

MARKERI DE LEZIUNE PODOCITARĂ ÎN NEFROPATIILE GLOMERULARE

Rezumatul tezei de doctorat

Doctorand: Silvia Spânu

Conducător științific: Prof. Dr. Mirela Gherman-Căprioară

CUPRINS

ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEXT	11
INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Structura podocitelor	19
1.1. Morfologie și biologie celulară	19
1.2. Interacțiunile dintre citoscheletul podocitar și membrana bazală glomerulară	21
2. Rolul și funcția podocitelor	22
3. Leziunea podocitelor	22
3.1. Factori de agresiune podocitară	22
3.2. Situsul agresiunii la nivel podocitar	23
3.3. Raspunsul podocitelor la factorii de agresiune	23
4. Consecințele leziunilor și disfuncțiilor podocitare, implicații în progresia nefropatiilor cronice	23
4.1. Fuziunea pedicelelor	24
4.2. Podocitopenia și mecanismul dezvoltării glomerulosclerozei	24
4.3. Podocitopatiile	25
4.3.1. Oprirea în dezvoltare a glomerulului	26
4.3.2. Construcția și menținerea deficitară a membranei bazale glomerulare	26
4.3.3. Modificări ale fenotipului podocitar și glomerulopatia cu leziuni minime	26
4.3.4. Depleția podocitară (podocitopenia și glomeruloscleroza focală și segmentală)	27
4.3.5. Dediferențierea podocitară cauzează glomerulopatia colabantă	27
4.3.6. Leziunea, pierderea și proliferarea podocitelor în glomerulopatiile imune și inflamatorii	28
4.3.7. Nefroangioscleroza și podocitele	28
4.3.8. Glomeruloscleroza diabetică ca și consecință a hipertrofiei glomerulare și podocitare	29
4.3.9. Aportul caloric crescut, obezitatea și glomeruloscleroza	29
4.3.10. Glomerulopatia asociată îmbătrânirii	29
5. Stadiul actual al cercetărilor în domeniul marker-ilor de leziune podocitară	29
5.1. Podocituria	30
5.2. Excreția urinară de markeri podocit- specifici: nefrinuria, podocalixinuria	31
5.3. Excreția urinară de ARN mesager podocit- specific	32
6. Studiul exosomilor urinari ca sursă potențială de markeri de leziune podocitară	33
6.1. Definiția, compoziția și identificarea exosomilor urinari	33
6.2. Biogeneza și eliberarea exosomilor	34
6.3. Rolul biologic al exosomilor	36
6.4. Stadiul actual al cercetărilor privind exosomii urinari ca sursă potențială de markeri de leziune podocitară	37
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	41
Ipoteza generală de lucru	43
I. Analiza fuziunii pedicelelor ca marker ultrastructural de leziune podocitară:	

Relația dintre fuziunea pedicelilor și proteinurie în nefropatiile glomerulare	45
Introducere	45
Material și metode	45
Rezultate	47
Discuții	50
Concluzii	52
II. Analiza exosomilor urinari ca sursă potențială de biomarkeri de leziune podocitară în evaluarea noninvazivă a nefropatiilor glomerulare	53
1. Izolarea exosomilor urinari prin metoda centrifugării diferențiale	53
1.1. Premize și obiective	53
1.2. Material și metode	54
1.3. Rezultate	55
1.4. Discuții	57
1.5. Concluzii	59
2. Izolarea exosomilor urinari prin metoda ultrafiltrării	61
2.1. Premize și obiective	61
2.2. Material și metode	61
2.3. Rezultate	63
2.4. Discuții	64
2.5. Concluzii	66
3. Identificarea exosomilor urinari pe baza criteriilor biochimice- separarea electroforetică a proteinelor exosomale urinare	67
3.1. Premize și obiective	67
3.2. Material și metode	68
3.3. Rezultate	70
3.4. Discuții	72
3.5. Concluzii	74
4. Analiza ARN-ului exosomal urinar ca sursă potențială de biomarkeri de leziune podocitară în nefropatiile glomerulare.	75
4.1. Stabilirea metodei de izolare a ARN exosomal urinar	75
4.1.1. Premize și obiective	75
4.1.2. Metodologie generală	76
4.1.3. Metode de izolare a ARN exosomal urinar	77
4.1.4. Rezultate	78
4.1.5. Discuții	91
4.1.6. Concluzii	94
4.2. Analiza ARN exosomal urinar pe modelul experimental de sindrom nefrotic indus de puromicină (PAN)	95
4.2.1. Premize și obiective	95
4.2.2. Material și metode	96
4.2.3. Rezultate	99
4.2.4. Discuții	114
4.2.5. Concluzii	120
Concluzii generale	121
Originalitatea tezei	123
REFERINȚE	125
ANEXE	

CUVINTE CHEIE: podocit, nefropatii glomerulare, exosomi urinari, biomarkeri podocitari

INTRODUCERE

Nefropatiile (NP) glomerulare sunt responsabile de circa 90% din cazurile de insuficiență renală terminală, implicand costuri considerabile aferente metodelor de substituție a funcției renale, dializa și transplantul renal. În ultimii ani cercetarea nefrologică s-a focusat pe studiul biologiei celulare podocitare și a plasat

această celulă, diferențiată terminal, cu capacitate de replicare limitată în centrul fiziologiei, patologiei și progresiei NP glomerulare.

Din aceste considerente se depun mari eforturi în prezent pentru identificarea de biomarkeri noninvazivi în vederea prevenției insuficienței renale terminale prin identificarea precoce și clasificarea adecvată a NP glomerulare, alegerea tratamentului optim și monitorizarea acestuia. S-a încercat evaluarea leziunii podocitare prin analiza mai complexă a sedimentului urinar și anume evaluarea podocituriei, excreției urinare de proteine podocit specifice și de ARN mesager (ARNm) corespunzător acestor proteine. Deși studiile preliminare au avut rezultate promițătoare toate aceste metode întâmpină la ora actuală dificultăți de ordin tehnic, care împiedică utilizarea lor în practica clinică.

Ulterior, s-au efectuat o serie de studii preliminare asupra exosomilor urinari ca sursă de biomarkeri. Exosomii sunt vezicule membranare cu diametre cuprinse între 40 și 100 de nm, care sunt eliberate în variate fluide biologice de către variate tipuri celulare. Observațiile care au atras atenția asupra exosomilor urinari ca sursă potențială de biomarkeri au fost următoarele: sunt eliberați de către toate tipurile de celule epiteliale renale, sunt vezicule stabile și rezistente la degradarea prin variate enzime urinare, conțin proteine cunoscute a fi implicate în variate NP și conțin de asemenea acizi nucleici intacti.

În acest sens cercetarea de față își propune să evalueze gradul de fuziune al pedicelilor podocitare ca marker ultrastructural de leziune podocitară și rolul exosomilor urinari ca sursă noninvazivă de biomarkeri de leziune podocitară în NP glomerulare.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

I. Analiza fuziunii pedicelilor ca marker ultrastructural de leziune podocitară: Relația dintre fuziunea pedicelilor și proteinurie în nefropatiile glomerulare

Introducere

Podocitele sunt celule epiteliale specializate, localizate pe suprafața externă a membranei bazale glomerulare (MBG) pe care se fixează prin intermediul unor procese celulare – pedicelele. Podocitele împreună cu celulele endoteliale și MBG reprezintă componentele esențiale ale barierei de filtrare glomerulară, care împiedică pierderea urinară de proteine. Fuziunea pedicelilor este observată în glomerulopatii (GP) care se manifestă prin proteinurie, mai ales în GP cu leziuni minime (GPLM) – unde fuziunea difuză a pedicelilor este singura modificare morfologică observată. Fuziunea pedicelilor este prezentă invariabil și în glomeruloscleroza focală și segmentală (GSFS) și GP membranară (GPM).

Până în prezent s-au efectuat puține studii care să abordeze analiza fuziunii pedicelilor în mod cantitativ, iar relația dintre gradul de fuziune al pedicelilor și proteinurie rămâne un subiect dezbătut.

Obiectivul studiului a fost reprezentat de evaluarea relației dintre proteinurie și gradul de fuziune al pedicelilor în NP glomerulare umane care s-au manifestat prin proteinurie de rang nefrotic și subnefrotic.

Material și metode

Pacienți. În studiu s-au inclus 37 de pacienți evaluați prin biopsie renală în scop diagnostic în perioada ianuarie 1999- decembrie 2008 în Clinica de Nefrologie Cluj. Pacienții au fost împărțiți în două grupuri: grupul care la data biopsiei renale a prezentat proteinurie de rang nefrotic (proteinurie glomerulară >3,5 g/24 h) (N=17) și grupul de pacienți care au prezentat proteinurie subnefrotică (0,16-3,4 g/24 h) (N=20).

Examinarea biopsiilor renale. Fragmentul bioptic renal a fost examinat în microscopie optică (MO), microscopie cu imunofluorescență (IF) și microscopie electronică de transmisie (TEM) în toate cazurile.

Măsurarea fuziunii pedicelilor. S-au fotografiat și analizat pentru fiecare caz 5 arii glomerulare diferite. Pentru fiecare caz s-au măsurat aproximativ 100 μm MBG. Pedicelele de-a lungul MBG măsurate s-au numărat manual. S-a considerat drept pedicel orice segment epitelial conectat cu MBG între două fante de filtrare. Pentru fiecare caz s-a calculat lățimea medie a pedicelilor (LMP), precum urmează: $LMP = \pi/4 \cdot \Sigma \text{lungime MBG} / \Sigma \text{pedicele}$, unde $\pi/4$ reprezintă un factor de corecție pentru variația întâmplătoare presupusă a unghiului de secțiune raportat la axul lung al podocitului. Valoarea obținută a fost folosită pentru a calcula în final LMP pentru fiecare grup.

Analiza statistică. Diferențele între cele două grupuri s-au determinat cu testul t. Diferențele au fost considerate semnificative când $p < 0,05$. Corelația dintre proteinurie și LMP s-a efectuat cu testul Spearman.

