e patologiche (28).

TEST DI VERIFICA

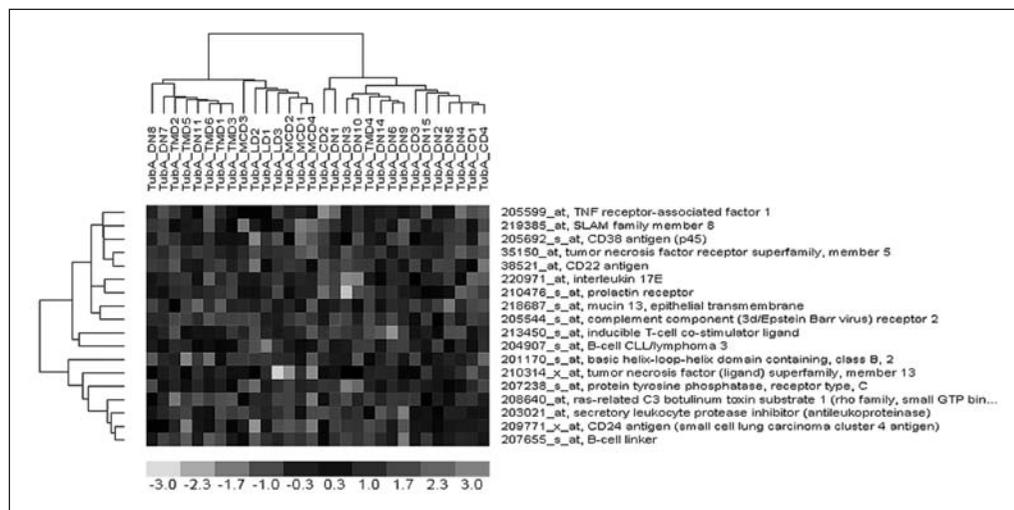
1) Gli SNPs sono:

- Differenze genetiche comuni di basi individuali
- Differenze genetiche rare
- Inserzioni di tratti di gene
- Delezioni di tratti di gene
- Trasversioni.

2) Quante "mappe proteiche" sono presenti nel rene?

- Uno
- Due
- Tanti quanti sono i tipi cellulari
- Tanti quanti sono i tipi cellulari in un dato momento dello sviluppo
- Tanti quanti sono i tipi cellulari in ogni preciso momento della vita.

Fig. 3 - Esempio di un gruppo di dati di espressione ricavati da un esperimento di microarray ed organizzati mediante il sistema di clustering.



3) Quale è il primo *step* nelle tecniche di proteomica?

- La separazione delle proteine del campione
- L'analisi spettrometrica
- Il deadsorbimento
- L'estrazione delle proteine del campione
- La ionizzazione.

METABOLOMICA/METABONOMICA

La metabolomica/metabonomica si occupa dell'individuazione e della misurazione di tutti i metaboliti, cioè di tutte le molecole a basso peso molecolare prodotte da cellule viventi nelle differenti condizioni e nei diversi momenti del loro ciclo vitale. Le parole metabolomica e metabonomica sono spesso utilizzate indifferentemente, tuttavia il loro significato è diverso, nel senso che la metabolomica ha lo scopo di catalogare e quantificare le piccole molecole presenti nei liquidi biologici in diverse condizioni (29), mentre la metabonomica è lo studio della variazione del profilo metabolico di un sistema biologico complesso in risposta a situazioni diverse come la malattia, l'esposizione a sostanze tossiche, le variazioni dietetiche (30).

I metaboliti analizzati sono lipidi, zuccheri, acidi organici, aminoacidi, peptici, eicosanoidi, e così via.

Le piattaforme strumentali utilizzate per lo studio del metaboloma sono la risonanza magnetica nucleare (NMR), la gas-cromatografia spettrometria di massa (GC-MS) e la cromatografia liquida spettrometria di massa (LC-MS), che permettono di individuare un gran numero di metaboliti. Ma anche altri tipi di spettrome-

tria di massa come il MALDI-MS vengono utilizzati, soprattutto per evitare la fase di cromatografia liquida ed analizzare direttamente il campione (31).