Rezultate

Nivelurile proteinuriei și ale colesterolului seric au fost semnificativ mai mari la grupul cu sindrom nefrotic comparativ cu grupul cu proteinurie subnefrotică ($p < 0,01$). Albuminemia a fost semnificativ mai mică la grupul cu sindrom nefrotic (SN) ($p < 0,01$).

În grupul fără sindrom nefrotic pedicelele au fost bine conservate, deși s-a observat fuziunea segmentală a acestora la unele cazuri. LMP în acest grup a fost de 422 ± 90 nm. La pacienții cu SN s-a observat fuziunea mai extinsă a pedicelelor, iar în 7 cazuri: GPLM (N=3), GPM (N=3) și GSFS (N=1) fuziunea pedicelelor a fost difuză. LMP în grupul cu SN a fost de 1195 ± 517 nm, semnificativ mai mare comparativ cu grupul pacienților fără SN ($p < 0,001$).

Proteinuria medie în grupul nonSN a fost de $1,4 \pm 0,9$ g/24h, iar în grupul SN a fost de $7,5 \pm 3,3$ g/24h, diferența fiind statistic semnificativă ($p < 0,001$). Proteinuria s-a corelat cu gradul de fuziune al pedicelelor când s-au analizat toți pacienții luați în studiu ($r = 0,65$; $p < 0,001$). Proteinuria nu s-a corelat cu LMP în niciunul din grupurile studiate- nonSN ($r = 0,08$; $p = 0,38$), iar SN ($r = 0,11$; $p = 0,36$).

Concluzii

- Diferența între lățimea medie a pedicelelor în grupul pacienților cu sindrom nefrotic a fost semnificativ mai mare comparativ cu pacienții cu glomerulopatii care s-au manifestat cu proteinurie subnefrotică.
- Gradul de fuziune al pedicelelor s-a corelat cu nivelul proteinuriei la pacienții studiați.

II. Analiza exosomilor urinari ca sursă potențială de biomarkeri de leziune podocitară în evaluarea noninvazivă a nefropatiilor glomerulare

1. Izolarea exosomilor urinari prin metoda centrifugării diferențiale (CD)

Premize și obiective

Urina este un fluid biologic complex, conținând elementele fazei lichide- compusă din proteinele solubile filtrate liber în glomerul și elementele fazei solide sau sedimentul, care poate fi concentrat prin centrifugare la viteza redusă. Acest sediment este compus în principal din celule epiteliale desprinse de pe tractul urinar și cilindrii. În plus urina conține numeroși exosomi urinari, care derivă practic din toate tipurile de celule epiteliale care vin în contact cu spațiul urinar, inclusiv podocitele glomerulare. Având o densitate foarte joasă, pentru izolarea acestora este necesară ultracentrifugarea, iar vizualizarea exosomilor urinari este posibilă doar în microscopie electronică.

Deși în ultimii ani s-au efectuat o serie de studii privind modul ideal de tratare a probelor urinare în vederea izolării exosomilor urinari, cercetarea în acest domeniu se confruntă în continuare cu absența unor protocoale standardizate de izolare și conservare a exosomilor urinari. Pentru izolarea exosomilor urinari se utilizează în mod curent două metode, prima se bazează pe CD a urinei, iar a doua pe ultrafiltrarea (UF) urinei printr-o nanomembrană.

Principalele obiective ale acestui studiu au fost reprezentate de: stabilirea unei metode de izolare a exosomilor urinari prin CD și stabilirea unui protocol de colectare și conservare a probelor de urină în vederea izolării exosomilor urinari.

Material și metode

Colectarea și stocarea probelor de urină. S-a colectat urina provenită din spotul urinar (a 2-a urină de dimineață) de la pacienți cu variate GP confirmate bioptic, aflați în observația Ambulatorului de Glomerulopatii (Medizinische Klinik II- UK Aachen, Germania) și de la voluntari sănătoși. Urina s-a recoltat în flacoane sterile de 50 de ml. Imediat după colectare fiecare probă a fost tratată cu inhibitori de proteaze și substanțe antibacteriene. Probele astfel tratate s-au stocat imediat la -80°C până la prelucrare.

Izolarea exosomilor urinari. Probele au fost decongelate la temperatura camerei în ziua prelucrării și s-au centrifugat la viteza de 13.000 rpm, 15 min. la 4°C . S-a recuperat supernatantul rezultat, fără a fragmenta sedimentul. Supernatantul s-a transferat în tuburi de înaltă viteză și s-a supus ultracentrifugării la 47.500

rpm, 1 oră la 4°C pentru a obține un sediment de membrane cu densitate joasă. Ultracentrifugarea s-a repetat până s-a prelucrat întreg supernatantul obținut în urma centrifugării la 13.000 rpm. Sedimentul astfel obținut a fost resuspendat în soluție de izolare și stocat imediat la -80°C până în momentul procesării.

Examinarea în TEM. Sedimentul obținut în urma ultracentrifugării unei probe provenită de la un voluntar sănătos a fost resuspendat în proporție de 1:1 în glutaraldehidă 3%. Grila a fost contrastată cu acetat de uraniu 0,5% și analizată la microscopul electronic JEOL 1200 EX.

Rezultate

Examinarea preparatului exosomal în TEM a relevat prezența unor microvezicule cu diametre variabile, cuprinse între 20 și 200 de nm. Majoritatea au avut diametre cuprinse între 40 și 80 de nm, dimensiune caracteristică exosomilor precum și morfologie tipică pentru această subpopulație de microvezicule urinare și anume peretele cu dublu contur.

Concluzii

- Prin metoda CD s-au izolat microvezicule urinare cu diametre variabile, majoritatea având diametre și morfologie caracteristice exosomilor urinari.
- Utilizarea celui de-al doilea spot urinar a fost adecvată ca și material de start pentru izolarea exosomilor urinari.
- Tratarea probei de urină după colectare cu inhibitori de proteaze și substanțe bactericide și congelarea la -80°C până la procesarea ulterioară au prevenit degradarea microveziculelor urinare.

2. Izolarea exosomilor urinari prin metoda ultrafiltrării (UF)

Premize și obiective

Deși metoda de izolare a exosomilor urinari prin metoda CD este considerată cea mai eficientă, ea prezintă unele dezavantaje, precum timpul îndelungat necesar etapei de ultracentrifugare și de numărul redus de probe ce pot fi prelucrate într-o runda de ultracentrifugare, care împiedică utilizarea ei în laboratorul clinic. În acest context s-a propus izolarea exosomilor urinari prin ultrafiltrare într-un concentrator cu nanomembrană disponibil comercial. Proteinele pot fi concentrate în interiorul membranei de 100 de ori, recuperarea proteinelor solubile poate atinge 95%, iar probele sunt concentrate în 10-30 de minute.

Obiectivul prezentului studiu a fost reprezentat de evaluarea eficienței acestei metode de izolare a exosomilor urinari în cazul prelucrării probelor de urină provenite de la pacienți diagnosticați cu variate GP.

Material și metode

Colectarea și stocarea probelor de urină s-a realizat conform protocolului utilizat în studiul anterior. S-a utilizat spotul urinar (a 2-a urina de dimineața) de la un caz de nefropatie cu IgA (NIgA), un caz de GSFS, un caz de GPM și de la un voluntar sănătos.

Izolarea exosomilor urinari prin metoda ultrafiltrării printr-o nanomembrană. Probele au fost decongelate la temperatura camerei în ziua prelucrării și centrifugate la viteza de 13.000 rpm, 15 minute, la 4°C. Supernatantul obținut astfel a fost prelucrat în continuare prin utilizarea concentratorului cu nanomembrană Vivaspin 20 (Sartorius, Goettingen, Germania). Probele de urină s-au centrifugat în concentrator la 3.000xg, 30 minute la temperatura camerei. S-au recuperat fracțiunile exosomale din concentrator și s-au congelat imediat la -80°C până la procesarea ulterioară.

Examinarea în TEM. Preparatul exosomal dintr-o probă provenită de la un voluntar sănătos recuperat din concentrator a fost examinat conform protocolului din studiul anterior.

Rezultate

În urma procesării probelor în concentratorul cu nanomembrană au rezultat volume variabile de fracțiune exosomală: 200 μl în cazul celor două probe provenite de la voluntarul sănătos, 450 μl în cazul probei provenite de la pacientul diagnosticat cu GSFS. În cazul probelor de la pacientul diagnosticat cu NIgA și de la cel diagnosticat cu GPM nu s-a produs ultrafiltrarea datorită coagulării nanomembranei.

Examinarea în TEM a relevat prezența unor microvezicule urinare cu diametre cuprinse între 20 și 500 de nm. Majoritatea au avut diametre cuprinse între 20 și 200 nm.

Concluzii

- Izolarea exosomilor urinari prin metoda UF a fost eficientă în cazul probelor provenite de la voluntarul sănătos și de la un pacient diagnosticat cu GSFS.
- Examinarea în TEM a fracțiunii exosomale obținută prin această metodă de izolare a evidențiat că majoritatea au avut diametre cuprinse între 40 și 100 de nm.
- Nanomembrana a coagulat când s-au procesat probe de la pacienți cu proteinurie semnificativă.

3. Identificarea exosomilor urinari pe baza criteriilor biochimice- separarea electroforetică a proteinelor exosomale urinare

Premize și obiective

Identificarea microveziculelor urinare ca și exosomi necesită îndeplinirea a două criterii, cele morfologice- discutate în primele două studii ale prezentei lucrări și criteriile biochimice- pentru evaluarea cărora este necesară analiza conținutului proteic al exosomilor urinari.

Analiza proteomică a exosomilor a evidențiat că exosomii conțin două tipuri de proteine: proteinele comune tuturor exosomilor, care certifică originea lor endosomală și proteinele specifice celulei de origine care ar putea sugera rolul biologic al exosomilor. Printre proteinele comune tuturor exosomilor se numără Tsg101 și Alix/AIP1, cu rol în biogeneza exosomilor. A doua componentă proteică a exosomilor este reprezentată de proteine specifice celulei de origine- precum podocina, podocalixina și nefrina în cazul podocitelor.

Obiectivul acestui studiu a fost reprezentat de identificarea exosomilor urinari pe baza criteriilor biochimice prin: identificarea proteinelor exosomale comune (Tsg101 și ALIX) și identificarea originii podocitare a exosomilor urinari prin evidențierea proteinelor podocitare (podocina, podocalixina, nefrina)

Material și metode

Colectarea probelor de urină și izolarea exosomilor urinari (metoda CD) s-au realizat conform protocoalelor stabilite în studiile anterioare.

Separarea proteinelor exosomale urinare prin Western blot s-a realizat conform protocolului sistemului Invitrogen®. Proteinele migrate în gel au fost transferate pe membrane de nitroceluloză (Amersham Biosciences- Hybond). Incubarea cu anticorpii primari s-a realizat peste noapte la 4°C. S-au utilizat anticorpii: anti AQP2, 30 kDa (Sigma Aldrich); anti AIP1, 105 kDa (BD Biosciences); anti Tsg101, 46 kDa (Abcam); anti podocalixină, 160 kDa, (Alpha Diagnostic); anti podocină – 42 kDa și anti nefrină – 100 kDa (cadou de la grupul de cercetare Möller). Incubarea cu anticorpii secundari corespunzatori s-a efectuat 1 oră, la temperatura camerei. Vizualizarea s-a realizat prin chemiluminescență. S-au comparat benzile proteice din probe cu scara markerului care conține proteine cu GM cunoscute.

Rezultate

Nu s-a reușit identificarea AIP1 (Alix), a AQP2 și a nefrinei în probele analizate în Western blot- uri seriate. Tsg101 a fost identificată în încercări seriate (un voluntar sănătos și un pacient cu NIgA). Identificarea podocalixinei s-a reușit într-o singură încercare, identificarea nefiind reproductibilă ulterior. Podocalixina a fost identificată în majoritatea probelor analizate (voluntari sănătoși, doi pacienți cu NIgA și doi pacienți cu GPM). Podocina a fost identificată în încercări seriate la un voluntar sănătos, dar nu și în proba unui pacient cu NIgA.

Concluzii

- Identificarea Tsg101- o proteină exosomală constitutivă sugerează originea endosomală a microveziculelor analizate.
- Identificarea podocinei și a podocalixinei sugerează originea podocitară a cel puțin unei fracțiuni dintre microveziculele analizate.
- Coprecipitarea unor proteine urinare abundente în fracțiunea exosomală a interferat cu detecția altor proteine podocitare studiate.

4. Analiza ARN-ului exosomal urinar ca sursă potențială de biomarkeri de leziune podocitară în nefropatiile glomerulare

4.1. Stabilirea metodei de izolare a ARN exosomal urinar

Premize și obiective

Cercetările privind evaluarea exosomilor urinari ca sursă de biomarkeri noninvazivi în NP medicale sunt canalizate la ora actuală pe două direcții: analiza proteomică, care prezintă dezavantajul coprecipitării în fracțiunea exosomală a proteinelor urinare abundente, care interferează cu identificarea proteinelor exosomale și a doua direcție este reprezentată de analiza acizilor nucleici exosomalii.

Este cunoscut faptul că urina totală conține acizi nucleici, însă aceștia nu reprezintă o sursă sensibilă de biomarkeri deoarece ar putea proveni din celule apoptotice a căror profil transcripțional nu îl reflectă pe cel al celulelor funcționale. Exosomii urinari sunt eliberați din celule viabile și astfel profilul acizilor nucleici din interiorul lor ar reda profilul transcripțional al celulelor funcționale.

S-a evidențiat recent că exosomii urinari au un profil al acizilor nucleici similar cu cel al țesutului renal, conținând atât ARN ribozomal cât și ARN mesager corespunzător unor proteine specifice fiecărui segment al nefronului. ARN exosomal urinar ar putea reprezenta astfel o sursă fiabilă de biomarkeri noninvazivi în evaluarea NP glomerulare.

Obiectivul principal al prezentului studiu a fost reprezentat de stabilirea unei metode de izolare a ARNm exosomal urinar în vederea analizării ulterioare a profilului ARNm corespunzător proteinelor podocitare în variate NP glomerulare.

Metodologie generală

Colectarea și stocarea probelor de urina s-a realizat conform protocolului stabilit în primul studiu.

Prelucrare-Izolarea exosomilor urinari s-a realizat prin metoda CD. Sedimentul obținut în urma ultracentrifugării a fost resuspendat în soluția de liză din kit-urile de izolare a ARN și stocat imediat la -80°C .

Cuantificarea ARN-ului s-a realizat prin spectroscopie optică pentru domeniul ultraviolet (UV) și cu platforma Agilent 2100 Bioanalyzer.

Metode de izolare a ARN exosomal urinar

ARN-ul a fost izolat conform protocoalelor producătorilor. Pentru fiecare kit s-au evaluat în paralel probe de la voluntari sănătoși și de la pacienți cu variate GP. Experiment 1: RNeasy Mini Kit (Qiagen); Experiment 2: Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit (Invitex); Experiment 3: ZR RNA Micro Prep (Zymo Research); Experiment 4: TRIzol Reagent (Invitrogen); Experiment 5: RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen).

Experiment 6: Amplificarea ARNului exosomal urinar izolat cu RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) cu Arcturus RiboAmp HS PLUS Amplification Kit (Applied Biosystems). Analiza qRT-PCR a probelor de ARN amplificate. Amplificarea ARN-ului izolat cu RNeasy Plus Micro Kit s-a realizat în două runde, conform protocolului producătorului, din proba de la un voluntar sănătos și un pacient diagnosticat cu NIGA. Pentru transcriptia ARNa în ADNc s-a utilizat sistemul de sinteză a ADNc Superscript (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Probele transcrise s-au stocat la -20°C până la procesarea ulterioară. Probele de ARNa transcrise în ADNc în etapa anterioară au fost supuse analizei prin reacție de polimerizare în lanț cu revers transcripție în timp real (qRT-PCR). Pentru qRT-PCR s-a utilizat sistemul de Real-Time PCR 7300 (Applied Biosystems). Probele au fost analizate în duplicat în vederea detecției ARNm corespunzător glyceraldehyde-3-phosphatase dehidrogenase (GAPDH) și a ARNr subunitatea 18S.

Rezultate

Nu s-a reușit izolarea de ARN exosomal urinar cu nici unul din kit-urile utilizate de rutină în laborator. În urma izolării ARN cu RNeasy Plus Micro Kit și a amplificării acestuia în două runde s-a obținut ARN în cantitate suficientă și de calitate adecvată pentru studii ulterioare. Nu s-a decelat prezența ARNr în probele analizate.

Concluzii

- Metoda de CD a urinii a fost eficientă pentru izolarea microveziculelor urinare în vederea extracției de ARN exosomal urinar.
- Resuspendarea fracțiunii exosomale în soluțiile de liză din kit-urile de izolare a ARN a fost eficientă în menținerea integrității ARN-ului exosomal urinar.

- Exosomii urinari conțin cantități foarte reduse de ARN, amplificarea acestuia fiind necesară pentru generarea de ARN de calitate și cantitate adecvată în vederea analizei ulterioare.

4.2. Analiza ARN exosomal urinar pe modelul experimental de sindrom nefrotic indus de puromicină (PAN)

Premize și obiective

Nefropatia indusă de puromicină reprezintă prototipul experimental al GPLM și GSFS. Această NP se caracterizează prin fuziunea pedicelilor și proteinurie de rang nefrotic. Podocitele sunt ținta primară a leziunii induse de puromicin aminonucleoside, astfel modelul experimental PAN a devenit un mijloc important de investigare a fiziopatologiei podocitare.

Administrarea de puromicină determină producția de radicali liberi de oxigen, care cauzează leziuni directe ale ADN-ului. Modificările ultrastructurale observate în cursul PAN corespund cu cele observate în GPLM umană. Nivelurile alterate de ARNm și proteine, precum și alterarea funcției podocalixinei, actinei, podocinei și nefrinei au fost raportate la animalele cu PAN. Modificările citoscheletului de actină au fost observate la 3 zile după administrarea puromicinei și au fost urmate de detașarea podocitelor și proteinurie masivă.

Obiectivele acestui studiu au fost reprezentate de izolarea ARN-ului exosomal urinar în cantitate suficientă și de calitate adecvată de la animalele cu PAN și analiza ulterioară a acestuia pentru identificarea de posibili markeri de evaluare noninvazivă a leziunii podocitare.

Material și metode

Realizarea modelului experimental. În studiu au fost incluși 16 șobolani masculi Sprague Dawley (Harlan Winkelmann of Germany®). Boala a fost indusă sub anestezie la 8 animale în ziua 1 a experimentului prin administrarea intraperitoneală de puromycin aminonucleoside (Sigma Aldrich) în doză de 150 mg/kgc. Lotul martor a fost compus din 8 animale care au fost injectate intraperitoneal cu câte 1 ml ser fiziologic 0,9%. S-a colectat urina/16 ore în zilele 0-3-5-10 și 15 și s-a determinat proteinuria și creatininuria. Fiecare probă a fost tratată cu inhibitori de proteaze și substanțe antibacteriene și stocată la -80°C. S-a determinat urea și creatinina serică în zilele 0-5-10 și 15 ale experimentului. În ziua 16 animalele au fost sacrificate și s-a prelevat țesut renal în vederea analizei în MO,IF, IHC și TEM.

Izolarea exosomilor urinari. S-a realizat din fiecare probă de urină colectată/ 16h prin metoda CD.