In particolare, sia la NMR sia il MALDI-MS possono essere applicati a sezioni di tessuto, come approccio complementare all'istologia tradizionale (32).

Ancora, come per genomica e proteomica, il dato generato richiede un'analisi computerizzata sofisticata che utilizza *cluster* gerarchici, ed algoritmi specifici.

Ovviamente il cosiddetto fenotipo metabolomico è estremamente complesso ed il suo studio richiede un notevole investimento sia in termini di tempo sia di spesa. Tuttavia, le promesse di questo campo di indagine sono particolarmente *appealing* per l'industria farmaceutica, che ritiene, attraverso l'identificazione del profilo metabolomico, di poter individuare alcuni parametri cruciali quali la resistenza o l'efficacia di un farmaco in ogni dato soggetto.

La definizione di normalità è nel caso della metabolomica di particolare importanza e difficoltà, in quanto il profilo metabolomico è ad esempio molto diverso in diversi ceppi di animali sperimentali, o nei due sessi. È inoltre influenzato dall'età, dalla dieta e più in generale dall'ambiente. Variazioni circadiane di numerosissimi metaboliti devono essere accuratamente tenute in considerazione e vanno studiate in modo completo per poterne permettere l'utilizzo (31).

E di nuovo, come in genomica e proteomica, per la definizione del metaboloma umano hanno preso il via almeno tre iniziative Internazionali: *Human metabolome database* (www.hmdb.ca), *Human serum Metabolome project* (www.husermet.org) e *NIH roadmap on metabolomics* (<http://nihroadmap.nih.gov/initiatives.asp>).

LIMITI E PROBLEMATICHE EMERGENTI

Ovviamente tutte queste nuove metodiche hanno numerosi limiti, che consistono soprattutto nella variabilità, nel potere di risoluzione e nella necessità di validazione. Nonostante l'impatto tecnologico e la ricerca costante di standardizzazione, permangono molteplici difficoltà tecniche e metodologiche che si aggiungono alle inevitabili variabili determinate dal tipo di materiale oggetto di studio.

Quello che oggi possiamo toccare con mano è la generazione di un'immensa mole di dati, e la necessità per la maggior parte dei ricercatori di non sottovalutare gli aspetti bioinformatici della ricerca, anche nel tentativo di evitare sforzi eccessivi, se non del tutto inutili. Solo lo sviluppo di nuovi *tools* bioinformatici consentirà, infatti, una più agevole e "user-friendly" catalogazione, analisi e interpretazione dei dati stessi.

In ultima analisi, l'esplosione di tecnologie ad alta produttività sta completamente cambiando il nostro approccio allo studio delle malattie, con l'obiettivo finale di definire l'unicità dell'individuo non solo nel suo stato di salute, ma anche di malattia. Se pensiamo alla non così futura farmacogenomica, pensiamo ad una scienza che riesca ad integrare dati di genomica, proteomica, metabolomica con i tradizionali profili clinici, e che consenta una diagnostica e una predittività della risposta terapeutica, con l'obiettivo di arrivare a strategie terapeutiche sempre più individuali.

È implicito in questi stessi concetti che tutto ciò solleva una serie di problematiche sociali e soprattutto etiche (33), che andranno affrontate sia in ambito scientifico che politico.

Altre questioni che richiederanno adeguata attenzione sono l'aumentata aspettativa da parte del paziente, e contemporaneamente non vanno sottovalutati i costi, visto che lo sviluppo tecnologico supera largamente quello economico e le novità tecnologiche sono praticamente quotidiane. È opinione di chi scrive che una previsione di riorganizzazione dei laboratori diagnostici dovrebbe essere fatta già oggi, mutuando il modello della "evidence based medicine", in modo da massimizzare i benefici e minimizzare i costi.