Izolarea și amplificarea ARN exosomal urinar. S-au prelucrat exosomii urinari de la 3 animale PAN din zilele 0-5 și 10 a bolii. ARN-ul exosomal a fost izolat conform protocolului kit-ului de izolare RNeasy Plus Micro kit (Qiagen) și amplificat conform protocolului kit-ului Arcturus RiboAmp HS PLUS Amplification Kit (Applied Biosystems). ARNa astfel obținut a fost stocat la -80°C până la prelucrare ulterioară.

Affimetrix gene chip array. Colectarea probelor de ARN și generarea de ARN complementar biotinitat (ARNc) s-a realizat conform Affimetrix GeneChip® Expression Analysis Technical Manual (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA). S-au determinat valorile de exprimare a fiecărui set de probe și s-au comparat între diferitele momente ale PAN, respectiv ziua 5 versus ziua 0 și ziua 15 versus ziua 0 prin utilizarea software-ului Affimetrix Microarray Suite 5.0.

Revers- transcripția și reacția de polimerizare în lanț în timp real cantitativă (qRT-PCR). S-a realizat cu sistemul de sinteză a ADNc Superscript (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), iar pentru qRT-PCR s-a utilizat sistemul Real- Time PCR 7300 (Applied Biosystems).

Analiza genelor. Genele de interes au fost analizate, în ceea ce privește proteinele codificate și funcția/rolul biologic al acestora, prin utilizarea bazei de date GeneCards V3®.

Rezultate

După inducția bolii s-a constatat apariția proteinuriei masive la lotul cu PAN începând cu ziua a 5-a a experimentului. Proteinuria a atins niveluri maxime în ziua a 10-a, iar în ziua a 15-a s-a observat tendința de scădere a acesteia. S-a observat de asemenea o alterare tranzitorie a funcției renale, evidențiată de creșterea parametrilor funcției renale (ureea și creatinina serică). Creșterea celor doi parametri serici a fost maximă în ziua a 5-a cu scădere progresivă, pâna la nivelurile de bază în ziua 10 și 15. Diureza medie la lotul PAN a

scăzut semnificativ în ziua a 5-a a bolii, moment în care s-a constatat retenția azotată maximă, comparativ cu ziua a 3-a a bolii ($p < 0,05$).

Analiza Gene array a ARN exosomal urinar a evidențiat exprimarea a 7384 de gene. Dintre acestea 1495 de gene au avut diferențe de exprimare de cel puțin 1,5 ori între cele trei momente ale bolii. 608 dintre aceste gene au fost secvențe satelit sau gene ipotetice, iar 887 dintre ele au corespuns unor gene cunoscute. Dintre genele cunoscute 78 au avut diferențe de exprimare de cel puțin 3 ori între cele trei momente ale bolii. În urma analizei genelor cu diferențe de exprimare acestea au putut fi grupate în: gene ale citoscheletului și a matricii extracelulare, gene ale aparatului exosomal, gene implicate în apoptoză și gene asociate cu stresul oxidativ. Majoritatea genelor cu diferențe de exprimare identificate, codifică proteine ale citoscheletului celular.

Expresia Actg (codifică actina) a scăzut progresiv în cele trei momente ale PAN la analiza Gene array. La analiza qRT-PCR patternul expresiei a evidențiat un peak de expresie în ziua 5. Expresia Des (codifică desmina) a crescut constant în cursul PAN. În cazul genei Vim (codifică vimentina) expresia a fost maximă în ziua a 5-a a PAN, scăzând în ziua a 10-a, dar nu până la nivelurile detectate în ziua 0. Variația expresiei celor două gene, Tuba1a și Tuba1c (codifică subunitatea alfa a microtubulilor) a fost similară, cu peak de expresie în ziua 5 și scădere în ziua 10. Genele Arpc2 și Dstn codifică proteinele reglatoare ale citoscheletului, actin related protein complex și respectiv destrina. Variația expresiei celor două gene a fost similară la cele două metode de analiză, Gene array și qRT-PCR.

Concluzii

- Administrarea de puromicină a indus proteinurie masivă la animalele experimentale. S-a constatat de asemenea alterarea tranzitorie a funcției renale cu scăderea diurezei.
- La analiza prin Gene array s-a reușit evidențierea unor grupe de gene care s-au corelat cu mecanisme fiziopatologice cunoscute a sindromului nefrotic experimental indus de puromicină, respectiv stresul oxidativ, apoptoza și reorganizarea citoscheletului podocitar.
- Din grupa genelor asociate citoscheletului s-au identificat cinci gene foarte probabil podocitare și anume: Actg, Des, Vim, Tuba1a și Tuba1c, și două gene reglatoare ale actinei: Arpc2 și Dstn, care ar putea reprezenta biomarkeri promițători de evaluare noninvazivă a leziunii podocitare în NP generatoare de sindrom nefrotic.

CONCLUZII GENERALE

1. La grupul de pacienți cu diverse nefropatii glomerulare studiat, gradul de fuziune al pedicelelor s-a corelat cu nivelul proteinuriei. Studiarea unor loturi nosologic uniforme de pacienți cu nefropatii glomerulare ar putea să definească mai precis valoarea fuziunii pedicelelor ca marker ultrastructural de leziune podocitară.
2. Prin metoda centrifugării diferențiale s-au izolat microvezicule urinare, majoritatea dintre acestea având caracteristicile exosomilor urinari.
3. Utilizarea celui de-al doilea spot urinar a fost adecvată ca și material de start pentru izolarea exosomilor urinari. Tratarea probei de urină după colectare cu inhibitori de proteaze și substanțe bactericide și congelarea probelor de urină astfel tratate la -80°C , până la procesarea ulterioară, a fost adecvată pentru păstrarea integrității exosomilor urinari.
4. Izolarea exosomilor urinari prin metoda ultrafiltrării prin nanomembrană nu a fost eficientă în cazul prelucrării probelor urinare de la pacienți cu proteinurie severă.
5. Prin identificarea proteinei exosomale constitutive Tsg101 și a podocinei s-a demonstrat originea podocitară a cel puțin unei fracțiuni din exosomii urinari izolați.
6. Coprecipitarea unor proteine urinare abundente în fracțiunea exosomală izolată prin centrifugare diferențială a interferat cu identificarea altor proteine podocitare. Sunt necesare studii în vederea identificării unor metode de purificare suplimentară a preparatului exosomal.
7. Exosomii urinari conțin cantități reduse de ARN, iar pentru analiza ulterioară a acestuia a fost necesară etapa de amplificare a ARN exosomal urinar.
8. Realizarea modelului de sindrom nefrotic experimental indus de puromicină (PAN) a fost corespunzătoare, fapt certificat de apariția proteinuriei masive a animalele de experiență.

9. La analiza prin Gene array s-a reusit evidențierea unor grupe de gene implicate în mecanisme fiziopatologice cunoscute din cadrul sindromului nefrotic experimental indus de puromicină, respectiv stresul oxidativ, apoptoza și reorganizarea citoscheletului podocitar.

10. Din grupa genelor asociate citoscheletului s-au identificat șapte gene foarte probabil podocitare cu potențial promițător de biomarkeri de evaluare noninvazivă a leziunii podocitare în nefropatiile glomerulare generatoare de sindrom nefrotic.

11. Pentru stabilirea rolului de biomarkeri de evaluare noninvazivă a leziunii podocitare a acestor gene va fi necesară corelarea în studii ulterioare a expresiei lor exosomale cu nivelul proteinelor codificate de acestea sau cu pattern-ul de expresie a acestor gene în țesutul renal al animalelor cu PAN prin metode obiective: imunohistochimic, respectiv, hibridizare in situ.

CURRICULUM VITAE

1. **Nume:** Spânu
2. **Prenume:** Silvia
3. **Data și locul nașterii:** 3 martie 1982, Cluj-Napoca
4. **Cetățenie:** Româna
5. **Stare civilă:** Necăsătorită
6. **Studii:**

<i>Instituția</i>	Colegiul Național „George Coșbuc Cluj”- Secția de limbă germană maternă	Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca; Facultatea de Medicină
<i>Perioada: de la (luna, anul) până la (luna, anul)</i>	Septembrie 1989- Iunie 2001	Octombrie 2001- Iulie 2007
<i>Grade sau diplome/premierii obținute (anul)</i>	- Deutsches Sprachdiplom der Kultusministerkonferenz Stufe 2 (2000) - Diploma de Bacalaureat (2001)	- Premiul II pentru rezultate deosebite obținute în formarea profesională ca viitor medic, acordat de Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca (2003) - Diploma de participare la Cursul de Morfopatologie al D-lui Prof. Dr. Horst Weidenbach de la Universitatea din Leipzig, Germania (2005) - Premiul II pentru rezultate deosebite obținute în formarea profesională ca viitor medic, acordat de Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca (2006) - Diploma de licență Doctor Medic (2007)

7. **Titlul științific:** Doctorand (Domeniul Medicină), din noiembrie 2007

8. Experiența profesională

<i>Perioada de la (luna, anul) până la (luna, anul)</i>	Noiembrie 2007- Octombrie 2011	Ianuarie 2008- prezent	Mai 2009- Septembrie 2010	Noiembrie 2011- prezent
<i>Locul:</i>	Cluj-Napoca	Cluj-Napoca	Aachen, Germania	Cluj-Napoca
<i>Instituția:</i>	Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, Catedra de Nefrologie	Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj, Clinica de Nefrologie	Rheinisch Westfälische Technische Hochschule Aachen ,Universitätsklinikum Aachen, Medizinische Klinik II	Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, Catedra de Nefrologie
<i>Funcția:</i>	Doctorand cu frecvență bursier	Medic rezident nefrologie	- Guest researcher (Mai 2009 – Septembrie 2009) - Bursier Erasmus LLP (Octombrie 2009- Septembrie 2010)	Asistent universitar
<i>Descriere:</i>	Activitate de cercetare științifică și didactică	Pregătire profesională în specialitatea nefrologie	Activitate de cercetare nefrologică fundamentală și clinică în ambulatorul de glomerulopatii	Activitate de cercetare științifică și didactică

9. Locul de muncă actual și funcția:

- Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Catedra de Nefrologie: Asistent universitar, Doctorand cu frecvență
- Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj, Clinica de Nefrologie: Medic rezident anul IV, specialitatea Nefrologie

10. Vechime la locul de muncă actual: 4 ani și 4 luni

11. Lucrări științifice publicate in extenso în calitate de prim/coautor :

1. Spânu C, Crăciun C, Spânu Silvia, Florescu P, Cristea Anca. Aportul microscopiei electronice în diagnosticul bioptic al nefropatiilor medicale. Ann. RSCB 2008;13:87-91. – **CNCSIS B+**
2. Spânu Silvia, Crăciun C, Spânu C, Florescu P, Cristea Anca, Gherman-Căprioară Mirela. Aportul microscopiei electronice în diagnosticul bioptic al sindroamelor nefrotice. Rev. Med. Farm, Tg. Mureș 2008;54:481-483. – **CNCSIS C**
3. Spânu Silvia, Kacso Ina Maria, Spânu C, Florescu P, Cristea Anca, Crăciun C, Gherman-Căprioară Mirela. Sindroame nefrotice la adulți explorate prin biopsie renală în județul Cluj și unele județe limitrofe: spectru etiologic, aspecte epidemiologice. Clujul Medical 2009;82(2):212-216. – **CNCSIS B+**
4. Spânu Silvia, Spânu C, Petrov L, Zdrenghia M, Todea Daniela. Insuficiență renală acută prin sindrom de liză tumorală spontană. Nefrologia 2009;12:169-172.

5. Spânu Silvia, Gherman-Căprioară Mirela. Exosomii urinari: un nou mijloc de evaluare noninvazivă a nefropatiilor glomerulare? Clujul Medical 2010;83(3):414-420. – **CNCSIS B+**
6. Spânu Silvia, Crăciun C, Spânu C, Gheman-Căprioară Mirela. Correlation between podocyte foot process effacement and proteinuria in human glomerular diseases. Studia Univ. VG, SSV 2011,21(3):463-468. – **CNCSIS B+, SCOPUS, EBSCO, Index Copernicus, ProQuest.**

12. Lucrări prezentate la manifestări științifice naționale și internaționale în calitate de prim/coautor :

1. „Aportul microscopiei electronice în diagnosticul bioptic al nefropatiilor medicale”
Autori: Spânu C, Crăciun C, Spânu Silvia, Florescu P, Cristea Anca, prezentare poster la „A XXVI-a Sesiune Științifică Anuală a Societății Naționale de Biologie Celulară”, Cluj-Napoca, 12-15 iunie 2008.
2. „Aportul microscopiei electronice în diagnosticul bioptic al sindroamelor nefrotice”
Autori: Spânu Silvia, Crăciun C, Spânu C, Florescu P, Cristea Anca, Gherman-Căprioară Mirela, prezentare orală la „Prima Conferință a Doctoranzilor în Medicină și Farmacie din Târgu-Mureș”, 9-11 iulie 2008.
3. „Urinary exosomes a noninvasive biomarker of glomerular diseases?” Autori: Silvia Spânu, Dagmar Wieland, R Star, J Floege, Anja Mühlfeld, prezentare orală în cadrul „The 6th International Congress on Uremia Research and Toxicity”, Sinaia, 18 octombrie 2009 (rezumat publicat în „Nefrologia” 2009;33(13):108-109).
4. „Exosomurie als neuartige Untersuchungsmethode zur Frühdiagnostik renaler Läsionen” Autori: Anja Mühlfeld, Silvia Spânu, Claudia van Royen, Bernd Denecke, Jürgen Floege, prezentare poster în cadrul „3. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Nephrologie”, Berlin, 10-13 septembrie 2011.
5. „Urinary exosomes may represent a new diagnostic tool for early diagnosis of renal damage” Autori: Anja Mühlfeld, Silvia Spânu, Bernd Denecke, Jürgen Floege, prezentare poster în cadrul „American Society of Nephrology Kidney Week 2011”, Philadelphia, 8-13 noiembrie 2011 (rezumat publicat în „Journal of the American Society of Nephrology Abstract Supplement” pg. 774A).

13.Limbi străine cunoscute:

- Germană – Deutsches Sprachdiplom der Kultusministerkonferenz Stufe 2 (nivel B2/C1)
- Engleză – IELTS Academic Module Band 7,5 (nivel C1/C2)

14. Memoriu de activitate științifică

Am început activitatea de cercetare în anul 2005 cu ocazia elaborării lucrării de licență în care am analizat spectrul etiologic și aspecte epidemiologice al sindroamelor nefrotice evaluate bioptic în Clinica de Nefrologie Cluj. Principalele rezultate ale lucrării au fost valorificate prin publicare într-o revistă indexată CNCSIS B+.

Cu ocazia stagiului de cercetare efectuat în Aachen, Germania am lucrat într-un laborator de cercetare nefrologică fundamentală. În prima perioadă a stagiului am asimilat tehnici și metode utilizate în mod curent într-un laborator de cercetare fundamentală, precum: imunohistochimia, tehnica efectuării Western blot-ului, metodologia de bază pentru lucrul cu culturi celulare, metodologia desfășurării unui studiu cu animale experimentale și metodologia de lucru pentru izolarea și cuantificarea acizilor nucleici.

Ulterior am lucrat la proiectul de cercetare „Exosomurie - ein neuartiger Ansatz zur Aktivitätsbeurteilung von Nierenerkrankungen ” în care am analizat rolul exosomilor

urinari sa sursă de biomarkeri în nefropatiile glomerulare. Rezultatele preliminariei ale studiilor efectuate au fost prezentate în cadrul a 3 congrese internaționale de prestigiu și vor servi drept bază pentru cercetări ulterioare într-un domeniu puțin explorat până la ora actuală.

MARKERS OF PODOCYTE INJURY IN GLOMERULAR DISEASES

Summary of the PhD Thesis

PhD Candidate: Silvia Spânu

Scientific Advisor: Prof. Dr. Mirela Gherman-Căprioară

TABLE OF CONTENTS

ABBREVIATIONS	11
INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	17
1. Structure of podocytes	19
1.1. Morphology and cell biology	19
1.2. Podocyte cytoskeleton - glomerular basement membrane interactions	21
2. Role and function of podocytes	22
3. Podocyte injury	22
3.1. Podocyte aggression factors	22
3.2. Aggression situs at podocyte level	23
3.3. Podocyte response to injury	23
4. Consequences of podocyte injury and disfunctions, implications on progression of chronic nephropathies	23
4.1. Podocyte foot process effacement	24
4.2. Podocytopenia and development of glomerulosclerosis	24
4.3. Podocytopathies	25
4.3.1. Arrested glomerular development	26
4.3.2. Defective glomerular basement membrane construction and maintainance	26
4.3.3. Podocyte phenotypic switch and minimal change disease	26
4.3.4. Podocyte depletion (podocytopenia and focal segmental glomerulosclerosis)	27
4.3.5. Podocyte dedifferentiation causes collapsing glomerulopathy	27
4.3.6. Podocyte injury, loss and proliferation in immune and inflammatory glomerulopathies	28
4.3.7. Nephroangiosclerosis and the podocyte	28
4.3.8. Diabetic glomerulosclerosis as a consequence of glomerular enlargement and podocyte loss	29
4.3.9. High calorie intake, obesity and glomerulosclerosis	29
4.3.10. Ageing associated glomerulopathy	29
5. Current state of research on markers of podocyte injury	29
5.1. Podocyteuria	30
5.2. Urinary loss of podocyte specific proteins: nephrinuria, podocalyxinuria	31
5.3. Detection of urinary podocyte specific messenger RNA	32
6. Urinary exosomes as potential source of podocyte injury markers	33
6.1. Definition, composition and identification of urinary exosomes	33
6.2. Biogenesis and release of exosomes	34
6.3. Biological role of exosomes	36
6.4. Current state of research on urinary exosomes as potential source of podocyte injury markers	37
PERSONAL CONTRIBUTIONS	41
General hypothesis	43
I. Analysis of podocyte foot process effacement as ultrastructural marker of podocyte injury: Relationship between podocyte foot process effacement and proteinuria in glomerular diseases	45
Introduction	45

Material and methods	45
Results	47
Discussions	50
Conclusions	52
II. Analysis of urinary exosomes as potential source of noninvasive podocyte injury markers in glomerular diseases	53
1. Urinary exosome isolation via differential centrifugation	53
1.1. Premises and objectives	53
1.2. Material and methods	54
1.3. Results	55
1.4. Discussions	57
1.5. Conclusions	59
2. Urinary exosome isolation via ultrafiltration	61
2.1. Premises and objectives	61
2.2. Material and methods	61
2.3. Results	63
2.4. Discussions	64
2.5. Conclusions	66
3. Urinary exosome identification based on biochemical criteria- electrophoretic separation of urinary exosomal proteins	67
3.1. Premises and objectives	67
3.2. Material and methods	68
3.3. Results	70
3.4. Discussions	72
3.5. Conclusions	74
4. Analysis of urinary exosomal RNA as potential source of biomarkers for podocyte injury in glomerular diseases	75
4.1. Establishment of a method for urinary exosomal RNA isolation	75
4.1.1. Premises and objectives	75
4.1.2. General methodology	76
4.1.3. Urinary exosomal RNA isolation methods	77
4.1.4. Results	78
4.1.5. Discussions	91
4.1.6. Conclusions	94
4.2. Urinary exosomal RNA analysis in the experimental nephrotic syndrome induced by puromycin (PAN)	95
4.2.1. Premises and objectives	95
4.2.2. Material and methods	96
4.2.3. Results	99
4.2.4. Discussions	114
4.2.5. Conclusions	120
General conclusions	121
Originality of the research	123
REFERENCES	125
ANNEXES	

KEYWORDS: Podocyte, glomerular diseases, urinary exosomes, podocyte biomarkers

INTRODUCTION

Glomerular diseases (GD) account for approximately 90% of the cases of end stage renal failure, implying significant costs associated with renal replacement therapy methods, dialysis and transplantation. During the last decades nephrology research has focused on the study of podocyte cell biology and has placed this terminally differentiated cell, with limited capacity of proliferation in the center of the physiology, pathology and progression of GD.