Per quanto concerne la biopsia renale, è evidente che il nefrologo e l'anatomo-patologo renale devono inserirsi nel nuovo scenario dello sviluppo scientifico senza farsi cogliere impreparati. Già nell'immediato vi sono ad esempio alcune indicazioni che ci sentiamo di proporre perché il materiale della biopsia renale venga utilizzato in modo adeguato rispetto alla sfida proposta dalle nuove tecnologie.

Innanzitutto, l'utilizzo di parte del materiale bioptico per studi "omici". Già nella fase di prelievo del campione bioptico, in presenza di materiale suffi-

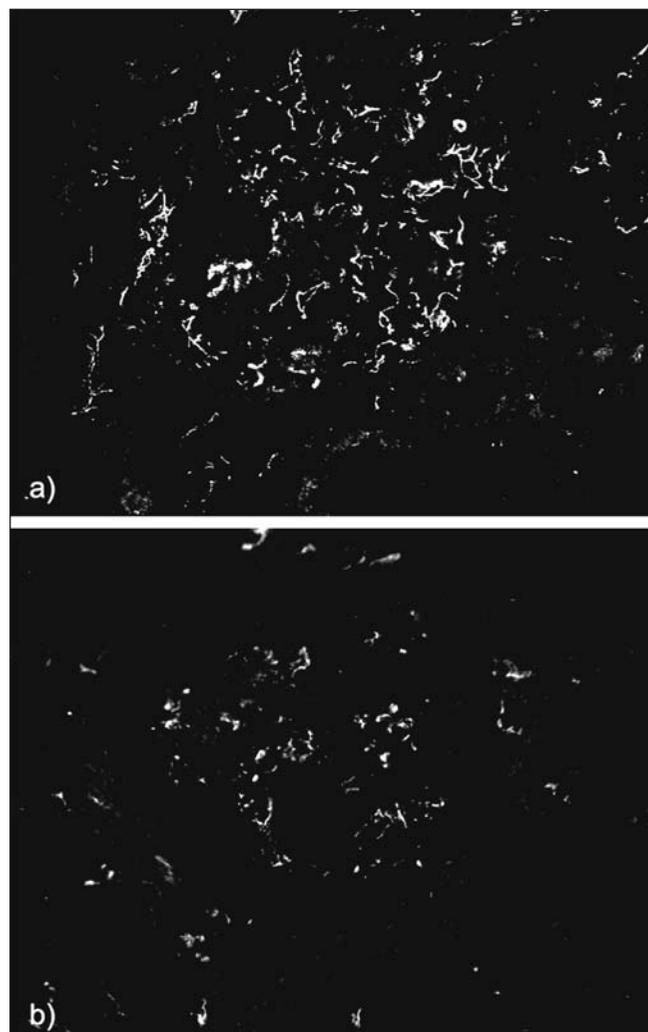


Fig. 4 - Glomeruli di controllo normale (a) e di soggetto con nefropatia diabetica (b) nei quali è stata analizzata la presenza del marker endoteliale VE-cadherin con metodica di immunofluorescenza indiretta. Si può notare come vi sia una riduzione di positività nel glomerulo in (b) rispetto al glomerulo in (a).

ciente, sarebbe importante destinare una piccola parte del campione allo studio mediante tecnologie ad alta produttività. Nella nostra esperienza, un decimo di uno dei due frustoli bioptici si è rivelato sufficiente a consentire la microdissezione in glomeruli e interstizio e l'estrazione di mRNA da amplificare e impiegare nei *microarray* di espressione (Fig. 3). Contemporaneamente o alternativamente, parte del materiale dovrebbe essere destinato all'estrazione proteica. Dato che queste tecniche non possono e non devono essere presenti in ogni singolo laboratorio o in ogni singolo centro, ne deriva la necessità di instaurare collaborazioni. Già oggi, nell'ambito della Società Italiana di Nefrologia si può fare riferimento ai gruppi di studio per instaurare collaborazioni proficue in questa direzione.