In these regards considerable efforts are being made to identify noninvasive biomarkers for prevention of end stage renal failure by means of early detection and adequate classification of GD. A few studies have evaluated podocyte injury by means of a more complex analysis of the urinary sediment, i.e. by evaluation of podocyteuria, the urinary excretion of podocyte specific proteins and their corresponding messenger RNA (mRNA). Although these studies revealed promising results, all these methods still encounter technical difficulties, which prevent their application in clinical practice.

Recent preliminary studies have evaluated urinary exosomes as a potential source of biomarkers of renal diseases. Exosomes are membrane vesicles with diameters ranging between 40 and 100 nm, which are released in various biological fluids by various cell types. The following observations drew attention on urinary exosomes as potential source of biomarkers: they are released by all renal epithelial cell types, they are stable vesicles which resist to urinary enzyme degradation, they harbour proteins known to be involved in various nephropathies and intact nucleic acids.

Consequently, the aims of the present research are to evaluate firstly, the role of podocyte foot process effacement as an ultrastructural marker and secondly, the role of urinary exosomes as noninvasive source of biomarkers of podocyte injury in GD.

PERSONAL CONTRIBUTION

I. Analysis of podocyte foot process effacement as ultrastructural marker of podocyte injury: Relationship between podocyte foot process effacement and proteinuria in glomerular diseases

Introduction

Podocytes are specialized epithelial cells, located on the outer surface of the glomerular basement membrane (GBM) to which they adhere via cellular processes- known as foot processes. Podocytes, together with the endothelial cells and the GBM are the main compounds of the glomerular filtration barrier, which prevents urinary loss of proteins. Foot process effacement is present in GD which present with proteinuria, especially in minimal change disease (MCD)- where foot process effacement is the only observed modification. Foot process effacement is also invariably present in focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) and membranous nephropathy (MN).

Few studies have approached the quantitative analysis of podocyte foot process effacement to date and the relationship between the extent of foot process effacement and level of proteinuria is still controversial.

The aim of the study was to evaluate the relationship between proteinuria and the degree of podocyte foot process effacement in human GD which presented with nephrotic range and non-nephrotic proteinuria.

Material and methods

Patients. 37 patients evaluated by renal biopsy for diagnostic purposes between January 1999 and December 2008 in the Nephrology Clinic Cluj were included in the study. The patients were divided in two groups: the group which presented with nephrotic range proteinuria (glomerular proteinuria >3,5 g/24 h) (N=17) and the group with non- nephrotic proteinuria (0,16-3,4 g/24 h) (N=20) at the time of biopsy.

Renal biopsy examination. The biopsy specimen was examined in optic microscopy (OM), immunofluorescence microscopy (IF) and transmission electron microscopy (TEM) in all cases.

Foot process effacement quantitation. 5 different glomerular areas were photographed and analyzed for each case. Approximately 100 μm GBM were measured for each case. The foot processes along the measured GBM were counted by hand. A foot process was defined as any connected epithelial segment butting on the GBM between neighbouring filtration pores or slits. For each case the arithmetic mean foot process width (FPW) was calculated as follows: $\text{FPW} = \pi/4 \cdot \Sigma \text{GBM length} / \Sigma \text{foot process}$, where $\pi/4$ serves to correct for presumed random variation in the angle of section relative to the long axis of the podocyte. The obtained value was used to calculate the mean FPW for each of the two groups.

Statistical analysis. Differences between groups were determined by the t test. Differences were considered significant when $p < 0,05$. Correlation analysis was performed using the Spearman test.

Results

The levels of proteinuria and serum cholesterol were significantly higher in the nephrotic syndrome (NS) group versus the non-nephrotic group ($p < 0,01$). Albuminemia was significantly lower in the NS group ($p < 0,01$).

Foot processes were well conserved in the non-nephrotic group, although segmental effacement was detected in some cases. Mean FPW in this group was 422 ± 90 nm. In the NS group extensive foot process effacement was observed and in 7 cases: MCD (N=3), MN (N=3) and FSGS (N=1) foot process effacement was diffuse. Mean FPW in the NS group was 1195 ± 517 nm, significantly higher than the mean FPW of the non-nephrotic group ($p < 0,001$).

Mean proteinuria in the non-nephrotic group was $1,4 \pm 0,9$ g/24h and $7,5 \pm 3,3$ g/24h in the NS group. The difference was statistically significant ($p < 0,001$). Proteinuria correlated to FPW when all patients were analyzed as a single group ($r = 0,65$; $p < 0,001$). Proteinuria did not correlate to FPW when the groups were analyzed separately (non-nephrotic group: $r = 0,08$; $p = 0,38$ and NS group: $r = 0,11$; $p = 0,36$).

Conclusions

- The mean FPW in the NS group was significantly higher compared to the mean FPW of the group with non-nephrotic proteinuria.
- The degree of foot process effacement correlated to the level of proteinuria in the studied patient population.

II. Analysis of urinary exosomes as potential source of noninvasive podocyte injury markers in glomerular diseases

1. Urinary exosome isolation via differential centrifugation (DC)

Premises and objectives

Urine is a complex biological fluid containing liquid phase elements - soluble proteins which are freely filtered in the glomerulus and solid phase elements or the urinary sediment, which can be concentrated by centrifugation at a low speed. This sediment contains mainly epithelial cells from the urinary tract and casts. In addition urine contains several exosomes, released by practically all epithelial cell types facing the urinary space, including podocytes. Because of their low density, exosomes can be concentrated only by ultracentrifugation and their visualization is possible only by electron microscopy examination.

Although a series of studies have recently analyzed the ideal handling of urine samples for exosome isolation, the research in this field is still facing the absence of standardized protocols for exosome isolation and preservation. Two methods are currently used for exosome isolation, the first one relies on DC of the urine sample and the second one relies on UF of the sample through a nanomembrane.

The aims of this study were: the establishment of a method for urinary exosome isolation via DC and the establishment of a protocol for collection and preservation of urine samples for exosome isolation.

Material and methods

Collection and storage of urine samples. The second morning urine spot was collected from patients with various GD biologically confirmed and followed in the Glomerular Diseases Ambulance (Medizinische Klinik II-UK Aachen, Germany) and from healthy volunteers. Urine samples were collected in sterile 50 ml containers, treated with protease inhibitors and antibacterial substances and immediately stored at -80°C until further processing.

Urinary exosome isolation. The samples were thawed at room temperature and centrifuged at 13.000 rpm, 15 min. at 4°C . The supernatant was recovered without fragmentation of the sediment, transferred into high speed tubes and ultracentrifuged at 47.500 rpm, 1 hour, at 4°C in order to obtain a low density membrane sediment. The ultracentrifugation step was repeated until the whole supernatant from the 13.000xg centrifugation was used. The sediment obtained after ultracentrifugation was resuspended in isolation solution and immediately stored at -80°C , until further processing.

TEM examination. The sediment from a healthy volunteer obtained via ultracentrifugation was resuspended in 3% glutaraldehyde 1:1. The grid was contrasted with 0,5% uranyl acetate and analyzed with the JEOL 1200 EX microscope.

Results

Examination of the exosome fraction in TEM revealed the presence of microvesicles with diameters ranging from 20 to 200 nm. Most vesicles had diameters between 40 and 100 nm, characteristic for urinary exosomes as well as typical exosome morphology i.e. double contour vesicle membranes.

Conclusions

- Urinary microvesicles with various diameters were isolated via DC, still, most of them had the size and morphology characteristic for urinary exosomes.
- The second morning urine sample proved to be adequate as starting material for urinary exosome isolation.
- Treatment of the urine sample with protease inhibitors, antibacterial agents and storage at -80°C prevented urinary vesicle degradation.

2. Urinary exosome isolation via ultrafiltration (UF)

Premises and objectives

Although DC is considered the most efficient for urinary exosome isolation, the method has some disadvantages like the long time required for sample processing and a reduced number of samples that can be processed at once, which prevent its application in a clinical laboratory. In these regards an alternative method for urinary exosome isolation by means of ultrafiltration in a commercially available nanomembrane concentrator was proposed. Proteins can be concentrated by a 100 fold in the membrane, the recovery of soluble proteins can reach 95% and the samples are concentrated in 10-30 minutes.

The aim of this study was to evaluate the efficiency of this method for urinary exosome isolation from samples of patients diagnosed with various GD.

Material and methods

Collection and storage of urine samples was performed according to the protocol established in the previous study. Urine samples from one patient with IgA nephropathy (IgAN), one with FSGS, one with MN and a healthy volunteer were processed.

Urinary exosome isolation. The samples were thawed at room temperature and centrifuged at 13.000 rpm, 15 min. at 4°C . The supernatant was recovered without fragmentation of the sediment and processed in the nanomembrane concentrator Vivaspin 20 (Sartorius, Goettingen, Germany). The samples were centrifuged in the concentrator at 3.000xg, 30 min. at room temperature. The exosomal fraction was recovered from the concentrator and stored immediately at -80°C , until further processing.

TEM examination. The exosomal fraction from the sample of the healthy volunteer was processed as described in the previous study.

Results

Various exosomal fraction volumes were recovered after processing in the nanomembrane concentrator: 200 μl from the two samples from the healthy volunteer, 450 μl from the patient with FSGS. The samples from the IgAN and the MN patient did not ultrafiltrate due to clotting of the nanomembrane.

TEM revealed urinary microvesicles with diameters ranging from 20 to 500 nm. Most of them had diameters between 20 and 200 nm.