Il materiale bioptico può essere inoltre di cruciale

importanza nella validazione dei risultati della ricerca. La verifica sul materiale umano delle molecole e delle pathways di danno renale identificate negli studi sperimentali e la loro precisa localizzazione nel tessuto bioptico nelle diverse patologie costituiscono uno step fondamentale per confermare o smentire l'importanza in patologia umana del dato sperimentale. Da questo punto di vista il nostro laboratorio sta contribuendo, grazie alla particolare esperienza in tecniche immunoistochimiche e di ibridazione *in situ* su materiale bioptico umano, alla validazione di dati provenienti da studi collaborativi sia Italiani che Internazionali, nel tentativo di meglio definire la patogenesi del danno renale (Fig. 4).

È infine verosimile ed auspicabile che si renda necessario in tempi brevi uno sforzo di ri-classificazione delle patologie renali che tenga conto dei nuovi dati e consenta una migliore definizione nosologica delle nefropatie.

TEST DI VERIFICA

1) La metabolomica/metabonomica è la scienza che studia:

- a. Molecole ad alto peso molecolare
- b. Molecole a basso peso molecolare
- c. Molecole presenti negli alimenti
- d. Molecole di nuova sintesi
- e. Molecole di origine vegetale.

2) Qual è lo strumento attualmente più utilizzato per gli studi di proteomica e metabolomica?

- a. Il cromatografo
- b. Lo spettrometro di massa
- c. Il microscopio
- d. Il citofluorimetro
- e. Il fluorimetro.

3) I dati di espressione genica che si ottengono con la tecnologia dei *microarrays* riguardano:

- a. Decine di geni
- b. Centinaia di geni
- c. Migliaia di geni
- d. Milioni di geni
- e. Decine di milioni di geni.

RIASSUNTO

L'interpretazione istologica ed immunoistologica della biopsia renale è la metodica di scelta per la diagnosi delle malattie renali glomerulari e interstiziali. Tuttavia la nostra comprensione del danno renale è ancora largamente incompleta a causa della mancata conoscenza dell'eziologia e della patogenesi di numerose malattie renali. Per questo motivo le terapie adottate sono tuttora largamente aspecifiche, genericamente dirette a contrastare il danno infiammatorio e a rallentare la progressione del danno fibrotico, senza incidere sulla causa che ha generato la malattia stessa.

Il recente sviluppo della "omica", cioè di settori scientifici di studio del genoma, del proteoma, e del metaboloma, grazie al supporto di tecnologie ad alta produttività, sta determinando in Nefrologia così come in tutti i rami delle scienze biomediche, un progresso esponenziale nell'acquisizione di nuovi dati. È pertanto prevedibile che in un futuro non molto lontano la comprensione di quanto avviene nel rene sia in condizioni fisiologiche che patologiche, consentirà di programmare strategie terapeutiche mirate, possibilmente disegnate specificamente per il singolo individuo.

Il nefrologo e l'anatomo-patologo renale non possono farsi travolgere dagli eventi, ma devono far sì che i dati provenienti dalle nuove tecnologie si traducano rapidamente in un nuovo approccio allo studio e all'interpretazione della biopsia renale.

Il materiale bioptico è cioè cruciale sia per generare che per convalidare la mole di dati provenienti dagli studi effettuati con tecnologie ad alta produttività. È inoltre probabile che la generazione di nuova conoscenza si traduca in breve in una riclassificazione delle patologie renali.

Per tutti questi motivi è pertanto essenziale da un lato che il materiale della biopsia renale sia adeguatamente processato e conservato secondo metodiche aggiornate, dall'altro è indispensabile uno sforzo collaborativo e di aggregazione per raggiungere una adeguata standardizzazione delle metodiche e per non dissipare energie in sforzi singoli.