Conclusions

- Urinary exosome isolation via UF was efficient for processing of samples from a healthy volunteer and a FSGS patient.
- TEM examination of the exosomal fraction revealed that most of the isolated vesicles had diameters corresponding to urinary exosomes.
- The nanomembrane clotted when urine samples from highly proteinuric patients were processed.

3. Urinary exosome identification based on biochemical criteria - electrophoretic separation of urinary exosomal proteins

Premises and objectives

The identification of urinary microvesicles as exosomes requires the fulfillment of two criteria, the morphological ones- discussed in the previous studies of this research and the biochemical criteria- which require the evaluation of the urinary exosomal protein contents.

Proteomic analysis of exosomes revealed that they contain two sets of proteins: exosomal constitutive proteins, which certify their endosomal origin and could suggest their biological role and a set of proteins characteristic for the cell of origin. The proteins Tsg101 and Alix/AIP1 have been identified among the constitutive exosomal proteins and are believed to play a role in exosome biogenesis. The second protein compound is represented by proteins specific for the cell of origin- podocin, podocalyxin and nephrin in the case of podocytes.

The aim of this study was to identify urinary exosomes by means of their biochemical characteristics by identification of common exosomal proteins (Tsg101 and ALIX) and to demonstrate their podocytic origin by identification of podocyte specific proteins (podocin, podocalyxin, nephrin).

Material and methods

Urine sample collection and exosome isolation (DC method) were performed according to the protocols established in the previous studies of the present research. .

Urinary exosomal protein separation was performed by Western blot according to the protocol of the Invitrogen® system. Proteins migrated in gele were transferred on nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences- Hybond). Incubation with the first antibody (anti AQP2, 30 kDa (Sigma Aldrich); anti AIP1, 105 kDa (BD Biosciences); anti Tsg101, 46 kDa (Abcam); anti podocalyxin, 160 kDa, (Alpha Diagnostic); anti podocin – 42 kDa and anti nephrin – 100 kDa (gift from the Möller research group) was performed overnight at 4°C. Incubation with the corresponding secondary antibody was performed for 1 hour at room temperature. Visualisation was realized by chemiluminescence. Protein bands were compared to the ladder of the marker with known mollecular weights.

Results

AIP1 (Alix), AQP2 and nephrin could not be identified in the analyzed samples in repeated Western blots. Tsg101 was identified in repeated blots (a healthy volunteer and an IgAN patient). The identification of podocalyxin succeeded only once. Podocalyxin was identified in most of the processed samples (healthy volunteers, 2 patients with IgAN and 2 patients with MN). Podocin could be identified repeatedly in the sample from a healthy volunteer, bot not in the sample of a patient with IgAN.

Conclusions

- The identification of Tsg101 suggests the endosomal origin of the analyzed microvesicles.
- The identification of podocin and podocalyxin suggest the podocytic origin of at least a fraction of the analyzed microvesicles.
- Coprecipitation of abundant urinary proteins ocured and interfered with the detection of other podocyte specific proteins of interest.

4. Analysis of urinary exosomal RNA as potential source of biomarkers for podocyte injury in glomerular diseases

4.1. Establishment of a method for urinary exosomal RNA isolation

Premises and objectives

Research on urinary exosomes as noninvasive source of biomarkers of kidney injury follows currently two directions: proteomic analysis, with the disadvantage of coprecipitation of abundant urinary proteins in the exosomal fraction and consecutive intereference with the identification of exosomal proteins and a second direction represented by the analysis of exosomal nucleic acid contents.

It is known that urine contains nucleic acids, but they are not suitable biomarkers because they could be released from apoptotic cells and so, do not reflect the transcriptional profile of functioning cells. Exosomes are released from functional cells and the nucleic acids they contain would reflect the transcriptional profile of functioning cells. It has recently been shown that urinary exosomes have a nucleic acid profile similar to that of kidney tissue, harbouring ribosomal RNA as well as mRNA corresponding to proteins specific for every segment of the nephron. In these regards urinary exosomal RNA could represent a reliable source of noninvasive biomarkers for the evaluation of GD.

The aim of this study was to establish a method for urinary exosomal RNA isolation for further analysis of the mRNA profile corresponding to podocyte specific proteins in GD.

General methodology

Collection and storage of urine samples was performed according to the protocol established in the first study of the present research.

Urinary exosome isolation was performed using the DC method. The exosomal pellet obtained after ultracentrifugation was resuspended in the lysis solution of the various RNA isolation kits and stored immediately at -80°C.

RNA quantification was performed via ultraviolet spectroscopy and by Agilent 2100 Bioanalyzer.

Exosomal RNA isolation methods

RNA was isolated according to the manufacturers protocols. For each kit samples from healthy volunteers were processed in parallel with samples from patients diagnosed with various glomerular diseases.

Experiment 1: RNeasy Mini Kit (Qiagen); Experiment 2: Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit (Invitek); Experiment 3: ZR RNA Micro Prep (Zymo Research); Experiment 4: TRIzol Reagent (Invitrogen); Experiment 5: RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen).

Experiment 6: Amplification of urinary exosomal RNA (Arcturus RiboAmp HS PLUS Amplification Kit - Applied Biosystems). Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) analysis.

Amplification of RNA samples isolated by the RNeasy Plus Micro Kit protocol was performed in two rounds according to the manufacturers protocol, from the sample of a healthy volunteer and an IgAN patient. The cDNA synthesis system Superscript (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) was used for transcription of aRNA into cDNA. The samples were further analyzed by qRT-PCR using the Real- Time PCR 7300 system (Applied Biosystems). The samples were analyzed in duplicate for glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH) and rRNA subunit 18S.

Results

Urinary exosomal RNA could not be identified in the analyzed samples after isolation with the kits currently used for RNA purification. After isolation with the RNeasy Plus Micro Kit and amplification of the RNA in two rounds, sufficient RNA and of good quality for further downstream studies could be detected. rRNA could not be detected in the analyzed samples.

Conclusions

- DC was efficient for urinary exosome isolation for further urinary exosomal RNA extraction.
- Storage of the exosomal fraction in the lysis solutions from the RNA isolation kits was efficient in preserving the integrity of urinary exosomal RNA.
- Urinary exosomes contain small amounts of RNA, making the amplification step mandatory for further downstream analysis.

4.2. Urinary exosomal RNA analysis in the experimental nephrotic syndrome induced by puromycin (PAN)

Premises and objectives

Puromycin induced nephrosis represents the experimental prototype of MCD and FSGS. This nephropathy is characterized by podocyte foot process effacement and nephrotic range proteinuria. Podocytes are the main target of injury induced by puromycin aminonucleoside- so the experimental PAN model has become an important tool for investigation of podocyte physiopathology.

Puromycin administration induces production of free oxygen radical species which cause direct DNA damage. The ultrastructural changes observed during PAN correspond to those seen in human MCD. Altered

levels of mRNA and proteins, as well as alteration of podocalyxin, actin, podocin and nephrin function have been reported in animals with PAN. Modifications of the podocyte actin cytoskeleton have been observed 3 days after disease induction and were followed by podocyte detachment and massive proteinuria.

The aims of this study were to isolate urinary exosomal RNA of good quality from the experimental animals and its further analysis for identification of possible noninvasive markers of podocyte injury.

Material and methods

The experimental model. 16 male Sprague Dawley rats (Harlan Winkelmann of Germany®) were included in the study. Disease was induced under anesthesia in 8 animals at day 1 of the experiment by intraperitoneal injection of 150 mg/kg puromycin aminonucleoside (Sigma Aldrich). 8 control animals were injected with 1 ml 0,9% saline. 16 hour urine collections were performed at day 0-3-5-10 and 15 and proteinuria and creatininuria were measured. Each sample was treated and stored according to the protocol of the first study. Serum urea and creatinine were determined at day 0-5-10 și 15 of the experiment. The animals were sacrificed at day 16 and renal tissue was collected for OM, IF, IHC and TEM analysis.

Urinary exosome isolation. Was performed for each 16 h urine sample by DC.

Urinary exosomal RNA isolation and amplification. Urinary exosomes from 3 PAN animals from day 0-5 and 10 were processed according to the protocols of RNeasy Plus Micro kit (Qiagen) and Arcturus RiboAmp HS PLUS Amplification Kit (Applied Biosystems). The obtained aRNA was stored at -80°C until further processing.

Affimetrix gene chip array. RNA sample collection and generation of complementary biotinylated RNA (ARNc) were realized according to the Affimetrix GeneChip® Expression Analysis Technical Manual (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA). Expression values were determined for each sample set and compared between different moments of PAN, day 5 versus day 0 and day 15 versus day 0 with the Affimetrix Microarray Suite 5.0 software.

qRT-PCR analysis. Was performed with the Superscript cDNA synthesis system (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). The Real-Time PCR 7300 system (Applied Biosystems) was used for qRT-PCR.

Gene analysis. The genes of interest were analyzed regarding the proteins they code for and their function/biological role with the GeneCards V3® database.

Results

After disease induction massive proteinuria was detected starting with day 5 in the PAN animals. Proteinuria reached maximum levels at day 10 and started to decrease at day 15 of the disease. A temporary reduction of renal function, indicated by increase of serum urea and creatinine, could be observed at day 5 with gradual decrease of the two parameters to baseline from day 10 to day 15. Medium urine output in the PAN animals decreased significantly at day 5, when the highest levels of urea and creatinine were measured, compared to day 3 ($p < 0,05$).

Gene array analysis of the urinary exosomal RNA revealed the expression of 7384 de genes. 1495 of these genes had expression level differences of at least 1,5 fold at the three analyzed time points of PAN. 608 of these genes were satellite sequences or hypotetic genes, while 887 corresponded to known genes. 78 of the known genes had expression differences of at least 3 fold at the analyzed time points. The genes with expression differences could be grouped in genes associated with the cytoskeleton and extracellular matrix, exosome associated genes, genes involved in apoptosis and oxidative stress associated genes. Most of the genes with expression difference coded for cell cytoskeleton proteins.

Actg (encodes actin) expression decreased progressively at the 3 time points of PAN on Gene array analysis. qRT-PCR analysis revealed an expression peak at day 5. Des (encodes desmin) expression increased constantly during the course of PAN. Expression of Vim (encodes vimentin) peaked at day 5 and decreased at day 10, but did not reach baseline expression values. The expression pattern of Tuba1a and Tuba1c (encode the alpha subunit of microtubules) was similar, with an expression peak at day 5 and a decrease at day 10. Arpc2 and Dstn encode the cytoskeleton regulatory proteins actin related protein complex and respectively destrin. The expression pattern of these two genes corresponded on Gene array and qRT-PCR analysis.

Conclusions

- Puromycin induced massive proteinuria in the experimental animals. A transient decrease of renal function with the reduction of diuresis was also observed.
- Gene array analysis revealed groups of genes which correlated with known physiopathological mechanisms of the puromycin induced nephrotic syndrome, i.e. oxidative stress, apoptosis and podocyte cytoskeleton reorganization.
- 5 genes which encode very probable podocytic proteins (Actg, Des, Vim, Tuba1a and Tuba1c) and 2 actin regulating genes (Arpc2 and Dstn) were identified in the group of genes associated with the cell cytoskeleton, which could represent promising noninvasive biomarkers of podocyte injury for GD causing NS.

GENERAL CONCLUSIONS

1. The degree of podocyte foot process effacement correlated to the level of proteinuria in the patient group diagnosed with various GD. The evaluation of a more uniform nosologic patient population with GD could define the role of foot process effacement as an ultrastructural marker of podocyte injury more precisely.
2. Urinary microvesicles were isolated by DC, most of them having the morphological characteristics of urinary exosomes.
3. The second morning urine spot sample was adequate as starting material for urinary exosome isolation. Treatment of urine samples with protease inhibitors, antibacterial agents and storage at -80°C prevented urinary exosome degradation.
4. Urinary exosome isolation via UF in a nanomembrane concentrator was not suitable for samples from patients with significant proteinuria.
5. The identification of the exosomal constitutive protein Tsg101 and podocin proved the podocytic origin of at least a fraction of the isolated urinary exosomes.
6. Coprecipitation of abundant urinary proteins in the exosomal fraction during DC interfered with the identification of other podocyte specific proteins. Further studies are necessary to establish methods for supplementary purification of the exosomal fraction.
7. Urinary exosomes harbour small amounts of RNA implying an amplification step for further downstream analysis of exosomal RNA.
8. The experimental nephrotic syndrome induced by puromycin was adequate as certified by the massive proteinuria detected in the PAN animals.
9. Gene array analysis revealed groups of genes involved in known physiopathological mechanisms of PAN, i.e. oxidative stress, apoptosis and podocyte cytoskeleton reorganization.
10. Seven genes encoding very probable podocytic proteins were identified in the group of cell cytoskeleton associated genes, with promising potential as noninvasive biomarkers of podocyte injury in GD causing NS.
11. Further correlation studies of the exosomal expression of these 7 genes to the level of encoded proteins or to the expression pattern of these genes in renal tissue of PAN animals are necessary to establish their role as noninvasive biomarkers of podocyte injury.

CURRICULUM VITAE

1. **Last name:** Spânu
2. **First name:** Silvia
3. **Date and place of birth:** March 3^{ed}, 1982, Cluj-Napoca
4. **Citizenship:** Romanian
5. **Marital status:** Not married

6. Education:

<i>Institution</i>	Colegiul Național „George Coșbuc Cluj”- Secția de limbă germană maternă	Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca
<i>Period</i>	September 1989- June 2001	October 2001- July 2007
<i>Degrees obtained</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Deutsches Sprachdiplom der Kultusministerkonferenz Stufe 2 (2000) - Baccalaureate (2001) 	<ul style="list-style-type: none"> - 2nd Price for special results obtained during the formation as future doctor - Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca (2003) - Participation at the Pathology Lecture of Prof. Dr. Horst Weidenbach- Leipzig University, Germany (2005) - 2nd Price for special results obtained during the formation as future doctor - Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca (2006) - Medical Doctor (2007)

7. Scientific title: PhD Student, since November 2007

8. Professional experience:

<i>Period</i>	November 2007-October 2011	January 2008-present	May 2009- September 2010	November 2011-present
<i>Location:</i>	Cluj-Napoca	Cluj-Napoca	Aachen, Germany	Cluj-Napoca
<i>Institution:</i>	Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, Department of Nephrology	Cluj County Emergency Hospital, Nephrology Clinic	Rheinisch Westfälische Technische Hochschule Aachen ,Universitätsklinikum Aachen, Medizinische Klinik II	Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, Department of Nephrology
<i>Position:</i>	PhD Student	Resident in nephrology	<ul style="list-style-type: none"> - Guest researcher (May 2009 – September 2009) - Erasmus LLP scholarship holder (October 2009- September 2010) 	Teaching Assistant
<i>Description:</i>	Didactic and research activities	Professional nephrology training	Basic nephrology research and clinical training in the glomerular diseases ambulance	Didactic and research activities

9. Current place of work and position:

- Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, Department of Nephrology: Teaching Assistant, PhD Student
- Cluj County Emergency Hospital, Nephrology Clinic: 4th year Nephrology resident

10. Time worked at the current workplace: 4 years and 4 months

11. Publications:

1. Spânu C, Crăciun C, Spânu Silvia, Florescu P, Cristea Anca. Aportul microscopiei electronice în diagnosticul bioptic al nefropatiilor medicale. Ann. RSCB 2008;13:87-91. – **CNCSIS B+**
2. Spânu Silvia, Crăciun C, Spânu C, Florescu P, Cristea Anca, Gherman-Căprioară Mirela. Aportul microscopiei electronice în diagnosticul bioptic al sindroamelor nefrotice. Rev. Med. Farm, Tg. Mureș 2008;54:481-483. – **CNCSIS C**
3. Spânu Silvia, Kacso Ina Maria, Spânu C, Florescu P, Cristea Anca, Crăciun C, Gherman-Căprioară Mirela. Sindroame nefrotice la adulți explorate prin biopsie renală în județul Cluj și unele județe limitrofe: spectru etiologic, aspecte epidemiologice. Clujul Medical 2009;82(2):212-216. – **CNCSIS B+**
4. Spânu Silvia, Spânu C, Petrov L, Zdrenghia M, Todea Daniela. Insuficiență renală acută prin sindrom de liză tumorală spontană. Nefrologia 2009;12:169-172.
5. Spânu Silvia, Gherman-Căprioară Mirela. Exosomii urinari: un nou mijloc de evaluare noninvazivă a nefropatiilor glomerulare? Clujul Medical 2010;83(3):414-420. – **CNCSIS B+**
6. Spânu Silvia, Crăciun C, Spânu C, Gheman-Căprioară Mirela. Correlation between podocyte foot process effacement and proteinuria in human glomerular diseases. Studia Univ. VG, SSV 2011,21(3):463-468. – **CNCSIS B+, SCOPUS, EBSCO, Index Copernicus, ProQuest.**

12. Presentations at national and international scientific manifestations:

1. „Aportul microscopiei electronice în diagnosticul bioptic al nefropatiilor medicale” Authors: Spânu C, Crăciun C, Spânu Silvia, Florescu P, Cristea Anca, poster presentation at „A XXVI-a Sesiune Științifică Anuală a Societății Naționale de Biologie Celulară”, Cluj-Napoca, 12-15 June 2008.
2. „Aportul microscopiei electronice în diagnosticul bioptic al sindroamelor nefrotice” Authors: Spânu Silvia, Crăciun C, Spânu C, Florescu P, Cristea Anca, Gherman-Căprioară Mirela, oral presentation at „Prima Conferință a Doctoranzilor în Medicină și Farmacie din Târgu-Mureș”, 9-11 July 2008.
3. „Urinary exosomes a noninvasive biomarker of glomerular diseases?” Authors: Silvia Spânu, Dagmar Wieland, R Star, J Floege, Anja Mühlfeld, oral presentation at „The 6th International Congress on Uremia Research and Toxicity”, Sinaia, October 18th, 2009 (abstract published in „Nefrologia” 2009;33(13):108-109).
4. „Exosomurie als neuartige Untersuchungsmethode zur Frühdiagnostik renaler Läsionen” Authors: Anja Mühlfeld, Silvia Spânu, Claudia van Royen, Bernd Denecke, Jürgen Floege, poster presentation at „3. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Nephrologie”, Berlin, 10-13 September 2011.
5. „Urinary exosomes may represent a new diagnostic tool for early diagnosis of renal damage” Authors: Anja Mühlfeld, Silvia Spânu, Bernd Denecke, Jürgen Floege, poster presentatio at the „American Society of Nephrology Kidney Week 2011”,

Philadelphia, 8-13 November 2011 (abstract published in the „Journal of the American Society of Nephrology Abstract Supplement” pg. 774A).

13. Foreign languages:

German – Deutsches Sprachdiplom der Kultusministerkonferenz Stufe 2 (Level B2/C1)

English – IELTS Academic Module Band 7,5 (Level C1/C2)

14. Memo concerning scientific activity

I started my research activity in 2005 while I was working on my graduation thesis. I studied the etiology and epidemiology of the nephrotic syndrome investigated by renal biopsy in the Department of Nephrology Cluj. The main results of this research were published in a CNCSIS B+ journal.

During the time I spent in Aachen, Germany I had the opportunity to work in a nephrology basic research laboratory. During the first period I learned basic techniques used in a basic research laboratory- mainly immunohistochemistry, the western blot technique, cell culture handling, the methodology of performing an animal experiment and various methods for nucleic acid isolation and purification.

I participated afterwards on the research project „Exosomurie - ein neuartiger Ansatz zur Aktivitätsbeurteilung von Nierenerkrankungen ” where I analyzed the role of urinary exosomes as a source of biomarkers of glomerular diseases. The preliminary results of the research were presented at 3 prestigious international congresses and will be used for further research in a currently understudied area.