RINGRAZIAMENTI

EU-FP5: Chronic renal disease - QLRT-2001-01215
Fondazione d'Amico per la Ricerca sulle malattie renali
www.fondazioneamico.org

BIBLIOGRAFIA

1. Ong ACM, Wheatley DN. Polycystic kidney disease - the ciliary connection. *Lancet* 2003; 361: 774-6.
2. Pazour GJ. Intraflagellar transport and cilia-dependent renal disease: the ciliary hypothesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2528-36.
3. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 108: 1583-7.
4. Gudermann T. A new TRP to kidney disease. *Nat Genet* 2005; 37: 663-4.
5. Daskalakis N, Winn MP. Focal and segmental glomerulosclerosis: varying biologic mechanisms underlie a final histopathologic end point. *Semin Nephrol* 2006; 89-94.
6. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83: 253-307.
7. Fitzgerald SM, Gan L, Wickman A, Bergstrom G. Cardiovascular and renal phenotyping of genetically modified mice: a challenge for traditional physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30: 207-16.
8. Schmid H, Henger A, Kretzler M. Molecular approaches to chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15: 123-9.
9. Schwab K, Witte DP, Aronow BJ, et al. Microarray analysis of focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Nephrol* 2004; 24: 438-47.
10. O'Riordan E, Goligorsky MS. Emerging studies of the urinary proteome: the end of the beginning? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14: 579-85.
11. Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, et al. Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 913-22.
12. Wishart DS. Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 2814-20.
13. Yasuda Y, Cohen CD, Henger A, Kretzler M, for the European Renal cDNA Bank (ERCB) Consortium. Gene expression profiling analysis in nephrology: towards molecular definition of renal disease. *Clin Exp Nephrol* 2006; 10:91-8.
14. Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, et al. Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *FASEB J* 2006; 20: 976-8.
15. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 1953; 171: 737-8.
16. Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* 1986; 233: 1076-8.
17. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
18. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The human genome project: lessons from large-scale biology. *Science* 2003; 300: 286-90.
19. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-70.
20. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437: 1299-320.
21. Schadt EE, Monks SA, Drake TA, et al. Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature* 2003; 422: 297-302.
22. Keith L, Williams, Denis F. Hochstrasser, Introduction to the Proteome. In: *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, edited by Wilkins, M.R.; Williams, K.L.; Appel, R.D.; Hochstrasser, D.F., Springer Verlag, 1997, 1-12.
23. Wittmann-Liebold B, Graack HR, Pohl T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics* 2006; 6: 4688-703.
24. Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 1991; 63: A1193-202.
25. Brown RS, Lennon JJ. Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser-desorption ionization linear time-of-flight mass-spectrometry. *Anal Chem* 1995; 67: 1998-2003.
26. Chaurand P, Sanders ME, Jensen RA, Caprioli RM. Proteomics in diagnostic pathology. Profiling and imaging proteins directly in tissue sections. *Am J Pathol* 2004; 165: 1057-68.
27. Kricka LJ, Master SR, Joos TO, Fortina P. Current perspectives in protein array technology. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 457-67.
28. Aguilar-Mahecha A, Hassan S, Ferrario C, Basik M. Microarrays as validation strategies in clinical samples: tissue and protein microarrays. *OMICS* 2006; 10: 311-26.
29. Bino RJ, Hall RD, Fiehn O, et al. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Sci* 2004; 9: 418-25.
30. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics. *Xenobiotica* 1998; 29: 1181-9.
31. Griffin JL, Nicholls AW. Metabolomics as a functional genomic tool for understanding lipid dysfunction in diabetes, obesity and related disorders. *Pharmacogenomics* 2006; 7: 1095-1107.
32. Vaidyanathan S, Gaskell S, Goodacre R. Matrix-suppressed laser desorption/ionization mass spectrometry and its suitability for metabolome analyses. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20: 1192-8.
33. Check E. Fetal genetic testing: screen test. *Nature* 2005; 438: 733-4.